Usporedba ELISA i LC-MS/MS tehnike u analizi aflatoksina u kukuruzu

Strugačevac, Livia

Master's thesis / Diplomski rad

2015

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:025088

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology Osijek

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Livia Strugačevac

USPOREDBA ELISA I LC-MS/MS TEHNIKE U ANALIZI AFLATOKSINA U KUKURUZU

DIPLOMSKI RAD

Osijek, siječanj, 2015.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

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

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

USPOREDBA ELISA I LC-MS/MS TEHNIKE U ANALIZI AFLATOKSINA U KUKURUZU

Livia Strugačevac, 195-DI

Sažetak: Aflatoksini su toksični sekundarni metaboliti plijesni *Aspergillus* spp. Cilj rada bio je usporediti pozitivne rezultate aflatoksina dobivene ELISA metodom s potvrdnom LC-MS/MS metodom. Ispitivanje je provedeno na kukuruzu, berbe 2012. godine u kojoj je prevladavalo vrlo toplo i suho vrijeme, a uzorci su sakupljeni 2013. godine na području istočne Slavonije. LC-MS/MS metoda je validirana uz iskorištenje od 79 do 96 %, te limit detekcije od 0,5 do 1 µg kg^{-1} i limit kvantifikacije od 1,65 do 3,3 µg kg^{-1}. Rezultati s LC-MS/MS metodom pokazali su sljedeće omjere B1:B2:G1:G2 aflatoksina: 1:0,08:0,18:0,02. Najviša vrijednost dobivena LC-MS/MS-om odnosi se na aflatoksin B1 i iznosi 233,57 µg kg^{-1}, dok je najveća vrijednost utvrđena ELISA testom za navedeni aflatoksin bila 1710,03 µg kg^{-1}. Uspoređujući metode, rezultati dobiveni ELISA-om bili su prosječno viši za 364 µg kg^{-1} u odnosu na rezultate dobivene na LC-MS/MS-u. Iz svega navedenog može se zaključiti prednost ELISA-e kao metode za praćenje zbog brzih rezultata i detekcije prisustva aflatoksina u uzorku, no rezultati se moraju potvrditi nekom preciznijom metodom, što je u ovom slučaju bila LC-MS/MS metoda.

Ključne riječi: aflatoksini, LC-MS/MS, ELISA, kukuruz, istočna Hrvatska

Rad sadrži: 41 stranicu
17 slika
9 tablica
32 literaturne reference

Jezik izvornika: Hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. prof. dr. sc. *Daniela Čačić Kenjerić* — Predsjednica
2. prof. dr. sc. *Tomislav Klapec* — član-mentor
3. doc. dr. sc. *Jelka Pleadin* — Članica
4. doc. dr. sc. *Natalija Velić* — zamjena člana

Datum obrane: 23. siječanj 2015.

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

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

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

COMPARISON OF ELISA AND LC-MS/MS TECHNIQUES IN AFLATOXIN ANALYSIS IN MAIZE

Livia Strugačevac, 195-DI

Summary: Aflatoxins are toxic secondary metabolites of *Aspergillus* spp. The aim of this study was to compare the positive results of aflatoxins obtained by ELISA assay with the confirmatory LC-MS/MS method. Analysis was performed on maize, harvested in 2012 which was characterized by very hot and dry weather, and the samples were collected in 2013 in eastern Slavonia. The LC-MS/MS method was validated with recovery range from 79 to 96 %, detection limit from 0.5 to 1 µg kg^{-1} and limit quantification from 1.65 to 33 µg kg^{-1}. The LC-MS/MS results showed the following aflatoxin B1:B2:G1:G2 ratio: 1:0.08:0.18:0.02. The highest value obtained by LC–MS/MS refers to 233.57 µg kg^{-1} aflatoxin B1, while the highest aflatoxin B1 value obtained by ELISA was 1710.03 µg kg^{-1}. The results obtained by ELISA were higher for 364 ug kg^{-1} on average compared to the LC-MS/MS results. Taken together, the results point to an advantage of ELISA assay due to its applicability for rapid screening and detection of aflatoxin presence. However, the results have to be confirmed using a more precise technique, which in this case was the LC-MS/MS method.

Key words: aflatoxin, LC-MS/MS, ELISA, maize, eastern Croatia

Thesis contains: 41 pages
17 figures
9 tables
32 references

Original in: Croatian

		Defense committee:
1.	*Daniela Čačić Kenjerić*, PhD, prof	chair person
2.	*Tomislav Klapec*, PhD, prof	supervisor
3.	*Jelka Pleadin*, PhD, assistant prof.	member
4.	*Natalija Velić*, PhD, assistant prof.	stand-in

Defense date: January 23, 2015.

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

Sadržaj

1. UVOD 1

2. TEORIJSKI DIO 3

2.1. Aspergillus flavus 4

2.1.1. KLIMATSKI UVJETI I IZLOŽENOST AFLATOKSINIMA 5

2.1.2. ŽIVOTNI CIKLUS PLIJESNI *A. flavus* 8

2.1.3. PREVENCIJA PROIZVODNJE MIKOTOKSINA 9

2.2. ELISA 10

2.2.1. PRINCIPI ELISA TESTA 11

2.2.2. VRSTE ELISA TESTOVA 12

2.2.2.1. SENDVIČ ELISA TEST 12

2.2.2.2. KOMPETITIVAN ELISA TEST 14

2.2.3. PRIMJENA ELISA TESTOVA 15

2.3. LC-MS/MS 15

2.3.1. ESI IONIZACIJA 16

2.3.2. PRINCIP RADA KVADRUPOLA 16

3. EKSPERIMENTALNI DIO 19

3.1. ZADATAK 20

3.2. MATERIJAL I METODE 20

4. REZULTATI 27

5. RASPRAVA 33

6. ZAKLJUČCI 36

7. LITERATURA 38

Popis oznaka, kratica i simbola

AFT	aflatoksini
AP	alkalna fosfataza (eng. *alkaline phosphatase*)
APCI	kemijska ionizacija pod atmosferskim tlakom (eng. *atmospheric pressure chemical ionization*)
APPI	fotoionizacija pod atmosferskim tlakom (eng. *atmospheric pressure photoionization*)
BSA	goveđi serumski albumin (eng. *bovine serum albumin*)
CID	kolizijski izazvana disocijacija (eng. *collision-induced dissociation*)
DC	jednosmjerna struja (eng. *direct current*)
DHMZ	Državni hidrometeorološki zavod
ELISA	enzimsko imunokemijska metoda (eng. *enzyme linked immunosorbent assay*)
ESI	ionizacija elektroraspršivanjem (eng. *electrospray ionisation*)
GC-MS/MS	plinska kromatografija s tandemskom masenom spektometrijom (eng. *gas chromatography-tandem mass spectrometry*)
HAH	Hrvatska agencija za hranu
HRP	peroksidaza iz hrena (eng. *horseradish peroxidase*)
HQW	ultra-čista voda
LC-MS/MS	tekućinska kromatografija s tandemskom masenom spektrometrijom (eng. *liquid chromatography-tandem mass spectrometry*)
LOD	limit detekcije
LOQ	limit kvantifikacije
MeOH	metanol
OVA	albumin iz jaja (eng. *ovalbumin*)
RF	radijska frekvencija (eng. *radio frequency*)

1. UVOD

Mikotoksini su toksični sekundarni metaboliti proizvedeni od strane pojedinih vrsta plijesni. Imaju niz različitih kemijskih i fizikalnih svojstava i toksikoloških učinaka na čovjeka i životinje. Iako ih je poznato više od 400, samo za njih 14 postoje zakonski određeni limiti u ljudskoj i životinjskoj hrani. Prisutnost mikotoksina u svježim proizvodima predstavlja opasnost za ljudsko zdravlje ukoliko prežive skladištenje, preradu i pripremu prehrambenog proizvoda za konzumiranje. Njihova pojava u hrani za životinje predstavlja rizik za ljudsko zdravlje, ukoliko se plijesni, i/ili toksični metaboliti, prenesu na meso ili životinjske proizvode poput jaja, mlijeka ili mliječnih proizvoda, a mogu također utjecati i na zdravlje životinja i njihovu produktivnost (Scudamore, 1998).

Analitika mikotoksina proteklih je godina uvelike napredovala, te u novim metodama prednjači uporaba LC-MS/MS-a kao najnaprednije analitičke tehnike. Unatoč tome, analitika mikotoksina roda *Aspergillus* među kojima je najpoznatiji aflatoksin još uvijek ima ponekad probleme zbog vrlo heterogene raspodjele u realnim uzorcima. Također kod LC-MS/MS detekcije problem može predstavljati supresija ionskog signala kod teških matriksa (Berthiller i sur., 2014).

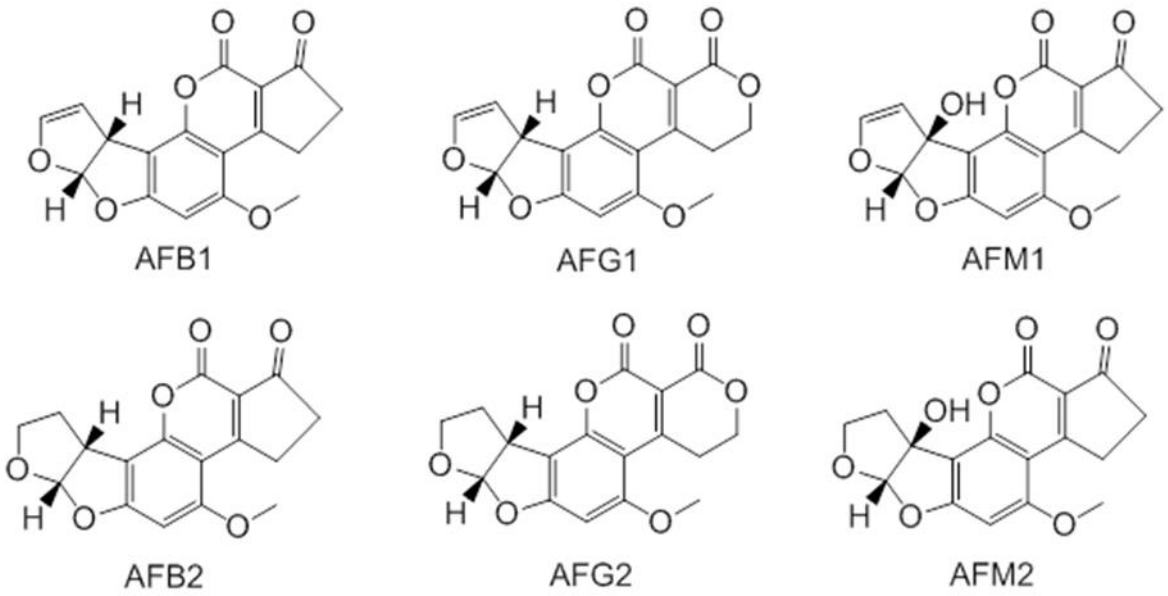
Cilj ovoga istraživanja bio je usporediti preciznost imunološke metode „ELISA“ u odnosu na potvrdnu LC-MS/MS tehniku prilikom određivanja količine aflatoksina u kukuruzu.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. *Aspergillus flavus*

Riječ „aflatoksin“ potječe od „***A**spergillus **fla**vus* **toksin**“, budući da su *A. flavus* i *A. parasiticus* glavne vrste odgovorne za kontaminaciju usjeva aflatoksinom prije berbe i/ili tijekom skladištenja. Aflatoksini B1, B2, G1 i G2 su četiri najvažnija toksina između šesnaest strukturno srodnih spojeva (Hedayati i sur., 2007). Aflatoksini M1 i M2 su hidroksilirani metaboliti aflatoksina B1 i B2 i nastaju kada sisavci konzumiraju hranu kontaminiranu ovim mikotoksinima **(Slika 1)** (Scudamore, 1998).

