

Prisutnost ergot alkaloida u žitaricama uzgojenim u Republici Hrvatskoj

Dželalija, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:788842>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-22**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2024.

Ivana Dželalija

**PRISUTNOST ERGOT ALKALOIDA U
ŽITARICAMA UZGOJENIM U REPUBLICI
HRVATSKOJ**

Rad je izrađen pod mentorstvom prof. dr. sc. Ivane Kmetič i komentorstvom prof. dr. sc. Jelke Pleadin, u Laboratoriju za analitičku kemiju na Hrvatskom veterinarskom institutu u Zagrebu.

ZAHVALA

Zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Ivani Kmetič na neizmjernej stručnosti, vodstvu i podršci tijekom izrade mog diplomskog rada. Svojim inspirativnim i zanimljivim predavanjima iz toksikologije, pobudili ste u meni interes za dubljim istraživanjem te mi proširili horizonte kritičkog razmišljanja, što je jedan od temelja na kojem gradim svoju budućnost.

Komentorici s Hrvatskog veterinarskog instituta, prof. dr. sc. Jelki Pleadin, zahvaljujem na stručnom vodstvu, neizmjernej srdačnosti i razumijevanju tijekom mog boravka na institutu. Vaša posvećenost bila je od ključnog značaja za tematski uspjeh diplomskog rada.

Hvala chem. tech. Sandri Birin i dr. sc. Nini Kudumiji na ljubaznosti, tehničkoj podršci i suradnji. Vaša stručnost i predanost pridonijele su uspješnom izvođenju eksperimenata i analiza.

Posebna zahvala ide mom dragom dečku koji je uvijek bio uz mene, pružajući podršku, ljubav i razumijevanje tijekom mog akademskog obrazovanja. Hvala ti što si bio moja stalna podrška i motivacija.

Za kraj, želim izraziti duboku zahvalnost svojoj obitelji bez koje ovo putovanje ne bi bilo ostvarivo. Hvala Vam na nesebičnom zalaganju, razumijevanju, podršci i ljubavi koju ste mi pružili.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za toksikologiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Upravljanje sigurnošću hrane

PRISUTNOST ERGOT ALKALOIDA U ŽITARICAMA UZGOJENIM U REPUBLICI HRVATSKOJ

Ivana Dželalija, univ. bacc. ing. techn. aliment.
0011168493

Sažetak: Cilj ovog istraživanja bio je ispitati prisutnost ergot alkaloida (EA) u uzorcima zobi, ječma, pšenice i kukuruza prikupljenim tijekom 2023. godine s polja hrvatskih proizvođača te utvrditi količine EA koje bi uzrokovale akutnu ili kroničnu toksičnost kod ljudi na temelju rezultata za sirove žitarice. Od ukupno 75 analiziranih uzoraka, 21 je bio pozitivan na prisutnost EA, pri čemu četiri uzorka ne odgovaraju europskim zakonskim propisima vezanim uz hranu za ljude. Visoka razina kontaminacije uočena je u zobi (60 % uzoraka kontaminirano; maksimalno 3200 µg/kg) i pšenici (44 %; maksimalno 159,10 µg/kg), dok nešto niža razina kontaminacije u ječmu (20 %; maksimalno 450,60 µg/kg). U niti jednom uzorku kukuruza nisu detektirani EA. Sirove žitarice nisu direktno konzumirane od strane ljudi, a procesi njihove obrade potencijalno mogu utjecati na koncentraciju EA, smanjujući tako njihovu prisutnost i toksičnost u gotovim proizvodima.

Ključne riječi: ergot alkaloidi, toksičnost, ELISA, mikotoksini, žitarice

Rad sadrži: 48 stranica, 14 slika, 6 tablica, 81 literaturni navod

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: prof. dr. sc. Ivana Kmetič

Komentor: prof. dr. sc. Jelka Pleadin, znan. savj. tr. zv., Hrvatski veterinarski institut

Pomoć pri izradi: chem. tech. Sandra Birin
dr. sc. Nina Kudumija

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. izv. prof. dr. sc. Teuta Murati (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Ivana Kmetič (mentor)
3. prof. dr. sc. Jelka Pleadin, znan. savj. tr. zv., HVI (član)
4. prof. dr. sc. Ksenija Markov (zamjenski član)

Datum obrane: 19. srpnja 2024.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Chemistry and Biochemistry
Laboratory for Toxicology

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

Graduate university study programme: Food Safety Management

THE PRESENCE OF ERGOT ALKALOIDS IN CEREALS GROWN IN THE REPUBLIC OF CROATIA

Ivana Dželalija, univ. bacc. ing. techn. aliment.
0011168493

Abstract: The aim of this study was to investigate the presence of ergot alkaloids (EA) in samples of oats, barley, wheat, and maize collected during 2023 from Croatian fields and to determine amounts of EA that would cause acute or chronic toxicity in humans based on results for raw grains. Out of a total of 75 analyzed samples, 21 tested positive for the presence of EA, with four samples not complying with the European legal regulations related to human food. High contamination levels were observed in oats (60 % of samples contaminated; max 3200 µg/kg) and wheat (44 %; max 159.10 µg/kg), while a slightly lower contamination level was found in barley (20 %; max 450.60 µg/kg). None of the maize samples tested positive for the presence of EA. Raw cereal grains are not directly consumed by humans, and processing procedures may potentially affect the concentration of EA, thus reducing their presence and toxicity in finished products.

Keywords: ergot alkaloids, toxicity, ELISA, mycotoxins, cereals

Thesis contains: 48 pages, 14 figures, 6 tables, 81 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in the Library of the University of Zagreb Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: Ivana Kmetič, PhD, Full professor

Co-mentor: Jelka Pleadin, PhD, Scientific Advisor with tenure, Croatian Veterinary Institute

Technical support and assistance: Sandra Birin, chem. tech.
Nina Kudumija, PhD

Reviewers:

1. Teuta Murati, PhD, Associate professor (president)
2. Ivana Kmetič, PhD, Full professor (mentor)
3. Jelka Pleadin, PhD, Scientific Advisor with tenure, CVI (member)
4. Ksenija Markov, PhD, Full professor (substitute)

Thesis defended: July 19th, 2024

Sadržaj

1.	UVOD	1
2.	TEORIJSKI DIO	3
2.1.	STRUKTURA I FIZIKALNO-KEMIJSKA SVOJSTVA ERGOT ALKALOIDA.....	3
2.2.	POJAVNOST I PRODUCENTI ERGOT ALKALOIDA.....	4
2.2.1.	Pojavnost ergot alkaloida u hrani i hrani za životinje.....	4
2.2.2.	Producenti ergot alkaloida	6
2.3.	BIOSINTEZA I METABOLIZAM ERGOT ALKALOIDA	8
2.3.1.	Stvaranje ergolinskog prstena	8
2.3.2.	Toksikokinetika ergot alkaloida	10
2.4.	MEHANIZAM DJELOVANJA ERGOT ALKALOIDA.....	11
2.5.	TOKSIČNI UČINCI U ORGANIZMU	12
2.5.1.	Akutna toksičnost	12
2.5.2.	Kronična toksičnost	13
2.5.3.	Toksikodinamika ergot alkaloida	14
2.6.	ZAKONSKA REGULATIVA UNUTAR EUROPSKE UNIJE.....	14
2.6.1.	Zakonska regulativa za hranu	14
2.6.2.	Zakonska regulativa za hranu za životinje.....	16
2.7.	ANALITIČKE METODE ZA ODREĐIVANJE PRISUTNOSTI ERGOT ALKALOIDA	16
2.7.1.	ELISA imunoenzimaska metoda.....	17
3.	EKSPERIMENTALNI DIO	20
3.1.	MATERIJAL	20
3.1.1.	Biološki materijal	20
3.1.2.	Kemikalije.....	20
3.1.3.	Oprema i uređaji.....	21
3.2.	PRINCIP ELISA METODE ZA ODREĐIVANJE ERGOT ALKALOIDA.....	21
3.3.	METODE RADA.....	22
3.3.1.	Priprema reagensa	22
3.3.2.	Priprema uzoraka zobi, ječma, pšenice i kukuruza	22
3.3.3.	Test procedura.....	24
3.4.	KVANTIFIKACIJA ERGOT ALKALOIDA U UZORCIMA.....	25

4.	REZULTATI I RASPRAVA	27
4.1.	Koncentracije ergot alkaloida u žitaricama	28
4.1.1.	Pojavnost ergot alkaloida u zobi	29
4.1.2.	Pojavnost ergot alkaloida u ječmu	30
4.1.3.	Pojavnost ergot alkaloida u pšenici.....	31
4.1.4.	Pojavnost ergot alkaloida u kukuruzu	32
4.2.	Usporedba razina ergot alkaloida u različitim žitaricama prikupljenim na hrvatskim poljima	33
4.3.	Karakterizacija rizika	38
5.	ZAKLJUČCI	40
6.	LITERATURA	41

1. UVOD

Mikotoksini (grč. *mykes* – gljiva, *toxicon* – otrov) predstavljaju sekundarne produkte metabolizma sintetizirane od strane različitih filamentoznih gljiva, među kojima su i članovi roda *Claviceps*, koji rastu na supstratima biljnog porijekla te čijih nekoliko vrsta proizvodi toksične ergot alkaloidne (EA) (Gurikar i sur., 2023; Singh i sur., 2019).

Claviceps purpurea najraširenija je vrsta na europskim prostorima, zbog čega joj se pridaje poseban značaj u vidu kontaminacije žita mikotoksinima, spojevima koji su povezani s raznim zdravstvenim poremećajima u ljudi i životinja (Gurikar i sur., 2023; Pleadin i sur., 2022).

Pronađena je u mnogim gospodarski važnim žitaricama kao što su raž, pšenica, tritikal, ječam, proso i zob. Navedene žitarice predstavljaju važan izvor energije i sastavni su dio prehrane ljudske populacije, uključujući dojenčad, djecu, adolescente i starije osobe, te stoga moraju odgovarati zakonskim normama i biti zdravstveno sigurne (Pleadin i sur., 2022; Agriopoulou, 2021).

Eskola i sur. (2020) daju osvrt na široko citiranu procjenu Organizacije za poljoprivredu i hranu (engl. *Food and Agriculture Organization*, FAO) koja navodi da je 25 % prehrambenih usjeva diljem svijeta kontaminirano mikotoksinima (Park i sur., 1999). Točno podrijetlo i osnova ove procjene danas su nepoznati, a osim sekundarnih izvora dostupno je malo detalja. Stoga, pregledom literature vezane uz pojavnost mikotoksina u žitaricama, s naglaskom na izvješća zajedničkog stručnog odbora za prehrambene aditive (engl. *Joint Expert Committee on Food Additives*, JECFA) osnovanog od strane FAO i Svjetske zdravstvene organizacije (engl. *World Health Organization*, WHO), koji provodi opsežne globalne preglede pojave relevantnih i reguliranih mikotoksina, Eskola i sur. (2020) donose zaključak da je njihova pojavnost podcijenjena. Iako globalna prevalencija mikotoksina u prehrambenim usjevima uvelike varira ovisno o brojnim čimbenicima, procjenjuje se da se pojavnost detektabilnih mikotoksina penje sve do 60-80 %, što se ne smije zanemariti. Moguće je da klimatske promjene utječu na veću incidenciju kontaminacije, dok se smatra da će to predstavljati još veću brigu u narednim godinama.

Europska komisija je 2012. godine preporučila državama članicama aktivno uključivanje subjekata u poslovanju s hranom i hranom za životinje te provedbu analiza i praćenje prisutnosti EA u žitaricama i proizvodima od žitarica namijenjenim za prehranu ljudi i životinja. Arroyo-Manzanares i sur. (2017) navode da je do danas izolirano preko 80 različitih EA, uglavnom iz vrsta gljivica roda *Claviceps*, a državama članicama Europske unije preporučeno je da se uzorci analiziraju na prisutnost barem sljedećih EA i njihovih *-inin* epimera: ergokristin/ergokristinin, ergotamin/ergotaminin, ergokriptin/ergokriptinin,

ergometrin/ergometrinin, ergozin/ergozinin, ergokornin/ergokorninin (Preporuka Europske komisije, 2012).

Cilj ovog istraživanja bio je validiranom analitičkom metodom odrediti koncentracije ukupnih EA u uzorcima žitarica - zobi, ječmu, pšenici i kukuruzu, s polja hrvatskih proizvođača, kako bi se utvrdila pojavnost ovih toksičnih tvari, odnosno razina kontaminacije različitih vrsta žitarica.

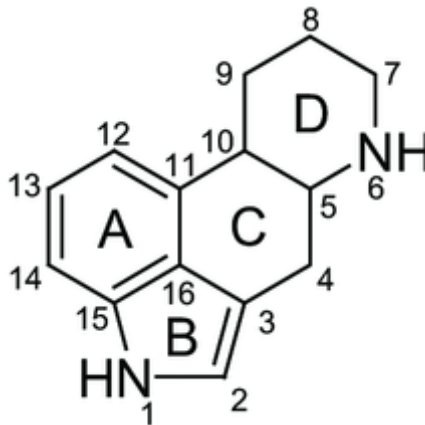
2. TEORIJSKI DIO

2.1. STRUKTURA I FIZIKALNO-KEMIJSKA SVOJSTVA ERGOT ALKALOIDA

EA su prirodni spojevi koji sadrže dušik, čija prisutnost je odgovorna za njihovu alkalnu prirodu. Ove tvari pripadaju indolnim alkaloidima (Akinboye i sur., 2023; Arroyo-Manzanares i sur., 2017), izvedenim iz L-triptofana, aromatske aminokiseline koja sadrži indolni prsten u svojoj strukturi i sukladno tome omogućava njihovu biosintezu (Božanović, 2017).

Većina EA, prisutnih u prirodi, sastavljeni su od tetracikličkog ergolinskog sustava prstena (slika 1). Europska komisija uvrstila je u zakonodavstvo 6 najznačajnijih EA i njihovih *-inin* epimera, a oni su:

- ergokristin/ergokristinin
- ergotamin/ergotaminin
- ergokriptin/ergokriptinin
- ergometrin/ergometrinin
- ergozin/ergozinin
- ergokornin/ergokorninin (HAH, 2017).



Slika 1. Ergolinski sustav prstena s rasporedom i numeracijom prstena (EFSA, 2012)

Na temelju supstitucija na C-8 atomu, EA podijeljeni su u 4 glavne grupe (HAH, 2017):

- klavin alkaloidi i 6,7-sekoergoleni,
- jednostavni derivati lizergične kiseline,
- ergopeptin alkaloidi – ciklol EA,
- ergopeptam alkaloidi – laktam EA.

U većini prirodnih EA, bez obzira na njihovu pripadnost jednoj od četiri podskupine, struktura prstena obično sadrži metilaciju na N6, supstituciju na C8 i prisutnost dvostruke veze

na položaju C8/C9 (za $\Delta^{8,9}$ -ergolene) ili C9/C10 (za $\Delta^{9,10}$ -ergolene), uz asimetrične centre na C5/C10 ili C5/C8. Vodik na C5 uvijek se nalazi u β -konfiguraciji, dok kod $\Delta^{8,9}$ -ergolena vodik na C10 obično zauzima trans-(α) položaj prema C5-H. Kod $\Delta^{9,10}$ -ergolena, asimetrični centar na C8 rezultira dvama epimerima: β - $\Delta^{9,10}$ -ergolenima (označeni sufiksom *-in*) i α - $\Delta^{9,10}$ -izoergolenima (označeni sufiksom *-inin*) (EFSA, 2012).

Čisti EA tvore bezbojne kristale koji se otapaju u organskim otapalima poput acetonitrila i metanola, kao i u smjesama organskih otapala i pufera. Određeni EA, osobito oni iz skupine jednostavnih derivata lizergične kiseline i ergoklavini, pokazuju topljivost i u vodi. Pri niskim pH vrijednostima, EA su pozitivno nabijeni, dok su pri neutralnim i visokim pH vrijednostima neutralni ili nemaju naboj (EFSA, 2012).

Kao indoli, EA bez $\Delta^{9,10}$ -dvostruke veze pokazuju karakterističnu ultraljubičastu (UV) -apsorpciju na 280 nm, dok se $\Delta^{9,10}$ -ergoleni lako otkrivaju putem fluorescencije (Flieger i sur., 1997). Zabilježene su valne duljine ekscitacije od 254, 313, 325 ili 366 nm i valne duljine emisije od 445 nm (Scott, 2007).

$\Delta^{9,10}$ -ergoleni su skloni epimerizaciji na atomu C-8, gdje se $\Delta^{9,10}$ -dvostruka veza može redistribuirati putem enolizacije, posebno u vodenim otopinama pri niskim ili visokim pH-vrijednostima (Krska i Crews, 2008). Omjer izvornog EA i njegovog *-inin* epimera uglavnom ovisi o prirodi ostataka amida u reakciji. Međutim, ovaj omjer može varirati ovisno o različitim faktorima kao što su struktura spojeva, uvjeti skladištenja, izloženost svjetlu, metode ekstrakcije ili analize. Stoga, kvantitativni analitički pristup treba obuhvatiti oba C8-epimera svakog ergopeptida kako bi se osigurala pouzdana analiza (HAH, 2017).

