

ZNANSTVENO MIŠLJENJE

O ergot alkaloidima u hrani i hrani za životinje

Donositelj znanstvenog mišljenja (sukladno članku 7. st. 3. ovoga Pravilnika)

(Zahtjev HAH – Z – 2016 – 3)

Usvojeno 31. svibnja 2017.

ČLANOVI ZNANSTVENOG ODBORA

- prof.dr.sc. Jasna Bošnjir, NZZJZ "Dr. Andrija Štampar" – predsjednica Znanstvenog odbora
- prof.dr.sc. Tomislav Klapac, PTF, Osijek – zamjenik predsjednice
- prof.dr.sc. Helga Medić, PBF, Zagreb
- izv.prof.dr.sc. Jelka Pleadin, HVI, Zagreb
- prof.dr.sc. Zdravko Špirić, „Oikon“ d.o.o., Zagreb

KOORDINATOR IZ HAH-a

- Leonard Matijević, mag.nutr.

SAŽETAK

Ovo znanstveno mišljenje govori o trogodišnjem istraživanju ergot alkaloida i ergot sklerocija koje je Hrvatska agencija za hranu (HAH) provela od 2014. do 2016. god. na različitim vrstama uzoraka podrijetlom iz Republike Hrvatske (RH). Naime, prema Uredbi Komisije 2015/1940, državama članicama se preporučuje da prate prisutnost ovih alkaloida te da o rezultatima obavijeste Europsku agenciju za sigurnost hrane (EFSA).

Ukupno je uzorkovano 80 uzoraka, od toga 65 uzoraka hrane i 15 uzoraka hrane za životinje. Svi uzorci su analizirani na 6 glavnih ergot alkaloida i njihovih –*inin* epimera (rezultati prikazani kao njihov zbroj, kako se i navodi u Uredbi 2015/1940). Na ergot sklerocije je ukupno vizualno analizirano 28 uzoraka (sve raž). U 36 % uzoraka su pronađeni ergot sklerociji s prosječnim udjelom od 0,0242 g/kg (uključujući sve uzorke), s najvećim pojedinačnim udjelom od 0,25 g/kg što znači da su svi uzorci bili ispod NDK vrijednosti od 0,5 g/kg prema Uredbi 2015/1940. U 62 % uzoraka je kvantificiran barem jedan ergot alkaloid, a prosječna koncentracija na temelju svih uzoraka je bila 136 µg/kg, uz najveću zabilježenu vrijednost od 1816 µg/kg u uzorku zrna raži. Rezultati korelacije između pojavnosti ergot sklerocija u uzorku i koncentracije ergot alkaloida, nisu bili dovoljni da se uspostavi uzročno – posljedična veza između ove dvije pojave.

Najveća koncentracija kod gotovih proizvoda je zabilježena u kruhu od raži i pšenice u iznosu od 80,6 µg/kg te je iskorištena za procjenu rizika. Zaključeno je da bi osoba od 70 kg bila u riziku od akutne toksičnosti kada bi dnevno pojela više od 870 g kruha od raži i pšenice, a u riziku od kronične toksičnosti kada bi takav proizvod svakodnevno jela u količinama većim od 520 g. Osim akutne toksičnosti, rađena je realnija procjena rizika i za kroničnu toksičnost te je u obzir uzeta prosječna koncentracija ergot alkaloida u svim proizvodima iz kategorije kruha i peciva, kao i koncentracija na 95. percentili. S obzirom na podnošljivi dnevni unos (*engl. Tolerable daily intake, TDI*) od 0,6 µg/kg, zaključeno je da bi osoba od 70 kg trebala dnevno jesti preko 1240 g kruha s prosječnim koncentracijama ergot alkaloida te preko 610 g kruha s visokim koncentracijama (na 95. percentili) da bi dosegla puni TDI. Samim time je zaključeno da je rizik po zdravlje ljudi nizak.

KLJUČNE RIJEČI

Ergot alkaloidi, ergot sklerociji, glavica raži, ergotizam, procjena rizika

SUMMARY

This scientific opinion is about three-year study on ergot alkaloids and sclerotia conducted by Croatian Food Agency (HAH) from 2014 to 2016 in different types of samples from Croatia. According to Commission Regulation 2015/1940, Member States are recommended to monitor the presence of these alkaloids and to inform European Food Safety Authority (EFSA) about the results.

In total, 80 samples (of which 65 food samples and 15 feed samples) were analyzed on 6 main ergot alkaloids and their corresponding *-inine* epimers (results are shown as the sum, according to Regulation 2015/1940). In total 28 samples were visually analyzed on ergot sclerotia (all rye samples). Ergot sclerotia were found in 36 % of the samples with an average content of 0,0242 g/kg (including all samples) and with a max. of 0,25 g/kg, which means that all the samples were below the maximum permitted levels of 0,5 g/kg according to Regulation 2015/1940. At least one of the ergot alkaloid was quantified in 62 % of the samples and the mean concentration on the basis of all samples was 136 mg/kg, with the max. recorded concentration of 1816 mg/kg in a rye sample. Results of correlation between the incidence of ergot sclerotia in a sample and the concentration of ergot alkaloids, were not sufficient to establish a cause – effect relationship between these two phenomena.

The highest concentration in the final product was observed in rye and wheat bread in the amount of 80,6 mg/kg and was used for risk assessment. It was concluded that a person of 70 kg b.w. will be at risk of acute toxicity if would daily eat more than 870 g of this foodstuff and at risk of chronic toxicity if would daily eat more than 520 g. In addition to acute toxicity, more realistic risk assessment was made for chronic toxicity and for that reason, mean concentration of ergot alkaloids in all products in the category of bread and rolls, as well as the concentration on the 95th percentile was taken into consideration. With regard to the tolerable daily intake (TDI) of 0,6 mg/kg, it was concluded that a person of 70 kg b.w. could daily eat over 1240 g of bread and rolls with average concentration of ergot alkaloids and over 610 g with high concentration (on the 95th percentile) in order to reach full TDI. Therefore it was concluded that the risk to human health is low.

KEY WORDS

Ergot alkaloids, ergot sclerotia, ergot, ergotism, risk assessment

ZAHVALE

Hrvatska agencija za hranu zahvaljuje članovima Znanstvenog odbora na doprinosu u izradi ovog znanstvenog mišljenja.

SADRŽAJ

SAŽETAK	2
SUMMARY	3
ZAHVALE	4
UVOD	6
PROCJENA RIZIKA.....	8
1. Identifikacija opasnosti	8
Fizikalno – kemijske karakteristike ergot alkaloida	9
Životni ciklus gljivice raži (<i>Claviceps purpurea</i>)	9
Ergot alkaloidi kroz povijest.....	11
Toksikokinetika	12
Toksikodinamika	13
Primjena ergot alkaloida kao lijekova i toksikološki podaci	15
Oblici djelovanja	15
2. Karakterizacija opasnosti	17
Procjena doze i odgovora	17
Dobivanje vrijednosti koje se odnose na zaštitu zdravlja.....	18
Zakonska regulativa	19
3. Procjena izloženosti	22
Provedba istraživanja o ergot alkaloidima i ergot sklerocijama u RH	22
Opis analitičke metode	22
Rezultati istraživanja	24
4. Karakterizacija rizika	36
ZAKLJUČCI	37
PREPORUKE	39
LITERATURA (REFERENCE)	40
DODACI.....	43

UVOD

Ergot alkaloidi su produkti gljivica raznih rodova od kojih je u Europi najrasprostranjenija vrsta *Claviceps purpurea* (glavnica ili glavica raži¹). Glavnica raži, kako joj i samo ime kaže, najviše napada raž, a može i ostale žitarice kao što su: pšenica, pšenoraž (tritikale), ječam, proso i zob, odnosno sve skupa više od 400 biljnih vrsta. U oboljeloj biljci, glavica raži zamjenjuje zdrava zrna s crnom, srpastom tvorevinom (tzv. sklerocijem) koja u sebi sadržava ergot alkaloida. Sklerocij od *Claviceps* vrsta se naziva ergot te otuda i ime za ovu vrstu alkaloida. Poznato je preko 50 ergot alkaloida, a posebno se prate ergot alkaloidi *Claviceps purpureae*: ergometrin, ergotamin, ergozin, ergokristin, ergokriptin (koji je mješavina α - i β - izomera), ergokornin te njihovi odgovarajući –*inin* epimeri (EFSA, 2012).

Fiziološki učinci ergot alkaloida poznati su od davnina gdje su, uslijed konzumacije kontaminiranih žitarica, brašna i kruha, bila česta masovna trovanja. Prilikom konzumacije manjih količina kontaminiranih žitarica, dolazi do probavnih smetnji. Veće količine uzrokuju ergotizam, bolest koja se manifestira halucinacijama, bolovima te snažnim vazokonstrikcijama, koje naposljetku dovode do pojave suhe gangrene te odumiranja udova. U najgorem slučaju može doći do zatajenja bubrega i srca te samim time i smrtnih posljedica. Kod trudnica može izazvati pobačaj. Ni životinje nisu imune na ergotizam te su zabilježena trovanja domaćih životinja: goveda, konja, ovaca, svinja i peradi. Međutim, napredak znanosti i poboljšanja u primjeni agronomskih i tehnoloških mjera (prosijavanje uslijed kojeg se uklanja do 82 % ergot sklerocija, mljevenje i termička obrada) su iskorijenili izbijanje većih epidemija ergotizma u zadnjih nekoliko desetljeća (EFSA, 2005; 2012).

Tijekom 2010. i 2011. god. Europska agencija za sigurnost hrane (EFSA) u suradnji s nekoliko institucija provela je veliko istraživanje o ergot alkaloidima u određenim žitaricama i proizvodima od žitarica, a ukupno je sudjelovalo 13 zemalja Europske unije. Ergot alkaloidi su bili prisutni u više od polovice analiziranih uzoraka i to u količinama od 1 do 12 340 $\mu\text{g/kg}$ (Di Mavungu, 2011). Rezultati ove studije su poslužili kao temelj za procjenu rizika o ergot alkaloidima koju je EFSA provela 2012. god. (EFSA, 2012). Iako zaključci procjene rizika nisu ukazivali na zabrinutost po zdravlje ljudi niti životinja, rezultati istraživanja su ipak pokazali povećanu prisutnost ergot alkaloida u hrani i hrani za životinje te je izdana Preporuka Europske komisije od 15. ožujka 2012. o praćenju prisutnosti ergot alkaloida u hrani i hrani za životinje (2012/154/EU).

Zakonodavstvo EU, koje se primjenjivalo i u RH u vrijeme prije EFSA-ine procjene rizika, ali i nakon Preporuke 2012/154/EU, propisivalo je najveće dopuštene količine (NDK) za *Claviceps purpurea* i to samo za hranu za životinje u iznosu od 1000 mg/kg, za krmiva i krmne smjese koje se sastoje od nemljevenih žitarica s udjelom vlage od 12 % (Direktiva 2002/32/EZ Europskog parlamenta i vijeća od 7. svibnja 2002. o nepoželjnim tvarima u hrani za životinje, Pravilnik o nepoželjnim tvarima u hrani za životinje NN 80/10 i Pravilnik o nepoželjnim tvarima u hrani za životinje kojim se provode uredbe

¹ Korištena je terminologija kako je napisano u Uredbi 2015/1940

Europske komisije o izmjenama Direktive 2002/32/EZ Europskog parlamenta i vijeća od 7. svibnja 2002. o nepoželjnim tvarima u hrani za životinje NN 124/12). Nadalje, europskim i nacionalnim zakonodavstvom bili su propisani uvjeti i mogućnosti stavljanja na tržište sjemena žitarica, tj. maksimalni broj ergot sklerocija ili njihovih dijelova u uzorku (Direktiva Komisije 2009/74/EZ od 26. lipnja 2009. o izmjeni direktiva Vijeća 66/401/EEZ, 66/402/EEZ, 2002/55/EZ i 2002/57/EZ u pogledu botaničkih naziva bilja, znanstvenih naziva drugih organizama i nekih priloga direktivama 66/401/EEZ, 66/402/EEZ i 2002/57/EZ u svjetlu razvoja znanstvenih i tehničkih spoznaja, Pravilnik o stavljanju na tržište sjemena žitarice NN 83/09, 31/13). Međutim, ono što je predstavljalo problem bio je nedostatak egzaktnih podataka o korelaciji između prisutnosti ergot sklerocija i količine ergot alkaloida, s obzirom da se određene količine nalaze i u prašini pa se smatralo da donošenje NDK vrijednosti samo za ergot sklerocije ne bi bilo dovoljno za zaštitu ljudi.

Podaci, koji su bili prikupljeni na osnovu Preporuke 2012/154/EU, rezultirali su donošenjem Uredbe Komisije (EU) 2015/1940 od 28. listopada 2015. o izmjeni Uredbe (EZ) br. 1881/2006 u pogledu najvećih dopuštenih količina ergot sklerocija glavnice raži na određenim neprerađenim žitaricama te odredaba o praćenju i izvješćivanju kojom se propisuju najveće dopuštene količine ergot sklerocija za neprerađene žitarice, osim kukuruza i riže, a koje iznose do 0,5 g/kg. Ovom Uredbom se propisuje i koje točno kategorije hrane treba uzorkovati i analizirati na prisutnost ergot alkaloida, međutim nije uspostavljen NDK po pitanju ergot alkaloida niti za jednu kategoriju (to se planira napraviti do 01. srpnja 2017. god.).

Hrvatska agencija za hranu (HAH) od nadležnog Ministarstva zdravlja dobila je 2014. prijedlog da se u RH provede istraživanje o prisutnosti ergot alkaloida u određenim žitaricama u skladu s Preporukom 2012/154/EU. Prijedlog je usvojen na konstituirajućoj sjednici Znanstvenog odbora za kemijske opasnosti HAH-a, održanoj u veljači 2014. god. Iste je godine provedeno pilot istraživanje na ukupno 30 uzoraka prehrambenih poluproizvoda i proizvoda na 6 glavnih ergot alkaloida i njihovih –*inin* epimera. Ovo pilot – istraživanje poslužilo je da se utvrdi pojavnost ergot alkaloida u proizvodima od raznih žitarica koji su namijenjeni krajnjem potrošaču. U 2015. god. je provedeno drugo po redu istraživanje, ovaj puta na nešto više uzoraka sirovine gdje se pokušala ispitati i povezanost između pojave ergot alkaloida i ergot sklerocija. Cjelokupni projekt produžen je i na treću godinu zaredom te je u 2016. god. provedeno završno istraživanje koje je obuhvatilo samo uzorke zrna raži (sirovina), uz pokušaj detaljnijeg utvrđivanja korelacije između pojavnosti ergot alkaloida i ergot sklerocija. Podaci od svih godina istraživanja poslani su u EFSA-u, kao doprinos europskoj bazi podataka u svrhu donošenja prijedloga za NDK za ergot alkaloida u pojedinim namirnicama.

U ovoj znanstvenom mišljenju biti će prikazani rezultati istraživanja iz sve tri godine.

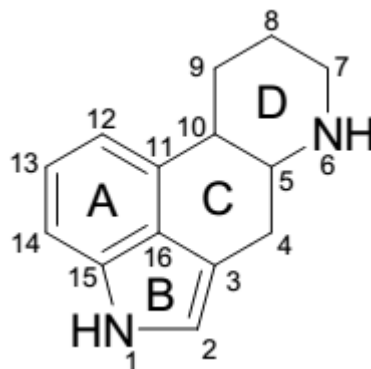
PROCJENA RIZIKA

1. Identifikacija opasnosti

Većina ergot alkaloida, koji su prisutni u prirodi, pokazuju tetraciklički ergolinski sustav prstena (**Slika 1**). U ovom znanstvenom mišljenju govori se o sljedećih 6 glavnih ergot alkaloida i njihovih *-inin* epimera koje je Europska komisija uvrstila u zakonodavstvo:

- ergokristin/ergokristinin
- ergotamin/ergotaminin
- ergokriptin/ergokriptinin
- ergometrin/ergometrinin
- ergozin/ergozinin
- ergokornin/ergokorninin

U **Dodatku 1** ovog znanstvenog mišljenja nalaze se kemijske strukture, kao i CAS brojevi te molekulske mase ovih ergot alkaloida i njihovih *-inin* epimera. Uz ove, do sada je identificirano više od 50 različitih ergot alkaloida, a njihov ukupni broj, kao i pojavnost, variraju između sojeva gljivica, geografskog položaja te biljke domaćina (EFSA, 2012).



