

## PREGLEDNI RAD

# Ciklopiazonična kiselina: toksičnost i pojavnost nedovoljno istraženog mikotoksina

## *Cyclopiazonic acid: toxicity and prevalence of insufficiently investigated mycotoxin*

Maja Kiš<sup>1\*</sup>, Ana Vulić<sup>2</sup>, Ivana Kmetič<sup>3</sup>, Tina Lešić<sup>2</sup>, Teuta Murati<sup>3</sup>, Jelka Pleadin<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Hrvatski veterinarski institut, Veterinarski zavod Križevci, Laboratorij za mikrobiologiju hrane i hrane za životinje, Zalkmardijeva 10, 48260 Križevci, Hrvatska

<sup>2</sup> Hrvatski veterinarski institut, Laboratorij za analitičku kemiju, Savska cesta 143, 10 000 Zagreb, Hrvatska

<sup>3</sup> Prehrambeno-biotehnoški fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Laboratorij za toksikologiju, Pierottijeva 6, 10 000 Zagreb, Hrvatska

\*Corresponding author: kis.vzk@veinst.hr

### Sažetak

Mikotoksini su proizvodi sekundarnog metabolizma toksikogenih plijesni koji predstavljaju vrlo česte onečišćivače hrane i hrane za životinje. Ciklopiazonična kiselina (CPA) je indol-tetraminska kiselina koju sintetiziraju različite plijesni iz rodova *Penicillium* (*P. griseofulvum*, *P. camemberti*, *P. commune*, *P. dipodomyicola*) i *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. oryzae*, *A. tamarii*). CPA je prirodni kontaminant hrane biljnog (kukuruz, kikiriki, riža) i animalnog podrijetla, uključujući mlijeko, sir i suhomesnate proizvode. Česta zajednička pojavnost CPA i aflatoksina u hrani i hrani za životinje upućuje na moguće sinergističko djelovanje. Iako toksični učinci CPA nisu detaljno proučeni, kod pojedinih životinjskih vrsta dokazano je tremorgeno, neurokemijsko i imunosupresivno djelovanje. S obzirom da je CPA slabo istražen mikotoksin, nužna su daljnja istraživanja njegove toksičnosti, pojavnosti te sinergističkog učinka više različitih mikotoksina koji se mogu nalaziti u istoj namirnici.

**Gljučne riječi:** ciklopiazonična kiselina, toksičnost, pojavnost, hrana, hrana za životinje

### Abstract

Mycotoxins are secondary metabolism products of toxigenic fungi that represent common contaminants of food and feed. Cyclopiazonic acid (CPA) is an indole-tetramic acid synthesized by moulds of the genera *Penicillium* (*P. griseofulvum*, *P. camemberti*, *P. commune*, *P. dipodomyicola*) and *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. oryzae*, *A. tamarii*). CPA is a natural contaminant of vegetal products (corn, peanuts, rice) and food of animal origin including milk, cheese and fermented meat products. Common co-occurrence of CPA and aflatoxins indicates a possible synergistic effect. Although the toxicity of CPA was not examined in detail, some animal species confirmed its tremorgenic, neurochemical and immunosuppressive properties. Given the scarcity of the data about CPA, further research of its toxicity, prevalence and synergistic effects of different co-occurring mycotoxins, are required.

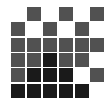
**Keywords:** cyclopiazonic acid, toxicity, prevalence, food, feed

### Uvod

Onečišćenje hrane plijesnima predstavlja ozbiljnu prijetnju zdravlju ljudi i životinja, posebice kada se radi o plijesnimama koje imaju sposobnost sinteze mikotoksina. Mikotoksini su heterogena skupina sekundarnih metabolita plijesni s učestalom prisutnošću na žitaricama, proizvodima na bazi žitarica, začинима, sušenom voću, orašastim plodovima te proizvodima životinjskog podrijetla. Čimbenici koji utječu na nastanak plijesni i pogoduju biosintezi mikotoksina odnose se na prisutnost spora plijesni, prikladnu relativnu vlažnost, temperaturu, aeraciju, prisutnost insekata i fizičko oštećenje supstrata (Sforza i sur., 2006; Pleadin i sur., 2012). Do kontaminacije mikotoksinima može doći tijekom bilo koje faze proizvodnog procesa,

a zbog svoje kemijske i toplinske stabilnosti, otporni su na različite uvjete tijekom prerade i proizvodnje hrane (Pleadin i sur., 2017).

Mikotoksini uzrokuju pojavu mikotoksikoza, bolesti koje imaju genotoksično, nefrotoksično, citotoksično, estrogeno i teratogeno djelovanje u brojnim organizmima. U svrhu zaštite javnog zdravlja od toksičnih učinaka mikotoksina vrlo je važna uspostava smjernica i odredbi zakonodavstva te procjena rizika na nivou svake zemlje (IARC, 1993). Iako su za sprječavanje štetnih utjecaja mikotoksina na zdravlje ljudi i životinja razvijene mnoge strategije, za sada još nije razvijena jedinstvena metoda koja bi bila podjednako učinkovita za sve mikotoksine u različitim supstratima (Pleadin i sur., 2017). S obzirom da je globalna prisutnost mikotoksina u hrani i hrani za životi-



nje gotovo neizbježna, osim na sigurnost hrane, zdravlje ljudi i produktivnost životinja, njihov negativan utjecaj očituje se i na nacionalnu ekonomiju i međunarodnu trgovinsku razmjenu.

