

Razvoj LC-MS/MS metode za određivanje reguliranih mikotoksina te njihova supojavnost u uzorcima hrvatskih žitarica

Kovač, Marija

Doctoral thesis / Disertacija

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:293052>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-02**

REPOZITORIJ

PTFS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

Marija Kovač

**Razvoj LC-MS/MS metode za određivanje reguliranih
mikotoksina te njihova supojavnost u uzorcima hrvatskih
žitarica**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Osijek, srpanj, 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA**DOKTORSKA DISERTACIJA**

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Poslijediplomski sveučilišni studij Prehrambeno inženjerstvo

Zavod za primijenjenu kemiju i ekologiju
Katedra za biokemiju i toksikologiju
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska
UDK:

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Znanstvena grana: inženjerstvo
Tema rada: je prihvaćena na IX. sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek održanoj 20. srpnja 2020.
Voditelj: dr. sc. Bojan Šarkanj, izv. prof.

RAZVOJ LC-MS/MS METODE ZA ODREĐIVANJE REGULIRANIH MIKOTOKSINA TE NJIHOVA
SUPOJAVNOST U UZORCIMA HRVATSKIH ŽITARICA
Marija Kovač, 65/D

Sažetak:

Praćenje pojavnosti i supojavnosti mikotoksina, toksičnih sekundarnih metabolita plijesni, neophodno je za utvrđivanje zdravstvene ispravnosti sirovine i/ili proizvoda. U okviru ove doktorske disertacije razvijena je LC-MS/MS multimikotoksinska metoda za istovremeno određivanje 11 zakonodavstvom reguliranih mikotoksina u žitaricama i proizvodima (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, DON, FB1, FB2, ZEA, T-2, HT-2 i OTA) uz minimalnu pripremu uzoraka baziranu na ekstrakciji čvrsto-tekuće smjesom otapala (acetonitril/voda/mravlja kiselina, 79/20/1, v/v/v) te razrjeđivanju sirovog ekstrakta (acetonitril/voda/mravlja kiselina, 20/79/1, v/v/v) prije analize. Prikadnost metode za namjenu je dokazana kroz validaciju metode, pri čemu su ispitane značajke metode zadovoljile zakonski postavljene kriterije prihvatljivosti. Metoda je korištena za analizu 209 uzoraka žitarica (kukuruz, pšenica, ječam, zob, raž i tritikal) žetve 2016. i 2017. iz svih hrvatskih županija. Najčešći pronađeni metaboliti u žitaricama obje godine bili su *Fusarium* mikotoksini, u prvom redu DON i HT-2. Ukupno 17 uzoraka nije bilo sukladno propisanim vrijednostima za hranu, od čega dva uzorka niti propisanim vrijednostima za hranu za životinje. Čak 50,0% uzoraka žetve 2016. te 33,7% žetve 2017. je bilo kontaminirano s dva ili više regulirana mikotoksina (2016. najčešće DON, FB1, FB2, ZEA, T-2 i HT-2 u kukuruzu, 2017. DON i HT-2 u pšenici te FB1 i FB2 u kukuruzu). Najkontaminiranija žitarica bio je kukuruz u obje godine, s FB1-om kao najzastupljenijim mikotoksinom. Umjerene temperature s razdobljima visoke vlažnosti zraka pogodovale su akumulaciji DON-a u uzorcima pšenice umjesto drugih *Fusarium* mikotoksina, dok su slični uvjeti pogodovali kontaminaciji kukuruza FUM-om.

Ključne riječi: validacija, LC-MS/MS, žitarice, supojavnost mikotoksina, vremenski uvjeti

Rad sadrži: 160 stranica
67 slika
32 tablice
6 priloga
145 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1.	dr. sc. Tomislav Klapac, red. prof.	predsjednik
2.	dr. sc. Mirela Samardžić, izv. prof.	član
3.	dr. sc. Ivana Flanjak, izv. prof.	član
4.	dr. sc. Jelka Pleadin, izv. prof.	zamjena člana

Datum obrane: 24. srpnja 2020.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Rektoratu sveučilišta u Osijeku, Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu te samo u elektroničkom obliku u Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici u Osijeku

BASIC DOCUMENTATION CARD**DOCTORAL THESIS**

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Postgraduate University Study Food Engineering

Department of Applied Chemistry and Ecology
Subdepartment of Biochemistry and Toxicology

Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

UDC:

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Food technology

Thesis subject was approved by the Faculty Council of the Faculty of Food Technology at its session no. IX held on July 20, 2020.

Mentor: Bojan Šarkanj, PhD, associate prof.

DEVELOPMENT OF LC-MS/MS METHOD FOR DETERMINATION OF REGULATED MYCOTOXINS AND THEIR CO-OCCURRENCE IN CROATIAN CEREALS

Marija Kovač, 65/D

Summary:

Monitoring the occurrence and co-occurrence of mycotoxins, toxic secondary metabolites of toxigenic fungi, is necessary to determine the safety of the raw material and/or products. Within this doctoral dissertation, a multimycotoxin LC-MS/MS method for the simultaneous determination of 11 regulated mycotoxins in cereals and products (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, DON, FB1, FB2, ZEA, T-2, HT-2 and OTA) was developed. A simple sample preparation was based on solid-liquid extraction using solvent mixture (acetonitrile/water/formic acid, 79/20/1, v/v/v) and dilution of crude extract (acetonitrile/water/formic acid, 20/79/1, v/v/v) before analysis. The fitness of the method for the purpose was proven through the validation of the method, where the tested features of the method met the legally set acceptability criteria. The method was used to analyze 209 cereal samples (maize, wheat, barley, oats, rye and triticale) of 2016 and 2017 harvest from all Croatian counties. The most common metabolites found in cereals in both years were *Fusarium* mycotoxins, primarily DON and HT-2. A total of 17 samples did not comply with the highest permitted values for food, two of which did not meet the recommended values for animal feed. Out of all investigated samples of 2016 and 2017 harvest, 50.0% and 33.7% of samples respectively, were contaminated with two or more regulated mycotoxins (most frequent in 2016 DON, FB1, FB2, ZEA, T-2 and HT-2 in corn, in 2017 DON and HT-2 in wheat and FB1 and FB2 corn). The most contaminated cereal was maize in both years, with FB1 being the most prevalent mycotoxin. Moderate temperatures with periods of high air humidity favored DON accumulation in wheat samples instead of other *Fusarium* mycotoxins, while similar conditions favored maize contamination with FUM.

Key words: validation, LC-MS/MS, cereals, mycotoxin co-occurrence, meteorological conditions

Thesis contains: 160 pages
67 figures
32 tables
6 supplements
145 references

Original in: Croatian

Defense committee:

- | | |
|---|--------------|
| 1. <i>Tomislav Klavec</i> , PhD, prof. | chair person |
| 2. <i>Mirela Samardžić</i> , PhD, associate prof. | member |
| 3. <i>Ivana Flanjak</i> , PhD, associate prof. | member |
| 4. <i>Jelka Pleadin</i> , PhD, associate prof. | stand-in |

Defense date: July 24, 2020

Printed and electronic (pdf format) versions of thesis are deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, University of Osijek; President's office, University Library in Zagreb and only in electronic version in University Library in Osijek

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	4
2.1. Mikotoksini	5
2.1.1. Pojavnost mikotoksina	5
2.1.2. Klasifikacija mikotoksina	8
2.1.3. Procesiranje hrane i mikotoksini	11
2.1.4. Zakonodavstvo i RASFF sustav	12
2.2. Tekućinska kromatografija – spektrometrija masa	15
2.2.1. Tekućinska kromatografija	15
2.2.2. Sprega LC-MS i načini ionizacije	17
2.2.3. Analizatori masa u vezanom sustavu LC-MS	20
2.3. Određivanje mikotoksina	26
2.3.1. Uzorkovanje i priprema uzoraka	26
2.3.2. Analitičke tehnike	28
2.3.3. LC-MS multimikotoksinske metode	29
2.3.4. Utjecaj matrice	30
2.4. Validacija analitičkih metoda	34
2.4.1. Izvedbene značajke metode i kriteriji prihvatljivosti	35
2.4.2. Mjerna nesigurnost	35
3. EKSPERIMENTALNI DIO	41
3.1. Zadatak	42
3.2. Materijali i metode	43
3.2.1. Razvoj LC-MS/MS multimikotoksinske metode bazirane na razrijedi i mjeri principu	44
3.2.2. Validacija razvijene LC-MS/MS multimikotoksinske metode	48
3.2.3. Primjena razvijene i validirane LC-MS/MS multimikotoksinske metode	55
4. REZULTATI I RASPRAVA	61
4.1. Optimizacija UHPLC-MS/MS uvjeta	62
4.2. Optimizacija postupka ekstrakcije	71
4.3. Validacija metode i procjena mjerne nesigurnosti	74
4.4. Analiza prikupljenih uzoraka	94
5. ZAKLJUČCI	116
6. LITERATURA	120
7. PRILOZI	132

Popis oznaka, kratica i simbola

AA	Amonijev acetat
ACN	Acetonitril
AF	Amonijev formijat
AFB1	Aflatoksini B1
AFB2	Aflatoksini B2
AFG1	Aflatoksini G1
AFG2	Aflatoksini G2
AFM1	Aflatoksini M1
AFM2	Aflatoksini M2
AFT	Aflatoksini
APCI	Kemijska ionizacija pri atmosferskom tlaku, eng. <i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i>
API	Tehnika ionizacije pri atmosferskom tlaku, eng. <i>Atmospheric Pressure Ionization</i>
APPI	Fotoionizacija pri atmosferskom tlaku, eng. <i>Atmospheric Pressure Photoionization</i>
APPRRR	Agencija za plaćanja u poljoprivredi, ribarstvu i ruralnom razvoju
BIPM	Međunarodni ured za utege i mjere, franc. <i>Bureau International des Poids et Mesures</i>
CFU-GM	eng. <i>Colony Forming Unit-Granulocyte and Macrophage</i>
CID	Kolizijski inducirana disocijacija, eng. <i>Collision Induced Dissociation</i>
CIT	Citrinin
(C)RM	(Certificirani) referentni materijal
DAD	Detektor s nizom dioda, eng. <i>Diode Array Detector</i>
DON	Deoksinivalenol
ELISA	Enzimsko imunokemijska metoda, eng. <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ESI	Elektrosprejna ionizacija, eng. <i>Electrospray Ionization</i>
FA	Mravlja kiselina, eng. <i>Formic Acid</i>
FB1	Fumonizin B1
FB2	Fumonizin B2
FID	Plameno-ionizacijski detektor, eng. <i>Flame Ionization Detector</i>
FLD	Fluorescentni detektor
FTIR	Detektor infracrvene spektroskopije s Fourierovom transformacijom, eng. <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy Detector</i>

FUM	Fumonizini
GC	Plinska kromatografija, eng. <i>Gas Chromatography</i>
GC-MS	Vezani sustav plinske kromatografije i spektrometrije masa, eng. <i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i>
GUM	Uputa za iskazivanje mjerne nesigurnosti, eng. <i>Guide to the expression of uncertainty in measurement</i>
HAc	Octena kiselina, eng. <i>Acetic acid</i>
HRMS	Spektrometar masa visoke razlučivosti, eng. <i>High Resolution Mass Spectrometer</i>
HTC 116	Tumorske stanice debelog crijeva, eng. <i>Human Colon Cancer Cells</i>
IAC	Imunoafinitetne kolone, eng. <i>Immunoaffinity Columns</i>
IARC	Međunarodna agencija za istraživanje raka, eng. <i>International Agency for Research on Cancer</i>
IPEC-J2	Epitelne stanice tankog crijeva svinja, eng. <i>Intestinal Porcine Epithelial Cells</i>
IS	Interni standard
ISO	Međunarodna organizacija za normizaciju, eng. <i>International Organization for Standardization</i>
IT	Stupica iona, eng. <i>Ion Trap</i>
LC	Tekućinska kromatografija, eng. <i>Liquid Chromatography</i>
LC-MS	Vezani sustavi tekućinske kromatografije i spektrometrije masa
LFIC	Test lateralnog protoka, LFIC, eng. <i>Lateral Flow Immunochromatography</i>
LLE	Tekućinsko-tekućinska ekstrakcija, LLE, eng. <i>Liquid-liquid extraction</i>
LOD	Granica detekcije, eng. <i>Limit Of Detection</i>
LOQ	Granica kvantifikacije, eng. <i>Limit Of Quantification</i>
LRMS	Spektrometar masa niske razlučivosti, eng. <i>Low Resolution Mass Spectrometer</i>
m/z	Omjer mase i naboja
MeOH	Metanol
MRM	Praćenje višestrukih reakcija, eng. <i>Multiple Reaction Monitoring</i>
MS	Spektrometrija masa, eng. <i>Mass Spectrometry</i>
NDK	Najveća dozvoljena koncentracija
NP	Normalno-fazna (kromatografija), eng. <i>Normal Phase</i>
Orbitrap	Orbitalna stupica iona, eng. <i>Orbital Ion Trap</i>
OTA	Ohratoksin A
OTB	Ohratoksin B
OTC	Ohratoksin C

OT α	Ohratoksin alfa
PAT	Patulin
PT	Ispitivanja sposobnosti, eng. <i>Proficiency Testing</i>
Q	Kvadrupol, eng. <i>Quadrupole</i>
QqQ	Trostruki kvadrupolni analizator masa
QuEChERS	Brza, jednostavna, jeftina, efektivna, robusna i sigurna metoda ekstrakcije, eng. <i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe</i>
R	Iskorištenje, eng. <i>Recovery</i>
R _A	Prividno iskorištenje, eng. <i>Apparent Recovery</i>
RASFF	Sustav brzog uzbunjivanja za obavješćivanje o izravnom ili neizravnom riziku za zdravlje ljudi koji potječe od hrane ili hrane za životinje eng. <i>Rapid Alert System for Food and Feed</i>
R _E	Iskorištenje ekstrakcije, eng. <i>Extraction Recovery</i>
RP	Reverzno-fazna (kromatografija), eng. <i>Reverse Phase</i>
RSD	Relativna standardna devijacija
RSD _M	Relativna standardna devijacija mjerenja
RSD _P	Relativna standardna devijacija pripreme uzoraka
S/N	Omjer signal/šum, eng. <i>Signal/Noise</i>
SANTE	Vodič za kontrolu analitičke kvalitete i postupaka validacije metode za određivanje pesticida u hrani i hrani za životinje
SPE	Ekstrakcija na čvrstoj fazi, eng. <i>Solid-Phase Extraction</i>
SRM	Praćenje izabranih reakcija, eng. <i>Selected Reaction Monitoring</i>
SSE	Praćenje izabranih reakcija, eng. <i>Selected Reaction Monitoring</i>
TIC	Kromatogram ukupnih iona, eng. <i>Total Ion Chromatogram</i>
TLC	Tankoslojna kromatografija, eng. <i>Thin-layer Chromatography</i>
TOF	(Analizator) vremena leta, eng. <i>Time of Flight</i>
(U)HPLC	Tekućinska kromatografija (ultra)visoke djelotvornosti, eng. <i>Ultra High Performance Liquid Chromatography</i>
UV-Vis	Ultraljubičasto-vidljivi (spektar), eng. <i>Ultraviolet-Visible</i>
XIC	Kromatogram ekstrahiranih iona, eng. <i>Extracted Ion Chromatogram</i>
ZEA	Zearalenon

1.UVOD

Mikotoksini su jedan od ključnih čimbenika zdravlja ljudi i životinja te svjetske trgovine i ekonomije (Bhat i sur., 2010.). Iako se ulažu znatni naponi u kontroli fungalne kontaminacije, pojavnost mikotoksina u hrani i hrani za životinje je značajna te prema najnovijim istraživanjima ona iznosi čak 60-90% (Streit i sur., 2013.; Kovalsky i sur., 2016.; Eskola i sur., 2019.).

Geografska rasprostranjenost mikotoksina vezana je uz klimatske uvjete pri kojima rastu pojedine vrste plijesni. Primjerice, AFT koje uglavnom proizvode plijesni roda *Aspergillus* pronalaze se češće i pri većim koncentracijama u tropskom i suptropskom području, dok se *Fusarium* mikotoksini pronalaze u umjerenom klimatskom području, kao što je područje Republike Hrvatske (Bhat i sur., 2010.; Domaćinović i sur., 2012.; Pleadin i sur., 2017.). Pojavnost mikotoksina na određenom geografskom području uvelike ovisi o sezonskim i lokalnim vremenskim uvjetima tijekom kritičnih faza rasta biljaka (prije i tijekom cvatnje ili tijekom zrenja zrna). Tako sušna razdoblja tijekom godine pogoduju rastu *Aspergillus* plijesni i biosintezi AFT-a, dok kišna razdoblja pogoduju biosintezi *Fusarium* mikotoksina (Battilani i sur., 2016.). Visoka varijabilnost u pojavnosti mikotoksina može biti rezultat čimbenika kao što su različita vrsta analiziranih uzoraka, godina provođenja analize i fluktuacije u vremenskim prilikama tijekom godine, te njihova heterogena distribucija unutar uzorka (Pinotti i sur., 2016.). Globalne klimatske promjene mogle bi promijeniti pojavnost mikotoksina te se u budućnosti očekuje veća pojavnost *Fusarium* mikotoksina na sjeveru Europe i *Aspergillus* vrsta u središnjoj Europi (Battilani i sur., 2012.; 2016.).

Budući da su žitarice još uvijek jedan od najvažnijih izvora hrane, praćenje koncentracije mikotoksina te utvrđivanje sukladnosti s legislativom i zdravstvene ispravnosti je od iznimne važnosti (Cheli i sur., 2014.). Nadalje, podaci o pojavnosti mikotoksina su neophodni za procjenu rizika izloženosti mikotoksinima, posebice kad se uzme u obzir moguća istovremena kontaminacija proizvoda s više vrsta mikotoksikogenih plijesni i mikotoksina te njihovo nepovoljno zbirno i sinergističko djelovanje po zdravlje ljudi i životinja. Prema istraživanjima, na globalnoj razini 30-100% uzoraka hrane i hrane za životinje je kontaminirano s više od jednog mikotoksina (Pinotti i sur., 2016.; Eskola i sur., 2019.).

Slijedom navedenog, nužna je stalna kontrola razina kontaminacije sirovina, poluproizvoda i proizvoda mikotoksinima i to pouzdanim analitičkim metodama za istovremeno određivanje više kemijski različitih spojeva primjenom tehnike kao što je LC-MS/MS. S obzirom na kemijski raznoliku prirodu mikotoksina, razvoj multimikotoksinske metode koristeći je LC-MS/MS predstavlja izazov. Potrebno je voditi računa o uvjetima pripreme uzorka i ekstrakcije analita, kromatografskim uvjetima separacije, a posebno o smanjenju utjecaja kompleksne matrice na učinkovitost ionizacije spoja i određivanju na spektrometru masa (Sulyok i sur., 2006.; 2007.; 2020.; Malachová i sur., 2014.; Tittlemier i sur., 2019.).

Upravo je cilj ovog doktorskog rada razvoj i validacija LC-MS/MS metode za određivanje zakonski reguliranih mikotoksina u žitaricama i proizvodima. Razvijena metoda bi se primijenila za provođenje istraživanja pojavnosti i supojavnosti reguliranih mikotoksina u žitaricama žetve 2016. i 2017. iz svih hrvatskih županija te izrade korelacije kontaminacije određenim mikotoksinima s vremenskim uvjetima na pojedinim mikrolokacijama, a sve sa svrhom stjecanja novih spoznaja o kontaminaciji mikotoksinima u Republici Hrvatskoj koje će doprinijeti istraživanju sinergističkih djelovanja mikotoksina te naposljetku zaštiti zdravlja potrošača.

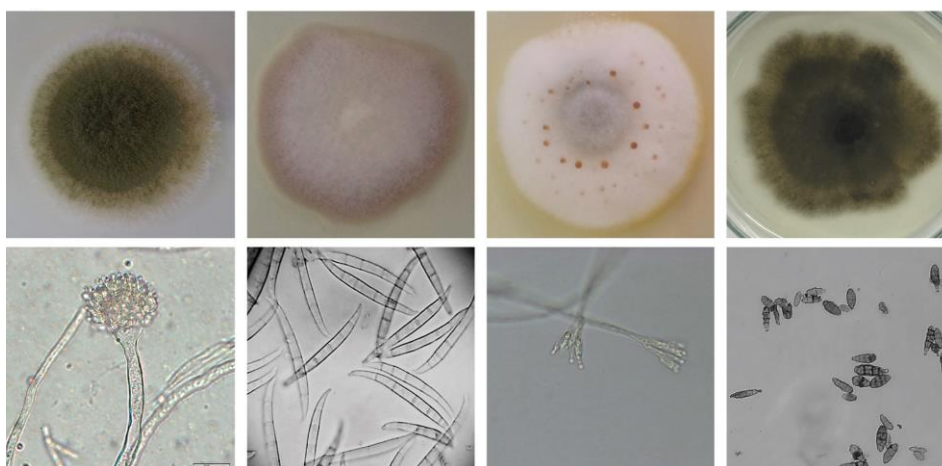
2. TEORIJSKI DIO

2.1. Mikotoksini

2.1.1. Pojavnost mikotoksina

Mikotoksini su toksični sekundarni metaboliti nekih vrsta filamentoznih gljiva (plijesni) te neizbježni prirodni kontaminanti hrane. Smatraju se jednim od važnijih kroničnih čimbenika rizika u prehrani, a bolesti koje uzrokuju kod ljudi i životinja se nazivaju mikotoksikoze (Bennett i Klich, 2003.). Riječ mikotoksin potječe od grčke riječi *mykes* što znači gljiva i latinske riječi *toxicum* što znači otrov te bi se doslovno mogla prevesti kao „otrov iz gljiva“. Konačan broj mikotoksina je nepoznat, no smatra se da postoji nekoliko tisuća sekundarnih metabolita plijesni od kojih se mikotoksini izdvajaju po svojoj toksičnosti pri niskim koncentracijama (Bennett, 1987.; Kovač i sur., 2018.).

Mikotoksine proizvodi čitav niz toksikogenih plijesni, a najveći broj vrsta pripadaju plijesnima roda *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* i *Alternaria* (Kovač i sur., 2018.), koje su prikazane na **Slici 1**. Kontaminacija hrane i hrane za životinje plijesnima i mikotoksinima se može dogoditi prije žetve, kontaminacijom usjeva na polju te nakon žetve, tijekom skladištenja, procesiranja i/ili transporta, a sve u slučaju optimalnih uvjeta za rast i produkciju (povoljne temperature, vlažnosti zraka, aktiviteta vode, pH, CO₂, i dr.). Za različite vrste plijesni različiti su i povoljni uvjeti za rast. Primjerice, *Aspergillus* i *Penicillium* vrste rastu pri nižem aktivitetu vode i višim temperaturama zraka u usporedbi s *Fusarium* vrstama koje općenito zahtijevaju veći aktivitet vode i niže temperature zraka (Bhat i sur., 2010.; Eeckhout i sur., 2013.).



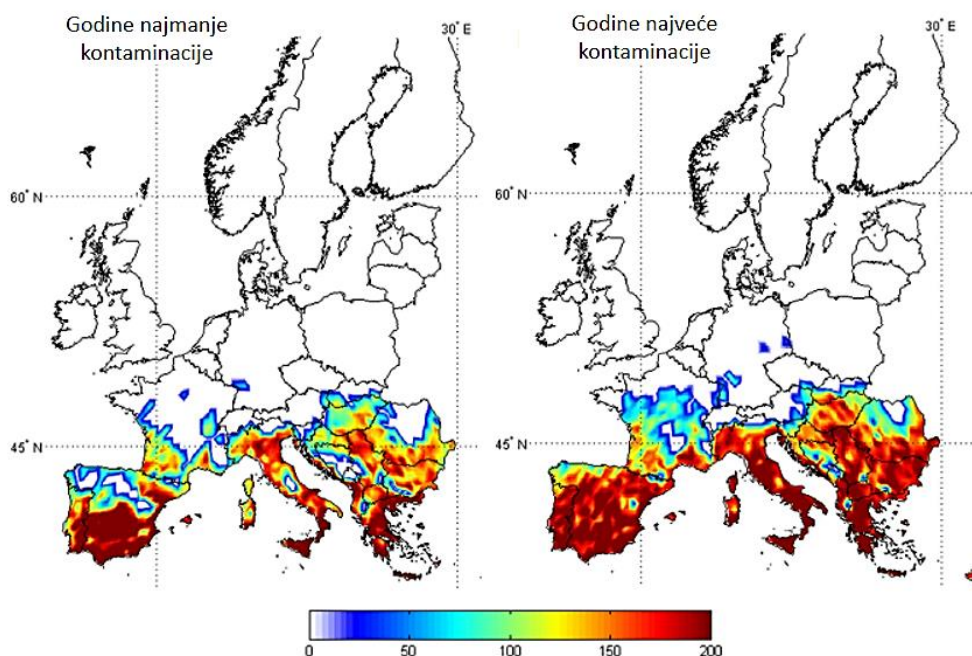
Slika 1 Najznačajnije mikotoksikogene plijesni s pripadajućim mikrofotografijama konidija, s lijeva na desno: *Aspergillus flavus* (NRRL 3251); *Fusarium verticillioides* (CBS 119.825); *Penicillium expansum* (CBS 325.48); i *Alternaria alternata* (wt) uzgajane na PDA podlozi sedam dana (Kovač i sur., 2018).

Vrsta i količina mikotoksina nastalih sekundarnim metabolizmom mikotoksikogenih plijesni ovise o međudjelovanju čimbenika kao što su vrsta supstrata, udio vlage, dostupnost nutrijenata, temperatura, vlažnost okoliša, zrelost kolonije, prisustvo drugih vrsta plijesni, kompeticija s drugim mikroorganizmima, oštećenje supstrata djelovanjem insekata i dr. (Bhat i sur., 2010.; Eeckhout i sur., 2013.). Prema tome, pojavnost mikotoksina uvelike ovisi o klimatskim čimbenicima te meteorološkim uvjetima koji variraju od godine do godine. Tako se AFT koje uglavnom proizvode *Aspergillus* vrste nalaze češće i u većim koncentracijama u tropskom i subtropskom području, a *Fusarium* mikotoksini u umjerenom klimatskom području. Također, duga sušna razdoblja tijekom godine pogoduju produkciji AFT, dok kišna razdoblja pogoduju nastanku *Fusarium* mikotoksina (Bhat i sur., 2010.; Domaćinović i sur., 2012.). Istraživanja pojavnosti mikotoksina u hrvatskim žitaricama i proizvodima ukazuju na učestalost kontaminacije usjeva upravo *Fusarium* mikotoksinima, u prvom redu FUM-om, DON-om i ZEA-om. Autori također ukazuju na povezanost vrste i koncentracije pronađenih mikotoksina s klimatskim, odnosno meteorološkim uvjetima u godini žetve žitarica (Pleadin i sur., 2012.a-c; 2013.; 2017.; Španić i sur., 2018.; 2019.; Habschied i sur., 2019).

Ipak, očekivane klimatske promjene mogle bi promijeniti pojavnost mikotoksina. Prema predviđanjima Bebbler i sur. (2013.) pod utjecajem čimbenika klimatskih promjena se bolesti i štetnici premještaju prema polovima brzinom 3-5 km/god. Isto se može pretpostaviti i za mikotoksikogene plijesni pa je moguća promjena vrsta mikotoksina i njihove učestalosti u pojedinim dijelovima Europe. Tako se u budućnosti očekuje veća pojavnost *Fusarium* mikotoksina na sjeveru Europe te *Aspergillus* vrsta u središnjoj Europi, a koji su do sada bili karakteristični za jug Europe (Battilani i sur., 2012.; 2016.).

Interakcije čimbenika klimatskih promjena, kao što su povišena koncentracija CO₂, porast temperature te ekstremne izmjene sušnih i kišnih razdoblja imaju sve značajniji utjecaj na rast mikotoksikogenih plijesni i produkciju mikotoksina. Prema dostupnim podacima, u sljedećih 25-50 godina se očekuje porast koncentracije atmosferskog CO₂ između dva i tri puta te rast temperature za 2-5 °C praćen sušnim razdobljima (Medina i sur., 2017.). Iako su plijesni uglavnom otporne na povišenu koncentraciju CO₂, u kombinaciji s drugim čimbenicima klimatskih promjena CO₂ može imati značajan indirektan utjecaj na produkciju mikotoksina (npr. promjenom omjera roditeljske i modificirane forme, kompeticijom između mikotoksina koje proizvode iste vrste plijesni i sl.), povezan s faktorima stresa zbog suše, oštećenja biljke insektima i promjenama u fenologiji usjeva, poput promjena vremena cvatnje i zrenja žitarica (Van Der Fels-Klerx i sur., 2016.; Medina i sur., 2017.; Kovač i sur., 2018.). Modeliranje utjecaja potencijalnih klimatskih promjena na fenologiju pšenice na području sjeverozapadne Europe koje su proveli Van Der Fels-Klerx i sur. (2012.) predviđa raniju cvatnju i zrenje ozime pšenice,

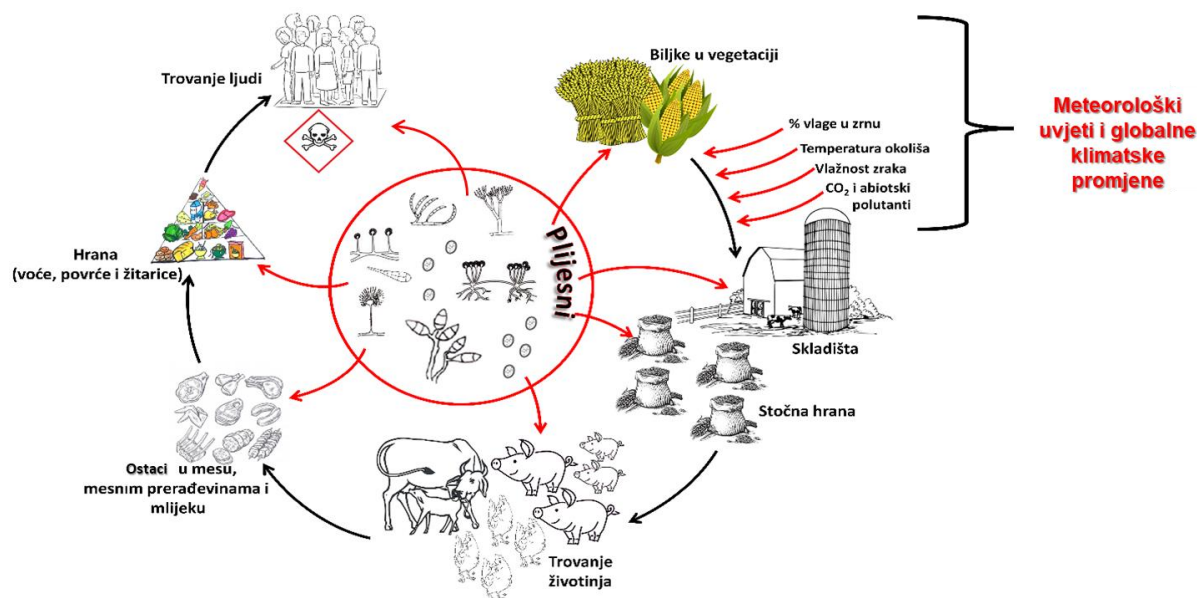
i to između jednog i dva tjedna, kao i povećanu kontaminaciju usjeva DON-om. Utjecaj klimatskih promjena na kontaminaciju žitarica AFT-ima za područje Europe istraživali su Battilani i sur., (2012.; 2016.). Prema predviđanjima, kao rezultat porasta temperature za 2 °C u sljedećih 100 godina AFB1 će postati značajna prijetnja sigurnosti hrane u istočnoj Europi, na Balkanskom poluotoku i Mediteranu, kroz povećanu kontaminaciju kukuruza aflatoksikogenim plijesnima.



Slika 2 Kontaminacija kukuruza AFT-ima u scenariju povećanja temperature za 2 °C (prilagođeno iz Battilani i sur., 2016.)

Podaci su dobiveni modelima predviđanja razvijenim od Battilani i sur. (2016.) s obzirom na predviđene klimatske promjene. Lijeva strana prikazuje godinu najmanje, a desna godinu najveće kontaminacije AFT-ima. Ljestvica 0-200 se odnosi na indeks rizika od kontaminacije: veći broj predstavlja i veći rizik od kontaminacije.

Osim spomenutim direktnim načinom kroz kontaminaciju hrane ili hrane za životinje mikotoksikogenim plijesnima, mikotoksini u prehrambeni lanac ljudi i životinja mogu ući i indirektno, konzumacijom mesa ili mlijeka životinja koje su konzumirale hranu kontaminiranu mikotoksini (Bhat i sur., 2010.; Perši i sur., 2011.). Prisustvo plijesni u namirnici ne znači nužno prisutnost mikotoksina, no s druge strane odsutnost vidljivih plijesni u hrani ne znači i odsutnost mikotoksina jer se mogu zadržati u supstratu dugo nakon nestanka plijesni (Klapec i Šarkanj, 2010.). Na **Slici 3** su prikazani izvori kontaminacije te unos mikotoksina u organizam.



Slika 3 Put kontaminacije mikotoksinima (prilagođeno iz Ožegović i Pepeljnjak, 1995.)

Bolesti koje mikotoksini uzrokuju kod ljudi i životinja se nazivaju mikotoksikoze, a ozbiljnost bolesti ovisi o toksičnosti mikotoksina, opsegu izloženosti, dobi i prehranbenom statusu oboljelog te mogućem synergističkom djelovanju drugih kemikalija kojima je osoba izložena (Peraica i sur., 1999.; Bennett i Klich, 2003.). Najduže poznata mikotoksikoza je ergotizam („Vatra sv. Antuna“ ili „sveti požar“), bolest koja se učestalo pojavljivala između 8. i 16. stoljeća, uzrokovana konzumacijom hrane kontaminirane plijesni *Claviceps purpurea* i ergot alkaloidima (Bhat, 2010.). Nakon pojave tzv. bolesti X (akutnog otrovanja AFT-ima) 1960.-ih i veterinarske krize koju je uzrokovala, toksični učinci mikotoksina su se počeli značajnije proučavati (Bennet i Klich, 2003.; Zain, 2011.; Domaćinović i sur., 2012.). Danas je poznato da mikotoksini imaju niz svojstava koja djeluju štetno na ljude i životinje pri čemu često mogu istovremeno djelovati na različite načine i ciljna mjesta u organizmu (Domaćinović i sur., 2012.).

2.1.2. Klasifikacija mikotoksina

Klasifikacija mikotoksina nije jednostavna te ih je moguće podijeliti na više osnova. Primjerice, kliničari ih dijele prema toksičnom učinku koji pokazuju u nositelja (hepatotoksini, nefrotoksini, neurotoksini, imunotoksini, itd.), molekularni biolozi ih svrstavaju u generičke grupe (teratogeni, karcinogeni, mutageni, alergeni, itd.), organski kemičari i biokemičari ih dijele prema strukturi ili biosintetskom izvoru (derivati terpena, derivati kumarina, derivati laktona i sl.), dok ih mikolozi dijele prema plijesni koja ih proizvodi (*Aspergillus* toksini, *Fusarium* toksini, itd.). Ipak, ni jedna podjela nije sasvim zadovoljavajuća zbog specifičnosti pojedinog mikotoksina, koji se može podijeliti u više kemijskih skupina, imati više načina djelovanja te ga

može proizvoditi više vrsta plijesni. Tako AFT, koji spadaju u derivate kumarina, ali imaju i difuransku strukturu, pokazuju hepatotoksična, mutagena i karcinogena svojstva, a proizvode ih većinom plijesni roda *Aspergillus*, no mogu ih proizvoditi i druge vrste (Bennett i Klich, 2003.).

Aflatoksini

AFT su prvi izolirani i karakterizirani mikotoksini, otkriveni nakon masovnog pomora peradi sredinom prošlog stoljeća, uzrokovanog konzumacijom hrane na bazi kikirikija kontaminiranog aflatoksikogenim plijesnima (Bennet i Klich, 2003.). AFT su derivati kumarina koje proizvode plijesni roda *Aspergillus*, u prvom redu *A. flavus* i *A. parasiticus*. *A. flavus* je plijesan sveprisutna u prirodi, kolonizira uglavnom nadzemne dijelove biljke te proizvodi B AFT (AFB1 i AFB2), dok *A. parasiticus* proizvodi B (AFB1 i AFB2) i G AFT (AFG1 i AFG2) te je prilagođenija okolišu tla (Marin i sur., 2013.). Kao prirodni fluorescirajući spojevi vidljivi su u UV-spekttru pri valnoj duljini od 365 nm te su imena B i G bazirana na njihovim fluorescentnim svojstvima: B za plavu (eng. *blue*) i G za zelenu (eng. *green*). Hidroksilirani metaboliti AFB1 i AFB2 nastali u jetri nakon unosa kontaminirane hrane nazivaju se AFM1 i AFM2, a mogu se pronaći u mlijeku (i životinja i ljudi), urinu i fecesu (Peraica i sur., 1999.; Kovač i sur., 2018.). Također, AFM1 mogu sintetizirati i neke vrste plijesni (Schaarschmidt i Fauhl-Hassek, 2019.) te se može naći i u žitaricama i proizvodima od žitarica (Houissa i sur., 2019; Ezekiel i sur., 2019).

AFT su se pokazali izrazito potentnim karcinogenima kod svih istraživanih životinja (miševi, štakori, ribe, patke, majmuni), a jetra su im glavni ciljani organ. Na osnovi provedenih toksikoloških studija i dokaza karcinogenosti AFT-a za čovjeka, IARC je klasificirala AFT (uključujući AFB1, AFG1, AFM1) u skupinu 1, kao dokazane karcinogene (IARC, 2012.).

Ohratoksin A

Ohratoksini su skupina bliskih derivata dihidroizokumarina povezanih s L-β-fenilalaninom koju čine: OTA, OTB, OTC i OTα. Najtoksičniji i najučestaliji predstavnik te skupine je OTA (Delaš, 2010.). OTA je otkriven 1965. kao metabolit plijesni *Aspergillus ochraceus* tijekom istraživanja novih mikotoksina. Ovaj mikotoksin proizvode i druge plijesni roda *Aspergillus* kao što su *A. carbonarius*, *A. melleus*, *A. niger* te plijesni roda *Penicillium* kao što su *P. nordicum* i *P. verrucosum* (Marin i sur., 2013.; Bezerra da Rocha i sur., 2014.). Smatra se da OTA posjeduje nefrotoksična, imunotoksična, karcinogena i teratogena svojstva (Peraica i sur., 1999.). Prepoznat je kao potentni nefrotoksin te su mu bubrezi glavni ciljni organ. Također, povezuje

se s različitim bolestima u ljudi i životinja te ga je IARC svrstala u skupinu 2B, kao mogući karcinogen (IARC, 1993.; Bui-Klimke i Wu, 2015.).

Fusarium mikotoksini

Trihoteceni su grupa strukturno sličnih metabolita plijesni koji sadrže tetraciklički 12,13 epoksitrihotecenski kostur (Bennet i Klich, 2003.; Bezerra da Rocha i sur., 2014.). Obzirom na varijacije u kemijskoj strukturi, podijeljeni su u četiri grupe: A, B, C i D. Trihoteceni tipa A (T-2, HT-2, neosolaniol, diacetoksiscripenol) i B (DON, nivalenol, fuzarenon-X) su toksikološki najznačajniji trihoteceni, a proizvode ih najčešće *Fusarium* spp. (Bennett i Klich, 2003.; Marin i sur., 2013.; Kovač i sur., 2018.).

T-2 toksin je najpotentniji trihotecen koji djeluje citotoksično, imunosupresivno, te izaziva niz gastrointestinalnih, dermatoloških i neuroloških simptoma. Toksičnost HT-2 je mnogo manje istraživana, no obzirom da se T-2 *in vivo* brzo metabolizira u HT-2, toksični utjecaji ovih mikotoksina se razmatraju zajedno (Marin i sur., 2013.). DON, iako manje toksičan od ostalih trihotecena, jedan je od najčešćih mikotoksina koji kontaminiraju hranu i hranu za životinje (Bennett i Klich, 2003.; Marin i sur., 2013.; Bezerra da Rocha i sur., 2014.). Pri konzumaciji niskih koncentracija DON izaziva gubitak mase i odbijanje hrane, dok pri izloženosti visokim koncentracijama izaziva mučninu, dijareju i povraćanje te se iz tog razloga naziva još i vomitoksin (Bennet i Klich, 2003.).

ZEA je sekundarni metabolit više *Fusarium* vrsta, uključujući *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. cerealis*, *F. equiseti*, *F. verticillioides* i *F. incarnatum* (Marin i sur., 2013.). Ove vrste proizvode i neke derivate ZEA-e, od kojih je najznačajniji zearalenol (stereoizomeri α -zearalenol i β -zearalenol). ZEA pripada skupini mikoestrogena, spojevima kojima je zajednička karakteristika kemijska sličnost s prirodnim i sintetskim hormonima estrogenima (Zain, 2011.; Marin i sur., 2013.), a ingestijom može uzrokovati morfološke i funkcionalne poremećaje reproduktivnih organa i oštećenje spolnih stanica (Kanižai Šarić i sur., 2011.; Domaćinović i sur., 2012.). IARC je svrstao ZEA u skupinu 3 (nema karcinogena svojstva za ljude) zbog nedostatnih istraživanja na ljudima i ograničenih istraživanja na pokusnim životinjama (IARC, 1993.).

FUM proizvodi nekoliko vrsta *Fusarium* plijesni, a posebno je značajna vrsta *Fusarium verticillioides*. FUM su prvi put opisani i karakterizirani tek krajem 1980.-ih, a čini ih grupa od 16 spojeva, od kojih su najznačajniji FB1 i FB2 (Bennet i Klich, 2003.; Bhat i sur., 2010.; Bezerra da Rocha i sur., 2014.). Toksično djelovanje FUM-a je dokazano u više životinjskih vrsta, a obzirom na dostupne toksikološke podatke, IARC je klasificirao FB1 i FB2 u skupinu 2B, kao moguće karcinogene za ljude (IARC, 1993.; 2002.).

2.1.3. Procesiranje hrane i mikotoksini

Fizikalni i toplinski procesi obrade hrane mogu potencijalno promijeniti koncentraciju mikotoksina jer primijenjena mehanička ili toplinska energija uzrokuje njihovu transformaciju i/ili degradaciju (Suman i Generotti, 2016.). Kod obrade žitarica, sortiranjem, čišćenjem i odvajanjem omotača zrna žitarica moguće je uvelike smanjiti koncentraciju nekih mikotoksina. Pripremom žitarica za mljevenje, uključujući uklanjanje oštećenih i pljesnivih zrna, sitnog materijala i prašine, mikotoksini se mogu značajno reducirati, posebno u slučaju AFT-a čija kontaminacija, odnosno distribucija unutar šarže može biti izrazito heterogena. Ljuštenje zrna žitarica može značajno smanjiti koncentraciju mikotoksina, naročito *Fusarium* mikotoksina koji su uglavnom smješteni u vanjskim slojevima zrna (Karlovsky i sur., 2016.). Iz istog razloga su različite frakcije procesa mljevenja različito kontaminirane mikotoksinima, primjerice bijelo brašno ili kukuruzna krupica sadrže niže koncentracije mikotoksina od frakcije vanjskih slojeva zrna (Suman i Generotti, 2016.).

Toplinsko procesiranje hrane kao što je ekstruzija također može značajno utjecati na razinu kontaminacije mikotoksinima. Utjecaj procesa ekstruzije na sadržaj mikotoksina ovisi uvelike o trajanju i temperaturi, no i o drugim čimbenicima, kao što je prisutnost aditiva reducirajućih šećera i natrijeva klorida u slučaju FUM-a, čija niža koncentracija u ekstrudiranim proizvodima na bazi kukuruza (žitarice za doručak, *snack* proizvodi) odražava nastanak njihovih degradacijskih produkata. Proces nikstamalizacije koji uključuje obradu sirovine alkalnom otopinom pri visokoj temperaturi i koristi se u proizvodnji različitih proizvoda na bazi kukuruza poput tradicionalnih tortilja u Južnoj Americi, također smanjuje koncentraciju FUM-a uslijed nastanka njihovih hidroliziranih oblika (Dall'Asta i Battilani, 2016.; Suman i Generotti, 2016.). Proces pečenja kruha i sličnih proizvoda veže se za smanjenje koncentracije trihotecena, u prvom redu DON-a, koje se objašnjava glikozidacijom DON-a u inicijalnoj fazi pečenja, prije inaktivacije enzima (Vidal i sur., 2014.). Utjecaj procesa pečenja na trihotecene su istraživali i Generotti i sur. (2017.), prema kojima pH i vrijeme pečenja imaju važnu ulogu u redukciji mikotoksina u gotovom proizvodu: dulje vrijeme pečenja uvelike smanjuje koncentraciju DON-a, kao i viši pH tijekom proizvodnje proizvoda od cjelovitog zrna žitarica.

2.1.4. Zakonodavstvo i RASFF sustav

Legislativa vezana za kontaminante se općenito zasniva na poznavanju njihovog potencijalnog štetnog utjecaja i namjeri za zaštitom zdravlja ljudi i životinja, kao i na potrebi uklanjanja prepreka u trgovinskoj razmjeni (van Egmond i sur., 2007.). Najveće dozvoljene koncentracije koje se propisuju za pojedini mikotoksin se zasnivaju na znanstvenim čimbenicima poput toksikoloških podataka i podataka o pojavnosti, no isto tako se uzimaju u obzir koncentracije mikotoksina koje se nalaze u realnim poljoprivrednim proizvodima (eng. *Agriculturally Achievable Levels*) (Malachová i sur., 2014.).

Obzirom na pojavnost i izraženo toksično djelovanje na zdravlje ljudi i životinja, najznačajnijim mikotoksinima se smatraju AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, DON, FB1, FB2, ZEA, T-2, HT-2 i OTA, CIT te PAT. Stoga su njihove NDK vrijednosti u pojedinim prehrambenim proizvodima unutar Europske unije (EU) regulirane Uredbom (EZ) br. 1881/2006 (EC, 2006.a) i Preporukom 2013/165/EU (EC, 2013.). Kad je u pitanju hrana za životinje, NDK vrijednosti su postavljene Direktivom 2002/32/EZ (EC, 2002.a) te Preporukom 2006/576/EC (EC, 2006.b) i Preporukom 2013/165/EU (EC, 2013.). Navedeni akti Europske unije su u zakonodavstvo Republike Hrvatske preuzeti kroz Zakon o kontaminantima NN 39/2013 (s izmjenama i dopunama) (HS, 2013.a), odnosno kroz Pravilnik o sigurnosti hrane za životinje NN 102/2016 (MP, 2016.). Pregled spomenutih dozvoljenih vrijednosti za žitarice i proizvode je dan u **Tablici 1**, a strukturne formule reguliranih mikotoksina prikazane su na **Sllici 4**.

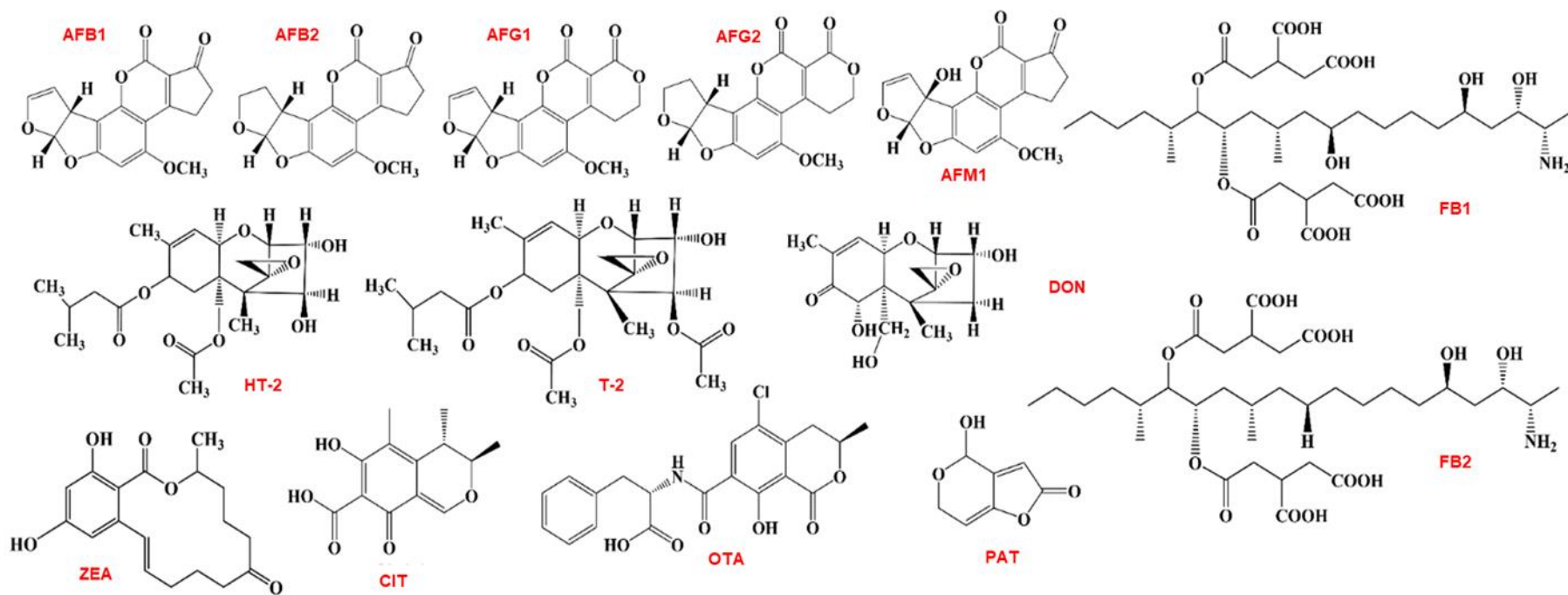
Tablica 1 Najveće dozvoljene, indikativne i preporučene vrijednosti mikotoksina u žitaricama prema europskoj legislativi (EC, 2006.a; EC, 2013.; EC, 2002.a, EC, 2006.b)

	Neprerađene žitarice (µg/kg)	Žitarice i proizvodi namijenjeni za izravnu prehranu ljudi (µg/kg)*	Hrana za životinje i krmne smjese (µg/kg)
AFB1	2,0-5,0	(0,1) 2,0-4,0	5,0-20,0
suma AFT	4,0-10,0	4,0	-
DON	1250-1750	(200) 500-750	900-12000
suma FB1 i FB2	1400-4000	(200) 800-1000	5000-60000
ZEA	100-350	(20) 50-100	100-3000
suma T-2 i HT-2	100-1000	(15) 25-200	250-2000
OTA	5,0	(0,5) 3,0	10-250

* u zagradama su navedene vrijednosti dozvoljene u dječjoj hrani/hrani za dojenčad

Za lakše osiguranje zdravstvene ispravnosti hrane koja dolazi na tržište EU, legislativa propisuje alate koji pomažu ostvarenju toga cilja. Jedan od alata je i RASFF. Pravni temelj RASFF-a je Uredba (EZ) br. 178/2002, a osnovan je kao mreža koja uključuje države članice, Europsku Komisiju i Europsku agenciju za sigurnost hrane, od kojih svaka određuje kontaktnu

točku koja je član sustava. U slučaju kada član mreže ima informaciju o postojanju izravnog ili neizravnog rizika za zdravlje koji potječe od hrane ili hrane za životinje, o tome obavješćuje Komisiju putem RASFF-a, a Komisija tu informaciju odmah prosljeđuje članovima mreže (EC, 2002.b). Prema Zakonu o hrani (NN 81/2013), nacionalna kontakt točka Republike Hrvatske prema Europskoj komisiji za RASFF sustav je ministarstvo nadležno za poljoprivredu (HS, 2013.b). U posljednjem dostupnom godišnjem izvješću o RASFF-u stoji kako je u 2018. godini u RASFF pristiglo ukupno 569 obavijesti vezanih za mikotoksine, koji su najveći problem među opasnostima vezanima uz hranu u državama članicama EU. Najveći postotak obavijesti se odnosio na obavijesti o odbijanju proizvoda s granica s trećim zemljama, a gotovo sve su se odnosile na problem vezan uz AFT u različitim kategorijama proizvoda, posebno orašastim plodovima i proizvodima od njih. Iz Republike Hrvatske u 2018. godini u RASFF nije pristigla ni jedna obavijest vezana za mikotoksine (EC, 2019.).



Slika 4 Strukture zakonski reguliranih mikotoksina: AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, DON, FB1, FB2, ZEA, T-2, HT-2 i OTA

2.2. Tekućinska kromatografija – spektrometrija masa

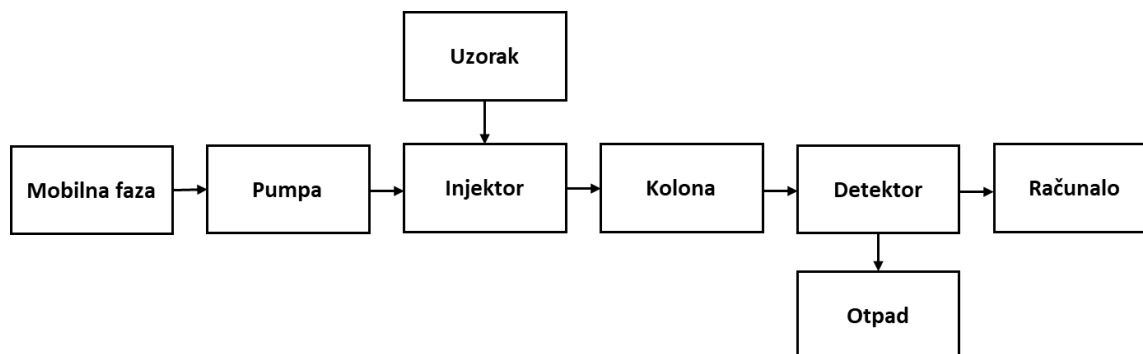
LC je analitička separacijska tehnika koja se koristi za odvajanje otopljenih tvari zahvaljujući različitim interakcijama između tekuće mobilne faze i čvrste stacionarne faze, uzrokovanim razlikama u adsorpciji, ionskoj izmjeni, razdiobi između faza ili veličine tvari koje se razdvajaju, koje rezultiraju različitim vremenom zadržavanja na kromatografskoj koloni (Cindrić i sur., 2009.; Parasuraman i sur., 2014.). Nakon separacije molekula analita slijedi detekcija, primjerice UV-Vis-om, FLD-om te, u posljednje vrijeme najčešće, MS-om. MS se bazira na prevođenju molekula analita u ionizirano stanje te sortiranju nastalih iona i njihovoj identifikaciji preko m/z -a. Postoji nekoliko različitih tehnologija za ioniziranje i analizu masa iona, a time i mnogo različitih spektrometara masa s različitim kombinacijama ova dva procesa. Povezivanje kromatografskih tehnika i MS-a je oduvijek bilo poželjno zbog osjetljivosti i visoke specifičnosti spektrometra masa u usporedbi s drugim kromatografskim detektorima. Vezani sustavi GC-a i MS-a pojavili su se već 1950.-ih, dok su vezani sustavi LC-a i MS-a, zbog manjka kompatibilnosti između postojećih izvora iona (MS) s kontinuiranom strujom tekuće faze (LC), svoju primjenu našli tek 1980.-ih razvojem ESI-a (Arpino, 2006.; Pitt, 2009.).

2.2.1. Tekućinska kromatografija

Kromatografiju kao fizikalno-kemijsku metodu razdvajanja kompleksnih smjesa tvari je otkrio botaničar Tswet početkom 20. stoljeća te je opisao kao fenomen separacije bazirane na različitom afinitetu različitih molekula za interakcije s površinom adsorbensa. Sljedećih 50 godina kromatografija se uglavnom razvijala u obliku GC-a te djelomično TLC-a, a pravi uzlet LC-a započeo je radom profesora Horvátha sredinom 20. stoljeća, čijom se zaslugom razvila HPLC (Kazakevich i LoBrutto, 2007.).

Moderna LC se i danas bazira na Tswetovoj definiciji, a vrste interakcije uključuju ionsku izmjenu, disperzivne te polarne sile (Kazakevich i LoBrutto, 2007.). NP LC se temelji na razlikama u jačini polarnih interakcija analita i stacionarne faze. Tekuća faza u ovom slučaju je nepolarno otapalo (npr. heksan ili heptan), dok je nepokretna faza sačinjena od poroznih oksida kao što je SiO_2 ili Al_2O_3 . NP LC se koristi za separaciju visoko hidrofobnih spojeva (npr. smjese različitih lipida), koji su netopivi u polarnim ili vodenim otapalima. S druge strane, RP LC se bazira na disperzivnim silama (hidrofobne ili van der Waals-ove interakcije), te je stacionarna faza hidrofobna (uglavnom kemijski modificirani porozni silikati), a tekuća faza polarna (smjese vode i ACN-a ili MeOH-a). RP LC je najpopularnija vrsta kromatografije te se preko 90% analiza svih nisko molekularnih analita provodi upravo koristeći RP (Kazakevich i LoBrutto, 2007.).

Tekućinski kromatograf, shematski pojednostavljeno prikazan na **Slici 5**, sastoji se od sustava za dobavu pokretne faze i spremnika u kojem se ona nalazi, sustava za injektiranje, kolone (stacionarne faze) i kućišta za kolonu, detektora te sustava za prikupljanje podataka i kontrolu (Kazakevich i LoBrutto, 2007.; Cindrić i sur., 2009.).