Slika 1: Ergolinski sustav prstena s numeracijom i rasporedom prstena

Ergot alkaloidi su podijeljeni u 4 glavne grupe na temelju supstitucija na C-8 atomu:

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

Fizikalno – kemijske karakteristike ergot alkaloida

Čisti ergot alkaloidi tvore bezbojne kristale koji su topljivi u organskim otapalima kao što su acetonitril, metanol ili u smjesama organskih otapala i pufera. Neki ergot alkaloidi (posebno oni iz skupine jednostavnih derivata lizergične kiseline i ergoklavini) su do neke mjere topljivi i u vodi. Ergot alkaloidi su pozitivno nabijeni pri niskim te bez naboja pri neutralnim i visokim pH-vrijednostima (EFSA, 2012).

$\Delta^{9,10}$ – ergoleni su podložni epimerizaciji u odnosu na asimetriju pri atomu C-8. $\Delta^{9,10}$ – dvostruka veza više podliježe preraspodjeli putem enolizacije gdje je ovaj proces pojačan pomoću vodene otopine pri niskim ili visokim pH-vrijednostima. Omjer izvornog ergot alkaloida i njegovog *-inin* epimera prvenstveno se određuje na osnovu prirode odgovarajućih ostataka amida koji su prisutni u reakciji. Ovaj omjer, promatran u uzorku ili ekstraktu hrane, može značajno varirati zavisno od strukture ergot alkaloida, uvjeta skladištenja, izloženosti svjetlu, ekstrakciji ili analitičkoj metodi koja se primjenjuje. Potonje je bilo naglašeno u studiji koju je proveo BfR (BfR, 2010). Dokazano je da unutar jednog laboratorija rad s uzorkom od strane različitih zaposlenika tog istog laboratorija ima utjecaj na omjer svakog para ergot alkaloida i njegovog epimera, dok se suma oba epimerna oblika nije mijenjala. Iz tog razloga kvantitativni analitički pristup uvijek treba pokriti oba C8 – epimera svakog ergopeptida.

Kada ih se drži u smeđim staklenim bočicama pri sobnoj temperaturi, svi glavni ergopeptidni ergot alkaloidi *C. purpureae* (ergozin, ergotamin, ergokornin, α -ergokristin, ergokristin) su stabilni u kloroformu s obzirom na epimerizaciju i degradaciju. Za sva ostala otapala ili mješavine otapala u kojima se testirala postojanost, uočene su različite razine epimerizacije na C-8 atomu i/ili degradacije pojedinačnih ergopeptid ergot alkaloida. S druge strane, ergometrin, jednostavni derivat lizergične kiseline, nije pokazao gotovo nikakvu epimerizaciju u ergometrinu pri testnim uvjetima (EFSA, 2012).

Životni ciklus gljivice raži (*Claviceps purpurea*)

Ova gljivica svoj životni ciklus započinje kao askospora nastanivanjem na biljku domaćina te se ubraja u obligatne parazite. Na druge biljke se prenosi izravnim kontaktom, vjetrom, kapljicama vode ili kukcima. Najčešće parazitira na raži i pšenici gdje se u klasu na tom mjestu ne razvija pšeno, već tamni roščić, tzv. ergot sklerocij (**Slika 2**), koji najčešće i sadržava ergot alkaloida.



Slika 2 Ergot sklerociji na klasu ječma, pšenice i raži

Ergot sklerocij je najčešće dužine između 1 i 3,5 cm te širok oko 0,3 cm (**Slika 3**). Unutar ergot sklerocija, dobro zaštićena debelom stjenkom, nalazi se kompaktna masa micelija koja obično u zimskom razdoblju otpadne s biljke domaćina te tako zaštićena čeka pogodno vrijeme za rast. Dolaskom toplijeg vremena, kada se i ostala vegetacija počinje buditi, ergot sklerocij proizvodi sitne strome koje nose peritecij. Pošto se radi o sitnim tvorevinama, teško ih je uočiti u zemlji (**Slika 4 i 5**). Nakon izgradnje peritecija, razvijaju se askospore koje se u povoljnim uvjetima izbacuju kroz peritecij te dalje rasprostranjuju zrakom, usađujući se na nove domaćine zatvarajući životni ciklus (Brajdić, 2014).



Slika 3 Ergot sklerocij pronađen na raži i odvojen od zdravog zrnja



Slika 4 Stroma ergot sklerocija u zemlji



Slika 5 Strome ergot sklerocija

Ergot alkaloidi kroz povijest

Sama riječ „ergot“ vuče podrijetlo iz francuskog jezika gdje označava „stražnji prst“ (ostrugu ili mamuzu) na odraslom pijetlu, kojem ergot sklerocij sličí. Bolest koja se najviše vezala uz ergot alkaloida u prošlosti je poznata pod pojmom *ergotizam*. Ova bolest je bila česta uslijed primjene primitivnih agronomskih i poljoprivrednih mjera. Naime, prilikom žetve je često dolazilo do kontaminacije zdravog zrnja s ergot sklerocijem, a prema nekim zapisima, u određenim uvjetima je sklerocij mogao sačinjavati do četvrtine ukupne žetve. Fizičkom odvajanju ergot sklerocija od ostatka zrnja nije se pridavala velika pažnja te je zajedno sa zdravim dijelovima završavao u brašnu i ostalim proizvodima gdje ga više nije bilo moguće mehanički odvojiti (EFSA, 2012).

Sam ergotizam manifestirao se na dva načina: gangrenozno i konvulzivno. U nekim slučajevima su mogla biti zastupljena oba slučaja. Povijesno gledano, gangrenozni ergotizam je bio istaknutiji te je bio odgovoran za teško stanje poznato i kao „vatra svetog Antuna“. U ovoj užasnoj manifestaciji vazokonstrikcije uzrokovane ergot alkaloidima, udovi i prsti bivali su otečeni i upaljeni uslijed čega su žrtve osjećale veliku vrućinu i žarenje (*lat. ignis sacer*, „sveta vatra“) te se takvo stanje smatralo božjom kaznom. Unutar nekoliko tjedana došlo je do razvoja gangrene gdje su upaljeni udovi i ekstremiteti postajali nekrotični i na kraju otpali (Brajdić, 2014; EFSA, 2012).

Gledajući još dalje u prošlost, smatra se da prvi zapisi o ergot sklerocijama datiraju iz drevne Asirije gdje se spominju „štetni mjehurići na klasu žita“. Drevni Egipćani su također bili svjesni bolesti uzrokovane konzumacijom određenih žitarica koje uzrokuju i konvulziju i halucinacije (Brajdić, 2014).

Prva velika epidemija u Europi uzrokovana ergot alkaloidima datira iz 9. stoljeća. Epidemije ergotizma su zabilježene u Francuskoj u 11. stoljeću gdje su se počele graditi bolnice za pomoć oboljelima. Bolnice su bile posvećene sv. Antunu i otuda ime za ovu bolest. Još jedna zanimljivost vezana za ovu bolest veže se za poznate slučajeve suđenja „vješticama iz Salema“ u 17. stoljeću kada se konvulzivni ergotizam pripisivao činovima vještica. U tim slučajevima, oboljeli su patili od grčevitih napadaja, osjećaja štipanja, bockanja i grizenja, a kako je lizergična kiselina prekursor danas poznatijoj halucinogenoj drogi LSD-u, česta su bila ukazanja utvara i demona (Brajdić, 2014; Wolf, 2000).

U 18. stoljeću u Engleskoj su bile zabilježene epidemije, iako su tamo bile rjeđe nego u ostatku Europe. U Rusiji je ergotizam također u prošlosti predstavljao veliki javnozdravstveni problem pogotovo u razdobljima kada je vladala glad, a kada se uslijed nemogućnosti izbora, konzumiralo i zaražene žitarice (Brajdić, 2014.).

Unatoč današnjem znanju i primjeni odgovarajućih agrotehnoloških mjera i u 20. stoljeću je bilo zabilježeno nekoliko epidemija, a zadnja poznata se dogodila 2001. god. u Etiopiji. Naime, radilo se o konzumaciji ječma koji je sadržavao zaraženu divlju zob. Od 18 prijavljenih pacijenata, 3 su umrli, a djeca su bila glavne žrtve. Kasnijim analizama je utvrđeno da su se koncentracije ergot alkaloida (ergotamina i ergometrina) kretale od 2.1 do 26.6 mg ergotamina/kg te od 0.9 do 12.1 mg ergometrina/kg (EFSA, 2012).

Toksikokinetika

Toksikokinetika nije detaljnije proučavana za većinu ergot alkaloida prisutnih u prirodi. O djelovanju ergometrina i ergotamina na ljude, postoje podaci zbog njihove primjene kao lijekova (o čemu će biti govora nešto više pod podnaslovom **Primjena ergot alkaloida kao lijekova i toksikološki podaci**).

Oralni unos ergot alkaloida je općenito povezan s lošom apsorpcijom jer je podložan opsežnom metabolizmu prvog prolaza kroz jetru. Nepredvidiva, nepotpuna i spora apsorpcija ergotamina se odvija u gastrointestinalnom traktu nakon oralnog unosa uz 60 %-tnu apsorpciju gdje najveću koncentraciju u plazmi dostiže između 1 i 2.7 sati nakon oralnog unosa. Ergometrin se pak brzo apsorbira nakon oralnog unosa (Pillay, 2013, EFSA 2012). Kod preživača je uočeno da se većina apsorpcije odvija u predželucima uz različit postotak učinkovitosti, zavisno od ergot alkaloida (jednostavni ergot alkaloidi lizergične kiseline su se učinkovitije apsorbirali od ergopeptid alkaloida) (EFSA, 2012).

Nakon apsorpcije, ergot alkaloidi se brzo distribuiraju u tijelu, a poluživot distribucije uvelike se razlikuje od pojedinca do pojedinca. S druge strane, malo se zna o ciljnim mjestima distribucije unutar tijela. U jednoj studiji veća je radioaktivnost zabilježena u jetri, plućima, bubrezima i srcu, nego u krvi, dva sata nakon unosa ergot alkaloida (Kalberer, 1970). Također, u jednoj *in vitro* studiji tri ergot alkaloida i njihova epimera [ergometrin(in), ergotamin(in) i ergokristin(in)] su pokazali potencijal za prelazak krvno-moždane barijere (Mulac i sur., 2012). Postoje pojedini dokazi za domaće životinje koji ukazuju da se ergopeptini mogu u manjoj mjeri taložiti i u masnom tkivu (EFSA, 2012).

Za metabolizam ergot alkaloida postoji malo podataka, čak i za one koji se koriste u medicinske svrhe. Smatra se da nakon oralnog unosa više od 90 % apsorbiranog ergotamina biva izloženo metabolizmu prvog prolaza. Novije su studije pokazale da su ergot alkaloidi podložni oksidativnim metaboličkim putevima, najčešće katalizirani citokromom P450 3A4, uz konjugaciju do glukuronske kiseline. Kod preživača, mikroflora predželudaca može igrati različite uloge u metaboličkoj sudbini ergot alkaloida. S jedne strane, fermentacija u predželucima može osloboditi ergot alkaloida iz biljnog tkiva i

pri tome povećati njihovu ukupnu količinu dostupnu za apsorpciju. S druge strane, mikroflora predželudaca učinkovito degradira ergopeptine do lizergične kiseline (EFSA, 2012).

Nakon metabolizma ergot alkaloida u jetri, izlučivanje putem žuči predstavlja glavni put eliminacije ergotamina i njegovih metabolita. I u ovom slučaju preživači imaju drugačiju toksikokinetiku jer se kod njih većina ergot alkaloida izlučuje putem mokraće (EFSA, 2012).

Toksikodinamika

Za određivanje LD₅₀ doza, EFSA je u svojoj procjeni rizika (EFSA, 2012) u obzir uzela studiju Griffitha i sur. iz 1978. god. u kojoj je određeno nekoliko LD₅₀ doza za nekoliko ergot alkaloida prisutnih u prirodi, kao i za nekoliko sintetskih. Studija je napravljena na miševima, štakorima i zečevima oba spola koji su ergot alkaloidima bili izloženi oralno, intravenozno i subkutano. Testirani alkaloidi prisutni u prirodi pokazali su nisku oralnu, akutnu toksičnost, a također, oralne LD₅₀ doze su uvijek bile veće od intravenoznih kod iste životinjske vrste što ukazuje na niski stupanj apsorpcije te visoki metabolizam prvog prolaza kroz koji ergot alkaloidi prolaze nakon oralnog unosa. Osim toga, zabilježene su bile i razlike u osjetljivosti između životinjskih vrsta gdje su zečevi bili najosjetljiviji (EFSA, 2012).

Subletalna, akutna izloženost ergot alkaloidima dovodi do znakova neurotoksičnosti kod sisavaca koji se očituju u nemirnosti, miozi ili midrijazi (suženju ili povećanju zjenice oka), slabosti mišića, drhtavici i krutosti. Nadalje, uočena je i gangrena koja se pojavila na repu štakora 5 - 7 dana nakon jednokratne intraperitonealne aplikacije 25 mg ergotoksina/kg t.m. (smjese ergokornina, α - i β -ergokriptina i ergokristina). U **Tablici 1** prikazane su vrijednosti LD₅₀ doza pri oralnom unosu ergometrina i ergotamina. Vidljive su jasne razlike u osjetljivosti između pojedinih životinjskih vrsta (EFSA, 2012).

Tablica 1 Uspostavljene LD₅₀ doze na pojedinim životinjskim vrstama

Tvar	Životinjska vrsta	LD ₅₀ (mg/kg)
Ergometrin	Miš	460
	Štakor	671
	Zec	27,8
Ergotamin	Miš	3200
	Štakor	1300
	Zec	550

Što se tiče toksičnosti ponavljajućih doza, neke studije u kojima se ispitivao parenteralni unos, pokazale su da ponavljajući unos različitih ergot alkaloida uzrokuje vazokonstrikciju u nekim dijelovima tijela, kao što su repovi štakora, krijesta i podbradnjak kod pijetlova te dijelovi uha pasa i zečeva, koja ima za posljedicu ishemiju tih dijelova. Speijers i sur. (1992 i 1993) su hranili štakore s ergometrin tartaratom u različitim dozama kroz nekoliko mjeseci. Pri većim dozama je uočeno nekoliko promjena,

prvenstveno promjene tjelesne mase, težine unutarnjih organa i promjene njihovih funkcija te crvenilo repa uz nekrozu u nekim slučajevima. Također su uočene određene razlike u jačini ovih promjena među spolovima. Na temelju izostanka vazokonstrikcije na repu štakora, EFSA-in CONTAM odbor je zaključio da je NOAEL doza od 0.4 mg ergotamina/kg t.m./dan (EFSA, 2012).

Peters-Volleberg i sur. (1996) proveli su studiju u kojoj su hranili štakore sa sintetskim ergometrin maleatom. Jedina značajna promjena koju su autori uočili pri visokim dozama bila je na jetri (uz promjene u metabolizmu glikogena) te u razinama serumskog prolaktina. Na osnovu tih saznanja, autori su označili dozu od 0.8 mg ergometrin maleata/kg t.m./dan (što je ekvivalent 0.6 mg ergometrina/kg t.m./dan) kao NOAEL.

Promjene u tjelesnoj masi, masi pojedinih unutarnjih organa te u njihovoj funkciji, kao i promjene u razinama pojedinih hormona, uočene su u studiji Janssena i sur. (2000a i b). U ovim studijama NOAEL je bio na 0.3 mg α -ergokriptina/kg t.m./dan. Uz to, iz ovih studija moglo se zaključiti da ne postoji značajna kvantitativna razlika u toksičnosti između ergotamina, ergometrina i α -ergokriptina.