Držanjem glavnih ergopeptidnih EA *C. purpureae* (ergozin, ergotamin, ergokornin, α -ergokristin, ergokristin) u smeđim staklenim bočicama pri sobnoj temperaturi, primijećeno je da su stabilni u kloroformu s obzirom na epimerizaciju i degradaciju. Međutim, kada su testirani u drugim otapalima ili njihovim mješavinama, primijećene su različite razine epimerizacije na C-8 atomu i/ili degradacije pojedinačnih ergopeptid EA. Za ergometrin, jednostavni derivat lizergične kiseline, primijećeno je da gotovo nije bilo epimerizacije pod testiranim uvjetima (HAH, 2017).

2.2. POJAVNOST I PRODUCENTI ERGOT ALKALOIDA

2.2.1. Pojavnost ergot alkaloida u hrani i hrani za životinje

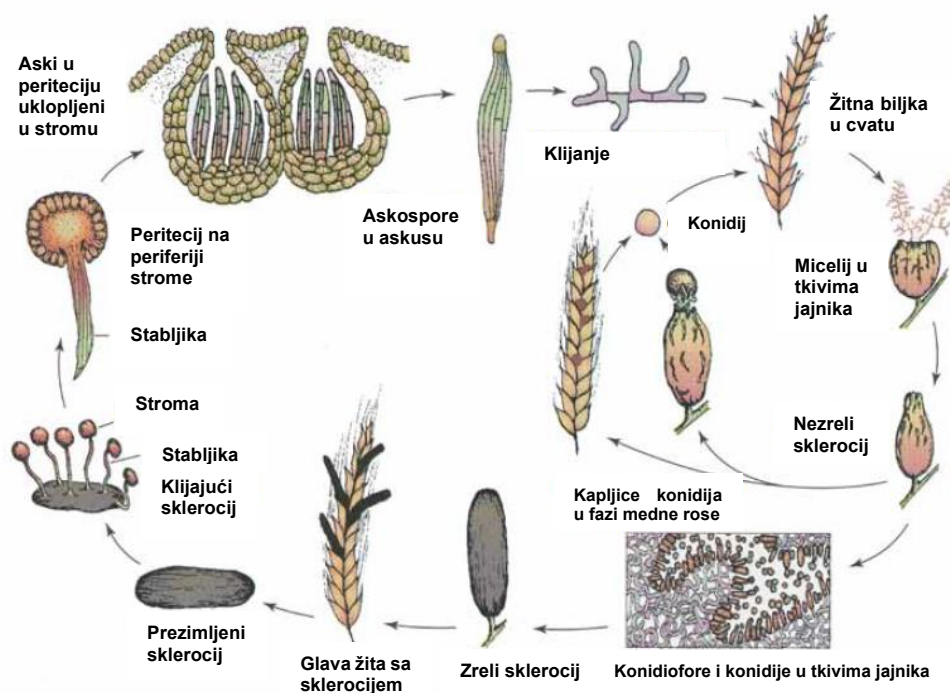
Produkcija EA varira ovisno o geografskoj regiji, a gljiva *Claviceps purpurea* primarni je producent u Europi (Malir i sur., 2023; Gürbüzeli i sur., 2015). Osim toga, na sintezu ovih spojeva utječe nekoliko čimbenika, uključujući, između ostalog, vrstu gljiva i biljaka, koncentraciju gljivica, temperaturu, vlažnost i dostupnost hranjivih tvari. Klimatski uvjeti od

velikog su značaja, budući da je sinteza EA pogodnija u vlažnom tlu i u uvjetima padalina (de Sá i sur., 2021; Carbonell-Rozas i sur., 2021; Guo i sur., 2016). Ovi toksični spojevi prvenstveno se nalaze u sjemenkama i proizvodima žitarica kao što su raž, pšenica, ječam, tritikal, zob i proso, pri čemu su raž, tritikal i ječam najčešće zahvaćeni (Silva i sur., 2023; Diana i sur., 2012).

Ergot je gljivična bolest cvatova ili sjemenskih glavica žitarica i trava gdje umjesto normalnog zrnja nastaju ergot tijela, kompaktne mase gljivičnog micelija poznate i kao sklerociji (jednina: sklerocij), u kojima se nalaze EA, a koje karakterizira tamna boja i polumjesečasti, cjevasti oblik (slika 2 i 3) (Chung, 2021; Guo i sur., 2016).

C. purpurea stvara dvije vrste spora. Spolne spore poznate kao askospore nastaju u stromama (jednina: stroma; kompaktne mase specijaliziranih vegetativnih hifa) koje nastaju klijanjem sklerocija, čime započinje ciklus bolesti. Tijekom klijanja svaki sklerocij formira 1-60 stroma. Svaka stroma sastoji se od stabljike boje mesa visine 0,5-2,5 cm, čiji vrh sadrži kuglastu glavicu. Na periferiji svake glavice razvijaju se brojne spolne plodne strukture poznate kao periteciji (jednina: peritecij), a svaki peritecij sadrži mnogo vrećastih stanica poznatih kao aski (jednina: askus). Mejoza (dioba stanica) rezultira s osam dugih, višestaničnih askospora u svakom askusu. S druge strane, aseksualne spore poznate kao konidije nastaju nakon infekcije jajnika biljke domaćina askosporama. Obje vrste spora šire se vjetrom, prskanjem kiše ili kukcima (Wegulo i Carlson, 2011).

Kada se njihovo oslobađanje poklopi s cvjetanjem, askospore slijeću na cvjetove i inficiraju jajnike. Po glavi može biti zaražen jedan ili više jajnika. Nekoliko dana nakon infekcije, jajnik je zamijenjen sivkasto bijelom micelijskom masom (stroma) koja zauzima prostor između listića (brakteja) cvijeta. Kako stroma raste i razvija se, biljka domaćin proizvodi ljepljivu, slatku izlučevinu (mednu rosu) koja prekriva stromu. Konidije pupaju sa strome i isplivaju na površinu medne rose koja privlači insekte. Konidije se tako šire na druge cvjetove te im zaraze jajnike. Stadij medne rose traje nekoliko dana, a produljuje ga vlažno i oblačno vrijeme. Ciklus bolesti je završen kada stroma koja je zamijenila svaki jajnik na glavi sazrije u sklerocij. Sklerocije padaju na tlo prije ili tijekom žetve ili su uvedene prilikom sadnje kontaminiranog zrnja, čime nanovo započinje ciklus (slika 2) (Wegulo i Carlson, 2011).



Slika 2. Ciklus bolesti ergota strnih žitarica i trava (prema Wegulo i Carlson, 2011)

Tijekom žetve žitarica, sjemenki i trava, prisutnost sklerocija može dovesti do kontaminacije hrane i hrane za životinje koja se bazira na žitaricama. Kontaminacija EA također se može pojaviti i u različitim fazama hranidbenog lanca, uzimajući u obzir da se sklerociji mogu slomiti tijekom transporta čime se olakšava ulazak ovih spojeva u hranidbeni lanac (Sun i sur., 2022; Chung, 2021).

U današnje vrijeme znatna količina (do 80 %) (Lenain i sur., 2012) EA u prehrambenim industrijama se učinkovito može eliminirati tehnikama čišćenja i mljevenja kao što su klasiranje, sortiranje i prosijavanje. Ipak, nije moguće u potpunosti eliminirati njihovu prisutnost, pa čak ni fungicidima, što čini analitičke metode za njihovo određivanje visoko značajnima (Silva i sur., 2023; Storm i sur., 2008).

2.2.2. Producenti ergot alkaloida

EA uglavnom su proizvod gljiva dvaju redova, *Eurotiales* i *Hypocreales*, koji pripadaju koljenu *Ascomycota*. Unutar reda *Hypocreales*, EA su karakteristični za porodicu *Clavicipitaceae*, iako svi članovi te porodice ne proizvode ove spojeve (Scharld i sur., 2006). Među poznatim gljivama koje proizvode EA su *Claviceps spp.* (Hulvova i sur., 2013; Lorenz i sur., 2007), *Epichloë spp.* (uključujući srodne *Neotyphodium spp.*), *Atkinsonella spp.*, *Balansia spp.*, *Periglandula spp.* i *Metarhizium spp.* (Gao i sur., 2011; Kozlovsky i sur., 2011). Također, u redu *Eurotiales*, rodovi *Aspergillus* (Ge i sur., 2009) i *Penicillium* (Kozlovsky i sur., 2013) u porodici *Trichocomaceae* također su poznati po proizvodnji EA. Kasnije je otkriveno da je red *Onygenales*, posebno rod *Arthroderma* (*Trichophyton*), također povezan s proizvodnjom ovih

spojeva (Wallwey i sur., 2012). Gljive koje proizvode EA obično zauzimaju različite ekološke niše: *Claviceps spp.* su biljni paraziti i simbionti, dok je *Aspergillus fumigatus* oportunistički patogen sisavaca (Jakubczyk i sur., 2014; Hulvova i sur., 2013; Wallwey i Li, 2012; Gao i sur., 2011; Schardl i sur., 2006).

Istraživanja pokazuju da tri porodice biljaka, *Convolvulaceae* (Beaulieu i sur., 2013; Markert i sur., 2008), *Poaceae* (Schardl i sur., 2013) i *Polygalaceae* (Scandola i sur., 1994), također proizvode EA. Ranije se vjerovalo da je horizontalni prijenos gena s gljiva na ove biljke tijekom evolucijskog procesa uzrokovao proizvodnju EA. Međutim, novija istraživanja sugeriraju da su gljive koje su asocirane s ovim biljkama vjerojatno same odgovorne za proizvodnju EA. Naime, kada su ove biljke tretirane fungicidima, dolazilo je do eliminacije povezanih gljivica i istovremenog gubitka alkaloida iz biljke. Ova simbioza između gljiva i biljaka omogućuje zaštitu biljke od štetnika, poboljšava otpornost na sušu i hranjive tvari te potiče rast, osobito korijena biljke domaćina. S druge strane, gljive imaju koristi od zaštićene niše i ishrane (Jakubczyk i sur., 2014; Wallwey i Li, 2011; Schardl, 2001). Iako se gljivični simbionti vertikalno prenose putem sjemena biljke domaćina, mehanizam širenja gljiva u biljci domaćinu još uvijek nije potpuno razjašnjen (Jakubczyk i sur., 2014; Panaccione i sur., 2014; Schardl i sur., 2013).

Claviceps purpurea je poznata kao ergot gljiva raži i srodnih trava te se smatra najvažnijim proizvođačem EA. EA u *C. purpurea* nalaze se u sklerocijima, pri čemu spektri variraju između različitih sojeva ove gljive (Lorenz i sur., 2009). Glavni spojevi koje proizvode uključuju ergokristin, ergotamin, ergokornin, α - i β -ergokriptin, ergometrin, ergozin, ergokristinin, ergotaminin, ergokorninin, α - i β -ergokriptinin, ergometrinin i ergozinin (EFSA, 2012; Franzmann i sur., 2010). Također, *C. purpurea* je morfološki vrlo varijabilna vrsta, što se očituje u različitim duljinama i oblicima sklerocija, boji puči te veličini i obliku konidija (Pažoutová, 2002).



Slika 3. Ergot sklerociji na klasu raži (SeedForward GmbH, 2023)

Drugi važni članovi roda *Claviceps* uključuju vrste poput *C. africana*, u kojoj je dihidroergozin glavni EA prisutan u njezinim sklerocijama; *C. fusiformis*, koja je povezana s proizvodnjom agroklavina, elimoklavina, hanoklavina, peniklavina i setoklavina, ali ne i derivata D-lizergične kiseline; te *C. gigantea*, *C. paspali* i *C. hirtella*, koji su također poznati proizvođači klavina. Također, sojevi *A. fumigatus* i *Penicillium*, uključujući *P. roqueforti*, *P. verrucosum* i *P. commune*, također su povezani s proizvodnjom klavina. *Aspergillus* je poznat po proizvodnji fumigaklavina A, B i C, dok je *Penicillium* povezan s proizvodnjom fumigaklavina A i B, ali ne i C (Arroyo-Manzanares i sur., 2017).

2.3. BIOSINTEZA I METABOLIZAM ERGOT ALKALOIDA

EA predstavljaju raznoliku skupinu metabolita s vrlo različitim strukturama. Unatoč njihovoj raznolikosti, svi dijele početne korake biosinteze, koji uključuju formiranje tetracikličkog ergolinskog prstenastog sustava (slika 1), osim najjednostavnijih tricikličkih spojeva kao što su 6,7-sekoergoleni i 6,7-sekoergolini. Istraživanje biosinteze EA provodi se već mnogo godina, te je većina biosintetskih puteva razjašnjena još od 1950-ih. Međutim, neki koraci u tom procesu i dalje ostaju nedovoljno razjašnjeni (Arroyo-Manzanares i sur., 2017).

2.3.1. Stvaranje ergolinskog prstena

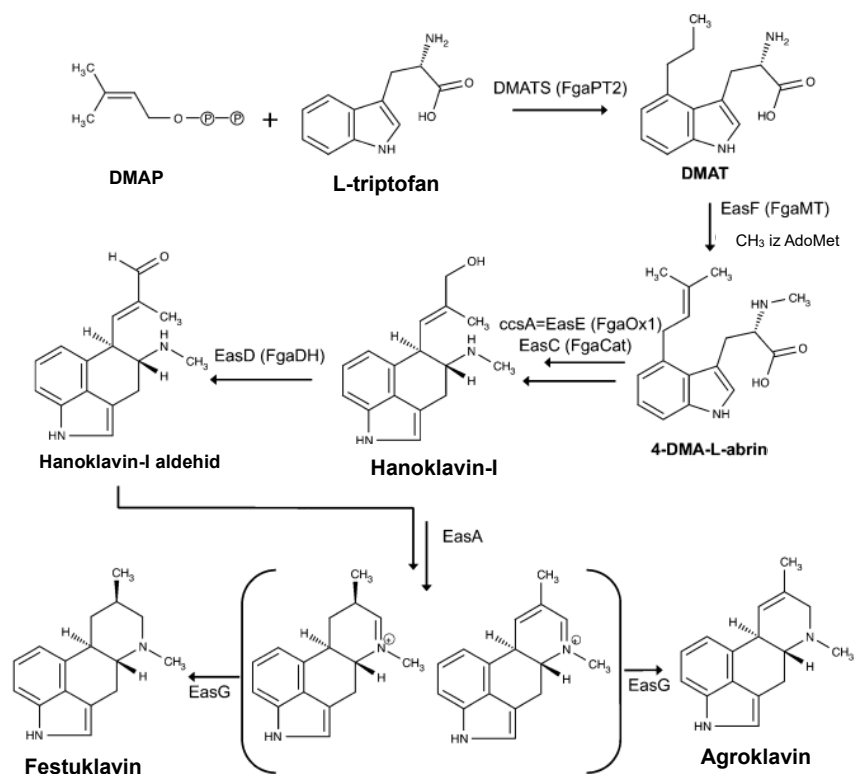
Biosinteza ergolinskog prstena započinje prenilacijom L-triptofana na položaju C4 s dimetilalil difosfatom (DMAPP) kao prenil donorom (slika 4). Ovu ključnu reakciju katalizira enzim preniltransferaza-4-dimetilaliltriptofan sintaza (DMATS), poznat i kao FgaPT2 u *A. fumigatus*, što rezultira stvaranjem 4-L-dimetilaliltriptofana (DMAT). Formiranje DMAT-a osigurava osnovnu strukturu ergolinskog prstenastog sustava. Nakon tog početnog koraka,

daljnji enzimski koraci uglavnom uključuju modifikacije i preraspodjele koje dovode do formiranja prstenova C i D. Sljedeći korak uključuje N-metilaciju amino dušika DMAT-a u prisustvu S-adenozilmetionina (AdoMet), kataliziranu enzimom 4-dimetilaliltriptofan N-metiltransferazom EasF (poznatom kao FgaMT u *A. fumigatus*). Kao rezultat, formira se 4-dimetilalil-L-abrin (4-DMA-L-abrin) (Arroyo-Manzanares i sur., 2017).

Hanoklavin-I je bio sljedeći identificirani intermedijer pronađen u biosintezi EA. Njegovo nakupljanje primijećeno je u mnogim producentima EA, ponekad u relativno visokim koncentracijama. Hanoklavin-I se dobiva dekarboksilacijom i zatvaranjem prstena C. Ovaj korak obuhvaća najmanje tri reakcije: dekarboksilaciju, ciklizaciju i hidroksilaciju. Za ove reakcije su odgovorni enzimi flavin adenin dinukleotid (FAD) ovisne oksidoreduktaze poput EasE (poznatog i kao *ccsA* i *FgaOx1* u *A. fumigatus*) i katalaze poput EasC (poznate i kao *FgaCat* u *A. fumigatus*) (Arroyo-Manzanares i sur., 2017).