Ciklopiazonična kiselina (CPA) je mikotoksin kojeg je 1968. godine otkrio i kemijski okarakterizirao Holzapfel, a izoliran je tijekom rutinske analize plijesni iz ekstrakta *Penicillium cyclopium* Westling (kasnije nazvan *Penicillium griseofulvum* Dierckx) kao glavni toksični metabolit. U kasnijim istraživanjima, Holzapfel i sur. (1970) su opisali dva nova relativno netoksična derivata:  $\beta$ -CPA i  $\alpha$ -CPA-imin koje također proizvodi *P. cyclopium*. Tijekom kasnijih istraživanja utvrđeno je da i plijesni iz roda *Aspergillus*, kao što su *Aspergillus flavus*, *Aspergillus tamarii*, *Aspergillus oryzae*, mogu biti producenti CPA. Od 1970. godine opisano je još 27 mikotoksina koji pripadaju grupi CPA, a proizvode ih plijesni iz rodova *Penicillium* i *Aspergillus*. S obzirom da je CPA manje potentan toksin u odnosu na druge mikotoksine (aflatoksin, sterigmatocistin), broj istraživanja i dostupnost podataka o utjecaju CPA na zdravlje ljudi i životinja, pojavnosti u hrani i analitičkim metodama u detekciji i kvantifikaciji je vrlo ograničen (Ostry i sur., 2018).

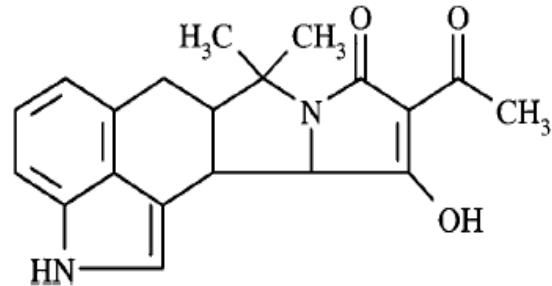
Poznato je da su mikotoksini specifični u odnosu na druge toksine po tome što pojedini rodovi plijesni imaju sposobnost sinteze nekoliko različitih mikotoksina, kao i to da pojedini mikotoksini mogu biti proizvod sekundarnog metabolizma više različitih rodova i vrsta plijesni. U povoljnim uvjetima, mješovite kulture plijesni su biokemijski aktivnije od čistih kultura što rezultira biosintezom različitih metabolita. Istovremena pojavnost CPA i aflatoksina je česta u hrani i hrani za životinje (Duran i sur., 2007). Plijesni iz rodova *Penicillium* i *Aspergillus* su široko rasprostranjene i često zajedno kontaminiraju usjeve žitarica ili se razvijaju tijekom skladištenja (Chang i sur., 2009). *A. flavus* je najznačajnija aflatoksikogena plijesan koja nastanjuje zračne dijelove biljke (list, cvijet) i proizvodi aflatoksin skupine B. Smatra se da je 1962. godine u Velikoj Britaniji došlo do uginuća više od 100.000 purića kao posljedica kombiniranog izlaganja aflatoksinu i CPA (Burdock i Flamm, 2000). CPA se povezuje s trovanjem ljudi i životinja u Indiji kontaminiranim prosom. Pri tome su u uzorcima nađeni sojevi *A. flavus* i *A. tamarii* koji imaju sposobnost proizvodnje CPA (Rao i Husain, 1985).

S obzirom da je prema dostupnoj literaturi CPA slabo istražen mikotoksin, u ovom radu dan je pregled svojstava, toksičnih učinaka i pojavnosti CPA u hrani biljnog i životinjskog podrijetla, a predstavljene su i analitičke metode koje se koriste u detekciji i kvantifikaciji ovog mikotoksina.

## Struktura i fizikalno-kemijska svojstva

CPA je indol-tetraminska kiselina, lipofilna jednobazna kiselina strukturno slična lizerginskoj kiselini (slika 1). Kao i većina mikotoksina, CPA je spoj relativno male molekulske mase (336,39 g/mol). To je optički aktivna molekula, bez boje i mirisa, koja posjeduje sposobnost keliranja metala. Netopljiva je u vodi, a slabo topljiva u puferiranim otopinama. Topljivost CPA u kloroformu, diklormetanu, metanolu i acetonitrilu iznosi oko 20 mg/mL. Topljivost u dimetil sulfoksidu (DMSO) iznosi 33,64 mg/mL, a u etanolu 1,68 mg/ml (Ostry i sur., 2018). CPA je stabilna prilikom čuvanja u krutom stanju pri

4 °C. Zagrijavanjem se CPA razgrađuje uz nastanak toksičnih para dušikovih oksida (NO<sub>x</sub>), a temperatura tališta iznosi 245–246 °C. Prema istraživanju Diaz i sur. (2010), stabilnost ovog mikotoksina je puno manja u otopinama, što utječe na provođenje analitičkih postupaka određivanja CPA.