Slika 5 Blok shema tekućinskog kromatografa

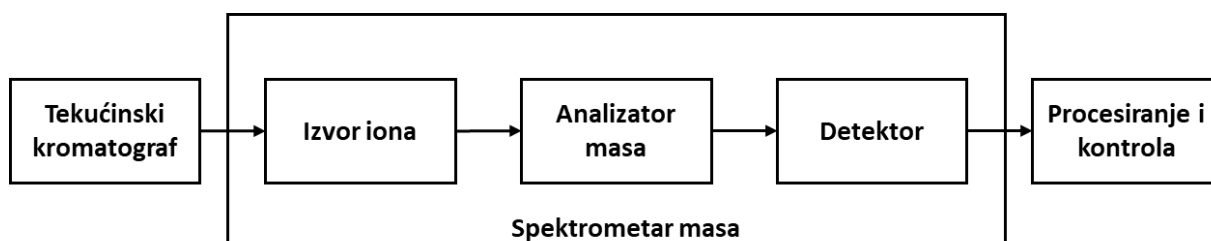
Sustav za dobavu pokretne faze sastoji se od spremnika pokretne faze s filterima, proporcionalnog ventila, odzračivača (eng. *Degasser*), crpke (binarne ili kvarterne) koja osigurava konstantan i kontinuiran protok mobilne faze kroz sustav, miješalice, regulacijskog ventila na ulazu i izlazu iz crpke, sustava za ujednačavanje pulseva, ventila za ispiranje te regulatora tlaka u sustavu. Uzorci se u sustav unose preko injektora (sustava za injektiranje) koji se sastoji od injektorskog ventila, automatskog uzorkivača (eng. *Autompler*) koji je termostatiran uglavnom uz pomoć Peltierovog elementa, igle za injektiranje, graduirane injekcije te kapilare određenog volumena koji se uz dodatak ekstenzije (eng. *Loop*) može modificirati. Srce tekućinskog kromatografa je analitička kolona u kojoj se odvija separacija analita iz smjese (Kazakevich i LoBrutto, 2007.; Cindrić i sur., 2009.). Ovisno o veličini čestica punjenja stacionarne faze kolone i povratnog tlaka (eng. *Backpressure*) razlikujemo: HPLC s tlakom do 400 bar i UHPLC s veličinom čestica punjenja kolone manjom od 2 μm za rad pri tlakovima preko 1000 bar (Kazakevich i LoBrutto, 2007.). Noviji tip kolona, eng. *Core-shell*, komercijaliziran 2006. godine, omogućuju rad pri tlakovima od dva do tri puta manjima u usporedbi s konvencionalnim, potpuno poroznim kolonama (eng. *Fully Porous*). Radi se o površinski poroznim kolonama (eng. *Superficially Porous*) sa česticama stacionarne faze koje se sastoje od neporozne jezgre (1,9 μm) okružene vanjskim poroznim prstenom (0,35-0,5 μm), a omogućuju kraće trajanje analiza, kraću ekvilibraciju te manji utrošak otapala (Jandera i sur., 2014.: Preti, 2016.). Djelotvornost kromatografske kolone je definirana brojem teorijskih tavana koji predstavlja broj faznih prijelaza postignutih na određenoj koloni. Što je veći broj teorijskih tavana, veća je i djelotvornost kolone. Osim djelotvornosti kolone, osnovni kromatografski parametri su i faktori zadržavanja i razdvajanja te razlučivanje. Pokazatelj zadržavanja analita

na kromatografskoj koloni naziva se faktor zadržavanja, a određuje se na temelju pretpostavke da nema interakcije sa stacionarnom fazom. Faktor razdvajanja je mjera selektivnosti kromatografskog sustava za dva različita analita, ovisno o interakciji sa stacionarnom fazom. Razlučivanje je mjera učinkovitosti odjeljivanja dvaju analita, a ovisi o faktoru zadržavanja, faktoru razdvajanja te broju teorijskih tavana (Cindrić i sur., 2009.; Kazakevich i LoBrutto, 2007.).

Za kontinuiranu registraciju spomenutih specifičnih (uglavnom fizikalnih) svojstava eluenta kolone služi detektor, primjerice UV-Vis, FLD ili MS. HPLC sustav razdvajanje analita prikazuje u obliku kromatograma, a pojedini analit u kromatogramu je predstavljen jednim pikom. U odsustvu jakih specifičnih interakcija analita sa stacionarnom fazom i relativno niskoj koncentraciji analita pikovi su simetrični te sličje Gaussovoj krivulji. Za identifikaciju pojedinog analita u kromatogramu služi vrijeme zadržavanja, odnosno zadržavanja na analitičkoj koloni, koje predstavlja udaljenost maksimuma pika od točke injektiranja izraženo u jedinici vremena (Kazakevich i LoBrutto, 2007.). Prema Odluci Komisije (EZ) br. 657/2002 o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata, vrijeme zadržavanja analita u uzorku mora odgovarati vremenu zadržavanja kalibracijske otopine, uz toleranciju $\pm 2,5\%$ kada se radi o LC-u (EC, 2002.c).

2.2.2. Sprega LC-MS i načini ionizacije

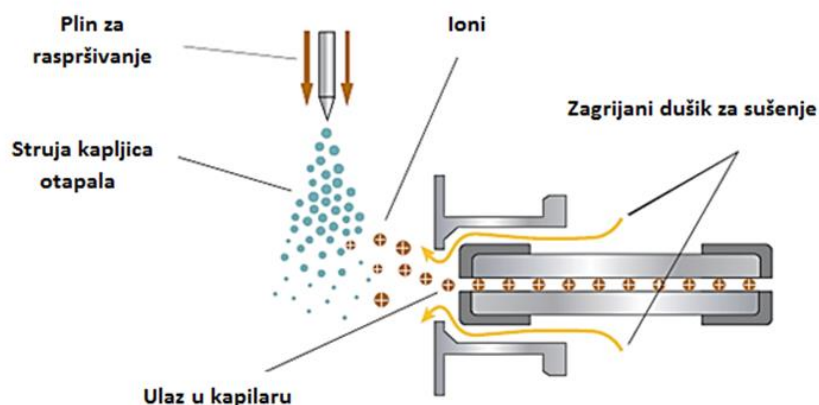
Tekućinski kromatograf i spektrometar masa su povezani međuspojem (eng. *Interface*) koji omogućuje otparavanje tekuće faze (iz tekućinskog kromatografa), ionizaciju neutralnih molekula analita te njihovo uvođenje u analizator (masa) spektrometra masa (Cindrić i sur., 2009.). Pojednostavljena blok shema vezanog sustava prikazana je na **Slici 6**.



Slika 6 Blok shema vezanog sustava LC-MS

Za prevođenje molekula analita u ionizirano stanje kod modernih LC-MS sustava najčešće se koriste API tehnike: ESI, APCI i APPI. ESI je najzastupljeniji način ionizacije u vezanom sustavu LC-MS, posebno važan za analizu uzoraka koji se ne mogu odrediti GC-om ili GC-MS-om, dok je primjena APCI-a i APPI-a ograničena na određivanje hlapljivih spojeva (Watson i Sparkman, 2007.). Ova je tehnika pogodna za ionizaciju velikih, nehlapivih spojeva poput

proteina, kao i za ionizaciju malih polarnih molekula, kompleksa metalnih iona i drugih topljivih anorganskih spojeva (Gross, 2011.). ESI se smatra najznačajnijim izvorom iona kad se radi o većini kontaminanata, uključujući mikotoksine (Pitt, 2009.). Princip rada ESI je prikazan na **Slici 7.**



Slika 7 Princip ESI (prilagođeno iz Particle Sciences, 2009.)

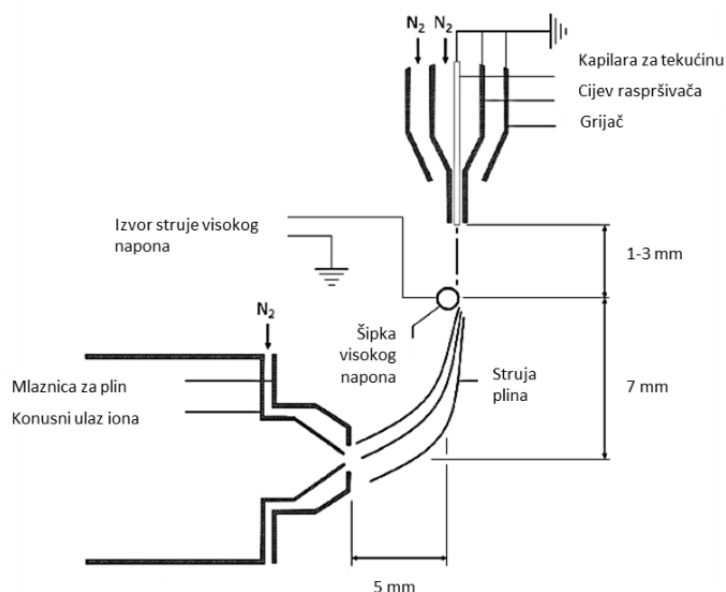
Eluent se raspršuje u kapljice u prisutnosti jakog elektrostatskog polja i zagrijanog dušika. Elektrostatsko polje uzrokuje daljnju disocijaciju analita, a zagrijani dušik otparava otapalo. Smanjenjem kapljica povećava se njihov naboj do trenutka kad odbojne sile između iona jednakih naboja ne nadjačaju kohezivne sile pa se ioni ubacuju u plinovitu fazu te prolaze u analizator masa.

Tehniku ESI-a razvili su Malcom Dole i suradnici 1960.-ih godina, a usavršio ju je John Fenn sredinom 1980.-ih, koji je primio Nobelovu nagradu za kemiju 2002. (Arpino, 2006.; Watson i Sparkman, 2007.; Gross, 2011.). Mobilna faza s analitom iz tekućinskog kromatografa ulazi u ionizator pri atmosferskom tlaku kroz metalnu kapilaru koja predstavlja elektrodu pod visokim naponom. Kapilara je obično smještena na ili izvan osi od ulaza u spektrometar masa kako bi se smanjila mogućnost kontaminacije. Na vrhu kapilare nastaje maglica sastavljena od nabijenih kapljica otapala. Pod utjecajem temperature, struje dušika i električnog potencijala otapalo otparava te se kapljice smanjuju, a naboj prenosi na molekule analita pri čemu dolazi do stvaranja iona. Ionizirane molekule analita se prenose pod visokim vakuumom u spektrometar masa (Pitt, 2009.; Cindrić i sur., 2009.). ESI se smatra „mekom“ ionizacijskom tehnikom (Arpino, 2006.; Pitt, 2009.; Gross, 2011.), što znači da se relativno malo energije prenosi analitu te se odvija mali broj fragmentacija u izvoru, u usporedbi s npr. elektronskom ionizacijom kod GC-MS-a (Pitt, 2009.). Kod analita s malom molekulskom masom (do oko 500 Da) koji nose jednu funkcionalnu grupu koja je nabijena, ESI obično dovodi do stvaranja jednostruko nabijenih iona, što uključuje dodatak protona analitu $[M+H]^+$ u slučaju pozitivne ionizacije, ili gubitak protona u slučaju negativne ionizacije $[M-H]^-$, te nastanak adukata kao što su $[M+NH_4]^+$, $[M+Na]^+$ i $[M+K]^+$ ili $[M+HCOO]^-$, $[M+CH_3COO]^-$ i $[M+Cl]^-$ što ovisi o aditivima u eluentima. Stvaranje višestruko nabijenih iona je također moguće, posebno kod većih

molekula, ili rjeđe, manjih molekula s višestrukim nabojem (Pitt, 2009.; Gross, 2011.). Budući da $[M+Na]^+$ i $[M+K]^+$ često ne daju stabilne ione koji se mogu detektirati, a nastaju u prisutnosti alkalnih iona u mobilnoj fazi te u staklenom posuđu, dodatak malih količina hlapivih pufera, npr. 5 mM AA-a ili AF-a, suprimira njihovo stvaranje te pomiče ravnotežu prema nastanku $[M+NH_4]^+$ u slučaju pozitivne ionizacije (Berthiller i sur., 2005.; Sulyok i sur., 2006.).

Učinkovitost procesa ionizacije mogu izmijeniti spojevi matrice koji koeluiraju s analitima u ekstrakt, obzirom da utječu na nastanak kapljica analita, odnosno njihovo isparavanje te količinu iona analita u plinovitoj fazi koja ulazi u analizator masa. Spomenuti utjecaj matrice ima za posljedicu pojačanje ili smanjenje intenziteta odziva analita na detektoru masa, a time i moguće nepovoljno djelovanje na značajke metode uključujući granicu detekcije/kvantifikacije, specifičnost/selektivnost, mjernu preciznost ili linearnost odziva (Gosetti i sur., 2010.).

Obzirom na nedostatke ESI, uveden je novi način ionizacije pri atmosferskom tlaku, tzv. *UniSpray* (**Slika 8**) koji koristi visoki napon, a ima mehanizam ionizacije sličan ESI, no zahvaljujući geometriji izvora, brojni hidrodinamički i aerodinamički fenomeni pomažu raspršivanje i raspad kapljica otapala, time pospješujući proces ionizacije. Uporaba *UniSpray* izvora iona je pokazala značajno povećanje osjetljivosti u odnosu na ESI, posebno kad se radi o visoko polarnim spojevima (Lubin i sur., 2017.).



Slika 8 Shema *UniSpray* izvora iona (prilagođeno iz Lubin i sur., 2017.)

Dušik ulazi u cijev raspršivača pod tlakom od 7 bar. Pri ovim uvjetima brzina plina raspršivača je blizu nadzvučne na udaljenosti 1-3 mm od šipke. Raspršivač je okružen prstenastim grijanjem koji zagrijava dušik pri protoku oko 1200 L/h. Ioni i nabijene kapljice nastaju kad je udar usmjeren prema ulazu iona koji je okružen konusom plinske mlaznice koja pospešuje struju dušika za sušenje (otparavanje otapala) od 150 L/h.

2.2.3. Analizatori masa u vezanom sustavu LC-MS

Analizator masa je dio spektrometra masa koji ima ulogu razdvajanja iona različitog m/z -a. Različiti analizatori zahtijevaju različite ionizacijske izvore i različite detektore iona, a neki od najčešćih su kvadrupolni analizator, IT, TOF te Orbitrap, kao i hibridi pojedinih vrsta (Cindrić i sur., 2009.; Pitt, 2009.; Gross i sur., 2011.; Dzuman i sur., 2015.; Castillo i sur. 2016.).

Postoji nekoliko glavnih tehničkih parametara koji definiraju i karakteriziraju analizator masa: snaga razlučivanja, točnost mjerenja mase, područje mjerenja mase i brzina snimanja spektra (Cindrić i sur., 2009.; Murray i sur., 2013.). Snaga razlučivanja se definira kao djelotvornost odvajanja iona vrlo malih razlika u masi (Murray i sur., 2013.). Točnost mjerenja mase odnosi se na sposobnost spektrometra masa da odredi molekulsku masu što bliže pravoj (izotopnoj) masi. Područje mjerenja mase definira se kao raspon između gornje i donje granice koja se može odrediti pojedinim spektrometrom masa. Brzina snimanja je mjera brzine snimanja zadanog raspona masa u masenim jedinicama po sekundi te se obično izražava kao Dalton po sekundi (Da/s) za LRMS, odnosno herc (Hz) za HRMS (Cindrić i sur., 2009.; Holčapek i sur., 2012.). U **Tablici 2** navedeni su tipični parametri za različite vrste analizatora masa.

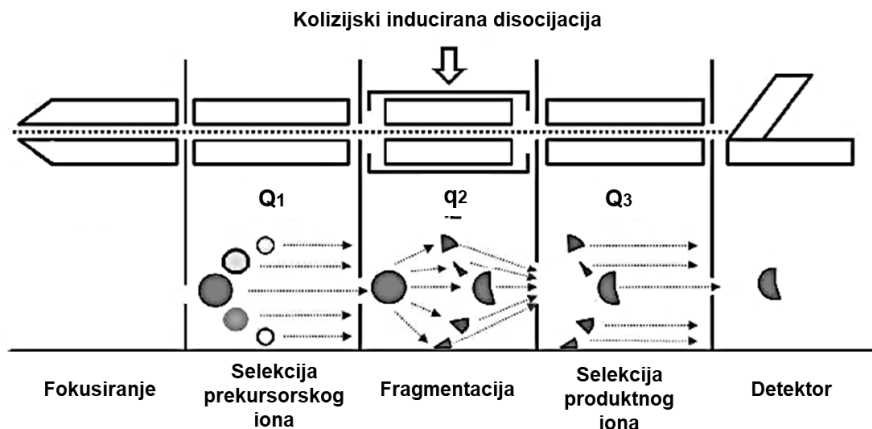
Tablica 2 Karakteristike izabranih analizatora masa korištenih u LC-MS aplikacijama
(prilagođeno iz Holčapek i sur., 2012.)

Analizator masa	Snaga razlučivanja $\times 10^3$	Točnost mjerenja mase / Da	Gornja granica područja mjerenja $\times 10^3$ / Da	Brzina snimanja / Hz
Q	3-5	0,1	2-3	2-10
IT	4-20	0,1	4-6	2-10
TOF	10-60	0,0001	10-20	10-50
Orbitrap	100-240	0,0001	4	1-5

Kvadrupolni analizator masa radi na principu električnog polja generiranog između skupa od četiri štapne elektrode postavljene u kvadratnu konfiguraciju pri čemu jedan dijagonalno suprotan par ima pozitivni, a drugi negativni polaritet, te su parovi dodatno spojeni radio-frekvencijskim potencijalom izmjenične struje. U ovisnosti o primijenjenoj struji i polju, ioni određenih m/z vrijednosti se prenose duž osi elektroda prema detektoru, dok se ostali neutraliziraju. Primjenom određenih napona provodi se skeniranje m/z vrijednosti što rezultira generiranjem spektra masa (Cindrić i sur., 2009.; Pitt, 2009.; Gross i sur., 2011.). Konfiguracija analizatora koja sadrži dva kvadrupola te tzv. kolizijsku ćeliju između (**Slika 8**) naziva se trostruki kvadrupolni analizator masa te je primjer MS/MS-a u kojoj se u dvije ili više faza odvija analiza masa (Pitt, 2009.). IT analizator masa ima sličan princip rada kao i kvadrupolni analizator u kojem se električno polje koristi za separaciju iona. IT se sastoji od hiperboličnih elektroda koje hvataju ione u trodimenzionalnom prostoru koristeći statički i radio-frekvencijski napon. Ioni određenih m/z -a napuštaju stupicu primjenom određenog napona te se generira spektar masa. Također je moguće da se ioni određenog m/z -a hvataju, fragmentiraju te njihovi fragmenti napuštaju stupicu prema detektoru masa (Pitt, 2009.). U analizatoru vremena leta separacija iona se odvija na osnovi brzine leta iona kroz analizator do detektora masa, a koja je u ovisnosti o masi iona: ioni manje mase lete brže i obratno. TOF analizator generira spektar masa vrlo brzo s visokom osjetljivošću te ima visoku točnost mjerenja mase (Pitt, 2009.; Cindrić, 2009.). Orbitrap je analizator masa u kojem se ioni koji su u orbitalnom gibanju oko središnje elektrode hvataju u elektrostatičkom polju. Hvatanje iona se odvija aksijalno, a m/z omjeri iona se određuju harmonijskim oscilacijama u kombinaciji s Fourierovim transformacijama. Ovi analizatori pokazuju relativno sporu brzinu skeniranja, ali veliku osjetljivost zbog sposobnosti hvatanja iona (Gross i sur., 2011.; Zubarev i Makarov, 2013.).

Kombinacije različitih analizatora masa su također moguće, a među njima su osobito značajne dvije konfiguracije. Kad se treći kvadrupol u trostrukom kvadrupolnom analizatoru masa zamijeni TOF analizatorom nastaje hibridni spektrometar masa QTOF (Pitt i sur., 2009.; Castillo i sur., 2016.). Također, moguća je konfiguracija u kojoj treći kvadrupol radi na način da hvata ione i zatim ih izbacuju ovisno o njihovim m/z vrijednostima (linearni IT analizator) pa govorimo o QTRAP spektrometru masa. Zadnji kvadrupol se može prebacivati iz IT načina rada u konvencionalni kvadrupolni način, stoga instrument kombinira značajke i QqQ i IT analizatora masa. Pri korištenju IT načina, osjetljivost je značajno poboljšana, a moguća je i dodatna fragmentacija i višestruka analiza masa (MS^3) (Pitt i sur., 2009.). U posljednje vrijeme, svoju primjenu našla je i treća konfiguracija, hibrid kvadrupola te Orbitrap-a, tzv. QOrbitrap analizator masa. U usporedbi s tradicionalnim QqQ analizatorima, upotreba MS/HRMS-a kao što je QOrbitrap ili QTRAP, omogućuje skeniranje spojeva koji nisu ciljani analiti (eng. *Non-target Screening*), retrospektivnu analizu podataka, te kvantifikaciju i potvrdu teoretski neograničenog broja analita u samo jednoj analizi (Dzuman i sur., 2015.).

Od svih navedenih analizatora masa, u rutinskoj kontroli zdravstvene ispravnosti hrane QqQ analizatori se navode kao „zlatni standard“, budući da osiguravaju postizanje zakonski uspostavljenih kriterija kvalitete za analitičke metode. Uz QqQ analizator masa koristi se MRM (naziva se još i SRM) način rada koji uključuje istovremeno praćenje barem dviju tranzicija iona analita od interesa, tj. njegovog kvantifikacijskog i potvrdnog iona (Righetti i sur., 2016.). Princip MRM načina prikazan je na **Slici 9**. Na osnovi m/z vrijednosti u prvom kvadrupolu (Q1) se izabire prekursorski ion koji je najčešće protonirana ili deprotonirana molekula ciljanog analita. U drugom kvadrupolu (q2) se prekursorski ion podvrgava fragmentaciji u sudaru s inertnim plinom (dušik ili argon) što se naziva CID. CID rezultira stvaranjem iona koji se prate i odabiru pomoću trećeg kvadrupola (Q3), dajući tako strukturnu informaciju molekularnog iona. Zbog visoke selektivnosti uključene u MRM način rada, u kvantitativnim analizama ciljanih analita može se postići visoka osjetljivost (Niessen i Falck 2015).



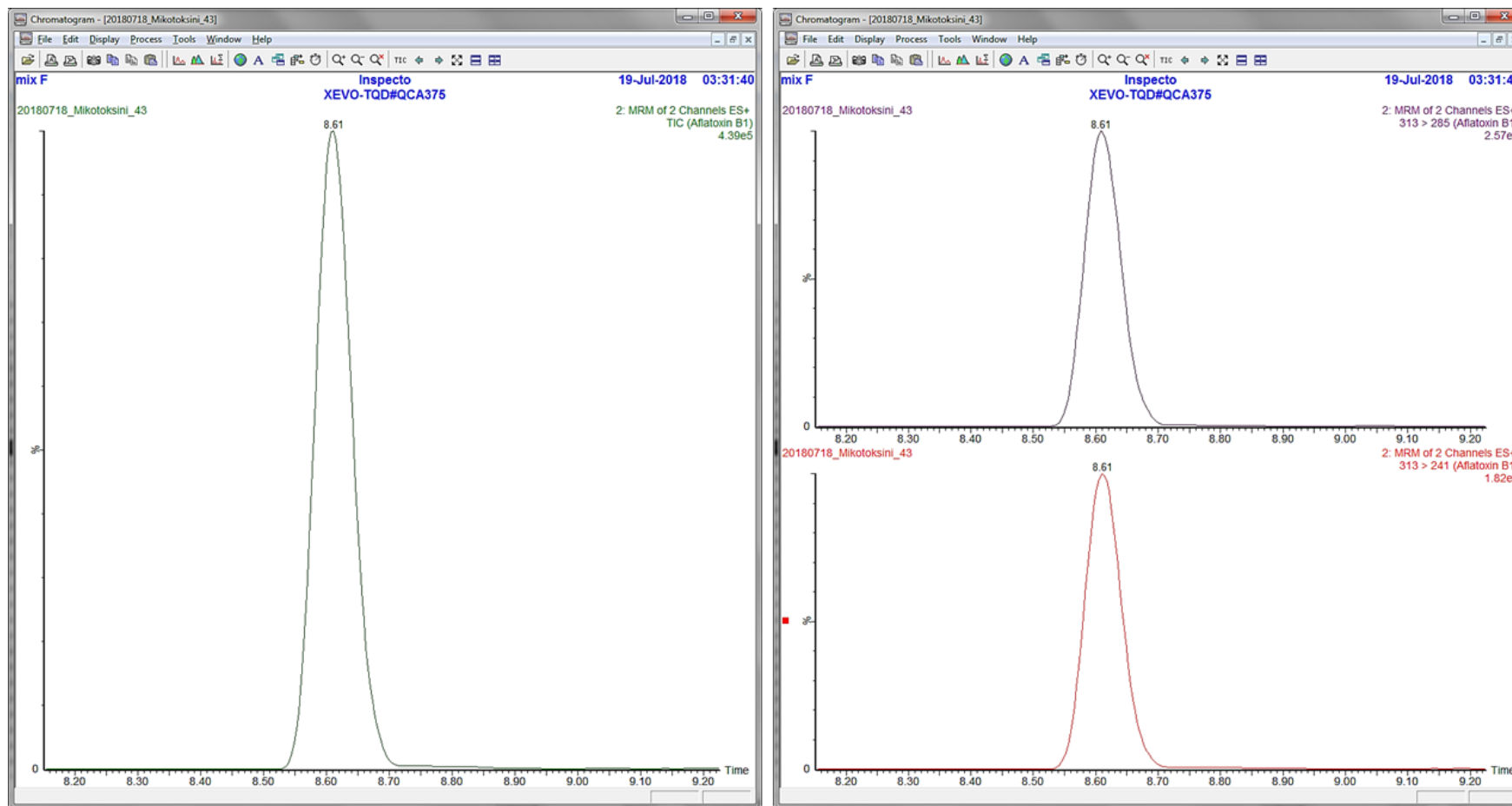
Slika 9 Princip MRM načina rada QqQ analizatora masa (prilagođeno iz Šarkanj, 2014.)

Svi ioni se usmjeravaju u snop iona. U prvom kvadrupolu Q1 se izabire specifični m/z pod specifičnim uvjetima (struja) koji ulazi u drugi kvadrupol q2. U q2 se odvija fragmentacija izabranog iona kolizijski induciranom disocijacijom CID te fragmenti ulaze u treći kvadrupol Q3. Kod MRM aplikacija se odabire samo specifični fragment iona te samo taj ion odlazi prema detektoru.

Ioni (fragmenti) nastali u analizatoru masa na detektoru se prevode u mjerljivi signal koji se grafički prikazuje kao spektar masa. Na spektru masa se odgovarajućim m/z vrijednostima pridružuje intenzitet koji označava relativnu zastupljenost iona. Najintenzivniji (osnovni) signal i njegov intenzitet se nominalno proglašava vrijednošću jedan, odnosno relativnom zastupljenosti 100%, dok se intenzitet ostalih signala preračunava u odnosu na intenzitet osnovnog signala (Niessen i Falck, 2015). Kako bi se pri MRM analizama postigao najbolji intenzitet signala, prekursorski ion te ioni produkti zahtijevaju posebno optimizirane uvjete. Nastanak fragmenata (iona produkata) ovisi o strukturi molekule, jer se određene kemijske grupe (npr. hidroksilne) lako kidaju te su potrebne niske energije kolizije, dok su druge snažno vezane te se za nastanak fragmenata moraju upotrijebiti snažniji uvjeti. Spomenuti parametri nastanka iona produkata vezani su za instrument na kojem se optimizacija provela te ne moraju odgovarati potrebnim uvjetima na instrumentima drugih proizvođača. Pri odabiru iona također se mora voditi računa o specifičnosti tranzicija te izbjegavati primjerice ione koji nastaju vezanjem kationa (natrij, kalij) ili gubitkom vode zbog njihove nestabilnosti (Sulyok i sur., 2006.).

Upravljanje vezanim sustavom LC-MS općenito se vrši programskom platformom (eng. *software*) osiguranom od strane proizvođača/dobavljača instrumenta. Isto programsko rješenje se koristi i za prikupljanje i obradu snimljenih podataka. Podaci dobiveni LC-MS/MS-om prikazuju se u TIC-u. Svaka tranzicija (ioni produkti) se također zasebno snima te se može prikazati u XIC-u. Primjer TIC-a te XIC-a dan je **Slikom 10**, na kojoj je duž y-osi prikazan signal iona, odnosno intenzitet odziva, dok je duž x-osi prikazano vrijeme analize. Za potvrdu

detekcije/identifikacije analita, prema Odluci Komisije (EZ) br. 657/2002 o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata, potrebne su tri ili četiri identifikacijske točke, ovisno o kategoriji tvari, što se u slučaju LMRS-a postiže spomenutim mjerenjem jednog iona prekursora i dva iona fragmenta (kvantifikacijski i potvrdni), a omjeri ova dva iona mjerenih u matrici moraju odgovarati dozvoljenim (propisanim) vrijednostima odstupanja u odnosu na omjer istih iona u standardu analita (EC, 2002.c).



Slika 10 TIC (lijevo) te XIC (desno) AFB1-a dobiveni spregnutim sustavom Acquity H-class - Xevo TQD (Waters, SAD)

2.3. Određivanje mikotoksina

Za valjanu procjenu izloženosti mikotoksinima i toksikološkog rizika koje predstavljaju za zdravlje ljudi i životinja te za utvrđivanje sukladnosti s važećim propisima vezanima za mikotoksine, neophodne su brze, točne i dovoljno osjetljive analitičke metode za njihovo određivanje. Analitika mikotoksina općenito je složen proces koji uključuje pravilno uzorkovanje i homogenizaciju, pripremu uzorka te detekciju i kvantifikaciju odgovarajućim analitičkim instrumentima/tehnikama. Priprema uzorka podrazumijeva ekstrakciju spoja ili spojeva iz uzorka prikladnim ekstrakcijskim otapalom, pročišćavanje dobivenog ekstrakta s ciljem eliminacije mogućih interferencija iz matrice, te, ukoliko je potrebno, koncentriranje ekstrakta (Rahmani i sur., 2009.; Pascale, 2009.; 2019.; Shanakhat i sur., 2018.).

2.3.1. Uzorkovanje i priprema uzoraka

Uzorkovanje je kritični korak u prikupljanju pouzdanih rezultata o prisutnosti nepoželjnih tvari u hrani i hrani za životinje. Njihova distribucija unutar serije proizvoda može biti vrlo različita (heterogena), kao što je to u slučaju mikotoksina, dok su druge tvari poput teških metala, aktivnih tvari pesticida i sl., relativno homogeno raspodijeljene (Krska i sur. 2008.; Cheli i sur., 2014.). Distribucija kontaminanata ima veliki utjecaj na točnost kvantifikacije pojedinog mikotoksina, a uzorkovanje predstavlja najveći izvor pogreške, stoga je adekvatno uzorkovanje neophodno za donošenje opravdane odluke o tome što učiniti sa serijama proizvoda kontaminiranih mikotoksinima (van Egmond i sur., 2007.; Cheli i sur., 2014.; Zhang i sur., 2018.). S ciljem standardizacije postupaka uzorkovanja i analiza za određivanje mikotoksina, Europska komisija je postavila set pravila Uredbom Komisije (EZ) br. 401/2006 od 23. veljače 2006. o utvrđivanju metoda uzorkovanja i analize za službenu kontrolu razina mikotoksina u hrani (EC, 2006.c; Zhang i sur., 2018.).

Mikotoksini se uglavnom ekstrahiraju iz usitnjenog uzorka smjesom otapala, ponekad uz dodatak modifikatora (npr. kiselina, baza i drugih), ovisno o fizikalno-kemijskim svojstvima spoja, vrsti uzorka i postupku pročišćavanja koje slijedi (Krska i sur., 2008.). Za ekstrakciju polarnih spojeva kao što su FUM potrebna je prisutnost vode te organskih otapala, dok hidrofobni toksini kao što su AFT zahtijevaju organska otapala. Nakon ekstrakcije, kod provedbe većine metoda osim ELISA postupaka te onih koje uključuju primjenu visoko-osjetljivih LC-MS/MS uređaja, slijedi predtretman uzoraka tj. pročišćavanje ekstrakta (Turner i sur., 2009.).

Uklanjanje komponentni matrice je glavni cilj pripreme uzoraka te važan dio moderne sofisticirane analize. Izbor metode pripreme ovisi o vrsti mikotoksina koji se želi analizirati,

koncentraciji spoja, matrici te instrumentalnoj tehnici mjerenja (Razzazi-Fazeli i Reiter, 2011.). Za analize pojedinih mikotoksina ili određenih grupa mikotoksina primjenjuju se različite metode pročišćavanja uključujući tekućinsko-tekućinsku ekstrakciju te ekstrakciju na čvrstoj fazi. LLE se bazira na različitoj topljivosti analita u vodenoj i nemješivoj fazi organskog otapala, pri čemu se analit transferira iz jedne faze u drugu, dok komponente matrice zaostaju. LLE je bila prva ekstrakcijska metoda koja je korištena za analizu AFT-a u hrani i hrani za životinje nakon njihovog otkrića 1960.-ih godina (Razzazi-Fazeli i Reiter, 2011.). LLE postupak je dugotrajan, zahtijeva veću količinu organskog otapala te je ovisan o matrici i spojevima koji se određuju te ga danas zamjenjuje SPE koja osim za uklanjanje matrice može služiti i za koncentriranje analita (Turner i sur., 2008.; Razzazi-Fazeli i Reiter, 2011.). SPE se bazira na interakcijama analita otopljenog u ekstraktu i stacionarne faze, koja se sastoji od čvrstog adsorbensa na koji se mikotoksini prvo adsorbiraju te se nakon koraka ispiranja eluiraju, najčešće organskim otapalima. Postoji širok raspon komercijalno dostupnih punila SPE kolona s različitim sorbentima (silikagel, C18, florisil, fenil, aminopropil, ionsko-izmjenjivačke tvari, materijali poput imunoadsorbenasa i polimera s molekularnim biljegom) koji se koriste ovisno o vrsti matrice, kemijskoj prirodi mikotoksina te korištenih otapala (Turner i sur., 2009.; Alshannaq i Yu, 2017.). U određivanju pojedinih grupa mikotoksina najznačajnije su multifunkcionalne SPE kolone, kao što su MycoSep® kolone koje sadrže smjesu aktivnog ugljena, ionsko-izmjenjivačkih smola i drugih materijala. U rutinskoj pripremi uzoraka za određivanje mikotoksina MycoSep® kolone se koriste od 1990.-ih, a postupak uključuje propuštanje ekstrakta kroz kolonu pri čemu se komponente matrice zadržavaju na čvrstoj fazi, dok spojevi od interesa prolaze u supernatant (Malachová i sur., 2018.). IAC omogućavaju najspecifičnije pročišćavanje od svih često korištenih metoda. Antitijela imobilizirana u koloni, specifična za određeni mikotoksin (antigen), pri prolasku ekstrakta kroz IAC selektivno vežu mikotoksin, koji se, nakon koraka ispiranja u kojem se uklanjaju tvari matrice, eluira s kolone organskim otapalom. U posljednje vrijeme, QuEChERS postupak se često koristi u pripremi uzoraka za određivanje mikotoksina u različitim matricama. Ovaj princip je inicijalno razvijen za multirezidualnu analizu pesticida (Anastassiades i sur., 2003.), a uključuje dva koraka: ekstrakciju analita iz uzorka ACN-om uz prisutnost smjese soli (magnezijev sulfat i natrijev klorid), nakon koje slijedi pročišćavanje disperzivnom SPE (d-SPE). Iako brza i uglavnom jednostavna metoda, QuEChERS priprema često nije dovoljna za učinkovito uklanjanje matrice, posebno kad se radi o kompleksnim uzorcima, a također zahtijeva modifikaciju postupka ovisno o vrsti mikotoksina koje se želi odrediti. Tako primjerice prisutnost primarno sekundarnih amina koji se uobičajeno koriste za pročišćavanje ekstrakta dovode do značajnih gubitaka FUM-a, kao i dodatak vode uzorcima s niskim sadržajem vlage prije ekstrakcije ACN-om (Alshannaq i Yu, 2017.; Malachová i sur., 2018.).

2.3.2. Analitičke tehnike

Kromatografija je najčešće korištena tehnika za određivanje mikotoksina u hrani i hrani za životinje. Najstarija kromatografska tehnika je TLC koja se koristila za brzi pregled (eng. *Screening*) određenih mikotoksina vizualnom procjenom ili instrumentalnom denzitometrijom. Trendovi u analitici mikotoksina usmjereni na robusnu, jednostavnu te brzu detekciju i kvantifikaciju različitih spojeva doveli su do razvoja kromatografskih metoda kao što je HPLC spregnuta s različitim detektorima: UV-om, DAD-om, FLD-om te, u novije vrijeme, MS-om (Alshannaq i Yu, 2017.). GC također ima primjenu u određivanju mikotoksina, uglavnom u sprezi s MS-om, FID-om ili FTIR-om, za spojeve poput trihotecena ili PAT-a. Ipak, zbog male hlapivosti te visoke polarnosti većine mikotoksina, GC analize često zahtijevaju derivatizaciju pa se ova tehnika rijetko koristi (Turner i sur., 2009.; Alshannaq i Yu, 2017.). Određivanje mikotoksina pomoću MS-a započelo je 1970.-ih godina kada se koristila u kombinaciji s TLC-om i GC-om, a potom sredinom 1980.-ih u sprezi s HPLC-om. Dostignuća u analitičkoj kemiji s naglaskom na osjetljivost i selektivnost dostupnih spektrometara masa te vezanje s tekućinskim kromatografima omogućili su nedvojbenu identifikaciju mikotoksina bez kompleksnih postupaka pripreme uzoraka (Krska i sur., 2008.; Li i sur., 2013.).

Od imunoloških metoda, ELISA je najčešće korištena tehnika u određivanju mikotoksina zbog visoke specifičnosti, relativno niske cijene i jednostavne primjene u manjim industrijskim laboratorijima gdje su potrebni brzi rezultati i nemaju dovoljno opreme ili educirane radne snage za naprednije tehnike (Turner i sur., 2009.; Alshannaq i Yu, 2017.). Postoji više načina izvedbe ove tehnike, no kompetitivna ELISA se najčešće koristi. Princip ELISA-e je u kompetitivnim interakcijama za imobilizirano antitijelo između mikotoksina iz uzorka koji se ponaša kao antigen te konjugata mikotoksina i enzima. Količina vezanog konjugata određuje intenzitet obojenja supstrata koje se određuje spektrofotometrijski, a enzimska aktivnost je obrnuto proporcionalna koncentraciji mikotoksina u uzorku. Ipak, ELISA tehnika ima određena ograničenja, uključujući potencijalnu krosreaktivnost te ograničenu uporabu ovisno o tipu matrice i razini kontaminacije, budući da su testni paketi validirani za specifične mikotoksine unutar specifičnog koncentracijskog područja i matrice što govori da se testni paket ne može koristiti za svaku vrstu uzorka i razinu kontaminacije (Alshannaq i Yu, 2017.).

Posljednjih godina raste interes za brzim tehnikama ispitivanja kontaminanata na mjestu provjere (eng. *On-site*) kao što su testovi lateralnog protoka. LFIC je razvijen kao test na štapiću, a bazira se na kompetitivnoj immunoanalizi u kojoj se obilježeno antitijelo koristi kao signalni reagens. LFIC omogućuje semikvantitativne rezultate u vrlo kratkom vremenu i pri tome ne zahtijeva posebnu laboratorijsku opremu, no primjena mu je ograničena zbog brojnih

problema povezanih s osjetljivošću i pouzdanošću u analizama različitih matrica. Biosenzori su još jedan brzi alat u analizi mikotoksina. Radi se o mjernim uređajima koji objedinjuje specifični biološki element (npr. antitijelo) koji omogućuje bioraspoznavanje i fizikalno-kemijski element koji to prepoznavanje pretvara u elektrokemijski, optički ili toplinski signal. Prednost ovakvih uređaja je u mogućnosti ponovne upotrebe, za razliku od ELISA testnih paketa i drugih brzih testova na štapiću, no zahtijevaju pročišćavanje uzoraka te ne mogu provoditi simultane analize većeg broja analita (Alshannaq i Yu, 2017.).

2.3.3. LC-MS multimikotoksinske metode

Potreba za multimikotoksinskim metodama kojima će se istovremeno određivati velik broj spojeva neophodne su u kontroli zdravstvene ispravnosti hrane, budući da jedna plijesan može proizvesti nekoliko vrsta mikotoksina te jedna namirnica može biti kontaminirana s više različitih (mikotoksikogenih) plijesni (Sulyok i sur., 2006.). Supojavnost mikotoksina u poljoprivrednim proizvodima je vrlo česta, a toksikološka djelovanja različitih mikotoksina, potencijalno aditivna, sinergistička ili antagonistička, još uvijek nisu dovoljno istražena. LC-MS multimikotoksinske metode predstavljaju dobar izbor za nedvojbeno određivanje velikog broja kemijski različitih spojeva u relativno kratkom vremenu analize (Kim i sur., 2017.).

Upotreba LC-MS-a u određivanju nisko-molekularnih kontaminanata i rezidua u vrlo niskim koncentracijama značajno se povećala u posljednjih dvadesetak godina. LC-MS metode omogućavaju značajno veću selektivnost i osjetljivost te pouzdanost identifikacije analita u usporedbi s konvencionalnim detektorima, kao i uporabu jednostavnijih postupaka pripreme uzoraka koji štede vrijeme i novac (Malachová i sur., 2018.). Postoji više vrsta MS detektora koji se primjenjuju u određivanju mikotoksina, uključujući one koje sadrže QqQ, IT, TOF, Orbitrap ili hibridne sustave navedenih analizatora masa (Dzuman i sur., 2015.; Righetti i sur., 2016.). U ciljanim (eng. *Target*) analizama mikotoksina LC-MS/MS tehnika uz QqQ analizator masa se koristi najčešće (Malachová i sur., 2018.) te postoje brojne metode koje se baziraju na ovoj tehnici. Kao komplementaran pristup QqQ metodama, važnu ulogu imaju tehnike koje omogućavaju snimanje cjelokupnih spektara masa (eng. *Full-scan*). Sprega LC-a i HRMS-a pruža mogućnost određivanja spojeva koji nisu ciljani spojevi analize, identifikacije novih spojeva kao i retrospektivnu analizu (Righetti i sur., 2016.).

Prvu validiranu multimikotoksinsku LC-MS/MS metodu razvili su Sulyok i sur. (2006.) za određivanje 39 slobodnih i modificiranih mikotoksina u pšenici i kukuruzu, koja je 2007. proširena na 87 mikotoksina (Sulyok i sur., 2007.), te 2014. na čak 295 fungalnih i bakterijskih metabolita u različitim vrstama namirnica (Malachová i sur., 2014.). U posljednje vrijeme u

analitici mikotoksina naglasak je u određivanju manjeg broja analita u specifičnim matricama (Berthiller i sur., 2018.). Neke od takvih metoda su one koje su razvili Kim i sur. (2017.) za određivanje 13 mikotoksina u žitaricama, Kafouris i sur. (2017.) za određivanje 11 mikotoksina reguliranih prema zakonodavstvu Europske unije u orašastim plodovima i žitaricama, Habler i sur. (2017.) za određivanje 12 *Fusarium* mikotoksina u pivu ili Šarkanj i sur. (2018.) za detekciju 12 najčešćih mikotoksina u urinu.

Kod razvoja multimikotoksinskih metoda postoji nekoliko analitičkih problema uključujući fizikalno-kemijsku raznolikost spojeva, izazov optimizacije pripreme uzorka, te odabir dovoljno velikog koncentracijskog raspona koji će zadovoljiti zakonski propisane najveće dozvoljene vrijednosti za pojedini mikotoksin, a koje se mogu razlikovati obzirom na vrstu matrice od interesa. Primjerice, molekulska masa mikotoksina varira od niske (moniliformin 98 g/mol) do visoke (FB1 722 g/mol ili bovericina 784 g/mol), a polarnost spojeva je vrlo različita (nepolarni ZEA i OTA, polarni DON, polarni ionizirani FUM) (Sulyok i sur., 2006.) što dovodi do problema vezanih za pravilan odabir optimalnog ekstrakcijskog otapala te postupka pripreme i pročišćavanja uzorka kako bi se izbjegli gubici određenih analita. S time na umu, u razvoju multimikotoksinskih metoda općenito se teži minimalističkom pristupu pripremi uzorka, bez korištenja posebnih tehnika pročišćavanja, najčešće tzv. razrijedi i mjeri principu (eng. *Dilute and Shoot*). Ipak, kod primjene ovog principa veća je vjerojatnost negativnog utjecaja matrice, budući da su pored ciljanih spojeva mikotoksina ekstrahirane i komponente matrice koje često nepovoljno djeluju na ionizaciju analita uzrokujući pojačavanje ili smanjenje signala na detektoru masa što može smanjiti točnost kvantifikacije analita (Sulyok i sur., 2006.).

2.3.4. Utjecaj matrice

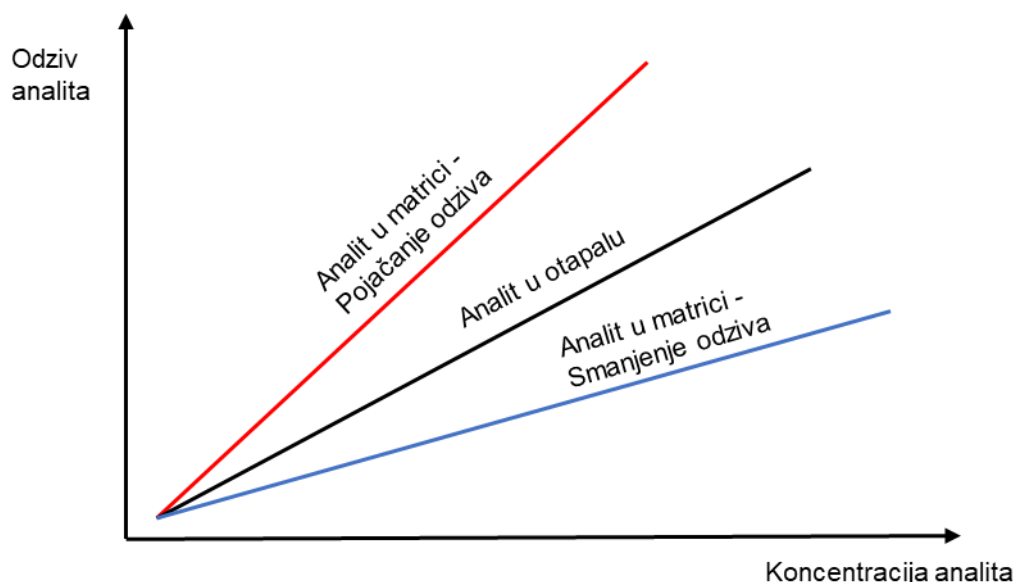
U širem smislu, utjecaj matrice se odnosi na zajednički utjecaj svih komponenti uzorka koji nisu analit na mjerenje količine prisutnog analita, odnosno analitički rezultat. U užem smislu, radi se o čimbeniku koji utječe na ionizacijski proces koji se odvija u LC-MS izvoru iona (Kruve i sur., 2015.). Tang i Kebarle (1993.) su bili prvi autori koji su demonstrirali kako signal analita u ESI-MS-u može biti pod velikim utjecajem istodobno prisutnih drugih tvari (Trufelli i sur., 2011.).

Utjecaj matrice na učinkovitost ionizacije i određivanja analita na spektrometru masa je glavna poteškoća kod LC-MS metoda, a naročito može biti značajan kod primjene ESI izvora iona. Stupanj utjecaja matrice ovisi o vrsti matrice i varijabilnosti između uzoraka iste vrste, postupku pripreme te kromatografskim i MS uvjetima analize, kao i kemijskim svojstvima analita (Malachová i sur., 2018.). Za smanjenje ili uklanjanje utjecaja matrice postoji nekoliko načina

uključujući modifikaciju MS uvjeta analize, optimizaciju pripreme uzorka (ekstrakciju i pročišćavanje), modifikaciju kromatografskih uvjeta te uporabu alternativnih kalibracijskih postupaka (Gosetti i sur., 2010.).

Vrsta ionizacijskog sučelja uvelike djeluje na problem pojačavanja/smanjenja iona analita. Poznato je da je ESI podložniji supresiji iona analita nego APCI i APPI načini ionizacije. Promjena MS uvjeta određivanja analita, primjerice promjena ionizacijskog načina te mjerenje negativnog iona analita može smanjiti utjecaj matrice (Gosetti i sur., 2010.; Fabregat-Cabello i sur., 2016.). Jedan od načina smanjenja utjecaja matrice je i smanjenje količine matrice koja se unosi u sustav, što se postiže razrjeđivanjem ekstrakta ili smanjenjem volumena injektiranja. Ipak, ovim načinom smanjuje se i koncentracija analita te nije uvijek primjenjiv, posebno kad se radi o niskim koncentracijama. Smanjenje količine nepoželjnih komponenti matrice u ekstraktu moguće je postići i optimizacijom postupaka pripreme uzoraka, odnosno uporabom spomenutih „jačih“ tehnika pročišćavanja kao što su SPE i IAC (Malachová i sur., 2018.).

Alternativna opcija uklanjanja utjecaja matrice je njena kompenzacija upotrebom različitih kalibracijskih postupaka, što uključuje kalibraciju u matrici (eng. *Matrix-matched calibration*), metodu standardnog dodatka (eng. *Standard addition*) i/ili korištenje IS-a (Gosetti i sur., 2010.; Fabregat-Cabello i sur., 2016.). Kalibracija u matrici zahtijeva nekontaminirani uzorak sastava sličnog sastavu uzorka kojeg treba analizirati. Nedostatak ovog postupka je (ne)dostupnost takvog materijala za svaki analit koji se ispituje, kao i vrijeme potrebno za pripremu kalibracijskih otopina te kvantifikacija analita koji premašuju vrijednosti u kalibracijskoj krivulji (Fabregat-Cabello i sur., 2016.). Na **Slici 11** je prikazan utjecaj matrice na kalibracijski pravac analita za slučaj smanjenja te pojačanja signala analita u odnosu na isti analit u otapalu.



Slika 11 Utjecaj matrice na kalibracijski pravac

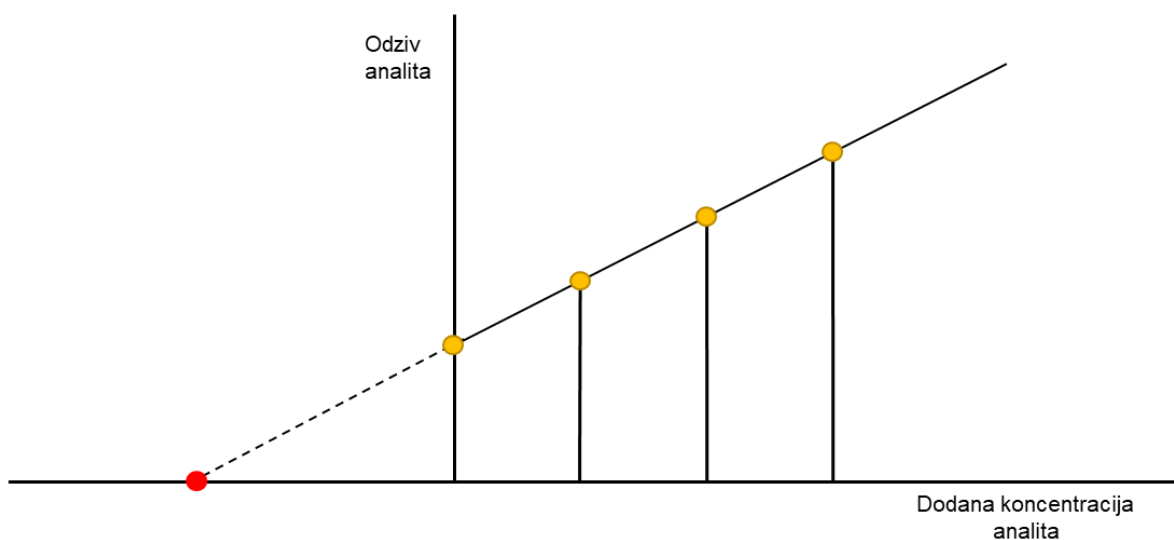
Prema Malachová i sur. (2014.), utjecaj matrice, odnosno SSE, može se izračunati iz omjera površina analita u ekstraktu matrice i čistom otapalu, prema formuli (1). Za analite kojima se SSE vrijednost nalazi u rasponu 90-110% smatra se kako nisu pod utjecajem matrice.

$$SSE \% = \frac{\text{srednja površina analita u ekstraktu matrice}}{\text{srednja površina analita u otapalu}} \times 100 \quad (1)$$

Osim izračuna SSE na osnovu jedne točke kalibracije, Malachová i sur. (2014.) preporučuju pri validaciji metode provesti izračun SSE i preko omjera nagiba kalibracijskog pravca u matrici i nagiba pravca u otapalu prema formuli (2):

$$SSE \% = \frac{\text{nagib kalibracijskog pravca u ekstraktu matrice}}{\text{nagib kalibracijskog pravca u otapalu}} \times 100 \quad (2)$$

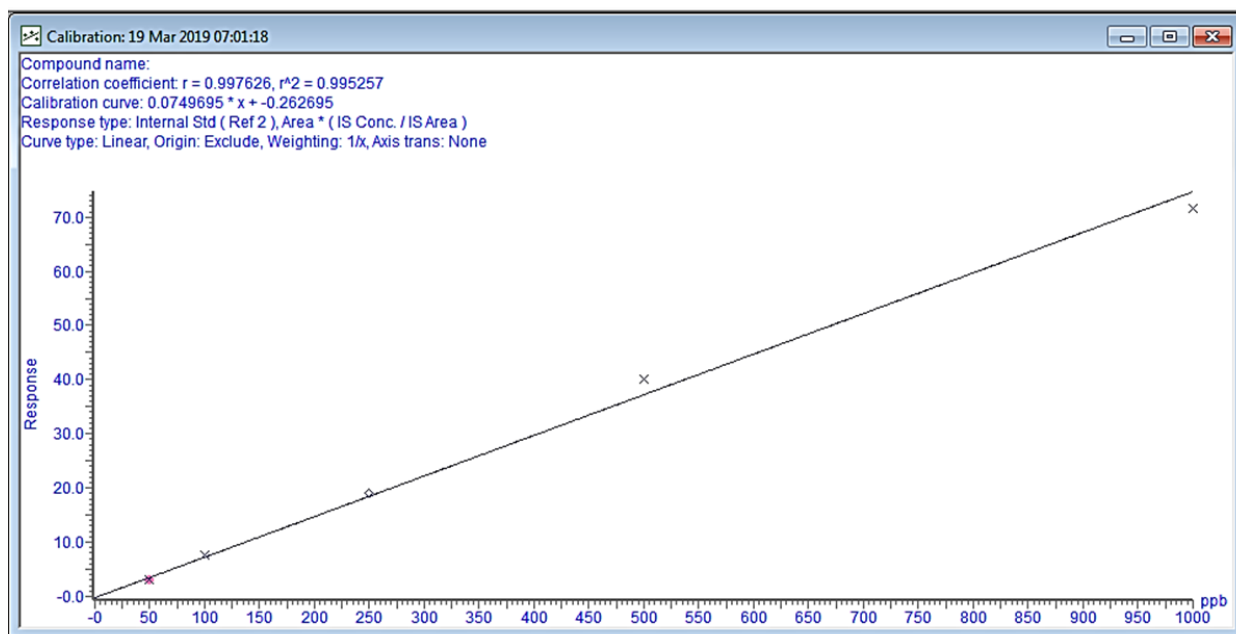
Drugi kalibracijski način kompenzacije utjecaja matrice je metoda standardnog dodatka, koja uključuje: pripremu uzorka prema ustaljenom postupku i mjerenje kalibracijom u otapalu, obogaćenje ekstrakta uzorka različitim koncentracijama analitičkog standarda, najčešće u koncentraciji koja odgovara dva, tri i četiri puta većoj vrijednosti od izmjerene, te izračunavanje koncentracije analita linearnom regresijom prema grafičkom prikazu na **Slici 12**. Sjecište pravca s x-osi daje inicijalnu koncentraciju analita u uzorku (Di Mavungu i sur., 2009.; Anastassiades i sur., 2017.). Budući da je ovakav pristup rješavanja utjecaja matrice dugotrajan te zahtijeva veću upotrebu analitičkog standarda od uobičajenog postupka, neki autori su ispitali mogućnost korištenja samo jednog standardnog dodatka, koji se također pokazao učinkovitim pri adekvatnom obogaćenju ekstrakta (Fabregat-Cabello i sur., 2016.).



Slika 12 Metoda standardnog dodatka (prilagođeno iz Anastassiades i sur., 2017.)

U slučaju korištenja ove metode kompenzacije utjecaja matrice, koncentracija analita se računa iz jednadžbe pravca, pri čemu je odziv analita nula te se iz omjera apsolutne vrijednosti odsječka na osi ordinata i nagiba pravca dobiva inicijalna koncentracija analita u uzorku.

Upotreba IS-a smatra se najučinkovitijom kompenzacijom utjecaja matrice. Pri tome je važno da IS nije prisutan u uzorcima koji se ispituju, da je stabilan prilikom pripreme uzorka (ukoliko se dodaju prije ekstrakcije), ima identična ili slična fizikalno-kemijska svojstva tvari koja se ispituje, kao i vrijeme kromatografskog zadržavanja. Komponente matrice koje koeluiraju s analitima jednako utječu i na analit i na IS, što se koristi prilikom izračuna koncentracije analita u uzorku. Uzorci i kalibracijske otopine pripremaju se na način da sadrže istu koncentraciju IS-a. U idealnom slučaju koriste se standardi koji imaju sve ugljikove izotope C^{12} zamijenjene sa izotopom C^{13} (eng. *Fully Labeled C^{13} Internal Standards*) (Šarkanj i sur., 2018.). Odziv (eng. *Response*) analita u kalibracijskoj otopini se korigira obzirom na odziv IS-a, a koncentracija analita se određuje iz dobivene jednadžbe kalibracijske krivulje (Gosetti i sur., 2010.; Fabregat-Cabello i sur., 2016.), kao što je prikazano na **Slici 13**. Nedostatak ovog pristupa kvantifikacije je u cijeni IS-a, ali i dostupnosti, pa se češće koriste u metodama određivanja manjeg broja problematičnih analita (Gosetti i sur., 2010.).



Slika 13 Kalibracija uz dodatak IS-a u TargetLynx programu (Waters, SAD)

Odziv (eng. *Response*) analita se izračunava množenjem izmjerene površine analita s omjerom koncentracije dodanog IS-a i njegove izmjerene površine. Na ordinatu se nanose vrijednosti odziva, a na apscisu koncentracije kalibrana. Kreira se kalibracijska krivulja te se iz jednadžbe pravaca izračunava koncentracija analita u uzorku.

