

PREGLEDNI RAD / REVIEW

Citrinin u hrani i hrani za životinje

Jelka Pleadin^{1*}, Nina Kudumija¹, Jadranka Frece², Danijela Petrović³, Ksenija Markov²

¹Dr. sc. Jelka Pleadin, dipl. ing. biotehnol., znanstvena savjetnica, Hrvatski veterinarski institut, Savska cesta 143, 10 000 Zagreb, Hrvatska

¹Dr. sc. Nina Kudumija, dipl. ing. preh. tehnol., stručna suradnica, Hrvatski veterinarski institut, Savska cesta 143, 10 000 Zagreb, Hrvatska

²Dr. sc. Jadranka Frece, dipl. ing. biotehnol., izvanredni profesor, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Pierottijeva 6, 10 000 Zagreb, Hrvatska

³Dr. sc. Danijela Petrović, prof. biol. i kem., docent, Sveučilište u Mostaru, Agronomski i Prehrambeno-tehnološki fakultet, Biskupa Čule b.b., 88 101 Mostar, Bosna i Hercegovina

²Dr. sc. Ksenija Markov, dipl. ing. biotehnol., izvanredni profesor, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Pierottijeva 6, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Sažetak

Mikotoksini su česti onečišćivači hrane i hrane za životinje, primarno žitarica i proizvoda na bazi žitarica. Među njima citrinin predstavlja mikotoksin iz skupine poliketida kojeg sintetiziraju plijesni iz roda *Penicillium* (*P. citrinum*, *P. viridicatum*, *P. expansum*, *P. notatum*), *Aspergillus* i *Monascus*. *P. citrinum* kao najznačajniji producent citrinitina je vrlo raširena i može se izolirati iz velikog broja namirnica i stočne hrane. Toksičnost citrinitina nije detaljno proučena te nema dovoljno podataka koji ukazuju na toksične učinke u ljudi. Međutim, u pojedinim životinjskih vrsta dokazana je njegova nefrotoksičnost, embriotoksičnost, teratogenost i genotoksičnost. Zbog nedovoljnog broja dokaza Međunarodna agencija za istraživanje raka (IARC) uvrstila je citrinin u skupinu 3 kao spoj koji se ne može klasificirati kao ljudski karcinogen. S obzirom na nedostatnost podataka, nužna su daljnja istraživanja njegove toksičnosti, prisutnosti u hrani i hrani za životinje te perzistentnosti u tkivima ljudi i životinja kao posljedice izloženosti onečišćenoj hrani ili hrani za životinje. Budući je onečišćenje i ovim mikotoksinom neizbježno, potreban je sustavan nadzor sirovina i finalnih proizvoda namijenjenih ishrani ljudi odnosno hranidbi životinja, kao i definiranje najvećih dopuštenih količina za različite vrste proizvoda putem zakonodavstva.

Ključne riječi: citrinin, onečišćenje, hrana, hrana za životinje, toksičnost, prevencija, redukcija i kontrola

Summary

Mycotoxins are common contaminants of food and feed, primarily cereals and cereal-based products. Among them citrinin represents a mycotoxin from the group of polyketides synthesized by moulds of the genus *Penicillium* (*P. citrinum*, *P. viridicatum*, *P. expansum*, *P. notatum*), *Aspergillus* and *Monascus*. *P. citrinum* as a mould most characteristic for the production of the citrinin is very widespread and can be isolated from a large number of food and feed products. The toxicity of citrinin was not examined in detail, and there is not enough data to indicate toxic effects in humans. However, some animal species confirmed its nephrotoxicity, embryotoxicity, teratogenicity and genotoxicity. Due to insufficient evidence, the International Agency for Research on Cancer (IARC) classified the citrinin in group 3, as the compound that can not be classified as a human carcinogen. Given the scarcity of data, further research of its toxicity, bioavailability in food and feed, and persistence in the tissues of humans and animals as a result of exposure to contaminated food or feed, are required. Since the contamination also with this toxin is almost inevitable, that requires a systematic monitoring of raw materials and finished products intended for human consumption or animal feed production, as well as defining the maximum levels for different types of products through legislation.

Keywords: citrinin, contamination, food, feed, toxicity, prevention, reduction and control

Uvod

Različite plijesni proizvode mikotoksine kao sekundarne metabolite štetne po zdravlje ljudi i životinja. Mikotoksini su učestalo prisutni na žitaricama, a do njihove biosinteze dolazi pod određenim okolišnim uvjetima, prikladnoj relativnoj vlažnosti, temperaturi i sadržaju kisika, te u ovisnosti o fizičkom oštećenju supstrata i prisutnosti spora plijesni (Sforza i sur., 2006; Pleadin i sur., 2015). Onečišćene žitarice koje se koriste u proizvodnji hrane i hrane za životinje, učestalo su razlog onečišćenja konačnih proizvoda. Poznato je da do sinteze mikotoksina može doći u bilo kojoj fazi proizvodnog procesa, prije ili poslije žetve žitarica te tijekom obrade i uskladištenja (Placinta i sur., 1999; Binder i sur., 2007). Ujedno, mikotoksini

predstavljaju kemijski i toplinski vrlo stabilne spojeve, otporne na različite uvjete proizvodnje, prerade i uskladištenja žitarica (Pleadin i sur., 2014a,b).