Aflatoksini su derivati kumarina i stvaraju bezbojne do blijedo žute kristale. Intenzivno florescentni pod UV svjetlom, emitiraju plavu (aflatoksin B1 i B2) ili zelenu (aflatoksin G1) i plavo-zelenu (aflatoksin G2) florescenciju, iz čega su izvedene oznake B i G, dok su aflatoksini M skupine dobili ime prema mlijeku u kojem su prvi put utvrđeni (IARC, 2012).



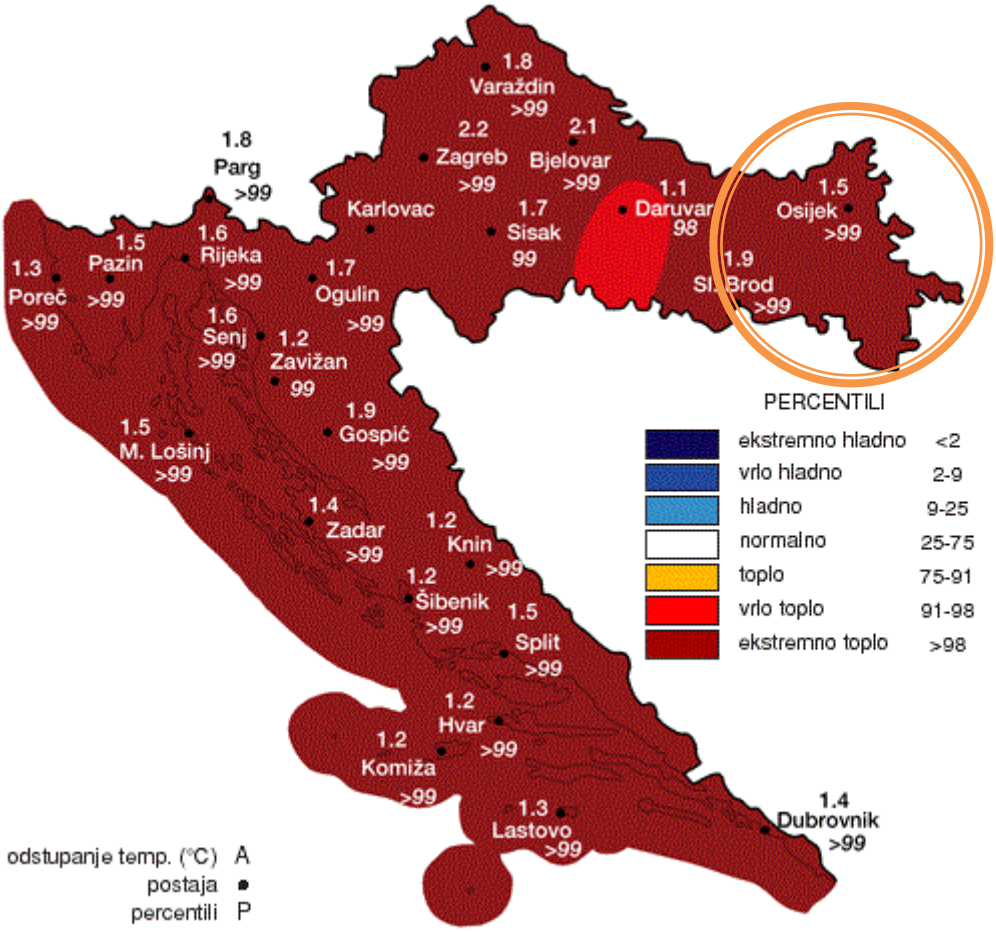
Slika 1 Kemijska struktura najznačajnijih aflatoksina

2.1.1. KLIMATSKI UVJETI I IZLOŽENOST AFLATOKSINIMA

Sinteza aflatoksina započinje već u polju pri temperaturi između 24 i 35 °C i vlažnosti iznad 7 %. *A. flavus* sintetizira aflatoksine B1 i B2 na žitaricama poput kukuruza, dok *A. parasiticus* može sintetizirati aflatoksine B1, B2, G1 i G2 na uskladištenim uljaricama (HAH, 2012).

Za pojavu plijesni i njihovih metabolita odgovorni su:

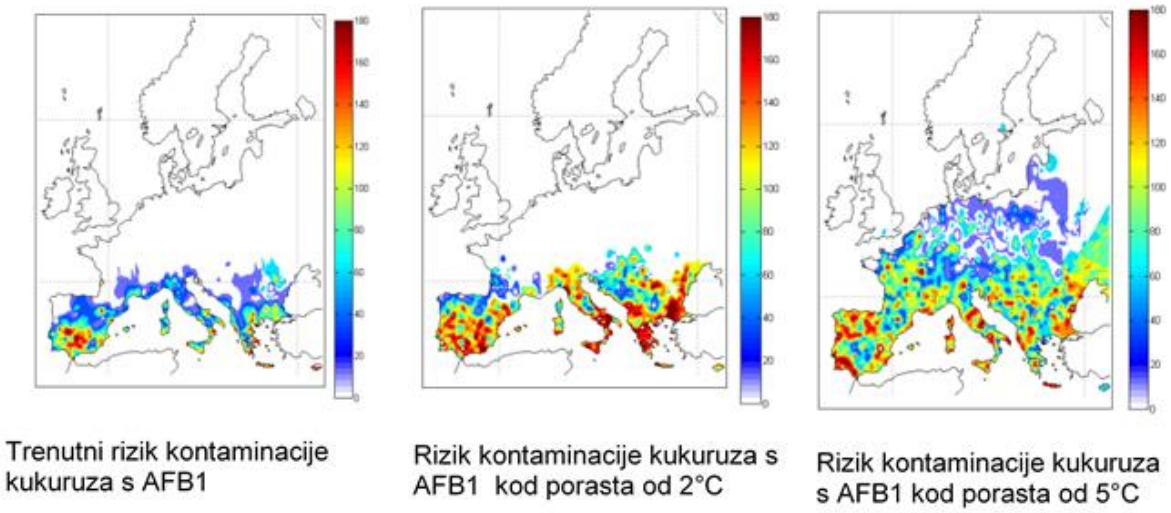
1. odgovarajući sadržaj vlage (slobodna ili aktivna voda),
2. pogodne temperature,
3. prisutnost kisika,
4. fizička oštećenja na usjevima, i
5. prisutnost gljivičnih spora (HAH, 2012).



Slika 2 Odstupanje srednje temperature zraka u 2012. godini (DHMZ, 2014)

Kontaminacija polja aflatoksinima je povezana s visokim temperaturama i stresom zbog suše, a događa se na usjevima u klimi viših temperatura u toplim sušnim godinama (Klich, 2007). **Slika 2** prikazuje odstupanje srednje temperature zraka u 2012. godini kada su uzeti uzorci koji su ispitivani na prisustvo aflatoksina.

Sve zemlje Europe, uključujući i južni dio, obično nisu karakterizirane toplim i suhim vremenom tijekom uzgoja žitarica. Ovakvi uvjeti dogode se u određenim područjima i godinama, i tada *A. flavus* može naći prikladne uvjete za rast i biosintezu aflatoksina (Battilani i sur., 2012).



Slika 3 Predviđanje proizvodnje aflatoksina pri promjeni srednje vrijednosti temperature (Battilani i sur., 2012)

Slika 3 prikazuje predviđanje rizika od širenja aflatoksina B1 prema sjevernom području u slučaju klimatskih promjena od trenutne srednje temperature te kada bi se prosječna temperatura povisila za 2 °C ili 5 °C. Prema predviđanjima, povišenje temperature za 5 °C dovelo bi do bržeg sazrijevanja kukuruza, uz raniju cvatnju (5-20 dana ranije) i berbu (20 dana prema srednjoj točki). Prema tome, očekuje se da će se područje proizvodnje aflatoksina širiti prema sjeveru zbog porasta površina zasijanih kukuruzom, kao i odgovarajućih uvjeta za rast gljiva. Uz trenutne temperature najmanji je rizik proizvodnje

aflatoksina, dok se kod povišenja prosječne temperature od 2 °C rizik širi na veći dio Balkana, Italiju, Španjolsku i Portugal, a rizik zahvaća cijelu centralnu i južnu Europu kod povišenja prosječne temperature za 5 °C (Battilani i sur., 2012).

Prema istraživanju koje su proveli Pleadin i sur. (2014) kao petogodišnje praćenje aflatoksina B1 na hrvatskim farmama od 2009. do 2013. godine, koristeći ELISA imunokemijski test, aflatoksin B1 je otkriven u 16,4 % ispitanih uzoraka, među kojima kukuruz najviše kontaminiran s 21,7 % uzoraka u 2013. godini koji prelaze zakonski postavljene limite (**Tablica 1** i **Tablica 2**). Osim toga, isti autori prema **Tablici 2** ukazuju na to da je od ukupno ispitivanih uzoraka istočna regija imala najveću koncentraciju aflatoksina B1.