2.4. Validacija analitičkih metoda

Validacija metoda je ključna aktivnost u analitici općenito, neophodna za prikupljanje pouzdanih i usporedivih rezultata mjerenja. Što su metode važnije i opsežnije to je i postupak validacije složeniji. Upravo takve su metode bazirane na LC-MS-u, s jedne strane zbog same tehnike, a s druge zbog činjenice da se LC-MS koristi za analizu vrlo kompleksnih uzoraka. Osim interne potrebe za validacijom metode, odnosno profesionalne odgovornosti analitičara da daje vjerodostojne mjerne rezultate, postoje zakonski propisi koji uvjetuju provjeru metode, tj. dokazivanje da njene izvedbene značajke udovoljavaju postavljenim kriterijima kvalitete (Gašljević, 2010.; Kruve i sur., 2015.). Kad se radi o mikotoksinima, kriterije učinkovitosti metode za njihovo određivanje propisuje Uredba Komisije (EZ) br. 401/2006 o utvrđivanju metoda uzorkovanja i analize za službenu kontrolu razina mikotoksina u hrani. Tako su primjerice propisane dozvoljene vrijednosti R-a za pojedini mikotoksin te relativna standardna devijacija u uvjetima ponovljivosti i obnovljivosti (EC, 2006.c). Obzirom da je za službene analize potrebna primjena metoda koje su validirane u skladu sa zajedničkim postupcima, Europska komisija je putem Odluke o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata br. 2002/657/EZ dala primjere i/ili naputke za postupke validacije analitičkih metoda, odnosno parametre učinkovitosti metode koje je po razvoju metode potrebno provjeriti (EC, 2002.c).

Mjeriteljski pristup procesu mjerenja, zahtijevajući validaciju metoda, osiguranje mjeriteljske sposobnosti te poznavanje mjerne nesigurnosti, traže i međunarodne norme koje propisuju rad laboratorija: ISO/IEC 17025 te ISO 15189 (Gašljević, 2010.).

Validacija metoda se prema normi HRN EN ISO/IEC 17025 definira kao potvrda ispitivanjem i prikupljanje objektivnog dokaza da su ispunjeni osobiti zahtjevi za posebnu predviđenu uporabu (HZN, 2017.). U ovom slučaju, objektivni dokazi su zapisi o provedbi validacijskih eksperimenata. Validacijski eksperimenti se planiraju individualno, ovisno o analitu, metodi i matrici, a njihov opseg mora biti dovoljan za zadovoljavanje potreba i područja primjene metode. Validacija je kompromis između troškova, opasnosti i tehničkih mogućnosti, a sam postupak obuhvaća: definiranje svrhe i opsega korištenja metode, definiranje parametara izvedbe metode i njihovih granica prihvatljivosti, provjeru ispunjenja zahtjeva upotrebom te metode, kao i izjavu o valjanosti metode za utvrđenu svrhu (Gašljević, 2010.; HZN, 2017.).

2.4.1. Izvedbene značajke metode i kriteriji prihvatljivosti

Pri planiranju validacijskih postupaka dva su koraka naročito kritična: prepoznavanje bitnih izvedbenih značajki metode za utvrđenu uporabu te postavljanje kriterija učinkovitosti za te značajke, opet uvažavajući utvrđenu uporabu metode (Gašljević, 2010.).

Izvedbene značajke metode

Izvedbene značajke metode su: specifičnost/selektivnost, mjerna preciznost (ponovljivost, međupreciznost, obnovljivost), mjerna istinitost, linearnost, LOD, LOQ te robusnost (EC, 2002.c; Gašljević, 2010.; HZN, 2017.). Kad se radi o LC-MS metodama, u kojima značajan utjecaj na proces ionizacije analita i sam ishod analitičkog ispitivanja ima matrica, kao izvedbena značajka navodi se i utjecaj matrice, odnosno SSE te s njom povezane značajke R_A i R_E (Malachová i sur., 2014.; De Santis i sur., 2017., Sulyok i sur., 2020.).

Specifičnost se definira kao mogućnost nedvosmislenog određivanja analita u složenoj matrici uzorka, odnosno u prisutnosti drugih (srodnih) sastojaka, kao što su nečistoće i razgradni produkti te se upotrebljava za opis metoda koje su namijenjene za određivanje samo jednog analita. Selektivnost je svojstvo metode da istovremeno identificira ili kvantificira nekoliko analita neovisno jedan o drugome, te je značajka multikomponentnih metoda analiza (Danzer, 2001.; Kaštelan-Macan, 2003.).

Mjerna preciznost označuje rasipanje rezultata mjerenja u danim uvjetima. Mjerna ponovljivost je preciznost pod uvjetima ponovljivosti - isti analitičar, isti uzorak, isti instrument, kratko vremensko razdoblje. Međupreciznost (intermedijarna preciznost) je preciznost koja se postiže

unutar istog laboratorija u duljem vremenskom periodu uz određene promjene – različiti analitičari, različita oprema, različiti uzorak i sl. Ukoliko se promatra preciznost koja se postiže između različitih laboratorija, govorimo o mjernoj obnovljivosti, koja se uobičajeno ne kvantificira kod validacije unutar laboratorija (Kaštelan-Macan, 2003.; Gašljević, 2010.). Ako se obnovljivost mora provjeriti, laboratoriji bi trebali sudjelovati u međulaboratorijskim poredbenim ispitivanjima (EC, 2002.c), odnosno ispitivanjima istih ili sličnih predmeta ispitivanja u dva ili više laboratorija prema unaprijed određenim uvjetima. Uključivanje u programe ispitivanja sposobnosti ili vanjske procjene kvalitete, odnosno sudjelovanje u drugim međulaboratorijskim usporedbama, smatra se najprikladnijim sredstvom za praćenje kvalitete rezultata ispitivanja te je dokaz tehničke osposobljenosti laboratorija (HAA, 2015.).

Mjerna istinitost označava stupanj podudarnosti između srednje vrijednosti rezultata ispitivanja ponovljenih određeni broj puta i prihvaćene referentne vrijednosti. Istinitost se obično izražava kao mjerno odstupanje. Prema Odluci o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata br. 2002/657/EZ istinitost se može utvrditi jedino pomoću CRM-a, no ukoliko CRM nije na raspolaganju, umjesto istinitosti može se odrediti R metode koje se definira kao maseni udio analita dodan uzorku koji je prisutan u konačnom ekstraktu (EC, 2002.c).

Granica detekcije analitičke metode je najniža koncentracija analita u uzorku koja se može kvalitativno dokazati, dok je granica kvantifikacije najmanja količina analita koja se može dovoljno pouzdano odrediti, tj. uz odgovarajuću preciznost i istinitost (Kaštelan-Macan, 2003.). Procjena LOD-a i LOQ-a može biti vizualna, s pomoću omjera signal/šum (samo za analitičke postupke s baznom linijom) ili statistička, na bazi standardne devijacije signala i nagiba regresijskog pravca. Vrijednost granice kvantifikacije iznimno je važna kod metoda kojima se određuju analiti u tragovima koji i u vrlo niskim koncentracijama mogu štetno djelovati na zdravlje ljudi (Lazarić, 2012.), kao što su mikotoksini.

Linearnost je svojstvo metode da unutar danog mjernog područja osigurava linearnost odziva o koncentraciji analita u mjerenom uzorku. Mjerno područje se definira kao interval unutar kojeg analitički postupak ima zadovoljavajuću istinitost, preciznost i linearnost (Kaštelan-Macan, 2003.). Linearnost se određuje mjerenjem odziva metode na različite poznate koncentracije RM-a, a procjenjuje se matematički na način da se preko linearne regresije izrazi jednadžba pravca i izračuna koeficijent determinacije, za koji se uobičajeno postavlja kriterij $\geq 0,99$. Nagib pravca je parametar koji izravno ukazuje na osjetljivost metode, dok odsječak pravca može ukazivati na sustavnu pogrešku (Lazarić, 2012.).

Robusnost se definira kao mjera otpornosti analitičkog postupka na male, namjerne promjene radnih uvjeta metode. Iako se uglavnom ističe podatak o osjetljivosti metoda, podatak o

njezinoj otpornosti je također važan, obzirom da je nedovoljno otporna metoda podložna većoj laboratorijskoj pogrešci (Kaštelan-Macan, 2003.).

Za pojedinu metodu, odnosno uporabu metode, nije potrebno provesti ispitivanje svih gore navedenih značajki, već samo onih koje su bitne za njezinu namjenu, a da je postupak u skladu sa specificiranim zahtjevima (Gašljević, 2010.; Lazarić, 2012.; HZN, 2017.). Određeni zahtjevi validacije se mogu odrediti u tijeku primjene same metode, a prilikom njenog planiranja bitno je sagledati minimalni broj parametra koji će dati potrebne informacije o valjanosti primijenjenog postupka (Špehar i sur., 2016.). U Poglavlju 3. Odluke Komisije br. 2002/657/EZ navedeni su primjeri i/ili naputci za postupke validacije analitičkih metoda (EC, 2002.c), te su i oni korišteni u ovoj doktorskoj disertaciji.

Kriteriji prihvatljivosti

Poznavanje izvedbenih značajki metode, kao i regulatornih zahtjeva, osnova su za postavljanje kriterija prihvatljivosti za pojedinu značajku, koji se po provedenom postupku validacije uspoređuju s dobivenim rezultatima (Lazarić, 2012.). Kriteriji prihvatljivosti (učinkovitosti) pojedinih izvedbenih značajki metoda za određivanje mikotoksina propisani su u Prilogu II Uredbe Komisije (EZ) br. 401/2006 o utvrđivanju metoda uzorkovanja i analize za službenu kontrolu razina mikotoksina u hrani (EC, 2006.c). Za spojeve čije su koncentracije zakonski regulirane u žitaricama i proizvodima dozvoljene R i RSD vrijednosti u uvjetima ponovljivosti su prikazani u **Tablici 3**.

Tablica 3 Odabrani kriteriji učinkovitosti za mikotoksine prema Uredbi Komisije (EZ) br. 401/2006

	Razina µg/kg	R%	RSD%
AFT	< 1,0	50-120	Dobivena pomoću Horwitz-ove jednadžbe
	1-10	70-110	
	> 10	80-110	
DON	> 100	60-110	≤20
	≥ 500	70-120	≤20
FUM	≤ 500	60-120	≤30
	> 500	70-110	≤20
ZEA	≤ 50	60-120	≤40
	> 50	70-110	≤25
T-2/HT-2	15-250	60-130	≤30
	> 250	60-130	≤25
OTA	< 1	50-120	≤40
	≥ 1	70-110	≤20

2.4.2. Mjerna nesigurnost

Mjerni rezultat je procjena vrijednosti mjerne veličine i da bi bio potpun mora sadržavati iskaz o mjernoj nesigurnosti (JCGM, 2008.). Prava vrijednost (eng. *True value*) mjerne veličine je prirodno neodrediva (JCGM, 2012.), budući da ne postoji mjerenje koje je savršeno, bez različitih utjecaja i pogrešaka. Sve izvore mogućih pogrešaka koje se događaju prilikom mjerenja, neovisno o njihovoj klasifikaciji, uključuje mjerna nesigurnost. Mjerna nesigurnost se definira kao parametar pridružen rezultatu mjerenja koji opisuje rasipanje vrijednosti koje bi se razumno moglo pripisati mjerenoj veličini (JCGM, 2008.). Ona ukazuje na raspon u kojem se s određenom vjerojatnošću, odnosno uz određenu razinu povjerenja, nalazi prava vrijednost rezultata (Gašljević i Jakovčić, 2006.). Prema zahtjevu norme HRN EN ISO/IEC 17025, ispitni laboratoriji moraju imati i primjenjivati postupke za procjenu mjerne nesigurnosti za sva kvantitativna ispitivanja (HZN, 2017.).

Mjerna nesigurnost se procjenjuje u skladu s međunarodno i multidisciplinarno harmoniziranim postupkom u čijoj su izradi surađivale različite međunarodne organizacije kao što su BIPM, ISO i druge, GUM-om, izdanim 1993. godine, s ispravkom 1995. (Gašljević, 2010.). Prema GUM-u, mjerna nesigurnost općenito obuhvaća više sastavnica, od kojih se neke određuju na temelju statističke razdiobe niza mjerenja i opisuju se eksperimentalnim standardnim odstupanjima, dok se druge određuju iz pretpostavljenih razdioba na temelju iskustva ili drugih podataka. Sastavnice mjerne nesigurnosti se kvantificiraju u obliku standardnog odstupanja, koje se u tom slučaju naziva standardna nesigurnost. Kod kvantitativnih metoda ispitivanja za procjenu sastavnica mjerne nesigurnosti GUM opisuje A i B način, odnosno standardnu nesigurnost A vrste i standardnu nesigurnost B vrste (JCGM, 2008.; Gašljević, 2010.).

Standardna nesigurnost A vrste

Nesigurnost A vrste se temelji na statističkoj analizi niza ponovljenih mjerenja. Radi se o *a posteriori* (lat. *ono što dolazi poslije*) obradi dobivenih informacija o mjernom procesu, nakon provedenog eksperimenta. Ako bi se mjerni postupak proveo na način da se dobije veliki broj mjerenja, odnosno beskonačni niz neovisnih mjerenja iste mjerne veličine, zbog slučajnih pogrešaka rezultati bi se raspodijelili po Gaussovoj ili normalnoj razdiobi. Vrh dobivene krivulje bila bi aritmetička sredina cijelog skupa rezultata μ te standardno odstupanje cijelog skupa rezultata σ . Budući da se u praksi ne može napraviti beskonačno mnogo mjerenja, već samo ograničen broj mjerenja n , iz tih se podataka procjenjuju μ i σ , s aritmetičkom sredinom \bar{x} i standardnim odstupanjem s (Gašljević i Jakovčić, 2006.):

$$\bar{x}_l = \frac{1}{n} \sum_{k=1}^n x_{i,k} \quad (3)$$

$$s(x_i) = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{k=1}^n (x_k - \bar{x})^2} \quad (4)$$

Standardna nesigurnost mjernog niza se potom izražava kao:

$$u(x_i) = s(\bar{x}_i) = \frac{s(x_i)}{\sqrt{n}} \quad (5)$$

Standardna nesigurnost B vrste

Kada se iz mjernog postupka ne mogu odrediti ili nije ekonomično određivanje pojedinih sastavnica, koristi se procjena B vrste. Postupak procjene standardne nesigurnosti B vrste zahtijeva znanje i iskustvo mjeritelja za prosudbu raspoloživih podataka kao što su proizvođačke specifikacije, podaci s umjernica i ovjernica, podaci iz priručnika, mjerni podaci iz drugih laboratorija i sl. (JCGM, 2008.). Nesigurnost B vrste se temelji na *a priori* (lat. *ono što dolazi prije*) vjerojatnosnim razdiobama: pravokutnoj (jednolikoj), trokutnoj ili normalnoj (Gaussovoj). Najkonzervativniji izbor je pravokutna vjerojatnosna razdioba, budući da ima najveće standardno odstupanje. Ako procjenitelj raspolaže s više informacija, odabrati se može i trokutna razdioba, dok je Gaussova najhrabrija odluka za koju valja imati tehničko opravdanje (Gašljević i Jakovčić, 2006.).

Koraci procjene mjerne nesigurnosti

Prema GUM-u postupak procjene i iskazivanja mjerne nesigurnosti uključuje: opis mjerne veličine te opis mjernog postupka i matematičkog modela mjerenja, prepoznavanje i analizu izvora nesigurnosti (npr. Ishikawa dijagramom), kvantificiranje izvora nesigurnosti (standardna nesigurnost A vrste i standardna nesigurnost B vrste), izračunavanje sastavljene standardne nesigurnosti iz procijenjenih standardnih nesigurnosti, izračunavanje proširene mjerne nesigurnosti, te iskazivanje mjernog rezultata uz proširenu mjernu nesigurnost (Gašljević i Jakovčić, 2006.; JCGM, 2008.).

Sastavljena mjerna nesigurnost u_c uzima u obzir doprinos svih bitnih izvora nesigurnosti. Izračunava se iz umnoška iznosa mjerne veličine i drugog korijena zbroja kvadrata pojedinačnih relativnih standardnih mjernih nesigurnosti te se pri tome sve standardne nesigurnosti jednako matematički tretiraju, neovisno o tome da li se radi o procjenama A ili B vrste.

Proširena mjerna nesigurnost U se izračunava množenjem sastavljene nesigurnosti u_c i obuhvatnog faktora k . Uobičajeno k iznosi od 2 do 3 te za normalnu razdiobu izbor $k=2$ obuhvaća raspon uz razinu pouzdanosti približno 95% (Gašljević, 2010.).

Primjer iskazivanja mjernog rezultata uz proširenu mjernu nesigurnost i obuhvatni faktor $k=2$ i uz mjernu jedinicu je dan niže navedenim izrazom **(6)**. Broj značajnih znamenki trebao bi biti u skladu sa legislativom, odnosno rezultat bi trebalo iskazati na način koji odgovara iskazanoj NDK vrijednosti danoj u važećoj legislativi.

$$\gamma_{\text{mikotoksin}} = (\text{iznos} \pm U) \mu\text{g/kg} \quad \mathbf{(6)}$$

Sastavnice mjerne nesigurnosti za koje se pokaže da najviše doprinose mjernoj nesigurnosti nužno je kontrolirati kroz svakodnevni mjerni proces, odnosno osigurati njihov trajni statistički nadzor kroz uspostavu postupaka kontrole kvalitete rezultata ispitivanja i internu provjeru kritičnih parametra metode. Pored internih mjera kontrole kvalitete, postoje i vanjske provjere kao što je sudjelovanje u međulaboratorijskim ispitivanjima, koje mogu detektirati neotkrivene sustavne pogreške u laboratoriju (Gašljević i sur., 2010.).

3.EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Zadatak

Zadatak ove doktorske disertacije je razvoj i validacija LC-MS/MS metode za određivanje zakonski reguliranih mikotoksina u žitaricama, njena primjena u istraživanju pojavnosti i supojavnosti istih u žitaricama žetve 2016. i 2017. iz svih hrvatskih regija te izrada korelacije pojavnosti mikotoksina s vremenskim uvjetima na pojedinim mikrolokacijama. Aktivnosti istraživanja su podijeljene u nekoliko faza:

1. Razvoj LC-MS/MS multimikotoksinske metode bazirane na razrijedi i mjeri principu za određivanje mikotoksina u žitaricama reguliranih europskim zakonodavstvom: Uredba (EZ) br. 1881/2006 (EC, 2006.a) i Preporuka 2013/165/EU (EC, 2013.) - hrana, Direktiva 2002/32/EZ (EC, 2002.a), Preporuka 2006/576/EC (EC, 2006.b) te Preporuka 2013/165/EU (EC, 2013.) - hrana za životinje, uključujući:
 - odabir i optimizaciju MS/MS parametara za pojedini analit: MRM tranzicije (prekursorski ioni i produktni ioni), napon na konusu, energija kolizije za odabrane tranzicije pojedinih mikotoksina te ostali MS/MS parametri specifični za primijenjeni MS/MS detektor;
 - kromatografsku separaciju analita: odabir sastava i pH mobilnih faza, gradijenta, analitičke UHPLC kolone i drugi parametri poput brzine protoka, volumena injektiranja i temperature kolone, te
 - pripremu uzoraka razrijedi i mjeri principom uz usporedbu različitih uvjeta ekstrakcije uvažavajući službenu legislativu vezanu za uzorkovanje i poduzorkovanje za analizu mikotoksina (Uredba Komisije (EZ) br. 401/2006 (EC, 2006.c)).
2. Validacija razvijene LC-MS/MS metode:
 - provođenje validacijskih eksperimenata s ciljem prikupljanja podataka o izvedbenim značajkama metode: selektivnost, mjerna preciznost, mjerna istinitost, linearnost, LOD i LOQ, te utjecaj matrice (SSE) ispitivanih žitarica i povezane značajke R_A i R_E ;
 - rješavanje problema utjecaja matrice na pojedini analit;
 - procjena mjerne nesigurnosti metode prema GUM načelima, te
 - uspostava postupaka kontrole kvalitete rezultata ispitivanja: unutarnja i vanjska - međulaboratorijske usporedbe i/ili (C)RM.
3. Primjena razvijene i validirane LC-MS/MS metode za određivanje reguliranih mikotoksina u hrvatskim žitaricama žetve 2016. i 2017. te korelacija s vremenskim uvjetima i analiza supojavnosti mikotoksina:
 - analiza reguliranih mikotoksina u prikupljenim uzorcima najzastupljenijih poljoprivrednih kultura prema podacima APPRRR-a za 2016. te 2017. godinu;

- priprema uzoraka prema validiranoj metodi te identifikacija i kvantifikacija mikotoksina reguliranih u žitaricama i proizvodima (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, DON, FB1, FB2, ZEA, T-2, HT-2, OTA) korištenjem LC-MS/MS-a;
- statistička analiza prikupljenih podataka te provjera sukladnosti s legislativom u pogledu NDK vrijednosti mikotoksina u hrani, odnosno hrani za životinje;
- priprema toplinske mape Hrvatske s podacima o pojavnosti detektiranih mikotoksina i usporedba s vremenskim uvjetima za pojedine mikrolokacije, te
- analiza supojavnosti mikotoksina te izrada preporuka za korištenje žitarica sukladno određenim koncentracijama mikotoksina.

3.2. Materijali i metode

Eksperimentalni dio doktorske disertacije odrađen je u Kemijskom laboratoriju, Odjelu za instrumentalne metode i spektrometriju masa, tvrtke Inspecto d.o.o., te u Laboratoriju za toksikologiju Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek.

Kemikalije korištene u provođenju ispitivanja su:

- Analitički standardi mikotoksina (Romer Labs® Inc, Austrija): smjesa AFB1-a, AFB2-a, AFG1-a i AFG2-a koncentracije 2,0 µg/mL za AFB1 i AFG1 te 0,5 µg/mL za AFB2 i AFG2 (lot broj L17324A), DON koncentracije 100 µg/mL (lot broj L17194D), smjesa FB1-a i FB2-a koncentracije 50 µg/mL (lot broj L17042M), ZEA koncentracije 100 µg/mL (lot broj L172817Z), T-2 koncentracije 100 µg/mL (lot broj L171837), HT-2 koncentracije 100 µg/mL (lot broj L17194H) te OTA koncentracije 10 µg/mL (lot broj L17223A). Standardi mikotoksina u filmu su rekonstituirani u ACN-u. Sve otopine su skladištene u zamrzivaču na -20 °C te prije korištenja temperirane na sobnu temperaturu.
- Organska otapala i modifikatori: MeOH i ACN LC-MS kvalitete (J.T. Baker, Nizozemska), FA i HAc LC-MS kvalitete, AF i AA LC-MS kvalitete (svi Fisher Chemical, Engleska) te ultračista voda (H₂O) pročišćena Niro VV sustavom (Nirosta d.o.o., Osijek).

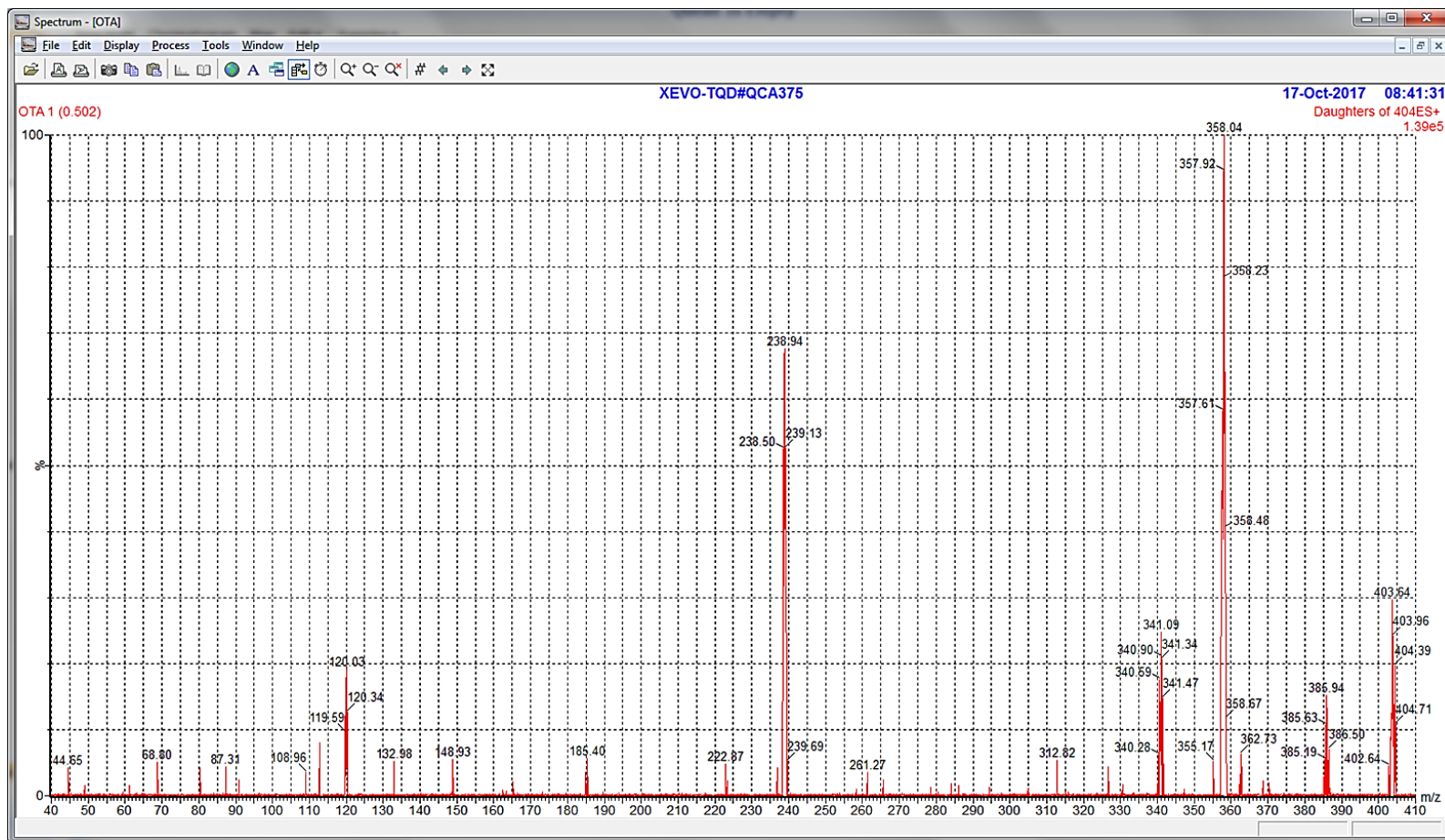
Instrumenti koji su korišteni za provođenje eksperimenata su:

- vorteks mješalica (Biosan, Latvija), klipne mikropipete volumena 0,5-10 µL, 10-100 µL, 100-1000 µL i 0,5-5 mL (Eppendorf, Njemačka), analitička vaga Analytic AC 210 S (Sartorius, Njemačka), tehnička vaga GX-2000 (A&D Weighing, SAD), titrator TitraLab AT1000 SERIES (Hach, SAD), laboratorijski mlin SM 300 (Retsch, Njemačka), laboratorijski mlin Romer RAS (Romer Labs, Austrija), rotacijska mućkalica, centrifuga Q-sep 3000 (Restek, SAD) te UPLC-MS/MS instrument Acquity H-class-Xevo TQD (Waters, SAD).

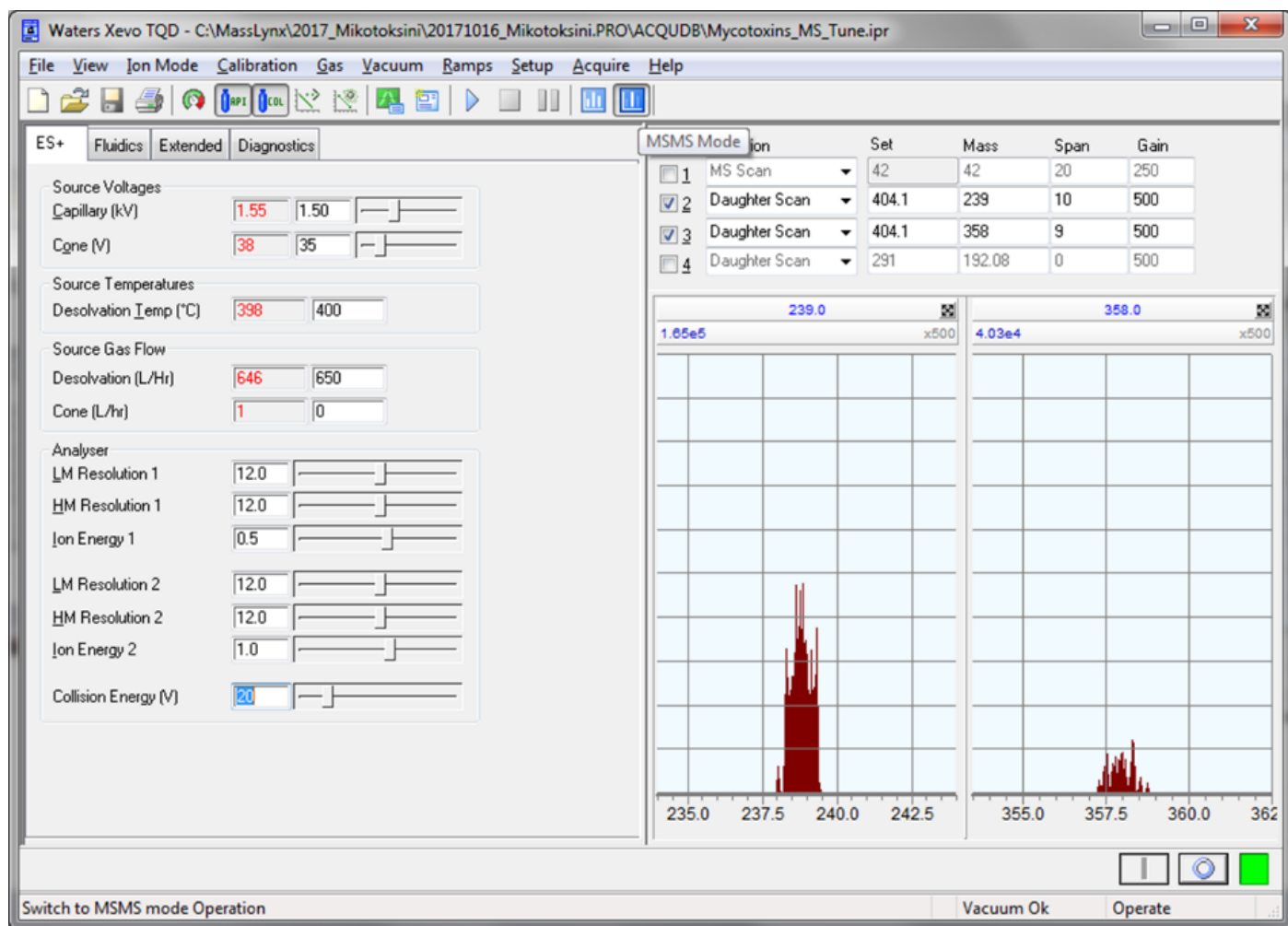
3.2.1. Razvoj LC-MS/MS multimikotoksinske metode bazirane na razrijedi i mjeri principu

MS/MS detekcija

Cjelokupni spektri masa te MS/MS spektri pojedinog analita snimljeni su uvođenjem otopine analitičkog standarda pojedinog mikotoksina u koncentraciji 1 µg/mL pripremljenog u ACN-u u spektrometar masa pri protoku 20 µL/min. Eksperimenti su provedeni u pozitivnoj, odnosno negativnoj ESI te je isprobano kombinirano uvođenje otopine standarda u ACN-u uz dotok mobilne faze pri protoku 0,1 mL/min. Snimanje cjelokupnog spektra masa pojedinog analita provedeno je s ciljem prikupljanja bar jednog iona prekursora te optimalnog napona na konusu, a snimanje MS/MS spektara kako bi se prikupile fragmentacije pojedinog iona (primjer **Slika 14**). Provjera iona prekursora te iona produkata je provedena uspoređivanjem s literaturnim podacima, odnosno znanstvenim radovima različitih autora. Kako bi se utvrdili uvjeti pri kojima se postiže najjači signal MS/MS tranzicija pojedinog spoja, ioni produkti su snimani pri različitim energijama kolizije (primjer **Slika 15**) te je tranzicija s jačim odzivom izabrana za kvantifikaciju, dok je druga korištena kao potvrdni ion spoja od interesa. Ostali MS/MS parametri kao što su napon na izvoru iona te temperatura i protok plina za raspršivanje su također optimizirani te su odabrani uvjeti pri kojima se za sve analite postiže najjači odziv.



Slika 14 Primjer snimljenog MS/MS spektra masa za OTA-u s masama najjačeg odziva



Slika 15 Primjer optimizacije MS/MS uvjeta za ione produkte OTA-e u programu Waters Xevo TQD Tune Page

Kromatografska separacija

Obzirom na kemijsku raznolikost mikotoksina od interesa, bilo je potrebno ispitati prikladan sastav mobilnih faza kako bi se postigao optimalan oblik pika te potrebna osjetljivost uz prihvatljivo vrijeme trajanja analize. Ispitana je kombinacija H₂O i organskih otapala MeOH-a i ACN-a u različitim omjerima koji su varirali između 0 i 25% udjela organske faze u inicijalnom sastavu gradijenta. Također, ispitan je dodatak modifikatora u mobilne faze, kao što su AF i AA te FA i HAc. Za ispitivanje kromatografske separacije dostupne su bile različite modifikacije C18 punjenja analitičkih kolona različitih proizvođača: Acquity BEH C18 dimenzija 100x2,1 mm i 1,7 μm veličine čestica punjenja (Waters, Irska); Ultra Acqueous C18 dimenzija 100x2,1 mm i 3 μm veličine čestica punjenja (Restek, SAD), Acquity HSS T3 dimenzija 100x2,1 mm i 1,8 μm veličine čestica punjenja (Waters, Irska) te Kinetex EVO C18 dimenzija 150x2,1 mm i 1,7 μm veličine čestica punjenja (Phenomenex, SAD). Drugi parametri poput brzine protoka, volumena injektiranja i temperature kolone su također optimizirani, budući da imaju značajan utjecaj na postizanje željenog oblika pika za sve analite, kao i parametre učinkovitosti metode.

Priprema uzoraka

U pogledu kemijske raznolikosti analita sastav ekstrakcijskog otapala je kritični parametar tijekom razvoja multimikotoksinske metode (Sulyok i sur., 2006.). Stoga je bilo potrebno ispitati različite smjese H₂O i organskih otapala sa i bez dodatka FA-a, odnosno HAc-a. Prilikom optimizacije uvjeta ekstrakcije reguliranih mikotoksina u ovom istraživanju ispitani su utjecaji ekstrakcijske smjese otapala sastava koju su predložili Frenich i sur. (2009.) - ACN/H₂O 80/20 (v/v) te Malachová i sur. (2014.) - ACN/H₂O/HAc 79/20/1 (v/v/v), kao i njihove modifikacije. Nadalje, uz sastav ekstrakcijskog otapala, ispitan je i utjecaj različitih duljina ekstrakcije na izvedbene značajke metode, odnosno efikasnost ekstrakcije pojedinih mikotoksina, te je odabrano najpovoljnije za ekstrakciju svih analita od interesa.

3.2.2. Validacija razvijene LC-MS/MS multimikotoksinske metode

Prilikom validacije razvijene multimikotoksinske razrijedi i mjeri metode određivani su sljedeći validacijski parametri, odnosno izvedbene značajke metode: selektivnost, linearnost, LOD, LOQ, mjerna preciznost (ponovljivost mjerenja i pripreme uzoraka) i mjerna istinitost (R). Budući da se radi o LC-MS/MS metodi ispitivanja, u kojoj značajan utjecaj na proces ionizacije analita i sam ishod analitičkog ispitivanja ima matrica, određen je i utjecaj matrice, odnosno SSE te s njom povezane značajke R_A i R_E . Validacijski eksperimenti su provedeni u skladu s Odlukom Komisije br. 2002/657/EZ o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata (EC, 2002.c). Evaluacija dijela dobivenih podataka (linearnost metode, LOD i LOQ) provedena je korištenjem MassLynx i TargetLynx programskih alata (v. 4.1, Waters, SAD), dok je ostala evaluacija provedena u Microsoft Office Excel-u 2016.

Ispitivanje validacijskih parametara metode

Selektivnost metode je provjerena usporedbom analiziranog *blank* otapala te otapala obogaćenog analitima. Odsutnost kromatografskog signala na očekivanom vremenu zadržavanja ciljanih spojeva ukazuje na odsutnost kemijskih interferencija ili interferencija iz matrice.

Linearnost standarda mikotoksina provjerena je u odgovarajućem koncentracijskom području za pojedini spoj shodno radnom opsegu mjerenjem površina pikova radnih otopina standarda spektrometrom masa. Svaka radna otopina standarda je injektirana tri puta te je iz dobivenih podataka prikazana ovisnost srednje vrijednosti izmjerenih površina pika i pripadajuće koncentracije radne otopine standarda. Dobivene krivulje su linearizirane, odnosno korigirane linearnom regresijom, određena je jednadžba kalibracijskog pravca za pojedini spoj te izražen koeficijent determinacije R^2 za koji je postavljen kriterij $\geq 0,99$.

LOD i LOQ metode određene su iz kromatograma obogaćenih uzoraka žitarica metodom omjera signal/šum pri čemu visina dobivenog pika mora biti tri puta veća od visine pozadinskog šuma za LOD ($S/N \geq 3$), odnosno 10 puta veća od visine pozadinskog šuma za LOQ ($S/N \geq 10$).

Istinitost mjerenja je ocijenjena pomoću određivanja R-a metode. Ispitivanje R-a metode je provedeno obogaćivanjem *blank* uzoraka kukuruza, pšenice i ječma analitičkim standardom mikotoksina u koncentraciji koja odgovara LOQ vrijednosti pojedinog analita, NDK vrijednosti u pojedinoj matrici te vrijednosti 1,5 NDK (**Tablica 4**). Svako obogaćenje je pripremljeno šest puta te svaka priprema izmjerena tri puta. R metode je izračunat prema formuli:

$$R \% = \frac{x_2 - x_1}{x_3} \times 100 \quad (7)$$

gdje je x_1 izmjerena vrijednost koncentracije analita u uzorku bez dodatka, x_2 izmjerena vrijednost koncentracije obogaćenog uzorka, x_3 koncentracija standarda dodana za obogaćivanje uzorka. Naposljetku je izražena srednja R vrijednost za svaku obogaćenu koncentraciju te ukupna srednja R vrijednosti svakog mikotoksina u pojedinoj vrsti uzorka, uz kalibraciju u otapalu te kalibraciju u pripadajućoj matrici. Prihvaćene vrijednosti dobivenog R-a pojedinog analita pri različitim obogaćenim koncentracijama odgovaraju vrijednostima propisanim Uredbom Komisije (EZ) br. 401/2006, Prilog II (EC, 2006.c).

Tablica 4 Vrijednosti obogaćenja pojedinog mikotoksina u validiranim matricama

	Kukuruz $\mu\text{g/kg}$			Pšenica $\mu\text{g/kg}$			Ječam $\mu\text{g/kg}$		
	LOQ	NDK	1,5 NDK	LOQ	NDK	1,5 NDK	LOQ	NDK	1,5 NDK
AFB1	1,0	5,0	7,5	1,0	2,0	3,0	1,0	2,0	3,0
AFB2	0,5	1,25	1,875	0,5	0,75	1,5	0,5	0,75	1,5
AFG1	1,0	5,0	7,5	1,0	2,0	3,0	1,0	2,0	3,0
AFG2	0,5	1,25	1,875	0,5	0,75	1,5	0,5	0,75	1,5
DON	200	1750	2625	200	1250	1875	200	1250	1875
FB1	150	2000	3000	150	1000	1500	150	1000	1500
FB2	150	2000	3000	150	1000	1500	150	1000	1500
ZEA	30	350	525	30	100	150	30	100	150
T-2	10	100	150	10	100	150	10	100	150
HT-2	10	100	150	10	100	150	10	100	150
OTA	1,0	5,0	7,5	1,0	5,0	7,5	1,0	5,0	7,5

Mjerna preciznost provjerena je pomoću ispitivanja ponovljivosti mjerenja i ponovljivosti pripreme uzoraka pri čemu su korišteni validacijski eksperimenti ispitivanja R-a.

Ponovljivost mjerenja je ispitana pomoću tri mjerenja koncentracije analita pojedine pripreme uzorka svakog obogaćenja za svaku ispitivanu matricu. Određene su srednje vrijednosti mjerenja koncentracije te njihove standardne devijacije koje su zatim korištene za izračun te relativne standardne devijacije izražene u postotku, čija je prihvaćena vrijednost $\leq 20\%$:

$$RSD = \frac{S}{X} \times 100 \quad (8)$$

pri čemu je S standardna devijacija skupine izmjera, a X srednja vrijednost skupine izmjera.

Ponovljivost pripreme uzoraka ispitana je korištenjem srednje izmjerene vrijednosti koncentracije analita za svaku od šest pripremljenih uzorka pojedine obogaćene koncentracije,

pri čemu su izračunate srednja vrijednost koncentracije svake pripreme i standardna devijacija srednjih vrijednosti koncentracija za pojedino obogaćenje te je naposljetku izračunata RSD vrijednost pripreme uzoraka za svaku obogaćenu koncentraciju prema formuli (8). Prihvaćena vrijednost RSD-a je $\leq 20\%$.

Utjecaj matrice (SSE) te s njom povezane značajke R_A i R_E također su određeni kako bi se odvojeno evaluirao korak pripreme uzoraka te korak detekcije na instrumentu (Sun i sur., 2019.). Smanjenje/pojačanje ionskog signala izračunato je preko formula (1) i (2), dok su za izračun ostala dva parametra korištene formule (9) i (10):

$$R_A \% = \frac{\text{srednja površina analita u obogaćenom uzorku}}{\text{srednja površina analita u otapalu}} \times 100 \quad (9)$$

$$R_E \% = \frac{\text{srednja površina analita u obogaćenom uzorku}}{\text{srednja površina analita u ekstraktu matrice}} \times 100 \quad (10)$$

Za spojeve za koje se utvrdio značajan utjecaj matrice prilikom provođenja validacijskih eksperimenata ispitala se i uporaba kalibracije u matrici kao alternativnog načina smanjenja efekta pojačavanja ili smanjenja signala analita koji se može koristiti u kvantifikaciji mikotoksina prisutnih u analiziranim žitaricama i proizvodima.

Mjerna obnovljivost je provjerena sudjelovanjem u dostupnim međulaboratorijskim poredbenim ispitivanjima, odnosno ispitivanjima sposobnosti, omogućenim od strane dobavljača kao što su Bipea, Fapas i Romer Labs u matricama različitih žitarica i proizvoda, u kojima se na osnovu prijavljenih rezultata laboratorija, dodijeljenih vrijednosti za analite od interesa te standardne devijacije prijavljenih rezultata sudionika ispitivanja računa z-vrijednost za koju je poželjan postignuti raspon $-2 \leq z \leq 2$ koji se smatra zadovoljavajućim. Rezultati $2 < |z| \leq 3$ smatraju se „sivom“ zonom te su svojevrsan signal za potrebom praćenja metode, dok se rezultat $|z| > 3$ smatra nezadovoljavajućim te zahtijeva mjere za pronalaskom uzroka nastalog problema (Malachová i sur., 2018.).

Procjena mjerne nesigurnosti

U procjeni mjerne nesigurnosti korišten je postupak prema GUM-u koji započinje opisom mjernog postupka i mjerne veličine. Metoda određivanja mikotoksina u ovom radu se zasniva na razrijedi i mjeri principu. Homogenizirani uzorak se ekstrahira smjesom otapala, a dobiveni ekstrakt se razrijedi u omjeru 1:1 te profiltrira. Identifikacija i kvantifikacija mikotoksina u razrijeđenom ekstraktu se vrši vezanim sustavom LC-MS/MS. Navedenom metodom se određuje masena koncentracija pojedinog mikotoksina u pripremljenom ekstraktu uzorka pomoću jednadžbe:

$$y = ac + b \quad (11)$$

$$c = \frac{y}{a} - b \quad (12)$$

gdje je y odziv detektora, a nagib kalibracijskog pravca, b odsječak pravca na y osi, c izračunata koncentracija mikotoksina. Izmjerena vrijednost koncentracije se korigira s obzirom na pripremu uzorka prema niže navedenoj jednadžbi te izražava u $\mu\text{g}/\text{kg}$:

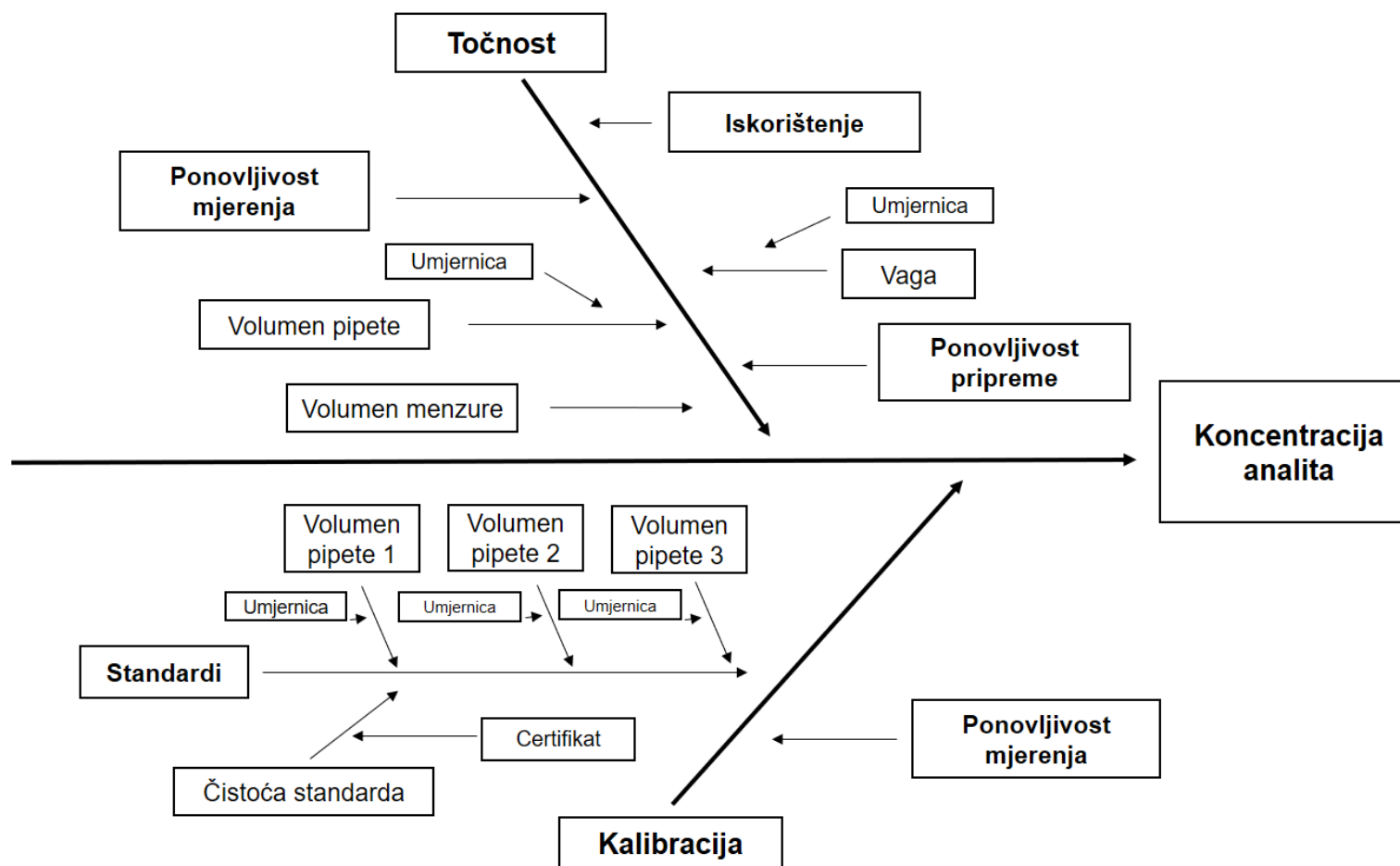
$$\gamma_c = c \cdot \frac{V}{m} \cdot F_r \quad (13)$$

gdje je V volumen ekstrakcijskog otapala, m masa odvagane uzorka i F_r faktor razrjeđenja ekstrakta.

Prepoznati izvori nesigurnosti (A vrste i B vrste) su analizirani te grafički prikazani dijagramom uzroka i posljedica (**Slika 16**). Nesigurnosti A vrste odnose se na podatke dobivene statističkom obradom rezultata provedenih validacijskih ispitivanja: kalibracijski pravac (linearnost), ponovljivost mjerenja, ponovljivost pripreme uzorka te R metode. Izvori nesigurnosti B vrste odnose se na podatke preuzete iz umjernica i certifikata: čistoća analitičkih standarda, nesigurnost vage, nesigurnost volumena pipeta i menzure. Izvori nesigurnosti (standardne nesigurnosti) su kvantificirani prema formulama **(14) - (23)**, a potom iskorišteni za izračun sastavljene standardne nesigurnosti te proširene mjerne nesigurnost koja se iskazuje uz mjerni rezultat.

Za izračun nesigurnosti čistoće standarda $u_{\check{c}s}$, volumena pipeta i menzure u_v te nesigurnosti odvage, odnosno mase uzorka, u_m , korišten je podatak o vrijednosti mjerne nesigurnosti a koji daje proizvođač na pripadajućem certifikatu te se doprinos računa prema jednadžbi:

$$u = \frac{a}{\sqrt{3}} \quad (14)$$



Slika 16 Ishikawa dijagram za razvijenu multimitoksinu LC-MS/MS razrijedi i mjeri metodu

Relativna nesigurnost čistoće standarda $U_{\check{c}s}$, relativna nesigurnost volumena pipeta i menzure U_v te relativna nesigurnosti odvage U_m se izračunavaju iz omjera pripadajuće standardne nesigurnosti te nazivne koncentracije, volumena, odnosno mase.

Za izračun nesigurnosti kalibracijskog pravca u_{c0} korišteni su podaci tri mjerenja pet različitih koncentracija analitičkog standarda pomoću sljedećih jednadžbi:

$$u_{c_0} = \frac{s}{a} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(c_0 - c_{sr})^2}{s_{xx}}} \quad (15)$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n [A_j - (ac_j + b)]^2}{n-2}} \quad (16)$$

$$s_{xx} = \sum_{j=1}^n (c_j - c_{sr})^2 \quad (17)$$

gdje je s rezidualno standardno odstupanje, a nagib kalibracijskog pravca, p broj ponovljenih mjerenja po otopini, n ukupni broj mjerenja, c_0 srednja vrijednost srednje točke kalibracijskog pravca, c_{sr} srednja vrijednost koncentracija, A_j izmjerena površina kalibranta, c_j koncentracija kalibranta, b odsječak kalibracijskog pravca. Relativna nesigurnost kalibracijskog pravca U_{c0} izračuna se iz omjera standardne nesigurnosti u_{c0} i srednje vrijednosti svih koncentracija c_{sr} .

Za izračun nesigurnosti ponovljivosti pripreme uzorka u_{pu} koriste se podaci tri mjerenja svake od šest priprema za tri obogaćene koncentracije. Izračuna se standardna devijacija srednjih vrijednosti mjerenja pripremljenih uzoraka za svaku obogaćenu koncentraciju te se podijeli s korijenom iz broja priprema:

$$s = \frac{1}{N} \sum_i^N (x_i - \bar{x})^2 \quad (18)$$

$$u_{pu} = \frac{s}{\sqrt{6}} \quad (19)$$

gdje je s standardna devijacija, N broj eksperimenata, x_i koncentracija pojedine pripreme, \bar{x} srednja koncentracija priprema jednog obogaćenja. Standardna nesigurnost se izračunava za svaku obogaćenu koncentraciju te se odabire ona s najvećim iznosom. Relativna nesigurnost pripreme uzorka se izračuna iz omjera standardne nesigurnosti u_{pu} i srednje vrijednosti koncentracija c_{sr} .

Za izračun nesigurnosti ponovljivosti mjerenja u_{pm} korišteni su podaci dobiveni mjerenjem šest pripremljenih uzoraka tri puta. Izračunata je združena (eng. *Pooled*) standardna devijacija s_p svih izmjerenih površina te podijeljena s drugim korijenom iz broja mjerenja:

$$s_p = \sqrt{\frac{1}{K} \sum_{k=1}^K s_k^2} \quad (20)$$

$$u_{pm} = \frac{s_p}{\sqrt{n}} \quad (21)$$

gdje je K broj eksperimenata, s standardna devijacija mjerenja pojedinog uzorka, a n ukupni broj mjerenja. Relativna nesigurnost ponovljivosti mjerenja se izračuna iz omjera standardne nesigurnosti u_{pm} i srednje vrijednosti svih izmjerenih površina A_{sr} .

Za izračun nesigurnosti R-a u_i korištena je srednja vrijednost R-a R uzimajući u obzir pravokutnu razdiobu prema jednadžbi (Štěpán i sur., 2004.):

$$u_i = \frac{0,5 \cdot (1-R)}{\sqrt{3}} \quad (22)$$

$$R = \frac{R_{c1} + R_{c2} + R_{c3}}{3} \quad (23)$$

gdje su R_{c1} , R_{c2} i R_{c3} R-i metode dobivena obogaćenjem *blank* uzorka s tri različite koncentracije c_1 , c_2 i c_3 . Relativna nesigurnost R-a se izračuna iz omjera standardne nesigurnosti u_i i vrijednosti R .

Izračunate vrijednosti sastavnica mjerne nesigurnosti se prikazuju tablično kao relativna mjerna nesigurnost za svaku pojedinu sastavnicu, a prikazuju se i u stupičastom dijagramu u kojem se zorno vidi koje sastavnice značajno doprinose mjernoj nesigurnosti. Sastavnice s najvećom vrijednosti uzimaju se u obzir pri izračunu sastavljene mjerne nesigurnosti u_c prema jednadžbi:

$$u_c = c \cdot \sqrt{(u_1)^2 + (u_2)^2 + (u_3)^2 + \dots + (u_n)^2} \quad (24)$$

gdje je c koncentracija mjerne veličine pri kojoj se želi izraziti mjerna nesigurnost, npr. vrijednost koja odgovara LOQ metode.

Proširena mjerna nesigurnost U izračunata je množenjem sastavljene nesigurnosti u_c i obuhvatnog faktora k uz pouzdanost 95%, gdje je $k=2$:

$$U = k \cdot u_c = 2 \cdot u_c \quad (25)$$

Za sastavnice mjerne nesigurnosti koje najviše doprinose mjernoj nesigurnosti (kritični parametri metode) osigurati će se trajni statistički nadzor kroz uspostavu unutarnjih postupaka kontrole kvalitete rezultata u rutinskom radu. Osim unutarnjim mjerama kontrole, provjeravati će se i vanjskim mjerama, kao što je sudjelovanje u međunarodnim ispitivanjima sposobnosti, odnosno međulaboratorijskim usporednim ispitivanjima.

3.2.3. Primjena razvijene i validirane LC-MS/MS multimikotoksinske metode

Prikupljanje uzoraka

Za određivanje pojavnosti reguliranih mikotoksina odabrani su uzorci tipičnih žitarica za podneblje Republike Hrvatske i to u obimu prema podacima APPRRR o najzastupljenijim poljoprivrednim kulturama za 2016. te 2017. godinu. Prikupljeno je ukupno 209 uzoraka žitarica uzgojenih u Republici Hrvatskoj (**Tablica 5**), pri čemu se vodilo računa da bar jedan uzorak potječe iz svake županije, a ostatak prema zastupljenosti, odnosno zasađenosti poljoprivrednih površina. Za 2016. godinu prikupljeni su uzorci kukuruza, pšenice i ječma, a za 2017. godinu uzorci kukuruza, pšenice, ječma te zobi, raži i tritikala.

Uzorkovanje žitarica je izvršeno prema Uredbi Komisije (EZ) br. 401/2006, dijelu B Priloga I za metode uzorkovanja za žitarice i proizvode od žitarica, koja, ovisno o težini serije iz koje se uzorkuje, propisuje težinu ili broj podserija za uzorkovanje, broj pojedinačnih uzoraka uzetih s različitih mjesta raspoređenih unutar serije ili podserije te težinu skupnog uzorka koji se dobiva objedinjenjem prikupljenih pojedinačnih uzoraka (**Tablica 6**) (EC, 2006.c). Minimalna količina prikupljenih uzoraka žitarica iznosila je 10 kg.

Po dolasku u laboratorij uzorci su skladišteni do trenutka mljevenja (najduže 48 h) na suhom i tamnom mjestu kako bi se izbjegla naknadna produkcija mikotoksina. Uzorci su prije analize usitnjeni (veličina sita 0,5 mm) kako bi se dobila homogena veličina čestica pri čemu su korišteni laboratorijski mlinovi SM 300 (Retsch, Njemačka) (**Slika 17**) te Romer RAS (Romer Labs, Austrija). Poslije mljevenja uzorci su čuvani u zamrzivaču na -18 °C do analize.

Tablica 5 Pregled vrste i broja prikupljenih uzoraka žitarica prema županijama za 2016. i 2017. godinu

Županija	2016. godina							2017. godina						
	Ukupno	Kukuruz	Pšenica	Ječam	Tritikal	Raž	Zob	Ukupno	Kukuruz	Pšenica	Ječam	Tritikal	Raž	Zob
Bjelovarsko-bilogorska	8	6	2					8	2	6				
Brodsko-posavska	15	13	2					6		6				
Dubrovačko-neretvanska	3		3					1	1					
Istarska	1		1					2		2				
Karlovačka	1	1						2		1				1
Koprivničko-križevačka	7	2	5					12	4	5			2	1
Krapinsko-zagorska	3		3					1			1			
Ličko-senjska	3	1	2					1	1					
Međimurska	9	5	3	1				3	1	1	1			
Osječko-baranjska	19	8	10	1				21	3	12	1		1	4
Požeško-slavonska	3	2	1					3	1	2				
Primorsko-goranska	3	2	1					2	1				1	
Sisačko-moslavačka	4		4					1	1					
Splitsko-dalmatinska	8	3	5					3	2	1				
Šibensko-kninska	1		1					2	1	1				
Varaždinska	4	3	1					3		2			1	
Virovitičko-podravska	7	2	5					6		4	2			
Vukovarsko-srijemska	13	8	5					7	3	2	1	1		
Zadarska	2	2						1		1				
Zagrebačka	4	3	1					3	2	1	1			
Grad Zagreb	2		2					1						
Ukupno	120	61	57	2	0	0	0	89	23	47	7	1	5	6

Tablica 6 Podjela serija na podserije ovisno o proizvodu i težini serije prema Uredbi Komisije (EZ) br. 401/2006 (EC, 2006.c)

Proizvod	Težina serije (t)	Težina ili broj podserija	Broj pojedinačnih uzoraka	Težina skupnog uzorka (kg)
Žitarice i proizvodi od žitarica	> 300 i < 1500	3 podserije	100	10
	≥ 50 i ≤ 300	100 t	100	10
	< 50		3-100 (*)	1-10

(*) Ovisno o težini serije



Slika 17 Mlin za usitnjavanje i homogenizaciju uzoraka SM 300 (Retsch, Njemačka)

Analiza mikotoksina

Prikupljeni uzorci žitarica su pripremljeni (**Slika 18**) i analizirani prema razvijanoj i validiranoj metodi čiji je optimizirani postupak opisan u poglavljima 4.1. i 4.2. Provedeno je određivanje 11 mikotoksina (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, DON, FB1, FB2, ZEA, T-2, HT-2, OTA) zakonski reguliranih u žitaricama korištenjem UPLC-MS/MS instrumenta Acquity H-class-Xevo TQD (Waters, SAD) (**Slika 19**). Za prikupljanje podataka mjerenja te procesiranje rezultata korišteni su programski paketi MassLynx i TargetLynx (v. 4.1, Waters, SAD).