S obzirom da je prisutnost mikotoksina u hrani i hrani za životinje gotovo neizbježna, potreban je sustavan nadzor sirovina i finalnih proizvoda namijenjenih ishrani ljudi odnosno hranidbi životinja (Pleadin i sur., 2012; Pleadin i sur., 2014c). U procesu obrade i proizvodnje namirnica postoji nekoliko ključnih točaka koje mogu utjecati na nastanak mikotoksina. Američka FAO organizacija (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) preporučila je uvođenje HACCP sustava (*Hazard Analysis and Critical Control Points*) u kontroli određenih točaka tijekom obrade i proizvodnje hrane koja može biti onečišćena mikotoksinima (FAO, 2003). Takvim se

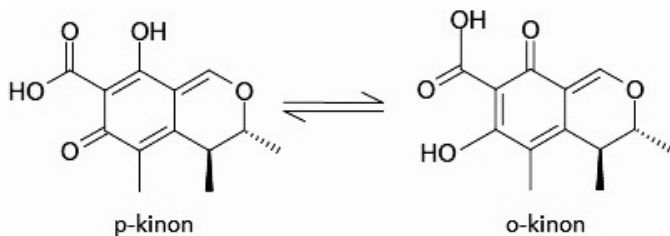
propisima utječe na proizvođače da sustavno i kontinuirano kontroliraju sustav obrade i proizvodnje te time smanje mogućnost onečišćenja hrane i hrane za životinje. Kontrola hrane i hrane za životinje na mikotoksine propisana je legislativom odnosno uredbama, međutim treba istaknuti da najveća dopuštena količina (NDK) citrinina u hrani i hrani za životinje nije regulirana u Europskoj uniji, ujedno niti u Hrvatskoj.

Citrinin je slabo istražen mikotoksin, kako na području Europske unije, tako i u Hrvatskoj. Prvi puta je izoliran kao čisti spoj 1931. godine, a 1951. godine iz žute riže uvezene iz Tajlanda u Japan u kojoj je pronađena plijesan *Penicillium citrinum* za koju je utvrđeno da je vrlo veliki producent citrinina. S obzirom na činjenicu da na prirodnim supstratima nikad ne nalazimo čiste, nego uvijek mješovite kulture plijesni, i kada se zna da su mješovite kulture često biokemijski aktivnije od čistih kultura, onda problem biosinteze različitih metabolita, koji nastaju tijekom rasta plijesni u mješovitim kulturama, postaje još značajniji. Broj istraživanja o pojavnosti citrinina je značajno manji u odnosu na druge mikotoksine te su dostupni podaci o njegovoj pojavnosti vrlo ograničeni (EFSA, 2012).

U ovom radu dan je pregled svojstava, toksičnih učinaka i pojavnosti citrinina u različitim prehrambenim proizvodima i hrani za životinje. Opisane su analitičke metode u njegovoj detekciji i kvantifikaciji te preventivne mjere i načini redukcije citrinina u hrani i hrani za životinje.

Struktura i fizikalno-kemijska svojstva

Citrinin je mikotoksin iz skupine poliketida prema IUPAC-u: (3*R*, 4*S*)-4,6-dihidro-8-hidroksi-3,4,5-trimetil-6-okso-3*H*-2-benzopiran-7-karboksilna kiselina (C₁₃H₁₄O₅) (slika 1).

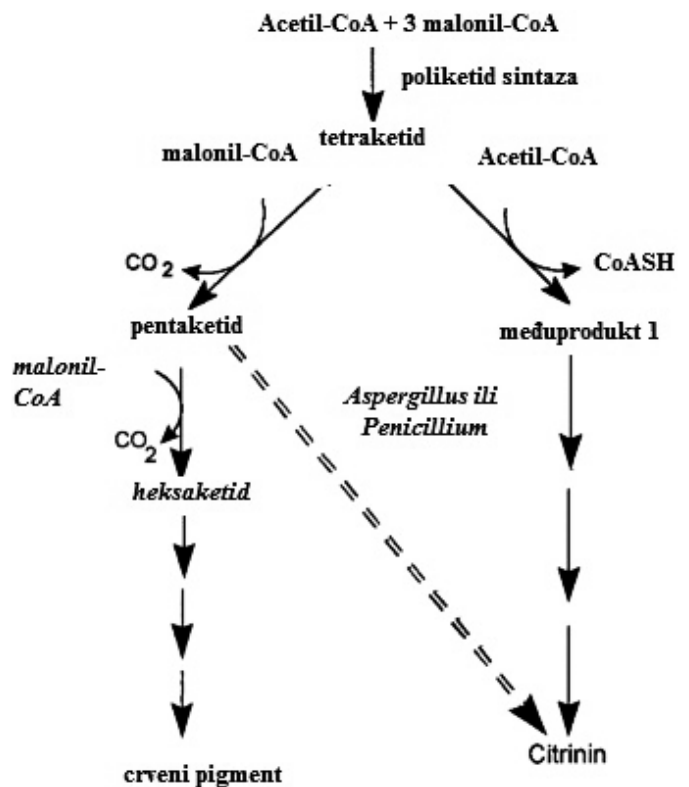


Slika 1. Strukturna formula izomera citrinina (Xu i sur., 2006)
Figure 1. Structural formula of citrinin isomers (Xu et al., 2006)

Citrinin je jednostavna molekula relativno male molekulske mase (250,25 g/mol) koja kristalizira u obliku žutih iglica. Predstavlja žuti ciklički spoj koji ima slobodnu karboksilnu skupinu i može oblikovati kelatne komplekse. Slabo je topljiv u vodi, ali je dobro topljiv u natrijevu hidroksidu, natrijevu karbonatu, natrijevu acetatu, metanolu, acetonitrilu, etanolu i većini ostalih polarnih organskih otapala. Djelomična fotorazgradnja se događa pod ultraljubičastim svjetlom u otopini, kao i u krutom stanju. Citrinin je razgadiv i u kiselim i lužnatim medijima i pod utjecajem topline (Xu i sur., 2006). Termolabilan je u vodenim otopinama na temperaturi iznad 70 °C te se raspada na citrinin H2 koji ne pokazuje značajnu citotoksičnost i citrinin H1 koji se sastoji od dvije molekule citrinina i pokazuje veću toksičnost u odnosu na početni spoj (EFSA, 2012). Temperatura tališta citrinina je 172 °C, a apsorpcijski maksimum (UV) je 333 nm u metanolu (Xu i sur., 2006, Abou-Zeid 2012).