Tablica 1 Koncentracija aflatoksina B1 u žitaricama i stočnoj hrani po pojedinim godinama uzorkovanja (Pleadin i sur., 2014)

Žitarica / Stočna hrana	Godina / AFB_1 srednja vrijednost ± SD (µg/kg)				
	2009	2010	2011	2012	2013
Kukuruz	3.38 ± 2.15	4.15 ± 3.33	2.18 ± 2.44	3.87 ± 1.56	93.5 ± 213
Pšenica	1.10 ± 0.61	1.21 ± 1.17	1.67 ± 1.11	1.76 ± 2.13	3.02 ± 2.15
Ječam	ND	1.33 ± 1.24	ND	1.14 ± 1.27	2.11 ± 1.13
Zob	ND	ND	1.12 ± 0.15	ND	1.13 ± 0.53
Smjese žitarica	1.02 ± 0.35	1.11 ± 1.28	ND	1.33 ± 1.24	34.6 ± 51.4
Stočna hrana	1.07 ± 1.23	1.09 ± 1.15	ND	1.12 ± 0.89	29.4 ± 41.5

Tablica 2 Koncentracija aflatoksina B1 u žitaricama i stočnoj hrani po pojedinim regijama (Pleadin i sur., 2014)

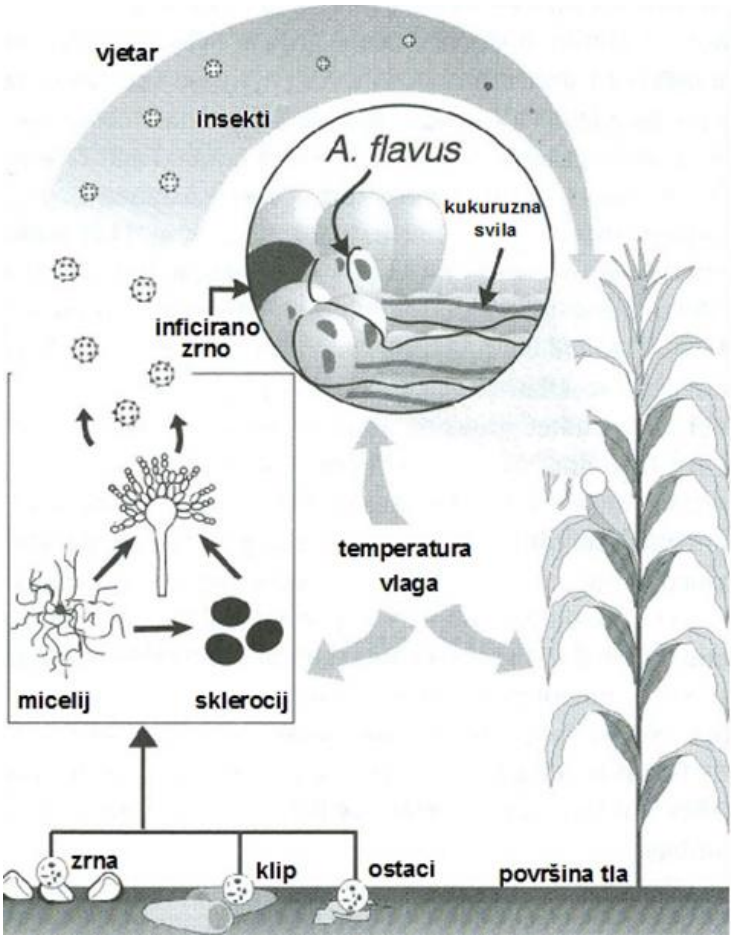
Žitarice / stočna hrana	Regija / AFB_1 srednja vrijednost ± SD (µg/kg)			
	R1	R2	R3	R4
Kukuruz	18.25 ± 34.52	10.25 ± 28.31	132 ± 289	15.2 ± 52.4
Pšenica	1.28 ± 1.53	1.41 ± 1.69	1.89 ± 2.44	1.64 ± 2.21
Ječam	1.23 ± 1.14	ND	1.67 ± 1.53	1.75 ± 1.12
Zob	1.17 ± 0.81	ND	1.28 ± 0.31	ND
Mješavine žitarica	5.52 ± 15.41	6.48 ± 20.12	28.5 ± 22.4	4.31 ± 3.38
Stočna hrana	2.25 ± 11.14	1.89 ± 4.15	24.7 ± 21.4	3.12 ± 10.38

R 1 – sjeverna regija , R 2 – zapadna regija , R 3 – istočna regija R 4 – središnja regija

Iako su mlade životinje osjetljivije na utjecaj aflatoksina, pogođene su sve starosne skupine uz određene kliničke pokazatelje: gastrointestinalna disfunkcija, smanjena produktivnost, smanjena iskoristivost hrane, oštećenje jetre, embrionalna smrt, teratogenost (urođene mane), tumor i smanjenje funkcije imunološkog sustava (Akande i sur.,2006).

2.1.2. ŽIVOTNI CIKLUS PLIJESNI *A. flavus*

Životni ciklus plijesni *A. flavus* može se podijeliti u dvije glavne faze: kolonizaciju biljnih ostataka u tlu i infekciju usjeva. Na početku vegetacije, kada nastanu povoljni uvjeti u okolišu, sklerocije i konidije, oblici micelija koji podnose nepovoljne zimske uvjete, počinju klijati i proizvoditi brojne konidiospore koje se prenose zrakom. Novi inokulum se širi pomoću kukaca ili vjetrom kako bi se započela kolonizacija i infekcija svježe posađenih kultura (**Slika 4**).



Slika 4 Životni ciklus plijesni *A. flavus* (Battilani i sur., 2012)

Čimbenici koji utječu na infekciju, osim uvjeta okoliša, su količina spora u polju i osjetljivost biljke (ovisno o usjevu, vrsti i zdravstvenom stanju), sustavu obrade tla i bilja te populaciji insekata. Kod kukuruza, značajne infekcije i proizvodnja aflatoksina se ne pojavljuju sve dok je vlaga zrna ispod 32 %, no proizvodnja aflatoksina se nakon infekcije može nastaviti sve dok vlaga zrna ne padne ispod 15 % (Battilani i sur., 2012). Osjetljiv stadij usjeva kukuruza je cvatnja, osobito posmeđivanje svile, kada spore nošene vjetrom ili spore koje nastaju naknadno imaju optimalnu učinkovitost. *A. flavus* može rasti i proizvoditi mikotoksine pri aktivitetu vode 0,73 i 0,85, što odgovara sadržaju vlage 8-12 % i 17-19 % u kukuruzu (Battilani i sur., 2012).

2.1.3. PREVENCIJA PROIZVODNJE MIKOTOKSINA

Kukuruz je jedna od najvažnijih ratarskih usjeva u Republici Hrvatskoj, te je najčešće onečišćen plijesnima *Penicillium* i *Fusarium* koje proizvode mikotoksine. Ovakva kontaminacija može se smanjiti na nekoliko načina:

a) upotrebom hibrida kukuruza otpornijih na plijesni,
b) vrijeme sjetve određuje vrijeme berbe, što može imati značajan utjecaj na pojavu bolesti jer se kasne sorte kukuruza lakše inficiraju plijesnima tijekom vlažne jeseni,
c) smanjenje infekcije može se postići plodoredom,
d) gnojidba s previše dušika povećava osjetljivost na plijesni, stoga je potrebno provesti analizu tla prije prihrane biljaka,
e) primjena separatora kako bi se uklonila oštećena i pljesniva zrna,
f) adekvatno skladištenje uz optimalnu temperaturu i vlažnost žitarica može smanjiti rast plijesni (Peraica i sur., 2002),
g) upotreba visoke temperature, UV, X-zraka, mikrovalova i ekstrakcija toksina otapalima,
h) dodatak vezivnih sredstava kako bi se smanjila bioraspoloživost ovih spojeva kod životinja: hidrirani natrij kalcij aluminosilikat i filosilikati izvedeni iz prirodnih zeolita, bentonit i aktivni ugljen imaju visok afinitet kod aflatoksina B1, no njihova primjena je upitna zbog mogućih štetnih učinaka povezanih s velikom količinom dodanih

sredstava, smanjenja bioraspoloživosti određenih minerala i vitamina u prehrani ili kontaminacije teškim metalima i dioksinima,

i) mnoštvo kemijskih sredstava poput kiselina, baza, oksidanata, reducirajućih sredstava, kloridnih sredstava i formaldehida su korišteni za razgradnju mikotoksina (osobito aflatoksina) u kontaminiranoj hrani, no njihova primjena je neučinkovita i skupa pa se uglavnom ne primjenjuju,

j) određeni sojevi mliječno kiselih bakterija, propionskih bakterija i bifidobakterija imaju strukturu stanične stijenke koja može vezati mikotoksine i na taj način ograničiti bioraspoloživost u tijelu životinja (Yiannikouris i Jouany, 2002); pojedini kvasci i plijesni, npr. *Trichosporon mycotoxinivorans,* imaju sposobnost razgradnje mikotoksina, ali na tržištu postoje i pripravci odgovarajućih enzima (Klapec i Šarkanj, 2013).

2.2. ELISA

S obzirom da je onečišćenje mikotoksinima moguće tijekom različitih faza proizvodnje, moraju se kontrolirati kritične točke tijekom procesa, a sukladno s tim potrebno je koristiti metode koje su brze, isplative, jednostavne i pogodne za brzo utvrđivanje mikotoksina. Vodeće među brzim metodama su imunokemijske metode visoke osjetljivosti i selektivnosti kao rezultat specifičnih antitijela. Najraširenija metoda je ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Ove metode zahtijevaju jednostavne instrumente (većina imunokemijskih metoda je bazirana na fotometrijskom, fluorimetrijskom i elektrokemijskom principu) ili ne zahtijevaju instrumentaciju (brzi testovi s vizualnim određivanjem za kvalitativno/semikvantitativno ocjenjivanje).

Najčešći nedostaci metoda baziranih na antigen-antitijelo interakciji su:

a) mogućnost nespecifičnog vezanja komponenata,
b) neobnovljivost sorpcije procesa,
c) mogućnost reakcija sa srodnim spojevima (Saeger, 2011).

2.2.1. PRINCIPI ELISA TESTA

Ključ ELISA testa je reakcija vezanja između antitijela i antigena, pri čemu je kao marker za detekciju dodan enzim koji katalizira pretvorbu bezbojnog supstrata u obojeni produkt. Enzimska aktivnost koja se određuje nakon dodatka supstrata na osnovi intenziteta boje mjerene kolorimetrijski direktno je proporcionalna sadržaju specifičnih antitijela u ispitivanom materijalu.

Antitijela su obrambeni proteini koji se stvaraju u tijelu toplokrvnih životinja kao odgovor organizma na infekciju stranim molekulama ili mikroorganizmima (Poljoprivredni fakultet u Beogradu, 2011). Kvaliteta antitijela definira specifičnost i osjetljivost analiza. Antitijela su proteini iz klase imunoglobulina sa specifičnim mjestom vezanja za antigen. Ako antigeni sa molekulskom težinom ispod 1000 Da (1 u = 1 Da = 1,660540 × 10^{-27} kg ± 0,59 ppm) nisu imunogeni, pogodan imunogen može se sintetizirati vezanjem analita od interesa ili analoga na nosač proteina visoke molekulske mase (Saeger, 2011).

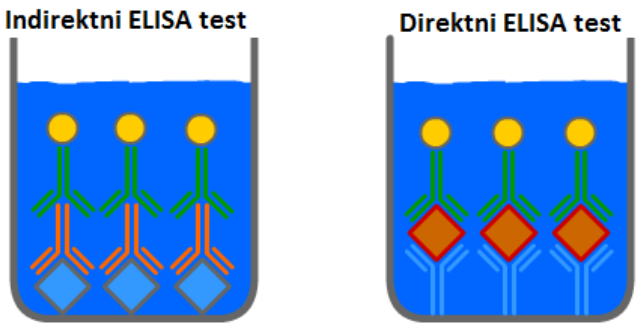
U ELISA testu mogu se koristiti dva tipa antitijela, monoklona ili poliklona. Poliklona antitijela koja nastaju kod životinja kao odgovor na pojedine složene antigene su heterogena jer ih proizvodi više različitih tipova stanica, od kojih je svaki sposoban proizvesti antitijelo koje reagira s različitom antigenskom determinantom kompleksnog antigena. Ukoliko je infektivno strano tijelo velika molekula poput proteina ili mikroorganizama, na njima se mogu nalaziti različita antigena mjesta i poliklona antitijela se stvaraju za vrijeme imunog odgovora domaćina (Poljoprivredni fakultet u Beogradu, 2011). Dok poliklona antitijela imaju različita heterogena svojstva specifičnosti i afiniteta i zbog toga mogu dati lažno pozitivne ili lažno negativne rezultate, monoklona antitijela koja nastaju od pojedinačnih limfocita u kulturama stanica su kemijski identična, visoko specifična i poželjna za ELISA-u (Pavlović, 2012).