Slika 18 Priprema uzoraka za analizu razrijedi i mjeri principom

Za potrebe identifikacije pronađenih spojeva MS-om, vremena zadržavanja analita u uzorku morala su odgovarati vremenima zadržavanja u otopini standarda mjerenih u istoj sekvenci uzoraka s tolerancijom 2,5% te je omjer iona analita (definiran kao omjer odziva kvantifikacijskog i potvrdnog iona) morao odgovarati iznosu $\pm 30\%$ omjera iona u standardu analita iz iste sekvence mjerenja, a čime su zadovoljeni kriteriji Odluke Komisije (EZ) br. 657/2002 (EC, 2002.c). Za kvantifikaciju pronađenih analita korištena je eksterna kalibracija uspoređujući površinu pika analita s kalibracijskom krivuljom odgovarajućeg standarda mikotoksina, pri čemu su za kreiranje kalibracijske krivulje pojedinog spoja korišteni kalibranti u otapalu, odnosno kalibranti u odgovarajućoj matrici. Prema potrebi, uzorci su razrijeđeni kako bi se koncentracija analita dovela u validirano mjerno područje.



Slika 19 UPLC-MS/MS instrument Acquity H-class-Xevo TQD MS (Waters, SAD)

Statistička obrada podataka i provjera sukladnosti

Za statističku obradu podataka korišteni su statistički programski paketi Statistica 13.3 (StatSoft) i Microsoft Office Excel 2016 (Microsoft). Pri obradi rezultata korištene su metode deskriptivne statističke analize: mjere centralne tendencije te mjere varijabilnosti (raspon, standardna devijacija) izračunate iz dobivenih mjerenja. Normalnost distribucije podataka testirana je Shapiro-Wilkovim testom, homogenost varijance Leveneovim testom, a usporedba između dviju pojedinih varijabli Mann-Whitneyevim U testom kod podataka koji nisu normalno distribuirani te t-testom kod normalno distribuiranih podataka. Za izračunavanje korelacije korišten je Spearmanov koeficijent korelacije. Statistički značajno različitim su smatrani podaci s vrijednostima $p < 0,05$.

Sukladnosti analiziranih uzoraka obzirom na pronađenu koncentraciju mikotoksina provjerena je usporedbom s NDK vrijednostima mikotoksina u hrani danima u Uredbi (EZ) br. 1881/2006 (EC, 2006.a) i Preporuci 2013/165/EU (EC, 2013.), odnosno usporedbom s NDK vrijednostima mikotoksina u hrani za životinje danima u Direktivi 2002/32/EZ (EC, 2002.a), Preporuci 2006/576/EC (EC, 2006.b) te 2013/165/EU (EC, 2013.).

Toplinska mapa pojavnosti detektiranih mikotoksina i korelacija s vremenskim uvjetima

Podaci o koncentraciji detektiranih mikotoksina upotrijebljeni su za kreiranje toplinske mape pojavnosti reguliranih mikotoksina u pojedinim županijama Republike Hrvatske pomoću programa Tableau Desktop 2019.4.1.

Obzirom da su meteorološki uvjeti koji variraju od godine do godine važan čimbenik pojavnosti mikotoksina, provedena je usporedba vrste i koncentracije pronađenih mikotoksina s vremenskim uvjetima na pojedinim mikrolokacijama. U te svrhe korišteni su podaci Državnog hidrometeorološkog zavoda o vremenskim prilikama (temperatura, količina oborina) tijekom godine 2016. i 2017. dostupni na internetskim stranicama organizacije.

Supojavnost mikotoksina i preporuke za korištenje

Također, provedena je analiza supojavnosti detektiranih mikotoksina. Provjereno je koje vrste mikotoksina imaju tendenciju zajedničke kontaminacije kojih vrsta analiziranih kultura.

Sukladno određenim koncentracijama mikotoksina te usporedbi s NDK vrijednostima danima u važećoj legislativi izrađene su preporuke za korištenje žitarica. Ovisno o razini kontaminacije, pojedini uzorci su prikladni za ljudsku potrošnju, dok se ostali mogu upotrijebiti u ishrani životinja. Kod ishrane životinja vodit će se briga o osjetljivosti životinja naspram pojedinih mikotoksina, odnosno njihovoj supojavnosti u žitaricama.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Optimizacija UHPLC-MS/MS uvjeta

MS/MS detekcija

S ciljem odabira i optimizacije parametara MS/MS detekcije za pojedini analit provedeni su eksperimenti snimanja cjelokupnih spektara masa svakog spoja kako bi se prikupio bar jedan ion prekursor te optimalni napon na konusu, dok su se MS/MS spektri snimali kako bi se prikupile tranzicije prekursora karakteristične za pojedini mikotoksin. Optimizirani MRM parametri (tranzicije, napon na konusu te energije kolizije) odabrani za MS/MS detekciju su prikazani u **Tablici 7**. U svim slučajevima izabrani su $[M+H]^+$ adukti za ione prekursore, osim za T-2 i HT-2 koji su formirali amonijev adukt $[M+NH_4]^+$ jačeg odziva od $[M+H]^+$. Pozitivna ESI je odabrana za snimanje svih analita, izuzev za ZEA za koji su odabrani negativna ESI i adukt $[M-H]^-$ zbog pojave koeluirajućih pikova u pojedinim vrstama matrice prilikom snimanja u pozitivnoj ESI. Navedene MRM tranzicije za analizirane regulirane mikotoksine se podudaraju s tranzicijama u radovima autora kao što su Arroyo-Manzanares i sur. (2018.), Kafouris i sur. (2017.), De Santis i sur. (2017.), Frenich i sur. (2009.) te Sulyok i sur. (2006.). S druge strane, obzirom na upotrebljavane instrumente različitih proizvođača, MS uvjeti kao što su napon na konusu te energije kolizije očekivano se značajno razlikuju u usporedbi s pojedinim autorima.

Ostali MS/MS parametri korišteni za MRM analizu u pozitivnoj i negativnoj ionizaciji optimizirani na način da se postigne najbolji intenzitet odziva (signala) na MS detektoru iznose kako slijedi: napon ESI igle za raspršivanje (eng. *Capillary*) 1,5 kV (+) i 2,5 kV (-), temperatura izvora 150 °C, temperatura raspršivanja 350 °C, protok plina za raspršivanje (eng. *Cone gas*) 50 L/h i protok plina za isušivanje (eng. *Desolvation gas*) 650 L/h (oba dušik). Kao kolizijski plin korišten je argon pri tlaku od $3,7 \cdot 10^{-3}$ mbar u kolizijskoj ćeliji. Vrijeme praćenja pojedine tranzicije (m/z) (eng. *Dwell time*) generirano je automatski koristeći funkciju *Autodwell* te je iznosilo 0,017-0,130 s, ovisno o mikotoksinu. Koristeći odabrano vrijeme praćenja omogućeno je prikupljanje dovoljnog broja točaka po piku koje osiguravaju potrebnu osjetljivost te reproducibilnost kvantitativnih rezultata.

Tablica 7 Karakteristike mikotoksina i UHPLC-MS/MS parametri

Mikotoksin	Molarna masa g/mol*	Log <i>P</i> *	Vrijeme zadržavanja min	Ion prekursor	Napon na konusu V	Energija kolizije eV	Produkt ioni**
AFB1	312,06	1,6	8,70	313,0 [M+H] ⁺	60 60	38 23	241,0 285,0
AFB2	314,08	1,3	8,45	315,0 [M+H] ⁺	60 60	30 25	259,0 287,0
AFG1	328,06	1,8	8,10	329,0 [M+H] ⁺	60 60	28 24	243,0 311,0
AFG2	330,07	1,5	7,79	331,0 [M+H] ⁺	60 60	24 28	313,0 245,0
DON	296,13	-0,7	4,74	297,0 [M+H] ⁺	25 25	12 10	231,0 249,0
FB1	721,39	-0,5	9,36	722,4 [M+H] ⁺	50 50	40 40	334,3 352,3
FB2	705,40	1,2	10,41	706,4 [M+H] ⁺	50 50	40 40	336,2 318,2
ZEA	318,15	3,6	10,47	317,1 [M-H] ⁻	-58 -58	30 20	131,0 175,0
T-2	466,22	0,9	10,07	484,7 [M+NH ₄] ⁺	25 25	20 25	185,0 215,0
HT-2	424,21	0,4	9,55	442,6 [M+NH ₄] ⁺	25 25	10 15	263,4 215,3
OTA	403,08	4,7	9,50	404,1 [M+H] ⁺	30 30	24 14	239,0 358,0

*Vrijednosti preuzete s *PubChem Public Chemical* baze podataka (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

**Kvantifikacijske tranzicije podebljane

Kromatografska separacija

Kako bi se postigao optimalan oblik pika pojedinog analita te potrebna osjetljivost uz prihvatljivo vrijeme trajanja analize provedeni su eksperimenti ispitivanja sastava i pH mobilnih faza, gradijenta eluiranja analita, UHPLC kolone te drugih parametara poput brzine protoka, volumena injektiranja i temperature kolone.

U **Tablici 8** su navedeni ispitani gradijenti eluiranja analita s kromatografske kolone te pripadajući protok mobilnih faza. Kao mobilne faze za gradijent 1 su korištene 0,1% FA u H₂O (A) i 0,1% FA u ACN (B). Za gradijent 2 kao mobilne faze ispitane su 2 mM AA + 0,1% FA u H₂O (A) i 2 mM AA + 0,1% FA u MeOH (B) te 5 mM AF u H₂O (A) i čisti MeOH (B). Za gradijent 3 korištene su 4 mM AF + 0,1% FA u H₂O (A) i 4 mM AF + 0,1% FA u MeOH (B) te 5 mM AF u H₂O (A) i čisti MeOH (B). Kao mobilne faze za gradijent 4 ispitane su 5 mM AF u H₂O (A) i čisti MeOH (B).

Djelotvornost separacije analita od interesa ispitana je korištenjem četiri UHPLC kolone:

- Acquity BEH C18, 100x2,1 mm, 1,7 μm (Waters, Irska),
- Ultra Acqueous C18, 100x2,1 mm, 3 μm (Restek, SAD),
- Acquity HSS T3, 100x2,1 mm, 1,8 μm (Waters, Irska) te
- Kinetex EVO C18, 150x2,1 mm, 1,7 μm (Phenomenex, SAD).

Dobiveni kromatogrami ispitivanja separacije gradijenta 4 primijenjenim na svakoj od četiri navedene analitičke kolone nalaze se u **Prilogu 1**. Kolona s najboljim učinkom separacije, oblikom pika te jačinom odziva za pojedini analit odabrana je za daljnju optimizaciju gradijenta i sastava mobilnih faza prema **Tablici 8**, a dobiveni kromatogrami su prikazani u **Prilogu 2**.

Tablica 8 Ispitani gradijenti eluiranja analita

	0,5 mL/min			0,3 mL/min			0,3 mL/min			0,35 mL/min					
	Vrijeme min	A%	B%	Vrijeme min	A%	B%	Vrijeme min	A%	B%	Vrijeme min	A%	B%			
1	0	98	2	2	0	95	5	3	0	95	5	4	0	75*	25
	1,5	98	2		6	50	50		6	50	50		3	25	75
	6,0	30	70		10	5	95		10	5	95		5	0	100
	6,1	10	90		11,5	5	95		15,0	5	95		6,5	0	100
	7,0	10	90		11,6	95	5		15,1	95	5		7,5	75	25
	7,1	98	2		14,0	95	5		18,0	95	5		8,5	75	25
	9,0	98	2												
	0,5 mL/min			0,3 mL/min			0,3 mL/min			0,35 mL/min					

¹ 0,1% FA u H₂O (A) i 0,1% FA u ACN (B)

² 2 mM AA + 0,1% FA u H₂O (A) i 2 mM AA + 0,1% FA u MeOH (B)

³ 4 mM AF + 0,1% FA u H₂O (A) i 4 mM AF + 0,1% FA u MeOH (B) te 5 mM AF u H₂O (A) i čisti MeOH (B)

⁴ 5 mM AF u H₂O (A) i čisti MeOH (B)

* Ispitan i početni udio vodene faze A od 100%

Korištenje MeOH-a u mobilnoj fazi pokazalo se boljim za postizanje veće osjetljivosti (većeg odziva) od ACN-a i to posebno za trihotecene. Dodatak AF-a za gotovo sve spojeve dao je bolje odzive od dodatka AA-a. Dodatak modifikatora (AF) bio je nužan za sprječavanje formiranja nepoželjnih natrijevih adukata, odnosno poticanje nastanka poželjnih $[M+NH_4]^+$ adukata koji omogućuju bolju osjetljivost te postizanje potrebnih LOQ vrijednosti za sve vrste matrica, naročito niskih vrijednosti za T-2 i HT-2 u proizvodima od žitarica namijenjenih izravnoj konzumaciji poput kruha, tjestenine, *snack* proizvoda i sl. Za postizanje zadovoljavajuće separacije i oblika pikova za FUM potrebno je bilo voditi računa o osiguranju blago kiselih kromatografskih uvjeta, obzirom na četiri karboksilne skupine u strukturi molekule (Sulyok i sur., 2006.; Frenich i sur., 2009.), stoga su isprobani i gradijenti s dodatkom 0,1% FA ili HAC u mobilne faze. Važan segment separacije bio je i udio organske faze u početnim uvjetima gradijenta kako bi se postigao najbolji mogući oblik pikova koji rano eluiraju.

Acquity HSS T3 kolona (100x2,1 mm, 1,8 μ m) se pokazala vrlo korisnom u separaciji polarnih spojeva te je dala najbolji oblik pikova za sve analite unatoč njihovoj kemijskoj različitosti. Obzirom na izabrani gradijent i sastav mobilnih faza, odabrana je temperatura kolone od 40 °C koja je omogućila da postignuti tlakovi u LC sustavu budu unutar dozvoljenih vrijednosti. Od ispitivanih volumena injektiranja, 10 μ L je odabran kao konačni, obzirom na postignutu najbolju osjetljivost ispitivanih analita uz prihvatljiv oblik pika, odnosno utjecaj matrice. Protok odabrane mobilne faze A (5 mM vodena otopina AF-a, pH 6,4) i odabrane mobilne faze B (MeOH) bio je 0,3 mL/min s početnim uvjetima analize u sastavu 95% mobilna faza A i 5% mobilna faza B te ukupnim vremenom analize 18 min. Gradijent je optimiziran na način da poveća učinkovitost separacije analita koji eluiraju blizu promjene polarnosti korištene mobilne faze (**Tablica 9**).

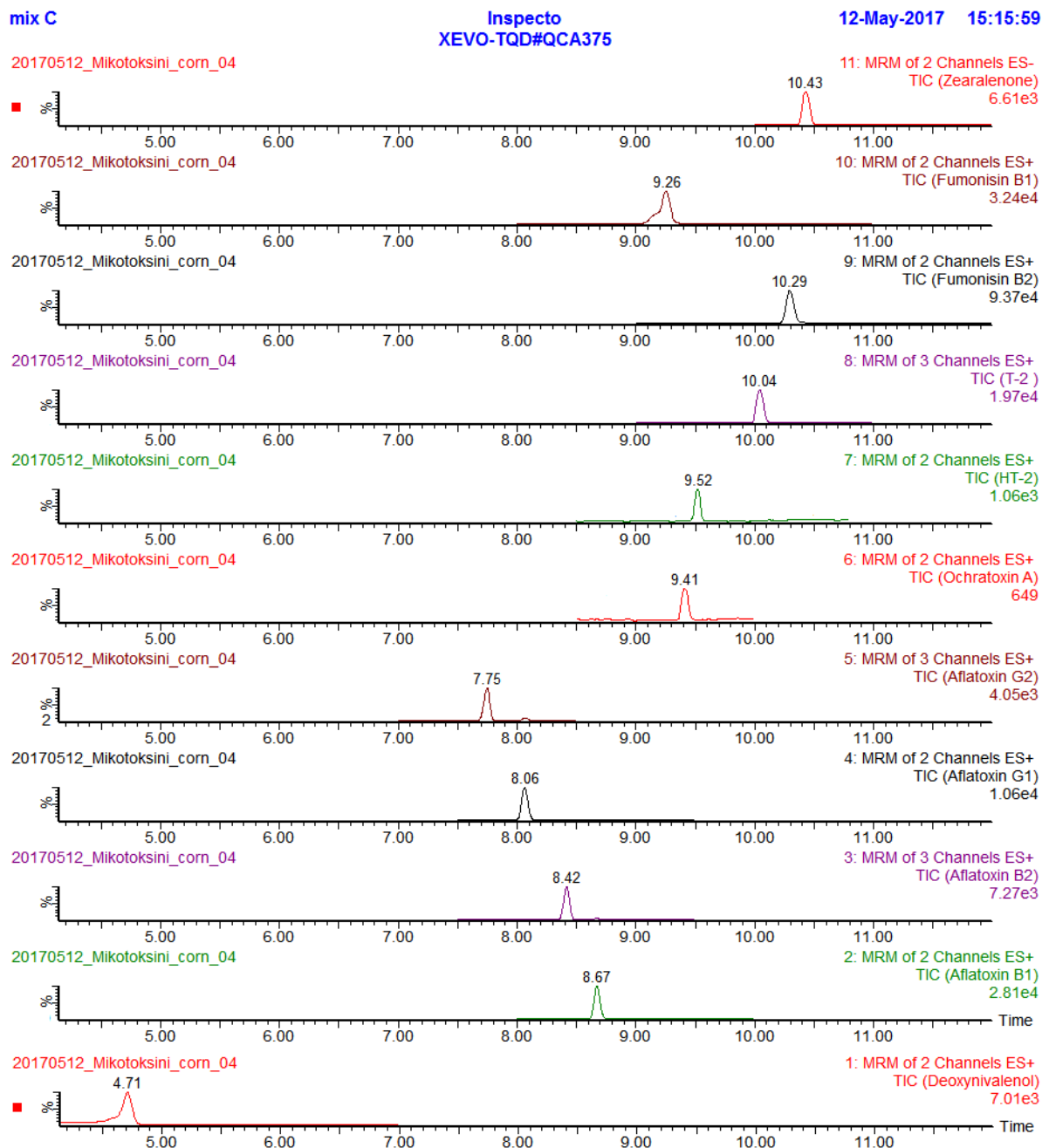
Tablica 9 Odabrani gradijent eluiranja

Vrijeme min	Mobilna faza A% (5 mM AF u H ₂ O)	Mobilna faza B% (MeOH)
0	95	5
6	50	50
10	5	95
15,0	5	95
15,1	95	5
18,0	95	5

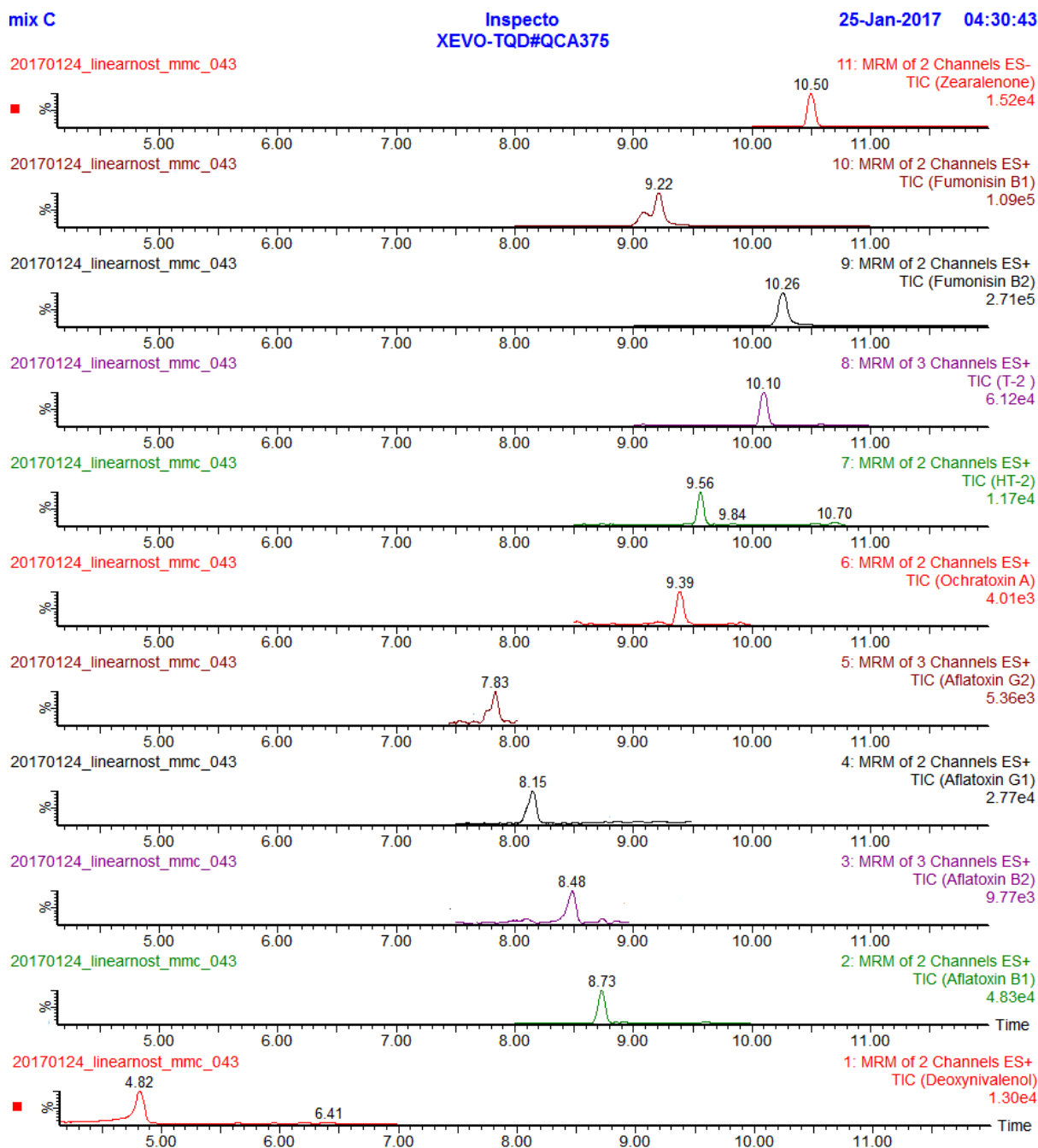
Autori kao što su De Santis i sur. (2017.), Kafouris i sur. (2017.), Arroyo-Manzanares i sur. (2018.) i dr. su također uglavnom koristili UHPLC kolone za kromatografsku separaciju analita, temperirane između 25 i 40 °C, uz protok mobilnih faza 0,3-0,4 mL/min od kojih je A H₂O, a B MeOH uz dodatak modifikatora AF, FA, HAc i sl. Volumen injektiranja u gotovo svim slučajevima je iznosio 10 µL, koji se smatra optimalnim za upotrebljavane dimenzije kolona i korišteni protok.

De Santis i sur. (2017.) su za svoj postupak UHPLC-MS/MS određivanja odabrali Phenomenex Kinetex Biphenyl kolonu (50x3 mm, 2,6 µm veličina čestica) te mobilne faze H₂O (A) i MeOH (B) s modifikatorima: 5 mM AF i 0,3% FA. Ukupno trajanje gradijenta je bilo 16,5 min, a protok mobilnih faza 0,3 mL/min i volumen injektiranja 10 µL. Kafouris i sur. (2017.) su koristili Waters Acquity BEH C18 kolonu dimenzija 2,1x100 mm i 1,7 µm veličine čestica, uz volumen injektiranja 10 µL i temperaturu 40 °C. Kao mobilne faze korišteni su H₂O (A) i ACN (B) s dodatkom 0,1% HAc i to pri protoku 0,4 mL/min. Početni uvjeti gradijenta iznosili su 90% A i 10% B, a ukupno vrijeme trajanja analize je iznosilo 8 min. Arroyo-Manzanares i sur. (2018.) su za svoju separaciju odabrali Waters Acquity HSS UPLC T3 kolonu (150x2,1 mm, 1,8 µm) temperiranu na 30 °C i volumen injektiranja 10 µL. Korištene mobilne faze su bile H₂O (A) i MeOH (B) svaka uz dodatak 5 mM AF-a i 0,3% FA pri protoku 0,4 mL/min uz početne uvjete gradijenta 95% A i 5% B. Malachová i sur. (2014.) su za kromatografsku separaciju koristili Phenomenex Gemini C18 kolonu (150 mm x 4,6 mm, 5 µm) s pretkolonom iste kemije punjenja (4 mm x 3 mm) te protokom mobilnih faza (A) MeOH/H₂O/HAc 10/89/1 (v/v/v) i MeOH/H₂O/HAc 97/2/1 (v/v/v) (B) obje s dodatkom 5 mM AAc, od 1 mL/min uz početni gradijent sa 100% udjelom mobilne faze A i ukupno trajanje separacije je 20,5 min pri 25 °C.

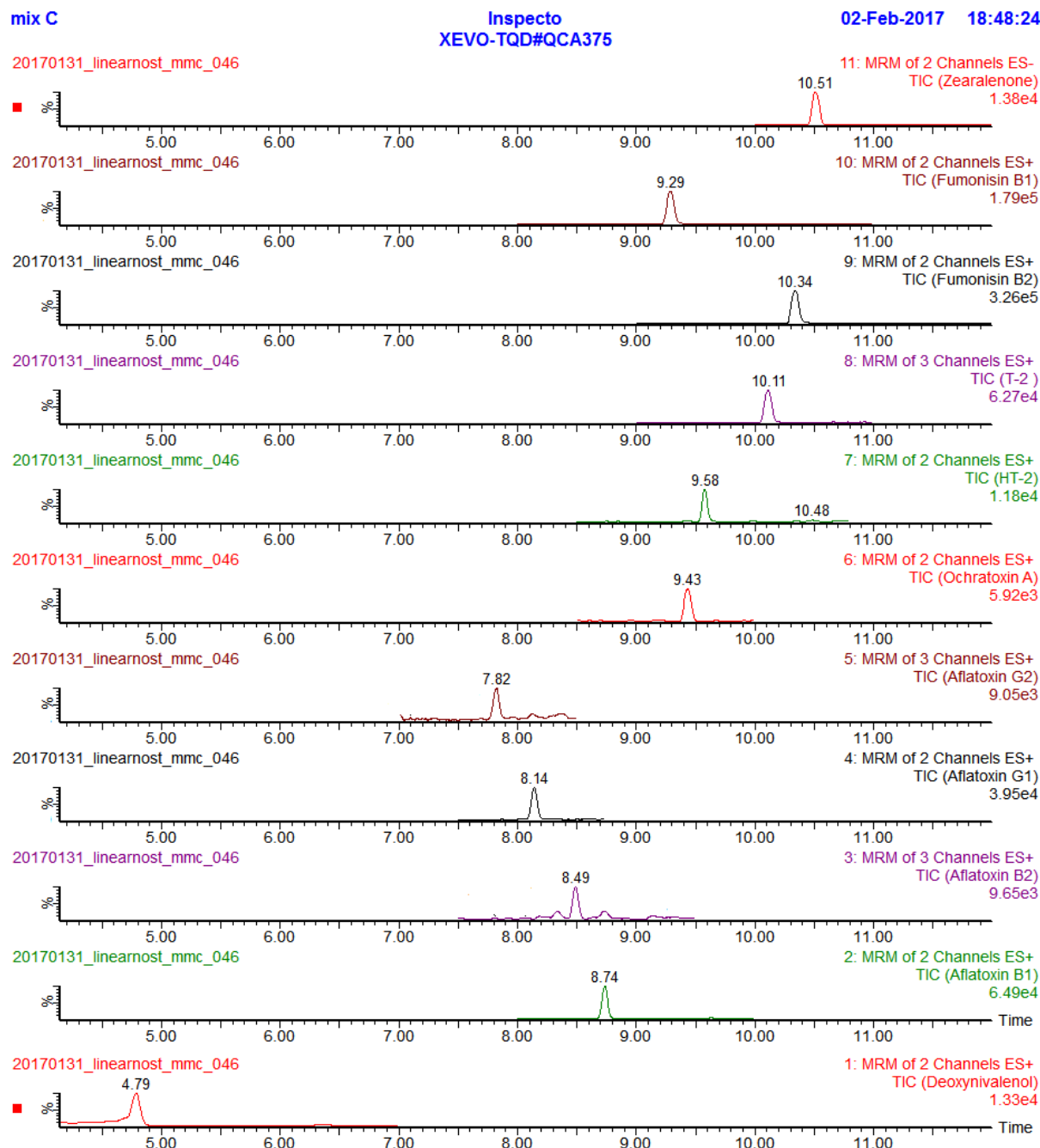
Slikama 20-22 su prikazani kromatogrami 11 ispitivanih mikotoksina u otopini standarda (Mix C, **Prilog 3**) pripremljenog u *blank* uzorcima kukuruza (**Slika 20**), pšenice (**Slika 21**) i ječma (**Slika 22**), dobiveni optimiziranim UHPLC-MS/MS uvjetima na instrumentu Acquity H-class-Xevo TQD (Waters, SAD). Kromatogrami analita prikazani su redosljedom unosa prilikom kreiranja MS metode, odozdo prema gore: DON, AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, OTA, HT-2, T-2, FB2, FB1 i ZEA.



Slika 20 UPLC-MS/MS kromatogram 11 reguliranih mikotoksina u *blank* ekstraktu kukuruza obogaćenom s: 4,0 µg/kg AFB1 i AFG1, 1,0 µg/kg AFB2 i AFG2, 400 µg/kg DON, 300 µg/kg FB1 i FB2, 60 µg/kg ZEA, 20 µg/kg T-2 i HT-2 te 2,0 µg/kg OTA. Vrijeme je prikazano duž x-osi, a intenzitet odziva duž y-osi.



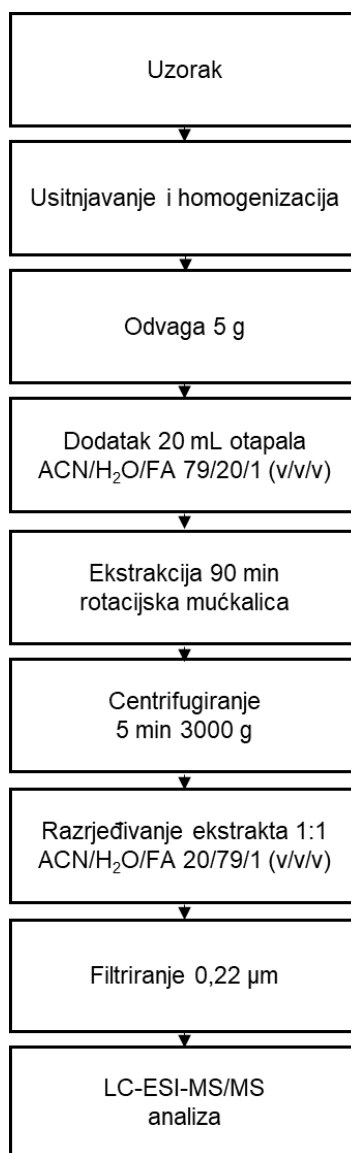
Slika 21 UPLC-MS/MS kromatogram 11 reguliranih mikotoksina u *blank* ekstraktu pšenice obogaćenom s: 4,0 µg/kg AFB1 i AFG1, 1,0 µg/kg AFB2 i AFG2, 400 µg/kg DON, 300 µg/kg FB1 i FB2, 60 µg/kg ZEA, 20 µg/kg T-2 i HT-2 te 2,0 µg/kg OTA. Vrijeme je prikazano duž x-osi, a intenzitet odziva duž y-osi.



Slika 22 UPLC-MS/MS kromatogram 11 reguliranih mikotoksina u *blank* ekstraktu ječma obogaćenom s: 4,0 µg/kg AFB1 i AFG1, 1,0 µg/kg AFB2 i AFG2, 400 µg/kg DON, 300 µg/kg FB1 i FB2, 60 µg/kg ZEA, 20 µg/kg T-2 i HT-2 te 2,0 µg/kg OTA. Vrijeme je prikazano duž x-osi, a intenzitet odziva duž y-osi.

4.2. Optimizacija postupka ekstrakcije

Obzirom na veliku raznolikost kemijskih svojstava mikotoksina koji trebaju biti istovremeno ekstrahirani iz uzorka ($\log P$ između -0,5 i 4,7, **Tablica 7**), optimizacija ekstrakcijskog postupka u multimikotoksinskim metodama je od velike važnosti (Sulyok i sur., 2006.; Zhao i sur., 2015.; Kafouris i sur., 2017.). Uz ekstrakciju, kritični korak je često i postupak pročišćavanja (Frenich i sur., 2009.), stoga se u ovom slučaju prije kromatografskog određivanja pristupilo jednostavnoj pripremi uzoraka: ekstrakciji čvrsto-tekuće bez posebnog pročišćavanja, ali uz razrjeđivanje sirovog ekstrakta kako bi se smanjio eventualni utjecaj matrice. Za pripremu uzorka ovim principom provjereni su različiti uvjeti ekstrakcije obzirom na sastav ekstrakcijskog otapala: ACN/H₂O 80/20 (v/v), ACN/H₂O/FA 79/20/1 (v/v/v) i ACN/H₂O/HAc 79/20/1 (v/v/v). Za ekstrakciju većine mikotoksina prikladna je smjesa vode s velikim udjelima MeOH-a ili ACN-a (više od 70%), no u slučaju hidrofilnih FUM-a poželjan je veći udio vode u ekstrakcijskom otapalu i/ili niži pH otapala (Bennet i Klich, 2003.; Sulyok i sur., 2006.; Turner i sur., 2009.; Zhao i sur., 2015.; Kafouris i sur., 2017.). Obzirom na navedeno, za ekstrakciju je odabran dodatak 1% kiseline i to mravlje, budući da nije bilo značajne razlike u odnosu na dodatak HAc-a. Manji udio vodene faze u ekstrakcijskom otapalu je kompenziran i vremenom ekstrakcije od 90 min (Malachová i sur., 2014.) pri kojem je postignuto optimalna (propisana) R vrijednost za gotovo sve analite. Dobiveni sirovi ekstrakt je s ciljem uklanjanja eventualnog utjecaja matrice na pojedine spojeve (Sulyok i sur., 2006.) razrijeđen istim volumenom otapala u sastavu jednakom onom za ekstrakciju sa zamijenjenim udjelima ACN-a i vode: ACN/H₂O/FA 20/79/1 (v/v/v). Na taj je način i smanjen udio organske faze koja utječe na deformiran izgled pikova spojeva koji rano eluiraju s analitičke kolone, kao što je DON. Odabrani optimizirani postupak pripreme uzoraka koristeći razrijedi i mjeri princip prikazan je **Slikom 23**.



Slika 23 Shematski prikaz optimiziranog postupka ekstrakcije

U polipropilensku tubu za centrifugiranje izvagano je 5 g usitnjenog homogeniziranog uzorka. Za provođenje validacijskih eksperimenata ispitivanja R-a metode u uzorke je dodan određeni volumen analitičkog standarda pojedinog mikotoksina za obogaćivanje te su uzorci ostavljeni preko noći na tamnom mjestu na sobnoj temperaturi kako bi se omogućilo otparavanje otapala te ekvilibracija između analita i matrice. Uzorcima je dodano 20 mL smjese ekstrakcijskog otapala ACN/H₂O/FA 79/20/1 (v/v/v) te su ekstrahirani 90 min na rotacijskoj mućkalici, a zatim centrifugirani pri sobnoj temperaturi na 3000 g tijekom 5 min. Volumen supernatanta od 2 mL je izdvojen u polipropilensku tubu od 5 mL te je dodan jednak volumen smjese otapala ACN/H₂O/FA 20/79/1 (v/v/v). Razrijeđeni ekstrakt je potom vorteksiran te je prije injektiranja u UHPLC–MS/MS sustav profiltriran kroz najlonski filter pora 0,22 µm. Za validacijske eksperimente postupak je minijaturiziran te je vagano 1 g uzorka kako bi se smanjio utrošak analitičkih standarda korištenih za obogaćivanje.

Razrijedi i mjeri pristup pripremi uzoraka bez posebnog koraka pročišćavanja koristili su Kafouris i sur. (2017.), De Santis i sur. (2017.), Malachová i sur. (2014.), Frenich i sur. (2009.), Sulyok i sur. (2006.). Upravo su Sulyok i sur. (2006.) razvili prvu multimikotoksinsku LC-MS/MS metodu za određivanje 39 kemijski različitih spojeva iz sirovog ekstrakta uzoraka bez korištenja posebnih tehnika pročišćavanja u pripremi uzoraka. Za ekstrakciju u trajanju od 90 min je korištena smjesa otapala ACN/H₂O/HAc 79/20/1 (v/v/v), nakon koje je ekstrakt razrijeđen u omjeru 1:1 smjesom otapala ACN/H₂O/HAc 20/79/1 (v/v/v) te injektiran. Iste uvjete ekstrakcije i pripreme uzoraka koristili su Malachová i sur. (2014.) za proširenje broja analiziranih analita i matrica. Postupak pripreme koji su koristili Kafouris i sur. (2017.) se sastoji od jednostruke ekstrakcije analita iz uzoraka otapalom ACN/H₂O 70/30 (v/v) u trajanju od 2 h, razrjeđivanja sirovog ekstrakta vodom te filtriranja prije UPLC-MS/MS analize. De Santis i sur. (2017.) su ekstrakciju provodili koristeći 1%-tnu FA u ACN/H₂O 80/20 (v/v) u trajanju od 30 min. Ekstrahirani uzorak je centrifugiran te je alikvot supernatanta uparen u struji dušika, rekonstituiran u mobilnoj fazi i profiltriran prije analize.

Drugačiji način pripreme uzoraka i to QuEChERS metodom koristili su autori Arroyo-Manzanares i sur. (2018.). Uzorak je prvo ekstrahirano otapalom (5% FA u ACN) u trajanju od 2 min, a zatim je provedena druga ekstrakcija i dijeljenje dodatkom smjese soli (4 g MgSO₄ i 1 g NaCl). Nakon centrifugiranja supernatant je uparen u struji dušika te rekonstituiran u mobilnoj fazi. Carballo i sur. (2018.) su također koristili QuEChERS pripremu. Uzorcima je dodana 2%-tna FA u H₂O, te ACN nakon čega je slijedila ekstrakcija u trajanju od 30 min. Ekstrakt je pročišćen smjesom soli MgSO₄ i C18 te centrifugiran, a dobiveni supernatant uparen u struji dušika te rekonstituiran prije analize.

Bez obzira na način pripreme, svi autori su postigli zadovoljavajuće vrijednosti ispitivanih validacijskih parametara, u prvom redu R-a metode i RSD-a. U usporedbi s drugim autorima, razrijedi i mjeri metoda razvijena u okviru ove doktorske disertacije ima jednako ili kraće vrijeme ekstrakcije za iste analite, jeftiniji postupak pripreme (otapala, soli za ekstrakciju, dušik) te kraće vrijeme ukupne pripreme uzoraka obzirom da ne uključuje uparavanje te rekonstituciju.

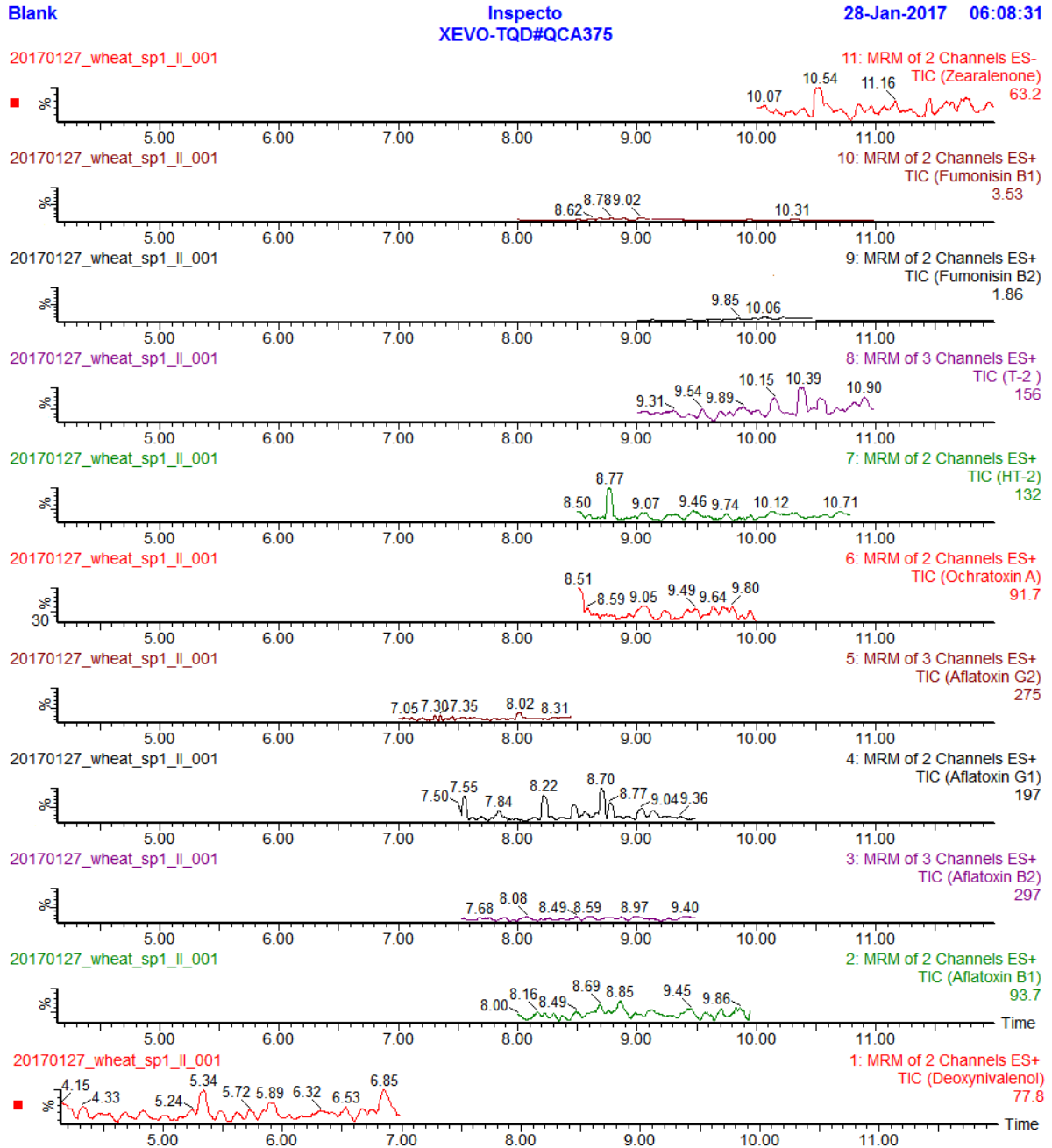
4.3. Validacija metode i procjena mjerne nesigurnosti

Validacija metode

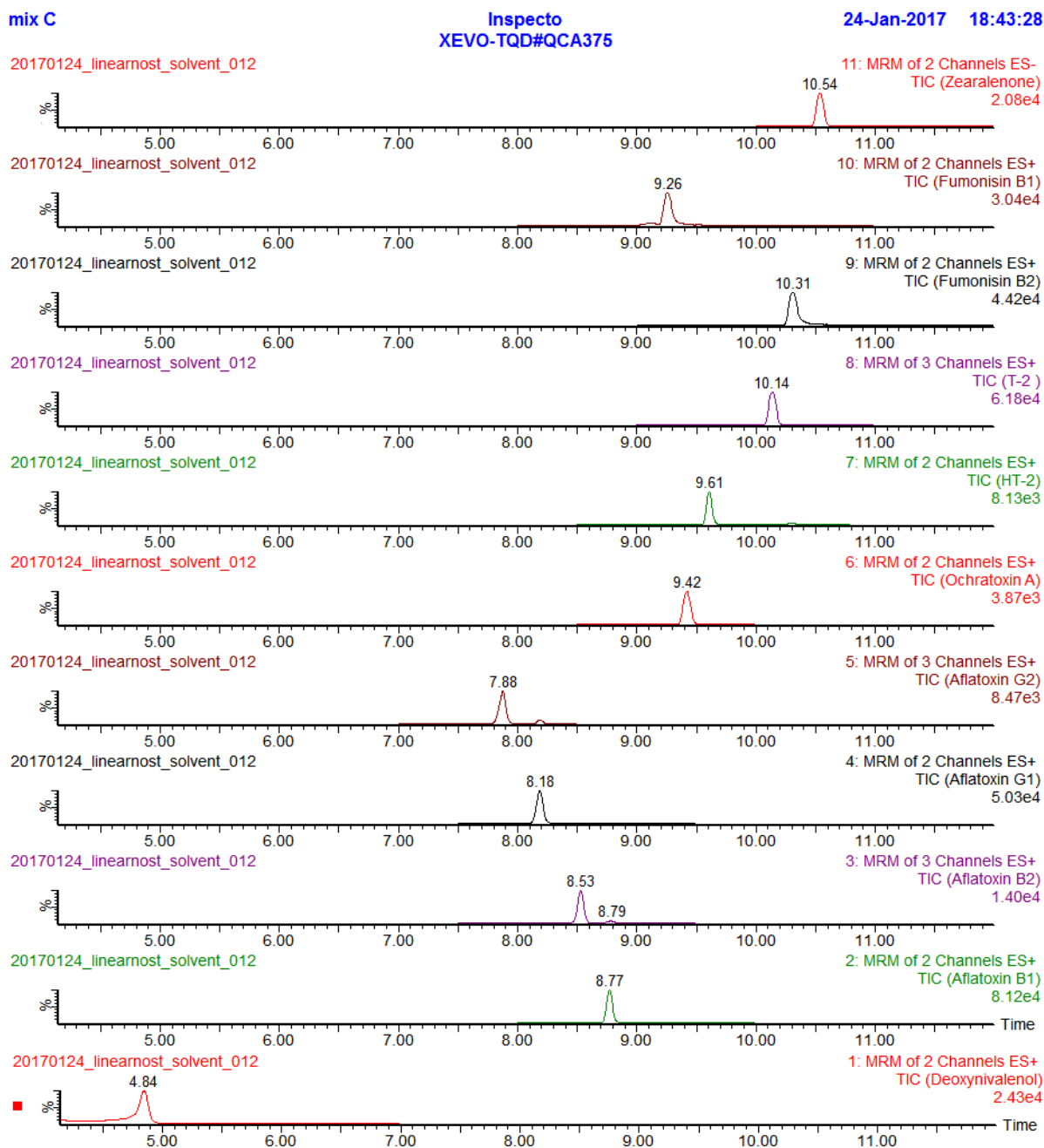
Validacija metode je provedena ispitivanjem validacijskih parametara, odnosno značajki metode: selektivnosti, linearnosti, LOD i LOQ, mjerne preciznosti (ponovljivost mjerenja i pripreme uzoraka) i mjerne istinitosti (R_a), obnovljivosti (sudjelovanje u međulaboratorijskim poredbenim ispitivanjima), te SSE_a , R_A -a i R_E -a. Validacijski eksperimenti su provedeni u skladu s Odlukom Komisije br. 2002/657/EZ o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata (EC, 2002.c) te su na temelju rezultata eksperimenata doneseni zaključci o prihvatljivosti/neprihvatljivosti ispitanih parametara za pojedine analite, odnosno potvrda da razvijena metoda odgovara namjeni koja je kvantitativno određivanje mikotoksina reguliranih u žitaricama i proizvodima (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, DON, FB1, FB2, ZEA, T-2, HT-2, OTA).

Selektivnost metode je provjerena analizom *blank* otapala i otapala obogaćenog analitima. Odsutnost kromatografskog signala na očekivanom vremenu zadržavanja na kromatografskoj koloni te zadanim tranzicijama pojedinog analita ukazuje na odsutnost interferencija te selektivnost razvijene multimikotoksinske metode. Kromatogrami dobiveni analizom otapala i obogaćenog otapala su prikazani **Slikama 24 i 25**.

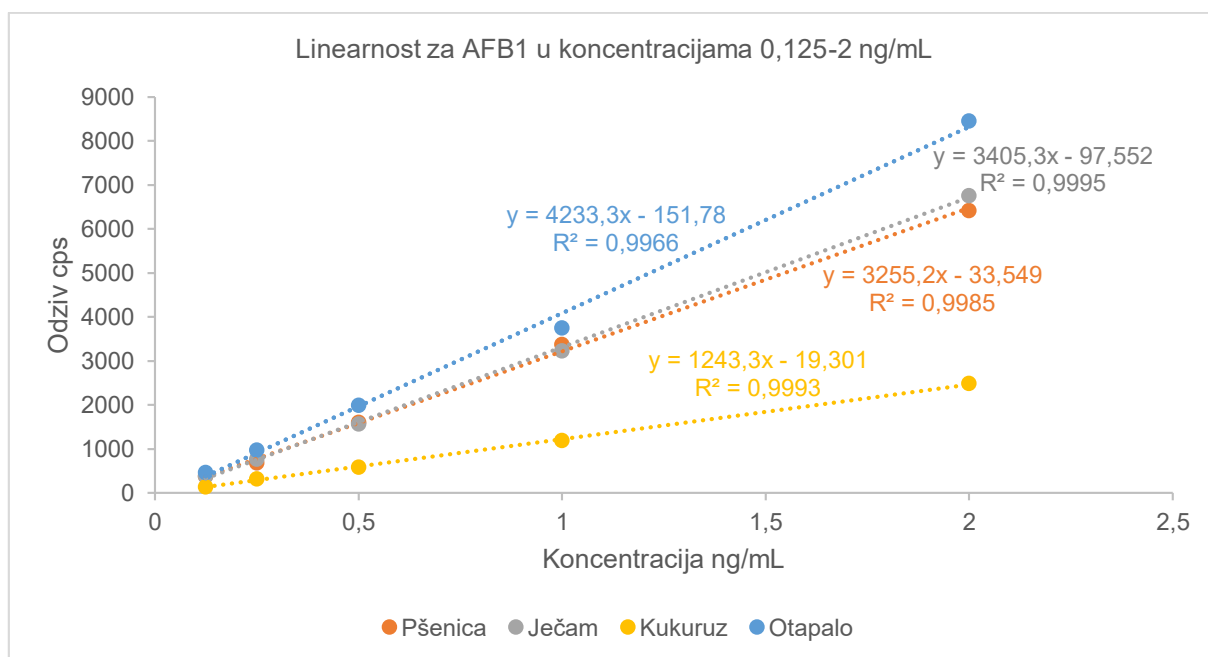
Linearnost je ispitana pomoću linearizirane kalibracijske krivulje pojedinog mikotoksina određivanjem koeficijenta determinacije R^2 . Za kreiranje kalibracijske krivulje korišteni su kalibranti pripremljeni u otapalu (ACN/H₂O 50/50 v/v, približno omjer otapala u pripremljenom uzorku) te kalibranti pripremljeni u odgovarajućoj matrici (*blank* matrice pšenice, ječma i kukuruza). Detaljan postupak pripreme otopina te krajnje koncentracije navedeni su u **Prilogu 3**. U istoj su tablici navedene i ekvivalentne vrijednosti koncentracija obzirom na pripremu uzoraka izražene u $\mu\text{g}/\text{kg}$. **Slikama 26-36** su grafički prikazane linearizirane kalibracijske krivulje mikotoksina i pripadajuće jednadžbe pravca te koeficijent determinacije. Pri linearizaciji se uobičajeno teži što manjoj razlici između dobivene krivulje i njene linearne aproksimacije, odnosno postizanju vrijednosti koeficijenta determinacije R^2 što bliže 1.



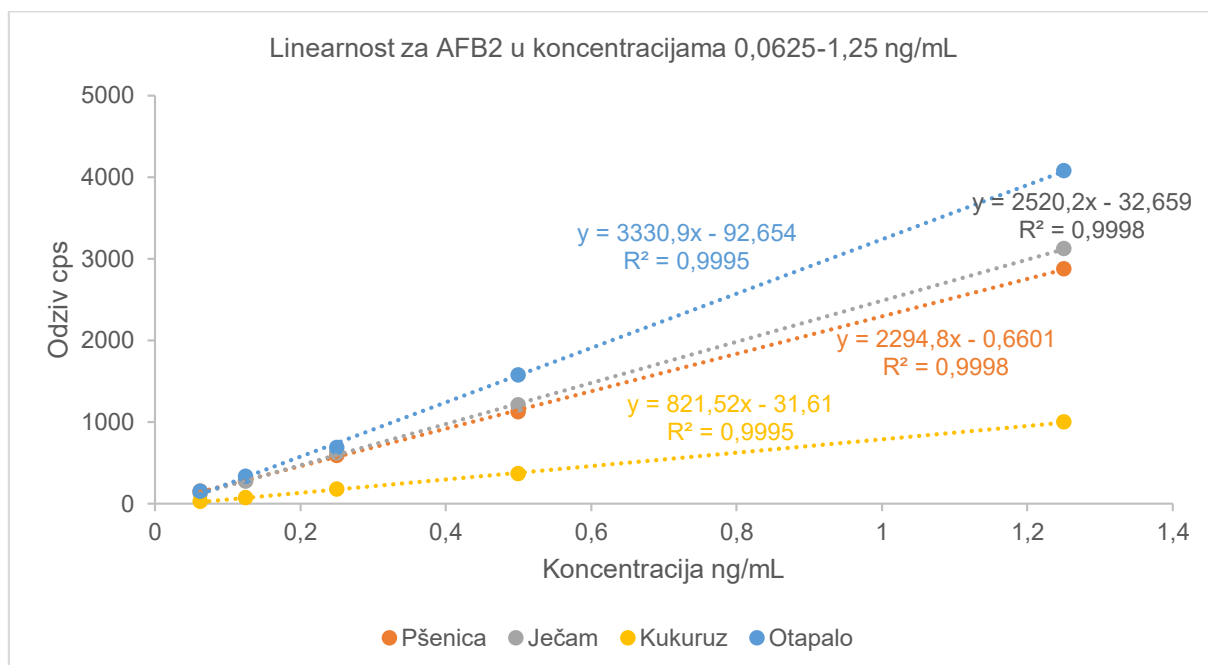
Slika 24 UPLC-MS/MS kromatogram 11 reguliranih mikotoksina u *blank* otapalu. Vrijeme je prikazano duž x-osi, a intenzitet odziva duž y-osi.



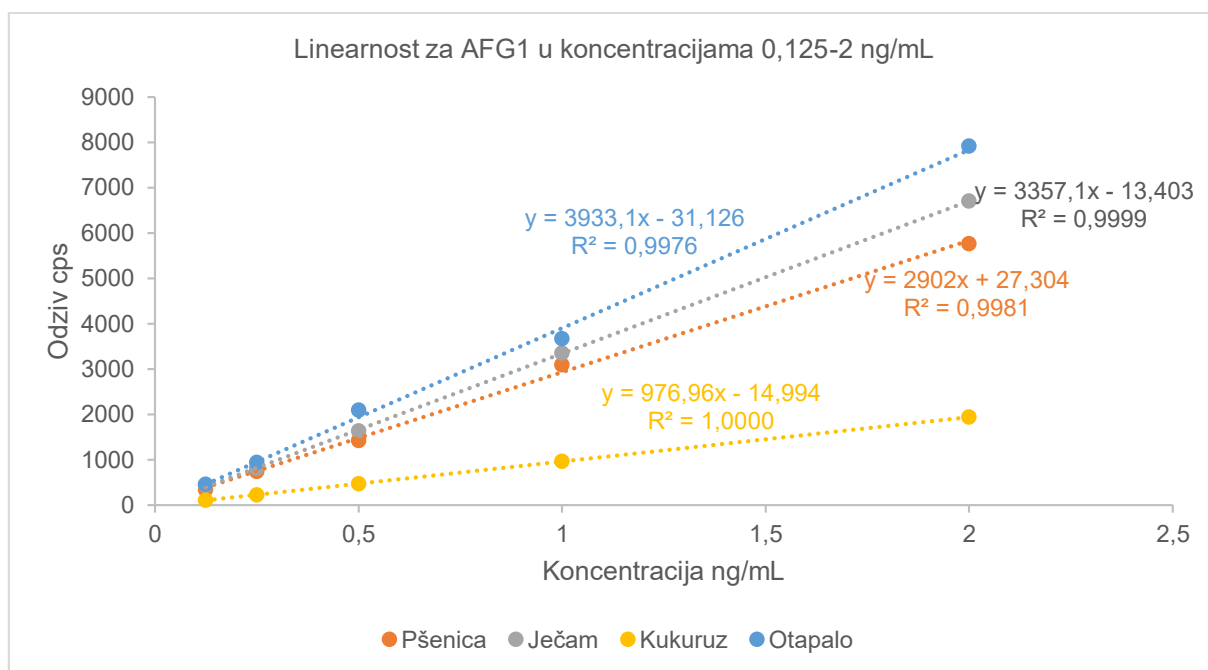
Slika 25 UPLC-MS/MS kromatogram 11 reguliranih mikotoksina u otapalu koje sadrži: 4,0 µg/kg AFB1 i AFG1, 1,0 µg/kg AFB2 i AFG2, 400 µg/kg DON, 300 µg/kg FB1 i FB2, 60 µg/kg ZEA, 20 µg/kg T-2 i HT-2 te 2,0 µg/kg OTA. Vrijeme je prikazano duž x-osi, a intenzitet odziva duž y-osi.