**Slika 1.** Strukturna formula ciklopiazonične kiseline (Burdock i Flamm, 2000)

**Figure 1.** Structural formula of cyclopiazonic acid (Burdock i Flamm, 2000)

## Biosinteza, apsorpcija i eliminacija

CPA uglavnom sintetiziraju plijesni iz roda *Penicillium* (*P. griseofulvum*, *P. camemberti*, *P. commune*, *P. dipodomycicola*) i *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. oryzae*, *A. tamarii*). Plijesni iz rodova *Penicillium* i *Aspergillus* su široko rasprostranjene u cijelom svijetu, najvažniji supstrati za njihov rast su ponajprije žitarice, a kontaminiraju i ostalu hranu biljnog i životinjskog podrijetla. Izolati *A. flavus* se razlikuju s obzirom na sposobnost proizvodnje CPA, a najveća učestalost sinteze CPA (>70%) je utvrđena u izolatima iz Argentine i SAD-a (Chang i sur., 2009). Mevalonat/acetatni biosintetski put je glavni put nastanka ovog mikotoksina u sekundarnom metabolizmu plijesni. Pritom se iz mevalonske kiseline i ciklo-acetoacetyl-L-triptofana (nastalog kondenzacijom dvije molekule octene kiseline i triptofana) sintetizira CPA (Chang i sur., 2009). Tetraminska kiselina nastaje u ranoj fazi biosinteze nakon čega reakcijama alkilacije nastaje  $\beta$ -CPA, koja je direktni biosintetski prekursor  $\alpha$ -CPA (Zhurakovskiy i sur., 2018). Iako je struktura CPA poznata još od 1968. godine, do sada je objavljeno tek nekoliko sinteza u kojima su dobiveni racemati (Kozikowski i sur., 1984; Muratake i Natsume, 1985; Haskins i Knight 2005), a literaturni podaci navode da je potrebno dodatno proučiti odnos strukture i aktivnosti dobivenih spojeva (Ostry i sur., 2018).

CPA se vrlo brzo apsorbira u organizam bez obzira na način primjene. Sat vremena nakon intraperitonealne primjene radioaktivno označene <sup>14</sup>C-CPA štakorima u dozi od 1 mg/kg tjelesne mase, najveća koncentracija radioaktivne doze zabilježena je u plućima, srcu, bubrezima, jetri i skeletnim mišićima. Mjesto najznačajnije kumulacije CPA su skeletni mišići u kojima je nakon 12 h zabilježeno 50% ukupne radioaktivne doze. Lokalizacija ovog mikotoksina u skeletnim mišićima povezana je sa simptomima slabosti, nekoordinacije i letargije koji su uočeni na pokusnim životinjama. Eliminacija CPA iz organizma provodi se putem fecesa i urina, pri čemu je nakon 72 h 37% radioaktivne doze eliminirano putem fecesa, a 23% putem urina. Biološko poluvrijeme

CPA iznosi  $33 \pm 12$  h kod intraperitonealne primjene, a  $43 \pm 25$  h kod intragastrične primjene (Norred i sur., 1985; Burdock i Flamm, 2000).

## Toksični učinci u organizmu

Toksičnost i biosinteza CPA i dalje nisu detaljno proučeni. CPA se ubraja u kategoriju potencijalno opasnih mikotoksina koji mogu uzrokovati degenerativne promjene i nekrozu jetre, slezene, gušterače, bubrega, žlijezda slinovnica, miokarda i skeletnog mišića. Dokazano je da su na toksično djelovanje CPA najosjetljiviji probavni organi, mišići, jetra i slezena, iako se simptomi toksičnosti razlikuju ovisno o vrsti, dobi i spolu životinje, načinu unosa mikotoksina u organizam, dozi i trajanju izlaganja (Ostry i sur., 2018).

Toksični učinci CPA potječu od njegove sposobnosti inhibicije specifične  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaze (SERCA) koja se nalazi u membrani sarkoplazmatskog ili endoplazmatskog retikuluma i odgovorna je za kumulaciju  $\text{Ca}^{2+}$  iona u njihovim skladištima u stanicama. Inhibiranjem ovog enzima dolazi do promjene u normalnom unutarstaničnom prijenosu kalcija koji je dio ciklusa mišićne kontrakcije i relaksacije (Goeger i sur., 1988). Gradijent kalcija ključan je u procesima diobe, diferencijacije i smrti stanice. Prema novijim istraživanjima, CPA djelomično blokira  $\text{Ca}^{2+}$  kanale u membrani i imobilizira četiri transmembranska lanca ATPaze (Moncoq i sur., 2007). Također, ovaj mikotoksin djeluje na mišićno tkivo tako da stvara negativni inotropni i kronotropni učinak, koji se očituju različitim simptomima toksičnosti.