Nakon toga slijedi oksidacija hidroksilne skupine hanoklavina-I kako bi se dobio aldehid. Ovu ključnu reakciju katalizira kratkolančana dehidrogenaza/reduktaza (SDR) EasD (poznata i kao *FgaDH* u *A. fumigatus*). Hanoklavin-I aldehid predstavlja posljednji zajednički intermedijer i točku grananja biosintetskog puta u nekoliko gljiva za proizvodnju agroklavina i festuklavina (kao i njegovog 8S-stereoizomera, piroklavina). Agroklavin obično je ključni intermedijer u stvaranju složenijih EA u gljivama iz porodice *Clavicipitaceae*, dok su festuklavin i piroklavin supstrati u gljivama iz porodice *Trichocomaceae*. Točku grananja uglavnom kontrolira „stari žuti enzim“ EasA (poznat i kao *FgaOx3* kod *A. fumigatus* i *FgaOx3pc* kod *P. commune*), a divergencija između gljiva ovisi o aktivnostima različitih verzija ovog enzima. Verzija EasA (*FgaOx3*) koja se nalazi u *A. fumigatus* reducira C8-C9 dvostruku vezu u hanoklavin-I aldehidu, tvoreći ciklizirani iminijski intermedijer u formiranju prstena D. S druge strane, verzije EasA koje se nalaze u većini producenata EA, u porodici *Clavicipitaceae*, ne reduciraju trajno dvostruku vezu; umjesto toga, ti enzimi potiču izomerizaciju oko dvostruke veze. Konačno, za stvaranje agroklavina u porodici *Clavicipitaceae* ili festuklavina (i njegovog 8S-stereoizomera piroklavina) u porodici *Trichocomaceae*, enzim EasG (poznat i kao *FgaFS* u *A. fumigatus* i *FgaFSpc* u *P. commune*) potreban je za redukciju iminijevog iona. Štoviše, verzije EasG pronađene u *A. fumigatusu* i *P. commune* razlikuju se po udjelu stereoizomera (festuklavin i piroklavin). Stvaranje festuklavina bilo je značajno veće kod *A. fumigatusa*, dok je *P. commune* proizvodio veću koncentraciju piroklavina (Arroyo-Manzanares i sur., 2017).

Daljnja istraživanja su pokazala da EasA nije bio neophodan za pretvorbu hanoklavin-I aldehida u agroklavin u *C. purpurea*, barem u *in vitro* eksperimentima, dok je EasG bio dovoljan za stvaranje agroklavina putem neenzimatskog adukta s reduciranim glutationom (Arroyo-Manzanares i sur., 2017).



Slika 4. Formiranje ergolinskog prstena (*prema* Arroyo-Manzanares i sur., 2017)

2.3.2. Toksikokinetika ergot alkaloida

Oralni unos EA obično je povezan s lošom apsorpcijom zbog ekstenzivnog metabolizma prilikom prvog prolaza kroz jetru. Apsorpcija ergotamina u gastrointestinalnom traktu nakon oralnog unosa je nepredvidiva, nepotpuna i spora, s oko 60 % apsorpcije. Najveća koncentracija u plazmi obično se postiže između 1 i 2,7 sati nakon oralnog unosa. S druge strane, ergometrin se brzo apsorbira nakon oralnog unosa. Kod preživača je primijećeno da se većina apsorpcije odvija u predželucu, s različitim stupnjem učinkovitosti ovisno o vrsti EA (jednostavni EA lizergične kiseline se učinkovitije apsorbiraju od ergopeptid alkaloida) (HAH, 2017).

Nakon apsorpcije, EA se brzo distribuiraju po tijelu, pri čemu se poluraspad znatno razlikuje od osobe do osobe. Ipak, ciljna mjesta distribucije unutar tijela su još uvijek slabo istražena. Jedna studija je pokazala veću radioaktivnost u jetri, plućima, bubrezima i srcu nego u krvi, dva sata nakon unosa EA (Kalberer, 1970). Nadalje, u *in vitro* istraživanju tri EA i njihovi epimeri [ergometrin(in), ergotamin(in) i ergokristin(in)] pokazali su potencijal za prelazak krvno-moždane barijere. Za domaće životinje postoje dokazi koji sugeriraju da se ergopeptini mogu taložiti u manjoj mjeri u masnom tkivu (HAH, 2017).

Za metabolizam EA postoji malo podataka, čak i za one koji se koriste u medicinske svrhe. Procjenjuje se da se nakon oralnog unosa više od 90 % apsorbiranog ergotamina izlaže

metabolizmu prvog prolaza. Nedavne studije su pokazale da su EA podložni oksidativnim metaboličkim putevima, često katalizirani citokromom P450 3A4, uz konjugaciju do glukuronske kiseline. Kod preživača, mikroflora u predželucu može imati različite uloge u metabolizmu EA. S jedne strane, fermentacija u predželucu može osloboditi EA iz biljnog tkiva i tako povećati njihovu ukupnu dostupnost za apsorpciju. S druge strane, mikroflora predželuca učinkovito razgrađuje ergopeptine u lizergičnu kiselinu (EFSA, 2012).

Nakon što se EA metaboliziraju u jetri, njihovo izlučivanje putem žuči postaje glavni put eliminacije ergotamina i njegovih metabolita. Međutim, kod preživača se primjećuje drugačija toksikokinetika jer se većina EA izlučuje putem mokraće (HAH, 2017).

2.4. MEHANIZAM DJELOVANJA ERGOT ALKALOIDA

Toksičnost EA dobro je poznata obzirom da je kroz povijest bilo zabilježeno nekoliko epidemija trovanja ljudi uslijed konzumacije zaraženih žitarica. S druge strane, dobro su poznati i pozitivni učinci po zdravlje ljudi, znajući da su se u prošlosti koristili medicinski preparati od sklerocija *C. purpureae* kod poroda, liječenja migrene i poremećaja živčanog sustava. U međuvremenu su ove preparate zamijenili lijekovi od izoliranih EA zbog bolje standardizacije, ali i zbog toga što se uočilo da nema smisla unositi „koktel“ EA jer imaju različite farmakološke učinke (HAH, 2017).

Općenito gledajući, djelovanje EA je isto kao i većine drugih lijekova; oni su ligandi koji se vežu za određene receptore, konkretno za adrenergičke, serotonergičke i dopaminergičke receptore (EFSA, 2012). Drugim riječima, utječu na uloge koje hormoni adrenalin, serotonin i dopamin imaju u organizmu. Receptori su pak makromolekule uključene u kemijsko signaliziranje unutar i između stanica, a aktivirani receptori izravno ili posredno nadziru biokemijske procese u stanicama. Kada se neka molekula veže za receptor te ga na taj način aktivira ili inaktivira, naziva se ligand. Svaki ligand se može vezati s nizom receptorskih podvrsta, odnosno malo koji je apsolutno specifičan i selektivan za određeni receptor. Zbog strukturalnih razlika između EA te adrenalina, serotonina i dopamina, EA općenito pokazuju nisku razinu specifičnosti, odnosno selektivnosti s obzirom na prethodno spomenute neuroreceptore i, zavisno o pojedinačnoj strukturi, mogu pokazati složeno ponašanje kao tzv. receptorski agonisti, parcijalni agonisti ili antagonisti. Tvari koje su agonisti se vežu za određene receptore te na taj način potiču receptore da proizvode biološke odgovore. Parcijalni agonisti se također vežu i aktiviraju određene receptore, ali imaju samo parcijalnu efikasnost u odnosu na pune agoniste. Antagonisti s druge pak strane blokiraju odgovor uzrokovan agonistima pa ih se još naziva i blokatorima. Osim toga, velika heterogenost adrenergičkih, serotonergičkih i dopaminergičkih receptora te raspodjela različitih vrsta i podvrsta receptora

u različitim tkivima, rezultira sa složenom kombinacijom bioloških odgovora, u skladu sa specifičnim profilom svakog pojedinog EA (EFSA, 2012).

2.5. TOKSIČNI UČINCI U ORGANIZMU

Ergotizam, poznat i kao ergotoksikoza ili trovanje ergotom, stanje je uzrokovano konzumiranjem hrane kontaminirane značajnom količinom EA. Obično se očituje simptomima poput glavobolje, povraćanja, proljeva i gangrene ekstremiteta, što se tradicionalno pripisuje unošenju alkaloida koje, kao što je u prethodnim poglavljima opisano, proizvodi najčešće gljiva *Claviceps purpurea*, koja inficira raž i druge žitarice. Nedavno su slični simptomi povezani s uporabom lijekova na bazi ergolina (Gupta, 2018).

2.5.1. Akutna toksičnost

Nakon oralnog unosa malih količina EA, pojedinci mogu doživjeti akutne simptome uključujući povraćanje, grčeve, glavobolje i kardiovaskularne probleme poput hipertenzije ili srčane aritmije. Može doći i do disfunkcije središnjeg živčanog sustava. Dokazano je da čak i male količine unosa uzrokuju kontrakcije maternice, što potencijalno dovodi do krvarenja maternice i pobačaja. U slučajevima ingestije u velikim količinama, akutni toksični učinci mogu se očitovati kao poremećaji cirkulacije zbog vazokonstrikcije krvnih žila, posebno zahvaćajući srčani mišić, bubrege i ekstremitete. Ovi simptomi mogu biti popraćeni halucinacijama, grčevima, slabljenjem osjeta i paralizom, a u teškim slučajevima respiratorni ili srčani zastoj može dovesti do smrti (BfR, 2010).

Postoje dva glavna tipa ergotizma, gangrenozni i konvulzivni. Gangrenozni oblik uzrokovan je jakim vazokonstriktivnim svojstvima nekih EA, što rezultira ograničenjem dotoka krvi u dijelove tijela (ishemija). U konvulzivnom obliku trnci su praćeni neurotoksičnim simptomima kao što su halucinacije, delirij i napadaji epileptičnog tipa. Pretpostavlja se da bi nedostatak vitamina A zajedno s visokom koncentracijom EA mogao biti uzročni čimbenik koji izaziva konvulzivni ergotizam. Dodatni simptomi ergotizma bili su letargija ili depresija (Arroyo-Manzanares i sur., 2017; EFSA, 2012).

Što se tiče životinja, sve su osjetljive na ergot, ali goveda su često najviše pogođena. Kod goveda ergotizam prvenstveno zahvaća ekstremitete, što često dovodi do gubitka vrhova ušiju i repa. Ovisno o razini ingestije, također može zahvatiti stopala i noge, što dovodi do hromosti s mogućim oticanjem skočnih zglobova, a u teškim slučajevima i do gubitka kopita. Promjene u protoku krvi mogu utjecati na termoregulaciju, uzrokujući intoleranciju na toplinu. Oboljela goveda mogu pokazivati simptome kao što su gruba dlaka, gubitak tjelesne težine i provesti dulja razdoblja stojeći u vodi ili tražeći hlad ako je dostupan (Gupta, 2018).

Budući da EA djeluju na nekoliko neurotransmiterskih receptora, posebno na adrenergičke, dopaminergičke i serotonergičke receptore, EFSA (2012) je neurotoksičnost smatrala glavnim akutnim učinkom sa simptomima kao što su nemir, mioza ili midrijaza (kontrakcija i širenje zjenica), mišićna slabost, tremor i ukočenost u sisavaca.

2.5.2. Kronična toksičnost

Dugotrajna ingestija umjerenih količina EA može negativno utjecati na reprodukciju, potencijalno izazivajući pobačaje, smanjenje porođajne težine i ometanje laktacije. Kronično oralno unošenje velikih količina EA u organizam može dovesti do simptoma sličnih onima koji se opažaju kod akutnog unošenja velikih količina EA. Ova zapažanja proizlaze iz štetnih učinaka uočenih kada su se određeni EA koristili kao aktivni sastojci u lijekovima ili kada su se pojedinci razboljeli nakon konzumiranja proizvoda od žitarica koji su bili kontaminirani s EA (BfR, 2010).

Korn i sur. (2014) u svojoj studiji prijavili su spontanu alopeciju, erozije, kraste i nekrozu, posebno u području repa u kunića, isključivo kod mladih kunića u dobi od 113 ± 20 dana hranjenih sijenom i komercijalnom peletiranom hranom. Rezultati studije pokazali su da su EA možda bili uzrok nekroze repa. Imunotestovi na uzorcima krvi pokazali su srednju i maksimalnu koncentraciju EA od 410 $\mu\text{g}/\text{kg}$ odnosno 1700 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Osim toga, EA su otkriveni u izmetu oboljelih kunića u razinama do 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Prosječni i maksimalni unos ukupnih EA hranom iznosio je 17 odnosno 71 $\mu\text{g}/\text{kg}$ tjelesne težine. Drugi toksini također su otkriveni u hrani za životinje, ali u razinama koje, prema autorima, ne objašnjavaju uočene učinke.

Ponovljeno doziranje s različitim EA rezultiralo je ishemijom, osobito u ekstremitetima (npr. repovima) štakora, smanjenim prirastom tjelesne težine i promjenama u razinama nekih hormona. Gangrena repa opažena je kod štakora 5-7 dana nakon jedne intraperitonealne izloženost ergotoksinu (smjesa koja uključuje ergokornin, α - i β -ergokriptin i ergokristin) od 25 mg/kg tjelesne težine (Griffith i sur., 1978). Studije ponovljenih doza na štakorima nisu pokazale veću kvantitativnu razliku u toksičnosti ergotamina, ergometrina i α -ergokriptina, s razinama bez opaženih štetnih učinaka (NOAEL) u području od 0,22 - 0,60 mg/kg tjelesne mase dnevno (EFSA, 2012).

Trenutno nema dostupnih podataka o kroničnoj toksičnosti EA uzrokovanom izloženošću ljudi kontaminiranoj hrani. Međutim, dostupne su ograničene informacije o uporabi lijekova koji sadrže ergot. Studije slučaja o dugotrajnoj primjeni EA lijekova za migrenske glavobolje prijavile su jaku klaudikaciju donjih ekstremiteta (bol u udovima) zbog kronične arterijske insuficijencije (Bogun i sur., 2011; Fröhlich i sur., 2010; Silberstein i McCrory, 2003; Garcia i sur., 2000). U svim slučajevima liječenje je prekinuto, a pacijenti su također zamoljeni da

prestanu koristiti kofein i cigarete. Za uspješno poništavanje simptoma korištena je antitrombocitna terapija.

2.5.3. Toksikodinamika ergot alkaloida

Toksični učinci EA opsežno su proučavani, posebno u pogledu njihovih bioloških učinaka, i to ne samo vezano uz njihove interakcije s receptorima. Studije akutne toksičnosti u *in vivo* otkrile su različite vrijednosti LD₅₀ (smrtonosna doza, 50 %) ovisno o čimbenicima kao što su životinjska vrsta, način primjene i specifični EA (Arroyo-Manzanares i sur., 2017). Griffith i sur. (1978) izvijestili su o rasponu vrijednosti LD₅₀ (od 0,9 do 275 mg/kg tjelesne težine) za različite prirodne i polusintetske EA primijenjene subkutanim ili oralnim putem kod miševa, štakora i zečeva. Također, nalazi pokazuju da su zečevi najosjetljiviji, s vrijednostima LD₅₀ u rasponu od 0,9 do 3,2 mg/kg tjelesne mase.

Dostupni su ograničeni podaci za pokuse *in vitro* vezane uz toksične učinke pojedinih EA na humanim kulturama stanica (Mulac i Humpf, 2011). Većina dostupnih podataka odnosi se na analize interakcija receptora provedene na stanicama s prekomjernom ekspresijom dopamina ili tumorskim stanicama (Larson i sur., 1999; Larson i sur., 1995). Dodatni pokusi pokazali su različite toksične potencijale peptidnih EA u odnosu na alkaloidne amide lizergične kiseline, što sugerira da je citotoksičnost EA u ljudskim staničnim linijama ovisna o specifičnom tipu alkaloida (Oda i sur., 2008).

2.6. ZAKONSKA REGULATIVA UNUTAR EUROPSKE UNIJE

Panel stručnjaka Europske agencije za sigurnost hrane (engl. *European Food Safety Authority*, EFSA) utvrdio je grupnu akutnu referentnu dozu od 1 µg/kg tjelesne mase i grupno prihvatljivi dnevni unos za ukupne EA od 0,6 µg/kg tjelesne težine. Zaključili su da, iako dostupna znanstvena literatura o EA ne sugerira razloge za zabrinutost kod bilo koje podskupine stanovništva, nije moguće isključiti i mogući nepoznati utjecaj drugih izvora hrane (Uredba Europske komisije, 2021).

Od 25. travnja 2023. godine na snagu je stupila Uredba Komisije (EU) 2023/915 o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani te je time Uredba (EZ) br. 1881/2006 stavljena izvan snage. Ujedno, od svibnja 2002. važeća je Direktiva 2002/32/EZ Europskog parlamenta i Vijeća, koja govori o nepoželjnim tvarima u hrani za životinje, uključujući EA.

2.6.1. Zakonska regulativa za hranu

U prilogu I., unutar Uredbe Komisije (EU) 2023/915, propisane su najveće dopuštene količine za mikotoksine u hrani, među kojima su i alkaloidi gljivice raži, odnosno EA (izraženo u µg/kg). Pojam gljivice raži odnosi se na gljivične strukture vrste *Claviceps purpurea*. Najveća dopuštena količina EA u hrani (tablica 1) vodi se kao donja granica zbroja

ergokornina/ergokorninina; ergokristina/ergokristinina; ergokriptina/ergokriptinina (oblik α i β); ergometrina/ergometrinina; ergozina/ergozinina; ergotamina/ergotaminina.