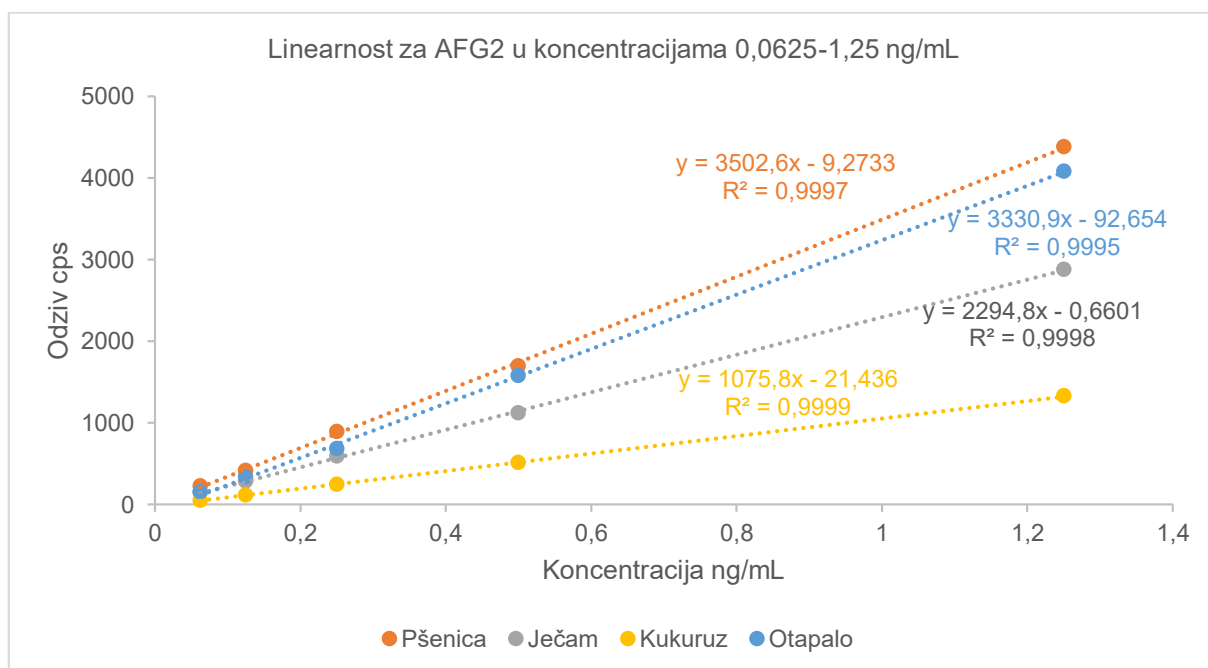
Slika 26 Grafički prikaz kalibracijskih pravaca za AFB1



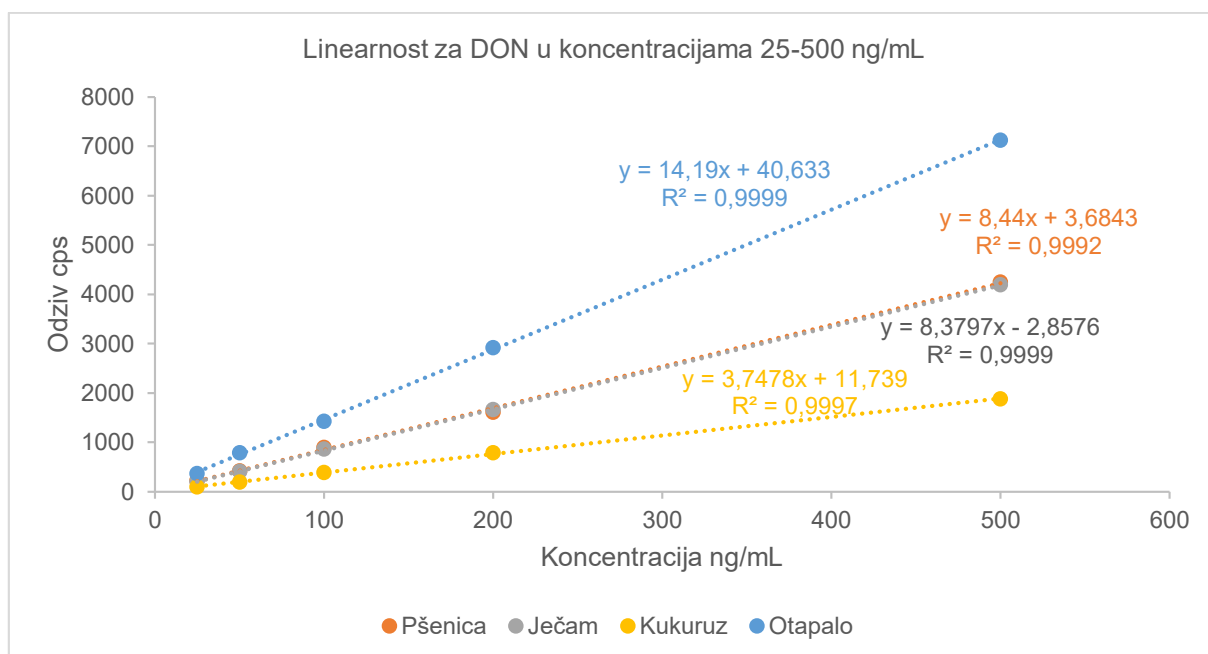
Slika 27 Grafički prikaz kalibracijskih pravaca za AFB2



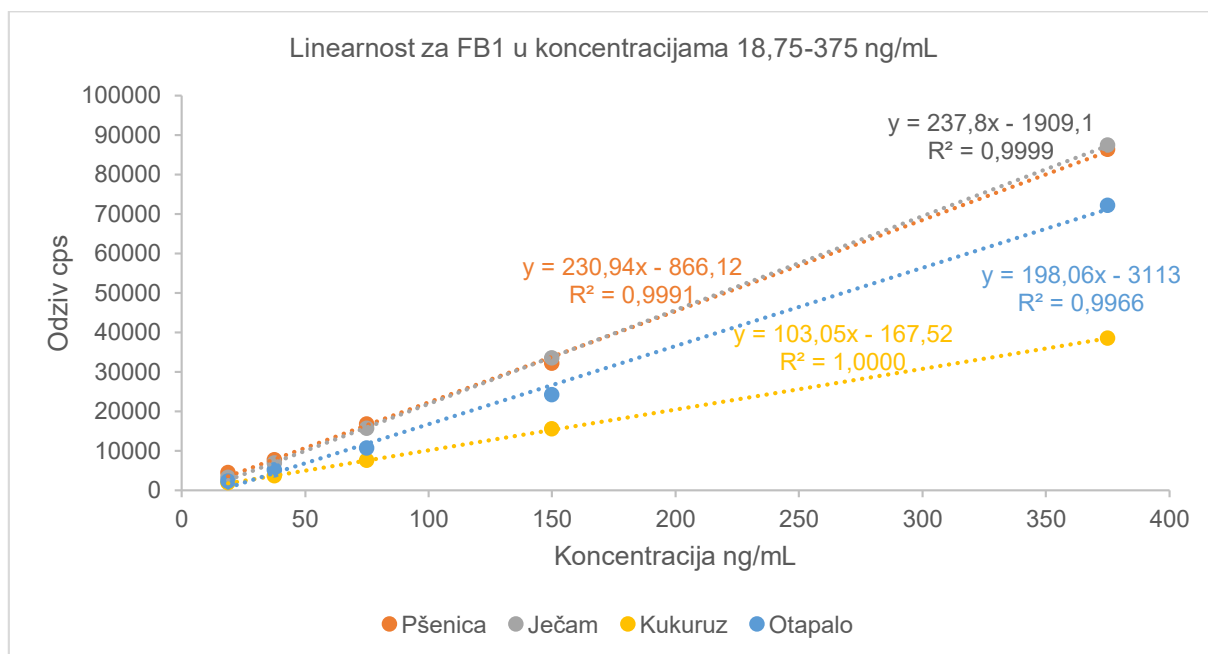
Slika 28 Grafički prikaz kalibracijskih pravaca za AFG1



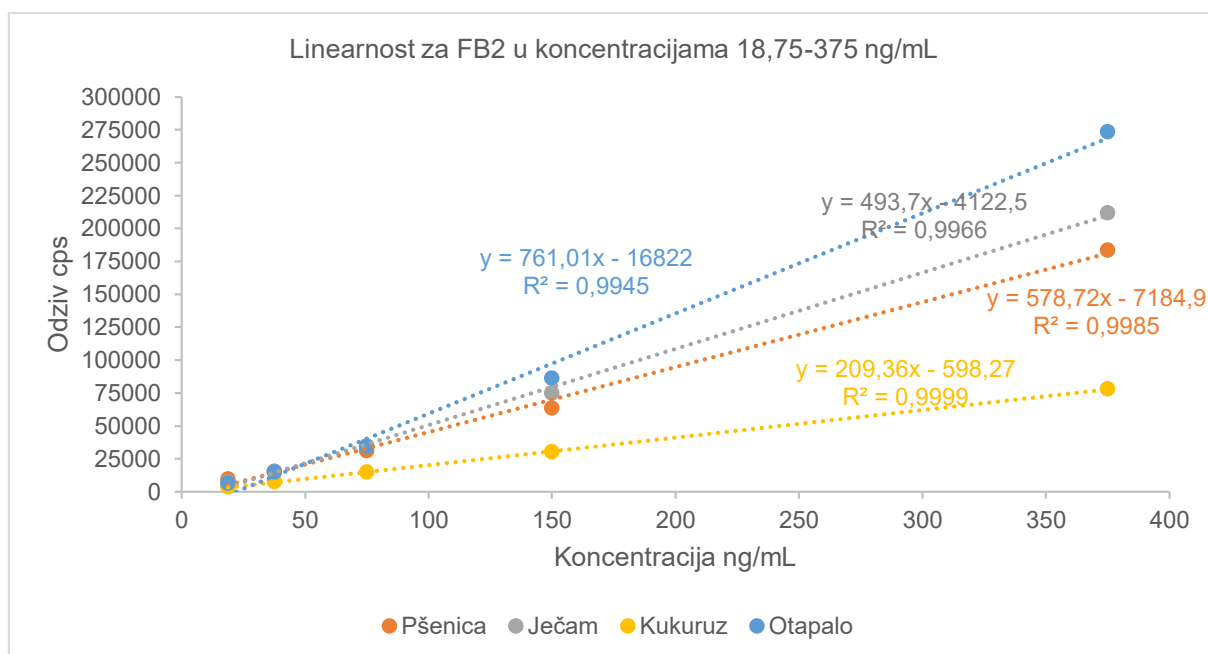
Slika 29 Grafički prikaz kalibracijskih pravaca za AFG2



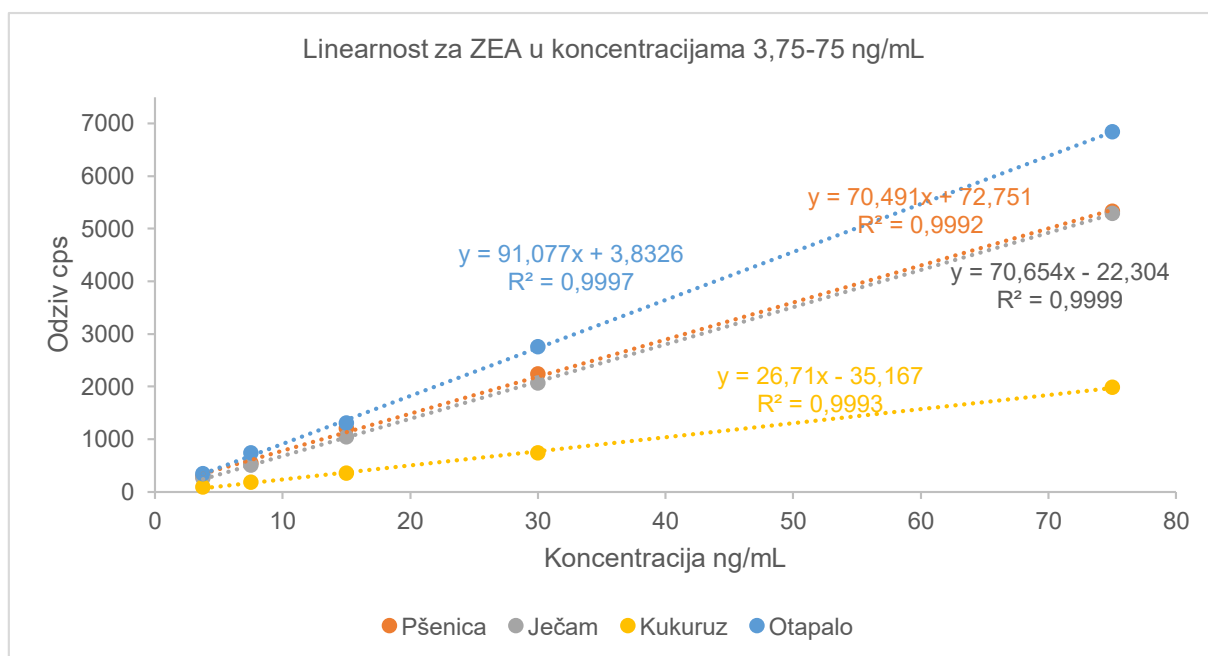
Slika 30 Grafički prikaz kalibracijskih pravaca za DON



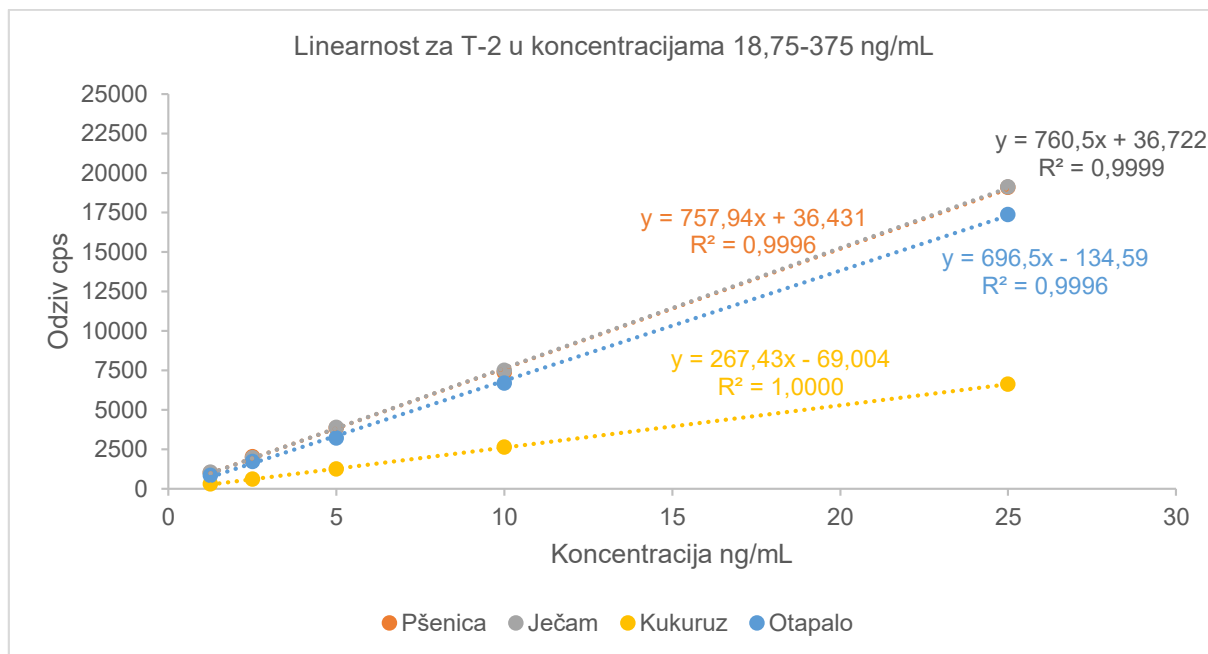
Slika 31 Grafički prikaz kalibracijskih pravaca za FB1



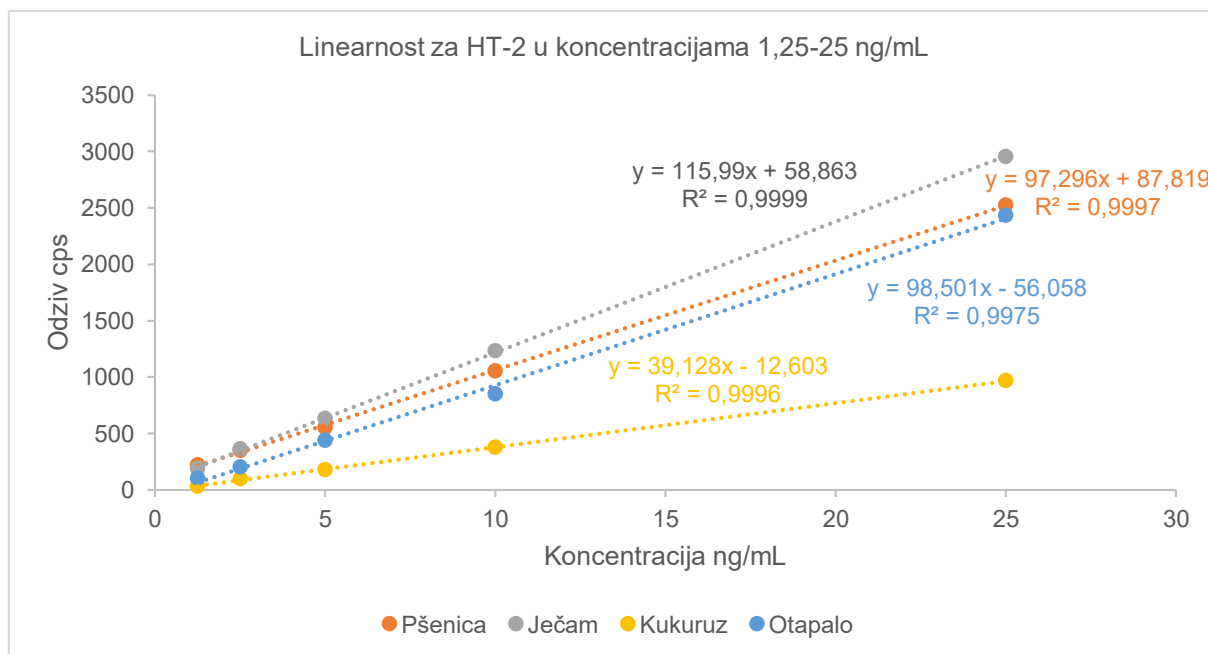
Slika 32 Grafički prikaz kalibracijskih pravaca za FB2



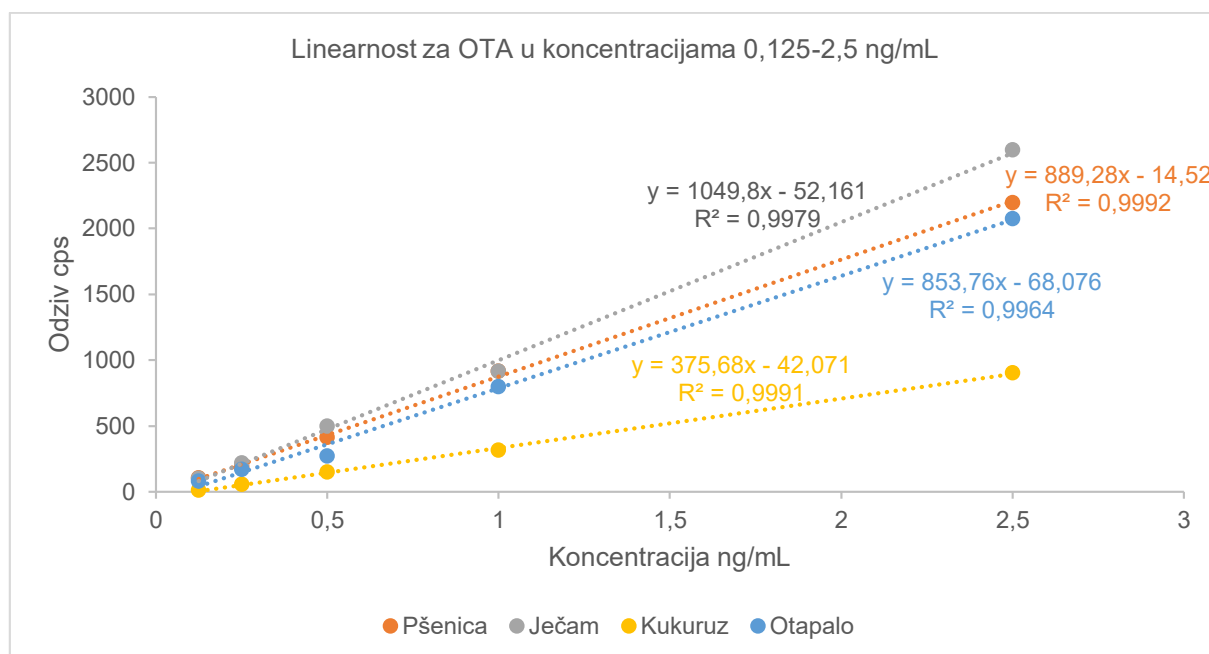
Slika 33 Grafički prikaz kalibracijskih pravaca za ZEA



Slika 34 Grafički prikaz kalibracijskih pravaca za T-2



Slika 35 Grafički prikaz kalibracijskih pravaca za HT-2



Slika 36 Grafički prikaz kalibracijskih pravaca za OTA

Provedenim eksperimentima ispitivanja linearnosti određeni R^2 odgovaraju postavljenom kriteriju $\geq 0,99$ za sve provedene kalibracije: kalibraciju u otapalu te matricama pšenici, ječmu i kukuruzu.

Arroyo-Manzanares i sur. (2018.) su ispitivanjem linearnosti metode za analizu reguliranih i nekih nereguliranih mikotoksina u žitaricama korištenjem UPLC-MS/MS-a sličnih performansi instrumentu korištenom u ovom radu dobili vrijednosti R^2 najmanje 0,98. Vrijednosti za R^2 postignute u metodi koju su razvili Kafouris i sur. (2017.) za određivanje reguliranih mikotoksina u žitaricama i orašastim plodovima iznosile su više od 0,98 za niske koncentracije, odnosno više od 0,99 za visoke koncentracije. De Santis i sur (2017.) su postigli vrijednosti R^2 najmanje 0,99 za sve ciljane spojeve uz kalibraciju u otapalu te u različitim žitaricama i proizvodima.

LOD i LOQ su ispitivani koristeći obogaćene *blank* uzorke žitarica te određeni kao najniža koncentracija analita koja daje kromatografski pik sa S/N -om ≥ 3 za limit detekcije, odnosno ≥ 10 za limit kvantifikacije. Najniže LOD i LOQ vrijednosti su postignute za AFB2 i AFG2, a najviše za DON. U usporedbi s drugim autorima kao što su Arroyo-Manzanares i sur. (2018.), Kafouris i sur. (2017.) ili De Santis i sur (2017.), LOD i LOQ vrijednosti dobivene ovom LC-MS/MS multimikotoksinskom metodom su nešto većeg iznosa. Ipak, u usporedbi s NDK vrijednostima uspostavljenima zakonodavstvom Europske unije za validirane matrice Uredbom (EZ) br. 1881/2006 (EC, 2006.a) i Preporukom 2013/165/EU (EC, 2013.), postignute LOQ vrijednosti za sve analite su bile niže, što ukazuje na prikladnost razvijene metode za određivanje niskih koncentracija ovih spojeva u žitaricama i proizvodima na bazi žitarica. Dobivene jednadžbe pravaca i koeficijenti determinacije za sve ispitivane kalibracije i spojeve,

raspon koncentracija u kojem su se provodila ispitivanja te postignute LOD i LOQ vrijednosti za pojedini analit prikazani su u **Prilogu 3**.

Eksperimenti određivanja R-a te ponovljivosti mjerenja i ponovljivosti pripreme uzoraka su provedeni korištenjem uzoraka kukuruza, pšenice i ječma, prethodno analiziranih kako bi se utvrdila odsutnost mikotoksina od interesa. Uzimajući u obzir postupak validacije iz Odluke Komisije (EZ) br. 657/2002 (EC, 2002.c), uzorci žitarica su obogaćeni s tri različite koncentracije analita, a svako obogaćenje je pripremljeno šest puta te svaka priprema izmjerena tri puta. Ispitivanja te izračun izvedbenih značajki su provedeni prema postupku opisanom u točki 3.2.2., a dobiveni rezultati srednjih vrijednosti R-a te RSD_M -a i RSD_P -a uzoraka za pojedino obogaćenje i matricu su prikazani u **Tablicama 10-12**.

Rezultati R-a metode dani su za sve tri matrice uz kalibraciju u otapalu te kalibraciju u odgovarajućem tipu matrice. Postignute srednje vrijednosti R-a pojedinih obogaćenja (LOQ, NDK, 1,5 NDK) za gotovo sve spojeve zadovoljavaju zakonski utvrđene kriterije prihvatljivosti za pojedine koncentracije analita koji iznose: 50-120% za AFT i OTA, 60-120% za DON, FUM i ZEA te 60-130% za T-2 i HT-2 (EC, 2006.c). Najniža te najviša prihvaćena (dozvoljena) vrijednost za neki analit postignuta je u kukuruzu: najniža u iznosu od 66,4% postignuta je za DON na razini obogaćenja pri LOQ, a najveća za HT-2 u iznosu od 122,6% pri obogaćenju u vrijednosti oko 1,5 NDK. Za analite FB1 i FB2 srednje vrijednosti R-a u svim matricama i obogaćenim koncentracijama uz kalibraciju u otapalu su značajno veće od propisanih, no uz kvantifikaciju kalibracijom u pripadajućoj matrici rezultati za sve vrste uzoraka su unutar dozvoljenog područja. Postignute vrijednosti R-a za FB1 i FB2 u pšenici i ječmu su bliža dozvoljenima, u usporedbi s kukuruzom za koji je zabilježeno značajno odstupanje. Srednji R OTA-e za pojedine razine obogaćenja je unutar dozvoljenog raspona. Gledajući ukupne prosječne vrijednosti R-a svih obogaćenih razina u pojedinim matricama, najniži R je zabilježen upravo za OTA-u i to u ječmu u iznosu od 63,2%, dok je za ostale analite postignuta zadovoljavajuća prosječna vrijednost R-a uz bar jedan od dva primijenjena kalibracijska načina (kalibracija u otapalu i/ili kalibracija u matrici) u sve tri matrice. Najveća prosječna R vrijednost svih obogaćenja zabilježena je u kukuruzu za FB1 u iznosu od 439,8% uz kalibraciju u otapalu. Razlog mogu biti smetnje koje su ekstrahirane iz uzorka zajedno s FB1-om, zbog čega je problem s R-om riješen korištenjem kalibracije u matrici. Postignute vrijednosti RSD_M -a i RSD_P -a za sve analizirane mikotoksine i matrice su uglavnom značajno niže od postavljenog kriterija 20%, koji predstavlja najnižu vrijednost RSD-a propisanu zakonodavstvom Europske unije (EC, 2006.c) za neki mikotoksin reguliran u žitaricama.

Tablica 10 Postignute prosječne vrijednosti R-a te RSD-a mjerenja i pripreme uzoraka u kukuruзу

Analit	Kukuruz																			Srednji R%	
	LOQ						NDK						1,5 NDK								
	R%		RSD _M %		RSD _P %		R%		RSD _M %		RSD _P %		R%		RSD _M %		RSD _P %				
Otapalo	Matrica	Otapalo	Matrica	Otapalo	Matrica	Otapalo	Matrica	Otapalo	Matrica	Otapalo	Matrica	Otapalo	Matrica	Otapalo	Matrica	Otapalo	Matrica	Otapalo	Matrica	Otapalo	Matrica
AFB1	101,0	109,9	5,4	5,9	6,9	10,6	73,3	101,7	3,5	2,0	5,8	3,2	75,9	96,0	1,8	1,7	5,2	4,1	83,4	102,5	
AFB2	88,8	85,3	8,4	12,6	9,4	15,9	75,6	106,8	6,3	6,9	9,4	15,9	84,5	98,2	6,4	4,7	12,6	13,9	83,0	96,8	
AFG1	98,5	81,8	8,0	10,4	13,7	13,6	82,1	83,1	2,4	3,2	3,9	4,1	94,5	96,2	3,7	4,1	5,0	5,2	91,7	87,0	
AFG2	95,4	115,7	7,1	8,9	8,9	9,7	83,7	102,1	4,6	6,8	5,7	8,4	96,0	115,7	4,9	4,7	8,4	5,4	91,7	111,2	
DON	69,0	66,4	3,5	6,4	5,6	7,0	119,6	95,4	2,6	2,2	3,6	4,1	91,3	99,7	2,6	2,9	4,9	4,1	93,3	87,2	
FB1	169,0	95,2	1,7	1,6	3,3	3,1	349,7	104,4	1,1	1,2	2,3	2,4	800,6	108,8	3,9	2,3	1,6	2,8	439,8	102,8	
FB2	180,3	104,7	1,4	1,5	3,5	1,6	151,9	102,8	1,8	1,9	3,1	3,0	164,6	107,8	1,0	1,7	2,8	3,2	165,6	105,1	
ZEA	79,1	81,5	2,6	3,1	4,0	3,5	70,4	78,0	1,2	1,4	2,7	2,5	91,5	100,8	1,2	1,2	2,8	2,8	80,3	86,8	
T-2	93,0	99,7	3,9	2,5	7,3	4,8	117,9	98,2	1,9	4,1	3,1	4,1	114,3	107,0	2,0	2,0	2,7	2,8	108,4	101,6	
HT-2	79,4	99,4	9,2	6,4	14,9	8,6	102,0	81,5	4,1	4,4	6,3	6,4	122,6	99,1	4,4	3,3	7,4	4,1	101,3	93,3	
OTA	108,7	112,8	11,4	5,4	19,4	6,7	36,6	102,1	20,0	8,4	14,2	7,2	60,7	93,9	9,3	9,7	9,1	6,1	68,7	102,9	

Tablica 11 Postignute prosječne vrijednosti R-a te RSD-a mjerenja i pripreme uzoraka u pšenici

Analit	Pšenica																			Srednji R%	
	LOQ						NDK						1,5 NDK								
	R%		RSD _M %		RSD _P %		R%		RSD _M %		RSD _P %		R%		RSD _M %		RSD _P %				
Otapalo	Matrica	Otapalo	Matrica	Otapalo	Matrica	Otapalo	Matrica	Otapalo	Matrica	Otapalo	Matrica	Otapalo	Matrica	Otapalo	Matrica	Otapalo	Matrica	Otapalo	Matrica		
AFB1	78,3	99,7	2,7	4,6	6,6	5,4	92,4	102,9	4,7	2,3	5,7	4,0	81,2	94,6	1,6	2,2	3,6	4,5	84,0	99,1	
AFB2	99,6	100,6	6,6	5,8	9,4	6,2	86,0	115,7	6,6	5,8	9,4	6,2	88,4	87,3	10,3	8,7	12,6	13,9	91,3	101,2	
AFG1	95,7	106,6	10,2	5,4	8,5	7,8	84,7	104,0	3,1	3,8	8,5	6,3	79,5	104,0	4,8	4,5	6,7	6,9	86,6	104,9	
AFG2	91,4	100,1	3,5	4,6	5,2	6,9	79,9	93,9	5,4	5,8	5,4	5,8	81,8	96,8	5,1	5,3	6,5	5,7	84,4	96,9	
DON	66,6	108,7	4,1	2,2	6,1	4,6	93,4	114,2	2,9	2,0	4,8	4,0	79,7	110,5	1,7	1,1	3,3	4,2	79,9	111,1	
FB1	226,4	101,9	1,7	1,3	2,3	1,8	237,5	106,1	1,6	1,1	3,4	3,6	200,4	96,2	1,7	1,0	5,3	3,5	221,4	101,4	
FB2	207,6	112,1	1,1	2,2	2,3	3,4	166,1	97,5	1,5	1,6	3,7	3,3	144,5	91,5	1,3	1,0	3,6	2,5	172,7	100,4	
ZEA	73,9	97,3	1,6	2,6	5,1	4,0	85,2	100,3	1,9	1,1	2,5	1,4	89,2	94,0	1,1	1,1	30,0	2,9	82,8	97,2	
T-2	115,6	92,0	3,7	5,0	6,4	2,8	99,6	99,6	1,8	3,4	4,1	7,4	99,9	100,2	2,7	2,5	2,5	3,1	105,0	97,3	
HT-2	110,3	98,8	6,2	5,0	11,1	5,8	100,0	89,4	7,4	9,3	9,8	17,4	74,0	92,4	8,0	9,2	12,9	13,8	94,8	93,5	
OTA	97,2	102,5	6,4	7,7	17,3	7,2	97,1	93,6	3,7	8,0	3,2	6,0	94,8	86,9	4,3	8,4	1,9	6,0	96,4	94,3	

Tablica 12 Postignute prosječne vrijednosti R-a te RSD-a mjerenja i pripreme uzoraka u ječmu

Analit	Ječam																			
	LOQ						NDK						1,5 NDK						Srednji R%	
	R%		RSD _M %		RSD _P %		R%		RSD _M %		RSD _P %		R%		RSD _M %		RSD _P %			
Otapalo	Matrica	Otapalo	Matrica	Otapalo	Matrica	Otapalo	Matrica	Otapalo	Matrica	Otapalo	Matrica	Otapalo	Matrica	Otapalo	Matrica	Otapalo	Matrica	Otapalo	Matrica	
AFB1	84,7	109,6	7,0	4,9	7,5	6,2	85,8	99,0	4,7	4,4	5,0	4,5	85,6	91,7	2,9	2,7	5,0	4,6	85,4	100,1
AFB2	99,6	97,8	6,3	7,9	7,0	12,8	85,0	99,2	7,4	7,2	8,2	6,7	98,6	103,9	6,3	6,3	7,5	7,7	94,4	100,3
AFG1	85,0	103,4	3,6	8,9	6,5	8,5	87,2	98,5	4,2	2,4	5,3	3,6	79,7	89,3	2,5	2,1	4,8	4,0	84,0	97,1
AFG2	116,4	112,9	5,1	4,4	6,4	6,9	81,5	112,8	5,2	5,8	8,9	6,2	101,2	105,1	5,2	5,0	6,2	5,5	99,7	110,3
DON	86,3	97,2	3,2	5,2	4,4	5,7	73,2	83,2	1,9	2,5	4,9	7,5	72,0	82,5	2,5	2,3	3,4	3,9	77,2	87,6
FB1	169,0	95,2	2,5	3,0	6,4	6,4	157,6	89,9	2,6	1,2	3,6	4,6	157,1	83,1	4,6	1,7	3,0	2,7	161,2	89,4
FB2	180,3	104,7	1,6	3,1	1,9	3,5	139,7	82,6	1,8	0,9	2,3	3,3	140,9	80,7	2,2	1,2	2,5	2,8	153,6	89,3
ZEA	88,3	105,0	1,3	2,0	5,8	9,1	99,1	92,2	1,6	2,0	3,0	6,4	87,1	78,7	1,4	1,3	3,0	2,7	91,5	92,0
T-2	97,6	100,1	6,0	4,9	6,7	4,9	107,3	89,3	1,9	2,1	3,5	2,1	104,4	78,3	1,5	1,5	3,3	3,1	103,1	89,2
HT-2	100,7	92,9	3,8	11,0	5,8	17,6	95,9	78,8	6,2	3,8	7,3	7,1	102,4	101,9	1,7	2,2	2,9	2,2	99,7	91,2
OTA	97,2	102,5	6,4	7,7	17,3	7,2	61,8	52,1	8,6	5,1	6,3	6,5	40,6	35,1	9,8	12,0	5,0	6,1	66,5	63,2

Dobiveni rezultati ispitivanja R-a te ponovljivosti mjerenja i ponovljivosti pripreme uzoraka uglavnom su slični rezultatima drugih autora dobivenih korištenjem različitih postupaka pripreme uzoraka te LC-MS/MS instrumenata ili čak bolji. Srednje R vrijednosti metode koju su razvili Kafouris i sur. (2017.) za određivanje reguliranih mikotoksina u žitaricama iznose 53-114%. De Santis i sur. (2017.) za svoju metodu su postigli R vrijednosti za pojedini mikotoksin koja odgovaraju propisanim vrijednostima (EC, 2006.c). Kod autora Malachová i sur. (2014.) R-ovi pri najvišim validiranim razinama iznose 70-120%, a Frenich i sur. (2009.) su svojom metodom postigli R-ove u iznosu 70-108%. Dobivene vrijednosti RSD-a kod svih autora uglavnom zadovoljavaju vrijednost $\leq 20\%$.

Utjecaj matrice, odnosno SSE, te s njim povezane značajke R_A i R_E izračunati su pomoću formula (1), (9) i (10) koristeći vrijednosti površina analita u ekstraktu matrice, otapalu i obogaćenom uzorku pri istim koncentracijama koje odgovaraju LOQ pojedinog analita. Za bolju evaluaciju utjecaja matrice, SSE je izračunat i preko formule (2) koristeći nagib kalibracijskog pravca standarda u matrici te nagib pravca u otapalu. Dobiveni rezultati su prikazani u **Tablici 13**.

Utjecaj matrice na ionizaciju ovisi o samom analitu te komponentama matrice koje se ekstrahiraju tijekom analize (De Santis i sur., 2017.), što znači da SSE za isti analit u različitim matricama može biti značajno drugačiji. Prema Malachová i sur. (2014.), za analite kojima se SSE vrijednost nalazi u rasponu 90-110% smatra se kako nisu pod utjecajem matrice. Prema prosječnim vrijednostima SSE-a svih spojeva, kukuruz u najvećoj mjeri smanjuje signal analita pri čemu $SSE_{površina}$ iznosi 35% (18-79%). Negativan trend utjecaja matrice kukuruza vidljiv je i na **Slikama 26-36** pri čemu žuta linija kalibracijske krivulje u kukuruzu za sve analite ima najmanji nagib. U pšenici je zamijećeno blago pojačanje signala analita pri čemu $SSE_{površina}$ iznosi 119% (62-211%), dok je ječam imao najmanji utjecaj na analit i prosječna $SSE_{površina}$ iznosi 97% (55-182%). Gledajući prosjek vrijednosti $SSE_{površina}$ pojedinačno za svaki analit, najveća supresija je zabilježena za OTA-u ($SSE_{površina}$ 45%) te DON ($SSE_{površina}$ 47%), dok je najveće pojačanje signala analita zabilježeno za HT-2 ($SSE_{površina}$ 141%) i FB1 ($SSE_{površina}$ 138%). Za određene spojeve zamijećene su značajne razlike u iznosu SSE vrijednosti izračunatih preko površine te preko nagiba pravca. Primjerice, SSE_{nagib} ne upućuje na utjecaj matrice za HT-2 u pšenici te iznosi 99% dok $SSE_{površina}$ izračunat pri LOQ vrijednosti otkriva povećanje signala analita i SSE u iznosu 211%. U slučaju kad se $SSE_{površina}$ (formula (1)) i SSE_{nagib} (formula (2)) razlikuju, prema Malachová i sur. (2014.) u obzir se uzimaju vrijednosti SSE izračunate prema formuli (1).

Tablica 13 Izračunate SSE%, R_E% i R_A% vrijednosti

Matrica		AFB1	AFB2	AFG1	AFG2	DON	FB1	FB2	ZEA	T-2	HT-2	OTA	Prosjek
Kukuruz	SSE _{nagib} %	29	25	25	32	62	52	28	38	67	40	39	39
	SSE _{površina} %	31	18	24	33	25	79	53	24	34	29	35	35
	R _E %	87	194	81	204	273	190	231	286	303	623	230	230
	R _A %	27	34	19	68	69	149	123	70	103	182	78	78
Pšenica	SSE _{nagib} %	77	69	74	105	60	116	65	77	191	99	92	92
	SSE _{površina} %	83	97	74	148	62	195	146	85	123	211	119	119
	R _E %	129	95	41	61	120	101	100	107	102	80	87	87
	R _A %	89	89	58	90	75	197	145	91	126	169	104	104
Ječam	SSE _{nagib} %	80	76	38	72	59	120	76	78	192	118	90	90
	SSE _{površina} %	83	80	93	97	55	140	111	77	124	182	97	97
	R _E %	106	111	62	110	106	98	121	101	86	65	96	96
	R _A %	89	89	58	107	58	137	134	78	107	117	90	90
Prosjek SSE _{površina} %		66	65	64	93	47	138	103	62	94	141	45	

Usprkos nepovoljnim SSE vrijednostima za određene analite i matrice, validacijom metode su postignute zadovoljavajuće vrijednosti R-a i RSD-a korištenjem kalibracije u matrici, što potvrđuje pouzdanost metode i prilikom kritičnih vrijednosti utjecaja matrice. Kalibracija u matrici je korištena za kompenzaciju intenziteta odziva analita i kod drugih autora. De Santis i sur. (2017.) su izračunale SSE vrijednosti za većinu analiziranih mikotoksina i kombinacija matrica žitarica/proizvoda od žitarica u iznosu 60–90% ili 110–120% smatrali prihvatljivima uz pristup korištenja kalibriranih u matrici. Sličan raspon SSE vrijednosti u analiziranim uzorcima žitarica dobili su i autori Malachová i sur. (2014.) pri validiranim obogaćenim vrijednostima oko LOQ.

Mjerna obnovljivost metode je provjerena sudjelovanjem u dostupnim međulaboratorijskim poredbenim ispitivanjima, odnosno ispitivanjima sposobnosti, omogućenim od strane dobavljača kao što su Bipea, Fapas te Romer Labs u matricama različitih žitarica i proizvoda (**Tablica 14**). Postignute z-vrijednosti za gotovo sve analizirane analite u pojedinim matricama zadovoljavaju postavljeni kriterij $-2 \leq z \leq 2$. Za FB1 u dječjoj hrani na bazi žitarica Bipea 12-3931 je postignuta z-vrijednost od 2,41 koja je u tzv. „sivoj“ zoni, što se može objasniti upotrebom matrice za pripremu standarda koja nije bila sasvim prikladna za kreiranje kalibracijske krivulje preko koje se kvantificirao FB1 te se nije uspio kompenzirati utjecaj matrice koja u slučaju FUM-a pojačava signal analita.

Malachová i sur. (2014.) su u ispitivanjima sposobnosti organizatora Bipea, Fapas i Coda-Cerva postigli z-vrijednosti u rasponu od -2 do 2 za sve prijavljene kombinacije matrica i analita, osim za AFG2 u hrani za djecu na bazi žitarica (2,62) i FB1 u kukuruzu (2,97). Slično su postigli i Kafouris i sur. (2017.) čije su prijavljene z-vrijednosti bile između -0,8 i 1,4 za kombinacije reguliranih mikotoksina i žitarica, sušenog voća i orašastih plodova.

Općenito, uspješnost multimikotoksinskih metoda u ispitivanjima sposobnosti je sve bolja. Prema De Girolamo i sur. (2017.) broj postignutih zadovoljavajućih z-vrijednosti je porastao s 59% na 85% u razdoblju 2011.-2014., dok se broj nezadovoljavajućih smanjio s 25% na 11%. Povećanje uspješnosti LC-MS metoda može se pripisati sveukupnom poboljšanom znanju i upravljanju čimbenicima koji utječu na pouzdanost LC-MS analiza, a što je povezano s kompenzacijom utjecaja matrice i općenito pojednostavljenjem postupaka pripreme uzoraka zbog dostupnosti spektrometara masa povećane osjetljivosti i selektivnosti (Pascale i sur., 2019.).

Tablica 14 Rezultati ispitivanja sposobnosti razvijenom metodom

Organizator	Oznaka PT-a	Matrica	Analit	z-vrijednost
Bipea	01-5131	Raž	AFB1	0,00
			AFB2	-0,25
			AFG1	-0,20
			AFG2	-0,45
			T-2	-0,52
			HT-2	-0,30
Romer Labs	CSSMY014-M18161DZ	Pšenica	DON	0,30
Bipea	03-0531	Ječam	ZEA	1,60
			AFB1	-1,48
			AFB2	0,00
			AFG1	-0,08
			AFG2	0,35
			T2	-0,21
Fapas	04351	Hrana za životinje na bazi žitarica	HT2	0,15
			AFB1	0,00
			OTA	0,60
			ZEA	0,30
			OTA	0,42
			DON	0,58
Bipea	12-3931	Dječja hrana na bazi žitarica	T2	0,84
			HT2	0,12
			T2+HT2	0,70
			ZEA	-0,11
			FB1	2,41
			FB2	0,98
Romer Labs	CSSMY0150-M18411AF	Kukuruz	FB2+FB2	1,70
			AFB1	-1,20
			AFB2	-0,50
			AFT ukupni	-1,10
			AFB1	-0,17
			AFB2	0,38
Bipea	02-4731	Heljdino brašno	AFG1	-1,00
			T-2	0,70
			HT-2	0,11
			OTA	1,48
			DON	0,67
			T2	1,06
Bipea	13-3931	Dječja hrana na bazi žitarica	HT2	0,35
			T2+HT2	1,18
			ZEA	0,57
			FB1	-0,39
			FB2	-0,85
			FB2+FB2	-0,83

Procjena mjerne nesigurnosti

Prepoznate nesigurnosti A vrste odnose se na podatke dobivene statističkom obradom rezultata provedenih validacijskih ispitivanja: kalibracijski pravac (linearnost), ponovljivost mjerenja, ponovljivost pripreme uzorka te R metode. Izvori nesigurnosti B vrste odnose se na podatke preuzete iz umjernica i certifikata: čistoća analitičkih standarda, nesigurnost vage, nesigurnost volumena pipeta i menzure. Navedeni izvori nesigurnosti (standardne nesigurnosti) su kvantificirani prema formulama (14) - (23), a izračunate vrijednosti relativnih standardnih nesigurnosti za pojedine spojeve i matrice su prikazane u **Prilogu 4**. U istim tablicama su također prikazane sastavljena mjerna nesigurnost u_c koja je izračunata prema formuli (24) iz relevantnih sastavnica, odnosno sastavnica s najvećom vrijednosti pri čemu je c LOQ vrijednost za pojedini analit, te proširena mjerna nesigurnost U izračunata prema formuli (25). Postignute proširene mjerne nesigurnosti za pojedini analit i korištenu kalibraciju su prikazani u **Tablici 15**.

Sastavnice nesigurnosti A vrste izračunate iz podataka provedene validacije metode su se pokazale najznačajnijim doprinositeljima mjerne nesigurnosti, a najveći utjecaj uglavnom je imao R metode. Dobivene vrijednosti proširenih mjernih nesigurnosti za analizirane mikotoksine u svim matricama uz obje vrste kalibracije iznose između 3% i 45%. Mjerna nesigurnost procijenjena uz podatke dobivene kalibracijom u matrici generalno je nižeg iznosa za većinu analiziranih spojeva. Dobivene vrijednosti proširenih mjernih nesigurnosti za analizirane mikotoksine čije izvedbene značajke zadovoljavaju kriterije postavljene legislativom u svim matricama iznose između 3% i 32% (FB2 i AFB2). Za analite čije izvedbene značajke ne zadovoljavaju kriterije (R metode za FB1 i FB2 uz kalibraciju u otapalu te OTA pri pojedinim obogaćenjima u kukuruzu i ječmu) procijenjena mjerna nesigurnost iznosi 24-45%.

Budući da u legislativi vezanoj za mikotoksine ne postoje propisane dozvoljene vrijednosti proširene mjerne nesigurnosti, za ocjenu prihvatljivosti dobivenih rezultata poslužio je dokument SANTE/11813/2017 (EC, 2017.). Prema SANTE-u, kriterij za proširenu mjernu nesigurnost analita je 50%, stoga se procijenjene mjerne nesigurnosti za određivanje 11 mikotoksina reguliranih u žitaricama razvijenom multimikotoksinskom metodom smatraju prihvatljivima.

Tablica 15 Procijenjena proširena mjerna nesigurnost U za multimikotoksinsku LC-MS/MS metodu

Redni broj	Analit	Kukuruz		Pšenica		Ječam	
		$U\%$ otapalo	$U\%$ matrica	$U\%$ otapalo	$U\%$ matrica	$U\%$ otapalo	$U\%$ matrica
1	AFB1	14	8	13	4	6	6
2	AFB2	12	8	8	4	20	20
3	AFG1	18	12	10	10	12	4
4	AFG2	12	8	4	8	32	16
5	DON	6	9	15	7	18	9
6	FB1	45	3	34	7	25	9
7	FB2	25	3	27	5	24	8
8	ZEA	14	8	13	4	7	10
9	T-2	8	6	6	6	6	8
10	HT-2	13	7	10	6	6	14
11	OTA	28	16	14	10	36	34

Kontrola kvalitete rezultata ispitivanja

Prema zahtjevima norme HRN EN ISO/IEC 17025 uspostava postupaka praćenja valjanosti rezultata ispitivanja je neophodna (HZN, 2017.). Kroz svakodnevni mjerni proces nužno je osigurati nadzor kritičnih parametara metode - parametara koji najviše utječu na mjerni proces, odnosno najviše doprinose mjernoj nesigurnosti. Takav kritični parametar metode koji se interno provjeravao u ovom slučaju je R za sve validirane analite u svakoj seriji ispitivanja. R metode se općenito može provjeravati korištenjem (C)RM-a (istinitost) ili obogaćenjem uzoraka određenom koncentracijom analitičkih standarda i izračunavanjem R-a na osnovu količine analita dodane uzorku, što je korišteno u ovom doktorskom radu. U slučaju značajnog odstupanja dobivenog R-a za neki analit u odnosu na dozvoljenu vrijednost, rezultat ispitivanja se korigirao obzirom na R, a korekcija za R nije bila potrebna ako je postotak R-a bio između 90% i 110% (EC, 2006.c). Pored internih mjera kontrole kvalitete rezultata pristupalo se međulaboratorijskim poredbenim ispitivanjima, odnosno PT-ima (pregled u **Tablici 14**), kao vanjskim mjerama osiguranja valjanosti rezultata ispitivanja. Postignute z-vrijednosti u rasponu $-2 \leq z \leq 2$ smatrale su se zadovoljavajućim, dok su rezultati $2 < |z| \leq 3$ smatrani „sivom“ zonom, odnosno signalom za boljim nadzorom metode.

4.4. Analiza prikupljenih uzoraka

Validirana LC-MS/MS multimikotoksinska razrijedi i mjeri metoda korištena je za analizu ukupno 209 uzoraka žitarica iz svih hrvatskih županija. Tijekom razdoblja 2016. i 2017. godine u Republici Hrvatskoj je pod žitaricama bilo ukupno oko 1.000.000 hektara površine, a najzastupljeniji su bili kukuruz i pšenica, dok su se ostale žitarice ječam, zob, raž i tritikal sijale u znatno manjim količinama (APPRRR, 2019.). Shodno tome, prikupljeno je 84 uzorka kukuruza (61 iz 2016. i 23 iz 2017.), 104 uzorka pšenice (57 iz 2016. i 47 iz 2017.), devet uzoraka ječma (dva iz 2016. i sedam iz 2017.), jedan uzorak tritikala, pet uzoraka raži te šest uzoraka zobi (sve 2017.) u kojima su simultano određivani regulirani mikotoksini AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, DON, FB1, FB2, ZEA, T-2, HT-2 i OTA. Svi mikotoksini su analizirani u MRM načinu rada MS-a koji uključuje praćenje dva fragmenta svakog navedenog spoja, jednog za kvantifikaciju te jednog za kvalitativnu provjeru. Pronađeni spojevi su kvantificirani uz korištenje eksterne kalibracije u otapalu, odnosno odgovarajućoj matrici, pri čemu su se izmjerene koncentracije korigirale za R metode (analiziran u svakoj seriji ispitivanja), ukoliko R nije bio unutar raspona 90-110% koje dozvoljava Odluka Komisije (EZ) br. 657/2002 (EC, 2002.c). Dobiveni rezultati mjerenja koncentracije reguliranih mikotoksina u hrvatskim žitaricama žetve 2016. i 2017. prikazani su u **Tablicama 16 i 17**.

Analizirane žitarice s hrvatskih polja žetve 2016. i 2017. su kontaminirane gotovo svim određivanim fungalnim metabolitima. Najčešći metaboliti pronađeni u svim prikupljenim uzorcima različitih kultura u koncentracijama iznad LOD-a bili su *Fusarium* mikotoksini. U 2016. godini pojavnost pronađenih mikotoksina u svim analiziranim uzorcima je bila sljedeća: DON 72,5% (63-4902 µg/kg), HT-2 45,0% (3-41 µg/kg), FB1 42,5% (61-9344 µg/kg), ZEA 35,8% (10-2068 µg/kg), FB2 33,3% (49-2442 µg/kg), T-2 16,7% (3-73 µg/kg), dok AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 i OTA nisu detektirani. Prosječna vrijednost svih pozitivnih uzoraka na prisutnost najčešćeg mikotoksina DON-a iznosila je 589 µg/kg, a najveća vrijednost od 4902 µg/kg pronađena je u uzorku kukuruza. U 2017. godini pojavnost detektiranih mikotoksina u svim analiziranim kulturama je bila: DON 32,6% (68-2408 µg/kg), HT-2 31,5% (3-154 µg/kg), FB1 23,6% (52-7350 µg/kg), FB2 15,7% (47-2139 µg/kg), T-2 10,1% (4-27 µg/kg), ZEA 5,6% (17-5155 µg/kg), OTA 4,5% (0,3-614 µg/kg), AFB1 3,4% (1,2-16,2 µg/kg), AFB2 2,3% (0,5-4,4 µg/kg), AFG1 2,3% (1,7-20,9 µg/kg) te AFG2 1,1% (2,2 µg/kg). Najveća zabilježena koncentracija najučestalijeg mikotoksina DON-a u vrijednosti od 2408 µg/kg pronađena je u uzorku pšenice, a njegova prosječna vrijednost u svim pozitivnim uzorcima iznosila je 510 µg/kg.

Tablica 16 Pojavnost reguliranih mikotoksina u žitaricama žetve 2016.

Analit	Žitarica					
	Kukuruz (n=61)		Pšenica (n=57)		Ječam (n=2)	
	F% (n)	Sred. konc. (min.-maks. konc.) µg/kg	F% (n)	Sred. konc. (min.-maks. konc.) µg/kg	F% (n)	Sred. konc. (min.-maks. konc.) µg/kg
AFB1	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
AFB2	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
AFG1	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
AFG2	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
DON	78,7 (48)	865 (68-4902)	68,4 (39)	262,5 (63-867)	<LOD	<LOD
FB1	83,6 (51)	1062 (61-9344)	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
FB2	65,6 (40)	58 (49-2442)	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
ZEA	73,8 (43)	221 (10-2068)	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
T-2	32,8 (20)	12 (3-73)	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
HT-2	88,5 (54)	8 (3-41)	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
OTA	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD

n broj uzoraka; F frekvencija (pojavnost), broj uzoraka kod kojih je detektirana koncentracija mikotoksina \geq LOD; <LOD ispod limita detekcije

Tablica 17 Pojavnost reguliranih mikotoksina u žitaricama žetve 2017.

Analit	Žitarica											
	Kukuruz (n=23)		Pšenica (n=47)			Ječam (n=7)		Tritikal (n=1)		Raž (n=5)		Zob (n=6)
	F% (n)	Sred. konc. (min.-maks. konc.) µg/kg	F% (n)	Sred. konc. (min.-maks. konc.) µg/kg	F% (n)	Sred. konc. (min.-maks. konc.) µg/kg	F% (n)	Sred. konc. (min.-maks. konc.) µg/kg	F% (n)	Sred. konc. (min.-maks. konc.) µg/kg	F% (n)	Sred. konc. (min.-maks. konc.) µg/kg
AFB1	8,7 (2)	1,2-9,7	2,1 (1)	16,2	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
AFB2	4,4 (1)	0,5	2,1 (1)	4,4	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
AFG1	4,4 (1)	1,7	2,1 (1)	20,9	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
AFG2	<LOD	<LOD	2,1 (1)	2,2	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
DON	30,4 (7)	484 (72-1156)	42,6 (20)	474 (68-2408)	<LOD	<LOD	100,0 (1)	309	20,0 (1)	1605	<LOD	<LOD
FB1	91,3 (21)	724 (52-7350)	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
FB2	60,9 (14)	292 (47-2139)	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
ZEA	13,0 (3)	26 (17-43)	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	20,0 (1)	17	16,7 (1)	5155
T-2	17,4 (4)	10 (4-27)	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	100,0 (1)	7	20,0 (1)	9	50,0 (3)	20 (17-22)
HT-2	34,8 (8)	18 (5-154)	23,4 (11)	4 (3-7)	14,3 (1)	3	100,0 (1)	245	20,0 (1)	32	100,0 (6)	6-120
OTA	<LOD	<LOD	8,5 (4)	0,3-614	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD

n broj uzoraka; F frekvencija (pojavnost), broj uzoraka kod kojih je detektirana koncentracija mikotoksina \geq LOD; <LOD ispod limita detekcije

Ukupno 10 uzoraka žitarica žetve 2016. te sedam uzoraka žitarica 2017. nije bilo sukladno NDK vrijednostima mikotoksina za hranu danima u Uredbi (EZ) br. 1881/2006 (EC, 2006.a) i Preporuci 2013/165/EU (EC, 2013.). Jedan uzorak iz 2016. te dva uzorka iz 2017. godine nisu bili sukladni ni NDK vrijednostima za hranu za životinje postavljenima Direktivom 2002/32/EZ (EC, 2002.a), odnosno Preporukom 2006/576/EC (EC, 2006.b). Pregled nesukladnih uzoraka dan je u **Tablici 18**. Uzorci koji nisu sukladni legislativi vezanoj za hranu te kao takvi nisu prikladni za korištenje u prehrani ljudi, mogu se upotrijebiti u ishrani životinja. Uzorci koji nisu prikladni ni za ljudsku prehranu niti za ishranu životinja kontaminirani su ZEA-om (porijeklom iz Varaždinske i Osječko-baranjske županije) te OTA-om (porijeklom iz Šibensko-kninske županije). Ovakva žitarica se ipak može iskoristiti na način da se „razrijedi“ „zdravom“ žitaricom čime će se koncentracija mikotoksina u stočnoj hrani smanjiti. Takva praksa nije dopuštena za hranu. U slučaju da „zdrava“ žitarica nije na raspolaganju, sirovina se ipak može upotrijebiti za ishranu određenih vrsta životinja: žitarica kontaminirana ZEA-om može se koristiti u ishrani primjerice peradi koja se pokazala vrlo otpornom na estrogena djelovanja ZEA-e te je treba posebno izbjegavati u ishrani svinja, dok se žitarica kontaminirana OTA-om bez značajnih posljedica može upotrijebiti u ishrani stoke, a treba se posebno izbjegavati u ishrani peradi (Zain i sur., 2011.).