**Tablica 1.** Toksičnost ( $\text{LD}_{50}$ ) ciklopiazonične kiseline u pokusnih životinja (Purchase, 1971; Burdock i Flamm, 2000)

**Table 1.** Toxicity ( $\text{LD}_{50}$ ) of cyclopiazonic acid in various experimental animals (Purchase, 1971; Burdock i Flamm, 2000)

Životinje/ Experimental animals	Spol/Sex	Peroralno/ Peroral (mg/kg)	Intraperitonealno/ Intraperitoneal (mg/kg)
Štakori/Rats	Muški/Male	36	2,3
	Ženski/Female	63	-
Pilići/Chickens	Muški/Male	12,0	-
	Ženski/Female	12,1	-
Kunići/Rabbits	Nije navedeno/ Not specified	-	< 10
Som/Catfish	Nije navedeno/ Not specified	-	2,82

CPA se ne smatra vrlo potentnim akutnim toksinom, s  $\text{LD}_{50}$  vrijednosti kod glodavaca koja se kreće u rasponu 30 - 70 mg/kg (tablica 1). U istraživanjima akutne toksičnosti na sisavcima zabilježena je slična klinička slika koja ukazuje na pojavu smanjenja motoričkih funkcija, gubitak koordinacije mišićnih pokreta, hipotermiju, tremor i konvulzije, uz smanjeno unošenje hrane i vode. Oralna i intraperitonealna primjena CPA izazivaju različite reakcije u pokusnih životinja zbog manje apsorpcije CPA u kiselom mediju želuca u odnosu na neutralno područje peritoneuma (Burdock i Flamm, 2000). Intraperito-

nealna primjena CPA kod štakora dovodi do nastanka lezija na jetri, bubrezima, slezeni, gušterači i srcu (Purchase, 1971), dok je u pokusu s pilećom hranom onečišćenom dozama od 10, 50 i 100  $\mu\text{g}$  CPA/g hrane kod brojlera zabilježena nekroza sluznice želuca, jetre i slezene, lezije proventrikula i upalni procesi pri dozi od 100  $\mu\text{g}$ /g, uz visoku stopu smrtnosti. Pritom, pri koncentraciji od 10  $\mu\text{g}$  CPA/g hrane kod brojlera nije zabilježen nastanak lezija (Dorner i sur., 1983).

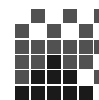
Istraživanja s višestrukim dozama pokazuju različite simptome kod više vrsta pokusnih životinja, pri čemu su svinje najosjetljivije sa NOAEL (*no-observed-effect-level*) od 1,0 mg/kg na dan (Burdock i Flamm, 2000). Istraživanja na gravidnim štakorima su pokazala niski teratogeni potencijal CPA. Međutim, pri dozama 5-10 mg/kg tjelesne mase, zabilježen je značajan stupanj retardacije u embrionalnom razvoju skeletnih mišića (Morrissey i sur., 1984). Prema novijim istraživanjima, CPA djeluje izravno toksično na limfocite i limfne organe kao što su timus i slezena (Kumar i Balachandran, 2009; Ostry i sur., 2018), a zbog oksidativnog stresa, čak i pri niskim dozama može izazvati upalne procese u jetri i bubrezima (Malekinejad i sur., 2011). U istraživanju na ljudskim stanicama, Hymery i sur., (2014) su u *in vitro* uvjetima dokazali citotoksično djelovanje CPA na hematopoetske stanice i stanice imunološkog sustava, dok je manja citotoksičnost zabilježena na stanicama probavnog sustava.

Dokazano je da CPA u kombinaciji s drugim mikotoksini- ma pokazuje sinergistički učinak (Chang i sur., 2009). Aditivni toksični učinak zabilježen je u istraživanjima CPA s aflatoksinom  $\text{B}_1$  (Smith i sur., 1992) i okratoksinom A (Gentles i sur., 1999) na pilićima, pri čemu su zabilježene promjene na jetri, bubrezima, slezeni te povećana razina triglicerida, mokraćne kiseline i aktivnost kreatin kinaze. Sinergističko djelovanje CPA i T-2 toksina kod pilića očituje se u smanjenom prirastu, a dovodi i do stanične smrti u limfnim organima (Chang i sur., 2009).

Istraživanja kronične toksičnosti CPA kod eksperimentalnih i domaćih životinja do sada nisu provedena. Zbog vrlo malo dostupnih podataka o toksičnosti i nedovoljno relevantnih istraživanja o karcinogenosti, Međunarodna agencija za istraživanje raka (IARC) za sada nije objavila svoju procjenu CPA. CONTAM Panel je 2006. godine naglasio važnost za procjenom istovremene izloženosti CPA i aflatoksina  $\text{B}_1$ . Zbog nedovoljno podataka, EFSA (*European Food Safety Authority*) i JECFA (*Joint Fao/WHO Expert Committee on Food Additives*) za sada nisu provele procjene izloženosti i unosa CPA u organizam (Ostry i sur., 2018).

## Pojavnost u hrani i hrani za životinje

Podaci iz malobrojnih istraživanja pojavnosti CPA u hrani i hrani za životinje ukazuju da je CPA prirodni kontaminant proizvoda biljnog i životinjskog podrijetla (tablica 2). Prikupljanjem podataka iz različitih istraživanja, prisutnost CPA određena je u kikirikiju, kukuruzu, riži, suhim smokvama, pireu od rajčica, suncokretu, pšenici (Ostry i sur., 2018). Na području Sjeverne i Južne Amerike utvrđene su značajnije razine onečišćenja, zbog povoljnih uvjeta za razvoj plijesni koje produciraju CPA. U istraživanju provedenom na uzorcima stočne hrane s farmi mlijeka u Brazilu, CPA je detektirana u 12% uzoraka u relativno niskim koncentracijama od 12,5-153,3  $\mu\text{g}$ /kg.