2.2.2. VRSTE ELISA TESTOVA

Postoje dva tipa ELISA-e, direktni i indirektni (**Slika 5**).

Kod direktnog tipa analit se natječe s enzimski označenim analitom za vezanje s ograničenom količinom antitijela imobiliziranih u jažicama. Nakon inkubacije nevezani spojevi se uklanjaju pranjem i dodaje se kromogenski supstrat. Enzimska aktivnost u pojedinoj jažici je obrnuto proporcionalna koncentraciji mikotoksina (Saeger, 2011).

U slučaju indirektne ELISA-e analit ili njegov analog povezan s makromolekularnim nosačem (npr. BSA ili OVA) je presvučen preko jažica za vrijeme inkubacije. Nakon toga se ekstrakt uzorka i specifično antitijelo dodaju u svaku jažicu. Analit prisutan u uzorku i imobilizirani analit natječu se za vezanje s antitijelom u otopini. Nakon ispiranja, količina vezanog specifičnog antitijela se pronalazi pomoću sekundarnog antitijela označenog s enzimom.



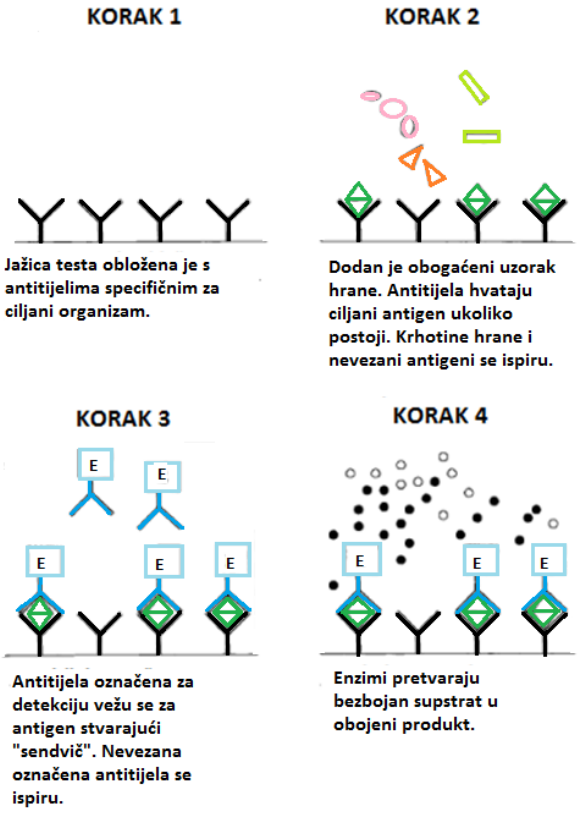
Slika 5 Direktni i indirektni tip ELISA-e (Hammar, 2014.)

Ovakav pristup omogućuje pojednostavljenje pripreme imunoreagensa (sekundarna antitijela označena enzimima pri čemu su na tržištu dostupni enzimi: HRP i AP) (Saeger, 2011).

2.2.2.1. SENDVIČ ELISA TEST

Sendvič test najčešće se koristi u komercijalne svrhe. Ovakav naziv dobio je zbog dva antitijela koja hvataju u klopku ciljani antigen. Antigen se prvo hvata, a zatim detektira.

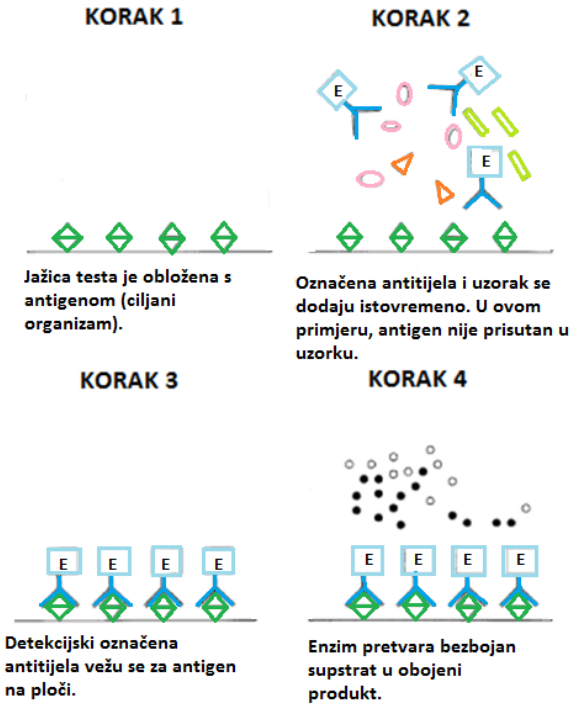
Specifično antitijelo koje hvata ciljni antigen veže se za površinu čvrstog nosača (mikrotitarske ploče). Obogaćeni uzorak hrane se dodaje u jažicu i ukoliko je ciljni antigen prisutan on će se vezati za antitijela (**Slika 6**). Nakon ispiranja i uklanjanja nevezanog materijala, u jažice se dodaju druga antitijela s vezanim enzimom kao markerom koja će se ponovno vezati za antigen i napraviti sendvič antitijela. Ponovno slijedi ispiranje da se uklone nevezana antitijela, a nakon toga dodavanje bezbojnog supstrata koji će enzim prevesti u obojeni produkt. Na kraju se dodaje otopina za inaktivaciju enzima da se spriječi daljnja aktivnost i promjene boje koja se mjeri. Ovaj test ukupno traje dva do tri sata, a zahtjeva obogaćen uzorak hrane za početak testa. Pri detekciji patogena u hrani sendvič ELISA koristi se u kvalitativne svrhe, ukazujući na prisustvo, odnosno odsustvo patogena. Kod indirektnog sendvič testa detekcijsko antitijelo ne nosi vezani enzim nego posebne markerske molekule koje će se specifično vezati za druge molekule, poput proteina (pr. antitijelo označeno kompleksom biotina i avidina kao markerom) (Poljoprivredni fakultet u Beogradu, 2011).



Slika 6 Koraci sendvič ELISA testa (Poljoprivredni fakultet u Beogradu, 2011)

2.2.2.2. KOMPETITIVAN ELISA TEST

Kod kompetitivnog ELISA testa (**Slika 7**) jažice mikrotitarske ploče se prekrivaju antigenom uz istovremeno dodavanje ispitivanog uzorka i označenih antitijela. Ukoliko ciljni antigeni nisu prisutni u uzorku, označena antitijela će se vezati za antigene kojima su presvučene jažice. Kada se doda supstrat enzim će katalizirati promjenu boje kao kod sendvič ELISA testa. No ukoliko su ciljni antigeni prisutni u uzorku, antitijela će se vezati za njih, dodatno uz one koji su spojeni s jažicama. Tijekom ispiranja svi antigen-antitijelo kompleksi iz otopine se uklanjaju. Prema tome, svaka promjena boje na kraju testa je rezultat jedino antitijelo-antigen kompleksa na površini jažice i intenzitet boje će biti slab. Ukoliko je nivo antigena u uzorku visok, više antitijela će biti vezano za otopini, što za rezultat ima manje antitijela koji su slobodni za vezanje na površini jažice i tada je rezultat bezbojan i izuzetno slabe boje.



Slika 7 Koraci kompetitivnog ELISA testa (Poljoprivredni fakultet u Beogradu, 2011)

Kompetitivan ELISA test daje rezultat suprotan sendvič ELISA testu, zato što obojeni proizvod ukazuje na negativan rezultat, a bezbojan ili vrlo slabo obojen ukazuje na pozitivan rezultat. Ovakav test može biti direktan i indirektan, kao i kod sendvič ELISA-e (Poljoprivredni fakultet u Beogradu, 2011).

2.2.3. PRIMJENA ELISA TESTOVA

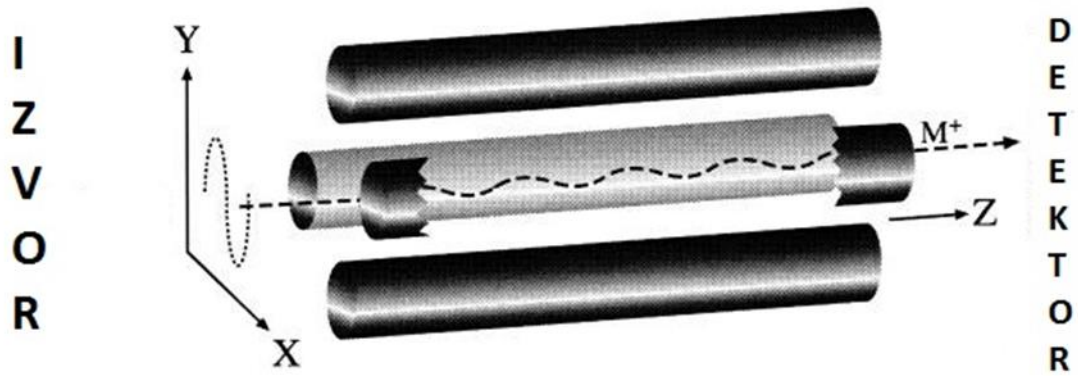
Oblik ELISA-e s mikrotitarskim pločama zauzima vodeće mjesto među brzim testovima za mikotoksine. ELISA testovi su dostupni za određivanje pojedinačnih mikotoksina jednako dobro kao i za grupe povezanih mikotoksina (aflatoksini, fumonizini, trihoteceni). Kitovi ELISA testa sadrže potrebne reagense i materijale. Validacija ovih testova uključuje procjenu analitičkog raspona, limit detekcije, osjetljivost, točnost i preciznost postupka kod kontaminiranih uzoraka različitih prehrambenih matrica. ELISA je heterogena tehnika koja se uglavnom izvodi na pločama s 96 ili 384 jažice. Jedan od imunoreagensa je obično imobiliziran na dnu i zidovima jažica za odvajanje vezanog i slobodnog reagensa. Heterogeni princip ELISA-e omogućava učinkovito odvajanje vezanih i slobodnih komponenata analitičkog sustava nakon imunokemijske reakcije. S obzirom da su mikotoksini monovalentni antigeni, obično se koristi kompetitivna ELISA tehnika (Saeger, 2011).

2.3. LC-MS/MS

Osnovni princip masene spektrometrije (MS) je stvaranje iona iz anorganskih ili organskih spojeva određenom metodom za odvajanje tih iona na temelju njihovog odnosa mase i naboja (*m/z*), te njihovo otkrivanje, kvantitativno ili kvalitativno (Gross, 2004). Masena spektrometrija se najčešće kombinira s tekućinskom kromatografijom (LC-MS ili LC-MS/MS), gdje se izvor iona analita nalazi u otopini, iako se može spojiti i s plinskom kromatografijom (GC-MS ili GC-MS/MS). Ukoliko se radi o tandemskoj masenoj spektrometriji (MS/MS) fragmentacija molekula odvija se između dva masena razdvajanja. Uzorak se uvodi u obliku kapljica u ionizator pod atmosferskim tlakom koji može biti elektrosprejni ionizator (ESI), kemijski ionizator pod atmosferskim tlakom (APCI) i fotoionizator pod atmosferskim tlakom (APPI) (de Hoffmann i Stroobant, 2007). Kod nepolarnih analita više se koriste APPI i APCI, dok se ESI primjenjuje za djelomično polarne i polarne spojeve (Gross, 2004).