Najkontaminiranija žitarica žetve 2016. i žetve 2017. bio je kukuruz, s FB1-om kao najzastupljenijim mikotoksinom (kontaminirano 85,7% svih uzoraka kukuruza), kojeg su slijedili HT-2 (73,8%), DON (65,5%), FB2 (64,3%), ZEA (54,8%), T-2 (28,6%), AFB1 (2,4%), te AFB2 i AFG1 (1,2%).

Ukupno 50,0% svih uzoraka žetve 2016. (98,4% svih uzoraka kukuruza) kontaminirano je s dva ili više mikotoksina. Najveću supojavnost imali su *Fusarium* mikotoksini DON, FB1, FB2, ZEA, T-2 i HT-2 koje je sadržavalo 26,2% svih uzoraka kukuruza. Najveću supojavnost u uzorcima žetve 2017. imali su FB1 i FB2 u uzorcima kukuruza, zatim DON i HT-2 u uzorcima pšenice, te je ukupno 33,7% svih analiziranih uzoraka sadržavalo dva ili više mikotoksina. Pregled svih kombinacija mikotoksina koje su pronađene u žitaricama žetve 2016. i 2017. dan je u **Tablici 19**.

Toksikološki utjecaj kombinacija mikotoksina koji se zajedno pojavljuju ne može se uvijek pretpostaviti gledajući njihove pojedinačne utjecaje. Izloženost većem broju mikotoksina može dovesti do njihovog aditivnog (nema očekivane interakcije), sinergističkog (veći od očekivanog) ili antagonističkog utjecaja (manji od očekivanog), no podaci o kombiniranim toksikološkim utjecajima mikotoksina su ograničeni, a time i znanje o riziku za zdravlje (Smith i sur., 2016.). Antagonističko djelovanje kombinacije *Fusarium* mikotoksina DON+FB1 na CFU-GM i IPEC-J2 stanice u niskim koncentracijskim dozama zamijetili su Ficheux i sur. (2012.) te Wan i sur. (2013.), dok su Kouadio i sur. (2007.) dokazali njihov aditivni učinak na Caco-2 epitelne

stanice. Kombinacija DON+ZEA pokazala je aditivno citotoksično djelovanje na Caco-2 i CFU-GM stanice (Kouadio i sur., 2007.; Ficheux i sur., 2012.), dok je antagonističko djelovanje zabilježeno na stanice IPEC-J2 i HTC 116 (eng. *Human Colon Cancer Cells*) (Wan i sur., 2013.; Bensassi i sur., 2014.). Wan i sur. (2013.) su proučavali i djelovanja smjesa DON+ZEA+FB1 na IPEC-J2 stanice te zamijetili antagonističko međudjelovanje pri niskim koncentracijama te sinergističko pri visokim koncentracijama, dok su Kouadio i sur. (2007.) za istu kombinaciju mikotoksina pokazali aditivni učinak na Caco-2 stanice. Kroničan unos sub-toksičnih koncentracija mikotoksina može promijeniti događaje na staničnoj razini, te uzrokovati biokemijska i imunološka oštećenja. Većina proučavanih kombinacija mikotoksina uglavnom dovodi do aditivnih ili sinergističkih međudjelovanja, te mogu predstavljati značajnu prijetnju zdravlju ljudi i životinja. Legislativa vezana za NDK vrijednosti mikotoksina još se uvijek temelji na izloženosti pojedinom spoju, stoga je potrebno više studija koje će obuhvaćati relevantne kombinacije mikotoksina, a jednostavnijoj usporedbi prikupljenih podataka pomogla bi standardizacija korištenih metoda istraživanja i predviđanja međudjelovanja mikotoksina na međunarodnoj razini (Šegvić Klarić, 2012.; Smith i sur., 2016.).

Prikupljeni podaci o pojavnosti mikotoksina su radi provjere postojanja statistički značajne razlike između pronađenih koncentracija mikotoksina u žitaricama godine 2016. i godine 2017. obrađeni metodama deskriptivne statističke analize. Podaci su prvo uspoređeni Shapiro-Wilkovim *W* testom za provjeru normalnosti distribucije podataka, a potom Levene-ovim testom za provjeru homogenosti varijance. Obzirom da u svim slučajevima nije postignuta normalna distribucija i/ili homogena varijanca, za daljnju analizu korišteni su neparametrijski testovi. Za usporedbu u distribuciji podataka među godinama korišten je Mann-Whitneyev *U* test koji je otkrio statistički značajnu razliku u distribuciji podataka između 2016. i 2017. godine za AFT ($p=0$), FB1 ($p=0,042$), FUM ($p=0,041$), T-2 ($p=0,038$) te OTA ($p=0$), dok kod ostalih mikotoksina nema statistički značajne razlike (DON ($p=0,740$), FB2 ($p=0,445$), ZEA ($p=0,578$), HT-2 ($p=0,139$)). Mann-Whitneyev *U* test poslužio je i za usporedbu varijabilnosti kontaminacije između pojedinih kultura te je otkrivena statistički značajna razlika između kukuruza i pšenice u koncentraciji DON-a ($p=0,002$) i HT-2 toksina ($p=0,038$) te između pšenice i zobi u koncentraciji HT-2 ($p=0,002$). Obzirom na fokus legislative na HT-2 toksin u zobi, a koja razlučuje ovu vrstu žitarice od ostalih te propisuje značajno veće NDK vrijednosti upravo za ovu kulturu, ovakvi rezultati su očekivani. Dobiveni podaci statističke analize sumirani su i prikazani kutijastim dijagramima (eng. *Box-plot*) za obje godine i sve analizirane mikotoksine te se nalaze u **Prilogu 5**.

Tablica 18 Pregled nesukladnih uzoraka žetve 2016. i 2017.

Godina žetve	Kultura	Mikotoksin	Konc. µg/kg	NDK ¹ µg/kg	NDK ² µg/kg	Županija	Godina žetve	Kultura	Mikotoksin	Konc. µg/kg	NDK ¹ µg/kg	NDK ² µg/kg	Županija
2016	Kukuruz	FB1	9344			Brodsko-posavska	Kukuruz	FB1	7350				Međimurska
		FB2	2442					FB2	2139				
		FB1+FB2	11786	4000	60000			FB1+FB2	9490	4000	60000		
	Kukuruz	ZEA	987	350	2000	Vukovarsko-srijemska	Kukuruz	AFB1	9,7	5,0	20,0	Splitsko-dalmatinska	
	Kukuruz	DON	3853	1750	8000	Brodsko-posavska	Pšenica	DON	1760	1250	8000	Karlovačka	
		ZEA	1018	350	2000		Pšenica	DON	2408	1250	8000	Virovitičko-podravska	
	Kukuruz	DON	3344	1750	8000	Međimurska		AFB1	16,2	2,0	20,0		
		ZEA	966	350	2000			AFB2	4,4				
	Kukuruz	DON	2275	1750	8000	Karlovačka		AFG1	20,9				Šibensko-kninska
		ZEA	1189	350	2000			AFG2	2,2				
	*Kukuruz	DON	4232	1750	8000	Varaždinska		AFT ukupni	43,7	4,0			
		ZEA	2068	350	2000			OTA	614	5,0	250		
	Kukuruz	DON	3902	1750	8000	Varaždinska	Raž	DON	1605	1250	8000		Varaždinska
		ZEA	1755	350	2000		*Zob	ZEA	5155	100	2000		Osječko-baranjska
	Kukuruz	DON	4902	1750	8000	Koprivničko-križevačka							
	Kukuruz	DON	2965	1750	8000	Bjelovarsko-bilogorska							
Kukuruz	FB1	4681			Zagrebačka								
	FB2	741											
	FB1+FB2	5422	4000	60000									

¹ NDK prema Uredbi (EZ) br. 1881/2006 (EC, 2006.a) i Preporuci 2013/165/EU (EC, 2013.) - hrana

² NDK prema Direktivi 2002/32/EZ (EC, 2002.a) i Preporuci 2006/576/EC (EC, 2006.b) – hrana za životinje

* Nesukladni uzorci prema legislativi i za hranu¹ i za hranu za životinje²

Tablica 19 Kombinacije mikotoksina pronađenih u uzorcima žetve 2016. i 2017.

Kombinacije mikotoksina	2016.			Kombinacije mikotoksina	2017.					
	Kukuruz	Pšenica	Ječam		Kukuruz	Pšenica	Ječam	Tritikal	Raž	Zob
DON+FB1+FB2	1			AFB1+AFB2+FB1+FB2	1					
DON+FB1+FB2+HT-2	3			AFB1+AFB2+ZEA		1				
DON+FB1+FB2+T-2+HT-2	1			AFB1+AFG1+DON+FB1+FB2	1					
DON+FB1+FB2+ZEA	3			DON+FB1+FB2	1					
DON+FB1+FB2+ZEA+HT-2	8			DON+FB1+FB2+ZEA	1					
DON+FB1+FB2+ZEA+T-2+HT-2	16			DON+FB1+FB2+ZEA+HT-2	1					
DON+FB1+T-2+HT-2	1			DON+FB1+T-2+HT-2	1					
DON+FB1+ZEA+HT-2	7			DON+FB1+ZEA+HT-2	1					
DON+FB1+ZEA+T-2+HT-2	1			DON+HT-2		3				
DON+ZEA	1			DON+HT-2+OTA		1				
DON+ZEA+HT-2	2			DON+OTA		1				
FB1+FB2	1			DON+T-2+HT-2				1		
FB1+FB2+HT-2	2			DON+ZEA+T-2+HT-2					1	
FB1+FB2+ZEA+HT-2	9			FB1+FB2	8					
FB1+HT-2	3			FB1+FB2+HT-2	1					
ZEA+T-2+HT-2	1			FB1+FB2+T-2	1					
				FB1+FB2+T-2+HT-2	1					
				FB1+T-2+HT-2	1					
				T-2+HT-2						2
				ZEA+T-2+HT-2						1
Broj uzoraka	60			Broj uzoraka	19	6		1	1	3
% uzoraka kulture	98,4			% uzoraka kulture	82,6	12,8		100,0	20,0	50,0
% svih uzoraka	50,0			% svih uzoraka	21,3	6,7		1,1	1,1	3,4

Istraživanja kontaminacije hrvatskih žitarica godine 2016. i 2017. drugih autora su rijetke. Habschied i sur. (2019.) su istraživali pojavnost reguliranih i nereguliranih *Fusarium* mikotoksina u šest sorti ječma tijekom godina 2016.-2018. Jedan od najznačajnijih mikotoksina u žitaricama – DON, pronađen je u koncentraciji od 57,9 µg/kg u 2016. godini, 61,4 µg/kg u 2017. te 58,1 µg/kg u 2018. Vrijednosti za T-2 i HT-2 su bile ili ispod limita detekcije ili vrlo niske: najveća pronađena koncentracija za T-2 je 13,1 µg/kg (2016.), dok je za HT-2 iznosila 12,3 µg/kg (2018.). FB1 je također pronađen u većini ispitanih uzoraka, i to u vrlo niskim koncentracijama: srednja vrijednost 7,6 µg/kg, 7,1 µg/kg i 6,0 µg/kg za godine 2016., 2017. i 2018. Prema autorima, pronađene koncentracije analiziranih mikotoksina nisu značajne u odnosu na NDK vrijednosti propisane EU zakonodavstvom, no njihova pojavnost se može povezati s klimatskim uvjetima.

Španić i sur. (2019.) su istraživali fuzarijsku palež klasi u različitim sortama pšenice sezona 2015./2016. i 2016./2017. Tijekom eksperimenta kao kontrola su korišteni neinokulirani uzorci pšenice u kojima su također određivani glavni *Fusarium* mikotoksini, od kojih i regulirani DON i ZEA. DON je pronađen u svih 25 analiziranih kontrolnih uzoraka pšenice, s prosječnom vrijednosti 70,1 µg/kg. Više od 60% namjerno inficiranih uzoraka je sadržavalo koncentracije DON-a veće od 1000 µg/kg, a najveća pronađena vrijednost iznosila je 4457,8 µg/kg. ZEA nije pronađen ni u jednom analiziranom kontrolnom uzorku.

Pojavnost mikotoksina u žitaricama ranijih sezona je bolje ispitana. Pleadin i sur. (2017.) su istraživali pojavnost mikotoksina AFB1, OTA, ZEA, DON i FUM u žitaricama žetve 2015. ELISA metodom je analizirano ukupno 250 uzoraka neprocesiranih žitarica i njihovih proizvoda, iz ekološkog i konvencionalnog uzgoja. Kukuruz se pokazao najkontaminiranijom žitaricom s 81,1-93,9% pozitivnih uzoraka na DON, 97,3-100% na ZEA, 89,2-93,9% na FUM, 9,13-16,2% na OTA-u te 6,0-10,8% na AFB1. Najveća pronađena koncentracija DON-a iznosila je 2260 µg/kg, ZEA-e 778 µg/kg, FUM-a 1980 µg/kg, OTA-e 4,52 µg/kg i AFB1 5,75 µg/kg. Ukupno 46% uzoraka kukuruza, 4% uzorka pšenice, 8% uzoraka ječma te 11% uzoraka raži nije bilo sukladno Uredbi (EZ) br. 1881/2006 (EC, 2006.a) obzirom na NDK vrijednosti pronađenih mikotoksina. Između žitarica ekološkog i konvencionalnog uzgoja značajnih razlika nije bilo te autori ukazuju da vremenski uvjeti tijekom godine, lokacija uzgoja, rotacija usjeva, izbor kultivara i slično imaju značajniji utjecaj na kontaminaciju mikotoksinima od uporabe fungicida.

Španić i sur. (2018.) su tijekom studije utjecaja infekcije različitih sorti pšenice godine 2014./2015. s plijesni *Fusarium culmorum* i biosinteze mikotoksina određivali koncentraciju mikotoksina LC-MS/MS-om uz prethodnu SPE pripremu uzoraka. Prirodno kontaminirana pšenica koja je služila kao kontrola tijekom istraživanja sadržavala je neke od reguliranih *Fusarium* mikotoksina: DON u čak 64% uzoraka, T-2 i HT-2 u 16%, dok ZEA nije pronađen. Koncentracije DON-a u analiziranim uzorcima kretale su se u rasponu 0-116 µg/kg.

Prisutnost *Fusarium* mikotoksina DON-a, ZEA-e, FUM-a te T-2 u uzorcima kukuruza, pšenice, ječma i zobi istraživali su Pleadin i sur. (2013.) pri čemu je analiziran 181 uzorak iz šest hrvatskih regija ELISA metodom. Najkontaminiranija žitarica bio je kukuruz, s DON-om kao najzastupljenijim mikotoksinom (52,5 %), kojeg su slijedili ZEA (40,5 %), FUM (37,5 %) i T-2 (33 %). Četiri uzorka kukuruza i jedan uzorak pšenice sadržavali su koncentracije mikotoksina veće od dozvoljenih Uredbom (EZ) br. 1881/2006 (EC, 2006.a). Prema autorima, nešto niža prosječna razina kontaminiranosti uzoraka analiziranim mikotoksinima mogla bi se objasniti mjestimično vrlo toplim i suhim razdobljima u 2011. godini u kojoj je studija provedena. Ovu tezu potvrđuju istraživanja koja su Pleadin i sur. (2012.b; 2012.c) proveli u 2010. godini koja je obilovala kišom i hladnim vremenskim uvjetima te su zabilježili značajnu kontaminaciju analiziranih žitarica ovim *Fusarium* mikotoksinima.

Pleadin i sur. (2014.) su istraživali pojavnost AFB1 u kukuruzu prikupljenom tijekom 2013. iz tvornica stočne hrane i farmi iz sjeverne, središnje i istočne Hrvatske. ELISA metodom i LC-MS/MS-om analizirano je ukupno 633 uzoraka, pri čemu je srednja vrijednost kvantificiranih uzoraka iznosila 81 µg/kg, a najveća vrijednost od 2072 µg/kg pronađena je u istočnoj regiji. Veliku pojavnost ovog mikotoksina autori su povezali s ekstremno vrućim i suhim vremenskim prilikama tijekom razdoblja od svibnja do rujna 2012. godine koje je pogodovalo nastanku AFB1 te kontaminaciji hrane za životinje ovim mikotoksinom.

Ista skupina autora istraživala je pojavnost AFB1 u žitaricama (kukuruz, pšenica, ječan, zob, mješavina žitarica) i hrani za životinje (za muzne krave) iz četiri hrvatske regije u razdoblju između 2009. i 2013. godine. Analizirano je ukupno 1949 uzoraka ELISA metodom, a AFB1 je određen u 16,4% uzoraka, od kojih najviše u kukuruzu iz 2013. Postotak nesukladnih uzoraka obzirom na zakonski uspostavljene NDK vrijednosti iznosio je 17,9% za mješavine žitarice i 12,3% za uzorke hrane za životinje. Rezultati ispitivanja pojavnosti AFB1 pokazali su utjecaj geografskog porijekla kulture, što je povezano s klimatskim uvjetima kao najvažnijim faktorom nastanka plijesni i posljedično produkcije AFB1 (Pleadin i sur., 2015.).

Hrvatska agencija za hranu je 2012. godine provela opsežno istraživanje kontaminacije 300 uzoraka dominantnih krmiva, odnosno sirovina krmiva sojine sačme i kukuruza iz vegetacijske godine 2011., mikotoksinima AFT-om, ZEA-om, DON-om te FUM-om. AFB1 je otkriven u 20% uzoraka u rasponu 1-10 µg/kg, DON je otkriven u 27% uzoraka u rasponu 55-500 µg/kg, FUM u 33% uzoraka u rasponu 220-2000 µg/kg, a ZEA u 12 % uzoraka u rasponu 16-100 µg/kg. Prosječna kontaminacija svim mikotoksinima osim FUM-om je bila otprilike ista u kukuruzu i sojinoj sačmi, dok je FUM sadržavalo 55% ispitanih uzoraka kukuruza te nijedan uzorak sojine sačme. Također, autori su naglasili utjecaj agroklimatskih uvjeta u kritičnim fazama razvoja poljoprivrednih kultura na razine mikotoksina u urodu, zbog čega je nužno provoditi kontinuiranu analizu ključnih sirovina i proizvoda (Domaćinović i sur., 2012).

Vulić i sur. (2011.) istraživali su pojavnost mikotoksina T-2 i HT-2 u uzorcima hrane za životinje te sirovinama pšenici, zobi, ječmu i soji. Analizirano je ukupno 50 uzoraka ELISA metodom. T-2/HT-2 su detektirani u 76% uzoraka hrane za životinje, s najvećom koncentracijom 67,68 ng/g pronađenom u hrani za ishranu stoke. Koncentracija T-2/HT-2 u analiziranim sirovinama se kretala u rasponu 2,61-32,94 ng/g, a najveća vrijednost zabilježena je u uzorcima zobi.

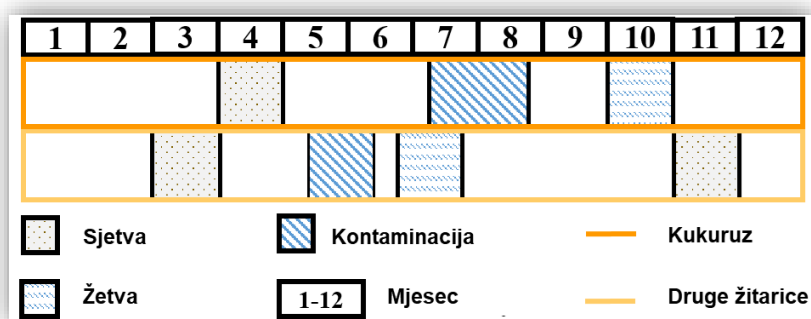
Pojavnost i supojavnost mikotoksina AFT, OTA, FUM i ZEA u žitaricama i hrani za životinje istraživali su Šegvić Klarić i sur. (2009.) koristeći ELISA metodu i TLC. Obje metode/tehnike su ukazale na sljedeću pojavnost mikotoksina: ZEA>FUM>AFT>OTA. ZEA je pronađena u čak 92% svih analiziranih uzoraka, dok su FUM detektirani samo u kukuruзу i hrani za životinje na bazi kukuruza. Kombinacija mikotoksina AFT+ZEA je zabilježena u 17% ispitanih žitarica, a kombinacije AFT+OTA, OTA+ZEA i ZEA+FUM u 12,5%. Najčešća kombinacija mikotoksina u uzorcima hrane za životinje bila je ZEA+FUM (54%), a zatim AFT+ZEA (30%) te OTA+ZEA (15%).

U sedmogodišnjem istraživanju koje su proveli Sokolović i Šimpraga (2006.) analizirano je 465 uzoraka žitarica i hrane za životinje u razdoblju 1998.-2004. na prisutnost trihotecena DON-a, T-2 toksina i diacetoksiscirpenola koristeći TLC. Analizirani mikotoksini su pronađeni u koncentracijama 0,05-3,4 mg/kg, a najčešćim kontaminantom pokazao se DON koji je detektiran u 41,2% svih uzoraka, dok su ostala dva mikotoksina pronađena u 16,8%, odnosno 27,6% uzoraka.

Domijan i sur. (2005.) su istražili prisutnost plijesni i mikotoksina FB1, FB2, ZEA i OTA u uzorcima kukuruza žetvene godine 2002. Mikološka analiza uzoraka ukazala je na kontaminaciju plijesnima *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. te *Aspergillus* spp. Plijesni proizvođači FUM-a *F. proliferatum* i *F. verticillioides* su pronađene u 93,3%, odnosno 53,3% uzoraka, dok je plijesan *F. graminearum*, proizvođač ZEA-e, bila prisutna u svim analiziranim uzorcima. Mikotoksin s najvećom pojavnosti bio je FB1 pronađen u 100% uzoraka u rasponu 238,2-1377,6 µg/kg, zatim ZEA pronađen u 80% uzoraka u koncentracijama 0,62–3,22 µg/kg, OTA u 47% uzoraka u rasponu 0,73–2,54 µg/kg te FB2 u samo dva uzorka u koncentracijama 68,4 µg/kg i 3084 µg/kg. Vrlo niske pronađene vrijednosti ZEA-e unatoč visokoj pojavnosti autori su objasnili nepovoljnim uvjetima za produkciju ovog toksina. Supojavnost dva mikotoksina (FB1+ZEA, FB1+FB2) pronađena je u sedam uzoraka, tri mikotoksina (FB1+ZEA+OTA, FB1+FB2+OTA) u drugih sedam uzoraka, dok je jedan uzorak sadržavao samo jedan mikotoksin – FB1.

Uspoređujući objavljene studije o pojavnosti mikotoksina drugih autora, istraživanje provedeno u okviru ove doktorske disertacije predstavlja prvo sveobuhvatno istraživanje pojavnosti i supojavnosti svih mikotoksina reguliranih u žitaricama istovremeno (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, DON, FB1, FB2, ZEA, T-2, HT-2 i OTA). Dostupni podaci za relevantne godine 2016. i 2017. te mikotoksine i kulture slažu se s podacima ispitivanja provedenog u sklopu disertacije. DON se pokazao dominantnim *Fusarium* mikotoksinom u analiziranim uzorcima pšenice, s najvećom pojavnosti i pronađenim koncentracijama, dok su T-2 i HT-2 toksini te FUM detektirani u niskim koncentracijama, a ZEA nije pronađen. Ranija istraživanja mikotoksina u hrvatskim žitaricama otkrivaju veću pojavnost ZEA-e od one pronađene u ovoj disertaciji, ali se i slažu u pogledu mikotoksinima najkontaminiranije kulture – kukuruza. Također, autori pojavnost analiziranih mikotoksina povezuju s klimatskim/vremenskim uvjetima.

Obzirom da je biosinteza mikotoksina pod utjecajem različitih čimbenika, visoke koncentracije mikotoksina su povezane s klimatskim uvjetima, pri čemu vlaga i temperatura imaju najvažniji doprinos za nastanak plijesni i proizvodnju mikotoksina (Bhat, 2010.; Domaćinović i sur., 2012.; Alexa i sur., 2013.). Na **Slici 37** prikazana su razdoblja sjetve pojedinih žitarica, njihove kontaminacije plijesnima te žetve istih. Biljka je općenito najpodložnija kontaminaciji u razdoblju cvatnje: kukuruz je najpodložniji kontaminaciji mikotoksikogenim plijesnima krajem srpnja i početkom kolovoza kada se odvija prašenje metlice i svilanje klipa (Kovačević i Rastija, 2014.), a ukoliko je taj period obilježen ekstremnim sušama izgledna je kontaminacija *Aspergillus* plijesnima i posljedično AFT-ima. Osim toga, značajna kišna razdoblja tijekom rujna i listopada mogu uzorkovati kontaminaciju kukuruza *Fusarium* vrstama. Kod pšenice te ostalih kultura kritičan je kraj svibnja i početak lipnja te izrazito kišna razdoblja koja pogoduju kontaminaciji *Fusarium* plijesnima (Španić i sur., 2018.; 2019.).



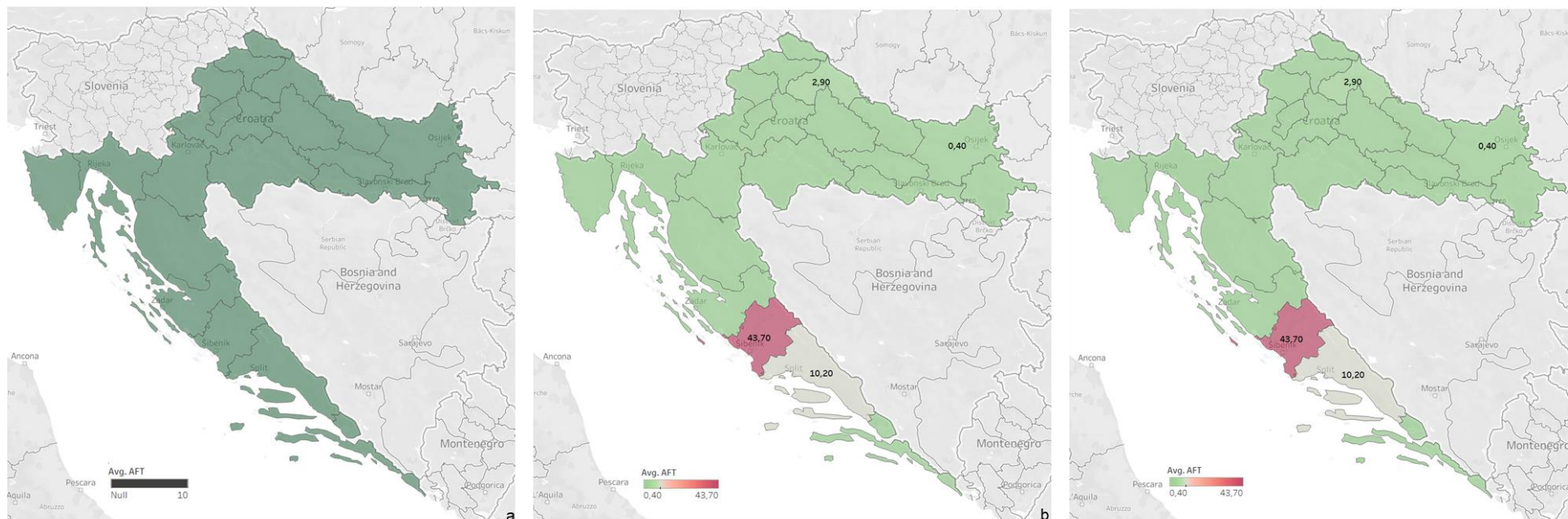
Slika 37 Razdoblja sjetve, kontaminacije i žetve žitarica

Relativno niske prosječne razine ili odsutnost kontaminacije uzoraka pšenice, ječma i drugih kultura žetve 2016. i 2017. mogu se objasniti činjenicom da su toplinske prilike istraživanih regija za vrijeme cvatnje kultura prema podacima Hrvatskog hidrometeorološkog zavoda o srednjim mjesečnim temperaturama zraka te količini oborina za svibanj i lipanj bile normalne do vrlo tople, dok su oborinske prilike bile normalne do kišne (DHMZ, 2019.). Pojavnost DON-a u uzorcima pšenice (68,4% 2016. te 42,6% 2017.) umjesto drugih *Fusarium* mikotoksina uzrokovane su umjerenim temperaturama s periodima visoke vlažnosti zraka koji pomažu kontaminaciju određenim *Fusarium* plijesnima i akumulaciju DON-a (Bryła i sur., 2016.), što potvrđuje odsutnost ili manja kontaminacija ovih žitarica ZEA-om. Sporadična visoka koncentracija ZEA-e pronađena u uzorku zobi (5155 µg/kg) iz Osječko-baranjske županije vjerojatno je uzrokovana nešto hladnijim (normalnim) toplinskim prilikama tijekom svibnja 2017. na području ove županije u usporedbi s ostatkom zemlje (DHMZ, 2019.), te nepravilnim skladištenjem, budući da su ostali uzorci iz te županije unutar granica. Također, srednje mjesečne temperature zraka većinom ispod višegodišnjeg prosjeka u listopadu 2016. mogu biti uzrokom značajne produkcije ZEA-e *Fusarium* vrsta te kontaminacije uzoraka kukuruza žetve 2016. Toplinske prilike tijekom rujna i listopada 2016. i 2017. godine u kombinaciji sa značajnim kišnim razdobljima pogodovale su produkciji FUM-a te značajnoj kontaminaciji kukuruza ovim mikotoksinima (FB1 u 85,7% svih uzoraka kukuruza). Količine oborina u listopadu 2016. koje su bile iznad višegodišnjeg prosjeka, u usporedbi s ispodprosječnim oborinama u listopadu 2017. (DHMZ, 2019.), mogu biti uzrok višim pronađenim koncentracijama FUM-a u uzorcima žetve 2016. (FB1 61-9344 µg/kg i FB2 49-2442 µg/kg) u odnosu na 2017. (FB1 52-7350 µg/kg i FB2 47-2139 µg/kg). Iznimno visoka koncentracija AFT-a pronađena u uzorku kukuruza žetve 2017. iz Splitsko-dalmatinske županije (AFB1 9,7 µg/kg i AFB2 0,5 µg/kg) može se objasniti vrlo toplim i ekstremno toplim srpnjem i kolovozom na cijelom području zemlje te sušnim do vrlo sušnim u južnim predjelima (DHMZ, 2019.), što je vjerojatno pogodovalo razvoju aflatoksikogenih plijesni i produkciji AFT-a. Za usporedbu, u uzorcima žetve 2016. godine AFT nisu detektirani niti u jednom analiziranom uzorku, a kolovoz 2016. godine je prema meteorološkim podacima imao normalne oborinske prilike u većini zemlje te normalne do tople toplinske prilike (DHMZ, 2019.) koje nisu pogodovale nastanku ovih sekundarnih metabolita. Značajna kontaminacija uzorka pšenice porijeklom iz Šibensko-kninske županije AFT-ima (AFB1 16,2 µg/kg, AFB2 4,4 µg/kg, AFG1 20,9 µg/kg i AFG2 2,2 µg/kg) ne može se objasniti vremenskim uvjetima na tom području, a može se pretpostaviti da je povezana s uvjetima skladištenja žitarice te se vjerojatno radi o slučajnoj kontaminaciji koja je rezultat nedovoljno čistog prostora kontaminiranog prijašnjim zaraženim sadržajem skladišta. Također, prisutnost AFT-a G skupine ukazuje na kontaminaciju s plijesni *A. parasiticus* koja nije uobičajeni stanovnik žitnih polja (Bennet i Klich, 2003.; Peraica i Rašić 2012.; Kovač i sur., 2018.).

Temperaturne i kišne mape Hrvatskog hidrometeorološkog zavoda za spomenuta relevantna vremenska razdoblja 2016. i 2017. godine nalaze se u **Prilogu 6**.

Podaci o pojavnosti analiziranih reguliranih mikotoksina u žitaricama žetve 2016. i 2017. poslužili su za kreiranje toplinskih mapa pojavnosti i pregled kontaminacije žitarica iz svake hrvatske županije. Na **Slikama 38-44** su prikazani podaci o pojavnosti mikotoksina (AFT, DON, FUM, ZEA, T-2, HT-2, OTA) za godine 2016. i 2017. te prosječno za 2016.-2017. Raspon pronađenih koncentracija mikotoksina prikazan je pomoću boja od zelene do ljubičaste, a koje predstavljaju koncentracije od vrlo niskih do vrlo visokih.

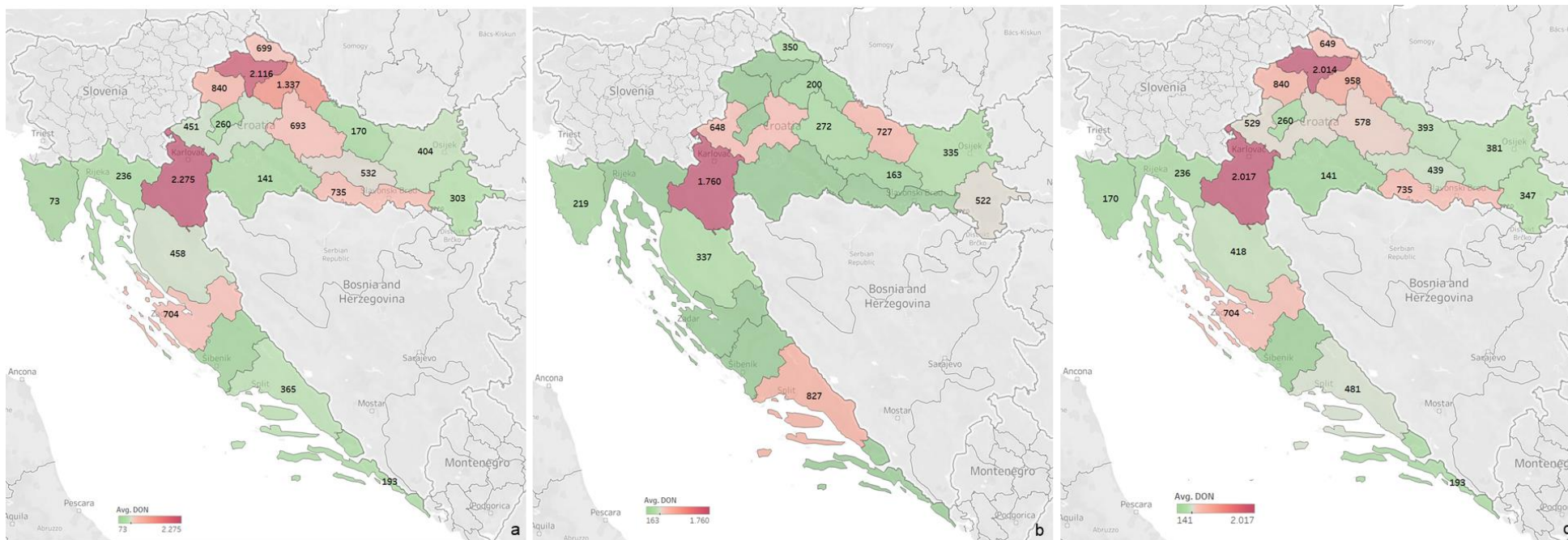
DON je 2016. kontaminirao uzorke iz svih hrvatskih županija, a najveća pojavnost je zamijećena u Karlovačkoj i Varaždinskoj županiji. Žitarice iz Karlovačke županije najkontaminiranije su bile i u 2017. godini, u kojoj je također zabilježena značajna pojavnost DON-a u većini hrvatskih županija. Ukupni FUM pronađen je u visokim koncentracijama u velikom dijelu kontinentalne Hrvatske, a najveća kontaminacija 2016. je bila u uzorcima iz Brodsko-posavske županije. Manja pojavnost zabilježena je u 2017. godini, a ekstremna koncentracija (9490 µg/kg) je pronađena u Međimurskoj županiji. Značajne koncentracije ZEA-e u uzorcima žetve 2016. pronađene su na sjeveru i istoku Hrvatske, a najveće koncentracije su zabilježene u Varaždinskoj i Karlovačkoj županiji. Isti mikotoksin je značajno manje kontaminirao žitarice 2017. godine, a najveća pojavnost je zabilježena u Osječko-baranjskoj županiji. Pojavnost T-2 toksina u 2016. godini najznačajnija je u Osječko-baranjskoj, Požeško-slavonskoj i Varaždinskoj, slično kao i HT-2 koji je pronađen u najvećim koncentracijama u Požeško-slavonskoj, Karlovačkoj i Varaždinskoj županiji. U 2017. godini pojavnost T-2 i HT-2 je najznačajnija u Karlovačkoj županiji, zatim u Varaždinskoj i Koprivničko-križevačkoj te Osječko-baranjskoj županiji. Ukupni AFT je pronađen u tek nekoliko uzoraka analiziranih žitarica i to žetve 2017. porijeklom iz Šibensko-kninske, Splitsko-dalmatinske, Koprivničko-križevačke te Osječko-baranjske županije. Najveća kontaminacija je zamijećena u uzorku pšenice iz Šibensko-kninske županije koji je sadržavao i značajnu koncentraciju OTA-e.



Slika 38 Toplinske mape pojavnosti AFT-a u žitaricama žetve 2016. (a), 2017. (b) i 2016.-2017. (c)

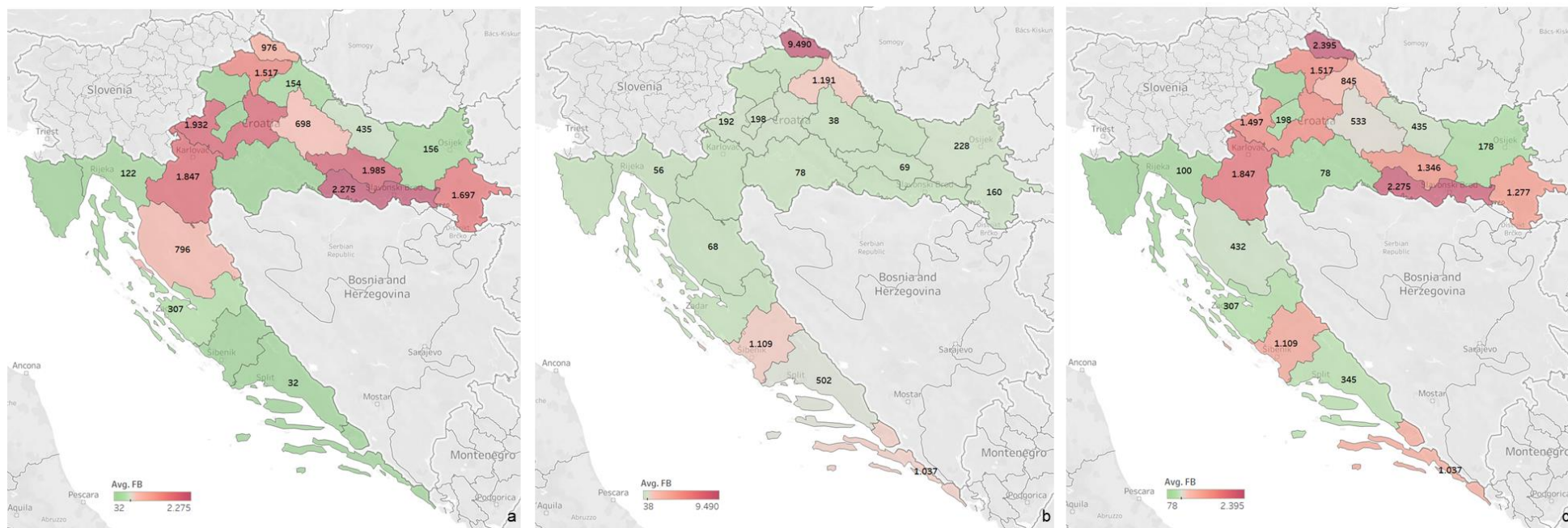
Raspon pronađenih koncentracija ukupnog AFT-a (legenda *Avg. AFT*) prikazan je bojom od zelene (niske koncentracije) do ljubičaste (visoke koncentracije).

U 2016. (a) ukupni AFT nije pronađen, dok je 2017. (b) detektiran u koncentracijama 0,40-43,70 µg/kg.



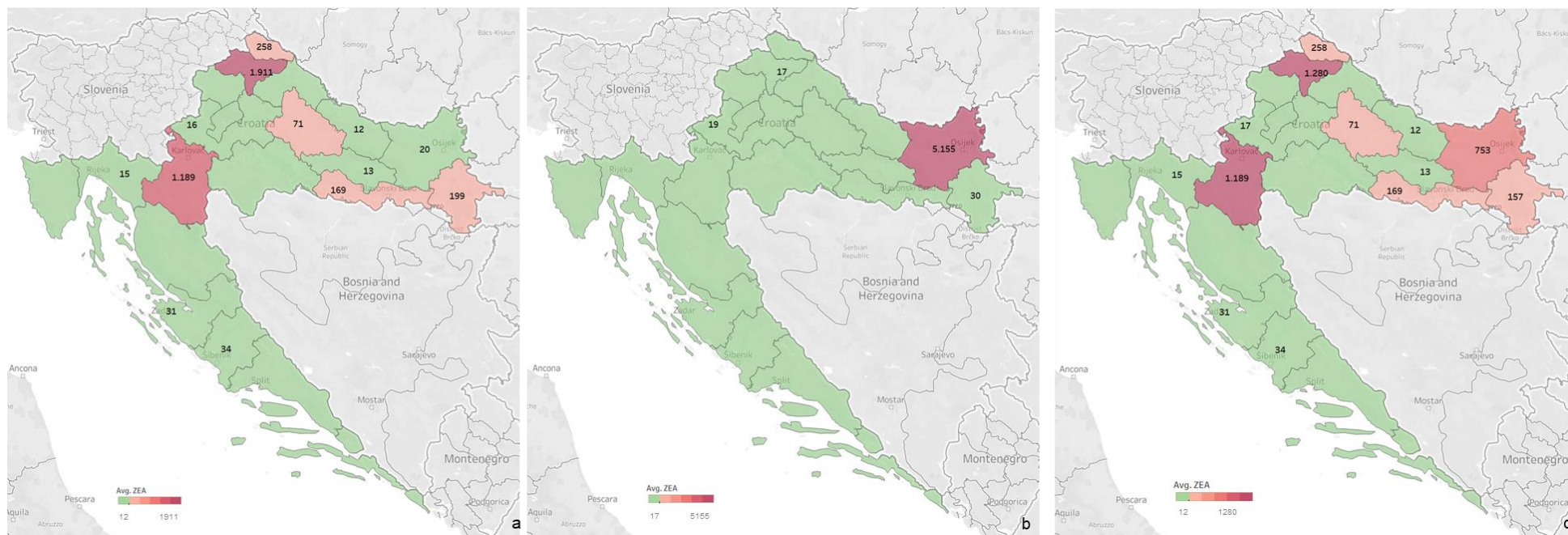
Slika 39 Toplinska mapa pojavnosti DON-a u žitaricama žetve 2016. (a), 2017. (b) i 2016.-2017. (c)

Raspon pronađenih koncentracija DON-a (legenda *Avg. DON*) prikazan je bojama od zelene (niske koncentracije) do ljubičaste (visoke koncentracije). U 2016. (a) DON je pronađen u koncentracijama 73-2275 µg/kg, dok je 2017. (b) detektiran u koncentracijama 163-1760 µg/kg.



Slika 40 Toplinska mapa pojavnosti ukupnog FUM-a u žitaricama žetve 2016. (a), 2017. (b) i 2016.-2017. (c)

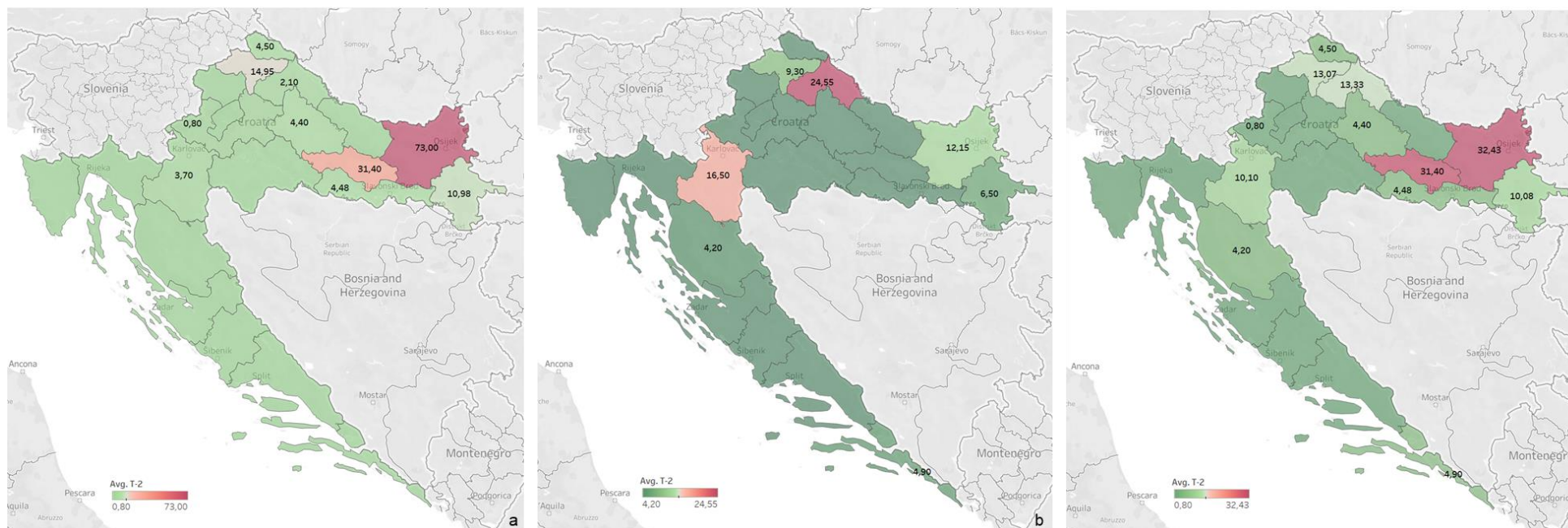
Raspon pronađenih koncentracija ukupnog FUM-a (legenda *Avg. FB*) prikazan je bojom od zelene (niske koncentracije) do ljubičaste (visoke koncentracije). U 2016. (a) ukupni FUM je pronađen u koncentracijama 32-2275 $\mu\text{g}/\text{kg}$, dok je 2017. (b) detektiran u koncentracijama 38-9490 $\mu\text{g}/\text{kg}$.



Slika 41 Toplinska mapa pojavnosti ZEA-e u žitaricama žetve 2016. (a), 2017. (b) i 2016.-2017. (c)

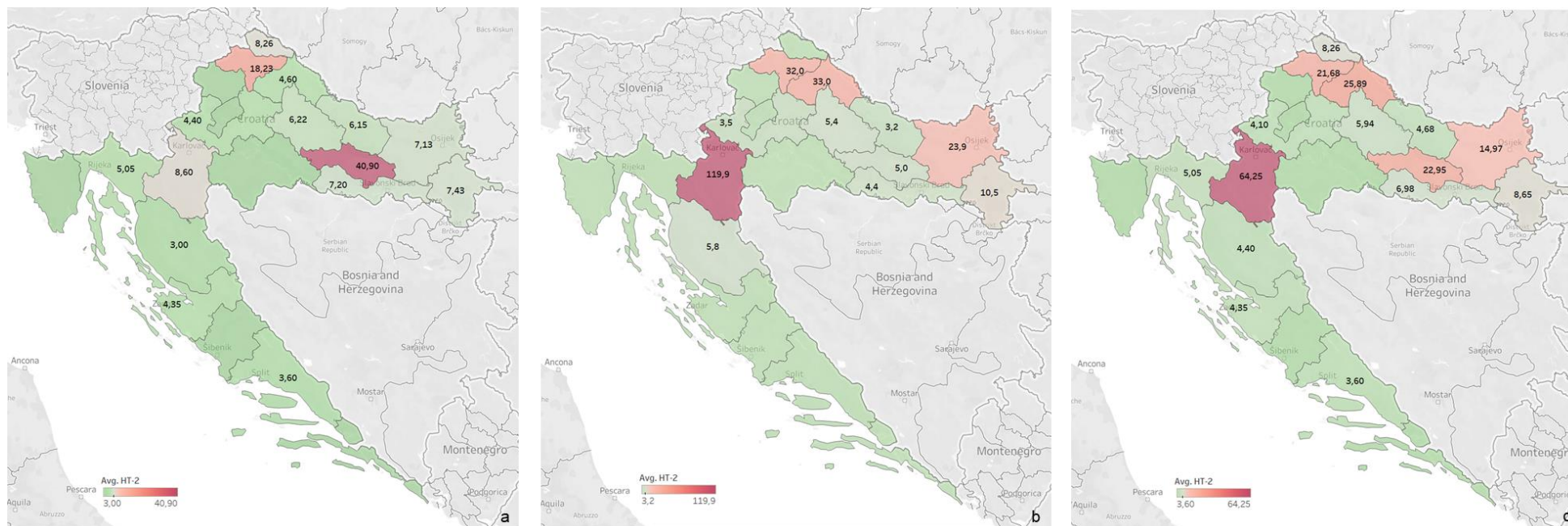
Raspon pronađenih koncentracija ZEA-e (legenda Avg. ZEA) prikazan je bojom od zelene (niske koncentracije) do ljubičaste (visoke koncentracije).

U 2016. (a) ZEA je pronađen u koncentracijama 12-1911 $\mu\text{g}/\text{kg}$, dok je 2017. (b) detektiran u koncentracijama 17-5155 $\mu\text{g}/\text{kg}$.



Slika 42 Toplinska mapa pojavnosti T-2 u žitaricama žetve 2016. (a), 2017. (b) i 2016.-2017. (c)

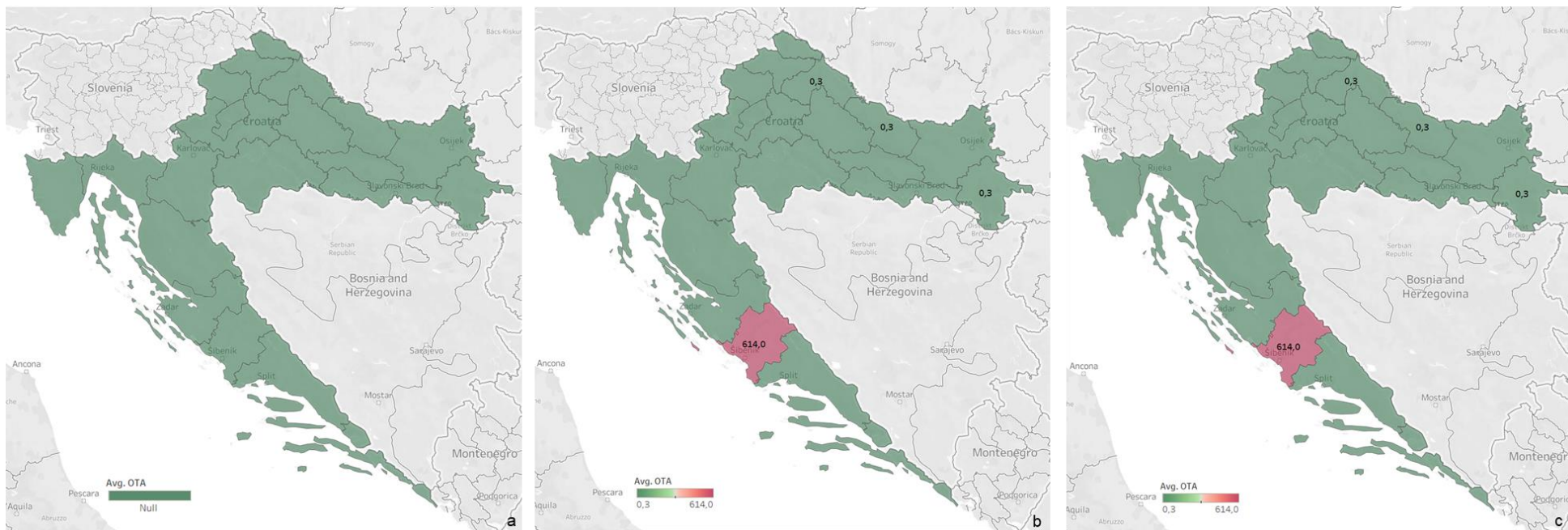
Raspon pronađenih koncentracija T-2 (legenda Avg. T-2) prikazan je bojom od zelene (niske koncentracije) do ljubičaste (visoke koncentracije). U 2016. (a) T-2 je pronađen u koncentracijama 0,80-73,0 µg/kg, dok je 2017. (b) detektiran u koncentracijama 4,20-24,55 µg/kg.



Slika 43 Toplinska mapa pojavnosti HT-2 u žitaricama žetve 2016. (a), 2017. (b) i 2016.-2017. (c)

Raspon pronađenih koncentracija HT-2 (legenda Avg. HT-2) prikazan je bojama od zelene (niske koncentracije) do ljubičaste (visoke koncentracije).

U 2016. (a) HT-2 je pronađen u koncentracijama 3,00-40,90 $\mu\text{g}/\text{kg}$, dok je 2017. (b) detektiran u koncentracijama 3,2-119,9 $\mu\text{g}/\text{kg}$.



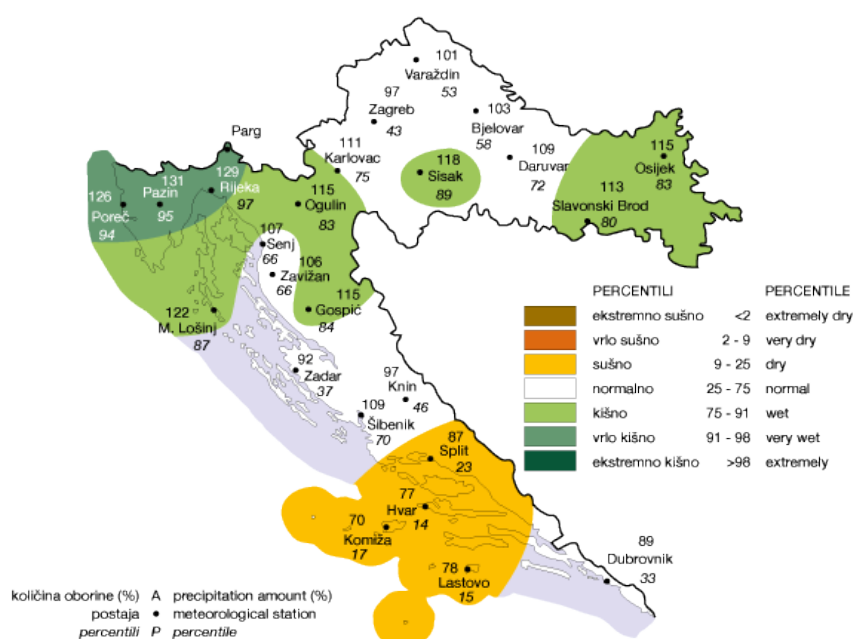
Slika 44 Toplinska mapa pojavnosti OTA-e u žitaricama žetve 2016. (a), 2017. (b) i 2016.-2017. (c)

Raspon pronađenih koncentracija OTA-e (legenda Avg. OTA) prikazan je bojom od zelene (niske koncentracije) do ljubičaste (visoke koncentracije).

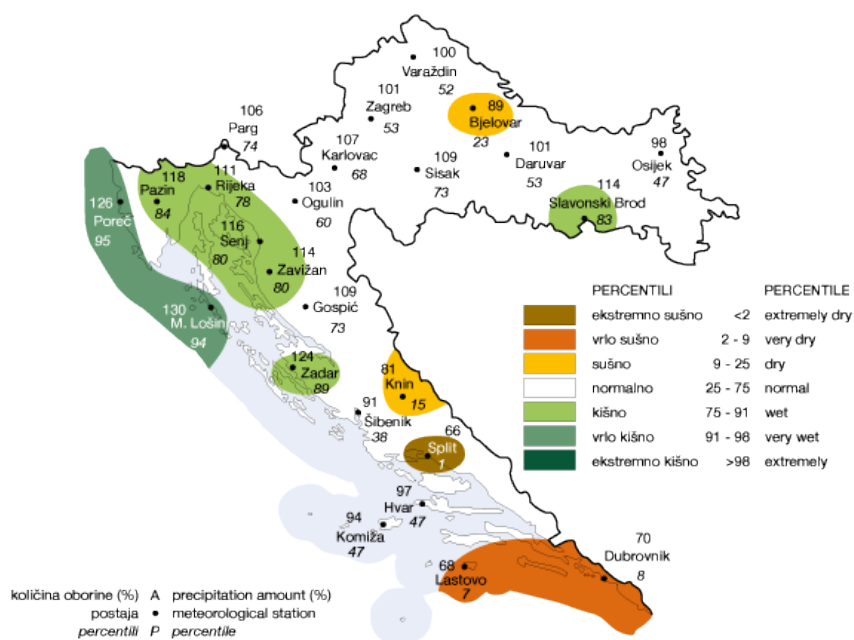
U 2016. (a) OTA nije pronađen, dok je 2017. (b) detektiran u koncentracijama 0,3-614 µg/kg.

Pojavnost i pronađene koncentracije dominantnih *Fusarium* mikotoksina DON-a i FUM-a u žitaricama 2016. i 2017. u korelaciji su s godišnjom količinom oborina na pojedinim lokacijama, a koja je uzrok značajnije kontaminacije ovim mikotoksinima u žitaricama žetve 2016., u odnosu na 2017. Godišnja količina oborina za 2016. na većem broju lokacija je bila iznad višegodišnjeg prosjeka (70%-131%), a oborinske prilike (**Slika 45**) su opisane kategorijama kišno, vrlo kišno, sušno i normalno: šire područje Siska, dio istočne Hrvatske, šire područje Gospića i Ogulina te dio sjevernog Jadrana nalaze se u kategoriji kišno, dio Istre i Kvarnera u kategoriji vrlo kišno, dio srednjeg i južnog Jadrana u kategoriji sušno, a preostali dio Hrvatske svrstan je u kategoriju normalno (DHMZ, 2019.). Godišnja količina oborina za 2017. na većini lokacija je također bila iznad višegodišnjeg prosjeka iako u manjem postotku u odnosu na 2016. (66%-130%), te su oborinske prilike (**Slika 46**) opisane kategorijama ekstremno sušno, vrlo sušno, sušno, normalno, kišno i vrlo kišno: šire područje Splita svrstano je u kategoriju ekstremno sušno, dio južnog Jadrana u kategoriju vrlo sušno, šire područje Knina i Bjelovara u kategoriju sušno, dio sjevernog Jadrana u kategoriju vrlo kišno, šire područje Zadra, Zavižana i Slavonskog Broda te dio Istre i Kvarnera u kategoriju kišno, dok se preostali dio zemlje nalazi u kategoriji normalno (DHMZ, 2019.).