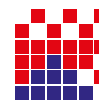
Biosinteza, apsorpcija i eliminacija

Citrinin uglavnom sintetiziraju plijesni iz roda *Penicillium* (*P. citrinum*, *P. viridicatum*, *P. expansum*, *P. notatum*) te *Aspergillus* i *Monascus*. *P. citrinum* je vrlo raširena plijesan i može se izolirati iz gotovo svakog uzorka pljesnive namirnice ili krmiva (Houbraken i sur., 2011, Bennett i Klich, 2003). Najvažniji supstrati za rast ove plijesni su ponajprije žitarice, posebno riža, pšenica i kukuruz te mljeveno zrnje žitarica i brašno. *P. citrinum* raste u temperaturnom rasponu od 5-40 °C, a optimalan rast se postiže pri 30 °C. To je kserofilna plijesan s minimalnom a_w vrijednošću za rast od oko 0,82 (Duraković i Duraković, 2000). Citrinin je prvotno bio okarakteriziran kao antibiotik te je uočen i njegov inhibicijski učinak na praživotinje, kvasce i slične organizme.



Slika 2. Biosintetski put citrinina i crvenog pigmenta u *M. ruber* (puna linija) te u vrstama roda *Aspergillus* i *Penicillium* (isprekidana linija) (Hajjaj i sur., 1999)
Figure 2. Citrinin biosynthetic pathway and the red pigment in *M. ruber* (full line) and in species of the genera *Aspergillus* and *Penicillium* (dashed line) (Hajjaj et al., 1999)

U filamentoznih plijesni poliketidni put je glavni put nastanka ovog mikotoksina kao sekundarnog metabolita. Poznato je da u plijesni iz roda *Aspergillus* citrinin nastaje kondenzacijom jedne acetil-koenzim A molekule i četiri molekule malonil-koenzim A uz adiciju tri metilne jedinice. Hajjaj i sur. (1999) su opisali metabolički put biosinteze citrinina u plijesni *M. ruber* kroz mogućnost njegovog nastanka kondenzacijom jedne molekule acetil-koenzim A i tri molekule malonil-koenzim A. Dodatkom još jedne molekule acetil-koenzim A nastaje prvi međuprodukt, ali se ne može ni isključiti mogućnost da molekula malonil-koenzim A reakcijom kondenzacije i dekarboksilacije s tetraketidom tvori prvi međuprodukt. Slje-



deća reakcija uključuje O-alkilaciju i cijepanje jednostruke veze između C-1 i C-9 atoma te nastanak drugog i trećeg među produkta podjednake molekulske mase. Nastali tetraketid tijekom rasta *M. ruber* uzrokuje proizvodnju citrinina i crvenog pigmenta. Cjeloviti proces biosinteze citrinina (slika 2) još nije u potpunosti razjašnjen, a literaturni podaci ujedno navode i da je potrebno proučiti enzime i enzimske reakcije koje sudjeluju u biosintetskom putu (Hajjaj i sur., 1999).

Citrinin se vrlo brzo apsorbira bez obzira na način primjene, iako je apsorpcija iz probavnog sustava oslabljena. Trideset minuta nakon intravenoznog injektiranja ¹⁴C-citrinina štakorima u dozi od 3 mg/kg tjelesne mase, ukupna radioaktivnost od 15% uočena je u jetri te bubrežima (6%) kao mjestima najznačajnije akumulacije citrinina u organizmu. Nakon 6 sati, količina radioaktivnosti smanjena je na oko 8% u jetri te 5% u bubrežima. Citrinin se iz organizma eliminira putem urina; 74% radioaktivnosti dokazano je u urinu u prvih 24 h te u fecesu 4% nakon 24 h odnosno 12% nakon 48 h (IARC, 1986).

Toksični učinci u organizmu

Citrinin je jedan od prvo otkrivenih mikotoksina, međutim njegov mehanizam djelovanja u organizmu još uvijek nije u potpunosti poznat. Prva istraživanja uključivala su učinke citrinina na respiraciju u bakterija i na životinjska tkiva, povećanje propusnosti membrana u gljiva i biljaka, inhibiciju biosinteze kolesterola i triacilglicerola u jetri štakora. Kancerogena i mutagena svojstva ovog mikotoksina povezuju se sa negativnim učincima na sintezu makromolekula. Dokazano je da citrinin nepovoljno djeluje na sintezu ribonukleinske kiseline (RNK) i to mnogo brže nego na sintezu proteina, dok učinak na deoksiribonukleinsku kiselinu (DNK) nije u potpunosti dokazan (Duraković i Duraković, 2000).

Toksičnost citrinina nije detaljno proučena i nema dovoljno podataka koji ukazuju na njegove toksične učinke u ljudi (AFSSA, 2006). Ujedno, podaci o kombiniranoj toksičnosti sa ostalim mikotoksinima su vrlo ograničeni, a najviše podataka dostupno je za okratoksin A. Izvješća o učestalosti prirodnoj zajedničkoj pojavnosti citrinina i okratoksina A u žitarica potaknula su brojna istraživanja toksičnih učinaka tih mikotoksina. Citrinin je kao i okratoksin A nefrotoksin te se pretpostavlja da je bio uključen u etiologiju endemske nefropatije svinja u Danskoj, a kao sinergist i u balkanskoj endemskoj nefropatiji koju karakterizira cjevasta degeneracija bubrega, intersticijske fibroze, anemija, gubitak na masi te poliurija. Osim što djeluje nefrotoksično, pojedina istraživanja pokazuju da citrinin kao i okratoksin A djeluje i hepatotoksično, teratogeno, fetotoksično te genotoksično (Liu i sur., 2003; AFSSA, 2006; Amalaradjou i Venkitanarayanan, 2008; Flajs i sur., 2011).