Tablica 1. Prikaz najvećih dopuštenih količina ergot alkaloida u različitim proizvodima od žitarica (Uredba Europske komisije, 2023)

		Mikotoksini	
1.8.2.	Alkaloidi glavice raži	Najveća dopuštena količina ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Napomene
		Donja granica zbroja ergokornina/ergokorninina; ergokristina/ergokristinina; ergokriptina/ergokriptinina (oblik α i β); ergometrina/ergometrinina; ergozina/ergozinina; ergotamina/ergotaminina.	Za alkaloidne glavice raži, najveće dopuštene količine odnose se na donje granice koncentracije, koje se izračunavaju pod pretpostavkom da su sve vrijednosti ispod granice kvantifikacije jednake nuli.
1.8.2.1.	Proizvodi meljave ječma, pšenice, pira i zobi (s udjelom pepela manjim od 900 mg/100 g suhe tvari)	100 50 od 1. srpnja 2024.	
1.8.2.2.	Proizvodi meljave ječma, pšenice, pira i zobi (s udjelom pepela jednakim ili većim od 900 mg/100 g suhe tvari)	150	
	Zrna ječma, pšenice, pira i zobi koja se stavljaju na tržište za krajnjeg potrošača		
1.8.2.3.	Proizvodi meljave raži	500 250 od 1. srpnja 2024.	
	Raž koja se stavlja na tržište za krajnjeg potrošača		
1.8.2.4.	Pšenični gluten	400	
1.8.2.5.	Prerađena hrana na bazi žitarica za dojenčad i malu djecu ⁽³⁾	20	Najveća dopuštena količina primjenjuje se na proizvod kako je stavljen na tržište.

⁽³⁾ Hrana kako je definirana u članku 2. Uredbe (EU) br. 609/2013 Europskog parlamenta i Vijeća od 12. lipnja 2013. o hrani za dojenčad i malu djecu, hrani za posebne medicinske potrebe i zamjeni za cjelodnevnu prehranu pri redukcijskoj dijete.

2.6.2. Zakonska regulativa za hranu za životinje

Direktiva 2002/32/EZ Europskog parlamenta i Vijeća obrađuje nepoželjne tvari u proizvodima koji su namijenjeni hranidbi životinja. Unutar ove Direktive, najveća dopuštena količina alkaloida glavice raži (*Claviceps purpurea*), koja se odnosi na žitarice s udjelom vlage od 12 %, iznosi 1000 mg/kg (ppm). Navedeno vrijedi za svu hranu za životinje koja sadrži nemljevene žitarice (Direktiva Europskog parlamenta i Vijeća, 2002).

2.7. ANALITIČKE METODE ZA ODREĐIVANJE PRISUTNOSTI ERGOT ALKALOIDA

Određivanje EA ima izuzetnu važnost zbog njihove rasprostranjenosti u žitaricama i sjemenkama te mogućih zdravstvenih rizika koje njihov unos može uzrokovati. Međutim, zbog velikog broja različitih namirnica, raznolikosti spojeva i njihovih koncentracija, izazovno je precizno odrediti koncentracije EA u svakoj pojedinoj vrsti uzoraka (Carbonell-Rozas i sur., 2022). To rezultira potrebom za učinkovitom i osjetljivom metodom analize koja omogućuje određivanje i kvantifikaciju ovih spojeva, ispod zakonom propisanih granica (Silva i sur., 2023; Cigić i Prosen, 2009).

Kako bi se osiguralo praćenje i kontrola ovih mikotoksina u sjemenkama i prehrambenim proizvodima od žitarica, tijekom posljednjeg desetljeća razvijene su brojne analitičke tehnike. Proces određivanja obično uključuje nekoliko koraka, počevši od uzorkovanja, ekstrakcije analita, čišćenja uzoraka, pa sve do detekcije i kvantifikacije EA i njihovih epimernih oblika (Crews, 2015).

Postoje razne metode koje se koriste za određivanje EA, a neke od njih su: tekućinska kromatografija (engl. *liquid chromatography*, LC), ELISA (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) imunoenzimski metoda, kapilarna elektroforeza (engl. *capillary electrophoresis*, CE), plinska kromatografija (engl. *gas chromatography*, GC) i tankoslojna kromatografija (engl. *thin-layer chromatography*, TLC) (Carbonell-Rozas i sur., 2021; Guo i sur., 2016). Tekućinska kromatografija može biti povezana s različitim detektorima, poput ultraljubičastog (engl. *ultraviolet*, UV) zračenja, detektora fluorescencije, detektora raspršenja evaporativnog svjetla i masenom spektrometrijom, dok je plinska kromatografija obično povezana s detekcijom uhvaćenih elektrona (Silva i sur., 2023; de Sá i sur., 2021; Veršilovskis i sur., 2020; Guo i sur., 2016).

Kromatografske metode bazirane su na odvajanju komponenti ovisno o njihovom afinitetu prema mobilnoj ili stacionarnoj fazi. Zbog različitih afiniteta dolazi i do različitog kretanja komponenti u koloni, što rezultira razdvajanjem komponenti (Ülger i sur., 2020). Ovom metodom moguće je pojedinačno odrediti glavne EA i njihov zbroj kako bi se dobio ukupni

sadržaj EA. Međutim, to čini ovu metodu skupom, upravo zbog toga što zahtijeva puno standarda, te se često primjenjuju financijski povoljnije metode. Umjesto da se svaki EA analizira zasebno, postoji alternativni pristup koji uključuje pretvaranje EA u zajedničku strukturu prije analize. Ovaj postupak se provodi hidrolizom, gdje se EA i njihovi epimeri razgrađuju u jednoličnu strukturu - lizergičnu kiselinu. Time se pojednostavljuje proces analize, jer se svi spojevi obrađuju kao jedna vrsta, što može rezultirati uštedom vremena i resursa (Silva i sur., 2023; Höfs i sur., 2023).

Obzirom na to da EA nisu isparljivi i mogu se razgraditi u injektoru pod utjecajem visoke temperature, primjena plinske kromatografije postaje manje uobičajena metoda za određivanje ovih spojeva. Dok, s druge strane, metoda tekućinske kromatografije često se koristi za analizu polarnih, nehlapljivih i termolabilnih mikotoksina, kao što su EA (Lenain i sur., 2012; Müller i sur., 2009).

Metode tekućinske kromatografije poput tankoslojne kromatografije (TLC), tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti (engl. *high performance liquid chromatography*, HPLC) i tekućinske kromatografije ultra visoke učinkovitosti (engl. *ultra-high-performance liquid chromatography*, UHPLC) primjenjuju se za određivanje EA. UHPLC je pokazao brzu i učinkovitu separaciju spojeva zahvaljujući tehnološkim naprecima, koristeći stupce napunjene submikronskim česticama, što opravdava njegovu primjenu u određivanju mikotoksina (Veršilovskis i sur., 2020; EFSA, 2012). Što se tiče detektora, UV svjetlo se koristi za kvantifikaciju EA, ali može potaknuti epimerizacijski proces, ometajući kvantifikaciju. Stoga su fluorescentni detektori počeli biti primjenjivani ne samo zbog veće specifičnosti i osjetljivosti, već i zato što su neki EA prirodno fluorescentni (Silva i sur., 2023).

Posljednjih godina, masena spektrometrija postala je standardni postupak za određivanje i kvantifikaciju EA. Kod ove metode, EA se pretvaraju u ionizirane čestice tehnikom elektrosprej ionizacije. To rezultira stvaranjem protoniranih molekularnih iona. Zajedno sa sudarajućim plinom, ove ionizirane molekule se fragmentiraju odnosno razbijaju na manje dijelove koje je moguće identificirati i detektirati (Silva i sur., 2023; Crews, 2015).

Kromatografske metode su ključne u laboratorijima za precizno određivanje koncentracije EA. Međutim, postoji potreba za jednostavnijim i bržim metodama koje se mogu koristiti uz manji utrošak sredstava i njihovu primjenu od strane niže kvalificiranih analitičara, a jedna od najpoznatijih je ELISA metoda, bazirana na imunoenzimatskom principu (Silva i sur., 2023).

2.7.1. ELISA imunoenzimatska metoda

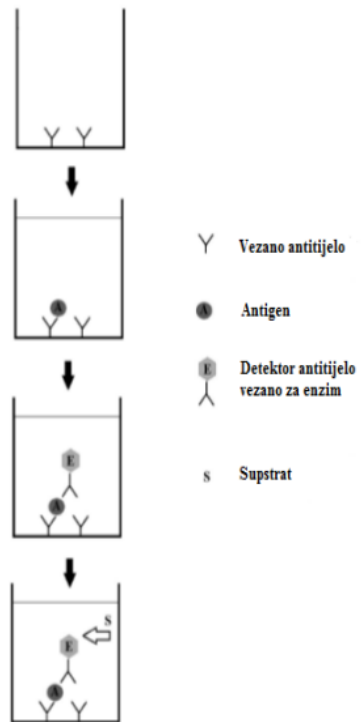
ELISA metoda je imunološka metoda koja se koristi za određivanje prisutnosti i količine specifičnog antigena u uzorku. Ova reakcija se temelji na interakciji između antitijela i antigena

u uzorku, a rezultat se mjeri spektrofotometrijom, gdje se promjena boje koristi kao pokazatelj prisutnosti antigena. ELISA je vrlo osjetljiva i selektivna metoda te omogućuje detekciju vrlo niskih koncentracija analita, npr. nekoliko nanograma po kilogramu ispitivanog uzorka. Postoje različite vrste tehnika ELISA testa, uključujući indirektnu, "sendvič", konkurentnu i novu višestruku i prijenosnu metodu pomoću mikrotitarskih ploča (Petrić, 2016; Butorac i sur., 2013).

Metodologija ELISA tehnike uključuje pričvršćivanje jedne ili dvije komponente, odnosno antigena ili antitijela, na čvrstu podlogu. Ovo rješava probleme separacije jer nakon reakcije, jedna komponenta ostaje vezana za čvrstu podlogu, dok se ostatak jednostavno uklanja, ostavljajući vezani reaktant u obliku u kojem se može lako izmjeriti. Mjerenje je drugi ključni korak, gdje se jedna komponenta, tj. detektor antitijelo, označava enzimom. Označena antitijela potom se mogu detektirati, a dodavanjem supstrata reakcija rezultira mjerljivim promjenama u intenzitetu boje (Petrić, 2016; Bonwick i Smith, 2004).

Imunoenzimski testovi dolaze u raznim oblicima i imaju mnoge primjene. Analitičari mogu koristiti komercijalne testove ili razviti vlastite, ovisno o opremi u njihovim laboratorijima. Ove metode pružaju važan alat stručnjacima u području prehrambene tehnologije za kontrolu kvalitete i osiguranje sigurnosti prehrambenih proizvoda. Glavna prednost ELISA metode je njezina jednostavnost i prenosivost u usporedbi sa stacionarnim kromatografskim sustavima. Međutim, postoji rizik od lažno pozitivnih rezultata zbog unakrsnih reakcija ili lažno negativnih rezultata zbog inhibicije antitijela od strane komponenata matriksa (Petrić, 2016; Bonwick i Smith, 2004).

ELISA je dakle brza i osjetljiva metoda za probiranje (engl. *screening*) EA. Kod jednog od oblika ELISA metode (direktna ili „sendvič“ ELISA tehnika, slika 5) poznato specifično antitijelo vezano je za dno mikrotitracijske ploče. Za njega se vezuje antigen (EA) iz materijala koji se ispituje, ukoliko je prisutan. Poslije ispiranja dodaje se konjugat kojega čine antitijela, specifična za ispitivani antigen, povezana s enzimom. Ova antitijela se vežu za antigen, ukoliko se u prethodnoj fazi vezao za ploču te nije ispran. Enzim tada stupa u reakciju sa supstratom pri čemu se pojavljuje obojenje koje označava pozitivan test, a intenzitet boje je proporcionalan količini prisutnog antigena u materijalu koji se ispituje. Važan aspekt ELISA-e je položaj konjugacije na molekuli EA prema proteinu korištenom za imunizaciju, jer ova pozicija osigurava učinkovitost ispitivanja (Höfs i sur., 2023). Međutim, važno je napomenuti da ELISA ne može definitivno potvrditi prisutnost EA. Umjesto toga, služi kao početna „*screening*“ metoda, a za konačne rezultate je ipak potrebna daljnja potvrda analize (Silva i sur., 2023; Chung, 2021). U ovom radu korištena je kompetitivna ELISA tehnika koja je detaljno objašnjena u Eksperimentalnom dijelu.



Slika 5. ELISA imunoenzimaska metoda (Petrić, 2016)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJAL

3.1.1. Biološki materijal

Žitarice zob, ječam, pšenica i kukuruz, biološki su materijali korišteni u radu. Sveukupno je, u više analiza, ispitano 75 uzoraka od kojih zob čini 10, ječam 20, pšenica 25 te kukuruz 20 uzoraka uzorkovanih tijekom 2023. godine. Materijal potječe s polja hrvatskih poljoprivrednika i proizvođača, a u tablici 2 prikazana je vrsta uzorkovanih (analiziranih) uzoraka te njihova županija podrijetla.

Tablica 2. Uzorci žitarica uzorkovani s hrvatskih polja tijekom 2023. godine koji su analizirani na ergot alkaloidne

Broj uzorka	Žitarica	Županija
4, 71	ZOB	Vukovarsko – srijemska
1, 2, 48, 69	JEČAM	
3, 5, 6	PŠENICA	
59	KUKURUZ	
40 – 44, 70	ZOB	Koprivničko – križevačka
11, 12, 29 – 39	JEČAM	
7 – 10, 14 – 17, 19 – 28	PŠENICA	
45	ZOB	Zagrebačka
47	JEČAM	
13, 18	PŠENICA	
73	KUKURUZ	
46	ZOB	Virovitičko – podravska
49	JEČAM	Osječko – baranjska
50 – 58, 60, 63, 65	KUKURUZ	
61, 68	KUKURUZ	Karlovačka
62, 64	KUKURUZ	Brodsko – posavska
66	KUKURUZ	Krapinsko – zagorska
67	KUKURUZ	Splitsko – dalmatinska
72	JEČAM	Varaždinska
74, 75	PŠENICA	

3.1.2. Kemikalije

Kemikalije za određivanje EA ELISA metodom sadržane su u kitu „Ergot Alkaloids ELISA“ (R-17-1.4.) proizvođača Randox iz Velike Britanije, a kit uključuje:

- testni materijal koji sadrži EA (raženo brašno)
- mikrotitracijska ploča sa 96 jažica (12 redova po 8 jažica)
- 6 standardnih otopina EA (1 mL) koncentracije: 0 ppb („*parts per billion*“, ng/g; µg/kg); 0,29 ppb; 0,67 ppb; 1,60 ppb; 3,87 ppb; 8,00 ppb
- enzimski konjugat (koncentrirani) (1 x 1 mL)
- pufer za razrjeđivanje konjugata (1 x 20 mL)
- pufer za ispiranje (koncentrirani) (1 x 32 mL)
- supstrat (1 x 15 mL)
- stop otopina (1 x 15 mL)

Dodatni reagensi koji su potrebni pri izradi su:

- metanol, HPLC kvaliteta (*Honeywell Riedel-de-Haën™*, Njemačka)
- mravlja kiselina, *p.a.* (*Honeywell Fluka™*, Njemačka)

3.1.3. Oprema i uređaji

U radu je korištena sljedeća oprema:

- digitalna vaga, *AND GF 2000*
- miješalica (vorteks) *LQ1, Heidolph*
- miješalica rotirajuća („*head-over-head*“), *Multi RS-60, Biosan*
- centrifuga, *Universal 120R, Hettich*
- mlin, *TECATOR Cylocec 1093 Sample Mill, Höganäs*
- hladnjak 2-8 °C, *LTH*
- mikropipeta 10-100 µL i 100-1000 µL, *Eppendorf Research*
- konusne epruvete
- staklena boca za pripravu reagensa
- menzura od 100 mL
- računalo s printerom
- uređaj za ELISU, *Thunder Bolt, GSD*

3.2. PRINCIP ELISA METODE ZA ODREĐIVANJE ERGOT ALKALOIDA

EA se ekstrahiraju iz uzorka otopinom za ekstrakciju (600 mL metanola + 400 mL redestilirane vode + 4 mL koncentrirane mravlje kiseline). Mikrotitracijska ploča obložena je sa EA antitijelom. EA (antigen) prisutan u standardu i ukoliko je prisutan u uzorku natječe se s peroksidaza označenim EA (enzimom označen antigen) za ograničeni broj „antitijela“ - mjesta na mikrotitracijskoj ploči. Nakon inkubacije na sobnoj temperaturi (po završetku kompetitivne reakcije), mikrotitracijska ploča se ispiru kako bi se uklonio višak reagensa. Zatim se dodaje

supstrat. Nakon inkubacije (odnosno potpunog razvoja boje), reakcija se zaustavlja dodatkom kiseline. Dolazi do promjene boje iz plave u žutu i slijedi očitavanje apsorbancije pri 450 nm. Zatim se konstruira baždarna krivulja za određivanje EA u uzorcima. Dobiveni rezultat predstavlja zbroj 12 EA (ergometrin, ergozin, ergokornin, ergotamin, ergokristin, α -ergokriptin, ergotaminin, ergokristinin, ergometrinin, ergozinin, ergokorninin, α -ergokriptinin).

3.3. METODE RADA

Metoda izrade eksperimentalnog dijela rada bazirala se na uputama proizvođača ELISA kita „Ergot Alkaloids ELISA“ Randox iz Velike Britanije. Drugi važni referentni dokument korišten tijekom izrade je radna uputa za određivanje EA u žitaricama/hrani za životinje ELISA metodom, Hrvatskog veterinarskog instituta u Zagrebu.