Ergot alkaloidi imaju nekoliko čvrsto dokazanih učinaka na reproduktivne procese uključujući: sprječavanje trudnoće ometajući implantaciju, embriotoksičnost, učinke na razvoj i inhibiciju laktacije. Osim ovih učinaka, postoje i određeni dokazi za inhibiciju ovulacije iz studije u kojoj su štakori subkutano bili izloženi 1 mg ergokornina. Griffin i sur. (1978) analizirali su učinke na reproduktivnom sustavu i zaključili da alkaloidi nemaju direktan toksični učinak, već da ometaju implantaciju inhibirajući otpuštanje prolaktina iz hipofize. Nadalje, u istoj studiji zaključeno je da najveći potencijal za ometanje implantacije nakon oralnog unosa ima ergokornin, zatim ergonin, ergotamin te ergometrin, a po pitanju mogućnosti uzrokovanja embrionalne smrti (također nakon oralnog unosa) najpotentniji je ergonin, zatim ergoalanin, ergovalin, ergozin, ergotamin te ergometrin. Zeilmacker i Carlsen (1962) prvi su dokazali hipotezu da ergot alkaloidi utječu na laktaciju i smanjeno izlučivanje prolaktina. Iako je studija Shaara i Clemensa (1972) dokazala izravno djelovanje ergokornina na hipofizu zbog inhibicije izlučivanja prolaktina, neke druge studije pokazale su da je indirektno djelovanje preko hipotalamusa također moguće te vjerojatno ergot alkaloidi mogu djelovati na obje ove žlijezde (Floss i sur., 1973). U oba slučaja, dopaminergična aktivnost ergot alkaloida vjerojatno je odgovorna za inhibiciju izlučivanja prolaktina, budući da dopamin sam po sebi inhibira izlučivanje prolaktina.

Uz iznimku ergotamina, na ostalim ergot alkaloidima prisutnim u prirodi provođene su jedino ograničavajuće studije genotoksičnosti. U *in vitro* studijama nije bila uočena mutagena aktivnost ergotamina. Neke rane studije su pokazale da ergotamin može imati neke štetne učinke na kromosomima u *in vitro*, ali i u *in vivo* uvjetima, iako su kasnije studije pokazale da su ti učinci slabi i nedosljedni. Po pitanju kancerogenosti, ne postoje studije dugoročne izloženosti ergometrina, ergotamina, ergozina, ergokornina, ergokriptina i ergokriptina te njihovih *-inin* epimera. CONTAM odbor je zaključio da dostupne informacije o genotoksičnosti i kancerogenosti ergot alkaloida ukazuju da su promatrani tumori kod štakora koji su hranjeni čistim ergotom ili ergotoksinom bili povezani s negenotoksičnim modelom djelovanja (EFSA, 2012).

Primjena ergot alkaloida kao lijekova i toksikološki podaci

Toksičnost ergot alkaloida dobro je poznata jer je, kako je već opisano, kroz povijest bilo zabilježeno nekoliko epidemija trovanja ljudi uslijed konzumacije zaraženih žitarica. S druge strane, dobro su poznati i pozitivni učinci po zdravlje ljudi, zato što 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 ergot alkaloida zbog bolje standardizacije, ali i zbog toga što se uočilo da nema smisla unositi „koktel“ ergot alkaloida jer imaju različite farmakološke učinke.

Ergotamin se često koristi u medicinske svrhe u obliku **ergotamin tartarata** za liječenje migrene i tzv. cluster glavobolje, a bilo je pokušaja liječenja i ortostatske hipotenzije (naglog pada tlaka nakon zauzimanja stajaleg položaja). Postoje točno propisane maksimalne dnevne, tjedne i mjesečne doze koje se ne smiju prekoračiti. Osim toga, te doze ne vrijede za trudnice i osobe koje koriste terapiju koja bi mogla biti u kontraindikaciji s ergometrin tartaratom. Štetne nuspojave se u prvom redu odnose na učinke na centralni živčani sustav ili na vazokonstrikciju krvnih žila te moguće stvaranje tromba. U slučaju prekoračenja propisanih doza, kod akutnog predoziranja može doći do mučnine, povraćanja, dijareje, ekstremne žeđi, osjećaja hladnoće, peckanja, svrbeži kože, brzog i slabog pulsa, promjena u krvnom tlaku, stanja šoka i na kraju stanja nesvijesti. Zabilježeni su i smrtni slučajevi uslijed respiratornog i cirkularnog zastoja. Kronična prekoračenja propisanih doza imala su za posljedicu trajne glavobolje te pojavu ergotizma (EFSA, 2012).

Ergometrin se pak u medicinske svrhe koristi kao **ergometrin maleat**. Ovaj spoj ima puno selektivnije djelovanje na maternicu, nego većina drugih ergot alkaloida, pogotovo na maternicu u puerperiju (periodu od 6 tjedana nakon poroda). Glavno djelovanje ergometrin maleata očituje se u uzrokovanju snažnih kontrakcija maternice, koje pri većim dozama mogu biti neprekidne, za razliku od oksitocina koji uzrokuje više fiziološki ritmičke kontrakcije. Ergometrin maleat koristi se za aktivno upravljanje trećom porođajnom dobi te radi sprječavanja ili liječenja postporođajnog ili postabortivnog krvarenja uzrokovanog atonijom (nemogućnosti stezanja) maternice. I za njega postoje točno propisane doze i režim uzimanja lijeka. Od štetnih nuspojava, kao najčešće, ističu se mučnina i povraćanje, a može doći i do bolova u trbušnoj šupljini, proljeva, glavobolje, vrtoglavice, zujanja u ušima, boli u prsima, drhtavice, bradikardije te drugih srčanih aritmija, sužavanja krvnih žila, srčanog infarkta te otežanog disanja (dispneje). Ergometrin maleat pokazuje manji potencijal za razvoj gangrene, nego ergotamin tartarat, ali su slučajevi ergotizma također zabilježeni, a simptomi akutnog trovanja su vrlo slični (EFSA, 2012).

Oblici djelovanja

Općenito gledajući, djelovanje ergot alkaloida je isto kao i većine drugih lijekova; oni su ligandi koji se vežu za određene receptore, konkretno na adrenergičke, serotonergičke i dopaminergičke receptore (EFSA, 2012). Drugim riječima, utječu na uloge koje hormoni adrenalina, 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 ergot alkaloida te adrenalina, serotonina i dopamina, ergot alkaloidi generalno 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 ergot alkaloida. Usprkos tomu, određene su neke općenite značajke, posebno u pogledu ergot alkaloida prisutnih u prirodi i polusintetskih ergot alkaloida koji se koriste kao lijekovi (EFSA, 2012).

Ergotamin se selektivno vezuje i aktivira tzv. serotonin (5-HT) 1D receptore koji se nalaze na krvnim žilama u području glave, uključujući i one na arteriovenskim anastomozama (mjestima na kojima se spajaju dva cirkulatorna sistema, odnosno mala arterija i njena prateća vena). To rezultira s vazokonstrikcijom i redukcijom protoka krvi u cerebralnim arterijama te može dovesti do olakšanja vaskularnih glavobolja u koje se ubrajaju migrena i cluster glavobolja. Ergotamin se također selektivno vezuje na tzv. alfa-adrenergične receptore te na taj način stimulira vaskularno glatko mišićje i uzrokuje vazokonstrikciju, kako u venama, tako i u arterijama, što također dovodi do ublažavanja glavobolja. Osim toga, aktivacija serotonin 1D receptora na završecima senzoričkih živčanih vlakana tzv. trogranog ili trigeminalnog živca (odgovornog za motoriku lica), sprječava otpuštanje neuropeptida koji uzrokuju upalne procese (pubchem.ncbi.nlm.nih.gov, 2005a).

Ergometrin izravno stimulira mišićje maternice u svrhu povećanja jačine i učestalosti kontrakcija. Unutar uobičajenih doza, ove kontrakcije prethode periodima relaksacije (opuštanja). Povećanjem doza, tonus maternice u stanju mirovanja (tzv. bazalni tonus) postaje povišen te se skraćuju periodi relaksacije. Kontrakcija zida maternice okolo oštećenih krvnih žila na placentarnom mjestu dovodi do hemostaze (procesa koji služi za zaustavljanje krvarenja). Ergometrin također inducira kontrakcije vrata maternice (cerviksa). Osjetljivost maternice na oksitocinski učinak je mnogo veća što se trudnoća bliži kraju. Oksitocinsko djelovanje ergometrina je veće, nego njegov vaskularni učinak. Ergometrin, kao i drugi ergot alkaloidi, proizvodi arterijske vazokonstrikcije stimulirajući alfa-adrenergične i serotonininske receptore te inhibirajući otpuštanje tzv. endotel-izvedenog faktora relaksacije. Manje je potentan vazokonstriktor, tj. manje suzuje krvne žile od ergotamina (pubchem.ncbi.nlm.nih.gov, 2005b).

2. Karakterizacija opasnosti

Procjena doze i odgovora

Različiti ergot alkaloidi mogu izazvati čitav niz različitih bioloških učinaka, zavisno o specifičnom afinitetnom profilu pojedinog ergot alkaloida na različite neuroreceptore, kako je prethodno opisano u tekstu.

Kada je CONTAM odbor razmatrao koji učinak ergot alkaloida označiti kao kritični, u obzir je uzeo nekoliko glavnih učinaka;

- smanjenje tjelesne mase je uočeno u mnogim studijama, a općenito je povezano sa smanjenim unosom hrane, što je pak najvjerojatnije povezano s dopaminergičkim učinkom ergot alkaloida
- smanjenje razine tiroksina (T4) u serumu uočeno je kod oba spola štakora nakon izlaganja ergometrinu (Peters-Volleberg i sur., 1996).
- smanjenje razine prolaktina u serumu uočeno je kod štakora u studiji subakutne izloženosti na α -ergokriptin (Janssen i sur., 2000b).

Međutim, kako su ovi rezultati učinaka bili neujednačeni, CONTAM odbor je zaključio da ih neće koristiti za uspostavljanje vrijednosti koje se odnose na zaštitu zdravlja (*engl. Health-based guidance values*, HBGV). Što se tiče učinaka koje ergot alkaloidi imaju na reproduktivne procese, oni su uočeni pri većim dozama, nego pri LOAEL dozama i to u studijama ponavljajućih doza. Odbacivši i ove učinke, CONTAM odbor je odlučio **vazokonstriktivni učinak na mišićnu atrofiju repa štakora** označiti kao kritični učinak koji će se koristiti za karakterizaciju opasnosti.

Podatke o ovom učinku dobili su iz studije subkronične izloženosti na ergotamin (Speijers i sur., 1993) te studije subakutne izloženosti na α -ergokriptin (Janssen i sur., 2000a, b). Pomoću tih podataka izračunali su najniži **BMDL₁₀** koji je iznosio **0.33 mg/kg t.m./dan** (EFSA, 2012).

Što se tiče terapijskih doza, oralna doza ergotamin tartarata u liječenju migrene ograničena je na maksimalni unos izražen kao ergotamin od 0,013 do 0,026 mg/kg .tm./dan. U slučaju prekoračenja, moguće su ozbiljne štetne nuspojave, kao što je periferna vazokonstrikcija. Prema starijoj literaturi, najveća ukupna, mjesečna, oralna doza ne smije biti veća od 0,253 mg/kg t.m.. Ako bi se ove doze nastavile uzimati i više od mjesec dana, mogu dovesti do trajne glavobolje. Isto tako, valja uzeti u obzir da i terapijske doze ispod maksimalno propisanih mogu biti povezane s nešto lakšim štetnim nuspojavama kao što su mučnina, povraćanje i bolovi u trbušnoj šupljini (EFSA, 2012).

Prekomjerni, redovni, oralni unos u vremenskom periodu od nekoliko mjeseci u količini od približno 0,3 mg ergotamina/kg t.m./dan tijekom perioda od 7 dana, dovodi do autonomne dizestezije (poremećaja osjeta dodira) kod žena koje boluju od migrene (EFSA, 2012).

Ovi podaci o odnosu između doze i odgovora nisu primjenjivi za pojedince s kontraindikacijama, posebno ne za trudnice ili dojilje zbog oksitocinskog djelovanja ergotamina, njegove inhibicije izlučivanja prolaktina (smanjenje laktacije) te mogućih štetnih učinaka (ergotizma) kod dojenčadi. Stoga, u obzir

treba uzeti da ergotamin pri oralnim dozama nižim od prethodno navedenih može dovesti do pojave štetnih učinaka, posebno u pogledu reproduktivne toksičnosti (EFSA, 2012).

Ergometrin maleat se propisivao u oralnim dozama od 0.2 do 0.4 mg (što je ekvivalent približno 0.15 do 0.30 mg ergometrina) do 4 puta na dan. Pri razmatranju doza, CONTAM odbor je pretpostavio da trudnice imaju prosječnu tjelesnu masu od 75 kg. To bi onda značilo da bi odgovarajuća doza bila od 0,008 do 0,016 mg ergometrina/kg t.m./dan, a koja bi prouzročila kontrakcije maternice. Najniža pojedinačna doza koja uzrokuje ovaj učinak je 0,002 mg/kg t.m., a lijek se može davati oralno u periodu od 2 do 7 dana (EFSA, 2012).

Dobivanje vrijednosti koje se odnose na zaštitu zdravlja

Genotoksični potencijal ergot alkaloida, osim ergometrina, nije se adekvatno istraživao. Dostupni podaci ne ukazuju na mutaciju bakterijskih stanica ili stanica sisavaca. Postoje određeni dokazi klastogenosti, ali podaci dobiveni iz *in vivo* studija nisu dosljedni. U dvogodišnjoj studiji o kancerogenosti, sirovi ergot sklerocij izazvao je neurofibrome na ušima pri 5 % i 2 %, ali ne i pri 1 % u prehrani, a neurofibromi su se smanjivali kada se ergot sklerocij više nije davao putem prehrane. Ovakva primjena ergot sklerocija, koji je uzrokovao neurofibrome na ušima, dovela je i do smanjenog dobivanja tjelesne mase. Pojavnost različitih vrsta tumora kod štakora koji su bili izloženi ergot sklerocijima (npr. limfosarkom u plućima te embrionalni sarkom bubrega) također je bila povećana u odnosu na štakore koji nisu bili izloženi. Izostanak i regresija karcinoma ukazuju na etiologiju povezanu s negenotoksičnim načinom djelovanja (EFSA, 2012).

Kako je već spomenuto, ergot alkaloidi djeluju na veliki broj neurotransmiterskih receptora, prvenstveno adrenergičkih, dopaminergičkih i serotoninskih receptora. Ova međudjelovanja s receptorima mogu rezultirati s akutnim, a također i s kroničnim učincima. Stoga je CONTAM odbor smatrao prikladnim uspostaviti akutnu referentnu dozu (ARfD), kao i podnošljivi dnevni unos (TDI) za ergot alkaloida (EFSA, 2012).

Prilikom ponavljajućih doza različitih ergot alkaloida, ovi učinci na receptore rezultiraju između ostalog s ishemijom, prvenstveno u ekstremitetima, kao što su repovi štakora, smanjenim dobivanjem tjelesne mase te promjenama u razinama nekih hormona. **Vazokonstrikcija** je označena kao kritični učinak te izabrana za dobivanje vrijednosti koje se odnose na zaštitu zdravlja (EFSA, 2012).

BMDL₁₀ je 0.33 mg/kg t.m./dan za pojavnost mišićne atrofije repa dobiven iz 13-tjedne studije na štakorima koji su hranjeni ergotaminom. Prilikom razmatranja ARfD-a, CONTAM odbor je zaključio da je potrebno koristiti faktor nesigurnosti od 3 zbog nedostataka podataka (npr. nepotpunih informacija o reproduktivnoj toksičnosti). Zajedno sa standardnim faktorom nesigurnosti od 100 za razlike unutar i između vrsta, CONTAM odbor primijenio je ukupni faktor nesigurnosti od 300 na BMDL₁₀ od 0.33 mg/kg t.m./dan i uspostavio **ARfD od 1 µg/kg t.m.** (zaokružen na cijeli broj) (EFSA, 2012).