Pojavnost DON-a i FUM-a u žitaricama 2016. s područja sjeverne i središnje Hrvatske koja su imala normalne oborinske prilike na godišnjoj razini može se objasniti većim količinama oborina u razdoblju cvatnje kada se odvijala infekcija *Fusarium* plijesnima. Značajna pojava AFT i OTA u žitaricama s područja oko Šibenika, Knina i Splita odgovara sušnim godišnjim oborinskim prilikama tijekom 2017.



Slika 45 Godišnja količina oborina za 2016. (DHMZ, 2019.)



Slika 46 Godišnja količina oborina za 2017. (DHMZ, 2019.)

5.ZAKLJUČCI

Na osnovi rezultata istraživanja provedenih u ovoj disertaciji mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- Razvijena je brza kvantitativna metoda za istovremeno određivanje 11 zakonodavstvom reguliranih mikotoksina u žitaricama i proizvodima na bazi žitarica (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, DON, FB1, FB2, ZEA, T-2, HT-2, OTA) uz minimalnu pripremu uzoraka i korištenje LC-MS/MS-a koji omogućuje nedvojbeno određivanje spojeva u $\mu\text{g}/\text{kg}$, čime se ispunjavaju zahtjevi, odnosno NDK vrijednosti uspostavljene zakonodavstvom EU: Uredba (EZ) br. 1881/2006 (EC, 2006.a) i Preporuka 2013/165/EU (EC, 2013.) - hrana, Direktiva 2002/32/EZ (EC, 2002.a), Preporuka 2006/576/EC (EC, 2006.b) te Preporuka 2013/165/EU (EC, 2013.) - hrana za životinje;
- Validacijom razvijene LC-MS/MS multimikotoksinske metode je dokazana njena prikladnost za namjenu, obzirom da su dobivene vrijednosti validacijskih parametara zadovoljile kriterije prihvatljivosti postavljene uzimajući u obzir zakonodavstvo: Odluka Komisije br. 2002/657/EZ o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata (EC, 2002.c). te Uredba Komisije (EZ) br. 401/2006 (EC, 2006.c.);
- Upotrebom razvijene i validirane LC-MS/MS multimikotoksinske razrijedi i mjeri metode analizirano je 209 uzoraka žitarica žetve 2016. i 2017., uključujući kukuruz, pšenicu, ječam, zob, raž i tritikal, te su u svim vrstama uzoraka najčešći pronađeni *Fusarium* mikotoksini, u prvom redu DON prisutan u 55,5% svih uzoraka te HT-2 pronađen u 39,2% svih uzoraka;
- Pojavnost mikotoksina u svim analiziranim uzorcima žetve 2016. je bila sljedeća: DON 72,5% (63-4902 $\mu\text{g}/\text{kg}$), HT-2 45,0% (3-41 $\mu\text{g}/\text{kg}$), FB1 42,5% (61-9344 $\mu\text{g}/\text{kg}$), ZEA 35,8% (10-2068 $\mu\text{g}/\text{kg}$), FB2 33,3% (49-2442 $\mu\text{g}/\text{kg}$), T-2 16,7% (3-73 $\mu\text{g}/\text{kg}$), pri čemu AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 i OTA nisu detektirani;
- Pojavnost detektiranih mikotoksina u svim analiziranim kulturama žetve 2017. je bila: DON 32,6% (68-2408 $\mu\text{g}/\text{kg}$), HT-2 31,5% (3-154 $\mu\text{g}/\text{kg}$), FB1 23,6% (52-7350 $\mu\text{g}/\text{kg}$), FB2 15,7% (47-2139 $\mu\text{g}/\text{kg}$), T-2 10,1% (4-27 $\mu\text{g}/\text{kg}$), ZEA 5,6% (17-5155 $\mu\text{g}/\text{kg}$), OTA 4,5% (0,3-614 $\mu\text{g}/\text{kg}$), AFB1 3,4% (1,2-16,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$), AFB2 (0,5-4,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$), AFG1 2,3% (1,7-20,9 $\mu\text{g}/\text{kg}$) te AFG2 1,1% (2,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$);
- Ukupno 50,0% svih uzoraka žetve 2016. je bilo kontaminirano s dva ili više mikotoksina, a najveću supojavnost imali su *Fusarium* mikotoksini DON, FB1, FB2, ZEA, T-2 i HT-2 koje je sadržavalo 26,2% svih uzoraka kukuruza;
- Najveću supojavnost u uzorcima žetve 2017. imali su FB1 i FB2 u uzorcima kukuruza, zatim DON i HT-2 u uzorcima pšenice, te je ukupno 33,7% svih analiziranih uzoraka sadržavalo dva ili više mikotoksina;
- Statistički značajna razlika u distribuciji mikotoksina između godine 2016. i 2017. je pronađena za mikotoksine AFT, FB1, FUM, T-2 i OTA. Također, statistički značajna razlika

- u kontaminaciji mikotoksinima pronađena je između kukuruza i pšenice u pojavnosti DON-a i HT-2, te između pšenice i zobi u pojavnosti HT-2;
- Uzimajući u obzir ranije objavljena istraživanja pojavnosti mikotoksina različitih autora, istraživanje provedeno u okviru ove doktorske disertacije je prvo sveobuhvatno istraživanje pojavnosti i supojavnosti svih reguliranih mikotoksina istovremeno (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, DON, FB1, FB2, ZEA, T-2, HT-2 i OTA);
 - Ukupno 10 uzoraka žitarica (kukuruz) žetve 2016. te sedam uzoraka žitarica 2017. nije bilo sukladno NDK vrijednostima mikotoksina za hranu danima u Uredbi (EZ) br. 1881/2006 (EC, 2006.a), a jedan uzorak iz 2016. (kukuruz) te dva iz 2017. godine (pšenica i zob) nisu bili sukladni ni NDK vrijednostima za hranu za životinje postavljenima Direktivom 2002/32/EZ (EC, 2002.a), odnosno Preporukom 2006/576/EC (EC, 2006.b);
 - Pronađene vrste i koncentracije mikotoksina povezane su s meteorološkim uvjetima tijekom cvatnje, odnosno razdobljem u kojem su biljke općenito najpodložnije kontaminaciji mikotoksikogenim plijesnima: normalne do vrlo tople toplinske prilike i normalne do kišne oborinske prilike tijekom svibnja i lipnja 2016. i 2017. uzrokovale su relativno niske prosječne razine (ili odsutnost) kontaminacije pšenice, ječma i drugih kultura različitim *Fusarium* mikotoksinima, dok su povoljne toplinske prilike tijekom rujna i listopada 2016. i 2017. godine u kombinaciji sa značajnim kišnim razdobljima pogodovale produkciji FUM-a i kontaminaciji kukuruza, a sporadičnoj kontaminaciji iste kulture AFT-ima pogodovale su vrlo tople i ekstremno tople toplinske prilike tijekom srpnja i kolovoza na cijelom području zemlje te sušne do vrlo sušne toplinske prilike u južnim predjelima tijekom 2017.;
 - Umjerene temperature s razdobljima visoke vlažnosti zraka pogodovale su kontaminaciji pšenice DON-om u (kontaminirano 56,7% svih uzoraka pšenice), dok su slični uvjeti pogodovali kontaminaciji kukuruza FUM-om (kontaminirano 85,7% svih uzoraka kukuruza), čime su potvrđena ranija istraživanja i tvrdnje kako je Hrvatska klimatski zemlja uglavnom *Fusarium* mikotoksina;
 - Pojavnost i pronađene koncentracije dominantnih *Fusarium* mikotoksina DON-a i FUM-a u žitaricama 2016. i 2017. u korelaciji su s godišnjom količinom oborina na pojedinim lokacijama, a koja je uzrok značajnije kontaminacije ovim mikotoksinima u uzorcima žetve 2016., u odnosu na 2017.;
 - Razvijena LC-MS/MS multimikotoksinska metoda za određivanje 11 zakonski reguliranih mikotoksina u žitaricama i proizvodima predstavlja odgovor na sve veću potrebu za kontrolom kontaminacije sirovina i proizvoda mikotoksinima, a mogućnost njene primjene za prikupljanje podataka o pojavnosti i supojavnosti mikotoksina, kao i već prikupljeni podaci u sklopu ove disertacije, od značaja su za buduća istraživanja kombiniranih

toksikoloških utjecaja mikotoksina, čime se može proširiti znanje o riziku koji mikotoksini predstavljaju za zdravlje te naposljetku značajno doprinijeti zaštiti zdravlja i ljudi i životinja.

6.LITERATURA

- Alexa E, Dehelean CA, Poiana MA, Radulov I, Cimpean A-M, Bordean D-M, Tulcan C, Pop G: The occurrence of mycotoxins in wheat from western Romania and histopathological impact as effect of feed intake. *Chemistry Central Journal*, 7:99, 2013.
- Alshannaq A, Jae-Hyuk Yu JH: Occurrence, Toxicity, and Analysis of Major Mycotoxins in Food. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14:1-20, 2017.
- Anastassiades M, Lehotay SJ, Štajnbaher D, Schenck FJ: Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. *Journal Of AOAC International*, 86:2, 2003.
- Anastassiades M, Kolberg DI, Benkenstein A, Eichhorn E, Zechmann S, Mack D, Wildgrube C, Sigalov I, Dörk D, Barth A: *Quick Method for the Analysis of numerous Highly Polar Pesticides in Foods of Plant Origin via LC-MS/MS involving Simultaneous Extraction with Methanol (QuPPE-Method Version 9.3)*. EU Reference Laboratory for pesticides requiring Single Residue Methods, Germany, 2017.
- APPRRR, Agencija za plaćanja u poljoprivredi ribarstvu i ruralnom razvoju: *Tražene kulture na jedinstvenom zahtjevu*. [29.12.2019]. <https://www.apprrr.hr/agr-onet/>
- Arroyo-Manzanares N, De Ruyck K, Uka V, Gámiz-Gracia L, García-Campaña AM, De Saeger S, Di Mavungu JD: In-house validation of a rapid and efficient procedure for simultaneous determination of ergot alkaloids and other mycotoxins in wheat and maize. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410(22): 5567-5581, 2018.
- Arpino P: History of LC–MS Development and Interfacing, Chapter 3. U: Gross M, Caprioli RM, Niessen WMA, editors. *The Encyclopedia of Mass Spectrometry*. Elsevier, 2006.
- Battilani P, Rossi V, Giorni P, Pietri A, Gualla A, van der Fels-Klerx HJ, Booij CJH, Moretti A, Logrieco A, Miglietta F, Toscano P, Miraglia M, De Santis B, Brera C: *Scientific report submitted to EFSA. Modelling, predicting and mapping the emergence of aflatoxins in cereals in the EU due to climate change*. EFSA, 2012.
- Battilani P, Toscano P, Van der Fels-Klerx HJ, Moretti A, Leggieri MC, Brera C, Rortais A, Goumperis T, Robinskou T: Aflatoxin B1 contamination in maize in Europe increases due to climate change. *Scientific Reports*, 6, 2016.
- Bebber DP, Ramotowski MA, Gurr SJ: Crop pests and pathogens move polewards in a warming world. *Nature climate change*, 3:985-988, 2013.
- Bennett JW: Mycotoxins, mycotoxicoses, mycotoxicology and mycopathologia. *Mycopathologia* 100:3-5, 1987.
- Bennett JW, Klich M: Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16:497-516, 2003.
- Bensassi F, Gallerne C, Sharaf el dein O, Hajlaoui MR, Lamaire C, Bacha H: In vitro investigation of toxicological interactions between the fusariotoxins deoxynivalenol and zearalenone. *Toxicon*, 84:1-6, 2014.

- Berthiller F, Cramer B, Iha MH, Krska R, Lattanzio VMT, MacDonald S, Malone RJ, Maragos C, Solfrizzo M, Stranska-Zachariasova M, Stroka J, Tittlemier SA: Developments in mycotoxin analysis: an update for 2016-2017. *World Mycotoxin Journal*, 11(1):5-31, 2018.
- Berthiller F, Crews C, Dall'Asta C, Saeger S De, Haesaert G, Karlovsky P, Oswald IP, Seefelder W, Speijers G, Stroka J: Masked mycotoxins: A review. *Molecular Nutrition & Food Research*, 57:165-186, 2013.
- Berthiller F, Schuhmacher R, Buttinger G, Krska R: Rapid simultaneous determination of major type A- and B-trichothecenes as well as zearalenone in maize by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1062:209-216, 2005.
- Bezerra da Rocha ME, da Chagas Oliveira Freire F, Erlan Feitosa Maia F, Florindo Guedes MI, Rondina D: Mycotoxins and their effects on human and animal health. *Food Control*, 36(1):159-165, 2014.
- Bhat R, Rai RV, Karim AA: Mycotoxins in food and feed. Present status and future concerns. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9:57-81, 2010.
- Bryła M, Waśkiewicz A, Podolska G, Szymczyk K, Jędrzejczak R, Damaziak K, Sułek A: Occurrence of 26 Mycotoxins in the Grain of Cereals Cultivated in Poland. *Toxins*, 8:160, 2016.
- Bui-Klimke TR i Wu F: Ochratoxin A and human health risk: A review of the evidence. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(13):1860-1869, 2015.
- Carballo D, Font G, Ferrer E, Berrada H: Evaluation of Mycotoxin Residues on Ready-to-Eat Food by Chromatographic Methods Coupled to Mass Spectrometry in Tandem. *Toxins*, 10:243, 2018.
- Castillo N, Ibáñez M, Beltrán E, Rivera-Monroy J, Ochoa JC, Páez-Castillo M, Posada-Buitrago ML, Sulyok M, Hernández F: Identification of mycotoxins by UHPLC-QTOF MS in air borne fungi and fungi isolated from industrial paper and antique documents from the Archive of Bogotá. *Environmental Research*, 144:130-13, 2016.
- Cheli F, Battaglia D, Gallo R, Dell'Orto V: EU legislation on cereal safety: An update with a focus on mycotoxins. *Food Control*, 37:315-325, 2014.
- Cindrić M, Marković A, Horvatić A: Spregnute tehnike tekućinski kromatograf-spektrometar masa: osnove metodologije i primjene. *Medicina*, 45:218-232, 2009.
- Dall'Asta C, Battilani P: Fumonisin and their modified forms, a matter of concern in future scenario? *World Mycotoxin Journal*, 9:727-39, 2016.
- Danzer K: Selectivity and specificity in analytical chemistry. General considerations and attempt of a definition and quantification. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 369(5):397-402, 2001.
- Delaš F: Mikrobni toksini. U: *Kemijske i fizikalne opasnosti u hrani*. HAH, Osijek, 2010.

- De Girolamo A, Ciasca B, Stroka J, Bratinova S, Pascale M, Visconti A, Lattanzio VMT: Performance evaluation of LC–MS/MS methods for multi-mycotoxin determination in maize and wheat by means of international Proficiency Testing. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 86:222-234, 2017.
- De Santis B, Debegnach F, Gregori E, Russo S, Marchegiani F, Moracci G, Brera C: Development of a LC-MS/MS Method for the Multi-Mycotoxin Determination in Composite Cereal-Based Samples. *Toxins*, 9:169, 2017.
- Državni hidrometeorološki zavod, DHMZ: Praćenje klime - Ocjena mjeseca, sezone i godine. [21.9.2019]. https://meteo.hr/klima.php?section=klima_pracenje¶m=ocjena
- Di Mavungu JD, Monbaliu S, Scippo ML, Maghuin-Rogister G, Schneider YJ, Larondelle Y, Callebaut A, Robbens J, Van Peteghem C, De Saeger S: LC-MS/MS multi-analyte method for mycotoxin determination in food supplements. *Food Additives and Contaminants*, 26(06):885-895, 2009.
- Domaćinović M, Ćosić J, Klapac T, Peraica M, Mitak M: *Znanstveno mišljenje o mikotoksinima u hrani za životinje*. HAH, 2012.
- Domijan A-M, Peraica M, Cvjetković B, Turčin S, Jurjević Ž, Ivić D: Mould contamination and co-occurrence of mycotoxins in maize grain in Croatia. *Acta Pharmaceutica*, 55:349-356, 2005.
- Dzuman Z, Zachariasova M, Veprikova Z, Godula M, Hajslova J: Multi-analyte high performance liquid chromatography coupled to high resolution tandem mass spectrometry method for control of pesticide residues, mycotoxins, and pyrrolizidine alkaloids. *Analytica Chimica Acta*, 863:29-40, 2015.
- Eeckhout M, Deschuyffeleer N, de Laethauwer S, Haesaert G: Guidelines for prevention and control of mould growth and mycotoxin production in cereals. *Mycohunt project*, 2013.
- EC, European Commission: Commission Regulation (EC) No 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, L70:12-34, 2006.c
- EC, European Commission: Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, L364:5-24, 2006.a
- EC, European Commission: Commission Recommendation 2013/165/EU of 27 March 2013 on the presence of T-2 and HT-2 toxin in cereals and cereal products. *Official Journal of the European Union*, L 91:12-15, 2013.
- EC, European Commission: Commission Recommendation 2006/576/EC on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding. *Official Journal of the European Union*, L 229:7-9, 2006.b
- EC, European Commission: Directive 2002/32/EC of the European Parliament And Of The Council of 7 May 2002 on undesirable substances in animal feed. *Official Journal of the European Union*, L140:10-22, 2002.a

- EC, European Commission: Regulation (EC) No 178/2002 of The European Parliament and of the Council of 28 January 2002 laying down the general principles and requirements of food law, establishing the European Food Safety Authority and laying down procedures in matters of food safety. *Official Journal of the European Union*, L31:1-24, 2002.b
- EC, European Commission: Commission decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results L221:8-36, 2002.c
- EC, European Commission: SANCO/11813/2017 Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed [26.8.2019]. https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2017-11813.pdf
- EC, European Commission: RASFF — The Rapid Alert System for Food and Feed — Annual Report 2018 [18.11.2019]. https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/rasff_annual_report_2018.pdf
- Eskola M, Kos G, Elliott CT, Hajšlová J, Mayar S, Krska R: Worldwide contamination of food-crops with mycotoxins: Validity of the widely cited 'FAO estimate' of 25%. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53:1-17, 2019.
- Ezekiel CN, Sulyok M, Ogara IM, Abia WA, Warth B, Šarkanj B, Turner PC, Krska R: Mycotoxins in uncooked and plate-ready household food from rural northern Nigeria. *Food and Chemical Toxicology*, 128:171-179, 2019.
- Fabregat-Cabello N, Zomer P, Sancho JV, Roig-Navarro AF, Mol HGJ: Comparison of approaches to deal with matrix effects in LC-MS/MS based determinations of mycotoxins in food and feed. *World Mycotoxin Journal*, 9(2):149-161, 2016.
- Ficheux AS, Sibiril Y, Parent-Massin D: Co-exposure of *Fusarium* mycotoxins: In vitro myelotoxicity assessment on human hematopoietic progenitors. *Toxicol*, 60:1171-1179, 2012.
- Frenich AG, Martínez Vidal JL, Romero-González R, del Mar Aguilera-Luiz M: Simple and high-throughput method for the multimycotoxin analysis in cereals and related foods by ultra-high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 117:705-712, 2009.
- Gašljević V: Method validation and measurement uncertainty. *Biochemia Medica*, 20(1):57-63, 2010.
- Gašljević V, Jakovčić M: *Procjena mjerne nesigurnosti*. Zagreb: HMD, 2006.
- Generotti S, Cirlini M, Šarkanj B, Sulyok M, Berthiller F, Dall'Asta C, Suman M: Formulation and processing factors affecting trichothecene mycotoxins within industrial biscuitmaking. *Food Chemistry*, 229:597-603, 2017.
- Gross JH: *Mass Spectrometry*. Springer, 2011.

- Gosetti F, Mazzucco E, Zampieri D, Gennaro MC: Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217(25):3929-3937, 2010.
- HAA, Hrvatska akreditacijska agencija: *Pravila za međulaboratorijske usporedbe HAA-Pr-2/6*. HAA, 2015.
- Habler K, Gotthard M, Schüler J, Rychlik M: Multimycotoxin stable isotope dilution LC-MS/MS method for *Fusarium* toxins in beer. *Food Chemistry*, 218:447-454, 2017.
- Habschied K, Krska R, Sulyok M, Šarkanj B, Krstanović V, Lalić A, Šimić G, Mastanović K: Screening of Various Metabolites in Six Barley Varieties Grown under Natural Climatic Conditions (2016–2018). *Microorganisms*, 7:532, 2019.
- Holčapek M, Jirásko R, Lísa M: Recent developments in liquid chromatography–mass spectrometry and related techniques. *Journal of Chromatography A*, 1259:3-15, 2012.
- Houissa H, Lasram S, Sulyok M, Šarkanj B, Fontana A, Strub C, Krska R, Schorr-Galindo, Ghorbel: Multimycotoxin LC-MS/MS analysis in pearl millet (*Pennisetum glaucum*) from Tunisia. *Food Control*, 106:106738, 2019.
- HS, Hrvatski sabor: *Zakon o kontaminantima*. Narodne novine 39/2013, 2013.a
- HS, Hrvatski sabor: *Zakon o hrani*. Narodne novine 81/2013, 2013.b
- HZN, Hrvatski zavod za norme: *Opći zahtjevi za osposobljenost ispitnih i umjernih laboratorija HRN EN ISO/IEC 17025*. HZN, 2017.
- IARC, International Agency for Research on Cancer: Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Some Naturally Occurring Substances: food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. IARC, 56:1-599, 1993.
- IARC, International Agency for Research on Cancer: *Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene, and Styrene*. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. IARC, 82:1-556, 2002.
- IARC, International Agency for Research on Cancer: *Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: chemical agents and related occupations. A review of human carcinogens*. IARC, 100F:224-248, 2012.
- Jandera P, Hájek T, Staňková M: Monolithic and core–shell columns in comprehensive two-dimensional HPLC: a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(1):139-51, 2014.
- JCGM, Joint Committee for Guides in Metrology: *Evaluation of measurement data – Guide to the expression of uncertainty in measurement. GUM 1995 with minor corrections*. JCGM, 2008.
- Kaštelan-Macan M: *Kemijska analiza u sustavu kvalitete*. Zagreb, Školska knjiga, 2003.
- Kafouris D, Christofidou M, Christodoulou M, Christou E, Ioannou-Kakouri E: A validated UPLC-MS/MS multi-mycotoxin method for nuts and cereals: results of the official

- control in Cyprus within the EU requirements. *Food and Agricultural Immunology*, 28(1):90-108, 2017.
- Kanižai Šarić G, Milaković Z., Krstanović V: Toksičnost *Fusarium* toksina. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam*, 6(3-4):112-116, 2011.
- Karlovsky P, Suman M, Berthiller F, De Meester J, Eisenbrand G, Perrin I, Oswald IP, Speijers G, Chiodini A, Recker T, Dussor P: Impact of food processing and detoxification treatments on mycotoxin contamination. *Mycotoxin Research*, 32:179-205, 2016.
- Kazakevich J, LoBrutto R: HPLC Theory and Practice, Introduction. U: Kazakevich J, LoBrutto R, editors. *HPLC for pharmaceutical scientists*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2007.
- Kim DH, Hong SY, Kang JW, Cho SM, Lee KR, An TK, Lee C, Chung SH: Simultaneous Determination of Multi-Mycotoxins in Cereal Grains Collected from South Korea by LC/MS/MS. *Toxins*, 9(3):1-13, 2017.
- Klapec T, Šarkanj B: *Opasnosti vezane uz hranu. Kemijske i fizikalne opasnosti*. Interna skripta. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, 2010.
- Kovač M, Šubarić D, Bulaić M, Kovač T, Šarkanj B: Yesterday masked, today modified; what do mycotoxins bring next? *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 69:196-214, 2018.
- Kovačević V, Rastija M: *Žitarice*. Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet, Osijek, 2014.
- Kruve A, Rebane R, Kipper K, Oldekop ML, Evard H, Herodes K, Ravio P, Leito I: Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part I. *Analytica Chimica Acta*, 870:29-44, 2015.
- Krska R, Schubert-Ullrich P, Molinelli A, Sulyok M, MacDonald S, Crews: ycotoxin analysis: An update. *Food Additives & Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure& Risk Assessment*, 25(2):152-163, 2008.
- Kouadio JH, Dano SD, Moukha S, Mobio TA, Creppy EE: Effects of combinations of *Fusarium* mycotoxins on the inhibition of macromolecular synthesis, malondialdehyde levels, DNA methylation and fragmentation, and viability in Caco-2 cells. *Toxicon*, 49:306-317, 2007.
- Kovalsky P, Kos G, Nährer K, Schwab C, Jenkins T, Schatzmayr G, Sulyok M, Krska R: Co-occurrence of regulated, masked and emerging mycotoxins and secondary metabolites in finished feed and maize - an extensive survey. *Toxins*, 8:363, 2016.
- Lazarić K: Validacija analitičkih metoda-osnovna načela. *Svijet po mjeri*, 1:61-64, 2012.
- Li P, Zhang Z, Hu X, Zhang Q: Advanced hyphenated chromatographic-mass spectrometry in mycotoxin determination: current status and prospects. *Mass Spectrometry Reviews*, 32:420-452, 2013.

- Lubin A, Bajic S, Cabooter D, Augustijns P, Cuyckens F: Atmospheric Pressure Ionization Using a High Voltage Target Compared to Electrospray Ionization. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 28:286-293, 2017.
- Malachová A, Stránská M, Václavíková M, Elliott CT, Black C, Meneely J, Hajšlová J, Ezekiel CN, Schuhmacher R, Krska R: Advanced LC-MS-based methods to study the co-occurrence and metabolization of multiple mycotoxins in cereals and cereal-based food. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410(3):801-825, 2018.
- Malachová A, Sulyok M, Beltrán E, Berthiller F, Krska R: Optimization and validation of quantitative liquid chromatography-tandem mass spectrometric method covering 295 bacterial and fungal metabolites including all regulated mycotoxins in four model food matrices. *Journal of Chromatography A*, 1362:145-156, 2014.
- Marin S, Ramos AJ, Cano-Sancho G, Sanchis V: Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology*, 60:218-237, 2013.
- Medina A, Akbar A, Baazeem A, Rodriguez A, Magan N: Climate change, food security and mycotoxins: Do we know enough? *Fungal Biology Reviews*, 31:143-154, 2017.
- MP, Ministarstvo poljoprivrede: *Pravilnik o sigurnosti hrane za životinje*. Narodne novine 102/2016, 2016.
- Murray KK, Boyd RK, Eberlin MN, Langley GJ, Li L, Naito Y: Definitions of terms related to mass spectrometry (IUPAC recommendation 2013). *Pure and Applied Chemistry*, 85(7):1515-609, 2013.
- Niessen WMA, Falck D: Introduction to Mass Spectrometry, a Tutorial, hapter 1. U: Kool J, Niessen WMA, editors. *Analyzing Biomolecular Interactions by Mass Spectrometry*. Wiley-VCH Weinheim, Germany, 1-54, 2015.
- Ožegović L, Pepeljnjak S: *Mikotoksikoze*. Školska knjiga, Zagreb, 1995.
- Parasuraman S, Anish R, Balamurugan S, Muralidharan S, Kumar KJ, Vijayan V: An Overview of Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy Instrumentation. *Pharmaceutical Methods*, 5:47-55, 2014.
- Particle Sciences: Mass Spectrometry in Bioanalysis. *Technical Brief*, 4, 2009.
- Pascale M: Detection methods for mycotoxins in cereal grains and cereal products. *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke*, 117:15-25, 2009.
- Pascale M, De Girolamo A, Lippolis V, Stroka J, Mol HGJ, Lattanzio VMT: Performance Evaluation of LC-MS Methods for Multimycotoxin Determination. *Journal of AOAC International*, 102(6):1708-1720, 2019.
- Peraica M, Rašić D: Akutne i toksične mikotoksikoze u ljudi. *Krmiva*, 54:81-87, 2012.
- Peraica M, Radić B, Lucić A, Pavlović M: Toxic effects of maycotoxins in humans. *Bulletin of the World Health Organization*, 77(9):754-766, 1999.

- Perši N, Pleadin J, Vulić A, Zdravec M, Mitak M: Mikotoksini u žitaricama i hrani životinjskog podrijetla. *Veterinarska stanica*, 4:335-345, 2011.
- Pinotti L, Ottoboni M, Giromini C, Dell'Orto V, Cheli F: Mycotoxin Contamination in the EU Feed Supply Chain: A Focus on Cereal Byproducts. *Toxins*, 8:45, 2016.
- Pitt JJ: Principles and Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry. *The Clinical Biochemist Reviews*, 30:19-34, 2009.
- Pleadin J, Malenica Staver M, Markov K, Frece J, Zdravec M, Jaki V, Krupić I, Vahčić N: Mycotoxins in organic and conventional cereals and cereal products grown and marketed in Croatia. *Mycotoxins Research*, 33(3):219-227, 2017.
- Pleadin J, Vulić A, Perši N, Škrivanko M, Capek B, Cvetnić Ž: Annual and regional variations of aflatoxin B1 levels seen in grains and feed coming from Croatian dairy farms over a 5-year period. *Food control*, 47:221-225, 2015.
- Pleadin J, Vulić A, Perši N, Škrivanko M, Capek B, Cvetnić Ž: Aflatoxin B1 occurrence in maize sampled from Croatian farms and feed factories during 2013. *Food control*, 40:286-291, 2014.
- Pleadin J, Vahčić N, Perši N, Ševelj D, Markov K, Frece J: *Fusarium* mycotoxins' occurrence in cereals harvested from Croatian fields. *Food Control*, 32:49-54, 2013.
- Pleadin J, Zdravec M, Perši N, Vulić A, Jaki V, Mitak M: Mould and mycotoxin contamination of pig feed in northwest Croatia. *Mycotoxin Research*, 28:157-162, 2012.a
- Pleadin J, Perši N, Mitak M, Zdravec M, Sokolović M, Vulić A: The natural occurrence of T-2 toxin and fumonisins in maize samples in Croatia. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 88:863-866, 2012.b
- Pleadin J, Sokolović, M, Perši N, Zdravec M, Jaki V, Vulić A: Contamination of maize with deoxynivalenol and zearalenone in Croatia. *Food Control*, 28:94-98, 2012.c
- Preti R: Core-Shell Columns in High-Performance Liquid Chromatography: Food Analysis Applications. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2016:1-9, 2016.
- Rahmani A, Jinap S, Soleimany F: Qualitative and Quantitative Analysis of Mycotoxins. *Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety*, 8:202-251, 2009.
- Razzazi-Fazeli E, Reiter EV: Sample preparation and clean up in mycotoxin analysis: principles, applications and recent developments, Chapter 2. U: De Saeger S, editor. *Determining Mycotoxins and Mycotoxigenic Fungi in Food and Feed*. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, 37-70, 2011.
- Righetti L, Paglia G, Galaverna G, Dall'Asta C: Recent advances and future challenges in modified mycotoxin analysis: Why HRMS has become a key instrument in food contaminant research. *Toxins*, 8:361, 2016.
- Schaarschmidt S, Fauhl-Hassek C: Mycotoxins during the Processes of Nixtamalization. *Toxins*, 11(4):227, 2019.

- Shanakhat H, Sorrentino A, Raiola A, Romano A, Masi P, Cavella S: Current methods formycotoxins analysis and innovative strategies for their reduction in cereals: an overview. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(11), 2018.
- Smith M-C, Madec S, Coton E, Hymery N: Natural Co-Occurrence of Mycotoxins in Foods and Feeds and Their in vitro Combined. *Toxins*, 8:94, 2016.
- Sokolović M, Šimpraga B: Survey of trichothecene mycotoxins in grains and animal feed in Croatia by thin layer chromatography. *Food Control*, 17:733-740, 2006.
- Streit E, Naehrer K, Rodrigues I, Schatzmayr G: Mycotoxin occurrence in feed and feed raw materials worldwide: Longterm analysis with special focus on Europe and Asia. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93:2892-2899, 2013.
- Sulyok M, Berthiller F, Krska R, Schuhmacher R: Development and validation of a liquid chromatography/ tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20: 2649-2659, 2006.
- Sulyok M, Krska R, Schuhmacher R: A liquid chromatography/tandem mass spectrometric multi-mycotoxin method for the quantification of 87 analytes and its application to semi-quantitative screening of moldy food samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389:505-1523, 2007.
- Sulyok M, Stadler D, Steiner D, Krska R: Validation of an LC-MS/MS-based dilute-and-shoot approach for the quantification of > 500 mycotoxins and other secondary metabolites in food crops: challenges and solutions. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2020.
- Suman M, Generotti S: Transformation of mycotoxins upon food processing: Masking, binding and degradation phenomena, Chapter 5. U: Dall'Asta C, Berthiller F, editors. *Masked mycotoxins in food - formation, occurrence and toxicological relevance*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 73-96, 2016.
- Sun D, Qui N, Zhou A, Lyu B, Zhang S, Li J, Zhao Y, Wu Y: Development of Sensitive and Reliable UPLC-MS/MS Methods for Food Analysis of Emerging Mycotoxins in China Total Diet Study. *Toxins*, 11:166, 2019.
- Šarkanj B: Utjecaj inhibitora glutation S – transferaze na produkciju aflatoksina plijesni *Aspergillus flavus*. *Doktorski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2014.
- Šarkanj B, Ezekiel CN, Turner PC, Abia WA, Rychlik M, Krska R, Sulyok M, Warth B: Ultra-sensitive, stable isotope assisted quantification of multiple urinary mycotoxin exposure biomarkers. *Analytica Chimica Acta*, 1019:84-92, 2018.
- Šegvić Klarić M: Adverse effects of combined mycotoxins. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 63:519-530, 2012.
- Španić V, Zdunić Z, Drezner G, Šarkanj B: The Pressure of *Fusarium* Disease and Its Relation with Mycotoxins in The Wheat Grain and Malt. *Toxins*, 11:198, 2019.
- Španić V, Marček T, Abičić I, Šarkanj B: Effects of *Fusarium* Head Blight on Wheat Grain and Malt Infected by *Fusarium culmorum*. *Toxins*, 10:17, 2018.

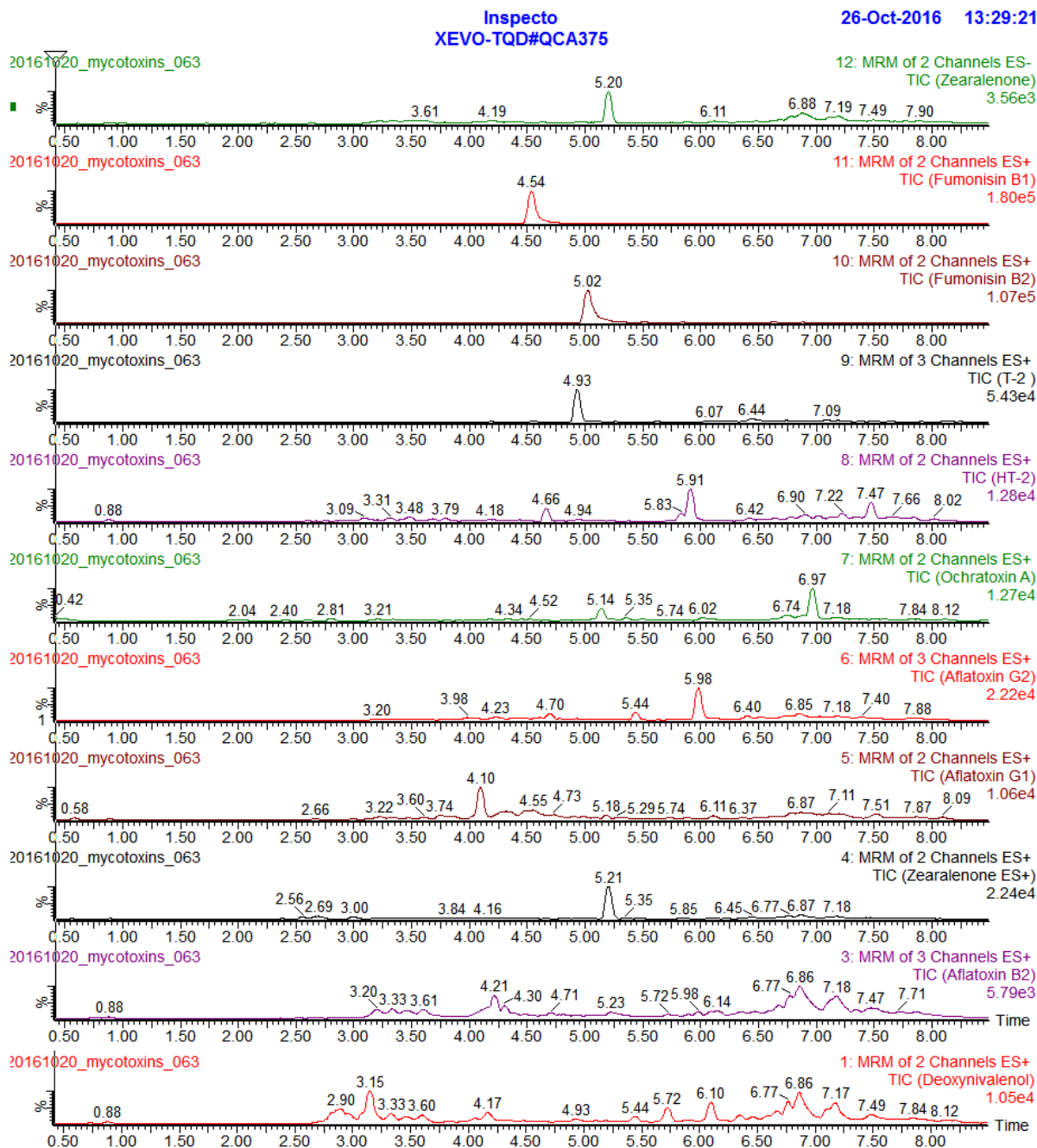
- Špehar B, Tomić T, Kurte L, Uzorinac-Nasipak N: Definiranje odgovarajućeg kriterija prihvatljivosti u postupku verifikacije ili validacije metode. U: *Iskustva laboratorija u primjeni HRN EN ISO/IEC 17025*, HMD, 2016.
- Štěpán R, Hajšlová J, Kocourek V, Tichá J: Uncertainties of gas chromatographic measurement of troublesome pesticide residues in apples employing conventional and mass spectrometric detectors. *Analytica Chimica Acta*, 520:245–255, 2004.
- Tang L, Kebarle P: Dependence of ion intensity in electrospray mass spectrometry on the concentration of the analytes in the electrosprayed solution. *Analytical Chemistry*, 65:3654-3668, 1993.
- Tittlemier SA, Cramer B, Dall'Asta C, Iha H, Lattanzio VMT, Malone RJ, Maragos C, Solfrizzo M, Stranska-Zachariasova M, Stroka J: Developments in mycotoxin analysis: an update for 2017-2018. *World Mycotoxin Journal*, 2(1):3-29, 2019.
- Trufelli H, Palma P, Famiglini G, Cappiello A: An overview of matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 30:491-509, 2011.
- Turner NW, Subrahmanyam S, Piletsky SA: Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. *Analytica Chimica Acta*, 632:168-180, 2009.
- Van der Fels-Klerx HJ, Goedhart PW, Elen O, Börjesson T, Hietaniemi V, Booij CJH: Modeling Deoxynivalenol Contamination of Wheat in Northwestern Europe for Climate Change Assessments. *Journal of Food Protection*: 75(6):1099-1106, 2012.
- Van der Fels-Klerx HJ, Liu C, Battilani P: Modelling climate change impacts on mycotoxin contamination. *World Mycotoxin Journal*, 9:717-726, 2016.
- Van Egmond HP, Schothorst RC, Jonker MA: Regulations relating to mycotoxins in food perspectives in a global and European context. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389:147-57, 2007.
- Vidal A, Morales H, Sanchis V, Ramos AJ, Marín S: Stability of DON and OTA during the breadmaking process and determination of process and performance criteria. *Food Control*, 40:234-42, 2014.
- Wan LYM, Turner PC, El-Nezami H: Individual and combined cytotoxic effects of *Fusarium* toxins (deoxynivalenol, nivalenol, zearalenone and fumonisins B1) on swine jejunal epithelial cells. *Food and Chemical Toxicology*, 57:276-283, 2013.
- Watson JT, Sparkman OD: *Introduction To Mass Spectrometry: Instrumentation, Applications, and Strategies for Data Interpretation*. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester 2007.
- Zain ME: Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society*, 15:129-144, 2011.
- Zhang L, Dou XW, Zhang C, Logrieco AF, Yang MH: A Review of Current Methods for Analysis of Mycotoxins in Herbal Medicines. *Toxins*, 10:65, 2018.
- Zhao Z, Na L, Yang L, Deng Y, Wanzg J, Song S, Linz S, Zhou Z, Hou J: Multi-mycotoxin analysis of animal feed and animal-derived food using LC–MS/MS system with timed

and highly selective reaction monitoring. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(24):7359-68, 2015.

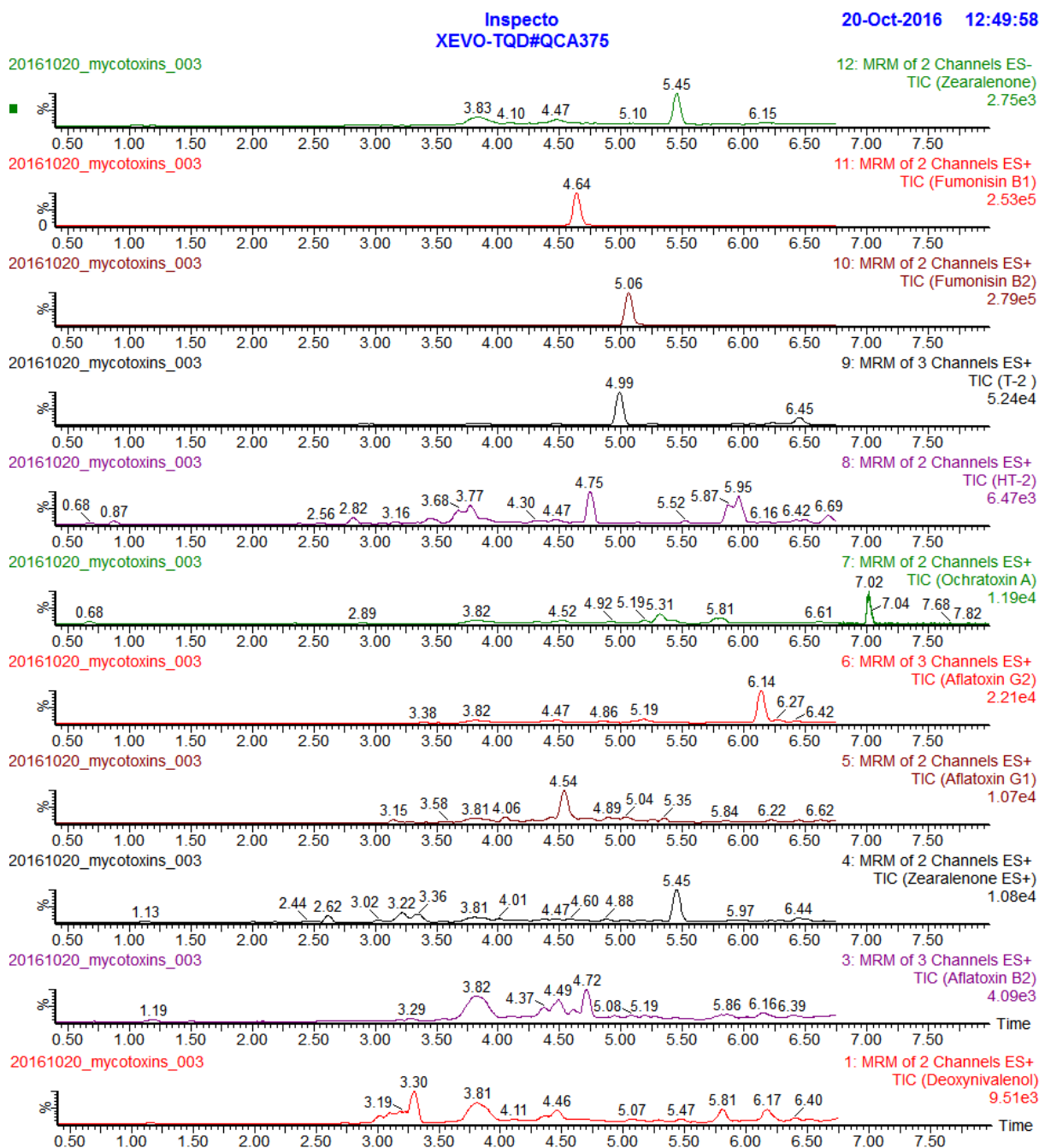
Zubarev RA, Makarov A: Orbitrap mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 85:5288–5296, 2013.

7. PRILOZI

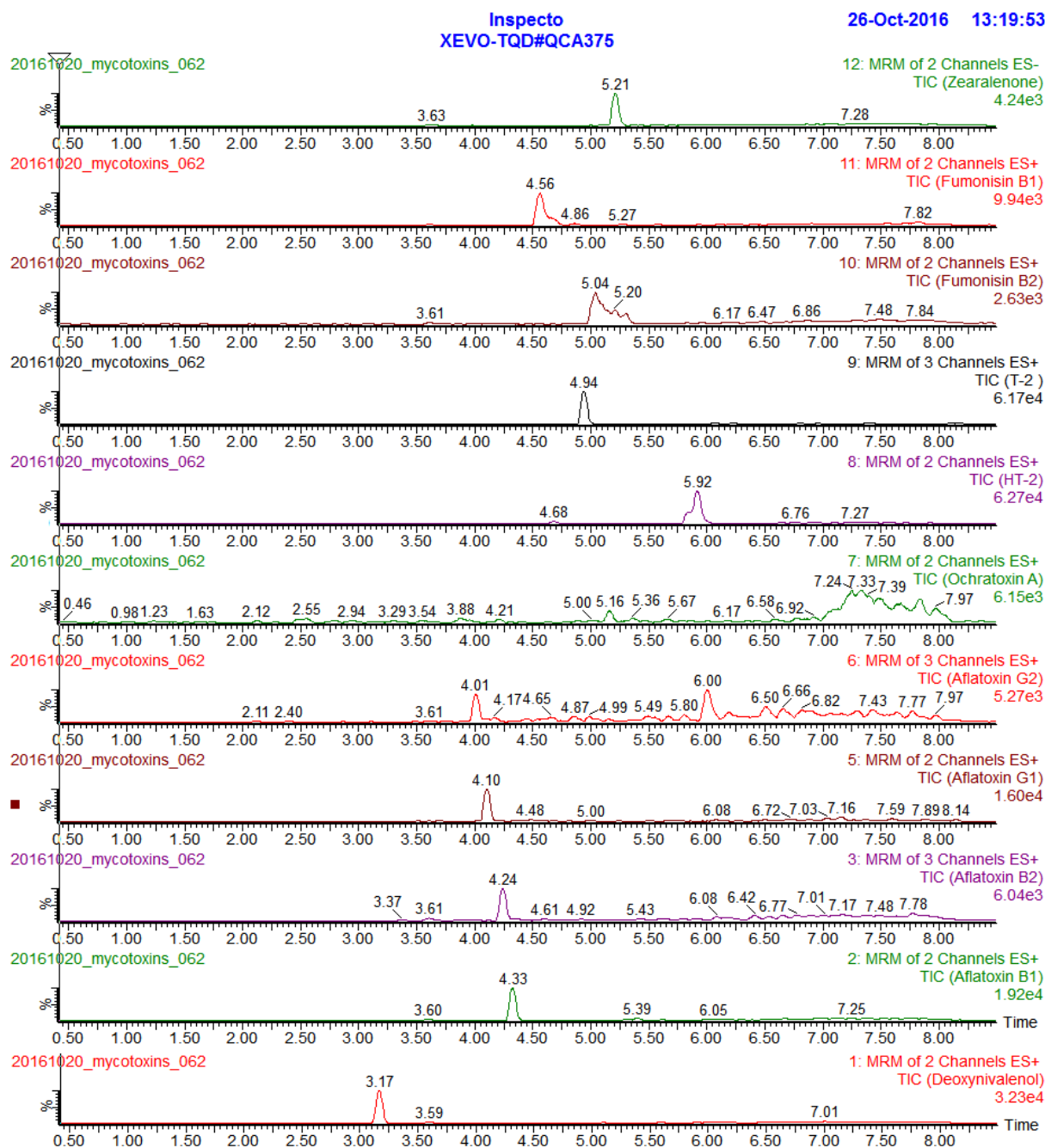
Prilog 1 UPLC-MS/MS kromatogrami 11 reguliranih mikotoksina dobiveni ispitivanjem obogaćenog *blank* uzorka kukuruza korištenjem gradijenta 4 (**Tablica 8**) i različitih UPLC kolona



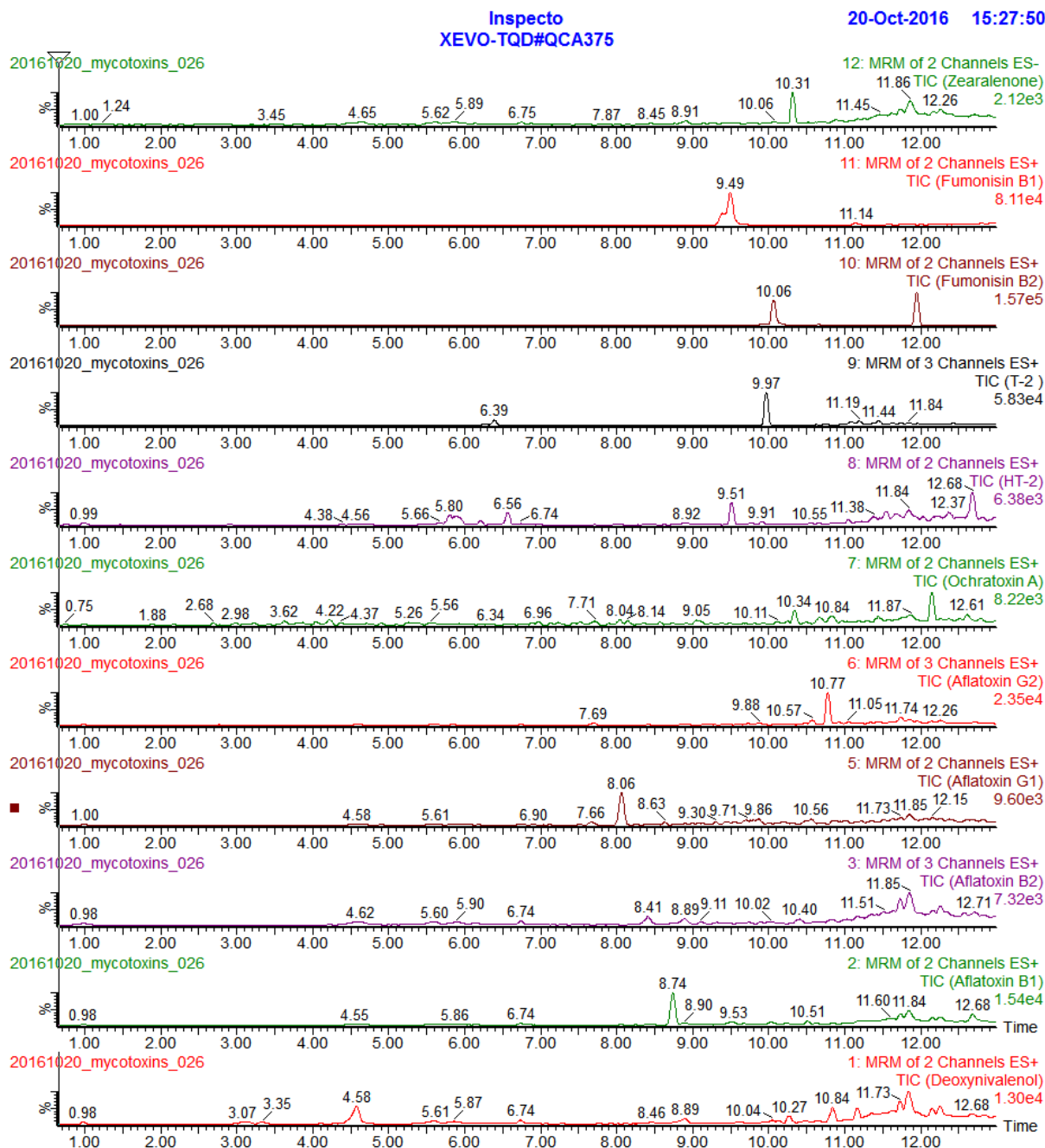
Slika 47 Acquity BEH C18 kolona (Waters, Irska). Vrijeme je prikazano duž x-osi, a intenzitet odziva duž y-osi.



Slika 48 Ultra Acqueous C18 kolona (Restek, SAD). Vrijeme je prikazano duž x-osi, a intenzitet odziva duž y-osi.

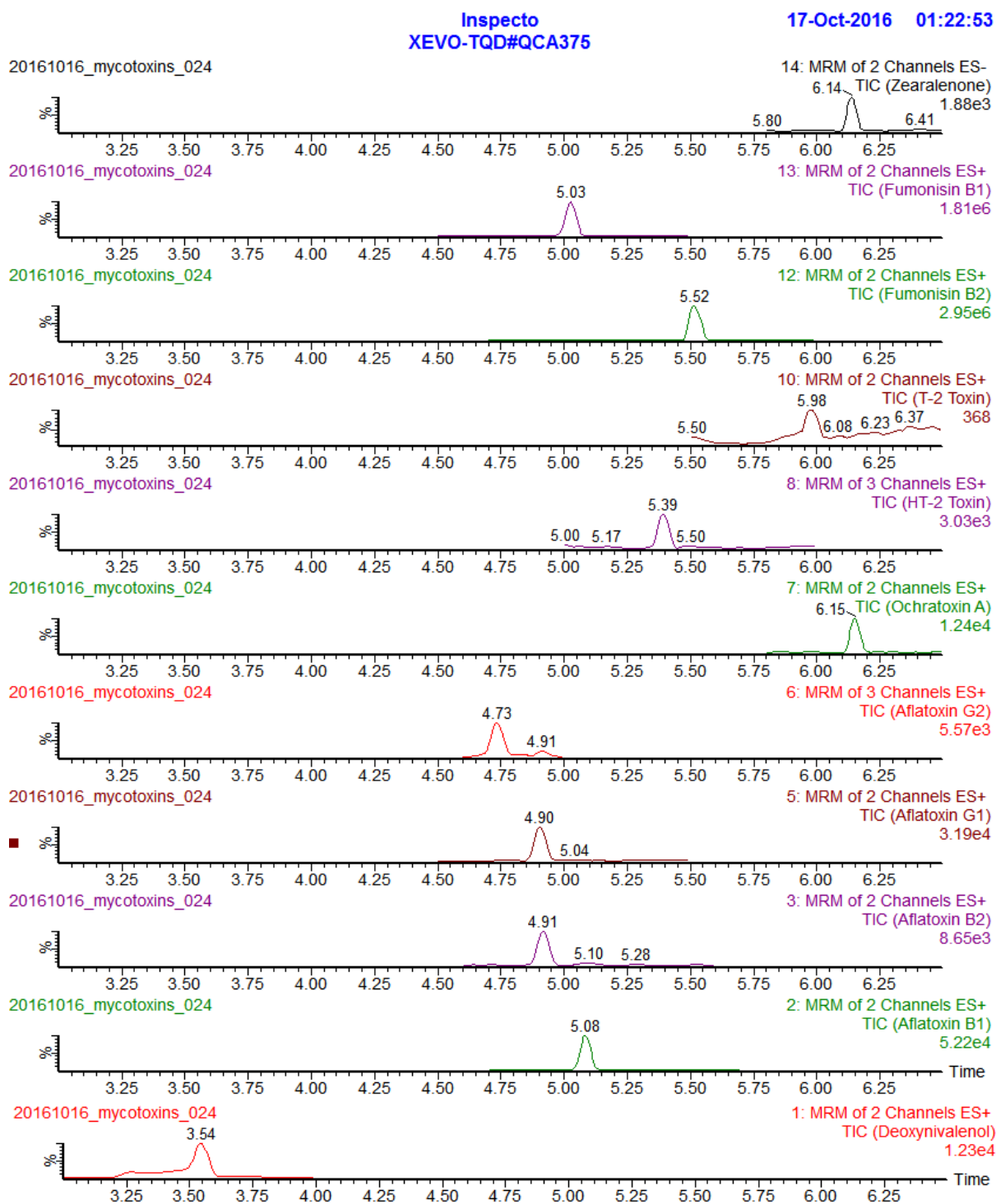


Slika 49 Acquity HSS T3 kolona (Waters, Irska). Vrijeme je prikazano duž x-osi, a intenzitet odziva duž y-osi.



Slika 50 Kinetex EVO C18 kolona (Phenomenex, SAD). Vrijeme je prikazano duž x-osi, a intenzitet odziva duž y-osi.