2.3.1. ESI IONIZACIJA

ESI koristi električnu energiju kako bi se potaknuo prijenos iona iz otopine u plinovitu fazu prije nego se podvrgne analizi masene spektrometrije. Prijenos ionskih vrsta iz otopine u plinovitu fazu sastoji se od raspršivanja fine vodene prašine nabijenih kapljica, isparavanja otapala i izbacivanja iona iz visoko nabijenih kapljica. Otapalo isparava povišenjem temperature i/ili dodatkom plina za sušenje, što dovodi do smanjenja opsega kapljica i povećanja površine pod nabojem. Jakost električnog polja unutar nabijene kapljice doseže kritičnu točku u kojoj je kinetički i energijski moguće izbacivanje iona na površinu.



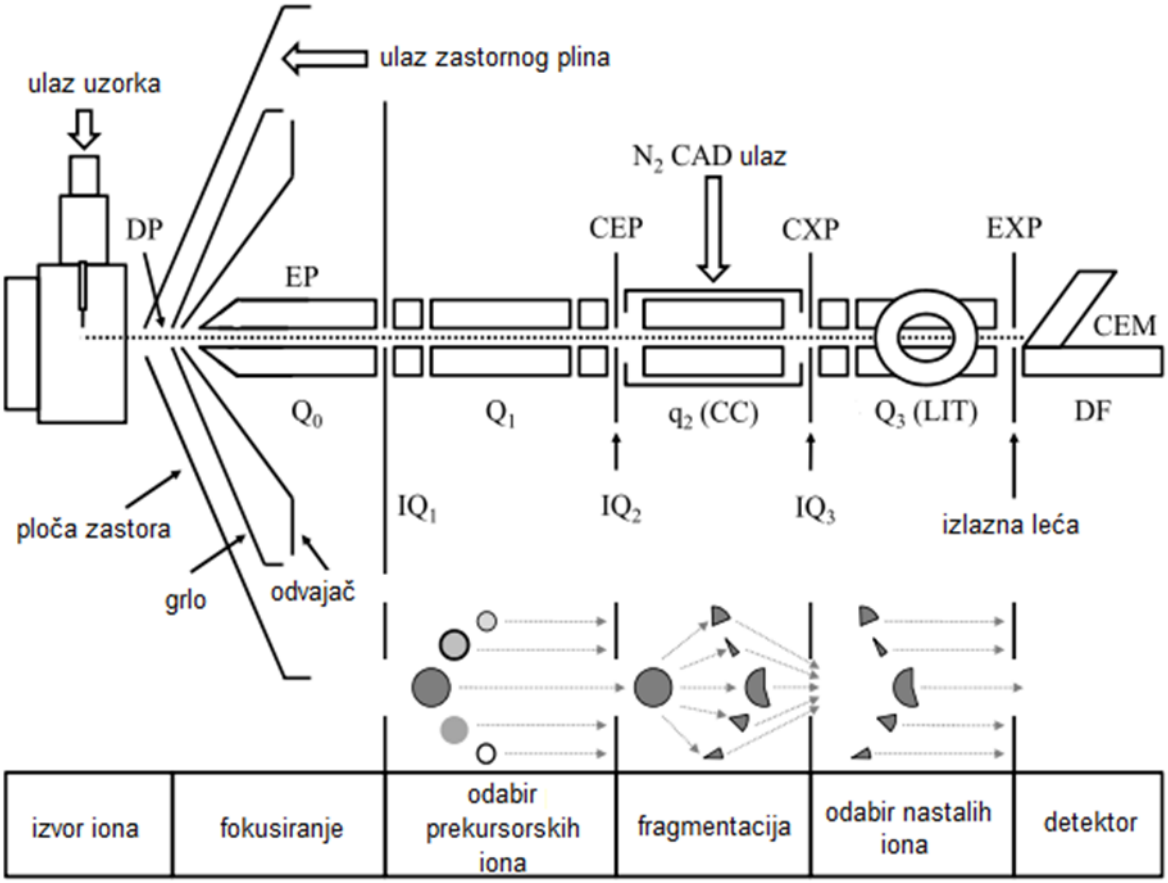
Slika 8 Rad kvadrupolskog masenog analizatora (Ho i sur., 2003)

2.3.2. PRINCIP RADA KVADRUPOLA

Kvadrupoli koji se najčešće koriste u MS, se sastoje od četiri paralelne elektrode koje su na istoj udaljenosti. Svaki par nasuprotnih elektroda ima isti naboj. Pulsirajuće električno polje uzrokuje oscilirajuće kretanje iona po x-y ravnini u smjeru naboja. Postavljanjem određenog omjera DC i RF kontrolira se prolazak poželjnih komponenti bez dodira elektroda, dok se one nepoželjne sudaraju i spaljuju na elektrodama (**Slika 8)**.

Kod tandemske masene spektrometrije su tri kvadrupola postavljena jedan iza drugog. U prvom kvadrupolu (Q_1) odvaja se prekursorski ion koji se u drugom kvadrupolu (Q_2) sudara s plinom (N_2) što se naziva kolizijski inducirana disocijacija (CID), gdje se prekursorski ion aktivira i podvrgava daljnjoj fragmentaciji. CID rezultira stvaranjem iona koji se prate i

odabiru pomoću trećeg kvadrupola (Q_3) dajući strukturnu informaciju molekularnog iona (**Slika 9**).



Slika 9 Princip rada MS/MS uređaja (Varga, 2010)

Faktori koji kontroliraju prolazak analita do detektora su:

a) CP (eng. curtain plate) – zastor plina kroz koji prolazi nabijeni analit,
b) DP (eng. declustering potential) – odvajač gdje se primjenjuje razlika u naboju,
c) EP (eng. entrance potential) – ulazni potencijal, podešavanje napona da se propušta samo specifičan odnos mase i naboja za mjereni analit,
d) CEP (eng. collision cell entrance potential) – reguliranje prolaska u sljedeći kvadrupol pomoću ulaznog potencijala kolizijske ćelije,
e) CC – kolizijska ćelija gdje se odvija fragmentacija iona analita,

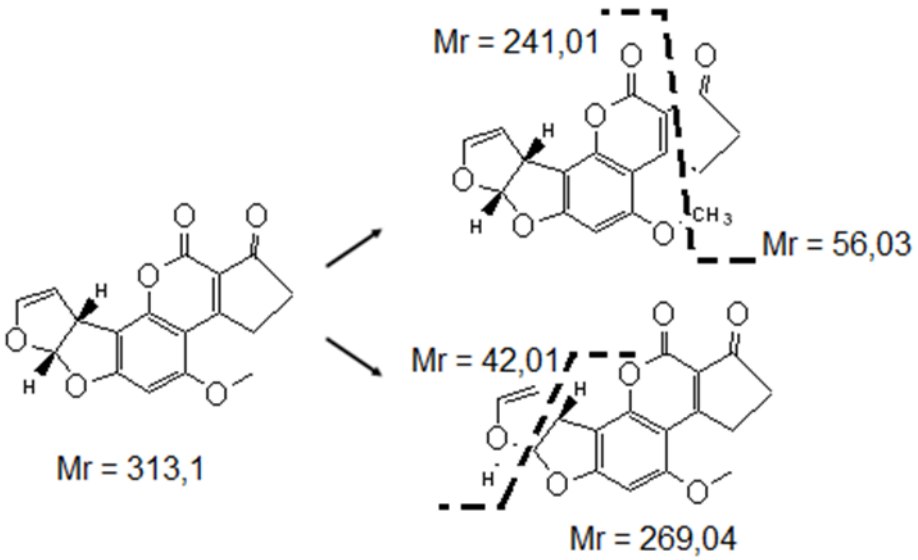
f) CXP (eng. cell exit potential) – napon na izlaznom dijelu kolizijske ćelije koji regulira prolaz u sljedeći kvadrupol,

g) LIT – linearni hvatač iona

h) CEM (eng. continuous electron multiplier) – kontinuirani množitelj elektrona u koji udaraju ioni nakon prolaska zadnjeg kvadrupola i

i) DF – deflektor koji dostavlja ione do detektora koji ih pretvara u brojeve udaraca po sekundi za određeni odnos m/z.

Aflatoksin B1 se prilikom analize propušta u Q_1 kao kation molekulske mase 313,1. U Q_2 aflatoksin se fragmentira pa se kvantifikacija prati preko fragmenta 241,01, a kvalitativna potvrda se postiže propuštanjem fragmenta 269,04.



Slika 10 Fragmentacija aflatoksina B1

Pomoću MS/MS detektora prate se retencijsko vrijeme fragmenta za kvalifikaciju i kvantifikaciju (qualifier i quantifier), te njihov relativni omjer u odnosu na standard kako bi se potvrdilo da u stvarnom uzorku ima aflatoksina B1 (Biselli i sur., 2005; Han i sur., 2010).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

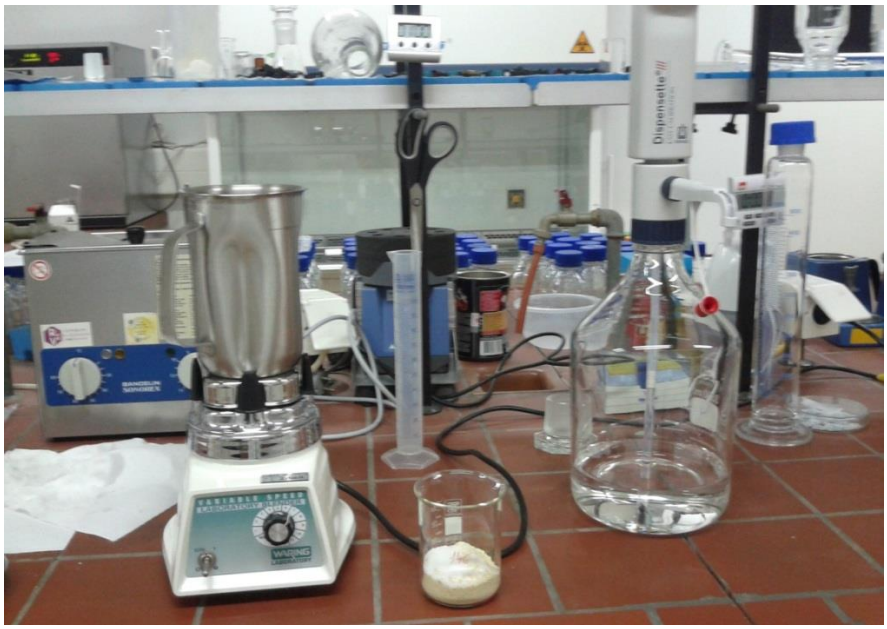
Cilj rada bio je odrediti količinu aflatoksina u kukuruzu, uroda 2012. godine, na uređaju LC-MS/MS te usporedba dobivenih rezultata s podacima utvrđenim ELISA testom.