Pri uspostavi TDI-a, CONTAM odbor je zaključio da je potrebno koristiti dodatni faktor nesigurnosti od 2 radi ekstrapolacije od subkroničnih do kroničnih studija. CONTAM odbor je primijenio

ukupni faktor nesigurnosti od 600 na BMDL₁₀ od 0.33 mg/kg t.m./dan te uspostavio **TDI od 0.6 µg/kg t.m.** (zaokruženo na jednu decimalu) (EFSA, 2012).

Pojedinačni ergot alkaloidi mogu pokazati različiti profil toksičnosti zbog razlika u vezanju na receptore, ali za one ergot alkaloida za koje postoje podaci, čini se da nema bitnije kvantitativne razlike u NOAEL/LOAEL i BMDL vrijednostima. Nažalost, ne postoji dovoljno odgovarajućih podataka o potentnosti većine ergot alkaloida koji se mogu pronaći u hrani unutar EU. Zbog potencijalnog djelovanja kroz iste receptore te zbog konverzije *–inin* oblika u reaktivnije *–in* oblike, CONTAM odbor je zaključio da je najbolje koristiti **grupni ARfD od 1 µg/kg t.m.** te **grupni TDI od 0.6 µg/kg t.m./dan za sumu 12 ergot alkaloida** koji su ispitivani i u ovom projektu, što pretpostavlja da imaju jednaki potencijal (EFSA, 2012).

Uspostavljeni grupni ARfD duplo je niži od najniže pojedinačne doze od 2 µg/kg t.m. ergometrina koja se koristi za poticanje kontrakcija maternice. Ova doza se koristila kao početna doza u terapijske svrhe te ako bi se pokazala preniska (bez učinka), davale su se ponavljajuće i/ili veće doze. CONTAM odbor je zaključio da je 2 µg/kg t.m. blizu NOAEL-a te da je granica između ovih doza kod osjetljivih grupa unutar populacije te grupnog ARfD-a, adekvatna (EFSA, 2012).

Najniža propisana doza ergotamina korištena u liječenju migrene (a koja nije pokazala uvjerljive dokaze farmakološke aktivnosti) je otprilike 10 do 20 puta veća nego grupni ARfD te 20 do 40 puta veća nego grupni TDI. Nadalje, grupni TDI je 13 puta manji od najveće preporučene doze ergotamina kad se isti koristi u terapijske svrhe (ta doza, prema medicinskoj literaturi, ne bi trebala premašivati 8 µg/kg t.m./dan tijekom perioda od 30 dana u svrhu izbjegavanja ozbiljnih štetnih nuspojava). Time je sigurnost uspostavljenih grupnih ARfD-a i TDI-a, koji su nekoliko puta niži od terapijskih doza, dodatno potvrđena (EFSA, 2012).

Zakonska regulativa

U svrhu zaštite zdravlja ljudi, u Uredbi EK 1881/2006 o kontaminantima u hrani, uspostavljene su najveće dopuštene količine (NDK) za mnoge kontaminante, ali ne i za ergot alkaloida. Stoga je Europska Komisija izdala Preporuku Europske komisije od 15. ožujka 2012. o praćenju prisutnosti ergot alkaloida u hrani i hrani za životinje (2012/154/EU). U njoj preporučuje državama članicama provođenje monitoringa na prisutnost ergot alkaloida u žitaricama i proizvodima od žitarica namijenjenih za prehranu ljudi, ali i hranidbu životinja, uz aktivno sudjelovanje subjekata u poslovanju s hranom i hranom za životinje. Preporučeno je ispitivati barem sljedeće ergot alkaloida i njihove *–inin* epimere: ergokristin/ergokristinin, ergotamin/ergotaminin, ergokriptin/ergokriptinin, ergometrin/ergometrinin, ergozin/ergozinin i ergokornin/ergokorninin. Prema istoj Preporuci, države članice istodobno trebaju utvrditi, gdje god je moguće, sadržaj ergot sklerocija u uzorku, radi unaprjeđenja znanja o odnosu između prisutnosti ergot sklerocija i koncentracije pojedinih ergot alkaloida.

Uredba komisije (EU) br. 1272/2009 od 11. prosinca 2009. o utvrđivanju zajedničkih detaljnih pravila za provedbu Uredbe Vijeća (EZ) br. 1234/2007 u pogledu otkupa i prodaje poljoprivrednih

proizvoda u okviru javne intervencije propisuje da bi žitarice bile prihvatljive za javnu intervenciju, „moraju biti zdrave, besprijekorne i tržišne kvalitete“. Ovi zahtjevi su ispunjeni ako žitarice nemaju neuobičajen miris i žive štetnike (uključujući grinje) u svakoj fazi razvoja, ako ispunjavanju određene minimalne zahtjeve u pogledu kvalitete te ako razine onečišćivača, uključujući radioaktivnost, ne prelaze najviše razine dopuštene zakonodavstvom Zajednice. Prethodno spomenuti minimalni zahtjevi u pogledu kvalitete su uspostavljeni i uključuju, između ostalog, najveće količine ergot sklerocija od 0.05 % u durum (tvrdoj) i običnoj pšenici, kao nečistoće koje se ne smiju nalaziti u žitaricama. NDK za ergot alkaloida ovom Uredbom 1272/2009 nije uspostavljen.

Nepoželjne tvari u hrani za životinje su regulirane Direktivom 2002/32/EZ Europskog parlamenta i vijeća od 7. svibnja 2002. o nepoželjnim tvarima u hrani za životinje. Ergot alkaloidi se kao takvi ne spominju u ovoj Direktivi, međutim Direktivom je uspostavljen NDK za *Claviceps purpurea* (glavicu raži) koji iznosi 1000 mg/kg, za krmiva i krmne smjese koje se sastoje od nemljevenih žitarica s udjelom vlage od 12 %.

Podaci koji su bili prikupljeni na osnovu Preporuke 2012/154/EU, rezultirali su donošenjem Uredbe Komisije (EU) 2015/1940 od 28. listopada 2015. o izmjeni Uredbe (EZ) br. 1881/2006 u pogledu najvećih dopuštenih količina ergot sklerocija glavice raži na određenim neprerađenim žitaricama te odredaba o praćenju i izvješćivanju kojom se propisuju najveće dopuštene količine ergot sklerocija za neprerađene žitarice, osim kukuruza i riže, a koje iznose do 0,5 g/kg. Ovom Uredbom se propisuje i koje točno kategorije hrane je potrebno uzorkovati i analizirati na ergot alkaloida, međutim još niti jedan NDK nije uspostavljen za njih (planira se to napraviti do 01. srpnja 2017. god.). Isječak iz spomenute Uredbe prikazan je na **Slici 6**.

PRILOG

Prilog Uredbi (EZ) br. 1881/2006 izmjenjuje se kako slijedi:

1. U odjeljku 2. dodaje se sljedeći unos 2.9.:

2.9.	Sklerocij glavice raži i alkaloidi glavice raži	
2.9.1.	Sklerocij glavice raži	
2.9.1.1.	Neprerađene žitarice ⁽¹⁸⁾ , osim kukuruza i riže	0,5 g/kg ^(*)
2.9.2.	Alkaloidi glavice raži ^(**)	
2.9.2.1.	Neprerađene žitarice ⁽¹⁸⁾ , osim kukuruza i riže	— ^(***)
2.9.2.2.	Proizvodi od meljave žitarica, osim od meljave kukuruza i riže	— ^(***)
2.9.2.3.	Kruh (uključujući male pekarske proizvode), kolači, keksi, <i>snack</i> proizvodi od žitarica, žitarice za doručak i tjestenina	— ^(***)
2.9.2.4.	Hrana na bazi žitarica za dojenčad i malu djecu	— ^(***)

^(*) Uzorkovanje se provodi u skladu s točkom B Priloga I. Uredbi Komisije (EZ) br. 401/2006 (SL L 70, 9.3.2006., str. 12.).

Analiza se provodi mikroskopskim pregledom.

^(**) Zbroj 12 alkaloida glavice raži: ergokristin/ergokristinin; ergotamin/ergotaminin; ergokriptin/ergokriptinin; ergometrin/ergometrinin; ergozin/ergozinin; ergokornin/ergokorninin.

^(***) Prikladne i ostvarive najveće dopuštene količine kojima bi se osigurala visoka razina zaštite zdravlja ljudi razmotrit će se za te relevantne kategorije hrane do 1. srpnja 2017."

2. Bilješka 18. zamjenjuje se sljedećom:

⁽¹⁸⁾ Najveća dopuštena količina primjenjuje se na neprerađene žitarice koje se stavljaju na tržište za prvi stupanj prerade.

„Prvi stupanj prerade“ znači svaka fizikalna ili toplinska obrada zrna ili na zrnu, osim sušenja. Postupci čišćenja, uključujući ljuštenje, sortiranja i sušenja ne smatraju se „prvim stupnjem prerade“ ako cijelo zrno ostane netaknuto nakon čišćenja i sortiranja.

Ljuštenje je čišćenje žitarica snažnim četkanjem i/ili ribanjem.

Ako se ljuštenje primjenjuje u prisutnosti sklerocija glavice raži, žitarice se prije ljuštenja moraju podvrgnuti prvom koraku čišćenja. Nakon ljuštenja, koje se provodi uz usisivač prašine, provodi se razvrstavanje po bojama prije meljave.

Sustavi integrirane proizvodnje i prerade označuju sustave u kojima su sve dolazne serije žitarica očišćene, razvrstane i obrađene u istom pogonu. U takvim sustavima integrirane proizvodnje i prerade najveća dopuštena količina primjenjuje se na neprerađene žitarice nakon čišćenja i razvrstavanja, ali prije prvog stupnja prerade.

Subjekti u poslovanju s hranom osiguravaju sukladnost svojim postupkom u okviru HACCP-a, pri čemu se utvrđuje i provodi učinkovit postupak praćenja na toj kritičnoj kontrolnoj točki."

Slika 6: Isječak iz Uredbe (EU) 2015/1940

Ovdje je bitno napomenuti da se mikroskopski pregled odvija prema metodi „Method for the Determination of Ergot (*Claviceps purpurea* Tul.) in Animal Feedingstuff, IAG-Method A4“, dostupnoj na sljedećem linku: http://www.iag-micro.org/files/iag-a4_ergot.pdf.

3. Procjena izloženosti

Provedba istraživanja o ergot alkaloidima i ergot sklerocijama u RH

HAH je 2014. god. prihvatio prijedlog Ministarstva zdravlja da se u RH provede istraživanje o prisutnosti ergot alkaloida u određenim žitaricama, prema Preporuci 2012/154/EU. Isti prijedlog je usvojen na konstituirajućoj sjednici Znanstvenog odbora za kemijske opasnosti HAH-a, održanoj u veljači 2014. god. Slijedom toga, dogovorena je suradnja s laboratorijem „Inspecto d.o.o.“ o provedbi ove studije. U skladu s planom projekta, u 2014. god. uzorkovanje i laboratorijske analize na 6 glavnih ergot alkaloida i njihovih *-inin* epimera napravljeno je na ukupno 30 uzoraka. Plan uzorkovanja, odnosno odabir vrsta uzoraka, napravljen je po uzoru na veliko istraživanje koje je provedeno na razini EU u razdoblju od kolovoza 2010. do svibnja 2011. god. na 803 različita uzorka žitarica i proizvoda od žitarica namijenjenih za hranu i hranu za životinje (Di Mavungu i sur., 2011). Uzorkovanje u RH napravljeno je u studenom, kod subjekata u poslovanju s hranom i hranom za životinje u Osječko-baranjskoj, Koprivničko-križevačkoj te Sisačko-moslavačkoj županiji.

Odlukom Upravnog vijeća HAH-a, istraživanje se nastavilo i u sljedeće dvije godine. Sličan plan uzorkovanja ponovljen je u studenom 2015. god. kada je dodatno provedeno utvrđivanje prisutnosti ergot sklerocija vizualnim pregledom (brojanje i vaganje zrnja) na određenom broju uzoraka.

U 2016. god. zaključilo se trogodišnje razdoblje istraživanja ergot alkaloida, koji su se ispitivali samo na uzorcima raži (sirovina), što je odlučeno na temelju rezultata iz prethodnih godina. U ovom zadnjem istraživanju uzorkovano je ukupno 20 uzoraka na području cijele RH i na svakom se posebno utvrđivalo ergot alkaloida i ergot sklerocije. Da bi se postigao veći broj analiza, s provoditeljem studije („Inspecto“ d.o.o.) dogovoreno je da se u uzorcima u kojima su pronađeni ergot sklerociji dodatno provedu analize na koncentracije ergot alkaloida i to na „čistom uzorku“ (uzorku bez ergot sklerocija) i u samim ergot sklerocijama.

Opis analitičke metode

Za utvrđivanje ergot alkaloida i njihovih *-inin* epimera korištena je analitička metoda UPLC MS/MS. Uzorci su pripremljeni prema uputama MycoSep® 150 Ergot SPE kolona za pročišćavanje, proizvođača Römer Labs, Austria. Svaki uzorak je imao masu od oko 10 kg (tri paralele od 3 do 3,5 kg) te je bilo potrebno odvagati 20 g prethodno samljevenog i homogeniziranog uzorka (koji se sastojao od jedne od paralela, odnosno od oko 3 kg) i dodati 100 ml acetonitril/(NH₄)₂CO₃ pufera (84:16, pH 8.5). Uzorci su se zatim stavljali na ekstrakciju na rotacionoj tresilici 60 minuta. Ekstrakt se nakon završene ekstrakcije filtrirao, a 4 ml filtrata prenosilo se u staklenu epruvetu i pročišćavalo kroz MycoSep® 150 Ergot SPE kolonu za pročišćavanje. U laganoj struji N₂ uparavao se 1 ml pročišćenog ekstrakta i rekonstituirao u 500 µl UPLC-MS/MS mobilne faze acetonitril/(NH₄)₂CO₃ (50:50). Razdvajanje komponenti odvijalo se na Acquity H-Class UPLC-u injektiranjem 10 µl pripremljenog uzorka na Acquity

BEH C18 kolonu (2.1 x 100 mm, veličina čestica 1,7 μm , Waters). Komponente su odvajane u gradijentnom ciklusu, koristeći acetonitril i $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ pufer kao mobilne faze. Nakon razdvajanja analiti su prolazili kroz Xevo TQD tripple-quadrupole maseni spektrometar gdje se pratilo odgovarajuće MS parametre i odgovarajuće ionske prijelaze specifične za ergot alkaloide (m/z = omjer mase i naboja). Za optimiziranje MS parametara, standardi ergot alkaloida otapali su se u otopini acetonitril/ $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ (70:30). Prekursori iona analita su se fragmentirali u ćeliji za koliziju, a dva njihova produkta s najvećim odzivom na detektoru masenog spektrometra odabirala su se za kvantifikaciju i potvrđivanje (**Tablica 2**). Granica kvantifikacije (*engl. Limit of Quantification, LOQ*) bila je postignuta na 1 $\mu\text{g/kg}$.

Ergot sklerocij se određivao makroskopskom i mikroskopskom identifikacijom samih ergot sklerocija i njihovih dijelova. Kvantifikacija se provodila vaganjem ergot sklerocija i dijelova većih od 0.5 mm. Uzorak u količini od 3 kg (jedna od paralela) prosijavao se kroz sito veličine otvora 0.5 mm te su se izvagale frakcije. Identifikacija ergot sklerocija se obavljala na temelju njegovih karakteristika; uspoređivanjem s referentnim materijalom ili postojećim opisima. Ergot sklerocij *Claviceps purpurea* Tul. je duguljasta, nekoliko cm dugačka tvorevina, tamnoljubičaste do crne boje. Oblik je sličan zrnu žitarice. Sastoji se od stvrdnutog micelija. U presjeku sklerocija vide se hife povezane bočnim zidovima koje zajedno tvore pseudoparenhimatsko tkivo. Vanjski slojevi su tamnoljubičasti do crni, dok su unutrašnji slojevi svijetlo ružičasti do ljubičasti. Za određivanje ergot sklerocija u frakciji < 0,5 mm upotrebljava se metoda obojenja pri čemu se frakcija rasporedi na filter papir natopljen otopinom etanola i peleta KOH ili NaOH. Nakon otprilike 5 minuta promatra se pojava crveno-ljubičaste zone oko dijelova ergota. Za kvantifikaciju se frakcija s veličinom čestica > 0,5 mm izvagala, izdvojile su se čestice ergot sklerocija i na osnovi njihove mase kvantificirala se njihova količina u odnosu na ukupni uzorak (g/kg).