Utjecaj citrinina na štakore u količini od 50 mg/kg intraperitonealno peti dan nakon aplikacije uzrokuje akutno zatajenje bubrega. Citrinin u domaćih ptica uzrokuje dijareju, povećano unošenje vode i smanjenje tjelesne mase, što dovodi do degeneracije bubrega (EFSA, 2012). Utječe na gubitak permeabilnosti stanične membrane, što uzrokuje poremećaj stanične ravnoteže i smrti stanice (Speijers i Speijers, 2004). Dokazano je da citrinin utječe na mišji embrionalni rast, izaziva apoptozu stanica u fazi blastocista (Chan i Shiao, 2007), djeluje na mišje reproduktivne organe i to tako da izaziva smanjenje koncentracije testosterona, inhibira funkciju muških reproduktivnih

organa odnosno smanjuje postotak živih spermatozoida te tako smanjuje fertilitet (Qingqing i sur., 2010). Obdukcijom kunića, zamoraca i svinja uočeno je povećanje bubrega, kao i cjevaste nekroze bubrežnog tkiva. Pri eksperimentalnom trovanju embrija kokošjeg jajeta (0,5 µg/jajetu) dokazana je hepatotoksičnost i nefrotoksičnost citrinina, uz ugibanje 67% embrija, pri čemu su uočene promjene na jetri i bubrežima (Ožegović i Pepeljnjak, 1995). Kod pokusa s pilećom hranom onečišćenom s 0; 33; 65; 130 i 260 mg citrinina/ kg hrane uočeno je da citrinin uzrokuje subakutnu toksičnost i dijareju pri dozi od 130 i 260 mg/kg, ali ne uzrokuje smrtnost. Nadalje, utvrđena je i hemoragija tankog crijeva i povećanje bubrega, kao i anaplastična područja u bubrežima i gušterači te povećanje brzine mitoze u stanicama epitela tubula pri dozi citrinina od 260 mg/kg, što svrstava citrinin u skupinu potencijalno kancerogenih spojeva u pilića (Ciegler i sur., 1977). Međutim, u istraživanjima kronične toksičnosti kod svinja, niska koncentracija citrinina od 0,02 mg/kg tjelesne mase tijekom 57 dana nije rezultirala nikakvim histopatološkim lezijama (AFSSA, 2006).

Međunarodna agencija za istraživanje raka (IARC) uvrstila je citrinin u 3. skupinu karcinogenih spojeva, zbog nedovoljno relevantnih istraživanja koja se odnose na njegovu karcinogenost (IARC, 1986). Toksičnost citrinina za pojedine pokusne životinje dana kao LD₅₀ vrijednost (tablica 2) kreće se u rasponu 35 - 134 mg/kg tjelesne mase, a prvenstveno ovisi o vrsti životinje, dozi i načinu primjene.

Tablica 1. Toksičnost (LD₅₀) citrinina u pokusnih životinja (Ožegović i Pepeljnjak, 1995; AFSSA, 2006; EFSA, 2012, Bennett i Klich, 2003)

Table 1. Toxicity (LD₅₀) of citrinin in experimental animals (Ožegović and Pepeljnjak, 1995; AFSSA, 2006; EFSA, 2012, Bennett and Klich, 2003)

Životinje	Subkutano (mg/kg)	Intraperitonealno (mg/kg)	Peroralno (mg/kg)
Miševi	35	35 62	82-105
Štakori	67	-	> 50
Kunići	-	50	134
Zamorčad	37	-	-
Patke	-	-	57
Pilići	-	-	95
Svinje	37	-	-

Europska komisija tražila je od EFSA-e (*European Food Safety Authority*) da donese stručno mišljenje vezano za utjecaj citrinina na zdravlje u ljudi. Obzirom da je citrinin nefrotoksin, donesen je NOAEL (*no-observed-effect level*) od 20 µg/kg tjelesne mase/dan. Bazirajući se na zdravstvenim vodičima, EFSA je odredila da je količina citrinina od 0,2 µg/kg tjelesne mase/dan sigurna doza koja ne izaziva nefrotoksičnost, ali je moguća genotoksičnost i karcinogenost. Za djecu i dojenčad najveća dopuštena količina je 9-53 µg/kg, a za čovjeka prosječne tjelesne mase 19-100 µg/kg. Zbog nedostatka eksperimentalnih studija CONTAM Panel (*The Panel on Contaminants in the Food Chain*) zaključila je da je potrebno puno više podataka da se navedeno potvrdi (EFSA, 2012). Zbog mogu-

Tablica 2. Prirodna pojavnost citrinina u namirnicama

Table 2. The natural occurrence of citrinin in food

Onečišćena namirnica	Količina citrinina (µg/kg)	Država	Referenca
Fermentirani kukuruz	584	Gana	Kpodo i sur. (1995)
Pšenica	65-460	Argentina	Comerio i sur. (1998)
Kukuruz	12	Indija	Janardhana i sur. (1999)
Silaža	2,4-64,2	Njemačka	Schneweis i sur. (2001)
Voće (grejp, smokve, kruške)	280-400	Egipat	Aziz i Martins (1983)
Jabuke	320-920	Portugal	Gimeno i Martins (1983); Martins i sur. (2002)
Integralna raž	1,1		
Integralna pšenica	0,5		
Pšenične mekinje	1,9-2,0	Njemačka	Meister (2004)
Kakao	2,4		

ćeg sinergističkog djelovanja npr. citrinina i patulina, u Japanu je propisana najveća dopuštena količina citrinina od 200 µg/kg.

Pojavnost u hrani i izloženost ljudi

Analizom rezultata od strane *European Food Safety Authority* (EFSA), koji su uključivali 30 uzoraka žitarica i proizvoda na bazi žitarica, u 23 uzorka citrinin nije detektiran, a u tri uzorka koncentracija citrinina je bila manja od limita kvantifikacije metode (EFSA, 2012). U četiri uzorka određen je citrinin u koncentraciji od 1,8; 5,2; 13,2 i 13,6 µg/kg. CON-TAM je zaključio da se iz dobivenih rezultata ne može provesti procjena unosa citrinina u organizam, jer 27 od 30 uzoraka nije bilo za ljudsku konzumaciju, a preostali su imali količinu citrinina manju od LOD (limita detekcije) ili LOQ (limita kvantifikacije) analitičke metode.