3.2. MATERIJAL I METODE

Ukupno je analizirano 64 uzoraka kukuruza. Zrno kukuruza koje je analizirano usitnjeno je na laboratorijskom mlinu IKA M20. Nakon toga je odvagano 50 g uzorka usitnjenog kukuruza i 5 g NaCl-a (**Slika 11**).

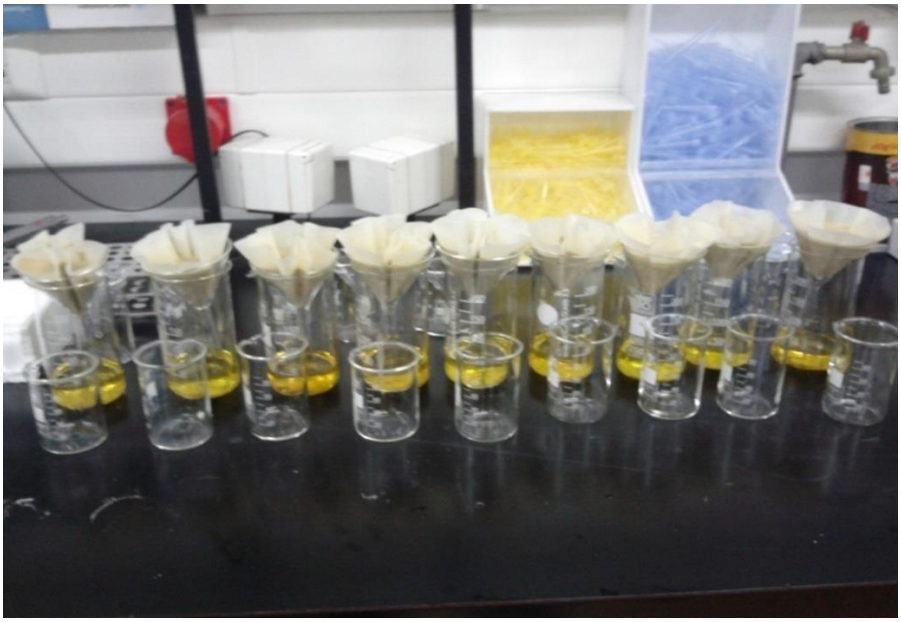
Slika 11 Odvaga uzorka

Aflatoksini su ekstrahirani pomoću 100 ml otopine metanol:voda (MeOH:HQW) u omjeru 80:20, tako da se pripremljena smjesa miješala u blenderu jednu minutu na najvećoj brzini (**Slika 12**).



Slika 12 Ekstrakcija s MeOH:HQW (80:20)

Nakon mješanja u blenderu, dobivena smjesa je filtrirana na nabranom filter papiru (**Slika 13**).



Slika 13 Prva filtracija

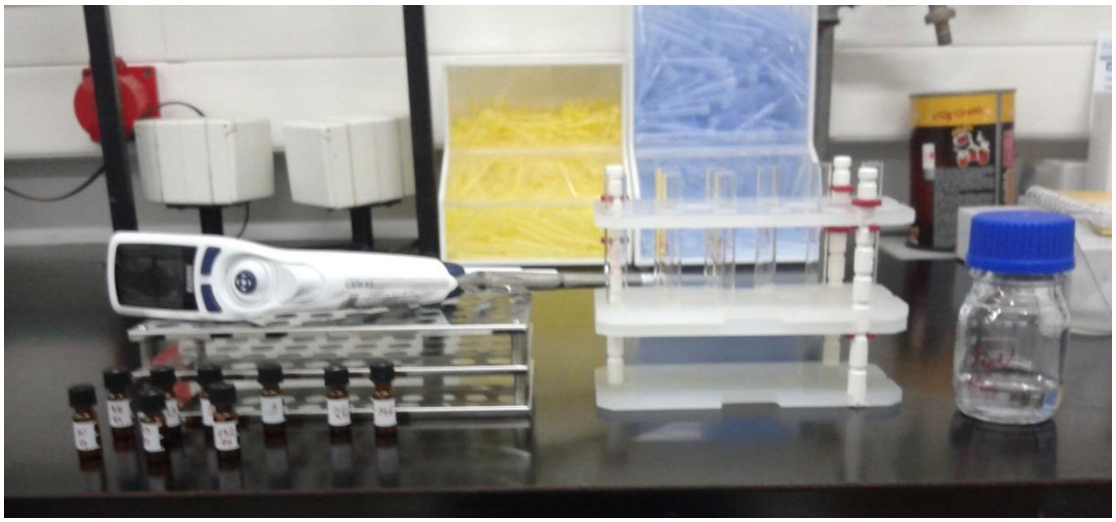
Deset mililitara dobivenog filtrata pomiješano je s 40 ml HQW (**Slika 14)**, i nakon toga filtrirano preko filtera sa staklenim mikrovlaknima.

Slika 14 Mješanje filtrata s HQW

Nakon filtracije nafilteru sa staklenim mikrovlaknima, 10 ml filtrata je propušteno kroz imunoafinitetnu kolonu (**Slika 15**) i isprano s 10 ml HQW. Nakon toga dodan je 1 ml metanola za eluiranje, a eluat s aflatoksinima skupljan je u kivetu.

Slika 15 Imunoafinitetne kolone AflaStar ®

Kivete su zatim prebačene na otparavanje otapala do suhog u vakuumu na termobloku (uređaj iza afinitetnih kolona na **Slici 15)**. Nakon otparavanja otapala rekonstitucija je provedena s 300 µL acetonitrila. Konačna otopina je prebačena u viale (**Slika 16**) pomoću kojih je izvršena analiza na LC-MS/MS-u. Od ukupnog volumena u vialama, 20 µL je korišteno za analizu. Faktor za preračunavanje iznosio je 0,3 te je on uključivao sve korake razrijeđenja i koncentriranja tijekom postupka izolacije aflatoksina.



Slika 16 Postupak rekonstitucije aflatoksina

Metoda je validirana u sklopu čega su određeni validacijski parametri navedeni u **Tablici 3**. Validacija je provedena dodatkom standarda aflatoksina uzorku kukuruza koji nije sadržavao detektibilne koncentracije aflatoksina, te je ostavljen u mraku pri sobnoj temperaturi preko noći da otpari otapalo. Koncentracije aflatoksina pri kojima je iskorištenje ispitano su navedene u **Tablici 3.** LOD i LOQ su izmjereni na matriksu (kukuruzu) mjerenjem odnosa signala i šuma (S/N) koji je za LOD iznosio 3, a za LOQ 10.

Tablica 3 Validacijski parametri LC-MS/MS metode za analizu aflatoksina

	AFB1	**AFB2**	**AFG1**	**AFG2**
LOD / µg kg^{-1}	0,5	0,5	0,5	1
LOQ / µg kg^{-1}	1,65	1,65	1,65	3,3
r	0,9987	0,9995	0,9982	0,9958
Iskorištenje	84 %	96 %	81 %	79 %
Koncentracije pri kojima je iskorištenje ispitano / µg kg $^{-1}$	4,04	1	4,06	1,015

Napravljena je kalibracija primjenom standarda poznatih koncentracija (Mix 1, Romerlabs), za aflatoksin B1 od 0,101 do 202 ppb, za aflatoksin B2 od 0,025 do 50 ppb, za aflatoksin G1 od 0,1015 do 203 ppb i za aflatoksin G2 od 0,025 do 50 ppb (**Tablica 4**).

Tablica 4 Standardi aflatoksina B1, B2, G1 i G2 (μg kg^{-1}) korišteni za kalibraciju

	OT1	OT2	OT3	OT4	OT5	OT6	OT7	OT8
AFB1	202	101	50,5	10,1	5,05	1,01	0,505	0,101
AFB2	50	25	12,5	2,5	1,25	0,25	0,125	0,025
AFG1	203	101,5	50,75	10,15	5,075	1,015	0,5075	0,1015
AFG2	50	25	12,5	2,5	1,25	0,25	0,125	0,025

Uređaj na kojem je izvršena analiza je AB SCIEX-ov API 2000 s trostrukim kvadrupolom (QqQ) i elektrosprejnim raspršivanjem (ESI). Korištena je kolona Supelcove Express C18, punjenja 2,7 μm, dimenzija 15 cm x 4,6 mm, koja je termostatirana na 45 °C uz protok od 100 μL min^{-1} i injekcijski volumen od 20 μL. Pokretne faze koje su korištene u analizi su:

a) pokretna faza A - AcN : H_2O = 95 : 5 uz dodatak 2 mM $HCOONH_4$,
b) pokretna faza B – H_2O uz dodatak 2 mM $HCOONH_4$.

Vrijeme analize trajalo je 25 min prema sljedećem rasporedu:

1. 0 – 10 min eluat je išao u otpad,
2. 10 – 20 min eluat je propuštan u MS,
3. 20-25 min eluat je išao u otpad kako bi se smanjila kontaminacija ESI izvora.

Ionizacija je izvršena pomoću ESI izvora, a za analizu je korišten Perkin Elmerov HPLC s binarnom pumpom i autosamplerom te plinom N_2, spojenim s AB SCIEX-ovim API 2000 MS/MS detektorom. Gradijent pokretne faze je postavljen prema **Tablici 5**, a MS/MS uvjeti su navedeni u **Tablici 6**.

Tablica 5 Gradijent pokretne faze

Pokretna faza / %	Vrijeme / min			
	0,00	20,00	21,00	25,00
A	100,0	70,0	100,0	100,0
B	0,0	30,0	0,0	0,0

Tablica 6 Uvjeti za analizu aflatoksina na AB SCIEX-ovom API 2000 MS/MS detektoru

AFLATOKSIN	Q1/Q3$_{quant}$	Q1/Q3$_{qual}$	DP / V	FP / V	EP / V	CE / eV	CXP / V	CEP / V
B1	313,0/241,1	313,1/269,0	40,30	382,40	10,00	52,70	12,00	12,03
B2	315,0/259,2	315,0/243,1	55,00	365,00	12,00	38,10	6,10	11,10
G1	329,1/242,9	329,1/200,3	35,10	321,00	10,30	40,50	11,90	21,85
G2	331,1/256,8	331,1/245,4	54,30	121,90	9,80	41,10	14,70	12,97
M1	329,1/273,3	329,1/229,1	41,00	392,20	10,00	35,20	8,10	8,97

4. REZULTATI

3.1. LC-MS/MS ANALIZA AFLATOKSINA

Tablica 7 Rezultati LC-MS/MS analize aflatoksina u uzorcima kukuruza u µg kg^{-1}