U analiziranim uzorcima mlijeka s istih farmi CPA je nađena u 6% uzoraka s vrijednostima ispod limita kvantifikacije (LOQ) metode (Oliviera i sur., 2008). Osim u mlijeku, prisutnost CPA je potvrđena u jajima i pilećem mesu, što ukazuje na prijenos mikotoksina iz onečišćenog krmiva u tkiva životinja (Chang i sur., 2009).

Osim proizvoda biljnog podrijetla, plijesni koje imaju sposobnost proizvodnje CPA mogu kolonizirati različite prehrambene proizvode. *P. camemberti* i *A. oryzae* su industrijske plijesni koje se uobičajeno koriste u fermentaciji hrane. Le Bars (1979) je s površine komercijalno dostupnih Camembert sireva izolirao 20 sojeva *P. camemberti* te utvrdio da svi imaju sposobnost proizvodnje CPA, pri čemu nastale koncentracije mikotoksina ovise o soju i okolišnim uvjetima. U novijem istraživanju prisutnosti CPA u sirevima s austrijskog tržišta, koje je uključilo i sireve s bijelom plemenitom plijesni (Camembert, Brie, Saint Albray), prisutnost CPA je potvrđena u 77% uzoraka, pri čemu su utvrđene vrijednosti i do 3700 µg/kg (Ansari i Haubl, 2016). Na površini fermentiranih suhomesnatih proizvoda prilikom zrenja dolazi do formiranja kolonija plijesni, najčešće iz rodova *Penicillium* i *Aspergillus*, čiji je rast općenito poželjan zbog pozitivnog utjecaja na razvoj okusa karakterističnog za ove proizvode. Alapont i sur. (2014) su u istraživanju prirodne mikroflore tradicionalnog španjolskog pršuta izolirali 33,7% sojeva plijesni koje produciraju CPA, od čega 66,6% čine sojevi *P. commune*, vrlo toksikogene plijesni.

Obzirom na zabilježenu visoku pojavnost plijesni proizvedena CPA u hrani, u proizvodnji komercijalnih fermentiranih proizvoda nužno je ispitivanje toksikogenih svojstava primijenjenih starter kultura plijesni. Istraživanjem Perominga i sur. (2018) potvrđeno je da 44% uzoraka španjolskog iberijskog pršuta sadrži CPA u koncentracijama od 36-540 µg/kg. Ovaj mikotoksin ima veliku stabilnost na mesnim proizvodima, pri čemu se 80% početne koncentracije zadržava na proizvodima nakon osam dana inkubacije. Rezultati upućuju na moguću kumulaciju vrlo visokih koncentracija CPA na sušenom mesu nakon kontaminacije i razvoja toksikogenih plijesni (Bailly i Guerre, 2009). Osim izravne kontaminacije putem plijesni, pojavnost CPA u hrani životinjskog podrijetla, posebice u mesu i mesnim proizvodima, može biti posljedica primjene kontaminirane stočne hrane u hranidbi životinja pri čemu dolazi do prijenosa mikotoksina u lancu od hrane za životinje do hrane životinjskog podrijetla (carry-over efekt) (Chang i sur., 2009).

U analiziranoj hrani, uz CPA, najčešće su određene i povećane koncentracije aflatoksina (Fernandez Pinto i sur., 2001; Oliviera i sur., 2008). Tako je 23% uzoraka suhih smokava iz Turske istovremeno onečišćeno s CPA te aflatoksinom B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> i G<sub>1</sub>. Pritom je CPA češći kontaminant suhih smokava u odnosu na aflatoksine (Heperkan i sur., 2012). U uzorcima kukuruza je uz CPA i aflatoksine B<sub>1</sub> i B<sub>2</sub> detektirana i povećana koncentracija deoksinivalenola (46-676 µg/kg) (Lee i Hagler, 1991).

**Tablica 2.** Prirodna pojavnost CPA u namirnicama

**Table 2.** Natural occurrence of CPA in food

Vrsta namirnice/ Food	Količina CPA/ CPA concentration (µg/kg)	Država/ State	Referenca/ Reference
Kukuruz/ Corn	25-250	SAD/ USA	Lee i Hagler (1991)
Kikiriki/ Peanut	32-6525	SAD/ USA	Lansden i Davidson (1983)
	493-4300	Argentina/ Argentina	Fernandez Pinto i sur. (2001)
Suhe smokve/ Dried figs	25-187	Turska/ Turkey	Heperkan i sur. (2012)
Sir/ Cheese	0,5 - 3610	Austrija/ Austria	Ansari i Haubl (2016)
Pršut/ Prosciutto	36-540	Španjolska/ Spain	Peromingo i sur. (2018)

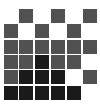
## Analitičke metode u detekciji

Za detekciju i kvantifikaciju CPA u fungalnim kulturama, hrani i hrani za životinje postoje različite analitičke metode. Pritom se najviše primjenjuju kromatografske i imunokemijske metode te kapilarna elektroforeza. Zbog svojstava CPA i niske stabilnosti u otopinama koja utječe na postupak ekstrakcije i detekcije, brojna istraživanja potvrđuju zahtjevnost analize ovog mikotoksina (Diaz i sur., 2010; Ansari i Haubl, 2016).