U uzorcima u kojima su se bili pronašli ergot sklerociji, isti su bili vraćeni nazad u uzorak (jednu od paralela od 3 kg) koji se zatim samljeo, homogenizirao te je iz te mase odvagano 20 g za analizu na ergot alkaloide.

U 2016. god. u kojoj su se na nekim uzorcima, koji su sadržavali ergot sklerocije, radile dodatne analize na „čistom uzorku“ (odnosno uzorku bez ergot sklerocija), to je podrazumijevalo korištenje druge paralele od 3 kg iz koje su se ergot sklerociji prvo odvojili od ostatka uzorka koji je zatim išao na analizu. Osim toga, analize na ergot alkaloide su vršene i u tim odvojenim ergot sklerocijima.

Tablica 2: Ionski prijelazi ergot alkaloida

Naziv ergot alkaloida	Ion prekursor (m/z)*	Primarni prijelaz (m/z)	Sekundarni prijelaz (m/z)
Ergometrin	326,2	223,1	208,0
Ergometrinin	326,2	208,0	223,0
Ergozin	548,4	208,0	268,1
Ergozinin	530,4	223,2	263,2
Ergokornin	562,4	268,1	208,0
Ergokorninin	562,4	277,1	223,1
Ergokriptin	576,4	208,0	223,0
Ergokriptinin	576,4	223,1	305,1
Ergotamin	582,4	208,0	223,1
Ergotaminin	582,4	223,2	297,1
Ergokristin	610,4	208,0	223,0
Ergokristinin	610,4	305,1	223,1

* Omjer mase i naboja

Rezultati istraživanja

U trogodišnjem periodu uzorkovanje je izvršeno prema planovima uzorkovanja prikazanim pojedinačno za svaku godinu u **Tablici 3 i 4**, a u skladu s planom projekta za svaku pojedinu godinu. Uzorkovano je ukupno 80 uzoraka, od toga 65 uzoraka hrane i 15 uzoraka hrane za životinje. Uzorci hrane su razvrstani prema kategorijama hrane iz Uredbe 2015/1940 (**Slika 6**).

Tablica 3: Zbirni, ostvareni plan uzorkovanja (hrana)

Kategorija proizvoda prema Uredbi 2015/1940	Opis uzorka	Broj uzoraka			Ukupno
		2014.	2015.	2016.	
2.9.2.1. ¹	Zrna pšenice	3	-	-	3
	Zrna raži	2	8	20	30
2.9.2.2. ²	Pšenično brašno	1	2	-	3
	Pšenična krupica	-	2	-	2
	Pšenične mekinje	-	1	-	1
	Raženo brašno	10	4	-	14
2.9.2.3. ³	Kruh na bazi raži i pšenice	2	4	-	6
	Dvopeci, kolačići	-	2	-	2

2.9.2.4. ⁴	Hrana za dojenčad i malu djecu	2	2	-	4
Ukupno		20	25	20	65

¹ 2.9.2.1. Neprerađene žitarice, osim kukuruza i riže;

² 2.9.2.2. Proizvodi od meljave žitarica, osim od meljave kukuruza i riže;

³ 2.9.2.3. Kruh (uključujući male pekarske proizvode), kolači, keksi, *snack* proizvodi od žitarica, žitarice za doručak i tjestenina;

⁴ 2.9.2.4. Hrana na bazi žitarica za dojenčad i malu djecu

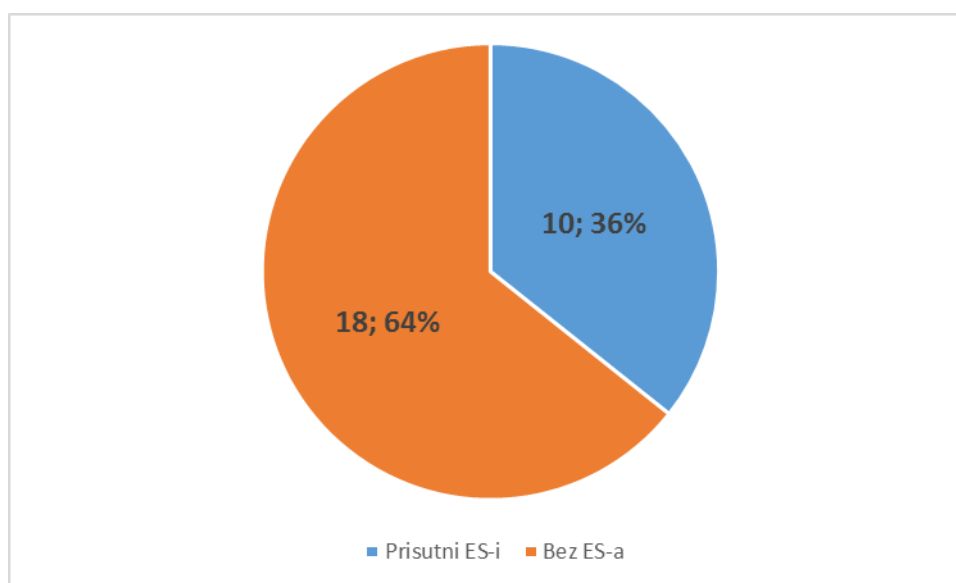
Tablica 4: Zbirni, ostvareni plan uzorkovanja (hrana za životinje)

Grupa proizvoda	Vrsta uzorka	Broj uzoraka			Ukupno
		2014.	2015.	2016.	
Hrana za životinje	Raž i nusproizvodi	4	3	-	7
	Pšenica i nusproizvodi	4	4	-	8
Ukupno		8	7	-	15

Tablica 5: Ukupni broj uzoraka pregledan na ergot sklerocije

Kategorija proizvoda prema Uredbi 2015/1940	Opis uzorka	Broj uzoraka			Ukupno
		2014.	2015.	2016.	
2.9.1.1. ¹	Zrna pšenice	-	-	-	-
	Zrna raži	-	8	20	28
Ukupno		-	8	20	28

U **Tablici 5** je prikazano na koliko je uzoraka još dodatno provedena i vizualna inspekcija na ergot sklerocije, koja je provedena samo na raži. Sve skupa pregledanih uzoraka na ergot sklerocije je bilo 28 (od 65, jer se kod uzoraka hrane za životinje ovaj pregled također nije radio). U 10 uzoraka (36 %) detektirani su ergot sklerociji (**Slika 7**).



Slika 7: Broj i udio uzoraka sa i bez ergot sklerocija (ES)

Svi ergot sklerociji koji su pronađeni u uzorcima su pojedinačno izvagani. U **Tablici 6** je prikazana njihova distribucija na temelju mase [g], odnosno udjela u 1 kg uzorka. Prosječni udio ergot sklerocija u uzorcima (uključujući sve analizirane uzorke) je iznosio 0,0242 g/kg, dok je najveći pojedinačni udio bio 0,25 g/kg, što znači da niti jedan uzorak nije bio iznad NDK vrijednosti od 0,5 g/kg. Nakon vaganja, ergot sklerociji su vraćeni nazad u uzorak te su na takvom, cjelovitom uzorku rađene analize na ergot alkaloida na način kako je objašnjeno u poglavlju „**Opis analitičke metode**“. Razlog ponovnog vraćanja ergot sklerocija u uzorak leži u činjenici što precizno uklanjanje ergot sklerocija ne bi odgovaralo realnoj situaciji. Naime, uzorkovanje se vršilo nakon mehaničkog pročišćavanja zrna koje se u daljnjoj preradi više ne radi, nego se takva sirovina koristi za daljnje namjene. Osim toga, pošto su udjeli ergot sklerocija u svim uzorcima bili ispod NDK vrijednosti te samim time sukladni, na ovaj način se željelo saznati kolike su eventualne koncentracije ergot alkaloida u takvim, sukladnim uzorcima.

Tablica 6: Distribucija udjela ergot sklerocija (ES) u analiziranim uzorcima

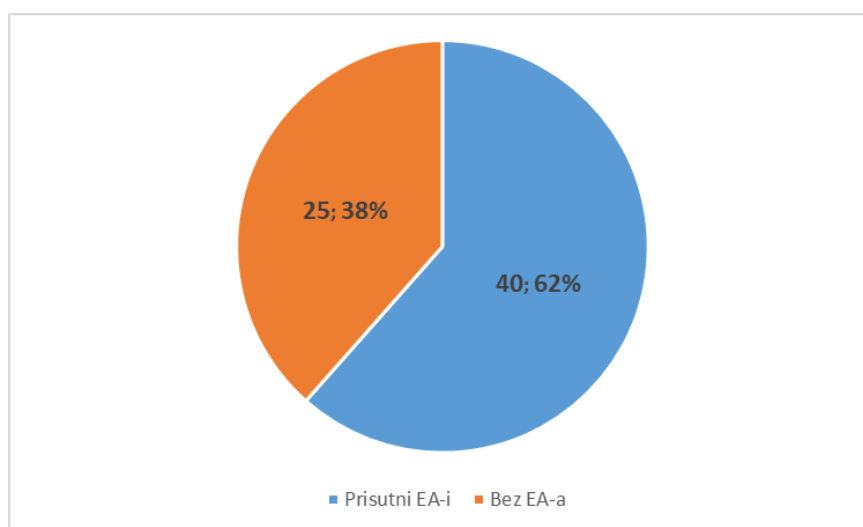
Vrsta uzorka	Ukupan broj uzoraka	Distribucija (broj uzoraka) ES-a na temelju izvagane mase [g/kg]					Prosječni udio [g/kg]	Najveći udio [g/kg]
		Bez ES-a	0,001-0,01	0,01-0,1	0,1-0,5	>0,5		
Zrna raži	28	18	1	7	2	-	0,0242	0,25

U **Tablici 7** prikazani su sumarni statistički podaci analiza na ergot alkaloide u uzorcima za sve tri godine. Izračuni su dobiveni na način da se, kao rezultat analize, za svaki uzorak uzimao ukupni zbroj svih ergot alkaloida i njihovih *–inim* epimera. U slučaju da je poneki ergot alkaloid bio ispod granice kvantifikacije (<LOQ), njemu se dodijelila vrijednost 0 (tzv. „Scenarij 1“). Na isti način su dobiveni svi ostali izračuni, osim ako nije navedeno drugačije. Detaljniji podaci za svaki uzorak se mogu pronaći u **DODATKU 2 i 3** gdje su rezultati prikazani i za tzv. „Scenarij 2“, u kojem su se za rezultate <LOQ-a dodjeljivalo puni LOQ od 1 µg/kg.

Tablica 7: Deskriptivna statistika za koncentracije ergot alkaloida u svim uzorcima (prema sirovini)

	Vrsta uzorka						
	Raž	Pšenica	Miješano	Ukupno	Raž (hrana za životinje)	Pšenica (hrana za životinje)	Ukupno
Ukupan broj uzoraka	44	9	12	65	7	8	15
Broj pozitivnih uzoraka	32 (73 %)	2 (22 %)	6 (50 %)	40 (62 %)	3 (43 %)	1 (13 %)	4 (27 %)
Prosječna koncentracija [µg/kg]	197	0,7	15,5	136	450,2	0,2	210,2
Medijan koncentracije [µg/kg]	128,4	0	0,5	22	0	0	0
Najviša koncentracija [µg/kg]	1816	5,2	80,6	1816	1248,8	1,7	1248,8
Najniža koncentracija [µg/kg]	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Koncentracija na 95. percentili	703,5	3,5	54,4	529	1202,7	1,1	1141

Iz **Tablice 7** je vidljivo da je u uzorcima hrane u ukupno 40 uzoraka (62 %), pronađen barem jedan ergot alkaloid. Prosječna koncentracija ergot alkaloida (uključujući sve uzorke hrane) je bila 136 µg/kg, a najveća izmjerena koncentracija iznosila je 1816 µg/kg u uzorku zrna raži iz 2015. god. (detaljnije u **DODATKU 3**). Broj uzoraka hrane za životinje (15) premalen je da mi se mogli donijeti značajniji zaključci, osim da je najveća izmjerena koncentracija iznosila 1248,8 µg/kg, također u raži te da je u samo jednom uzorku pšenice utvrđena koncentracija ergot alkaloida, u koncentraciji tek nešto većoj od LOQ-a.



Slika 8: Udio pozitivnih i negativnih uzoraka (hrana) na ergot alkaloide (EA)

Osim na razini sirovine, rezultate se može promatrati i u potkategorijama (brašno, kruh i sl.), kako je i navedeno u Uredbi 2015/1940.

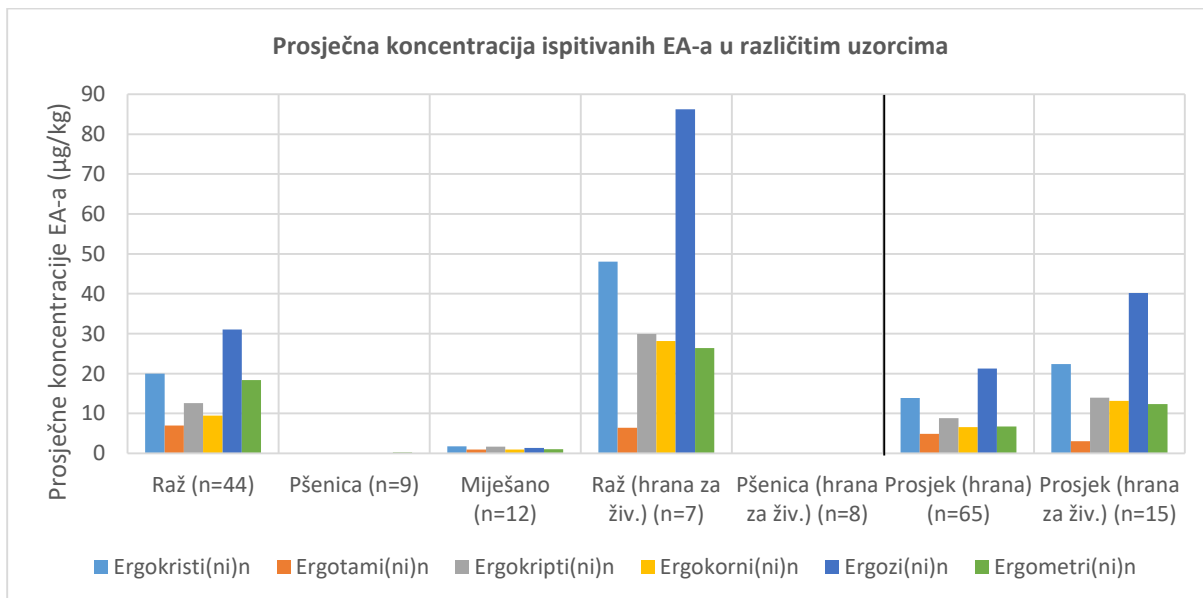
Tablica 8: Deskriptivna statistika za koncentracije ergot alkaloida u svim uzorcima (prema kategoriji hrane)

	Vrsta uzorka (prema Uredbi 2015/1940)				
	2.9.2.1.	2.9.2.2.	2.9.2.3.	2.9.2.4.	Ukupno
Ukupan broj uzoraka	33	20	8	4	65
Broj pozitivnih uzoraka	21 (64 %)	13 (65 %)	6 (75 %)	0 (0 %)	40 (62 %)
Prosječna koncentracija [$\mu\text{g/kg}$]	192	116	23	0	136
Medijan koncentracije [$\mu\text{g/kg}$]	77	23	22	0	22
Najviša koncentracija [$\mu\text{g/kg}$]	1816	536	81	0	1816
Najniža koncentracija [$\mu\text{g/kg}$]	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Koncentracija na 95. percentili	745	502	64	0	529

Iz **Tablice 8** vidljivo je da su koncentracije ergot alkaloida niže što je uzorak podvrgnut većem tehnološkom stupnju obrade. Detaljni prikaz koncentracija pojedinačnih ergot alkaloida i pripadajućih – *inin* epimera u uzorcima hrane i hrane za životinje za svaku godinu, nalazi se u **Dodatku 3** (a, b, c, d, e).