3.3.1. Priprema reagensa

Otopina za ekstrakciju sadržava 600 mL metanola, 400 mL redestilirane vode i 4 mL koncentrirane mravlje kiseline. Standardne otopine EA su liofilizirane pa ih se pažljivo otopi u 1 mL redestilirane vode te se promućkaju prije upotrebe uz izbjegavanje stvaranja pjene. Konjugat (koncentrirani) je također liofiliziran te se otopi, tj. razrijedi prije upotrebe dodatkom 1 mL redestilirane vode te promućka prije upotrebe uz sprječavanje stvaranja pjene. Diluent/pufer za ispiranje (konc.) se pripravlja tako da se sadržaj viala pufera za ispiranje razrijedi sa 970 mL redestilirane vode. Supstrat i stop otopina su odmah spremni za uporabu te ne zahtijevaju nikakvu obradu prije uporabe.

3.3.2. Priprema uzoraka zobi, ječma, pšenice i kukuruza

Prvi korak prije same pripreme uzoraka je mljevenje zrnja žitarica u laboratorijskom mlinu (slika 6). Nakon što se zrnja samelju dobiju se usitnjeni uzorci od svake pribavljene sirovine.



Slika 6. (a) Zrnja ječma za analizu ergot alkaloida; **(b)** Mlin za homogenizaciju zrnja žitarica

U 2,5 g homogeniziranog uzorka (slika 7) dodaje se 25 mL ekstrakcijske otopine.



(a) Homogenizirani uzorci spremni za vaganje; **(b)** Odvaga uzorka u konusnu epruvetu

S ciljem kontrole kvalitete analitičkog postupka koristi se kontrolni materijal, a temeljem rezultata ovog kontrolnog – referentnog uzorka potvrđuje se točnost metode za određivanje prisutnosti EA u ispitivanim uzorcima. Prema uputama proizvođača ELISA kita dodijeljena srednja vrijednost ukupnih EA u kontrolnom materijalu iznosi 419 $\mu\text{g}/\text{kg}$, a prihvatljiv dobiveni rezultat koncentracije EA je u rasponu od 266 do 572 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Nakon vaganja i dodatka ekstrakcijske otopine uzorke treba protresti na vorteksu tijekom 1 minute te zatim tijekom 15 minuta na „*head-over-head*“ rotirajućoj miješalici (slika 8).



Slika 8. Uzorci nakon miješanja na „*head-over-head*“ rotirajućoj miješalici

Zatim slijedi centrifugiranje uzoraka tijekom 5 minuta pri 3500 rpm te zatim razrjeđivanje uzoraka u omjeru 1:9 sa razrijeđenim puferom za ispiranje (100 μL ekstrahiranog uzorka + 900 μL razrijeđenog pufera za ispiranje), koji se nakon tog postupka dobro promućkaju. Na ovaj

način pripremljeni uzorci se ukapavaju u jažice mikrotitracijske ploče, a faktor razrjeđenja koji se primjenjuje na analizirane uzorke za izračun koncentracije EA iznosi 100.

3.3.3. Test procedura

Provedba test procedure temelji se na uputama proizvođača ELISA kita „Ergot Alkaloids ELISA“ (Randox, Velika Britanija) (slika 9).

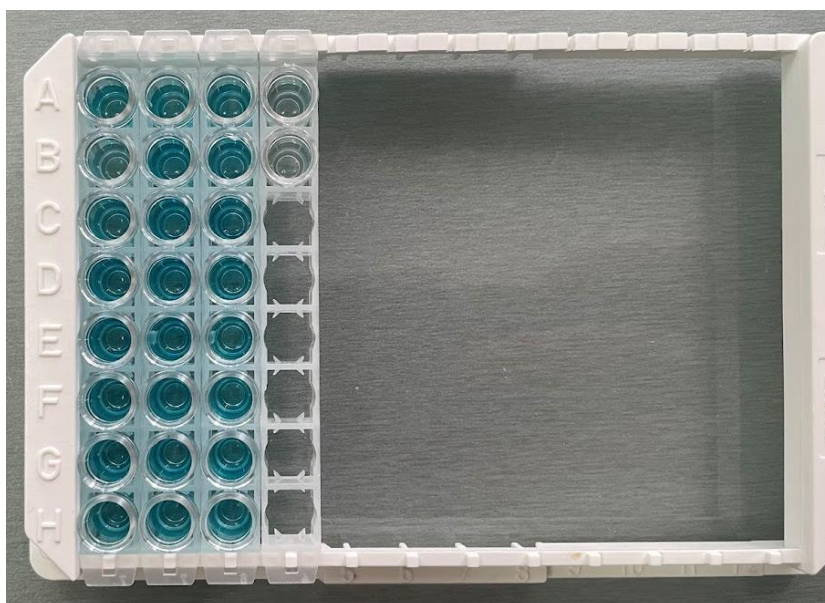


Slika 9. ELISA kit „Ergot Alkaloids ELISA“

Nakon što su se uzorci za analizu pripremili, uz pomoć mikropipete u jažice se pipetira 50 μL standarda (6 standardnih otopina EA) i uzoraka te doda 75 μL konjugata i lagano protrese mikrotitracijska ploča par sekundi. Zatim se ploča pokrije aluminijskom folijom te slijedi inkubacija 1 sat na sobnoj temperaturi u mraku.

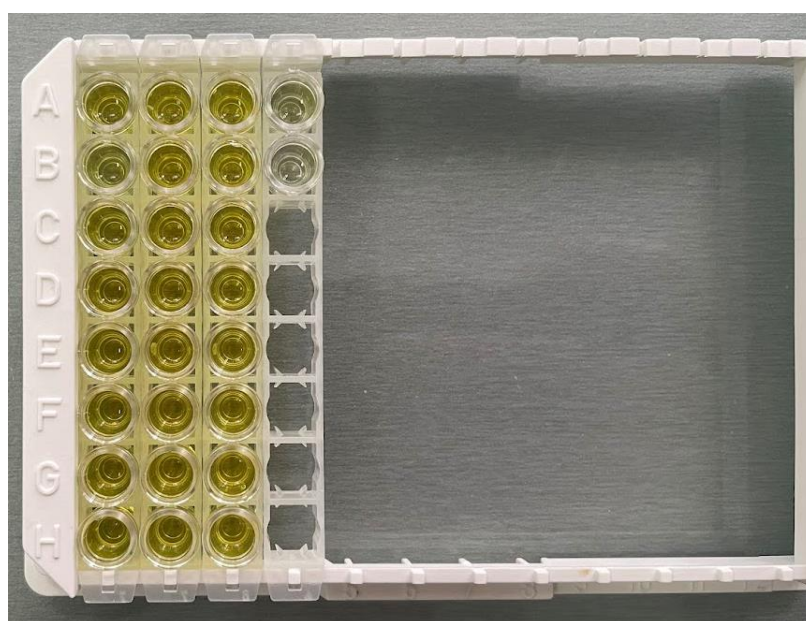
Nakon inkubacije slijedi ispiranje ploče 5 puta sa razrijeđenim puferom za ispiranje tijekom 5 minuta (svako ispiranje traje 1 minutu). Nakon zadnjeg ispiranja potrebno je odbaciti tekućinu iz jažica i lupkanjem o papir osušiti ploču do suha.

Odmah nakon ispiranja slijedi pipetiranje 250 μL (po jažici) supstrata te je potrebno lagano protresti ploču par sekundi. Otopina poprima plavu boju te zatim ponovno slijedi inkubacija u mraku u trajanju od 20 minuta, kako bi došlo do potpunog razvoja boje. Slika 10 prikazuje izgled jažica nakon dodatka supstrata.



Slika 10. Jažice na mikrotitracijskoj ploči nakon dodatka supstrata

Reakcija se zaustavlja dodatkom 100 μ L stop otopine te dolazi do promjene boje iz plave u žutu (slika 11).



Slika 11. Jažice na mikrotitracijskoj ploči nakon dodatka stop otopine

3.4. KVANTIFIKACIJA ERGOT ALKALOIDA U UZORCIMA

Nakon završetka reakcije slijedi mjerenje srednje vrijednosti apsorbancije, za standarde i uzorke, unutar 10 minuta pri valnoj duljini od 450 nm. Zadani računalni softver (RIDASOFT), koji je sastavni dio automatiziranog uređaja, na temelju podataka o apsorbanciji za standarde konstruira baždarnu krivulju, a „4 parameter curve fit“ se koristi za konstruiranje krivulje.

Koncentracija EA u uzorcima očitava se iz baždarne krivulje. Na ordinatu su nanese srednje vrijednosti apsorbancija, a na apscisu koncentracije EA (ppb). Računalni program uređaja provodi navedene korake određivanja koncentracije EA te se dobivene koncentracije EA množe s faktorom 100.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati prisutnost, odnosno odrediti ukupnu koncentraciju EA u uzorcima žitarica prikupljenih tijekom 2023. godine od hrvatskih proizvođača, najvećim dijelom iz središnje i istočne Hrvatske. Grupe žitarica koje su analizirane su zob, ječam, pšenica i kukuruz. Hrvatski poljoprivrednici od žitarica najviše uzgajaju kukuruz i pšenicu (Iljkić i sur., 2019). S druge strane, zob se slabo uzgaja te je stoga u ovom radu najmanje analiziranih uzoraka zobi. Također, bitno je naglasiti da, iako se ergot obično povezuje s raži zaraženom *C. purpurea* (Britannica, 2024), nije prikupljen niti jedan uzorak raži s hrvatskih polja, što ukazuje na oskudnost ove žitarice na hrvatskim prostorima.

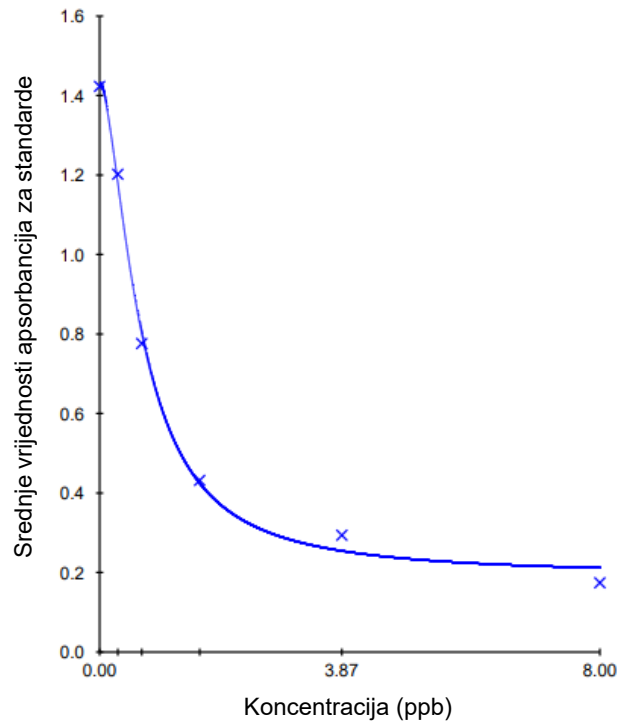
U provedenom istraživanju praćen je ukupni sadržaj EA u neprerađenoj zobi, ječmu, pšenici i kukuruzu, tako da ispitivani uzorci nisu očišćeni u industrijskom procesu kojim se uklanja ergot sklerocij.

Tijekom istraživanja izmjerene su koncentracije ukupnih EA u ispitanim uzorcima zrnja zobi, ječma, pšenice i kukuruza, metodom ELISA testa. Ova metoda je široko prihvaćena zbog svoje osjetljivosti i specifičnosti u detekciji mikotoksina u prehrambenim proizvodima (Silva i sur., 2023).

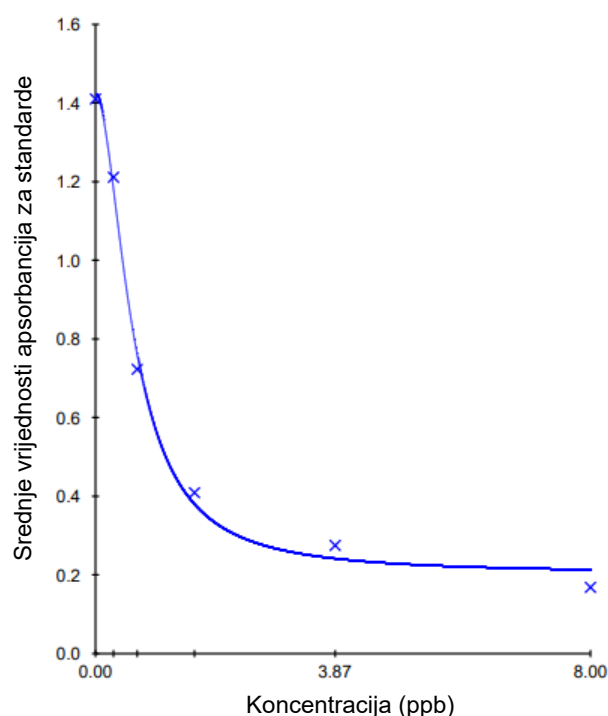
Pojavnost, odnosno kontaminacija žitarica s EA te mogući štetni utjecaj ovih toksičnih spojeva na zdravlje ljudi i životinja tema je o kojoj će se u ovom radu raspravljati.

4.1. Koncentracije ergot alkaloida u žitaricama

Baždarna krivulja prikazana na slici 12 korištena je za softversko izračunavanje svih analiziranih uzoraka, osim kod ponovljenog uzorka (uzorak 43) na koji je primijenjen faktor razrjeđenja 400, kada je korištena baždarna krivulja prikazana na slici 13.



Slika 12. Baždarna krivulja iz koje su softverski izračunate koncentracije ergot alkaloida u analiziranim uzorcima



Slika 13. Baždarna krivulja iz koje su softverski izračunate koncentracije ergot alkaloida u uzorku 43 s faktorom razrjeđenja 400

4.1.1. Pojavnost ergot alkaloida u zobi

Pojavnost EA određena je u više od 400 biljnih vrsta, od kojih su raž, pšenica kao i ostale žitarice najbitnije za čovjeka. U ovoj studiji EA kvantificirani su u 10 uzorka zobi (2 iz Vukovarsko – srijemske, 6 iz Koprivničko – križevačke, 1 iz Zagrebačke te 1 iz Virovitičko – podravske županije), te su rezultati prikazani u tablici 3.

Tablica 3. Prikaz izmjerenih srednjih vrijednosti apsorbancije, postotaka apsorbancije te softverski izračunatih koncentracija ergot alkaloida u uzorcima zobi

	Srednja vrijednost apsorbancije	Postotak apsorbancije (%)	Izračunata koncentracija EA (µg/L / µg/kg)	Faktor razrjeđenja	Koncentracija EA u uzorku (µg/L / µg/kg)
4	1,253	88,1	0,225	100	22,50
40	1,276	89,7	0,205	100	20,50
41	0,800	56,2	0,673	100	67,30
42	1,504	105,7	max	100	n.d.
43	0,162	11,4	min	100	*
43	0,159	11,2	min	200	**
43	0,172	12,2	8,00	400	3200,00

Tablica 3. Prikaz izmjerenih srednjih vrijednosti apsorbancije, postotaka apsorbancije te softverski izračunatih koncentracija ergot alkaloida u uzorcima zobi – *nastavak*

44	1,140	80,1	0,324	100	32,40
45	1,538	108,1	max	100	n.d.
46	0,648	45,5	0,911	100	91,10
70	1,504	105,7	max	100	n.d.
71	1,538	108,1	max	100	n.d.

n.d. – nije detektirano ($<0,1 \times 10^3$ ppb)

min, max - ulazne srednje vrijednosti apsorbancija za uzorke prelaze najnižu (minimalnu) i najveću (maksimalnu) srednju vrijednost asporbancije za standarde te leže izvan raspona baždarne krivulje

* uzorak je morao biti ponovljen s većim razrjeđenjem kako bi se iz baždarne krivulje dobila koncentracija EA sadržana u njemu

** uzorak ponovljen s faktorom razrjeđenja 200 gdje koncentracija i dalje ne upada pod baždarnu krivulju te je stoga uzorak opet analiziran, s faktorom razrjeđenja 400

4.1.2. Pojavnost ergot alkaloida u ječmu

Među najvećim proizvođačima ječma u svijetu su Kanada, SAD i Rusija, a u Europi - Njemačka, Francuska i Španjolska (Šakić Bobić, 2015). U Hrvatskoj se proizvodnja ječma od 2000. godine povećavala, no taj trend je zaustavljen te se po zastupljenosti na oranicama u RH ječam nalazi na četvrtom mjestu (Iljkić i sur., 2019). U ovoj studiji EA kvantificirani su u 20 uzoraka ječma (4 iz Vukovarsko – srijemske, 13 iz Koprivničko – križevačke, 1 iz Zagrebačke, 1 iz Osječko – baranjske te 1 iz Varaždinske županije), te su rezultati prikazani u tablici 4.

Tablica 4. Prikaz izmjerenih srednjih vrijednosti apsorbancije za standarde, postotaka apsorbancije te softverski izračunatih koncentracija ergot alkaloida u uzorcima ječma

	Srednja vrijednost apsorbancije	Postotak apsorbancije (%)	Izračunata koncentracija EA ($\mu\text{g/L}$ / $\mu\text{g/kg}$)	Faktor razrjeđenja	Koncentracija EA u uzorku ($\mu\text{g/L}$ / $\mu\text{g/kg}$)
1	0,842	59,2	0,620	100	62,00
2	1,721	120,9	max	100	n.d.
11	1,780	125,1	max	100	n.d.
12	1,720	120,9	max	100	n.d.
29	1,673	117,6	max	100	n.d.
30	1,662	116,8	max	100	n.d.
31	1,615	113,5	max	100	n.d.
32	1,643	115,5	max	100	n.d.
33	1,628	114,4	max	100	n.d.