Metoda kapilarne elektroforeze se temelji na migraciji električki nabijenih čestica u uskoj kapilari prema jednoj od elektroda pod djelovanjem električnog polja visokog potencijala. Metodu karakterizira brza primjena uz jednostavne korake pročišćavanja uzoraka, međutim, zbog relativno niske razine osjetljivosti, u analizi CPA se ove metode rijetko primjenjuju (Ostry i sur., 2018).

Tankoslojna kromatografija (TLC) je jedna od najznačajnijih analitičkih metoda u detekciji CPA. Zbog brze provedbe, niske cijene i lakoće identifikacije ciljnih spojeva, uspješno se

primjenjuje u određivanju ovog mikotoksina u hrani i hrani za životinje, pri čemu LOQ u većini istraživanja iznosi oko 20 ng/g (Lee i Hagler, 1991; Heperkan i sur., 2012; Ostry i sur., 2018). Zbog niske osjetljivosti i iskorištenja TLC metode, suvremena analitika mikotoksina se u velikoj mjeri oslanja na razvoj metoda tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti (HPLC) (Pleadin i sur., 2015). Većina kromatografskih metoda zahtijeva pažljivo provođenje koraka pripreme uzoraka, izolacije i odabir odgovarajućih otapala. U ekstrakciji CPA iz uzoraka koriste se različita otapala kao što su kombinacije zakiseljenog kloroforma, kloroforma i metanola ili otopine nekloriranih otapala (vodena otopina metanola, vodena otopina acetonitrila). Pritom se alkalna vodena komponenta koristi kako bi se toksin ekstrahirao u ioniziranom obliku, za razliku od zakiseljenog kloroforma kojim se toksin ekstrahira u neutralnom obliku (Ostry i sur., 2018). Kako bi se izbjegla upotreba halogenirajućih otapala, u posljednjem desetljeću porasla je primjena otapala acetonitril:voda ili metanol:voda (7:3, v/v) uz dodatak bikarbonata (Heperkan i sur., 2012). Zbog nestabilnosti



bilnosti CPA koja se povećava u prisutnosti mravlje kiseline i kisika, prilikom pročišćavanja i analize važno je spriječiti moguću adsorpciju mikotoksina na polipropilen. Standardne otopine CPA potrebno je pripremati u staklenom posuđu, uz dodatak vode i organskog otapala. Kako bi se spriječilo izlaganje CPA toplini i ambijentalnom zraku, posudu s otopinom standarda potrebno je napuniti do vrha, a askorbinska kiselina se može dodati u uzorak kako bi se smanjili gubici CPA tijekom postupka ekstrakcije (Ostry i sur., 2018). HPLC metode karakterizira visoka točnost, osjetljivost i preciznost u određivanju mikotoksina, a uspješno su primjenjene u određivanju CPA u različitim matriksima (Duran i sur., 2007; Oliveira i sur., 2008). Nakon što je otkriveno da se molekula CPA fotolizom može prevesti u fluorescirajuće stanje započele su se primjenjivati HPLC metode s fluorescentnim detektorom (FLD) koje se koriste u istovremenoj detekciji aflatoksina i CPA u fungalnim kulturama (Soares i sur., 2010). Ipak, učinkovite i pouzdane kvantitativne metode za analizu CPA u različitim matriksima hrane i hrane za životinje još uvijek nisu dovoljno razvijene (Ansari i Haubl, 2016).

Posljednjih se godina kromatografske metode u analitici mikotoksina sve više koriste u kombinaciji s detekcijom masenom spektrometrijom (MS) (Pleadin i sur., 2015). Primjena LC-MS/MS metoda za određivanje CPA podrazumijeva upotrebu vrlo male količine otapala za ekstrakciju, visoku osjetljivost i jednostavne korake pročišćavanja (Ostry i sur., 2018). Do sada razvijene LC-MS/MS metode u analizi CPA se međusobno razlikuju po odabiru otapala i detektora, a najniži LOQ od 0,5 µg/kg postignut je u istraživanju Ansari i Haubl (2016) na uzorcima sira s bijelom plemenitom plijesni. Kako bi se riješio problem matriks efekta koji je čest u analizi CPA te značajno utječe na kvantifikaciju analita, korišten je interni standard sa <sup>13</sup>C označenim atomima (Ansari i Haubl, 2016).

Primjena imunokemijskih metoda u određivanju CPA značajno je manja u odnosu na kromatografske metode. Glavni nedostatak u primjeni ELISA metode (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) i imunoafinitetnih kolona je komplicirani proces izolacije i detekcije, s obzirom da antitijela CPA nisu komercijalno dostupna (Ostry i sur., 2018). Maragos i sur. (2017) su razvili monoklonalna antitijela za detekciju CPA koja se mogu koristiti kao komponente biosenzora u istovremenoj detekciji više mikotoksina u kukuruzu. ELISA metodom pri određivanju CPA u kukuruzu postignut je LOQ od 5 µg/kg (Maragos i sur., 2017).