Na **Slici 9** prikazana je prosječna koncentracija pojedinačnih ergot alkaloida pronađenih u uzorcima hrane i hrane za životinje. Radi praktičnosti, prikazani su zajedno pojedinačni ergot alkaloidi i njihovi –*inin* epimeri. Prvo što je vidljivo je razlika između koncentracija pronađenih u raži i pšenici, neovisno o tome radi li se o hrani ili hrani za životinje, gdje su u raži prisutne daleko veće koncentracije ergot alkaloida. Iz tog razloga se odlučilo u zadnjoj (trećoj) godini projekta, istraživati ergot alkaloida samo na uzorcima raži. Uzimajući u obzir sve uzorke raži i pšenice bez miješanih uzoraka (68 ukupno, odnosno 51 uzorak raži i 17 uzoraka pšenice), u raži su ergot alkaloidi prisutni u prosječnim koncentracijama od 231,77 µg/kg, dok su kod pšenice prisutni u zanemarivim količinama od 0,46 µg/kg (ispod LOQ-a). Najveća pojedinačna koncentracija u raži pa tako i na ukupnom broju svih uzoraka je 1816 µg/kg.

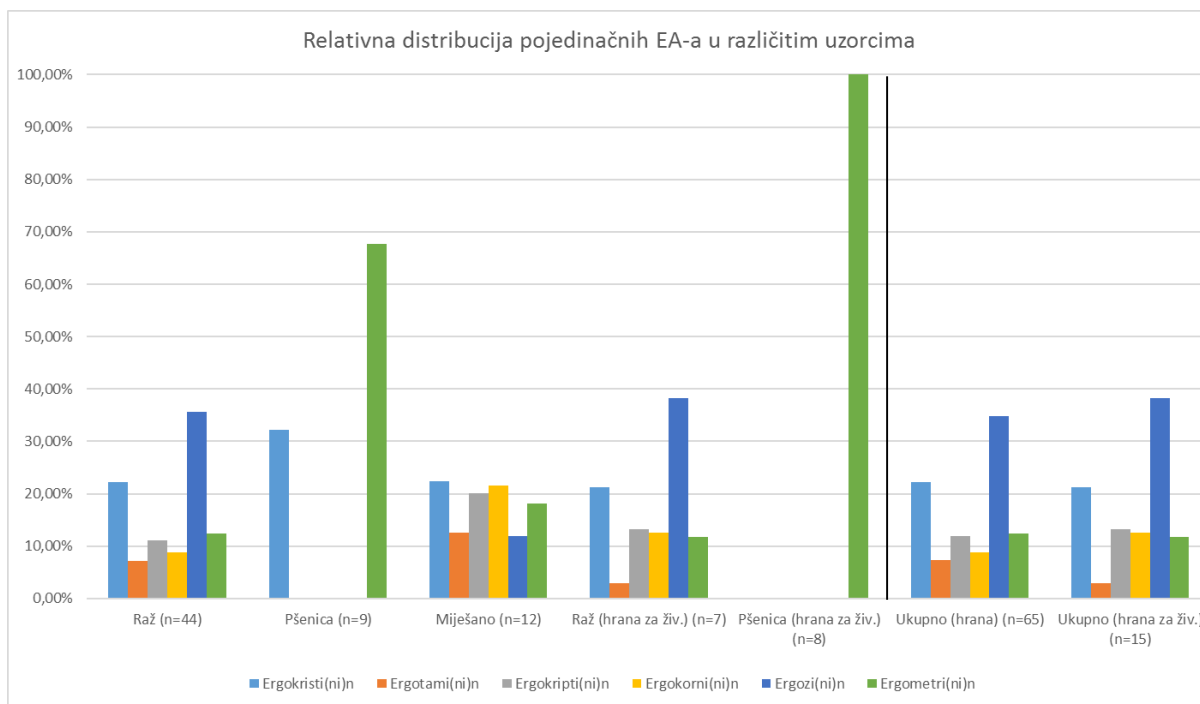
Gledajući pojedinačne ergot alkaloida i njihove –*inin* epimere, u najvećim koncentracijama je pronađen ergozi(ni)n (prosječna koncentracija na 65 uzoraka hrane je 21,29 µg/kg, a na 15 uzoraka hrane za životinje je 40,22 µg/kg), dok je sljedeći ergokristi(ni)n, koji je pronađen u gotovo dvostruko manjim koncentracijama. S druge strane, u najmanjim koncentracijama je pronađen ergotami(ni)n (prosječna koncentracija na 65 uzoraka hrane je 4,93 µg/kg, a na 15 uzoraka hrane za životinje je 3,01 µg/kg).



Slika 9 Prosječne konc. pojedinačnih ergot alkaloida (EA) u uzorcima prema vrsti sirovine i namjeni

Osim toga, vidljivo je i da je više ergot alkaloida u prosjeku pronađeno u hrani za životinje, nego u hrani (za precizniju procjenu, potreban je veći broj uzoraka, pogotovo hrane za životinje). U hrani je

prosječno pronađeno 136 µg/kg, a u hrani za životinje 210,19 µg/kg, što je otprilike za 38 % više. Ovo se može objasniti činjenicom da su kod uzoraka hrane prisutni i gotovi proizvodi, koji su prošli čitav niz dodatnih tehnoloških postupaka, a koji su utjecali na manju pojavnost ergot alkaloida u finalnom proizvodu, dok se kod hrane za životinje radi o mekinjama od raži ili pšenice koje su bile podvrgnute jednostavnijim tehnološkim postupcima obrade.



Slika 10 Relativna distribucija konc. pojedinačnih ergot alkaloida (EA) u uzorcima prema vrsti sirovine i namjeni

Kao što je vidljivo iz **Slike 10**, kod uzoraka raži, ergozi(ni)n je zastupljen u najvećem postotku, odnosno na njega od svih ergot alkaloida otpada 31,54 % kod uzoraka hrane i 38,29 % kod uzoraka hrane za životinje. Po učestalosti ga slijedi ergokristi(ni)n, također podjednako i kod hrane i kod hrane za životinje. Kod uzoraka pšenice, zbog toga što su u samo 3 uzorka kvantificirani ergot alkaloidi (gledajući i hranu i hranu za životinje) i to ergokristi(ni)n te ergometri(ni)n, nije moguće donositi adekvatne zaključke o distribuciji pojedinačnih ergot alkaloida. Gledajući relativnu distribuciju ergot alkaloida na svim uzorcima hrane i hrane za životinje, može se uočiti da su oni zastupljeni u vrlo sličnim omjerima, odnosno da između hrane i hrane za životinje nema značajnije razlike po tom pitanju.

Visoka varijabilnost u sastavu ergot alkaloida može se vidjeti iz **Tablice 9**. U toj tablici su koeficijenti korelacije bili računati između 6 glavnih ergot alkaloida kojima su opet bili pridruženi njihovi –*inin* epimeri. U obzir su se uzimali i uzorci hrane i hrane za životinje radi većeg broja uzoraka s kojim se računa, odnosno preciznijeg izračuna. Uzorci pšenice su izuzeti jer ovaj statistički prikaz na takvim uzorcima ne bi bio relevantan zbog ukupno samo 3 uzorka u kojima su bili kvantificirani ergot alkaloidi, tj. jako malog broja pozitivnih uzoraka. Snažna pozitivna korelacija (što bliže vrijednosti 1) između dva ergot alkaloida ukazuje na to da se oba često nalaze zajedno u uzorku ili da ih u uzorku nema. Snažna

negativna korelacija (što bliže vrijednosti -1) ukazuje na to da je u većini slučajeva samo jedan od dva ergot alkaloida prisutan u značajnim količinama. Slijedom toga, najsnažnija (ali i dalje samo umjerena) korelacija je uočena između ergotamina i ergokristina (0,573) te između ergokristina i ergozina (0,571). Ostale korelacije su ili pozitivno ili negativno slabe (blizu 0) što ukazuje na to da je distribucija ergot alkaloida u uzorcima manje-više slučajna, tj. da se ne mogu uspostaviti zavisnosti između pojavnosti pojedinih ergot alkaloida. Slični zaključci navedeni su u studiji o ergot alkaloidima i ergot sklerocijima u hrani za životinje iz Nizozemske (Mulder, 2012).

Tablica 9: Koeficijenti korelacije između glavnih ergot alkaloida, temeljeni na njihovoj relativnoj distribuciji u pozitivnim uzorcima raži i miješanim uzorcima hrane i hrane za životinje. Korelacije jače od 0,4 ili -0,4 su istaknute.

Korelacija	Koeficijent korelacije
Ergokriptin-ergotamin	0,087
Ergokriptin-ergokornin	0,180
Ergokriptin-ergokristin	-0,057
Ergokriptin-ergozin	-0,039
Ergokriptin-ergometrin	-0,042
Ergotamin-ergokornin	0,302
Ergotamin-ergokristin	0,573
Ergotamin-ergozin	0,236
Ergotamin-ergometrin	0,218
Ergokornin-ergokristin	0,207
Ergokornin-ergozin	0,260
Ergokornin-ergometrin	0,462
Ergokristin-ergozin	0,571
Ergokristin-ergometrin	0,462
Ergozin-ergometrin	0,349

U 2016. god. na svih 9 uzoraka u kojima su pronađeni ergot sklerociji, dodatno su rađene analize na ergot alkaloide nakon što se ergot sklerocij odvojio od ostatka uzorka. Analize su rađene na tom „čistom“ dijelu uzorka, ali i na samim ergot sklerocijima. Kada se usporede rezultati analiza na ergot alkaloida na istom uzorku koji je sadržavao ergot sklerocije i iz kojeg su oni uklonjeni (**Tablica 10**), vidljivo je da praktički nema nikakve razlike, odnosno da se još dodatnim pročišćavanjem svih zatečenih ergot sklerocija nije postigla dodatna zdravstvena ispravnost zrna raži.

Tablica 10 Usporedba koncentracija ergot alkaloida u istim uzorcima s i bez ergot sklerocija

	Kategorija proizvoda 2.9.2.1. prema Uredbi 2015/1940 (zrna raži)	
Broj uzorka	Nepročišćeni uzorak [μg/kg]	Pročišćeni uzorak [μg/kg]
1	217	232
2	253	255
3	733	732
4	762	743
5	329	330
6	345	352
7	433	428
8	229	226
9	304	295

Iz ovoga bi se moglo zaključiti da prisutnost ergot sklerocija nema utjecaj na koncentracije ergot alkaloida u pročišćenom uzorku, ukoliko se radi o uzorku u kojem je prisutnost ergot sklerocija mala. Mulder (2012) pretpostavlja da kontaminacija pročišćenog uzorka može imati podrijetlo od sitnih čestica sklerocija (prašine) ili od djelomične zaraze gljivicom, a koji se kao takvi postupcima prosijavanja i vizualnom inspekcijom ne mogu odstraniti, što je vjerojatno objašnjenje i za ovaj slučaj.

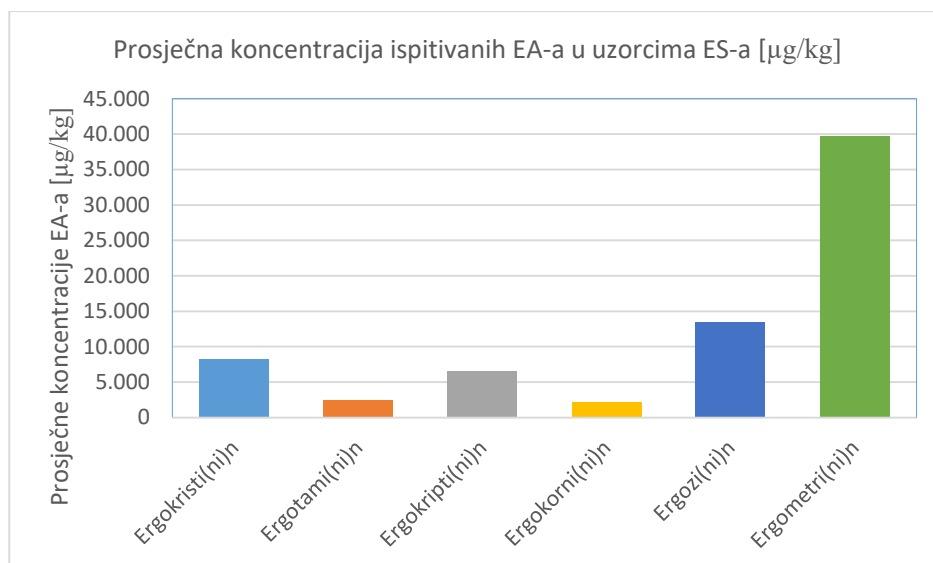
Kako su se ergot alkaloidi dodatno ispitivali i u tim odvojenim ergot sklerocijima, dodatno je moguće pojasniti zašto oni u ovom slučaju nisu izvor kontaminacije. Naime, kako je i vidljivo iz **Tablice 11**, sâm sadržaj ergot alkaloida u ergot sklerocijima je nedovoljno visok da može značajno pridonijeti kontaminaciji 1 kg uzorka, stoga je jedini mogući zaključak da se kontaminacija dogodila u nekom prethodnom stupnju prerade sirovine. Npr. iz **Tablice 10** je vidljivo da je uzorak br. 1 imao ukupnu koncentraciju ergot alkaloida od 232 μg/kg u pročišćenom dijelu, a iz **Tablice 11** je pak vidljivo da ergot sklerociji pronađeni u tom uzorku imaju koncentraciju ergot alkaloida od svega 0,75 μg/kg te samim time nikako ne mogu biti glavni izvor kontaminacije.

Tablica 11 Koncentracije ergot alkaloida (EA) u ergot sklerocijima (ES)

Broj uzorka	Koncentracije EA-a u ES-u [$\mu\text{g/kg}$ ES-a]	Doprinos EA-a iz ES-a ukupnoj kontaminaciji uzorka [$\mu\text{g/kg}$ uzorka]
1	62 555	0,75
2	159 331	7,97
3	111 746	7,82
4	334 550	83,64
5	106 944	3,96
6	267 402	9,09
7	112 070	19,05
8	113 412	4,42
9	41 810	0,42

Dodatni zaključci koji se mogu izvući iz ovih analiza su da su svi ergot sklerociji sadržavali ergot alkaloide. Najveća koncentracija je iznosila 334 550 $\mu\text{g/kg}$, a prosječna 145 536 $\mu\text{g/kg}$. Kako su te koncentracije iskazane na 1 kg ergot sklerocija, kada se preračuna kolike bi one bila na 1 kg uzorka (stupac „Doprinos EA-a iz ES-a ukupnoj kontaminaciji uzorka [$\mu\text{g/kg}$ uzorka]“), s obzirom na maseni udio ergot sklerocija u uzorku, vidljivo je da one maksimalno doprinose do oko 10 % (uzorak broj 4).

Gledajući pojedinačno ergot alkaloide, iz **Slike 11**, na temelju samo 9 uzoraka, vidljivo je da je ergometri(ni)n prisutan u najvećim koncentracijama (39 808 $\mu\text{g/kg}$), a u najmanjim ergokorni(ni)n (2158 $\mu\text{g/kg}$). Već iz ovih podataka se može zaključiti da se pojavnost, kao ni distribucija ergot alkaloida u ergot sklerocijima ne može usporediti s onom u cjelokupnom uzorku. Ovaj podatak također ide u prilog tome da je kontaminacija, odnosno prisutnost ergot alkaloida u cjelokupnom uzorku podrijetlom od nekih drugih izvora, a ne iz ergot sklerocija pronađenih u uzorku.