Markov i sur. (2013) su sa površine domaćih fermentiranih suhomesnatih proizvoda, koji se tradicionalno proizvode na području Hrvatske, izolirali plijesni koje produciraju citrinin te je ovaj mikotoksin detektiran u 5,55% analiziranih uzoraka s vrijednostima koje su se kretale oko LOQ metode. Prikupljanjem podataka iz različitih istraživanja utvrđena je koncentracija citrinina u žitaricama do 420 µg/kg, a u proizvodima na bazi žitarica do 42 µg/kg, do 355 µg/kg u bilju i do 0,2 µg/kg u voćnim i povrtnim sokovima. Što se tiče procjene izloženosti i unosa citrinina u organizam, EFSA za sada nema dovoljno podataka (EFSA, 2012; Dietrich i sur., 2001).

Pojavnost u hrani za životinje

Na području Europe, koncentracija citrinina u žitaricama odnosno krmivima namijenjenim hranidbi životinja široko varira, a pojedina istraživanja ukazala su i na značajnije razine

onečišćenja, utvrđene su vrijednosti i do 998 µg/kg. Kononenko i Burkin (2008) su analizom žitarica (n = 766) detektirali citrinin u 4,5% analiziranih uzoraka pšenice te 3,6% uzoraka ječma u koncentracijama od 50 do 998 µg/kg i u 1,9% uzoraka kukuruza u koncentraciji od 218 do 953 µg/kg. Curtui i sur. (1998) su od analiziranih 55 uzoraka pšenice i kukuruza u Rumunjskoj detektirali citrinin u samo jednom uzorku kukuruza u koncentraciji od 580 µg/kg. Također, istraživanja su provedena i na uzorcima hrane za životinje porijeklom iz poljoprivrednih gospodarstava na području Rumunjske. Svi analizirani uzorci sadržavali su citrinin u koncentracijama od 17 do 405 µg/kg, dok je u 25% uzoraka koncentracija citrinina bila veća od 405 µg/kg. Nadalje, u Bugarskoj su u uzorcima hrane za svinje i piliće, uzorkovane na farmi na kojoj su prilikom klanja uočeni pokazatelji nefropatije (povećani i blijedo išarani izgled bubrega), određene povećane količine citrinina. Citrinin je 2006. godine detektiran u 92% uzoraka hrane za životinje s prosječnom koncentracijom od 54,7±27,5 µg/kg te 2007. godine u 96% uzoraka s koncentracijom od 120,5±43,3 µg/kg.

U analiziranoj hrani, uz citrinin, određene su i povećane koncentracije okratoksina A (188,8±27,3 µg/kg i 376,4±63,9 µg/kg) te nekih drugih mikotoksina (Stoev i sur., 2010). Također, u istraživanjima provedenim u Velikoj Britaniji, od 141 uzoraka žitarica, 48 uzoraka je bilo onečišćeno citrininom sa njegovom najvećom koncentracijom od 10 µg/kg (LOD = 1 µg/kg) (Scudamore i Hetmanski, 1995; Scudamore i sur., 1997).

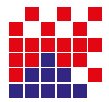
Analitičke metode za određivanje

U analitici mikotoksina koriste se analitičke metode koje se mogu podijeliti na kvalitativne i kvantitativne te nadalje na orijentacijske i potvrdne metode. Za određivanje citrinina najviše se primjenjuju kolorimetrijske, kromatografske i imu-

Tablica 3. Karakteristike najznačajnijih analitičkih metoda za određivanje citrinina (EFSA 2012)

Table 3. Characteristics of the most important analytical methods for the determination of citrinin (EFSA 2012)

Analitička metoda	Karakteristika metoda	Limit detekcije (µg/kg)
Kolorimetrijske metode	Orijentacijska (kvalitativna - polukvantitativna)	100-8000
Tankoslojna kromatografija	Orijentacijska (kvalitativna - polukvantitativna)	15-40
Imunoenzimska metoda	Orijentacijska (polukvantitativna - kvantitativna)	2-15000
Tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti s fluorescentnim ili DAD detektorom	Potvrdna (polukvantitativna - kvantitativna) Mogućnost detektiranja više analita	0,1-10
Tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti s masenom spektrometrijom	Potvrdna (polukvantitativna - kvantitativna) Mogućnost detektiranja više analita	0,1-100



nokemijske metode, a osnovne karakteristike najznačajnijih metoda prikazane su u tablici 3.

Kolorimetrijske metode u određivanju citrinina temelje se na njegovoj prirodnoj fluorescenciji (EFSA 2012). Navedene metode karakterizira jednostavnost i brzina te niska cijena analize, međutim zbog različitih faktora koji utječu na kolorimetrijske metode, nisko iskorištenje reakcije, kao i relativno niska razina osjetljivosti (visoke LOD vrijednosti) ove metode, općenito imaju ograničenu primjenu u analitici ovog mikotoksina (Xu i sur., 2006).

Tankoslojna kromatografija (TLC) se nekada smatrala iznimno dobrom, brzom i jeftinom metodom za određivanje mikotoksina, dok se značajnije nije razvila HPLC metoda (Xu i sur., 2006). Glavni problem TLC kao metode za određivanje citrinina je njegova slaba fluorescencija i nestabilnost (Betina, 1989). U današnje se vrijeme zbog manje osjetljivosti i iskorištenja TLC metoda najčešće primjenjuje za kvalitativno određivanje citrinina.

Imunoenzimska metoda ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) je imunološka metoda koja se široko koristi u određivanju citrinina, jer omogućuje brzi *screening* ili kvantitaciju vrlo niskih koncentracija na velikom broju uzoraka. ELISA metodu karakterizira i lakoća provedbe, točnost i dostupnost reagenasa. Nedostatak ove metode jest da daje informaciju o prisustvu analita, ali ne i o njegovim biokemijskim svojstvima, kao što je npr. molekulska masa, kao i moguća *cross* reaktivnost strukturno sličnih spojeva (Pleadin, 2014a). Literaturni podaci govore da je većina problema vezanih uz ELISA metodu rezultat nekvalitetne opreme, odnosno nepridržavanja uputa proizvođača kitova vezanih za samu metodu (Crowther, 1995). Ova metoda ne zahtjeva složene korake u pročišćavanju uzoraka, no dobiveni pozitivni rezultat ELISA metode potrebno je potvrditi primjenom npr. tekućinke kromatografije visoke učinkovitosti (HPLC) (EFSA 2012).

Tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) oblik je kromatografije koja podrazumijeva primjenu visokih tlakova, a princip metode temelji se na razlici u topljivosti sastojaka uzoraka u pokretnoj i nepokretnoj fazi. Komponente se razdvajaju na koloni temeljem njihove različite brzine putovanja. Tijekom zadnjih desetak godina HPLC metode postale su vrlo popularne i osjetljive metode za identifikaciju i kvantifikaciju mikotoksina (Pascale i Visconti, 2008). Izrazito visoka osjetljivost, kao i preciznost u određivanju mikotoksina, može se postići pažljivom pripremom ekstrakata uzoraka te odabirom odgovarajućih otapala. Također, HPLC metoda uspješno je primijenjena za određivanje citrinina u žitaricama, siru, hrani za životinje, dijetetskim preparatima kao i u biološkim tekućinama, a ovisno o materijalu za analizu HPLC metode značajno se razlikuju u odabiru normalno-fazne ili reverzno-fazne kolone, pripremi i pročišćavanju uzoraka te odabiru detektora (Xu i sur., 2006; Stark, 2010).

U posljednjem desetljeću u analitici mikotoksina HPLC metoda se često kombinira sa detekcijom masenom spektrometrijom (MS) (Pleadin i sur., 2014a). MS omogućava izrazito točnu i specifičnu detekciju, pri čemu ograničavajuće čimbenike predstavljaju visoka cijena potrebne opreme složenost postupaka ekstrakcije i odjeljivanja te detekcije i kvantifikacije ovih spojeva (Turner i sur., 2009). U usporedbi s navedenim kvalitativnih i kvantitativnih metoda, HPLC-MS/MS metoda

za određivanje citrinina podrazumijeva uporabu male količine otapala za ekstrakciju, jednostavne korake pročišćavanja i visoku osjetljivost (Ji i sur., 2015).

Preventivne mjere i redukcija

Onečišćenje žitarica mikotoksinima neizbježno dovodi do zdravstvenih rizika za potrošača, ali i do ekonomskih gubitaka, stoga veliku pažnju treba usmjeriti na detoksikaciju onečišćenih žitarica sigurnim i učinkovitim metodama. Provođenje dobre skladišne prakse (Good Storage practices - GSP) sprječava nastanak plijesni, a time i onečišćenje hrane i hrane za životinje mikotoksinima. Primjenjeni postupci redukcije mikotoksina općenito trebaju omogućiti inaktivaciju mikotoksina, uništiti štetne metabolite plijesni, a da se hranjiva vrijednost i organoleptička svojstva namirnice koja se obrađuje ne promijeni. Treba navesti da ne postoji jedinstveni način uklanjanja mikotoksina iz hrane i hrane za životinje te da je većina mikotoksina otporna na temperaturu koja se uobičajeno primjenjuje kod pripreme hrane (80-121 °C), tako da se postupcima kuhanja, prženja i pasterizacije ukupna količina mikotoksina smanjuje vrlo malo ili niti malo.

Citrinin je prilično stabilan na zraku i u sušenim proizvodima tijekom godinu dana, a nestabilan je tijekom dulje izloženosti svjetlu i toplini. Međutim, razgrađuje se tijekom operacije gnječenja koja se primjenjuje u procesu proizvodnje hrane. Obzirom da je citrinin temperaturno nestabilan, u odnosu na npr. okratoksin A, termičkom obradom se količina citrinina drastično smanjuje. Upravo to svojstvo objašnjava njegovu nisku pojavnost u jabučnim sokovima i ostalim proizvodima. Određena je njegova prisutnost u mekinjama i u polituri riže, a smatra se da je vjerojatno održiv tijekom meljave, budući je nađen u kukuruznom brašnu u koncentraciji 10-98 µg/kg (Flajs i Peraica, 2009). Kitabatake i sur. (1991) su zaključili da se citrinin raspada pri višim temperaturama i pri različitim postocima relativne vlažnosti, npr. sušenjem pri 175 °C i u vlažnim uvjetima pri 140 °C.

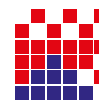
Poželjna strategija za smanjenje razine mikotoksina u žitaricama je prevencija njihovim onečišćenjem prije, tijekom i nakon žetve. Citrinin u pravilu nastaje nakon žetve i to obično pri lošim uvjetima uskladištenja, a najčešće se pojavljuje u žitaricama. Pronađen je kao nepoželjni onečišćivač u kvasca iz roda *Monascus* (crvena rižina plijesan) koja se stoljećima koristi kao konzervans mesnih proizvoda i bojilo, naročito u azijskim zemljama (EFSA, 2012). Kvasac roda *Monascus* uzgaja se i namjerno dodaje u namirnice kao jeftina i primamljiva boja iz skupine "prirodnih bojila". Riža je jedna od najvažnijih žitarica u ljudskoj prehrani, zajedno sa pšenicom i kukuruzom. Uzgaja se u vrlo vlažnim područjima te je kao takva izrazito podložna nastanku plijesni. Područja uzgoja s velikom količinom oborina, time i idealnim uvjetima za rast onečišćivača, zahtijevaju dodatno sušenje žitarica tijekom uskladištenja. Postoje dvije mogućnosti nastanka plijesni i to: prva je onečišćenje usjeva tijekom sazrijevanja, a druga je onečišćenje već zrelog usjeva zbog izloženosti toplini i vlazi na polju ili u skladištu. Osim navedenog, neki insekti također mogu utjecati na razvoj plijesni. O važnosti uklanjanja kritičnih točaka, a time i ispravnog uskladištenja, govori i činjenica da je u riži pronađeno nekoliko mikotoksina, i to: aflatoksin, fumonizin, trihotecen, okratoksin A, ciklopiazonska kiselina, zearalenon, deoksiniva-

lenol, citrinin, gliotoksin i sterigmatocistin (Fernández-Cruz i sur., 2012). Utvrđeno je da je rižu potrebno uskladištiti u prostorijama gdje je relativna vlažnost zraka 65% i temperatura zraka oko 15 °C, održavati aeracijske sustave koji omogućavaju određenu vlažnost i temperaturu zraka te uskladištenje samo kvalitetnih zrna riže.