Tablica 4. Prikaz izmjerenih srednjih vrijednosti apsorbancije za standarde, postotaka apsorbancije te softverski izračunatih koncentracija ergot alkaloida u uzorcima ječma - *nastavak*

34	1,605	112,8	max	100	n.d.
35	1,496	105,1	max	100	n.d.
36	1,633	114,8	max	100	n.d.
37	1,671	117,4	max	100	n.d.
38	0,241	16,9	4,51	100	450,60
39	0,261	18,3	3,62	100	362,30
47	1,420	99,8	0,040	100	4,00
48	1,788	125,7	max	100	n.d.
49	1,773	124,6	max	100	n.d.
69	1,615	113,5	max	100	n.d.
72	1,496	105,1	max	100	n.d.

n.d. – nije detektirano ($<0,1 \times 10^3$ ppb)

min, max - ulazne srednje vrijednosti apsorbancija za uzorke prelaze najnižu (minimalnu) i najveću (maksimalnu) srednju vrijednost asporbancije za standarde te leže izvan raspona baždarne krivulje

4.1.3. Pojavnost ergot alkaloida u pšenici

Pšenica, koja predstavlja najvažniju krušnu žitaricu u RH, u razdoblju od 2003. do 2017. godine bilježi vrlo blagi trend opadanja zasijanih površina i to naročito u zadnje četiri promatrane godine (Ilijčić i sur., 2019). U ovoj studiji EA kvantificirani su u 25 uzoraka pšenice (3 iz Vukovarsko – srijemske, 18 iz Koprivničko – križevačke, 2 iz Zagrebačke te 2 iz Varaždinske županije), te su rezultati prikazani u tablici 5.

Tablica 5. Prikaz izmjerenih srednjih vrijednosti apsorbancije za standarde, postotaka apsorbancije te softverski izračunatih koncentracija ergot alkaloida u uzorcima pšenice

	Srednja vrijednost apsorbancije	Postotak apsorbancije (%)	Izračunata koncentracija EA (ppb)	Faktor razrjeđenja	Koncentracija EA u uzorku ($\mu\text{g/L}$ / $\mu\text{g/kg}$)
3	1,549	108,9	max	100	n.d.
5	1,712	120,3	max	100	n.d.
6	1,885	132,5	max	100	n.d.
7	0,895	62,9	0,559	100	55,90
8	0,902	63,4	0,551	100	55,10
9	0,549	38,6	1,13	100	113,30
10	1,948	136,9	max	100	n.d.
13	0,578	40,6	1,06	100	106,00

Tablica 5. Prikaz izmjerenih srednjih vrijednosti apsorbancije za standarde, postotaka apsorbancije te softverski izračunatih koncentracija ergot alkaloida u uzorcima pšenice - *nastavak*

14	0,424	29,8	1,59	100	159,10
15	1,783	125,3	max	100	n.d.
16	1,243	87,4	0,234	100	23,40
17	1,772	124,5	max	100	n.d.
18	1,708	120,0	max	100	n.d.
19	1,838	129,2	max	100	n.d.
20	0,973	68,4	0,477	100	47,70
21	0,471	33,1	1,38	100	138,40
22	0,469	33,0	1,39	100	139,10
23	1,142	80,3	0,322	100	32,20
24	1,839	129,2	max	100	n.d.
25	0,854	60,0	0,606	100	60,60
26	1,710	120,2	max	100	n.d.
27	1,852	130,1	max	100	n.d.
28	1,813	127,4	max	100	n.d.
74	1,772	124,5	max	100	n.d.
75	1,783	125,3	max	100	n.d.

n.d. – nije detektirano ($<0,1 \times 10^3$ ppb)

min, max - ulazne srednje vrijednosti apsorbancija za uzorke prelaze najnižu (minimalnu) i najveću (maksimalnu) srednju vrijednost asporbancije za standarde te leže izvan raspona baždarne krivulje

4.1.4. Pojavnost ergot alkaloida u kukuruзу

U razdoblju od 2003. do 2017. godine kukuruz predstavlja najdominantniju ratarsku kulturu u RH. 2005. godina obilježena je s najvećim zasijanim površinama kukuruza, nakon čega su površine pod kukuruzom u stalnom opadanju (Iljkić i sur., 2019). U ovoj studiji EA kvantificirani su u 20 uzoraka kukuruza (1 iz Vukovarsko – srijemske, 1 iz Zagrebačke, 12 iz Osječko – baranjske, 2 iz Karlovačke, 2 iz Brodsko – posavske, 1 iz Krapinsko – zagorske te 1 iz Splitsko – dalmatinske), te su rezultati prikazani u tablici 6.

Tablica 6. Prikaz izmjerenih srednjih vrijednosti apsorbancije za standarde, postotaka apsorbancije te softverski izračunatih koncentracija ergot alkaloida u uzorcima kukuruza

	Srednja vrijednost apsorbancije	Postotak apsorbancije (%)	Izračunata koncentracija EA (ppb)	Faktor razrjeđenja	Koncentracija EA u uzorku ($\mu\text{g/L}$ / $\mu\text{g/kg}$)
50	1,711	120,2	max	100	n.d.

Tablica 6. Prikaz izmjerenih srednjih vrijednosti apsorbancije za standarde, postotaka apsorbancije te softverski izračunatih koncentracija ergot alkaloida u uzorcima kukuruza - *nastavak*

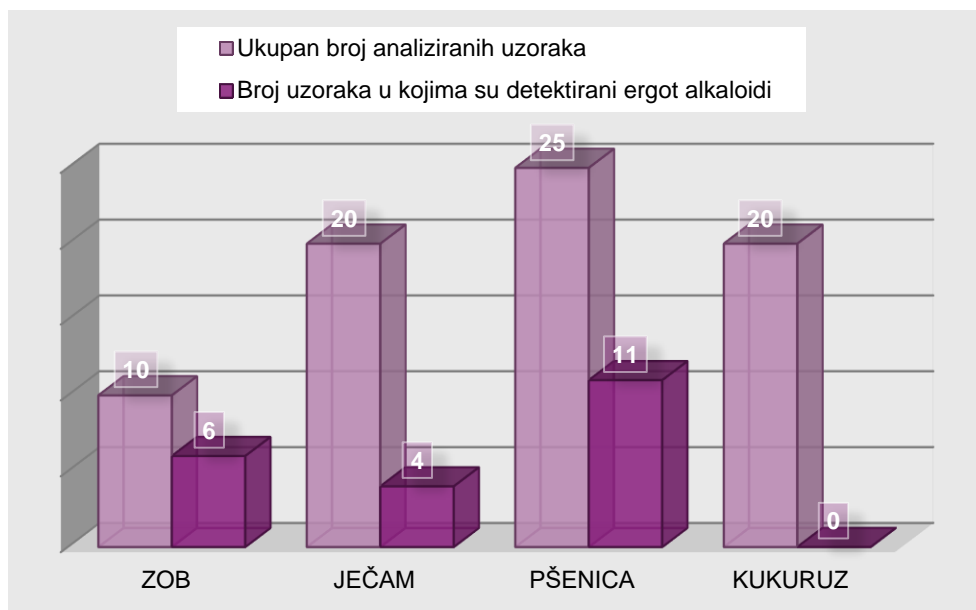
51	1,840	129,3	max	100	n.d.
52	1,818	127,8	max	100	n.d.
53	1,754	123,3	max	100	n.d.
54	1,904	133,8	max	100	n.d.
55	1,844	129,6	max	100	n.d.
56	1,836	129,0	max	100	n.d.
57	1,865	131,1	max	100	n.d.
58	1,730	121,6	max	100	n.d.
59	1,768	124,2	max	100	n.d.
60	1,683	118,3	max	100	n.d.
61	1,809	127,1	max	100	n.d.
62	1,753	123,2	max	100	n.d.
63	1,879	132,0	max	100	n.d.
64	1,775	124,7	max	100	n.d.
65	1,590	111,7	max	100	n.d.
66	1,690	118,8	max	100	n.d.
67	1,817	127,7	max	100	n.d.
68	1,752	123,1	max	100	n.d.
73	1,754	123,3	max	100	n.d.

n.d. – nije detektirano ($<0,1 \times 10^3$ ppb)

min, max - ulazne srednje vrijednosti apsorbancija za uzorke prelaze najnižu (minimalnu) i najveću (maksimalnu) srednju vrijednost asporbancije za standarde te leže izvan raspona baždarne krivulje

4.2. Usporedba razina ergot alkaloida u različitim žitaricama prikupljenim na hrvatskim poljima

Slika 14 prikazuje ukupan broj analiziranih uzoraka u odnosu na broj uzoraka u kojima su detektirani EA, za svaku grupu analiziranih žitarica zasebno.



Slika 14. Odnos uzoraka u kojima su detektirani ergot alkaloidi i ukupnog broja analiziranih uzoraka

Od 75 uzoraka, 21 uzorak bio je pozitivan na prisutnost EA, što čini 28 %.

Od ukupno 10 analiziranih uzoraka zobi, u 6 uzoraka je detektirana prisutnost EA, što čini 60 %. Važno je osvrnuti se na koncentracije, od kojih je jedna zabrinjavajuća. Prateći zakonsku regulativu Europske unije, odnosno Uredbu Komisije (EU) 2023/915 u točki 1.8.2. „Alkaloidi glavice raži“ i podtočki 1.8.2.2. „Proizvodi meljave ječma, pšenice, pira i zobi (s udjelom pepela jednakim ili većim od 900 mg/100 g suhe tvari) te zrna ječma, pšenice, pira i zobi koja se stavljaju na tržište za krajnjeg potrošača“, najveća dopuštena količina EA iznosi 150 µg/kg (ppb). Koncentracije detektiranih EA u 6 pozitivnih uzoraka zobi iznose: 20,50 µg/kg (uzorak 40), 22,50 µg/kg (uzorak 4), 32,40 µg/kg (uzorak 44), 67,30 µg/kg (uzorak 41), 91,10 µg/kg (uzorak 46) dok je u jednom uzorku zobi (uzorak 43) određena koncentracija EA od čak 3200 µg/kg. Ova koncentracija višestruko (preko 20 puta) nadmašuje najveću dopuštenu količinu EA koja je propisana Uredbom Komisije (EU) 2023/915, što znači da ovaj uzorak zobi ne odgovara zakonskim odredbama te se ne smije stavljati na tržište za krajnjeg potrošača. Ostali uzorci zobi odgovaraju zakonskim propisima budući da ne prelaze zakonski propisanu najveću dopuštenu količinu EA.

Od ukupno 20 analiziranih uzoraka ječma, u 4 uzorka utvrđena je prisutnost EA, odnosno 20 % uzoraka ječma bilo je kontaminirano ovim toksinima. Koncentracije EA u pozitivnim uzorcima iznose: 4,00 µg/kg (uzorak 47), 62,00 µg/kg (uzorak 1), 362,30 µg/kg (uzorak 39), 450,60 µg/kg (uzorak 38). Zadnje dvije koncentracije više od dvostruko prelaze zakonski postavljene najveće dopuštene koncentracije EA (Uredba Europske komisije, 2023), što čini te uzorke ječma neprikladnima za stavljanje na tržište. Ostala dva uzorka zadovoljavaju

zakonske propise i ne predstavljaju opasnost za zdravlje potrošača te stoga mogu biti korišteni u daljnjoj proizvodnji.

Po pitanju pšenice, 11 uzoraka pšenice bilo je pozitivno na prisutnost EA, dok ih je ukupno analizirano 25, što ukazuje na kontaminaciju od 44 %. Koncentracije detektiranih EA u pozitivnim uzorcima iznose: 23,40 µg/kg (uzorak 16), 32,20 µg/kg (uzorak 23), 47,70 µg/kg (uzorak 20), 55,10 µg/kg (uzorak 8), 55,90 µg/kg (uzorak 7), 60,60 µg/kg (uzorak 25), 106,00 µg/kg (uzorak 13), 113,30 µg/kg (uzorak 9), 138,40 µg/kg (uzorak 21), 139,10 µg/kg (uzorak 22) te jedina koncentracija koja ne odgovara zakonskoj normi, odnosno najvećim dopuštenim koncentracijama EA prema Uredbi Komisije (EU) 2023/915, 159,10 µg/kg (uzorak 14).

Na kraju, od ukupno 20 analiziranih uzoraka kukuruza, u niti jednom nisu detektirani EA, odnosno kontaminirano je 0 % uzoraka. Poveznica kukuruza za zakonodavstvom vezanim uz EA nije moguća, obzirom da Uredba Komisije (EU) 2023/915 ne dovodi u vezu kukuruz i najveće dopuštene količine EA. To sugerira da možda ne postoji dovoljno podataka o specifičnoj prisutnosti i učincima EA u kukuruzu, što otežava postavljanje sigurnih granica.

Rezultati ukazuju na srednju razinu kontaminacije ječma te visoku razinu kontaminacije zobi i pšenice, uzgojenih tijekom 2023. godine. Uzorak zobi s koncentracijom koja doseže 3200 µg/kg, nalaže brojna pitanja. Najveće određene koncentracije EA osim onih u zobi određene su u ječmu, s koncentracijama od 362,30 µg/kg i 450,60 µg/kg, koje nadmašuju zakonski propisanu najveću dopuštenu količinu EA, a ona iznosi 150 µg/kg za analizirane uzorke zobi, ječma i pšenice, dok za kukuruz ta vrijednost zakonski nije propisana (Uredba Europske komisije, 2023). Uzorci pšenice s koncentracijama od 138,40 µg/kg i 139,10 µg/kg veoma su blizu zakonski propisanoj granici, dok je uzorak s koncentracijom od 159,10 µg/kg nešto prelazi.

Mikotoksini su okolišni kontaminanti, a razdoblje padalina i uglavnom razdoblje cvatnje dva su kritična perioda u kojima gljiva inficira biljku (Pleadin i sur., 2022; Guo i sur., 2016). Cvatnja žitarica obično se događa u proljetnim mjesecima (Dennis i Peacock, 2009), a uvidom u dostupne podatke Državnog hidrometeorološkog zavoda Republike Hrvatske, za mjesec svibanj 2023. godine na području istočne, središnje i sjeverozapadne (SZ) Hrvatske, uočene su temperature zraka, količine oborina i relativne vlažnosti zraka koje su mogle pogodovati rastu gljive *C. purpurea*, a samim time i sintezi EA. U svibnju 2023. godine na području istočne Hrvatske srednja mjesečna temperatura zraka iznosila je 16,7 °C, dok je za područje središnje i SZ Hrvatske iznosila 15,9 °C. Srednja mjesečna količina oborina iznosila je 124 mm za istočnu, odnosno 135 mm za središnju i SZ Hrvatsku. Srednja relativna vlažnost zraka bila je visoka, 77 % za istočnu i 76 % za središnju i SZ Hrvatsku (DHMZ, 2023).

U usporedbi s ostalim reguliranim mikotoksinima, podaci o pojavnosti EA u žitaricama poželjenim u mediteranskim područjima uzgoja još uvijek su oskudni. Carbonell-Rozas i sur. (2023) izvještavaju o pojavi EA u 18 genotipova ozimih žitarica poželjenih tijekom 3 godine (2020., 2021. i 2022.) s pokusnog polja u sjevernoj Italiji, koji su analizirani pomoću HPLC-MS/MS. Rezultati pokazuju široku pojavu glavnih EA u svim razmatranim usjevima žitarica, što je vezano uz povoljne meteorološke uvjete. Kontaminacija s EA ovisila je o godini žetve i bila je posebno visoka 2020. godine za sve analizirane žitarice, uključujući emmer pšenicu, durum pšenicu, meku pšenicu, pir, ječam, tritikal, tritordeum i raž. Od sveukupno 162 uzorka žitarica, u 98 je potvrđena kontaminacija sa barem jednim od 12 EA, što pokazuje da je bilo 60 % pozitivnih uzoraka. Potvrdili su da je raž osjetljivija na gljivičnu infekciju te utvrdili koncentraciju EA do čak 4302 µg/kg. Također, Carbonell-Rozas i sur. (2023) su prvi koji su izvijestili o akumulaciji EA u hibridnoj biljci tritordeum (2021. godine utvrđena iznimno visoka koncentracija od 15389 µg/kg) i emmer pšenici (1,9 µg/kg). U njihovoj studiji najviša koncentracija EA u ječmu iznosila je 20,9 µg/kg, što je manje od najveće utvrđene koncentracije EA u ječmu u ovoj studiji, koja iznosi 450,60 µg/kg.

U kanadskoj studiji, Martos i sur. (2010) proveli su simultanu analizu 22 mikotoksina, među kojima i analizu EA - ergotamina i ergokornina, u zrnju pšenice, ječma, zobi, raži i kukuruza. Analiza je provedena tekućinskom kromatografijom visoke učinkovitosti u kombinaciji s masenom spektrometrijom, a najveća koncentracija ergotamina u analiziranim uzorcima pšenice iznosila je 638 µg/kg te ergokornina 354 µg/kg. U uzorcima kukuruza, zobi, ječma i raži nisu detektirani EA, odnosno ergotamin i ergokornin.