Slika 11 Prosječna koncentracija ispitivanih ergot alkaloida (EA) u uzorcima ergot sklerocija (ES) [µg/kg]

Na razini Europske unije, jedna od najznačajnijih studija o ergot alkaloidima, odnosno njihovoj pojavnosti u hrani i hrani za životinje, rađena je u sklopu projekta pod nazivom CFP/EFSA/CONTAM/2010/01 „Survey on ergot alkaloids in cereals intended for human consumption and animal feeding“ (Di Mavungu, 2011) na temelju koje je napravljen plan uzorkovanja za ovo istraživanje (osim u 2016. god.). U sklopu tog projekta, uzorci su bili prikupljeni kroz 2010. i 2011. god. u 13 europskih zemalja te su rezultati dostavljeni EFSA-i. Malysheva i sur. (2014) objavili su rezultate o analizama na ergot alkaloidima koji se nadovezuju na spomenutu studiju. Stoga je sve skupa analizirano 1065 uzoraka. U **Tablicama 12 i 13**, prikazana je usporedba rezultata dobivenih iz tih studija s rezultatima dobivenim u ovoj studiji.

Tablica 12 Usporedba rezultata dobivenih u RH sa studijom koju su proveli Malysheva i sur. (2014) prema vrsti sirovine i namjeni

	Raž (hrana)		Pšenica (hrana)		Miješano (hrana)		Raž (za živ.)		Pšenica (za živ.)	
	RH	EU	RH	EU	RH	EU	RH	EU	RH	EU
Ukupan broj uzoraka	44	226	9	332	12	186	7	157	8	137
Pozitivni uzorci [%]	75	84	22	67	50	48	43	52	13	27

Prosječna koncentracija [μg/kg]	197	87	0,7	62	15,5	7	450,2	311	0,2	19
Medijan koncentracije [μg/kg]	128,4	28	<LOQ	7	0,5	<LOQ ¹	<LOQ	1	<LOQ	<LOQ
Najviša koncentracija [μg/kg]	1816	1121	5,2	591	80,6	123	1248,4	12340	1,7	701
Najniža koncentracija [μg/kg]	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Koncentracija na 95. percentili [μg/kg]	703,5	393	3,5	375	54,4	36	1202,7	1456	1,1	52

¹LOQ = 1 [μg/kg]

U ukupno 44 uzorka raži (hrana) vidljivo je da je prosječna koncentracije ergot alkaloida veća u RH nego u EU, iako je u EU ukupno bilo više pozitivnih uzoraka. Osim toga, u istoj kategoriji je najviša zabilježena koncentracija također veća u RH, nego u EU (1816 μg/kg naspram 1121 μg/kg), ali je zato u raži (hrana za životinje) u EU zabilježena rekordna koncentracija ergot alkaloida od 12 340 μg/kg, što je približno deset puta više od najviše zabilježene koncentracije u istoj kategoriji u RH.

Gledajući prema kategoriji hrane (Uredba 2015/1940), moguće je bilo usporediti samo sljedeće rezultate, kako je prikazano u **Tablici 13**.

Tablica 13 Usporedba rezultata dobivenih u RH sa studijom koju su proveli Malysheva i sur. (2014) prema kategoriji hrane (prema Uredbi 2015/1940)

Statistički parametar	2.9.2.2.		2.9.2.3.	
	RH	EU	RH	EU
Pozitivni uzorci [%]	65	80	75	-
Najviša koncentracija ergot alkaloida [μg/kg]	536	1121	81	94

4. Karakterizacija rizika

Prilikom karakterizacije rizika, potrebno je uzeti u obzir akutnu i kroničnu izloženost za što se koriste **ARfD** i **TDI** vrijednosti za ergot alkaloida. Ove vrijednosti postavila je EFSA na temelju učinaka koje ergot alkaloidi imaju na neurotransmiterske 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 dobivanje ovih vrijednosti (EFSA, 2012).

Gledajući izmjerene koncentracije u uzorcima u sve tri godine, može se uočiti da su one najveće u sirovini (zrna raži). Trenutno nisu dostupni podaci o tome koliko i na koji način daljnja obrada utječe na ergot alkaloida te se stoga rezultati dobiveni na uzorcima sirovina nisu mogli uzimati u obzir prilikom karakterizacije rizika. Na temelju dobivenih rezultata, može se zaključiti da su niže koncentracije ergot alkaloida prisutne kod većeg stupnja tehnološke obrade. EFSA je također u procjeni rizika iz 2012. god. koristila samo rezultate na gotovim namirnicama (EFSA, 2012.).

Stoga je za procjenu akutne izloženosti korištena najveća izmjerena ukupna koncentracija (zbroy svih ergot alkaloida 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.**, estimirano je da bi osoba od 70 kg u jednom danu smjela pojesti takvog kruha u količinama 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 količinama do **521 g** dnevno, bez posljedica po zdravlje.

Da bi se dobila realnija procjena kronične izloženosti, za izračun se koristila prosječna koncentracija ergot alkaloida u svim uzorcima kruha i koncentracija na 95. percentili te su se tako dobivene vrijednosti uspoređivale s TDI-em. Ukupno je analizirano 6 uzoraka i prosječna koncentracija ergot alkaloida iznosila je **33,83 µg/kg**, a koncentracija na 95. percentili **68,7 µg/kg** u „Scenariju 2“, gdje se za sve pojedinačne vrijednosti <LOQ koristio puni LOQ (1 µg/kg). U skladu s TDI-em od 0,6 µg/kg t. m., osoba od 70 kg dnevno bi smjela konzumirati **1241 g** kruha s prosječnim koncentracijama ergot alkaloida te **611 g** kruha s koncentracijama ergot alkaloida na 95. percentili. Iz ovih izračuna se može zaključiti da je rizik od ergot alkaloida nizak.

ZAKLJUČCI

Istraživanje ergot alkaloida u RH prvi puta je na nacionalnoj razini napravljeno 2014. god. u skladu s Preporukom 2012/154/EU u kojoj se državama članicama ukazuje na potrebu ispitivanja ove vrste alkaloida. Naime, glavni problem kod praćenja ergot alkaloida je trenutna zakonska neuređenost, tj. nepostojanje NDK vrijednosti za pojedine ili grupne ergot alkaloida za vrste namirnica ili sirovina.

Isto istraživanje je bilo produženo i na sljedeće dvije godine te je ukupno analizirano 80 uzoraka, od toga 65 uzoraka hrane (što sirovine, što gotovih proizvoda), a 15 uzoraka hrane za životinje. Svi uzorci su bili od raži i/ili od pšenice te je uočeno da su ergot alkaloidi zastupljeniji u uzorcima od raži. U ukupno 40 uzoraka (62 %) je pronađen barem jedan ergot alkaloid uz prosječnu koncentraciju od 136 µg/kg (na temelju svih uzoraka), uz maksimalnu koncentraciju zabilježenu 2015. god. u zrnu raži koja je iznosila 1816 µg/kg. Gledajući podjelu po kategorijama hrane (prema Preporuci 2012/154/EU), vidljivo je da su koncentracije ergot alkaloida niže što je veći stupanj obrade. Najveća koncentracija kod gotovih proizvoda je zabilježena u kruhu od raži i pšenice u iznosu od 80,6 µg/kg.

Što se tiče pojedinačnih ergot alkaloida, u uzorcima je najzastupljeniji bio ergozin (zajedno sa svojim *–inin* epimerom) čiji udio je u uzorcima bio preko 35 %, dok je najmanje zastupljen bio ergotamin i njegov *–inin* epimer s udjelom ispod 8 %. Uzimajući u obzir koeficijente korelacije, zaključeno je da ne postoji međusobna zavisnost pojedinih ergot alkaloida, nego da je njihova prisutnost u ukupnom sadržaju ergot alkaloida nasumična.

Prethodno spomenuta najveća koncentracija kod gotovih proizvoda od 80,6 µg/kg korištena je za procjenu rizika. Zaključeno je da bi osoba od 70 kg bila u riziku od akutne toksičnosti kada bi dnevno pojela više od 870 g kruha od raži i pšenice, a u riziku od kronične toksičnosti kada bi takav proizvod svakodnevno jela u količinama većim od 520 g. Osim akutne toksičnosti, rađena je realnija procjena rizika i za kroničnu toksičnost te je u obzir uzeta prosječna koncentracija ergot alkaloida u svim proizvodima iz kategorije kruha i peciva, kao i koncentracija na 95. percentili. S obzirom na TDI od 0,6 µg/kg, zaključeno je da bi osoba od 70 kg trebala dnevno jesti preko 1240 g kruha s prosječnim koncentracijama ergot alkaloida te preko 610 g kruha s visokim koncentracijama (na 95. percentili). Samim time je zaključeno da je rizik po zdravlje ljudi nizak.

Rezultati korelacije između pojavnosti ergot sklerocija u uzorku i koncentracije ergot alkaloida, nisu bili dovoljni da se uspostavi uzročno – posljedična veza između ove dvije pojave. Dapače, rezultati iz ove studije su pokazali da fizičko odvajanje ergot sklerocija nema nikakav utjecaj na koncentracije ergot alkaloida u ostatku uzorka. Razlog tome leži u činjenici da su ergot sklerociji pronađeni u malim količinama (ispod NDK) te da njihov sadržaj ergot alkaloida nije toliko visok da bi značajnije mogao utjecati na koncentracije u cijelom uzorku. Stoga se može potvrditi da ergot alkaloidi u raži i pšenicu mogu doći putem drugih izvora (npr. prašine) ili iz djelomične zaraze gljivicom zrna koja se prosijavanjem ne može ukloniti te dosta teško detektirati vizualnom inspekcijom. Za detaljnije zaključke, potrebno je načiniti dodatne analize koje će se fokusirati upravo na korelaciju između ove dvije pojave.

Na taj način moći će se uspostaviti adekvatne NDK vrijednosti za ergot alkaloide koji će služiti zaštiti zdravlja ljudi.

PREPORUKE

Procjena rizika na ergot alkaloide iz sirovine i poluproizvoda nije bila moguća zbog nedovoljno podataka o tome kako razni tehnološki postupci (osim prosijavanja) utječu na koncentracije ergot alkaloida, ali i na njihova svojstva. Iz tog razloga je i EFSA radila procjenu rizika samo na gotovim proizvodima (EFSA, 2012). Stoga bi u budućnosti bilo korisno daljnje istraživanje koje će se dodatno fokusirati na utjecaj tehnoloških postupaka obrade (mljevenje, termička obrada i sl.) na koncentracije ergot alkaloida u finalnom proizvodu (konditorima, hrani za dojenčad i malu djecu i dr.).

LITERATURA (REFERENCE)

Brajdić N, (2014): Ražena glavica (*Claviceps purpurea*), ergotizam i ergot alkaloidi. *Preddiplomski rad*. Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb.

BfR, Das Bundesinstitut für Risikobewertung (2010): *Presentation by Ch. Gottschalk*. 5th CRL/NRL Workshop on Mycotoxins, Geel.

Di Mavungu JD, Larionova DA, Malysheva SV, Van Peteghem C, De Saeger S (2011): *Survey on ergot alkaloid sin cereals intended for human consumption and animal feeding*. Laboratory of Food Analysis, Department of Bio-analysis, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ghent University, Ghent.

Direktiva 2002/32/EZ Europskog parlamenta i vijeća od 7. svibnja 2002. o nepoželjnim tvarima u hrani za životinje. 2002L0032.

Direktiva Komisije 2009/74/EZ od 26. lipnja 2009. o izmjeni direktiva Vijeća 66/401/EEZ, 66/402/EEZ, 2002/55/EZ i 2002/57/EZ u pogledu botaničkih naziva bilja, znanstvenih naziva drugih organizama i nekih priloga direktivama 66/401/EEZ, 66/402/EEZ i 2002/57/EZ u svjetlu razvoja znanstvenih i tehničkih spoznaja. Službeni list Europske unije L166/40.

EFSA, European Food Safety Agency (2005): *Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in Food Chain on a request from the Commission related to ergot as undesirable substance in animal feed*. EFSA, Parma.

EFSA, European Food Safety Agency (2012): *Scientific Opinion on Ergot alkaloids in food and feed*. EFSA, Parma.

Floss HG, Cassady JM i Robbers JE (1973): Influence of ergot alkaloids on pituitary prolactin and prolactin-dependent processes. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 62, 699-715.

Griffith RW, Grauwiler J, Hodel C, Leist KH i Matter B (1978): Ergot – toxicology considerations. U: *Heffter-Heubner's Handbook of experimental pharmacology*. 805-851.

IAG, International Association of Feedingstuff Analysis (n.d.): *Method for the Determination of Ergot (Claviceps purpurea Tul.) in Animal Feedingstuff, IAG-Method A4*. IAG. Dostupno na: http://www.iag-micro.org/files/iag-a4_ergot.pdf

Janssen GB, Beems RB, Speijers GJ i van Egmond HP (2000a): Subacute toxicity of alphaergocryptine in Sprague-Dawley rats. 1: general toxicological effects. *Food and Chemical Toxicology*, 38, 679-688.

Janssen GB, Beems RB, Elvers LH i Speijers GJ (2000b): Subacute toxicity of alpha-ergocryptine in Sprague-Dawley rats. 2: metabolic and hormonal changes. *Food and Chemical Toxicology*, 38, 689-695.

Kalberer F (1970): Absorption, distribution and excretion of [3H] ergotamine in the rat. Biopharmaceutical aspects. U: *Ergot Alkaloids and Related compounds*. Eds Berde B and Shild HO. Springer Verlag, New York.

Malysheva SV, Larionova DA, Di Mavunga DJ i De Saeger S (2014): Pattern and distribution of ergot alkaloids in cereals and cereal products from European countries. *World Mycotoxin Journal*, 2014; 7 (2): 217-230

Mulac D, Huwel S, Galla HJ i Humpf HU (2012): Permeability of ergot alkaloids across the bloodbrain barrier *in vitro* and influence on the barrier integrity. *Molecular Nutrition & Food Research*, 56, 475-485

Mulder PPJ, van Raamsdonk LWD, van Egmond HJ, Voogt J, van Brakel MW, van der Horst GM i de Jong J (2012): *Dutch survey ergot alkaloids and sclerotia in animal feeds*. RIKILT – Institute of Food Safety, Wageningen.

Peters-Volleberg GW, Beems RB i Speijers GJ (1996): Subacute toxicity of ergometrine maleate in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 34, 951-958.

Pillay VV (2013): *Modern Medical Toxicology*. 4th edn, Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd, New Delhi.

Pravilnik o nepoželjnim tvarima u hrani za životinje. Narodne novine br. 80/10.

Pravilnik o nepoželjnim tvarima u hrani za životinje kojim se provode uredbe Europske komisije o izmjenama Direktive 2002/32/EZ Europskog parlamenta i vijeća od 7. svibnja 2002. o nepoželjnim tvarima u hrani za životinje. Narodne novine br. 124/12.

Pravilnik o stavljanju na tržište sjemena žitarice. Narodne novine 83/09 i 31/13.

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.

Pubchem.ncbi.nlm.nih.gov (2005a): *Ergotamine*. Dostupno na:
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/8223#section=Top> (16.01.2017.)

Pubchem.ncbi.nlm.nih.gov (2005b): *Ergonovine*. Dostupno na:
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/443884#section=Top> (16.01.2017.)

Shaar CJ i Clemens JA (1972): Inhibition of Lactation and Prolactin Secretion in Rats by Ergot Alkaloid. *Endocrinology*, 90, 285-288.

Speijers GJA, Krajnc-Franken MAM, van Leeuwen FXR, SDanse LHJC, Loebeer JG, Elvers LH, Hoejenbos-Spithout HHM i Janssen GB (1992): *Subacute toxicity experiment with rats fed a diet containing ergotamine tartrate*. Report no. 618312001. National Institute of Public Health and Environmental Protection, Bilthoven.

Speijers GJA, Wester PN, van Leeuwen FXR, de la Fonteyne-Blankestijn L, Post W, van Egmond HP, Sizoo EA i Janssen GB (1993): *Subchronic toxicity experiment with rats fed a diet containing ergotamine tartrate*. Report no. 618312002. National Institute of Public Health and Environmental Protection, Bilthoven.

Uredba Komisije (EU) 2015/1940 od 28. listopada 2015. o izmjeni Uredbe (EZ) br. 1881/2006 u pogledu najvećih dopuštenih količina sklerocija glavice raži na određenim neprerađenim žitaricama te odredaba o praćenju i izvješćivanju. Službeni list Europske unije, L283/3.