Nadalje, dokazano je da gljiva koja raste u zemlji *Trichoderma hamatum* smanjuje proizvodnju citrinina iz *Penicillium viridcatum* (Abd-Allah i Ezzat, 2005). Osim navedenog i neke biljke koje se koriste u medicini smanjuju proizvodnju citrinina kao što su *Andrographis paniculata*, *Cymbopogon citratus*, *Eurycoma longifolia*, *Kaempferia galanga* i *Orthosiphon aristatus* (Reddy i sur., 2002). Toplinskom obradom u kombinaciji sa kemijskim sredstvima može se povećati učinkovitost degradacije mikotoksina. Utvrđeno je da se citrinin može detoksicirati tretmanom s 0,05% H₂O₂ tijekom 30 min pri sobnoj temperaturi (Fouler i sur., 1994; Kabak, 2010). Međutim, većina kemikalija potencijalno je opasna ili utječe na karakteristike proizvoda, te se danas sve više pažnje usmjerava biološkoj dekontaminaciji namirnica (Reddy, 2010) koja podrazumijeva enzimsku degradaciju mikotoksina odnosno njihovu modifikaciju u manje toksične produkte. Utvrđeno je da probiotičke bakterije u vodenim otopinama vežu pojedine mikotoksine, ali je to područje nedovoljno istraženo te se daljnja istraživanja trebaju usmjeriti na njihovu primjenu u vezivanju mikotoksina, ujedno i citrinina. Također, fizikalni postupci poput zračenja x, γ i UV zrakama pokazali su se učinkovitim u degradaciji mikotoksina (Kabak, 2010).

Literatura

1. Abd-Allah E. F., Ezzat M. (2005): Natural occurrence of citrinin in rice grains and its biocontrol by *Trichoderma hamatum*. *Phytoparasitica*, 33 (1), 73-84.
2. Abou-Zeid A.M. (2012): Review on citrinin syntetic methods molecular biosynthesis on effect on plant extracts. *British Microbiology Research Journal*, 2(2), 108-122.
3. AFSSA – Agence Francaise de Sécurité Sanitaire des Aliments (2006): *Évaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale*. Report Synthétique.
4. Amalaradjou M.A.R., Venkitanarayanan, K. (2008): Detection of *Penicillium*, *Aspergillus* and *Alternaria* Species in Fruits and Vegetables, 225-249. In: *Mycotoxins in Fruits and Vegetables*/ Barkai-Golan R., Paster N. (ed.), Academic Press, Elsevier.
5. Bennett J.W., Klich M. (2003): Mycotoxins, *Clinical Microbiology Reviews*, 3, 497-516.
6. Betina V. (1989:) Chromatographic methods as tools in the field of mycotoxins, *Journal of Chromatography A*, 477(2), 187-233.
7. Binder E.M., Tan, L.M., Chin, L.J., Handl, J., Richard, J. (2007): Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients, *Animal Feed Science and Technology*, 137, 265-282.
8. Chan W.-H., Shiao N.-H. (2007): Effect of citrinin on mouse embryonic development *in vitro* and *in vivo*, *Reproductive Toxicology*, 24, 120-125.
9. Ciegler A., Vesonde R.R.F., Jackson L.K. (1977): Production and biological activity of patulin and citrinin from *Penicillium expansum*, *Applied and Environmental Microbiology*, 33 (4), 1004-1006.
10. Crowther J.R.(1995): Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA & Principels, *Joint FAO/IAEA, Division Vienna*.
11. Curtui V., Usleber E., Dietrich R., Lepschy J., Märtlbauer E. (1998): A survey on the occurrence of mycotoxins in wheat and maize from western Romania, *Mycopathologia*, 143, 97-103.
12. Dietrich R., Schmid A., Märtlbauer E. (2001): Citrinin in fruit juices, *Mycotoxin Research*, 17, 156-159.
13. Duraković S., Duraković L. (2000): *Specijalna mikrobiologija*, Kugler d.o.o., Zagreb.
14. EFSA-European Food Safety Authority (2012): Scientific Opinion on the risks for public and animal health related to the presence of citrinin in food and feed, *EFSA Journal*, 10(3), 1-81.
15. FAO-Food and Agriculture Organization of the United Nations (2003): Manual on the application of the HACCP system in the mycotoxin prevention and control, *FAO Food and Nutrition Paper*, 72, 1-124.
16. Fernández-Cruz M., Mansilla M.L., Tadeo J.L. (2012):Mycotoxins in fruits and their processed products: Analysis, occurrence and health implications, *Journal of Advanced Research*, 1, 113-122.
17. Flajs D., Mladinić M., Željezić D., Peraica M. (2011): Citrinin potentiates ochratoxin A toxicity, *Abstracts/Toxicology Letters*, 205S, 220-221.
18. Flajs D., Peraica M. (2009): Toxicological properties of citrinin, *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 60, 457-464.
19. Fouler S.G., Trivedi A.B., Kitabatake N. (1994): Detoxification of citrinin and ochratoxin A by hydrogen peroxide, *Journal of AOAC International*, 77 (3), 631-637.
20. Hajjaj H., Klaébé A., Loret M.O., Goma G., Blanc P.J., François J. (1999): Biosynthetic Pathway of citrinin in the Filamentous Fungus *Monascus ruber* as Revealed by ¹³C Nuclear Magnetic Resonance, *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (1), 311-314.
21. Houbraken J., Frisvad J.C., Samson R.A. (2011):Taxonomy of *Penicillium* section Citrina, *Studies in Mycology*, 70 (1), 53-138.
22. IARC - International Agency for Research on Cancer (1986): Citrinin. Some Naturally Occurring and Synthetic Food Components, Furocoumarins and Ultraviolet Radiation. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, volume 40, 67.
23. Ji X., Xu J., Wang X., Qi P., Wei W., Chen X., Li R., Zhou Y, (2015): Citrinin Determination in Red Fermented Rice Products by Optimized Extraction Method Coupled to Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS), *Journal of Food Science*, 80, 1438-1444.
24. Kabak B. (2010): Prevention on management of mycotoxins in food and feed 201-229. In: *Mycotoxins in food, feed and bioweapons*/Rai M. & Varma A. (ed.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
25. Kitabatake N., Trivedi A.B., Doi E. (1991): Thermal decomposition and detoxification of citrinin under various moisture conditions, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39 (12), 2240-2244.