Pleadin i sur. (2022) ELISA metodom istražili su pojavu ergot sklerocija i EA u uzorcima zrnja pšenice i raži prikupljenih tijekom 2021. godine od hrvatskih proizvođača žitarica iz središnje i istočne Hrvatske. Analizirano je sveukupno 64 uzorka, od kojih pšenice 53, a raži 11 uzoraka. Veća kontaminacija EA utvrđena je u uzorcima raži (18 % uzoraka kontaminirano, a najveća utvrđena koncentracija EA iznosila je 167,4 µg/kg), dok je manja učestalost kontaminacije utvrđena u pšenici, sa samo jednim pozitivnim uzorkom (1,9 % kontaminirano; max 68,5 µg/kg). Rezultati pokazuju nisku razinu kontaminacije pšenice i raži koju su uzgajali hrvatski proizvođači tijekom razdoblja navedenog istraživanja. U ovoj studiji, provedenoj na uzorcima zrnja žitarica prikupljenih tijekom 2023. godine, od ukupno 25 analiziranih uzoraka pšenice, 11 ih je bilo pozitivno na prisutnost EA, s najvećom koncentracijom od 159,10 µg/kg, što ukazuje na veću učestalost kontaminacije pšenice hrvatskih proizvođača tijekom razdoblja ovog istraživanja.

Druge studije također su ukazale na pojavnost EA u uzorcima žitarica. Babič i sur. (2020) proveli su četverogodišnju studiju (2014.-2017.) te izvijestili o pojavi EA u žitaricama

namijenjenim hranidbi životinja prikupljenim u Sloveniji. Ukupno 517 uzoraka žitarica analizirano je na prisutnost EA tekućinskom kromatografijom u kombinaciji s masenom spektrometrijom. Skup uzoraka uključivao je pšenicu, raž, tritikal, zob, pir i ječam. Studija je pokazala da je 17 % analiziranih uzoraka žitarica bilo kontaminirano s najmanje jednim EA. Najveće stope kontaminacije zabilježene su u raži (54 %), zobi (50 %) i piru (30 %), gdje su utvrđene i najveće srednje koncentracije ukupnih EA (502 µg/kg, 594 µg/kg i 715 µg/kg). Međutim, najveće koncentracije ukupnih EA pronađene su u pšenici i raži (4217 µg/kg i 4114 µg/kg). Navedena koncentracija ukupnih EA u pšenici veća je od najveće koncentracije koja je detektirana u ovoj studiji i iznosi 159,10 µg/kg. Isto vrijedi i za ječam. Babič i sur. (2020) utvrdili su da je najveća koncentracija EA u ječmu iznosila 1177 µg/kg, dok je u ovom radu određena vrijednost od 450,60 µg/kg. Najveća koncentracija EA u zobi kod Babič i sur. (2020) iznosila je 2191 µg/kg, dok je u ovom radu određena koncentracija veća i iznosi 3200 µg/kg.

Navedene studije pokazuju da kontaminacija EA ima sporadičnu učestalost te je jasno da su mnogi čimbenici uključeni u pojavu EA i da njihove koncentracije uvelike variraju ovisno o sojevima gljivica, zemljopisnim regijama, biljkama domaćinima i regionalnim/lokalnim vremenskim uvjetima. Hladno i vlažno vrijeme posebno pogoduje ergotu potičući klijanje sklerocija (Pleadin i sur., 2022).

Često se žitarice koje ne zadovoljavaju parametre zakonske regulative oko najvećih dopuštenih količina EA za ljude, koriste za proizvodnju hrane za životinje. Razlog je taj što su mjere za ljude mnogo strože nego za životinje. Najveće dopuštene količine EA u hrani za ljude izražavaju se u µg/kg, dok se za životinje izražavaju u mg/kg. To znači da ono što se ne može iskoristiti za ljudsku prehranu nerijetko može zadovoljiti parametre propisane u legislativi za hranu za životinje, što je u ovom slučaju Direktiva 2002/32/EZ Europskog parlamenta i Vijeća koja obrađuje nepoželjne tvari u proizvodima koji su namijenjeni prehrani životinja. Unutar ove Direktive, najveća dopuštena količina alkaloida glavice raži (*Claviceps purpurea*), izražena u mg/kg (ppm) u odnosu na hranu za životinje s udjelom vlage od 12 %, iznosi 1000 mg/kg. Navedeno se odnosi na svu hranu za životinje koja sadrži nemljevene žitarice. Udio vlage u ispitivanim uzorcima iznosio je ~12 %. To znači da svi analizirani uzorci odgovaraju zakonskoj normi za hranu za životinje. Za primjer, uzorak zobi u kojem je utvrđena koncentracija EA od 3200 µg/kg, odnosno 3,2 mg/kg, ne zadovoljava zakonske norme za hranu za ljude, ali zadovoljava norme za hranu za životinje, te se stoga može koristiti kao stočna hrana. Isto vrijedi i za uzorke 14, 38 i 39, čije koncentracije u mg/kg iznose redom 0,2 mg/kg, 0,5 mg/kg i 0,4 mg/kg te ne prelaze zakonski postavljen limit od 1000 mg/kg, za hranu za životinje.

4.3. Karakterizacija rizika

Posljedice unosa EA u organizam ovise o unesenoj količini i učestalosti ingestije te mogu varirati od akutnih do kroničnih oboljenja, a u ekstremnim slučajevima mogu uzrokovati i smrt. Ti se učinci mogu očitovati u nekoliko oblika, jer je poznato da ovi spojevi stupaju u interakciju s adrenergičkim, serotonergičkim i dopaminergičkim receptorima (EFSA, 2012). Jedan od učinaka uzrokovanih pretjeranim unosom EA je vazokonstrikcija, posredovana interakcijom α -adrenergičkih receptora, koju karakteriziraju grčevi, otekline, crvene mrlje, nekroza, gubitak ekstremiteta i smrt. Interakcija sa serotonergičkim i dopaminergičkim receptorima utječe na središnji živčani sustav, uzrokujući simptome kao što su halucinacije, vrtoglavica, mučnina, paraliza, psihoza, demencija, bockanje, poremećaj ekstremiteta i smrt (Silva i sur., 2023).

Prilikom karakterizacije rizika, potrebno je uzeti u obzir akutnu i kroničnu izloženost za što se koriste akutna referentna doza (ARfD – engl. *acute reference dose*) i prihvatljivi dnevni unos (TDI – engl. *tolerable daily intake*) za EA. Ove vrijednosti postavila je EFSA na temelju učinaka koje EA imaju na neurotransmitterske receptore, što u konačnici može rezultirati s ishemijom, prvenstveno u ekstremitetima kao što su repovi štakora, smanjenim dobivanjem tjelesne mase te promjenama u razinama nekih hormona. Vazokonstrikcija je pak označena kao kritični učinak te izabrana za određivanje ARfD i TDI vrijednosti (HAH, 2017).

Razmatrajući utvrđene koncentracije EA u uzorcima u sve tri godine, EFSA (2012) izvještava da su one najveće u sirovini (zrnja raži). Trenutno nisu najbolje razjašnjeni dostupni podaci o tome kako i na koji način daljnja obrada utječe na EA te se stoga rezultati dobiveni na uzorcima sirovina nisu mogli uzimati u obzir prilikom karakterizacije rizika. Na temelju dobivenih rezultata, EFSA (2012) je zaključila da su niže koncentracije EA prisutne kod većeg stupnja tehnološke obrade. EFSA je također u procjeni rizika iz 2012. godine koristila samo rezultate na gotovim namirnicama. Obzirom da su u ovom radu rezultati dobiveni na uzorcima sirovina (zrnja zobi, ječma, pšenice i kukuruza), također nije moguće odrediti količinu te sirovine koju bi osoba trebala unijeti u organizam kako bi se očitovao toksični učinak, iz razloga što daljnja obrada sirovine, kao što je na primjer termička obrada kuhanjem, pečenjem ili prženjem, potencijalno može utjecati na promjenu u količini EA u gotovoj namirnici. Bitno je naglasiti da ljudi uglavnom ne konzumiraju sirovinu, tj. zrnja žitarica, bez prethodne termičke obrade, te stoga nema smisla utvrđivati količine sirovog zrnja koje osoba treba unijeti u organizam kako bi se odrazio negativan utjecaj na zdravlje.

Određivanje točne količine kontaminirane hrane koju bi osoba trebala unijeti u organizam da bi doživjela trovanje s EA ovisi o nekoliko čimbenika, uključujući specifičnu vrstu EA, njihovu koncentraciju u hrani i tjelesnu težinu osobe. EFSA (2012) je za ljude utvrdila akutnu referentnu dozu za EA na 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ t.m. Navedeno znači da bi za osobu tešku 70 kg granica akutne

izloženosti bila 70 µg EA u jednom obroku ili tijekom kratkog razdoblja. Prihvatljivi dnevni unos za EA postavljen je na 0,6 µg/kg tjelesne težine dnevno. Za istu osobu od 70 kg, to je jednako 42 µg dnevno, što teoretski znači da ta osoba može cijeli život konzumirati 42 µg EA dnevno bez štetnih učinaka na zdravlje.

Hrvatska agencija za hranu u vlastitom istraživanju za procjenu akutne izloženosti koristila je najveću izmjerenu ukupnu koncentraciju EA (zbroj svih EA i njihovih *-inin* epimera) u gotovom proizvodu i to u kruhu od raži i pšenice, koja je iznosila 80,6 µg/kg. Uzimajući u obzir uspostavljeni ARfD od 1 µg/kg t.m., procijenjeno je da bi osoba od 70 kg u jednom danu smjela pojesti takvog kruha u količini do 868,5 g, a da ne dođe do prekoračenja ARfD-a. Za procjenu kronične izloženosti uz uspostavljeni TDI od 0,6 µg/kg t. m., osoba od 70 kg može tijekom čitavog života jesti takav kruh u količini do 521 g dnevno, bez posljedica po zdravlje (HAH, 2017).

U Europskoj uniji uspostavljen je sigurnosni alat pod nazivom „Sustav brzog uzbunjivanja za hranu i hranu za životinje“ (engl. *Rapid Alert System for Food and Feed*, RASFF) kako bi se olakšalo brzo obavještanje i odgovor u slučaju opasnosti za ljudsko zdravlje vezane uz hranu i hranu za životinje. Ovo je važan alat koji dijeli brze informacije o izravnom ili neizravnom riziku za ljude između država članica, komisije i nadležnog tijela (Silva i sur., 2023).

Kada država članica identificira rizik i prijavi ga RASFF-u, prvu obavijest prima Europska komisija, koja provjerava obavijest i odmah je prosljeđuje ostalim članicama, omogućujući im da poduzmu potrebne radnje, od kojih je najvažnija pravovremeno povlačenje proizvoda s tržišta te time izbjegavanje potencijalnih štetnih učinaka na zdravlje potrošača (Silva i sur., 2023). Redoviti nadzor i pridržavanje sigurnosnih smjernica ključni su za izbjegavanje zdravstvenih rizika.

5. ZAKLJUČCI

1. Određeni sadržaj EA ukazuje na srednju razinu kontaminacije ječma (20 % uzoraka kontaminirano), te visoku razinu kontaminacije zobi (60 %) i pšenice (44 %), s polja hrvatskih proizvođača. Kukuruz pokazuje najnižu razinu kontaminacije, odnosno u niti jednom uzorku kukuruza EA nisu detektirani.
2. Niska temperatura zraka, velika količina oborina te visoka relativna vlažnost zraka u svibnju 2023. godine na području istočne, središnje i sjeverozapadne Hrvatske, predstavljali su povoljne uvjete za razvoj gljive *C. purpurea*. Uzorci žitarica s određenim koncentracijama EA koje ne zadovoljavaju zakonske propise (3200 µg/kg, 450,60 µg/kg, 362,30 µg/kg te 159,10 µg/kg) potječu iz Koprivničko – križevačke županije (središnja Hrvatska), što prema opisanim vremenskim uvjetima objašnjava visoke koncentracije ovih toksičnih spojeva. Poljoprivrednici i stručnjaci trebaju biti svjesni potencijalnog rizika od kontaminacije žitarica s EA te poduzimati odgovarajuće mjere kako bi smanjili taj rizik, kao što su primjena fungicida, pravilna agrotehnika i praćenje vremenskih uvjeta.
3. Kontaminirana zrnja žitarica čije koncentracije EA od 3200 µg/kg (zob), 450,60 µg/kg (ječam), 362,30 µg/kg (ječam) te 159,10 µg/kg (pšenica) prelaze najveću dopuštenu količinu EA u hrani za ljude definiranu zakonodavstvom, mogu se koristiti kao hrana za životinje, obzirom da su njihove koncentracije znatno niže od najveće dopuštene količine EA u hrani za životinje, prema Direktivi 2002/32/EZ Europskog parlamenta i Vijeća.
4. S toksikološkog aspekta važno je napomenuti da se provedeno istraživanje odnosi na sirove žitarice, koje nisu namijenjene za izravnu konzumaciju ljudi. Procesi obrade poput kuhanja potencijalno mogu utjecati na koncentraciju EA, smanjujući tako njihovu toksičnost u gotovim proizvodima. Stoga, nije moguće izravno odrediti koncentracije EA koje bi uzrokovale akutnu ili kroničnu toksičnost kod ljudi na temelju rezultata za sirove žitarice.
5. Budući da razine EA mogu varirati ovisno o nizu čimbenika, daljnja istraživanja ovih mikotoksina su potrebna tijekom duljeg vremenskog razdoblja i pod različitim uvjetima uzgoja i prerade žitarica.
6. Dodatna istraživanja trebaju uključivati utjecaj zemljopisnih regija, biljaka domaćina i regionalnih/lokalnih vremenskih prilika, kao i postupaka tehnološke obrade sirovina (mljevenje, toplinska obrada, itd.) na koncentracije EA u konačnom proizvodu.

6. LITERATURA

- Agriopoulou S (2021) Ergot alkaloids mycotoxins in cereals and cereal-derived food products: characteristics, toxicity, prevalence, and control strategies. *Agronomy* **11**, 931. <https://doi.org/10.3390/agronomy11050931>
- Akinboye AJ, Kim K, Choi S, Yang I, Lee JG (2023) Alkaloids in food: a review of toxicity, analytical methods, occurrence and risk assessments. *Food Sci Biotechnol* **32**, 1133–1158. <https://doi.org/10.1007/s10068-023-01295-0>
- Arroyo-Manzanares N, Gámiz-Gracia L, García-Campaña AM, Diana Di Mavungu J, De Saeger S (2017) Ergot Alkaloids: Chemistry, Biosynthesis, Bioactivity, and Methods of Analysis. U: Mérillon JM, Ramawat K (ured.) *Fungal Metabolites*. Reference Series in Phytochemistry. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-25001-4_1
- Babič J, Tavčar-Kalcher G, Celar FA, Kos K, Čeverek M, Jakovac-Strajn B (2020) Ergot and ergot alkaloids in cereal grains intended for animal feeding collected in Slovenia: Occurrence, pattern and correlations. *Toxins* **12**, 730. <https://doi.org/10.3390/toxins12110730>
- Beaulieu WT, Panaccione DG, Hazekamp CS, Mckee MC, Ryan KL, Clay K (2013) Differential allocation of seed-borne ergot alkaloids during early ontogeny of morning glories (*Convolvulaceae*). *J Chem Ecol* **39**, 919–930. <https://doi.org/10.1007/s10886-013-0314-z>
- BfR (2010) Presentation by Ch. Gottschalk. 5th CRL/NRL Workshop on Mycotoxins, Geel. BfR, - Das Bundesinstitut für Risikobewertung.
- Bogun N, Mathies R, Baesecke J (2011) Angiospastic occlusion of the superficial femoral artery by chronic ergotamine intake. *Deut Med Wochenschr* **136**, 23-26. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1269435>
- Bonwick GA, Smith CJ (2004) Immunoassays: their history, development and current place in food science and technology. *Int J Food Sci Tech* **39**, 817-827. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.00855.x>
- Božanović D (2017) Alkaloidi - prirodni organski spojevi s dušikom (završni rad), Sveučilište Josipa Juraja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek. <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:007121> Pristupljeno 10. svibnja 2024.
- Britannica (2024) The Editors of Encyclopaedia. "ergot". *Encyclopedia Britannica*, <https://www.britannica.com/science/ergot>. Pristupljeno 14. lipnja 2024.
- Butorac A, Marić M, Badanjak Sabolović M, Hruškar M, Rimac Brnčić S, Bačun Družina V (2013) Analitičke metode u forenzici hrane. *Croatian Journal of Food Technology*,

Biotechnology and Nutrition **8**, 90-101. <https://hrcak.srce.hr/115923> Pristupljeno 10. svibnja 2024.