Uredba Komisije (EU) br. 1272/2009 od 11. prosinca 2009. o utvrđivanju zajedničkih detaljnih pravila za provedbu Uredbe Vijeća (EZ) br. 1234/2007 u pogledu otkupa i prodaje poljoprivrednih proizvoda u okviru javne intervencije. Službeni list Europske unije, L349/2009.

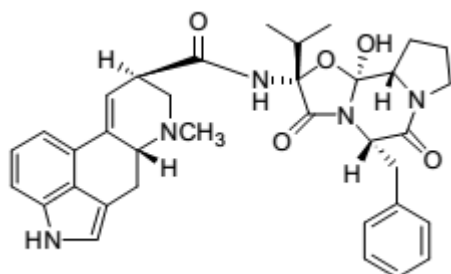
Wolf A (2000): Witchcraft or Mycotoxin? The Salem Witch Trials. *Clinical Toxicology*, 38(4), 457-460

Zeilmaker GH i Carlsen RA (1962): Experimental studies on the effect of ergocornine methanesulphonate on the luteotrophic function of the rat pituitary gland. *Acta Endocrinologica*, 41, 321-335.

DODACI

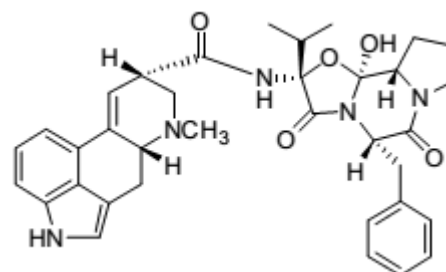
DODATAK 1

Kemijska struktura EA-a obuhvaćenih ovim istraživanjem i znanstvenim izvješćem



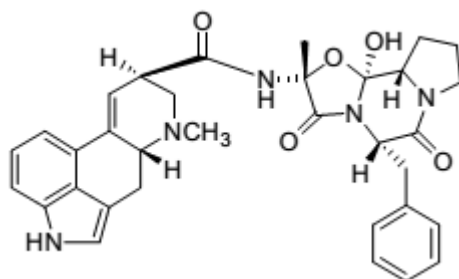
Ergokristin, CAS: 511-08-0

Mol. masa: 609.7 g/mol



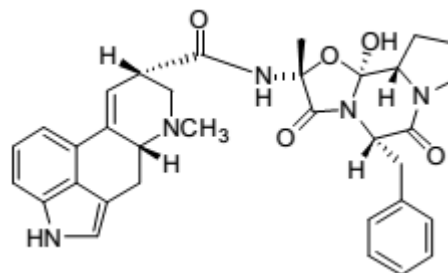
Ergokristinin, CAS: 511-07-9

Mol. masa: 609.7 g/mol



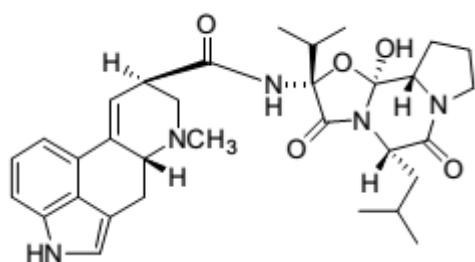
Ergotamin, CAS: 113-15-5

Mol. masa: 581.7 g/mol



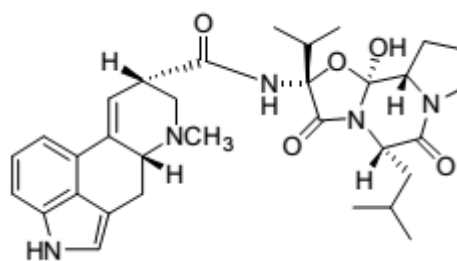
Ergotaminin, CAS: 639-81-6

Mol. masa: 581.7 g/mol



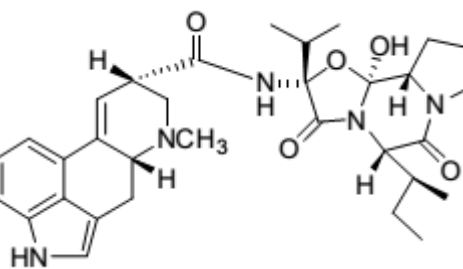
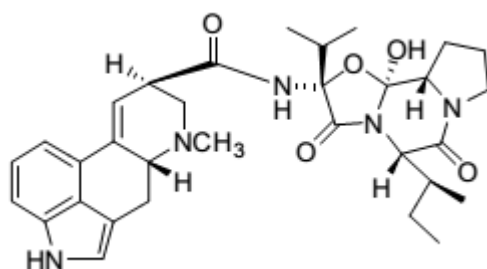
α-ergokriptin, CAS: 511-09-1

Mol. masa: 575.7 g/mol



α-ergokriptinin, CAS: 511-10-4

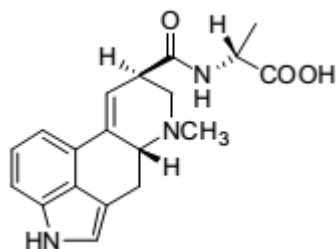
Mol. masa: 575.7 g/mol



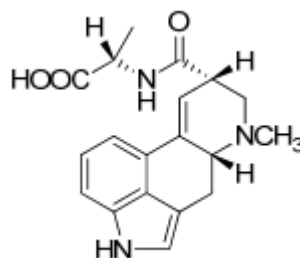
β-ergokriptinin, CAS: 19467-61-9

β-ergokriptin, CAS: 20315-46-2

Mol. masa: 575.7 g/mol

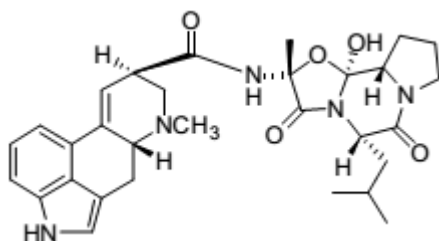


Mol. masa: 575.7 g/mol



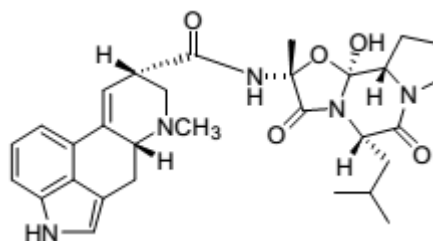
Ergometrin, CAS: 60-79-7

Mol. masa: 339.4 g/mol



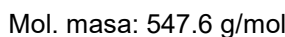
Ergometrinin, CAS: 479-00-5

Mol. masa: 339.4 g/mol



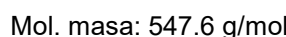
Ergozin, CAS: 561-94-4

Mol. masa: 547.6 g/mol



Ergozinin, CAS: 596-88-3

Mol. masa: 547.6 g/mol



DODATAK 2

a) Koncentracija EA-a u analiziranim uzorcima hrane u sve tri godine

Hrana za ljude			
Opis uzorka	Br. uzoraka	Koncentracija ergot alkaloida [µg/kg]	
		LB ¹	UB ²
Zrna pšenice	3	5,2	14,2
		0	12
		1	12
Zrna raži	30	22,7	23,7
		88,1	89,1
		0	12
		0	12
		130,8	130,8
		0	12
		143,5	145,5
		0	12
		0	12
		1816	1816
		126	130
		0	12
		217	219
		253	253
		138	140
		22	31
		733	733
		0	12
		0	12
		762	762
		77	81
		329	330
		345	345
		433	433
		0	12
		229	233
		0	12
		171	176
		0	12
		304	304
Pšenično brašno	3	0	12

		0	12
		0	12
Pšenična krupica	2	0	12
		0	12
Pšenične mekinje	1	0	12
Raženo brašno	14	536,1	536,1
		225,1	225,1
		136,4	136,4
		144,7	144,7
		4,8	13,8
		1,4	12,4
		131,6	131,6
		175,8	175,8
		41,3	41,3
		314	314
		0	12
		499,7	499,7
		112,4	112,4
		2,5	12,5
Kruh na bazi raži i pšenice	6	80,6	80,6
		28,3	29,3
		20,7	22,7
		33	33
		22,4	25,4
		0	12
Dvopeci, kolačići	2	1	12
		0	12
Hrana za dojenčad i malu djecu	4	0	12
		0	12
		0	12
		0	12

b) Koncentracije EA-a u analiziranim uzorcima hrane za životinje za obje godine

Hrana za životinje			
	Br. uzoraka	Koncentracija ergot alkaloida [µg/kg]	
		LB	UB
Raž i nusproizvodi	7	807,4	807,4
		0	12
		0	12
		1095	1095
		1248,8	1251,8
		0	12
		0	12
Pšenica i nusproizvodi	8	1,7	12,7
		0	12
		0	12
		0	12
		0	12
		0	12
		0	12
		0	12

¹LB – lower bound ili „Scenarij 1“ u kojem se za vrijednosti < LOQ-a koristila 0

²UB – upper bound ili „Scenarij 2“ u kojem se za vrijednosti < LOQ-a koristio puni LOQ (1 µg/kg)

DODATAK 3

a) Koncentracije EA-a i –inin epimera u uzorcima hrane za 2014. god.

Opis uzorka	Ergokristinin	Ergokristin	Ergotaminin	Ergotamin	Ergokriptinin	Ergokriptin	Ergokorninin	Ergokornin	Ergozinin	Ergozin	Ergometrinin	Ergometrin	UKUPNO
Raženo brašno	30,8	118,7	8	37,4	22,1	71,3	11,3	32,1	34,2	95,7	9,1	65,5	536,1
	13	47,3	4,6	20,6	12,6	32,5	8,5	19,2	17,9	31,8	3,5	13,6	225,1
	7	18,2	6,8	24,2	11,1	23,9	8,5	17	4,3	8	1,6	5,8	136,4
	11,4	38,5	2,1	7,2	4,1	10,6	3,6	7,7	12	27,3	2,8	17,4	144,7
	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	1,7	1,5	1,6	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	4,8
	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	1,4	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	1,4
	7,4	45,3	1,2	5,8	3,5	13,5	2,3	6,2	8,5	17,6	1,9	18,4	131,6
	9,2	26,4	7,9	28,6	13,5	29,1	10,3	21,2	6,9	12,6	2	8,1	175,8
	6,9	5,3	2	2,9	4,6	3,2	3,3	1,8	2,6	4,1	2	2,6	41,3
	39,3	40,2	24	30,5	31,4	28,7	30,7	23,1	15,4	22,4	23,1	5,2	314
Pšenično brašno	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Zrna pšenice	< LOQ	1	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	1	3,2	5,2
	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	< LOQ	1	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	1
Zrna raži	3,4	2,8	1,8	2,5	2,6	1,7	1,9	1,2	1,4	2,1	< LOQ	1,3	22,7
	14,5	14,4	4,5	7,6	10,4	8,7	6,7	4,5	6,2	9,6	< LOQ	1	88,1
Kruh na bazi raži i pšenice	10,7	8,3	3,8	6,2	8,1	7,8	5,4	4,6	2,1	10,4	3,1	10,1	80,6
	3,1	2,2	2,4	3,9	3,7	3	2,5	1,6	1,3	2,8	< LOQ	1,8	28,3
	2,6	2	1,5	2	2,2	1,5	1,5	< LOQ	1,4	2,9	< LOQ	3,1	20,7
	5	3,2	1,4	2,2	3,6	2,9	2,5	1,5	1,8	4,2	1,7	3	33
Hrana za dojenčad i malu djecu	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
UKUPNO	164,3	374,8	72	181,6	133,5	241,5	100,5	143,3	116	251,5	51,8	160,1	1990,8

b) Koncentracije EA-a i -inin epimera u uzorcima hrane za životinje za 2014. god.

Opis uzorka	Ergokristinin	Ergokristin	Ergotaminin	Ergotamin	Ergokriptinin	Ergokriptin	Ergokorninin	Ergokornin	Ergozinin	Ergozin	Ergometrinin	Ergometrin	UKUPNO
Raž i nusproizvodi	57	229,5	12,8	63,7	32,4	90,3	16,9	40,6	56,4	107	12	88,8	807,4
	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	14,5	35	1,8	6	43	247,5	11,8	56,6	134	276,1	46,2	222,3	1095
Pšenica i nusproizvodi	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	1,7	1,7
	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
UKUPNO	71,5	264,5	14,6	69,7	75,4	337,8	28,7	97,2	190,4	383,1	58,2	312,8	1904,1

c) Koncentracije EA-a i –inin epimera u uzorcima hrane za 2015. god.

Opis uzorka	Ergokristinin	Ergokristin	Ergotaminin	Ergotamin	Ergokriptinin	Ergokriptin	Ergokorninin	Ergokornin	Ergozinin	Ergozin	Ergometrinin	Ergometrin	UKUPNO
Zrna raži	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	6,4	25,7	1,9	12,2	2,5	15,1	1,9	12,3	3,7	19,8	1,3	28	130,8
	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	< LOQ	5,6	< LOQ	1,2	2,8	7,2	4,1	14,9	3,5	17,9	5	78,6	143,5
	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	33	347,3	2,1	18,9	9,6	48,8	14	74,2	1065,8	82,5	4,2	115,6	1816
Brašno od raži	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	7,3	75,6	7,7	51,2	13,5	54,6	7,8	40,1	13,9	89,6	6	132,4	499,7
	5,3	26,8	1,5	8,2	6,3	14,4	2,6	11,5	13,9	3,9	1	17	112,4
	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	1	1,5	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	2,5
Pšenična krupica	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ

Pšenično brašno	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Pšenične mekinje	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Hrana za dojenčad	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Kruh od raži	2,9	1,7	< LOQ	< LOQ	5,1	1,3	2,5	< LOQ	2,7	4,1	1	1,1	22,4
	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Dvopeći, kolačići	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	1	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	1
	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
UKUPNO	54,9	482,7	13,2	91,7	41,8	142,9	32,9	153	1106,5	217,8	18,5	372,7	2728,6

d) Koncentracije EA-a i -inin epimera u uzorcima hrane za životinje za 2015. god.

Opis uzorka	Ergokristinin	Ergokristin	Ergotaminin	Ergotamin	Ergokriptinin	Ergokriptin	Ergokorninin	Ergokornin	Ergozinin	Ergozin	Ergometrinin	Ergometrin	UKUPNO
Raž i nusproizvodi	42,9	293,2	< LOQ	5,9	1,1	4,2	69	199,4	139	494,1	< LOQ	< LOQ	1248,8
	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Pšenica i nusproizvodi	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
UKUPNO	42,9	293,2	0	5,9	1,1	4,2	69	199,4	139	494,1	0	0	1248,8

e) Koncentracije EA-a i –inin epimera u uzorcima hrane za 2016. god.

Opis uzorka	Ergokristinin	Ergokristin	Ergotaminin	Ergotamin	Ergokriptinin	Ergokriptin	Ergokorninin	Ergokornin	Ergozinin	Ergozin	Ergometrinin	Ergometrin	UKUPNO
Zrna raži	6	52	1	11	<LOQ	2	<LOQ	<LOQ	8	28	<LOQ	18	126
	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	9	37	1	4	<LOQ	1	2	10	34	110	<LOQ	9	217
	12	22	3	13	4	20	6	20	15	46	7	85	253
	4	26	<LOQ	<LOQ	2	11	3	9	8	26	2	47	138
	2	9	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	11	22
	46	130	12	33	11	59	5	16	50	145	9	217	733
	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	46	62	10	65	55	66	13	50	50	96	28	221	762
	2	13	<LOQ	<LOQ	<LOQ	7	3	14	7	24	<LOQ	7	77
	4	23	<LOQ	3	35	66	12	48	18	57	5	58	329
	5	27	1	12	11	38	27	86	18	33	3	84	345
	17	35	7	61	22	28	9	34	26	72	6	116	433
	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	55	68	8	20	16	38	1	23	229
	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	6	53	2	9	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	11	47	<LOQ	43	171
	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	18	56	5	23	2	26	3	30	23	73	2	43	304
UKUPNO	177	545	42	234	197	392	91	337	284	795	63	982	4139