BROJ UZORKA	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2
9	134,29	8,56	84,82	5,01
10	26,79	1,17	<LOD	<LOD
11	1,38	<LOD	1,13	<LOD
13	108,21	13,94	47,78	6,68
14	204,11	14,53	1,33	<LOD
15	64,64	3,78	1,16	<LOD
18	7,32	<LOQ	<LOD	<LOD
20	31,21	1,79	<LOD	<LOD
21	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
22	0,96	<LOD	<LOD	<LOD
23	4,64	<LOQ	3,85	<LOQ
24	27,75	2,56	5,19	1,93
25	1,46	<LOD	0,50	<LOD
26	4,75	<LOQ	2,19	<LOD
27	17,68	2,35	<LOD	<LOD
28	18,14	1,43	8,89	<LOD
29	57,14	4,09	1,34	<LOD
31	<LOQ	<LOD	<LOD	<LOD
32	<LOQ	<LOD	<LOQ	<LOD
33	6,50	0,53	5,93	<LOD
34	1,16	<LOD	<LOQ	<LOD
36	<LOQ	<LOD	<LOD	<LOD
40	25,36	3,47	30,44	4,41
42	1,16	<LOD	<LOQ	<LOD
43	37,50	3,16	<LOQ	<LOD
44	205,00	18,41	46,30	7,63
45	133,57	8,22	1,06	<LOD
48	<LOQ	<LOD	<LOD	<LOD
50	51,43	5,13	11,78	<LOQ
51	1,18	<LOQ	2,91	<LOQ
55	<LOQ	<LOD	<LOD	<LOD
58	19,79	2,01	11,33	2,35
61	1,48	<LOD	<LOD	<LOD
67	41,79	2,91	2,27	<LOD
87	<LOQ	<LOD	<LOD	<LOD
88	13,39	1,81	1,00	<LOD

Tablica 7 Rezultati LC-MS/MS analize aflatoksina u uzorcima kukuruza u µg kg^{-1} - nastavak

BROJ UZORKA	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2
90	3,52	<LOD	<LOD	<LOD
91	0,74	<LOD	<LOD	<LOD
92	24,96	2,88	0,80	<LOD
93	174,29	10,50	<LOD	<LOD
94	96,43	6,63	<LOQ	<LOD
96	22,75	2,90	<LOD	<LOD
97	1,05	<LOD	<LOD	<LOD
98	54,64	4,00	<LOD	<LOD
99	0,84	<LOD	<LOD	<LOD
100	20,50	2,01	4,44	<LOD
101	74,29	7,16	14,33	1,25
102	233,57	9,34	2,64	<LOD
103	6,21	0,51	<LOD	<LOD
104	20,82	1,43	9,78	2,55
107	29,04	3,56	<LOD	<LOD
115	16,71	1,22	1,85	<LOQ
116	28,21	2,15	1,56	<LOD
117	4,75	<LOQ	4,26	<LOQ
118	<LOD	1,46	<LOD	<LOD
123	9,43	0,73	1,34	<LOD
125	16,82	1,45	2,27	<LOQ
126	100,71	10,25	2,69	<LOQ
130	61,43	4,25	65,56	2,90
132	11,43	0,85	2,08	<LOD
140	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
141	4,79	<LOQ	<LOD	<LOD
144	25,86	1,76	8,22	<LOQ
146	46,43	3,63	31,48	3,16

* LOD i LOQ vrijednosti u **Tablici 3**

Tablica 8 Deskriptivna statistika dobivenih rezultata u µg kg^{-1}

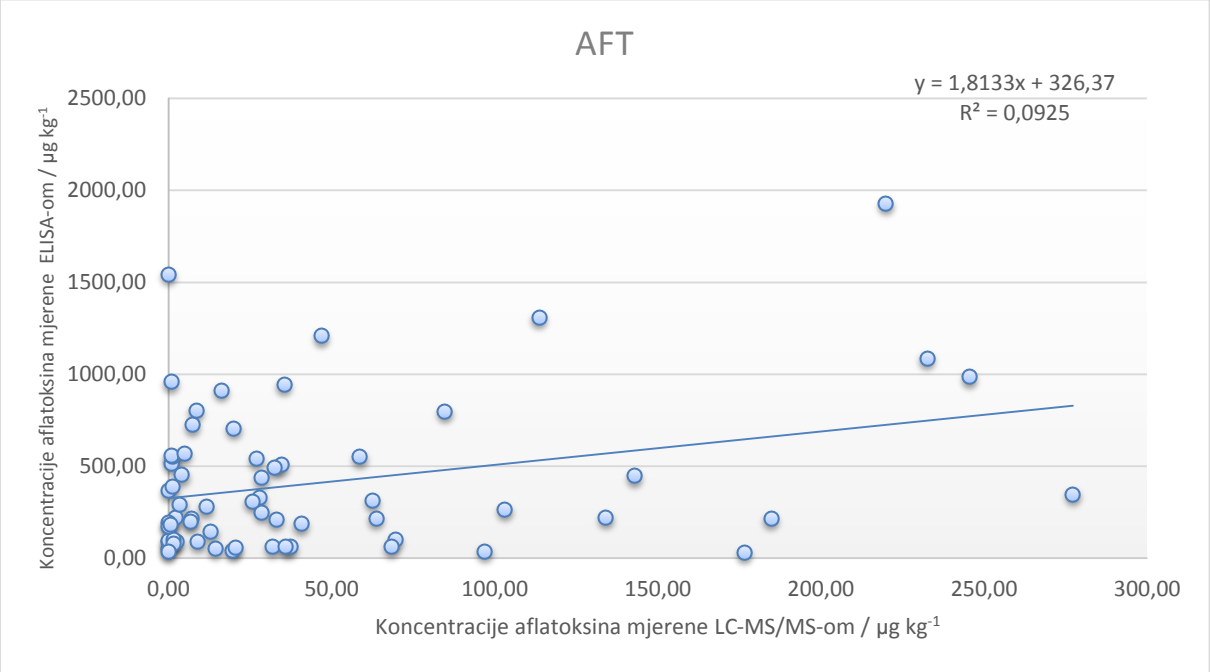
	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2	SUMA AFT
SREDNJA VRIJEDNOST	41,69	4,41	12,08	3,68	52,28
MINIMUM	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
MAKSIMUM	233,57	18,41	84,81	7,63	277,34
MEDIJAN	20,82	2,90	3,38	2,90	28,21
STANDARDNA DEVIJACIJA	55,91	4,19	19,70	2,03	68,41

4.2. USPOREDBA REZULTATA DOBIVENIH LC-MS/MS metodom i ELISA-om

Tablica 9 Usporedba koncentracija aflatoksina izmjerenih LC-MS/MS metodom i ELISA-om u µg kg^{-1}

uzorak	LC-MS/MS	ELISA	Δ ELISA vs LC-MS/MS	uzorak	LC-MS/MS	ELISA	Δ ELISA vs LC-MS/MS
9	232,68	1088,00	855,32	61	1,48	100,00	98,53
10	27,96	327,00	299,04	67	46,97	1210,00	1163,03
11	2,51	90,00	87,49	87	0,00	171,00	171,00
13	176,61	32,00	-144,61	88	16,20	914,00	897,80
14	219,97	1930,00	1710,03	90	3,52	294,00	290,48
15	69,58	99,00	29,42	91	0,74	184,00	183,26
18	7,32	726,00	718,68	92	28,64	252,00	223,36
20	33,00	213,00	180,00	93	184,79	216,00	31,21
21	0,00	89,00	89,00	94	103,06	266,00	162,94
22	0,96	515,00	514,04	96	25,65	308,00	282,35
23	8,49	804,00	795,51	97	1,05	558,00	556,95
24	37,43	62,00	24,57	98	58,64	552,00	493,36
25	1,96	221,00	219,04	99	0,84	960,00	959,16
26	6,94	216,00	209,06	100	26,95	540,00	513,05
27	20,03	708,00	687,97	101	97,03	38,00	-59,03
28	28,46	438,00	409,54	102	245,55	987,00	741,45
29	62,57	314,00	251,43	103	6,72	198,00	191,28
31	0,00	368,00	368,00	104	34,58	507,00	472,42
32	0,00	51,00	51,00	107	32,60	495,00	462,40
33	12,96	143,00	130,04	115	19,78	42,00	22,22
34	1,16	393,00	391,84	116	31,92	61,00	29,08
36	0,00	94,00	94,00	117	9,01	91,00	81,99
40	63,68	219,00	155,32	118	1,46	80,00	78,54
42	1,16	553,00	551,84	123	11,50	279,00	267,50
43	40,66	187,00	146,34	125	20,54	60,00	39,46
44	277,34	348,00	70,66	126	113,65	1310,00	1196,35
45	142,85	450,00	307,15	130	134,14	222,00	87,86
48	0,00	1544,00	1544,00	132	14,36	53,00	38,64
50	68,34	62,00	-6,34	140	0,00	37,00	37,00
51	4,09	455,00	450,91	141	4,79	569,00	564,21
55	0,00	195,00	195,00	144	35,84	62,00	26,16
58	35,48	945,00	909,52	146	84,70	798,00	713,30

*sve vrijednosti koje su LC-MS/MS metodom bile manje od LOQ prikazane su u tablici kao nule



Slika 17 Usporedba izmjerenih koncentracija aflatoksina mjerenih na LC-MS/MS-u i ELISA-i

5. RASPRAVA

Ovo istraživanje provedeno je u svrhu usporedbe preciznosti imunokemijske metode ELISE u odnosu na analitičku metodu LC-MS/MS. Šezdeset četiri uzorka kukuruza koji su se pokazali pozitivnima na prisutnost aflatoksina ELISA metodom ponovno je mjereno potvrdnom LC-MS/MS metodom (**Tablica 7**). Uzorci berbe 2012, su sakupljeni u Istočnoj Slavoniji kada su za vrijeme vegetacije kukuruza bile ekstremno visoke temperature praćene vrlo sušnim razdobljem (DHMZ, 2014). Rezultati s LC-MS/MS-om prikazuju da je u uzorcima kukuruza koji su analizirani najzastupljeniji aflatoksin B1, zatim G1, dok su u manjim koncentracijama zastupljeni aflatoksini B2 i G2. Prema Pravilniku o nepoželjnim i zabranjenim tvarima u hrani za životinje (MPRRR, 2010) najveća dopuštena količina aflatoksina B1 kreće se od 5 do najviše 20 µg kg^{-1} (ppb), što ukazuje na to da većina uzoraka pozitivnih prema ELISA-i premašuje pravilnikom dozvoljene vrijednosti. LC-MS/MS metodom je utvrđeno da 47 % uzoraka ima više od 20 µg kg^{-1}, te 64 % uzoraka sadrži više od 5 µg kg^{-1}.

Najveća koncentracija aflatoksina određena LC-MS/MS-om se odnosi na aflatoksin B1 i iznosila je 233,57 µg kg^{-1}, dok je minimalna vrijednost ispod limita detekcije. Srednja vrijednost ukupnih aflatoksina iznosi 52,28 µg kg^{-1} (**Tablica 8**). Odnos pojavnosti aflatoksina B1:B2:G1:G2 iznosi 1:0,08:0,18:0,02 što je u skladu s rezultatima ostalih istraživača (Kensler i sur., 2011; Matumba i sur., 2015).