26. Kononenko G.P., Burkin, A.A. (2008): A survey on the occurrence of citrinin in feeds and their ingredients in Russia, *Mycotoxin Research*, 24, 3-6.
27. Liu B.-H., Yu F.-Y., Wu T.-S., Li A.-Y., Su M.-C., Wang M.-C., Shih S.-M. (2003): Evaluation of genotoxic risk and oxidative DNA damage in mammalian cells exposed to mycotoxins, patulin and citrinin, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 191, 255-263.
28. Markov K., Pleadin J., Bevardi M., Vahčić N., Sokolić-Mihalak D., Frece J. (2013): Natural occurrence of aflatoxin B₁, ochratoxin A and citrinin in Croatian fermented meat products, *Food Control*, 34, 312-317.
29. Ožegović L., Pepeljnjak S. (1995): *Mikotoksikoze*, Školska knjiga, Zagreb, 69-206.
30. Qingqing H., Linbo Y., Yunqian G., Shuqiang L. (2010): Toxic effects of citrinin on the male reproductive system in mice, *Experimental and Toxicologic Pathology* 64(5), 465-469 doi: 10.1016/j.etp.2010.10.015.
31. Pascale M., Visconti A. (2008): Overview of Detection Methods for Mycotoxins, 169-183. In: *Mycotoxins Detection Methods, Management*/Leslie J.F., Bandyopadhyay R., Visconti A (ed.). Public Health and Agricultural Trade, Myco-Globe.
32. Placinta C.M., D'Mello J.P.F., Macdonald A.M.C. (1999): A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins, *Animal Feed Science and Technology*, 78, 21-37.
33. Pleadin J., Markov K., Frece J. (2014a): Aflatoksini - Onečišćenje, učinci i metode redukcije, *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition*, 9, 75-82.
34. Pleadin J., Markov K., Frece J., Vulić A., Perši N. (2014b): Bio-Prevalence, Determination and Reduction of Aflatoxin B₁ in Cereals In: *Aflatoxins: Food Sources, Occurrence and Toxicological Effects*/ Adina G. Faulkner (ed.). USA: Nova Science Publishers, 1-34.
35. Pleadin J., Perši N., Vulić A., Zadavec M. (2012): Survey of mycotoxin feed contamination in Croatia, *Biotechnology in Animal Husbandry*, 28, 167-177.
36. Pleadin J., Vulić A., Perši N., Škrivanko M., Capek B., Cvetnić Ž. (2014c): Aflatoxin B₁ occurrence in maize sampled from Croatian farms and feed factories during 2013, *Food Control*, 40, 286-291.
37. Pleadin J., Vulić A., Perši N., Škrivanko M., Capek B., Cvetnić Ž. (2015): Annual and regional variations of aflatoxin B₁ levels seen in grains and feed coming from Croatian dairy farms over a 5-year period, *Food Control*, 47, 221-225.
38. Reddy K.R.N., Farhana, N.I., Salleh, B., Oliveira, C.A.F. (2010): Microbiological Control of Mycotoxins: Present Status and Future Concerns, *Formatex*, 1078-1086.
39. Reddy K.R.N., Nurdijati S.B., Salleh B. (2002): Efficacy of aqueous medicinal plant extracts on growth and citrinin production by *Penicillium citrinum* isolated from rice grains, *African Journal of Microbiology Research*, 4(23), 2562-2565.
40. Scudamore K.A., Hetmanski M.T. (1995): Natural occurrence of mycotoxins and mycotoxigenic fungi in cereals in the United Kingdom, *Food Additives and Contaminants Part A*, 12, 377-382.
41. Scudamore K.A., Hetmanski M.T., Chan H.K., Collins S. (1997): Occurrence of mycotoxins in raw ingredients used for animal feeding stuffs in the United Kingdom in 1992, *Food Additives and Contaminants Part A*, 14, 157-173.
42. Sforza S., Dall'Astra C., Marchelli R. (2006): Recent advances in mycotoxin determination in food and feed by hyphenated chromatographic techniques/mass spectrometry, *Mass Spectrometry Reviews*, 25, 54-76.
43. Speijers G.J.A., Speijers M.H.M. (2004): Combined toxic effects of mycotoxins, *Toxicology Letters*, 153, 91-98.
44. Stark A.-A. (2010): Molecular of detection of aflatoxins and other mycotoxins 21-39. In: *Mycotoxins in food, feed and bioweapons*/ Rai, M. & Varma, A., (ed.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
45. Stoev S.D., Dutton M.F., Njobeh P.B., Mosonik J.S., Steenkamp P.A. (2010): Mycotoxic nephropathy in Bulgarian pigs and chickens: complex aetiology and similarity to Balkan endemic nephropathy, *Food Additives and Contaminants Part A*, 27, 72-88.
46. Turner N.W., Subrahmanyam S., Piletsky S.A. (2009): Analytical methods for determination of mycotoxins, *Analytica Chimica Acta*, 632, 168-180.
47. Xu B., Jia X., Gu L., Sung C. (2006): Review on the qualitative and quantitative analysis of the mycotoxin citrinin, *Food Control*, 17, 271-285.