Carbonell-Rozas L, Alabrese A, Meloni R, Righetti L, Blandino M, Dall'Asta C (2023) Occurrence of Ergot Alkaloids in Major and Minor Cereals from Northern Italy: A Three Harvesting Years Scenario. *J Agric Food Chem* **71**, 15821-15828. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c05612>

Carbonell-Rozas L, Hernández-Mesa M, Righetti L, Monteau F, Lara FJ, Gámiz-Gracia L i sur. (2022) Ion Mobility-Mass Spectrometry to Extend Analytical Performance in the Determination of Ergot Alkaloids in Cereal Samples. *J Chromatogr A* **1682**, 463502. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.463502>

Carbonell-Rozas L, Mahdjoubi CK, Arroyo-Manzanares N, García-Campaña AM, Gámiz-Gracia L (2021) Occurrence of Ergot Alkaloids in Barley and Wheat from Algeria. *Toxins* **13**, 316. <https://doi.org/10.3390/toxins13050316>

Chung SWC (2021) A Critical Review of Analytical Methods for Ergot Alkaloids in Cereals and Feed and in Particular Suitability of Method Performance for Regulatory Monitoring and Epimer-Specific Quantification. *Food Addit Contam Part A* **38**, 997–1012. <https://doi.org/10.1080/19440049.2021.1898679>

Cigić IK, Prosen H (2009) An Overview of Conventional and Emerging Analytical Methods for the Determination of Mycotoxins. *Int J Mol Sci* **10**. <https://doi.org/10.3390/ijms10010062>

Crews C (2015) Analysis of Ergot Alkaloids. *Toxins* **7**, 2024–2050. <https://doi.org/10.3390/toxins7062024>

Dennis ES, Peacock WJ (2009) Vernalization in cereals. *J Biol* **8**. <https://doi.org/10.1186/jbiol156>

de Sá SVM, Monteiro C, Fernandes JO, Pinto E, Faria MA, Cunha SC (2021) Emerging Mycotoxins in Infant and Children Foods: A Review. *Crit Rev Food Sci Nutr* **63**, 1707–1721. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1967282>

DHMZ (2023) Mjesečni agrometeorološki bilten. DHMZ – Državni hidrometeorološki zavod, https://meteo.hr/podaci.php?section=podaci_agro¶m=mjesečni_agro_bilten&Mjesec=05&Godina=2023. Pristupljeno 15. lipnja 2024.

Diana Di Mavungu J, Malysheva SV, Sanders M, Larionova D, Robbens J, Dubruel P i sur. (2012) Analytical Methods Development and Validation of a New LC-MS/MS Method for the Simultaneous Determination of Six Major Ergot Alkaloids and Their Corresponding Epimers.

Application to Some Food and Feed Commodities. *Food Chem* **135**, 292–303. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.04.098>

Direktiva Europskog parlamenta i Vijeća (2002) Direktiva 2002/32/EZ Europskog parlamenta i Vijeća od 7. svibnja 2002. o nepoželjnim tvarima u hrani za životinje. Službeni list Europske unije, L 140/10.

EFSA (2012) Scientific opinion on ergot alkaloids in food and feed. *EFSA J* **10**, 2798. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2798>

Eskola M, Kos G, Elliott CT, Hajšlová J, Mayar S, Krska R (2020) Worldwide contamination of food-crops with mycotoxins: Validity of the widely cited 'FAO estimate' of 25 %, *Crit Rev Food Sci* **60**, 2773-2789. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1658570>

Flieger M, Wurst M, Shelby R (1997) Ergot alkaloids--sources, structures and analytical methods. *Folia Microbiol* (Praha) **42**, 3-29. <https://doi.org/10.1007/BF02898641>

Franzmann C, Wachter J, Dittmer N, Humpf HU (2010) Ricinoleic acid as a marker for ergot impurities in rye and rye products. *J Agric Food Chem* **58**, 4223–4229. <https://doi.org/10.1021/jf1006903>

Fröhlich G, Kaplan V, Amann-Vesti B (2010) Holy fire in an HIV-positive man: a case of 21st century ergotism. *Can Med Assoc J* **182**, 378-80. <https://doi.org/10.1503/cmaj.091362>

Gao Q, Jin K, Ying SH, Zhang Y, Xiao G, Shang Y i sur. (2011) Genome sequencing and comparative transcriptomics of the model entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. acridum*. *PLoS Genet* **7**, 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001264>

Garcia GD, Goff Jr JM, Hadro NC, I-Donnell SD, Greatorex PS (2000) Chronic ergot toxicity: A rare cause of lower extremity ischemia. *J Vasc Surg* **31**, 1245-1247. <https://doi.org/10.1067/mva.2000.105668>

Ge HM, Yu ZG, Zhang J, Wu JH, Tan RX (2009) Bioactive alkaloids from endophytic *Aspergillus fumigatus*. *J Nat Prod* **72**, 753–755. <https://doi.org/10.1021/np800700e>

Griffith RW, Grauwiler J, Hodel C, Leist KH, Matter B (1978) Toxicologic considerations. U: Berde B, Schild HO (ured.) Ergot alkaloids and related compounds. Springer, Berlin.

Guo Q, Shao B, Du Z, Zhang J (2016) Simultaneous Determination of 25 Ergot Alkaloids in Cereal Samples by Ultraperformance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *J Agric Food Chem* **64**, 7033–7039. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b02484>

Gupta PK (2018) Chapter 15 - Veterinary toxicology. *Illustrated Toxicology*, Elsevier Inc, str. 427–517. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813213-5.00015-8>

- Gürbüz M, Uysal H, Kızılet H (2015) Assessment of Genotoxic Potential of Two Mycotoxins in the Wing Spot Test of *Drosophila Melanogaster*. *Toxicol Ind Health* **31**, 261–267. <https://doi.org/10.1177/0748233712472528>
- Gurikar C, Shivaprasad DP, Sabillón L, Nanje Gowda NA, Siliveru K (2023) Impact of mycotoxins and their metabolites associated with food grains. *Grain & Oil Science and Technology* **6**, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.gaost.2022.10.001>
- HAH (2017) Znanstveno mišljenje o ergot alkaloidima u hrani i hrani za životinje. HAH - Hrvatska agencija za hranu, <https://www.hah.hr/wp-content/uploads/2015/10/Znanstveno-misljenje-o-ergot-alkaloidima.pdf>. Pristupljeno 10. svibnja 2024.
- Höfs S, Jaut V, Schneider RJ (2023) Ergometrine Sensing in Rye Flour by a Magnetic Bead-Based Immunoassay Followed by Flow Injection Analysis with Amperometric Detection. *Talanta* **254**, 124172. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.124172>
- Hulvova H, Galuszka P, Frebortova J, Frebort I (2013) Parasitic fungus *Claviceps* as a source for biotechnological production of ergot alkaloids. *Biotechnol Adv* **31**, 79–89. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.01.005>
- Ilikić D, Kranjac D, Zebec V, Varga I, Rastija M, Antunović M i sur. (2019) Stanje i perspektiva proizvodnje žitarica i uljarica u Republici Hrvatskoj. *Glasnik zaštite bilja* **2019**, 58-67.
- Jakubczyk D, Cheng JZ, O'Connor SE (2014) Biosynthesis of the ergot alkaloids. *Nat Prod Rep* **31**, 1328–1338. <https://doi.org/10.1039/C4NP00062E>
- Kalberer F (1970) Absorption, distribution and excretion of [3H] ergotamine in the rat. Biopharmaceutical aspects. U: Berde B, Shild HO (ured.) *Ergot Alkaloids and Related compounds*. Springer, New York, str. 754.
- Korn AK, Gross M, Usleber E Thom N, Köhler K, Erhardt G (2014) Dietary ergot alkaloids as a possible cause of tail necrosis in rabbits. *Mycotoxin Res* **30**, 241–50. <https://doi.org/10.1007%2Fs12550-014-0208-0>
- Kozlovsky AG, Zhelifonova VP, Antipova TV (2013) Fungi of the genus *Penicillium* as producers of physiologically active compounds. *Appl Biochem Microbiol* **49**, 1–10. <https://doi.org/10.1134/S0003683813010092>
- Kozlovsky AG, Zhelifonova VP, Antipova TV, Zelenkova NF (2011) Physiological and biochemical characteristics of the genus *Penicillium* fungi as producers of ergot alkaloids and quinocitrinins. *Appl Biochem Microbiol* **47**, 426–430. <https://doi.org/10.1134/S0003683811040065>

- Krska R, Crews C (2008) Significance, chemistry and determination of ergot alkaloids: a review. *Food Additives and Contaminants Part A* **25**, 722–731. <https://doi.org/10.1080/02652030701765756>
- Larson BT, Harmon DL, Piper EL, Griffis LM, Bush LP (1999) Alkaloid binding and activation of D2 dopamine receptors in cell culture. *J Anim Sci* **77**, 942–947. <https://doi.org/10.2527/1999.774942x>
- Larson BT, Samford MD, Camden JM, Piper EL, Kerley MS, Paterson JA i sur. (1995) Ergovaline binding and activation of D2 dopamine receptors in GH4ZR7 cells. *J Anim Sci* **73**, 1396–1400. <https://doi.org/10.2527/1995.7351396x>
- Lenain P, Diana Di Mavungu J, Dubruel P, Robbens J, De Saeger S (2012) Development of Suspension Polymerized Molecularly Imprinted Beads with Metergoline as Template and Application in a Solid-Phase Extraction Procedure toward Ergot Alkaloids. *Anal Chem* **84**, 10411–10418. <https://doi.org/10.1021/ac302671h>
- Lorenz N, Haarmann T, Pazoutová S, Jung M, Tudzynski P (2009) The ergot alkaloid gene cluster: functional analyses and evolutionary aspects. *Phytochemistry* **70**, 1822–1932. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.05.023>
- Lorenz N, Wilson EV, Machado C, Schardl CL, Tudzynski P (2007) Comparison of ergot alkaloid biosynthesis gene clusters in *Claviceps* species indicates loss of late pathway steps in evolution of *C. fusiformis*. *Appl Environ Microbiol* **73**, 7185–7191. <https://doi.org/10.1128/AEM.01040-07>
- Malir F, Pickova D, Toman J, Grosse Y, Ostry V (2023) Hazard Characterisation for Significant Mycotoxins in Food. *Mycotoxin Res* **39**, 81–93. <https://doi.org/10.1007/s12550-023-00478-2>
- Markert A, Steffan N, Ploss K, Hellwig S, Steiner U, Drewke C i sur. (2008) Biosynthesis and accumulation of ergoline alkaloids in a mutualistic association between Ipomoea asarifolia (*Convolvulaceae*) and a *Clavicipitalean* fungus. *Plant Physiol* **147**, 296–305. <https://doi.org/10.1104/pp.108.116699>
- Martos P, Thompson W, Diaz G (2010) Multiresidue mycotoxin analysis in wheat, barley, oats, rye and maize grain by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *World Mycotoxin J* **3**, 205–223. <https://doi.org/10.3920/WMJ2010.1212>
- Mulac D, Humpf H-U (2011) Cytotoxicity and accumulation of ergot alkaloids in human primary cells. *Toxicology* **282**, 112–121. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2011.01.019>
- Müller C, Kemmlein S, Klaffke H, Krauthause W, Preiß-Weigert A, Wittkowski R (2009) A Basic Tool for Risk Assessment: A New Method for the Analysis of Ergot Alkaloids in Rye and

Selected Rye Products. *Mol Nutr Food Res* **53**, 500–507. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200800091>

Oda T, Kume T, Izumi Y, Takada-Takatori Y, Niidome T, Akaike A (2008) Bromocriptine, a dopamine D(2) receptor agonist with the structure of the amino acid ergot alkaloids, induces neurite outgrowth in PC12 cells. *Eur J Pharmacol* **598**, 27–31. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.09.015>

Panaccione DG, Beaulieu WT, Cook D (2014) Bioactive alkaloids in vertically transmitted fungal endophytes. *Funct Ecol* **28**, 299–314. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12076>

Park DL, Njapau H, Boutrif E (1999) Minimizing risks posed by mycotoxins utilizing the HACCP concept. *FAO Food, Nutrition and Agriculture Journal* **23**, 49–56.

Pažoutová S (2002) The evolutionary strategy of *Claviceps*. U: White F, Bacon CW, Hywel-Jones NL (ured.) *Clavicipitales* fungi: evolutionary biology, chemistry, biocontrol and cultural impacts. Marcel Dekker, New York.

Petrić J (2016) Imunoenzimske (ELISA) metode u analitici prehrambenih proizvoda (završni rad), Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb. <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:850428> Pristupljeno 10. svibnja 2024.

Pleadin J, Kudumija N, Škrivanko M, Cvetnić L, Petrović D, Vasilj V i sur. (2022) Ergot sclerotia and ergot alkaloids occurrence in wheat and rye grains produced in Croatia. *Veterinarska stanica* **53**, 503-511. <https://doi.org/10.46419/vs.53.5.14>

Preporuka Europske komisije (2012) Preporuka Europske komisije od 15. ožujka 2012. o praćenju prisutnosti ergot alkaloida u hrani i hrani za životinje (2012/154/EU). Službeni list Europske unije, L77/20.

Scandola M, Games DE, Costa C, Allegri G, Bertazzo A, Curcuruto O i sur. (1994) Structural study of alkaloids from *Securidaca longipedunculata* roots II. Isolation and characterization by supercritical fluid chromatography/mass spectrometry. *J Heterocycl Chem* **31**, 219–224. <https://doi.org/10.1002/jhet.5570310137>

Schardl CL, Young CA, Pan J, Florea S, Takach JE, Panaccione DG i sur. (2013) Currencies of mutualisms: sources of alkaloid genes in vertically transmitted *epichloae*. *Toxins* **5**, 1064–1088. <https://doi.org/10.3390/toxins5061064>

Schardl CL, Panaccione DG, Tudzynski P (2006) Ergot alkaloids-biology and molecular biology. *Alkaloids Chem Biol* **63**, 45–86. [https://doi.org/10.1016/S1099-4831\(06\)63002-2](https://doi.org/10.1016/S1099-4831(06)63002-2)

- Schardl CL (2001) *Epichloë festucae* and related mutualistic symbionts of grasses. *Fungal Genet Biol* **33**, 69–82. <https://doi.org/10.1006/fgbi.2001.1275>
- Scott P (2007) Analysis of ergot alkaloids — a review. *Mycotoxin Res* **23**, 113-121. <https://doi.org/10.1007/BF02951506>
- SeedForward GmbH (2023) Ergot in cereals: All you need to know about spread, symptoms & management, <https://seedforward.com/en/blog/ergot-in-cereals-all-you-need-to-know-about-spread-symptoms-management>. Pristupljeno 12. lipnja 2024.
- Silberstein SD, McCrory DC (2003) Ergotamine and dihydroergotamine: history, pharmacology, and efficacy. *Headache* **43**, 144-66. <https://doi.org/10.1046/j.1526-4610.2003.03034.x>
- Silva Â, Mateus ARS, Barros SC, Silva AS (2023) Ergot Alkaloids on Cereals and Seeds: Analytical Methods, Occurrence, and Future Perspectives. *Molecules* **28**, 7233. <https://doi.org/10.3390/molecules28207233>
- Singh PK, Singh RP, Singh P, Singh RL (2019) Food Hazards: Physical, Chemical, and Biological. *Food Safety and Human Health*, 15–65. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816333-7.00002-3>
- Storm ID, Rasmussen PH, Strobel BW, Hansen HCB (2008) Ergot Alkaloids in Rye Flour Determined by Solid-Phase Cation-Exchange and High-Pressure Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *Food Addit Contam Part A* **25**, 338–3. <https://doi.org/10.1080/02652030701551792>
- Sun Y, Jiang J, Mu P, Lin R, Wen J, Deng Y (2022) Toxicokinetics and Metabolism of Deoxynivalenol in Animals and Humans. *Arch Toxicol* **96**, 2639–2654. <https://doi.org/10.1007/s00204-022-03337-8>
- Šakić Bobić B (2015) Isplativost uzgoja ječma. *Gospodarski list*. <https://gospodarski.hr/rubrike/agroekonomika/isplativost-uzgoja-jecma/> Pristupljeno 20. lipnja 2024.
- Ülger TG, Uçar A, Çakıroğlu FP, Yılmaz S (2020) Genotoxic Effects of Mycotoxins. *Toxicon* **185**, 104–113. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.07.004>
- Uredba Europske komisije (2023) Uredba Europske komisije (EU) 2023/915 od 25. travnja 2023. o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani i o stavljanju izvan snage Uredbe (EZ) br. 1881/2006. *Off J Eur Union* 2023, L 119/103.

Uredba Europske komisije (2021) Uredba Europske komisije(EU) 2021/1399 od 24. kolovoza 2021. o izmjeni Uredbe (EZ) br. 1881/2006 u pogledu najvećih količina ergot sklerocija i ergot alkaloida u određenim prehrambenim proizvodima. *Off J Eur Union* 2021, L 301, 1-5.

Veršilovskis A, Mulder PPJ, Pereboom-de Fauw DPKH, de Stoppelaar J, de Nijs M (2020) Simultaneous Quantification of Ergot and Tropane Alkaloids in Bread in the Netherlands by LC-MS/MS. *Food Addit Contam Part B* **13**, 215–223.
<https://doi.org/10.1080/19393210.2020.1771777>

Wallwey C, Li SM (2012) Production, detection, and purification of clavine-type ergot alkaloids. U: Keller NP, Turner G (ured.) Fungal secondary metabolism. Methods and protocols, vol 944, Methods in molecular biology. Humana Press, New York, str. 121 – 131.

Wallwey C, Li SM (2011) Ergot alkaloids: structure diversity, biosynthetic gene clusters and functional proof of biosynthetic genes. *Nat Prod Rep* **28**, 496–510.
<https://doi.org/10.1039/C0NP00060D>

Wegulo SN, Carlson MP (2011) Ergot of Small Grain Cereals and Grasses and its Health Effects on Humans and Livestock. University of Nebraska – Lincoln Extension.
<https://extensionpubs.unl.edu/publication/ec1880/pdf/view/ec1880-2011.pdf> Pristupljeno 1. lipnja 2024.

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja Ivana Dželalija izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Vlastoručni potpis