## Zaključci

Dosadašnja istraživanja CPA ukazuju na moguću visoku pojavnost ovog mikotoksina u različitoj hrani biljnog i životinjskog podrijetla, primarno u žitaricama, sušenom voću, siru i mesnim proizvodima. Toksikološka istraživanja CPA nisu detaljnije provedena, ali je utvrđeno da u pojedinim životinjskih vrsta ima tremorgeno, neurokemijsko i imunosupresivno djelovanje. Ujedno, dokazana zajednička pojavnost CPA i aflatoksina u hrani i hrani za životinje upućuje na moguće sinergističko djelovanje ovih mikotoksina. S obzirom da je CPA slabo istražen mikotoksin, nužna su daljnja istraživanja njegove toksičnosti, pojavnosti te sinergističkog učinka u organizmu. Potreban je daljnji razvoj suvremenih analitičkih metoda s niskim

limitima detekcije i kvantifikacije ovog mikotoksina, čime bi se omogućila provedba istraživanja pojavnosti CPA u različitim kategorijama hrane i hrane za životinje te u konačnici osigurala zaštita zdravlja ljudi i životinja.

## Zahvala

Ovaj rad je financirala Hrvatska zaklada za znanost projektom „Mikotoksini u hrvatskim tradicionalnim mesnim proizvodima: molekularna identifikacija plijesni producenata i procjena izloženost potrošača“ (IP-2018-01-9017).

## Literatura

- Alapont C., Lopez-Mendoza M.C., Gil J.V., Martinez-Culebras P.V. (2014) Mycobiota and toxigenic *Penicillium* species on two Spanish dry-cured ham manufacturing plants. *Food Additives & Contaminants Part A*, 31 93-104.
- Ansari P., Haubl G. (2016) Determination of cyclopiazonic acid in white mould cheese by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) using a novel internal standard. *Food chemistry*, 75 (2) 249-254.
- Bailly J.D., Guerre P. (2009) Mycotoxins in meat and processed meat products. U: F. Toldrá (ed.), *Food microbiology and food safety - Safety of meat and processed meat*, (pp. 83-124). New York: Springer.
- Burdock G.A., Flamm W.G. (2000) Safety Assessment of the Mycotoxin Cyclopiazonic Acid. *International Journal of Toxicology*, 19 195-218.
- Chang P.K., Ehrlich K.C., Fujii I. (2009) Cyclopiazonic Acid Biosynthesis of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus oryzae*. *Toxins*, 1 74-99.
- Diaz G.J., Thompson W., Martos P.A. (2010) Stability of cyclopiazonic acid in solution. *World Mycotoxin Journal*, 3 25-33.
- Dorner J.W., Cole R.J., Lomax L.G., Gosser H.S., Diener U.L. (1983) Cyclopiazonic acid production by *Aspergillus flavus* and its effects on broiler chickens. *Appl. Environ. Microbiol.*, 46 698-703.
- Duran R.M., Cary J.W., Calvo A.M. (2007) Production of cyclopiazonic acid, aflatrem, and aflatoxin by *Aspergillus flavus* is regulated by veA, a gene necessary for sclerotial formation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 73 1158-1168.
- EFSA (European Food Safety Authority) (2006) Minutes of the 18th Plenary Meeting of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), 12-14.10.2006, Parma, EFSA/CONTAM/493
- Fernandez Pinto V., Patriarca A., Locani O., Vaamonde G. (2001) Natural co-occurrence of aflatoxin and cyclopiazonic acid in peanuts grown in Argentina. *Food Additives & Contaminants*, 18:11 1017-1020.
- Gentles A., Smith E.E., Kubena L.F., Duffus E., Johnson P., Thompson J., Harvey R.B., Edrington T.S. (1999) Toxicological evaluations of cyclopiazonic acid and ochratoxin A in broilers. *Poultry Science*, 78 1380-1384.
- Goeger D.E., Riley R.T., Dorner J.W., Cole R.J. (1988) cyclopiazonic acid inhibition of the Ca<sup>2+</sup>-transport ATPase in



rat skeletal muscle sarcoplasmic reticulum vesicles. *Biochemical Pharmacology*, 37 978-981.

Haskins C.M., Knight D.W. (2005) A total synthesis of ( $\pm$ )- $\alpha$ -cyclopiazonic acid using a cationic cascade. *Chemical Communications*, 25 3162-3164.

Heperkan D., Somuncuoglu S., Karbancioglu-Guler F., Mecik N. (2012) Natural contamination of cyclopiazonic acid in dried figs and co-occurrence of aflatoxin. *Food control*, 23 82-86.

Holzappel C.W. (1968) The isolation and structure of cyclopiazonic acid, a toxic metabolite of *Penicillium cyclopium* Westling. *Tetrahedron*, 24 2101-2119.

Holzappel C.W., Hutchison R.D., Wilkins D.C. (1970) The isolation and structure of two new indole derivatives from *Penicillium cyclopium* Westling. *Tetrahedron*, 26 5239-5246.

Hymery N., Masson F., Barbier G., Coton E. (2014) Cytotoxicity and immunotoxicity of cyclopiazonic acid on human cells. *Toxicology in Vitro*, 28 940-947.