Rezultati dobiveni s ELISA-om se razlikuju od onih s LC-MS/MS-a, pri čemu imunokemijska metoda ima izrazito više vrijednosti. Tako najveća razlika za jedan od uzoraka iznosi čak 1710,03 µg kg^{-1}, gdje je koncentracija na ELISA-i iznosila 1930 µg kg^{-1}, a na LC-MS/MS-u 219,97 µg kg^{-1}. Postoji odstupanje u rezultatima dobivenim ELISA i LC-MS/MS metodama što prikazuje **slika 17** uz jednadžbu pravca linearnosti $y = 1,8133x + 326,37$, te koeficijentom determinacije $R^2 = 0,0925$. Prosječna razlika između koncentracija aflatoksina mjerenih LC-MS/MS metodom i ELISA metodom je 364 µg kg^{-1} (**Tablica 9**). Zachariasova i sur. (2008) su proveli istraživanje na deoksinivalenolu i njegovim konjugatima u pivu koristeći nekoliko različitih kitova ELISA testa i uspoređujući rezultate s onima dobivenim LC-MS/MS-om. Parametri uspješnosti imunotestova ovise o afinitetu i specifičnosti antitijela koje se koristi u pojedinom kitu. Tako veliku ulogu ima način proizvodnje antitijela, tip proteina nosača vezanog na toksin prije imunizacije, kao i mjesto vezanja mikotoksina u antitijelu. Rezultati koje su oni prikazali također pokazuju bolju preciznost LC-MS/MS metode, te povišene

rezultate ELISA-e. Smatraju da ELISA pokazuje precijenjene rezultate zbog pojave maskiranih konjugata, no dobra strana ove metode je brzo dobivanje pozitivnih rezultata, koji se zatim naknadno potvrđuju nekom preciznijom metodom. **Slikom 17** prikazano je raspršenje mjerenih vrijednosti gdje se može vidjeti da postoji razlika između rezultata dobivenih LC-MS/MS i ELISA metodom. Takvi rezultati se mogu i djelomično pojasniti vrlo heterogenom raspodjelom aflatoksina u uzorcima (Briselli i sur., 2008; Kensler i sur., 2011). Također kod validacije nije ispitana moguća supresija ionskog signala na LC-MS/MS-u, koja može utjecati na rezultate, ali je jedan uzorak poslan na međulaboratorijsko ispitivanje u akreditirani laboratorij te je odstupanje u rezultatima bilo unutar zakonski propisanih granica (MZSS, 2008). Prema Kensleru i sur. (2011) samo jedan kikiriki u velikoj pošiljci može sadržavati aflatoksine u dovoljno visokim koncentracijama da time, nakon prerade, kontaminira cijelu pošiljku. Heterogenost distribucije aflatoksina u realnim uzorcima smatra se jednim od glavnih izvora grešaka kod mjerenja njegove koncentracije (Kensler i sur., 2011).

Pleadin i sur., (2014) su mjerili koncentracije aflatoksina u 633 uzorka sjeverne, centralne i istočne Hrvatske, te su također utvrdili najviše koncentracije u istočnoj Hrvatskoj, do maksimalno 2072 µg kg^{-1}. Ista skupina autora (Pleadin i sur., 2015) pratila je promjenu koncentracija aflatoksina u više žitarica berbe od 2009. do 2013. godine gdje su maksimumi zabilježeni u berbi 2012.Time se potvrđuje veća pojavnost aflatoksina za vrijeme vrlo toplih i sušnih godina (Battilani i sur., 2012). Sukladno povišenim koncentracijama aflatoksina B1 u krmivima, zabilježene su i povišene koncentracije aflatoksina u mlijeku iz istočnih dijelova Hrvatske (Bilandžić i sur., 2014 a,b).

Shephard (2009) je opisao razvoj metoda za analizu aflatoksina u 21. stoljeću, gdje primjećuje znatno napredovanje u vidu poboljšanja u općoj analitičkoj metodologiji, uključujući uvođenje ekstrakcije čvrste faze, stavljanje (U)HPLC metode u prvi plan separacijskih tehnika i premještanje MS-a iz područja fizike na gotovo univerzalan HPLC detektor. On također primjećuje otvaranje puta brzim metodama, poput ELISA-e, kao praktično brzo rješenjeu sukladnim situacijama.

6. ZAKLJUČCI

Temeljem istraživanja provedenih u ovom radu mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. LC-MS/MS metoda je validirana zadovoljavajući parametre propisane Pravilnikom o planu uzorkovanja i metodama analiza za službenu kontrolu količina mikotoksina u hrani (MZSS, 2008) uz iskorištenje od 79 do 96 %, te limit detekcije od 0,5 do 1 µg kg^{-1} i limit kvantifikacije od 1,65 do 3,3 µg kg^{-1};
2. Utvrđene su visoke koncentracije aflatoksina u krmivu, te je u 47 % uzoraka bilo utvrđeno više od 20 µg kg^{-1}, te u 64 % više od 5 µg kg^{-1} koji su propisani legislativom;
3. Za većinu uzoraka ELISA je dala previsoke rezultate (u prosjeku 364 µg kg^{-1}), što je u skladu s rezultatima drugih autora;
4. Najzastupljeniji aflatoksin u rezultatima dobivenim LC-MS/MS metodom je aflatoksin B1, i čini 78 % ukupno detektiranih aflatoksina, dok 22 % otpada na B2, G1 i G2.

7. LITERATURA

Banerjee S, Mazumdar S: Electrospray ionization mass spectrometry: A Technique to access the information beyond the molecular weight of the analyte. *International Journal of Analytical Chemistry* ID 282574, 2012.

Battilani P, Rossi V, Giorni P, Pietri A, Gualla A, van der Fels-Klerx HJ, Booij CJH, Moretti A, Logrieco A, Miglietta F, Toscano P, Miraglia M, De Santis B, Brera C: Scientific report submitted to EFSA. Modelling, predicting and mapping the emergence of aflatoxins in cereals in the EU due to climate change. EFSA, 2012.

Berthiller F, Burdaspal PA, Crews C, Iha MH, Krska R, Lattanzio VMT, MacDonald S, Malone RJ, Maragos C, Solfrizzo M, Stroka J, Whitaker TB: Developments in mycotoxin analysis: an update for 2012-2013. *World Mycotoxin Journal* 7:3-33, 2014.

Bilandžić N,Božić Đ, Đokić M, Sedak M, Solomun Kolanović B, Varenina I, Cvetnić Ž: Assessment of aflatoxin M1 contamination in the milk of four dairy species in Croatia. *Food Control* 43:18–21, 2014.

Bilandžić N, Božić Đ, Đokić M, Sedak M, Solomun Kolanović B, Varenina I, Tanković S, Cvetnić Ž: Seasonal effect on aflatoxin M1 contamination in raw and UHT milk from Croatia. *Food Control* 40:260–264, 2014.

Biselli S, Persin C, Syben M: Investigation of the distribution of deoxynivalenol and ochratoxin A contamination within a 26 t truckload of wheat kernels. *Mycotoxin Research* 24:98-104, 2008.

De Hoffmann E, Stroobant V: Ion Sources. U *Mass spectrometry, principles and applications, third edition*, str. 42-48. John Wiley & Sons,Chichester, Engleska, 2007.

Domaćinović M, Ćosić J, Klapec T, Peraica M, Mitak M: *Znanstveno mišljenje o mikotoksinima u hrani za životinje*. Hrvatska agencija za hranu, Osijek, 2012.

DHMZ, Državni hidrometeorološki zavod: *Odstupanje srednje temperature zraka u 2012. godini*. DHMZ, 2014.

Gross JH: Introduction. U *Mass spectrometry*, str.1-6. Springer-Verlag, Berlin, 2004.

Hammar F, Pohl-Ferry C: *Autoimmune diagnostics, ELISA.* Wiley Information Services, ChemgaPedia, 2014.

http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/en/ch/25/orgentec/autoimmundiagnostik.vlu/Page/vsc/en/ch/25/orgentec/diagnostik_elisa_varianten_en.vscml.html [15.8.2014.]

Han Z, Zheng Y, Luan L, Cai Z, Ren Y, Wu Y: An ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of aflatoxins B1, B2, G1, G2, M1 and M2 in traditional Chinese medicines. *Analytica Chimica Acta* 664:165-171, 2010.

Hedayati M T, Pasgualotto A C, Warn P A, Bowyer P, Denning D W: *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology* 153:1677-1692, 2007.

Ho CS, Lam CWK, Chan MHM, Cheung RCK, Law LK, Lit LCW, Ng KF, Suen MWM, Tai HL: Electrospray ionisation mass spectrometry: Principles and clinical applications. *The Clinical Biochemist* Reviews 24:3–12, 2003.

IARC, International Agency for Research on Cancer: *Aflatoxins*. IARC monographs 100F:225-248, 2012.

Kensler TW, Roebuck BD, Wogan GN, Groopman JD: Aflatoxin: a 50-year odyssey of mechanistic and translational toxicology. *Toxicological Sciences* 120:S28-S48, 2011.

Klich MA: *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. *Molecular Plant Pathology* 8:71-722, 2007.

Klapec T, Šarkanj B: *Opasnosti vezane uz hranu, Kemijske i fizikalne opasnosti*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, 2014.

L, Sulyok M, Njoroge SMC, Ediage EN, van Poucke C, de Sager S, Krska R: Uncommon occurrence of aflatoxin B1, B2, G1 AND G2 in maize and groundnuts from Matumba Malawi. *Mycotoxin Research, in press*, 2015.

MP, Ministarstvo poljoprivrede: *Pravilnik o izmjenama pravilnika o nepoželjnim tvarima u hrani za životinje kojim se provode uredbe Europske komisije o izmjenama direktive 2002/32/ez Europskog parlamenta i Vijeća od 7. Svibnja 2002. o nepoželjnim tvarima u hrani za životinje*. Narodne novine 124/12, 2012.

MPRRR, Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja: *Pravilnik o nepoželjnim i zabranjenim tvarima u hrani za životinje*. Narodne Novine 80/10, 2010.

MZSS, Ministarstvo zdravstva i socijalne skrbi: *Pravilnik o planu uzorkovanja i metodama analiza za službenu kontrolu količina mikotoksina u hrani*. Narodne novine 45/08, 2008.

Pavlović H: *Brze metode u analizi hrane (interni materijali)*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2012. http://studenti.ptfos.hr/Diplomski_studij/Brze_metode_u_analizi_hrane/Akademska%202012i2013/Brze%20metode%20p%205%202012.pdf [29.11.2014.]

Peraica M, Domijan A, Jurjević Ž, Cvjetković B: Prevention of exposure to mycotoxins from food and feed. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*53:229-237, 2002.

Pleadin J, Vulić A, Perši N, Škrivanko M, Capek B, Cvetnić Ž: Aflatoxin B1 occurrence in maize sampled from Croatian farms and feed factories during 2013. *Food Control* 40:286-291, 2014.

Pleadin J, Vulić A, Perši N, Škrivanko M, Capek B, Cvetnić Ž: 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, 2015.

Poljoprivredni fakultet u Beogradu: *Imunološke tehnike u detekciji patogena u hrani: ELISA imunoadsorpcioni enzimski test*. AGRIFBG, 2011. http://www.agrif.bg.ac.rs/files/subjectfiles/366/Imunoloske%20metode%20tekst.pdf

Scudamore KA: Mycotoxins. *Natural toxicants in food: A manual for experimental foods, dietetics and food scientists*, str. 147-155. Sheffield Academic Press, Sheffield, 1998.

Shepard GS: Aflatoxin analysis at the beginning of twenty-first century. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*395:1215-1224, 2009.

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

Zachariasova M, Hajslova J, Kostelanska M, Poustka J, Krplova A, Cuhra P, Hochel I: 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, 2008.

Yiannikouris A, Jouany JP: Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review. *Animal Research* 51:81-99, 2002.