IARC (International Agency for Research on Cancer) (1993) Some naturally Occuring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to humans, Vol 56, IARC, Lyon.

Kozikowski A.P., Greco M.N.J., Springer J.P. (1984) Total synthesis of the unique mycotoxin  $\alpha$ -cyclopiazonic acid ( $\alpha$ -CPA): an unusual dimethylzinc-mediated replacement of a phenylthio substituent by a methyl group and a contrathermodynamic Raney nickel desulfurization reaction. *Journal of the American Chemical Society*, 106 6873-6874.

Kumar R., Balachandran C. (2009) Histopathological changes in broiler chickens fed aflatoxin and cyclopiazonic acid. *Veterinarski Arhiv*, 79 31-40.

Lansden J.A., Davidson J.I. (1983) Occurrence of cyclopiazonic acid in peanuts. *Applied and Environmental Microbiology*, 45 (3) 766-769.

Le Bars J. (1979) Cyclopiazonic acid production by *Penicillium camemberti* Thom and natural occurrence of this mycotoxin in cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 38 1052-1055.

Lee Y.J., Hagler W.M. (1991) Aflatoxin and Cyclopiazonic Acid Production by *Aspergillus flavus* Isolated from Contaminated Maize. *Journal of Food Science*, 56 (3) 871-872.

Malekinejad H., Akbari P., Allymehr M., Hobbenaghi R., Rezaie A. (2011) Cyclopiazonic acid augments the hepatic and renal oxidative stress in broiler chicks. *Human and Experimental Toxicology*, 30 910-919.

Maragos C.M., Sieve K.K., Bobell J. (2017) Detection of cyclopiazonic acid (CPA) in maize by immunoassay. *Mycotoxin Research*, 33 157-165.

Moncoq K., Trieber C.A., Young H.S. (2007) The molecular basis for cyclopiazonic acid inhibition of the sarcoplasmic reticulum calcium pump. *Journal of Biological Chemistry*, 282 9748-9757.

Morrissey R.E., Cole R.J., Dorner J.W. (1984) The effects of cyclopiazonic acid on pregnancy and fetal development of Fisher rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 14 585-594.

Muratake H., Natsume M. (1985) Total synthesis of ( $\pm$ )- $\alpha$ -cyclopiazonic acid. *Heterocycles*, 23 1111-1117.

Norred W.P., Morrissey R.E., Riley R.T., Cole R.J., Dorner J. (1985) Distribution, excretion and skeletal muscle effects of the mycotoxin 14C-cyclopiazonic acid in rats. *Foods and Chemical Toxicology*, 23 1069-1076.

Oliveira C.A.F., Sebastião L.S., Fagundes H., Rosim R.E., Fernandes A.M. (2008) Aflatoxins and cyclopiazonic acid in feed and milk from dairy farms in São Paulo, Brazil. *Food Additives & Contaminants: Part B: Surveillance*, 1:2 147-152

Ostry V., Toman J., Grosse Y., Malir F. (2018) Cyclopiazonic acid: 50th anniversary of its discovery. *World Mycotoxin Journal*, 11 (1) 135-148.

Peromingo B., Rodriguez M., Nunez F., Silva A., Rodriguez A. (2018) Sensitive determination of cyclopiazonic acid in dry-cured ham using a QuEChERS method and UHPLC-MS/MS. *Food Chemistry*, 263 275-282.

Pleadin J., Frece J., Markov K. (2017) Utjecaj postupaka prerade na transformaciju i smanjenje koncentracije mikotoksina u određenim skupinama hrane. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition*, 12 (1-2) 4-13.

Pleadin J., Frece J., Vasilj V., Markov K. (2015) Fuzarijski mikotoksini u hrani i hrani za životinje. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition*, 10 (1-2) 6-13.

Pleadin J., Zdravec M., Perši N., Vulić A., Jaki V., Mitak M. (2012) Mould and mycotoxin contamination of pig feed in northwest Croatia. *Mycotoxin Research*, 28 157-162.

Purchase I.F.H. (1971) The acute toxicity of the mycotoxin cyclopiazonic acid to rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 18 114-123.

Rao L.B., Husain A. (1985) Presence of cyclopiazonic acid in kodo millet (*Paspalum scrobiculatum*) causing kodo poisoning in man and its production by associated fungi. *Mycopathologia*, 89 177-180.

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.

Smith E.E., Kubena L.F., Braithwaite C.E., Harvey R.B., Phillips T.D., Reine A.H. (1992) Toxicological evaluation of aflatoxin and cyclopiazonic acid in broiler chickens. *Poultry Science*, 71 1136-1144.

Soares C., Rodrigues P., Abrunhosa L., Venancio A. (2010) HPLC method for simultaneous detection of aflatoxins and cyclopiazonic acid. *World Mycotoxin Journal*, 3 225-231.

Zhurakovskiy, O., Turkmen, Y.E., Loffler, L.E., Moorthie, V.A., Chen, C.C., Shaw, M.A., Crimmin M.R., Ferrara M., Ahmad M., Ostovar M., Matlock J.V., Aggarwal V.K. (2018) Enantioselective Synthesis of the Cyclopiazonic Acid Family Using Sulfur Ylides. *Angewandte Chemie*, 57 (5) 1346-1350.