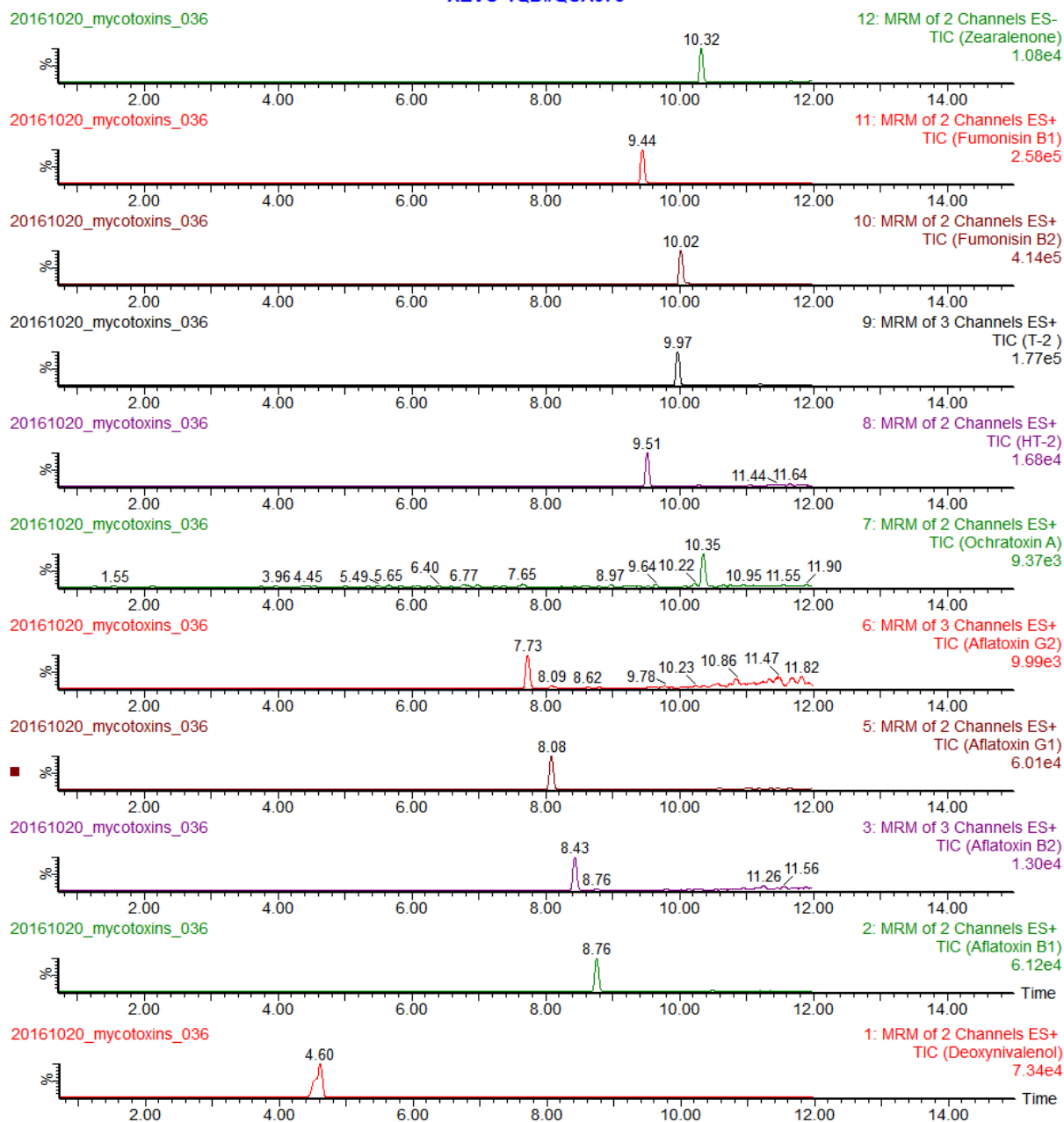
Prilog 2 UPLC-MS/MS kromatogrami 11 reguliranih mikotoksina dobiveni ispitivanjem obogaćenog *blank* uzorka kukuruza korištenjem Acquity HSS T3 kolone (Waters, Irska) i različitih gradijenata mobilnih faza prema **Tablici 8**



Slika 51 Gradijent 1 i mobilne 0,1% FA u H₂O (A)/0,1% FA u ACN (B). Vrijeme je prikazano duž x-osi, a intenzitet odziva duž y-osi.

Inspecto
XEVO-TQD#QCA375

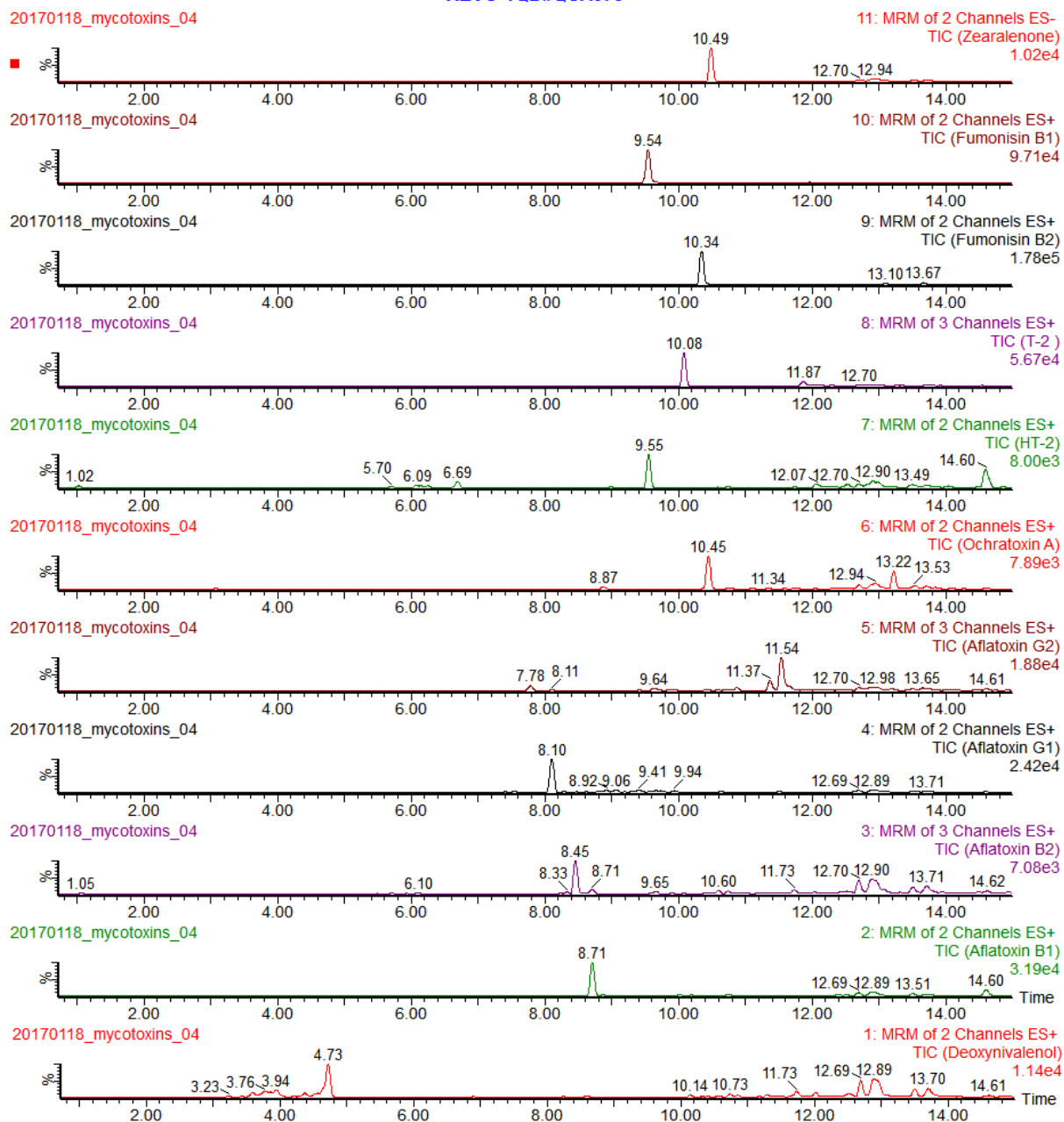
21-Oct-2016 08:42:28



Slika 52 Gradijent 2 i mobilne 2 mM AA+0,1% FA u H₂O (A)/2 mM AA+0,1% FA u MeOH
(B). Vrijeme je prikazano duž x-osi, a intenzitet odziva duž y-osi.

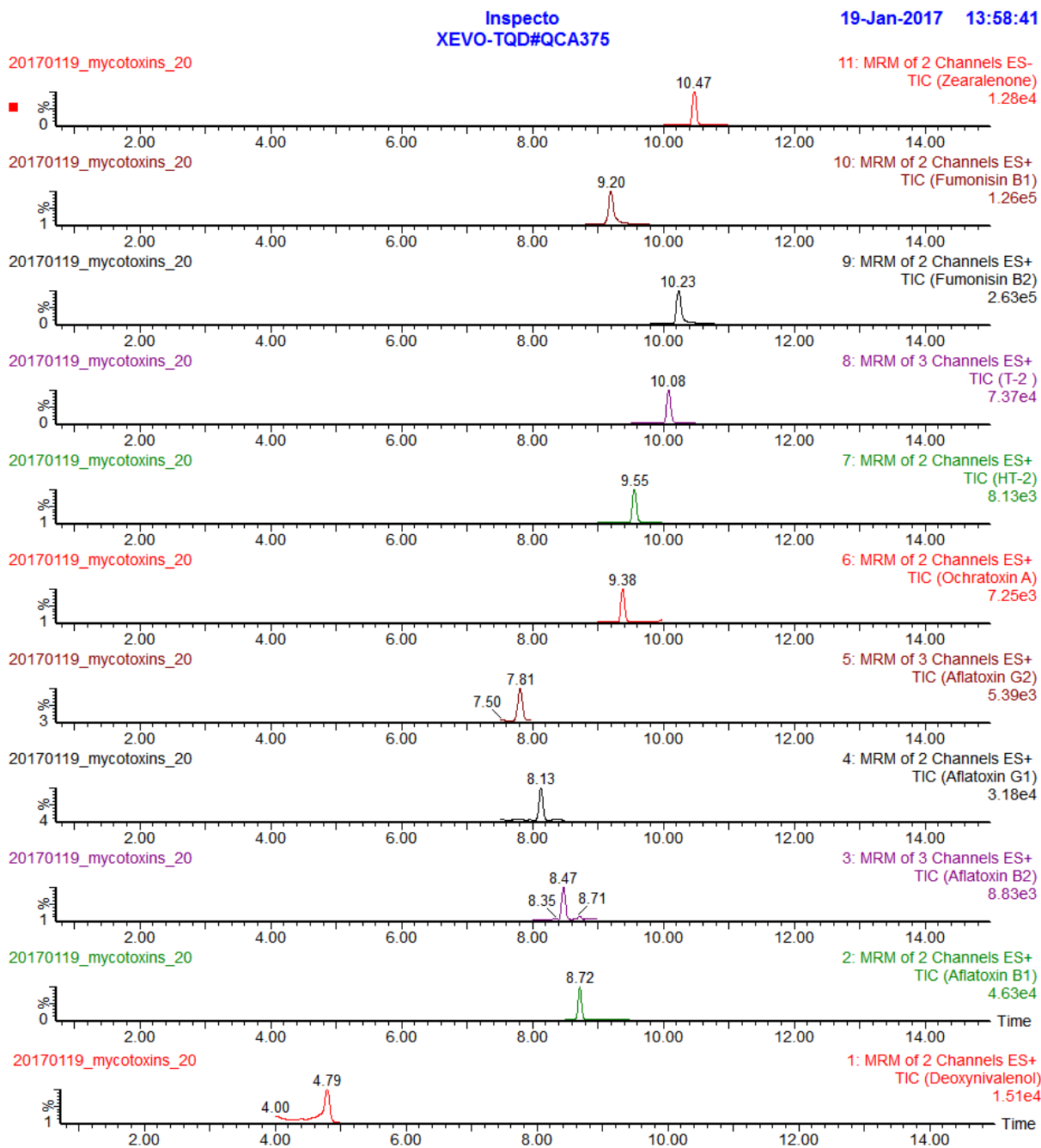
Inspecto
XEVO-TQD#QCA375

18-Jan-2017 11:11:38

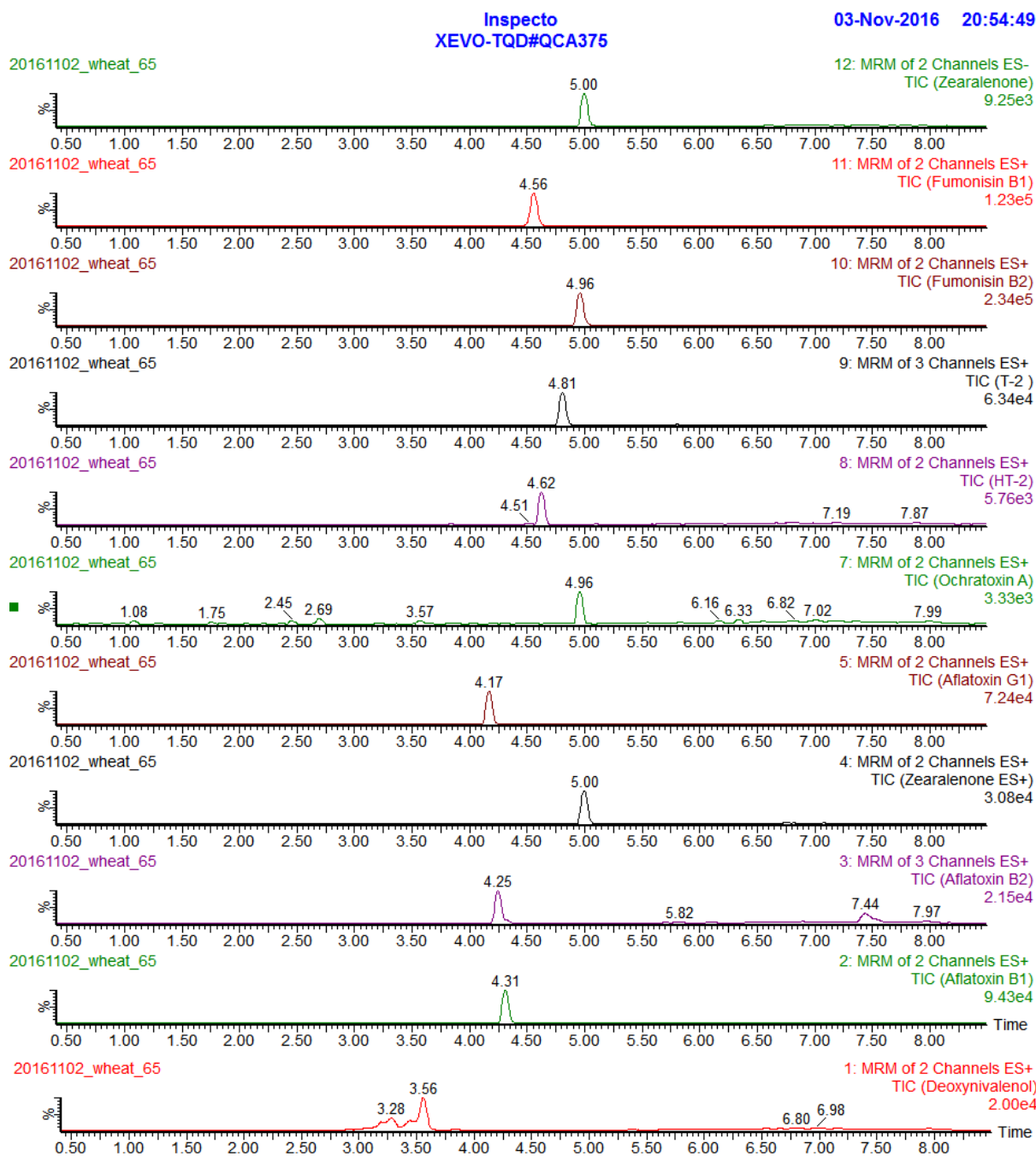


Slika 53 Gradijent 3 i mobilne 4 mM AF+0,1% FA u H₂O (A)/4 mM AF+0,1% FA u MeOH (B).

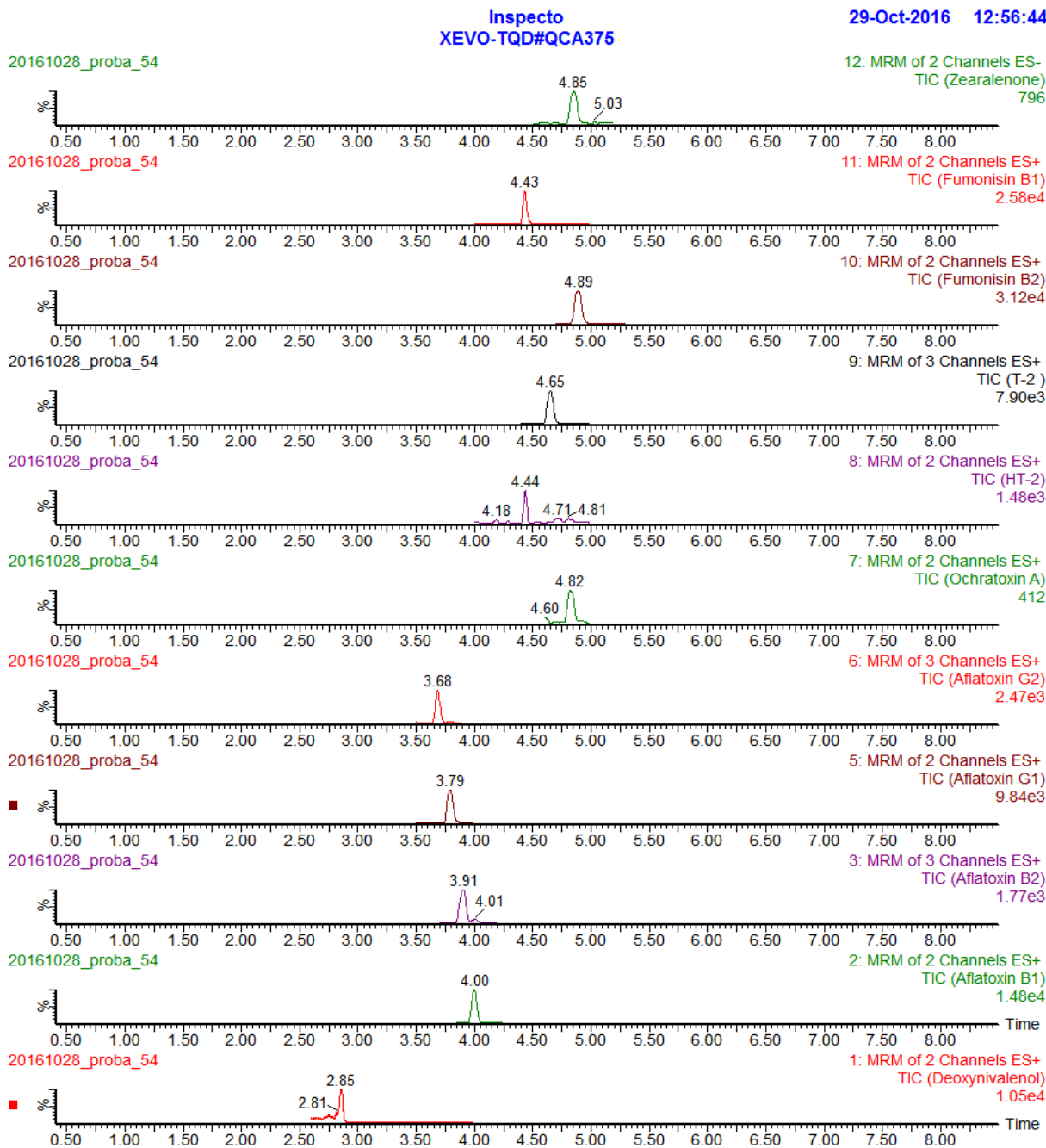
Vrijeme je prikazano duž x-osi, a intenzitet odziva duž y-osi.



Slika 54 Gradijent 3 i mobilne 5 mM AF u H₂O (A)/čisti MeOH (B). Vrijeme je prikazano duž x-osi, a intenzitet odziva duž y-osi.



Slika 55 Gradijent 4 i mobilne 5 mM AF u H₂O (A)/čisti MeOH (B). Vrijeme je prikazano duž x-osi, a intenzitet odziva duž y-osi.



Slika 56 Gradijent 4 i mobilne 5 mM AF u H₂O (A)/čisti MeOH (B) uz početni udio A 100%.

Vrijeme je prikazano duž x-osi, a intenzitet odziva duž y-osi.

Prilog 3 Postupak pripreme otopina standarda mikotoksina te vrijednosti nekih izvedbenih značajki razvijene metode

Tablica 20 Priprema osnovne otopine (SS, eng. *Standard Solution*) i radnih otopina standarda mikotoksina (Mix A - Mix F)* te ekvivalentne vrijednosti u uzorcima

Analit	Analitički standard µg/mL	Volumen standarda µL za pripremu 1000 µL SS-a	SS ng/mL	Mix A (razrj. 400x)		Mix B (razrj. 200x)		Mix C (razrj. 100x)		Mix D (razrj. 50x)		Mix E (razrj. 25x)		Mix F (razrj. 10x)	
				Konc. ng/mL	Ekv. µg/kg	Konc. ng/mL	Ekv. µg/kg	Konc. ng/mL	Ekv. µg/kg	Konc. ng/mL	Ekv. µg/kg	Konc. ng/mL	Ekv. µg/kg	Konc. ng/mL	Ekv. µg/kg
DON	100	50	5000	x	x	25	200	50	400	100	800	200	1600	500	4000
AFB1	2,0		50	0,125	1	0,25	2	0,5	4	1	8	2	16	x	x
AFB2	0,5	25	12,5	x	x	0,0625	0,5	0,125	1	0,25	2	0,5	4	1,25	10
AFG1	2,0		50	0,125	1	0,25	2	0,5	4	1	8	2	16	x	x
AFG2	0,5		12,5	x	x	0,0625	0,5	0,125	1	0,25	2	0,5	4	1,25	10
FB1	50	75	3750	x	x	18,75	150	37,5	300	75	600	150	1200	375	3000
FB2	50		3750	x	x	18,75	150	37,5	300	75	600	150	1200	375	3000
ZEA	100	7,5	750	x	x	3,75	30	7,5	60	15	120	30	240	75	600
T-2	100	2,5	250	x	x	1,25	10	2,5	20	5	40	10	80	25	200
HT-2	100	2,5	250	x	x	1,25	10	2,5	20	5	40	10	80	25	200
OTA	10	2,5	25	x	x	0,125	1	0,25	2	0,5	4	1	8	2,5	20
Volumen SS-a za pripremu 1000 µL radnih otopina standarda (Mix A - Mix F)				2,5		5		10		20		40		100	

*za AFB1 i AFG1 korišteni kalibranti Mix A - Mix E, za ostale mikotoksine Mix B - Mix F

Tablica 21 Vrijednosti izvedbenih značajki metode u otapalu i žitaricama

Spoj	Matrica	Jednadžba	Raspon koncentracija $\mu\text{g}/\text{kg}$	Linearnost R^2	LOD $\mu\text{g}/\text{kg}$	LOQ $\mu\text{g}/\text{kg}$
AFB1	Otapalo	$y=4233,3x-151,78$	1,0-16	0,9966	0,30	1,0
	Pšenica	$y=3255,2x-33,549$		0,9985		
	Kukuruz	$y=1243,3x-19,301$		0,9993		
	Ječam	$y=3405,3x-97,552$		0,9995		
AFB2	Otapalo	$y=3330,9x-92,654$	0,5-10	0,9995	0,15	0,5
	Pšenica	$y=2294,8x-0,6601$		0,9998		
	Kukuruz	$y=821,52x-31,61$		0,9995		
	Ječam	$y=2520,2x-32,659$		0,9998		
AFG1	Otapalo	$y=3933,1x-31,126$	1,0-16	0,9976	0,30	1,0
	Pšenica	$y=2902x+27,304$		0,9981		
	Kukuruz	$y=976,96x-14,994$		1,0000		
	Ječam	$y=1502,5x-145,4$		0,9989		
AFG2	Otapalo	$y=3330,9x-92,654$	0,5-10	0,9995	0,15	0,5
	Pšenica	$y=3502,6x-9,2733$		0,9997		
	Kukuruz	$y=1075,8-21,436$		0,9999		
	Ječam	$y=2394,8x-0,6601$		0,9998		
DON	Otapalo	$y=14,19x+40,633$	200-4000	0,9999	61	200
	Pšenica	$y=8,4400x+3,6843$		0,9992		
	Kukuruz	$y=8,7478x+11,739$		0,9997		
	Ječam	$y=8,3797x-2,8576$		0,9999		
FB1	Otapalo	$y=198,06x-3113$	150-3000	0,9966	46	150
	Pšenica	$y=230,94x-866,12$		0,9991		
	Kukuruz	$y=103,05x-167,52$		1,0000		
	Ječam	$y=237,94x-866,12$		0,9999		
FB2	Otapalo	$y=761,01x-16822$	150-3000	0,9945	46	150
	Pšenica	$y=493,7x-4122,5$		0,9966		
	Kukuruz	$y=209,36x-598,27$		0,9999		
	Ječam	$y=578,72x-7184,9$		0,9985		
ZEA	Otapalo	$y=91,077x+3,8326$	30-600	0,9997	9	30
	Pšenica	$y=70,491x+72,751$		0,9992		
	Kukuruz	$y=26,71x+35,167$		0,9993		
	Ječam	$y=70,654x-22,304$		0,9999		
T-2	Otapalo	$y=696,5x-134,59$	10-200	0,9996	3	10
	Pšenica	$y=757,94x+36,431$		0,9996		
	Kukuruz	$y=267,43x-69,004$		1,0000		
	Ječam	$y=760,5x+36,722$		0,9999		
HT2	Otapalo	$y=98,501x-56,058$	10-200	0,9975	3	10
	Pšenica	$y=97,296x+87,819$		0,9997		
	Kukuruz	$y=39,128x+12,603$		0,9996		
	Ječam	$y=115,99x+58,863$		0,9999		
OTA	Otapalo	$y=1049,8x-52,161$	1,0-20	0,9979	0,30	1,0
	Pšenica	$y=853,76x-68,076$		0,9992		
	Kukuruz	$y=375,68-42,071$		0,9991		
	Ječam	$y=889,28x-14,52$		0,9964		

Prilog 4 Izračunate vrijednosti relativnih standardnih nesigurnosti te sastavljena i proširena mjerna nesigurnost za pojedine spojeve i matrice

Tablica 22 Sastavnice mjerne nesigurnosti za AFB1

Redni broj	Izvor mjerne nesigurnosti	Relativna standardna nesigurnost za AFB1					
		Otapalo	Kukuruz	Otapalo	Pšenica	Otapalo	Ječam
1	Čistoća standarda	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004
2	Volumen klipne pipete 1	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005
3	Volumen klipne pipete 2	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005
4	Volumen klipne pipete 3	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003
5	Volumen menzure	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003
6	Odvaga uzorka	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002
7	Kalibracijski pravac	0,002	0,008	0,02	0,009	0,02	0,008
8	Ponovljivost mjerenja	0,02	0,01	0,01	0,02	0,02	0,01
9	Ponovljivost pripreme uzorka	0,01	0,02	0,02	0,03	0,01	0,02
10	Iskorištenje	0,01	0,01	0,06	0,01	0,01	0,01
Sastavljena mjerna nesigurnost u_c $\mu\text{g}/\text{kg}$		0,07	0,04	0,07	0,02	0,03	0,03
Proširena mjerna nesigurnost U $\mu\text{g}/\text{kg}$		0,14	0,08	0,14	0,04	0,06	0,06

Tablica 23 Sastavnice mjerne nesigurnosti za AFB2

Redni broj	Izvor mjerne nesigurnosti	Relativna standardna nesigurnost za AFB2					
		Otapalo	Kukuruz	Otapalo	Pšenica	Otapalo	Ječam
1	Čistoća standarda	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006
2	Volumen klipne pipete 1	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005
3	Volumen klipne pipete 2	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005
4	Volumen klipne pipete 3	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003
5	Volumen menzure	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003
6	Odvaga uzorka	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002
7	Kalibracijski pravac	0,02	0,002	0,02	0,02	0,02	0,003
8	Ponovljivost mjerenja	0,020	0,03	0,020	0,02	0,010	0,02
9	Ponovljivost pripreme uzorka	0,05	0,04	0,02	0,02	0,03	0,01
10	Iskorištenje	0,03	0,04	0,03	0,04	0,05	0,01
Sastavljena mjerna nesigurnost u_c $\mu\text{g}/\text{kg}$		0,09	0,06	0,05	0,05	0,06	0,02
Proširena mjerna nesigurnost U $\mu\text{g}/\text{kg}$		0,12	0,13	0,10	0,10	0,12	0,04

Tablica 24 Sastavnice mjerne nesigurnosti za AFG1

Redni broj	Izvor mjerne nesigurnosti	Relativna standardna nesigurnost za AFG1					
		Otapalo	Kukuruz	Otapalo	Pšenica	Otapalo	Ječam
1	Čistoća standarda	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004
2	Volumen klipne pipete 1	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005
3	Volumen klipne pipete 2	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005
4	Volumen klipne pipete 3	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003
5	Volumen menzure	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003
6	Odvaga uzorka	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002
7	Kalibracijski pravac	0,009	0,005	0,009	0,005	0,009	0,005
8	Ponovljivost mjerenja	0,020	0,03	0,020	0,02	0,020	0,02
9	Ponovljivost pripreme uzorka	0,02	0,03	0,004	0,008	0,08	0,09
10	Iskorištenje	0,06	0,01	0,03	0,02	0,06	0,003
Sastavljena mjerna nesigurnost u_c $\mu\text{g}/\text{kg}$		0,09	0,06	0,05	0,05	0,06	0,02
Proširena mjerna nesigurnost U $\mu\text{g}/\text{kg}$		0,18	0,12	0,10	0,10	0,12	0,04

Tablica 25 Sastavnice mjerne nesigurnosti za AFG2

Redni broj	Izvor mjerne nesigurnosti	Relativna standardna nesigurnost za AFG2					
		Otapalo	Kukuruz	Otapalo	Pšenica	Otapalo	Ječam
1	Čistoća standarda	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006
2	Volumen klipne pipete 1	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005
3	Volumen klipne pipete 2	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005
4	Volumen klipne pipete 3	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003
5	Volumen menzure	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003
6	Odvaga uzorka	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002
7	Kalibracijski pravac	0,009	0,004	0,002	0,005	0,009	0,005
8	Ponovljivost mjerenja	0,020	0,02	0,010	0,01	0,010	0,01
9	Ponovljivost pripreme uzorka	0,01	0,03	0,01	0,01	0,06	0,07
10	Iskorištenje	0,06	0,01	0,02	0,02	0,09	0,04
Sastavljena mjerna nesigurnost u_c $\mu\text{g}/\text{kg}$		0,03	0,02	0,01	0,02	0,08	0,04
Proširena mjerna nesigurnost U $\mu\text{g}/\text{kg}$		0,06	0,04	0,02	0,04	0,16	0,08

Tablica 26 Sastavnice mjerne nesigurnosti za DON

Redni broj	Izvor mjerne nesigurnosti	Relativna standardna nesigurnost za DON					
		Otapalo	Kukuruz	Otapalo	Pšenica	Otapalo	Ječam
1	Čistoća standarda	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002
2	Volumen klipne pipete 1	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005
3	Volumen klipne pipete 2	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005
4	Volumen klipne pipete 3	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003
5	Volumen menzure	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003
6	Odvaga uzorka	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002
7	Kalibracijski pravac	0,005	0,008	0,005	0,01	0,005	0,004
8	Ponovljivost mjerenja	0,010	0,02	0,010	0,006	0,010	0,01
9	Ponovljivost pripreme uzorka	0,02	0,02	0,02	0,02	0,01	0,02
10	Iskorištenje	0,02	0,04	0,07	0,03	0,09	0,04
Sastavljena mjerna nesigurnost u_c $\mu\text{g}/\text{kg}$		6,1	9,9	14,6	7,2	18,0	8,9
Proširena mjerna nesigurnost U $\mu\text{g}/\text{kg}$		12,2	19,8	29,1	14,4	36,0	17,9

Tablica 27 Sastavnice mjerne nesigurnosti za FB1

Redni broj	Izvor mjerne nesigurnosti	Relativna standardna nesigurnost za FB1					
		Otapalo	Kukuruz	Otapalo	Pšenica	Otapalo	Ječam
1	Čistoća standarda	0,007	0,007	0,007	0,007	0,007	0,007
2	Volumen klipne pipete 1	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005
3	Volumen klipne pipete 2	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005
4	Volumen klipne pipete 3	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003
5	Volumen menzure	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003
6	Odvaga uzorka	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002
7	Kalibracijski pravac	0,05	0,003	0,05	0,01	0,05	0,005
8	Ponovljivost mjerenja	0,009	0,004	0,004	0,004	0,006	0,007
9	Ponovljivost pripreme uzorka	0,01	0,01	0,01	0,01	0,03	0,03
10	Iskorištenje	0,2	0,01	0,2	0,03	0,1	0,03
Sastavljena mjerna nesigurnost u_c $\mu\text{g}/\text{kg}$		33,9	2,5	25,2	5,1	18,7	1,5
Proširena mjerna nesigurnost U $\mu\text{g}/\text{kg}$		67,8	5,0	50,4	10,2	37,4	3,0

Tablica 28 Sastavnice mjerne nesigurnosti za FB2

Redni broj	Izvor mjerne nesigurnosti	Relativna standardna nesigurnost za FB2					
		Otapalo	Kukuruz	Otapalo	Pšenica	Otapalo	Ječam
1	Čistoća standarda	0,007	0,007	0,007	0,007	0,007	0,007
2	Volumen klipne pipete 1	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005
3	Volumen klipne pipete 2	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005
4	Volumen klipne pipete 3	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003
5	Volumen menzure	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003
6	Odvaga uzorka	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002
7	Kalibracijski pravac	0,06	0,005	0,06	0,02	0,06	0,02
8	Ponovljivost mjerenja	0,003	0,004	0,003	0,007	0,04	0,007
9	Ponovljivost pripreme uzorka	0,01	0,004	0,01	0,01	0,02	0,01
10	Iskorištenje	0,1	0,01	0,1	0,001	0,10	0,03
Sastavljena mjerna nesigurnost u_c $\mu\text{g}/\text{kg}$		18,9	2,3	20,2	3,8	17,6	5,9
Proširena mjerna nesigurnost U $\mu\text{g}/\text{kg}$		37,8	4,6	40,4	7,6	35,2	11,8

Tablica 29 Sastavnice mjerne nesigurnosti za ZEA

Redni broj	Izvor mjerne nesigurnosti	Relativna standardna nesigurnost za ZEA					
		Otapalo	Kukuruz	Otapalo	Pšenica	Otapalo	Ječam
1	Čistoća standarda	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002
2	Volumen klipne pipete 1	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005
3	Volumen klipne pipete 2	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005
4	Volumen klipne pipete 3	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003
5	Volumen menzure	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003
6	Odvaga uzorka	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002
7	Kalibracijski pravac	0,007	0,01	0,007	0,01	0,007	0,004
8	Ponovljivost mjerenja	0,007	0,008	0,007	0,008	0,004	0,005
9	Ponovljivost pripreme uzorka	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,04
10	R	0,07	0,04	0,07	0,04	0,03	0,03
Sastavljena mjerna nesigurnost u_c $\mu\text{g/kg}$		2,1	1,2	1,9	0,4	1,1	1,5
Proširena mjerna nesigurnost U $\mu\text{g/kg}$		4,2	2,4	3,8	0,8	2,2	3,0

Tablica 30 Sastavnice mjerne nesigurnosti za T-2

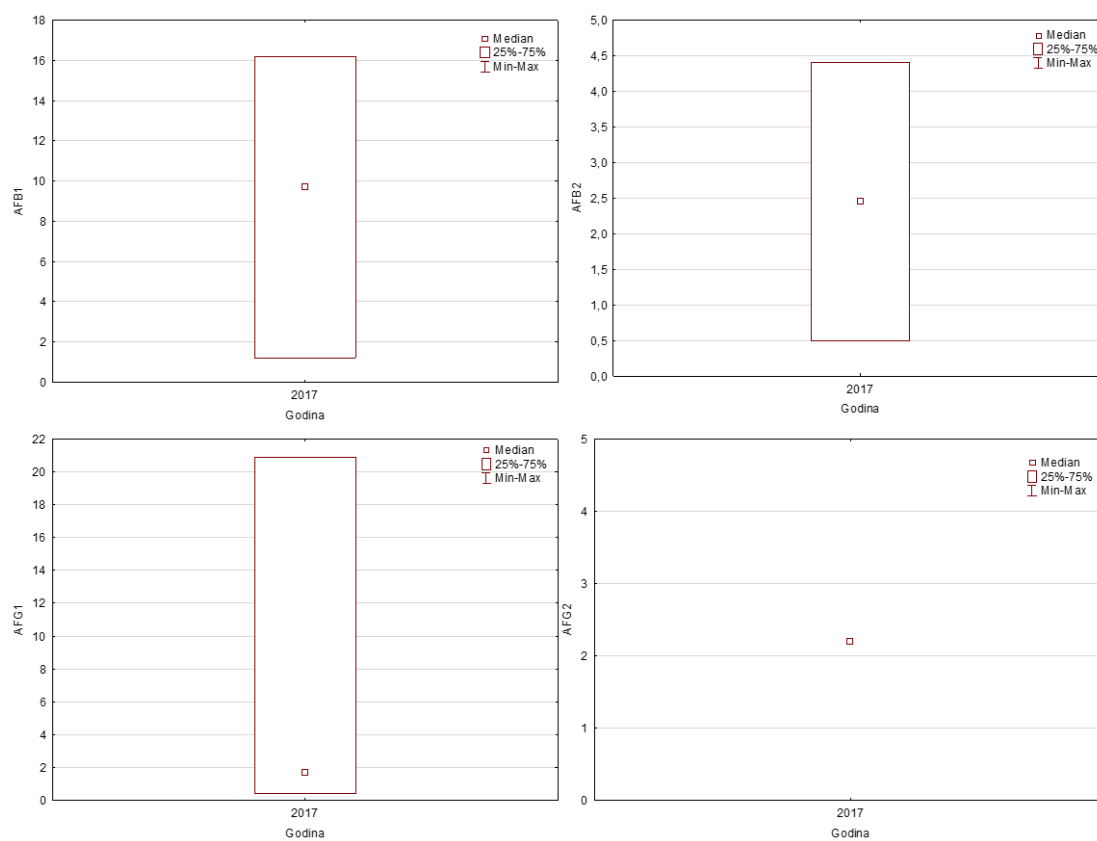
Redni broj	Izvor mjerne nesigurnosti	Relativna standardna nesigurnost za T-2					
		Otapalo	Kukuruz	Otapalo	Pšenica	Otapalo	Ječam
1	Čistoća standarda	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002
2	Volumen klipne pipete 1	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005
3	Volumen klipne pipete 2	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005
4	Volumen klipne pipete 3	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003
5	Volumen menzure	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003
6	Odvaga uzorka	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002
7	Kalibracijski pravac	0,008	0,03	0,008	0,005	0,008	0,005
8	Ponovljivost mjerenja	0,009	0,01	0,010	0,01	0,010	0,01
9	Ponovljivost pripreme uzorka	0,03	0,01	0,02	0,01	0,02	0,01
10	Iskorištenje	0,02	0,005	0,01	0,03	0,01	0,03
Sastavljena mjerna nesigurnost u_c $\mu\text{g/kg}$		0,4	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4
Proširena mjerna nesigurnost U $\mu\text{g/kg}$		0,8	0,7	0,6	0,6	0,6	0,8

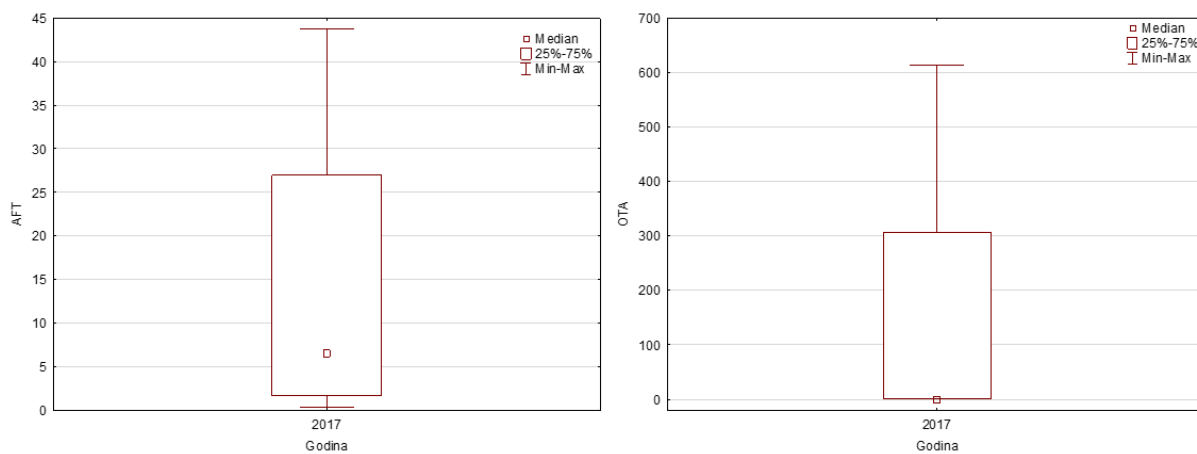
Tablica 31 Sastavnice mjerne nesigurnosti za HT-2

Redni broj	Izvor mjerne nesigurnosti	Relativna standardna nesigurnost za HT-2					
		Otapalo	Kukuruz	Otapalo	Pšenica	Otapalo	Ječam
1	Čistoća standarda	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009
2	Volumen klipne pipete 1	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005
3	Volumen klipne pipete 2	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005
4	Volumen klipne pipete 3	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003
5	Volumen menzure	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003
6	Odvaga uzorka	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002
7	Kalibracijski pravac	0,02	0,007	0,02	0,007	0,02	0,004
8	Ponovljivost mjerenja	0,02	0,01	0,02	0,01	0,01	0,02
9	Ponovljivost pripreme uzorka	0,05	0,03	0,04	0,02	0,02	0,06
10	Iskorištenje	0,004	0,02	0,02	0,02	0,001	0,03
Sastavljena mjerna nesigurnost u_c $\mu\text{g/kg}$		0,7	0,4	0,5	0,3	0,3	0,7
Proširena mjerna nesigurnost U $\mu\text{g/kg}$		1,4	0,8	1,0	0,6	0,6	1,4

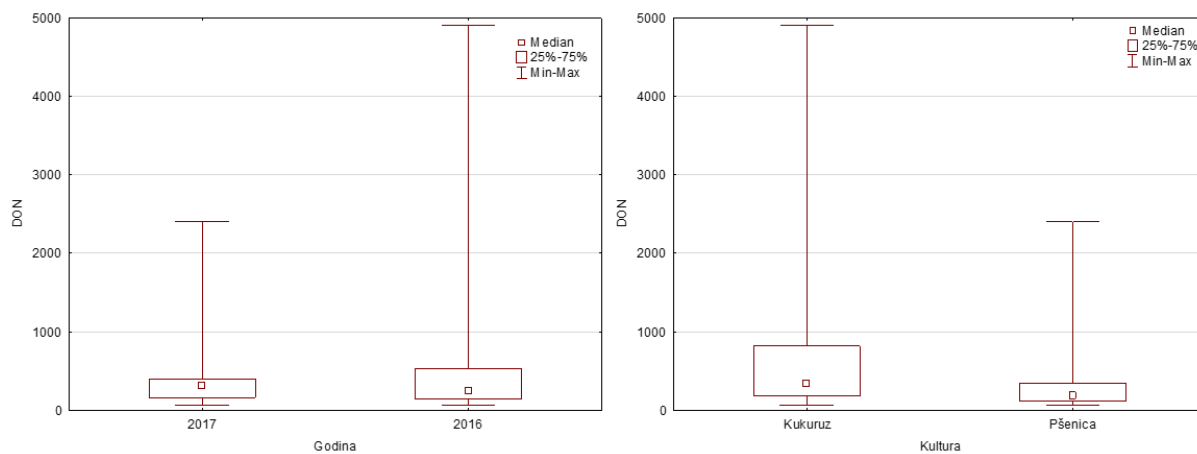
Tablica 32 Sastavnice mjerne nesigurnosti za OTA

Redni broj	Izvor mjerne nesigurnosti	Relativna standardna nesigurnost za OTA					
		Otapalo	Kukuruz	Otapalo	Pšenica	Otapalo	Ječam
1	Čistoća standarda	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005
2	Volumen klipne pipete 1	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005
3	Volumen klipne pipete 2	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005
4	Volumen klipne pipete 3	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003
5	Volumen menzure	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003
6	Odvaga uzorka	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002
7	Kalibracijski pravac	0,03	0,01	0,03	0,03	0,03	0,02
8	Ponovljivost mjerenja	0,03	0,03	0,02	0,02	0,02	0,02
9	Ponovljivost pripreme uzorka	0,08	0,06	0,07	0,03	0,07	0,03
10	Iskorištenje	0,1	0,04	0,01	0,02	0,01	0,2
Sastavljena mjerna nesigurnost u_c $\mu\text{g/kg}$		0,14	0,08	0,07	0,05	0,18	0,17
Proširena mjerna nesigurnost U $\mu\text{g/kg}$		0,28	0,16	0,014	0,010	0,36	0,34

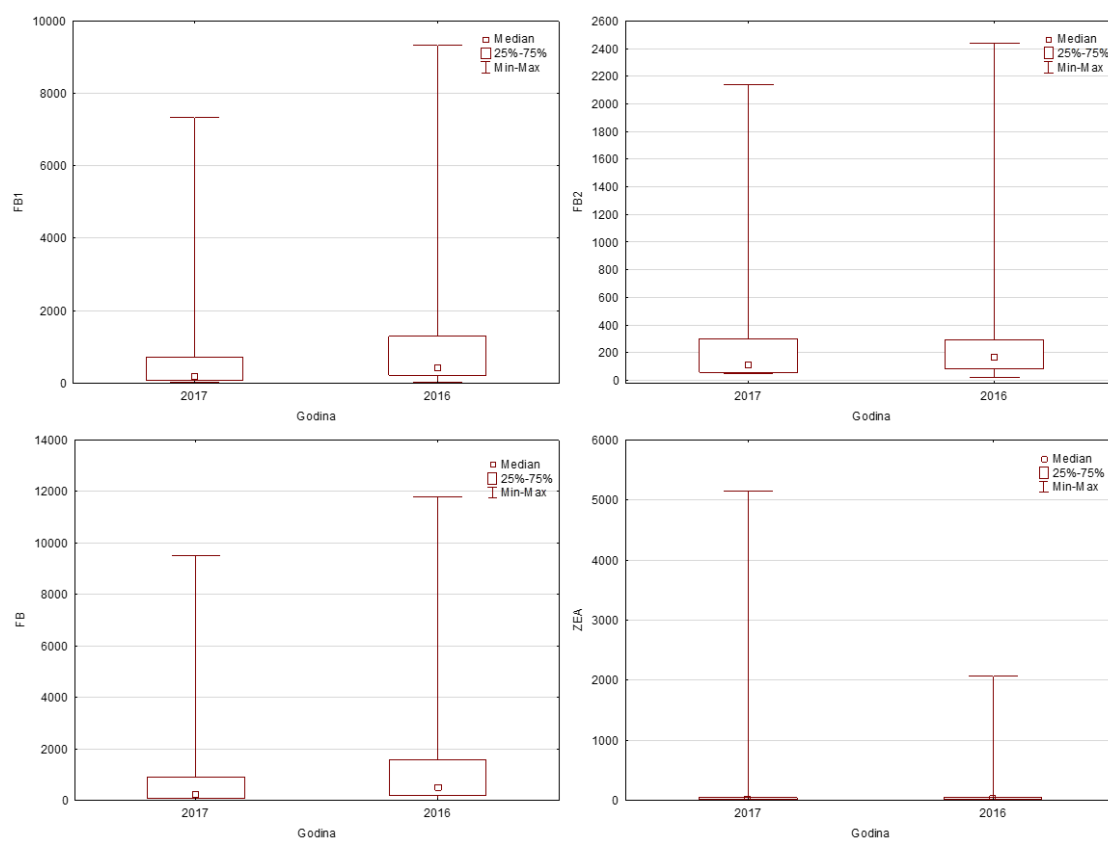
Prilog 5 Dijagrami pojavnosti analiziranih mikotoksina u žitaricama žetve 2016. i 2017.**Slika 57** Pojavnost AFB1, AFB2, AFG1 i AFG2 u žitaricama žetve 2017.



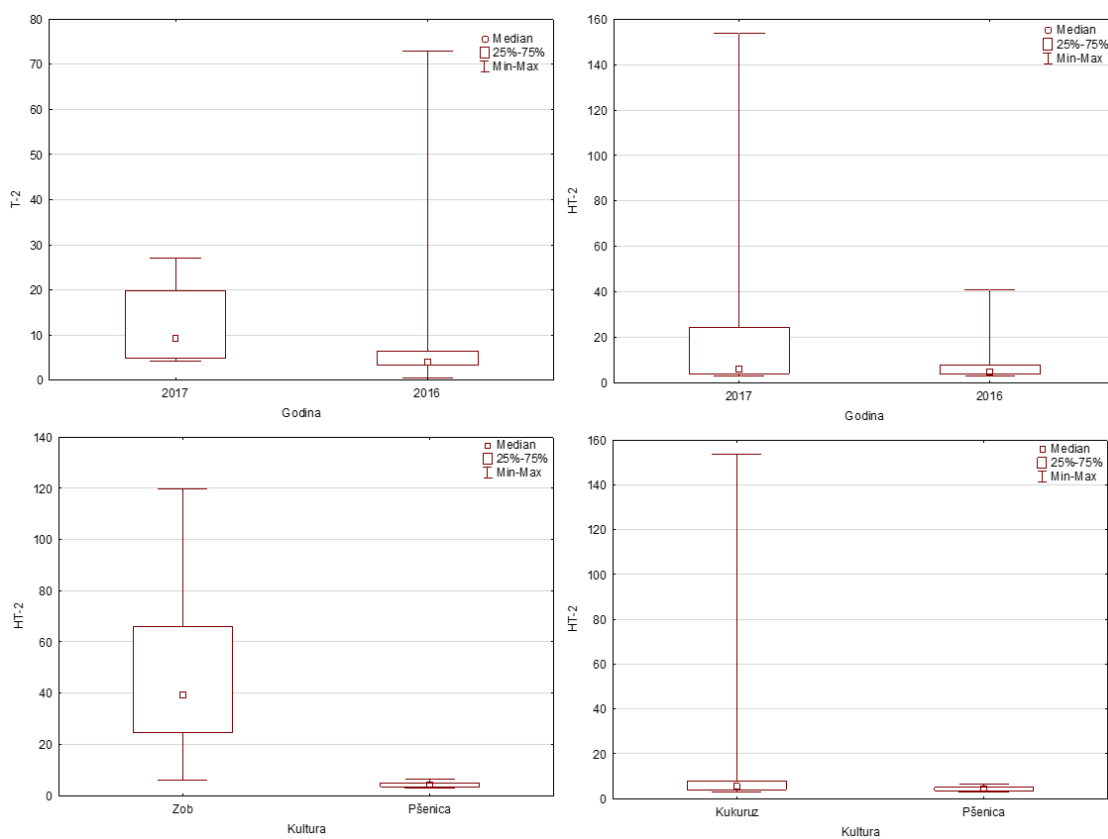
Slika 58 Pojavnost AFT-a i OTA-e u žitaricama žetve 2017.



Slika 59 Pojavnost DON-a u žitaricama žetve 2016. i 2017. te u kukuruzu i pšenici

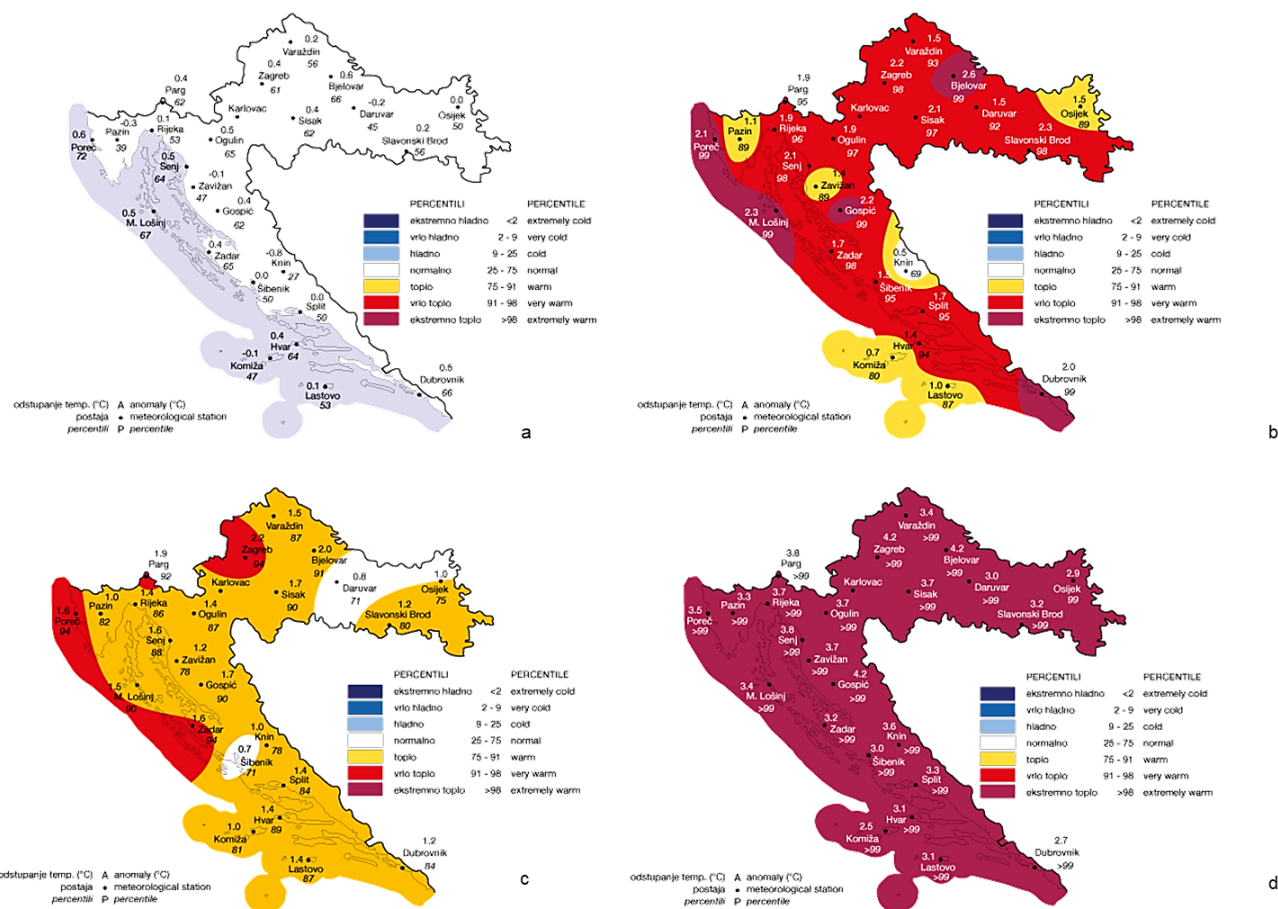


Slika 60 Pojavnost FB1, FB2, FUM-a i ZEA-e u žitaricama žetve 2016. i 2017.

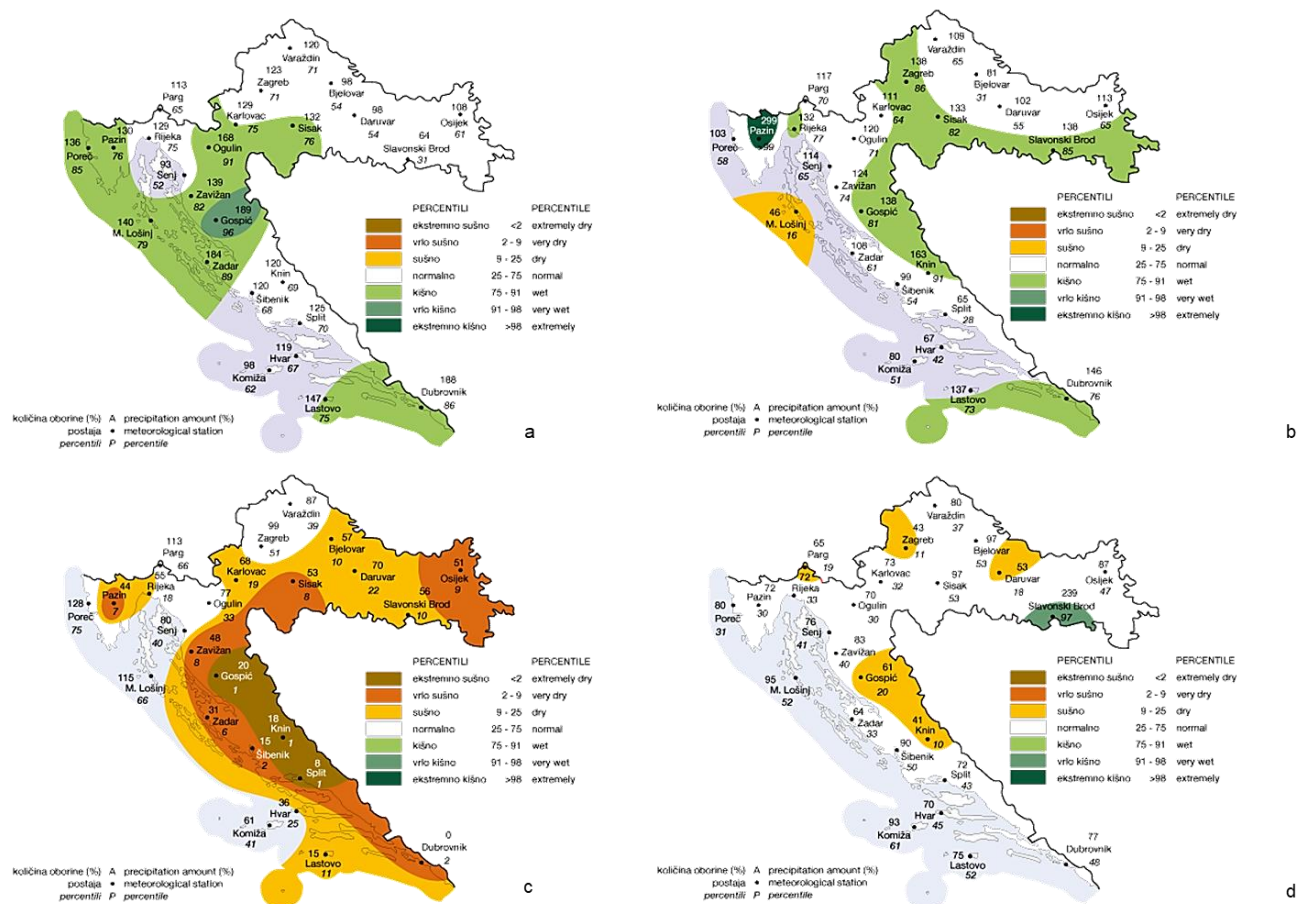


Slika 61 Pojavnost T-2 i HT-2 u žitaricama žetve 2016. i 2017., HT-2 u zobi i pšenici te HT-2 u kukuruzu i pšenici

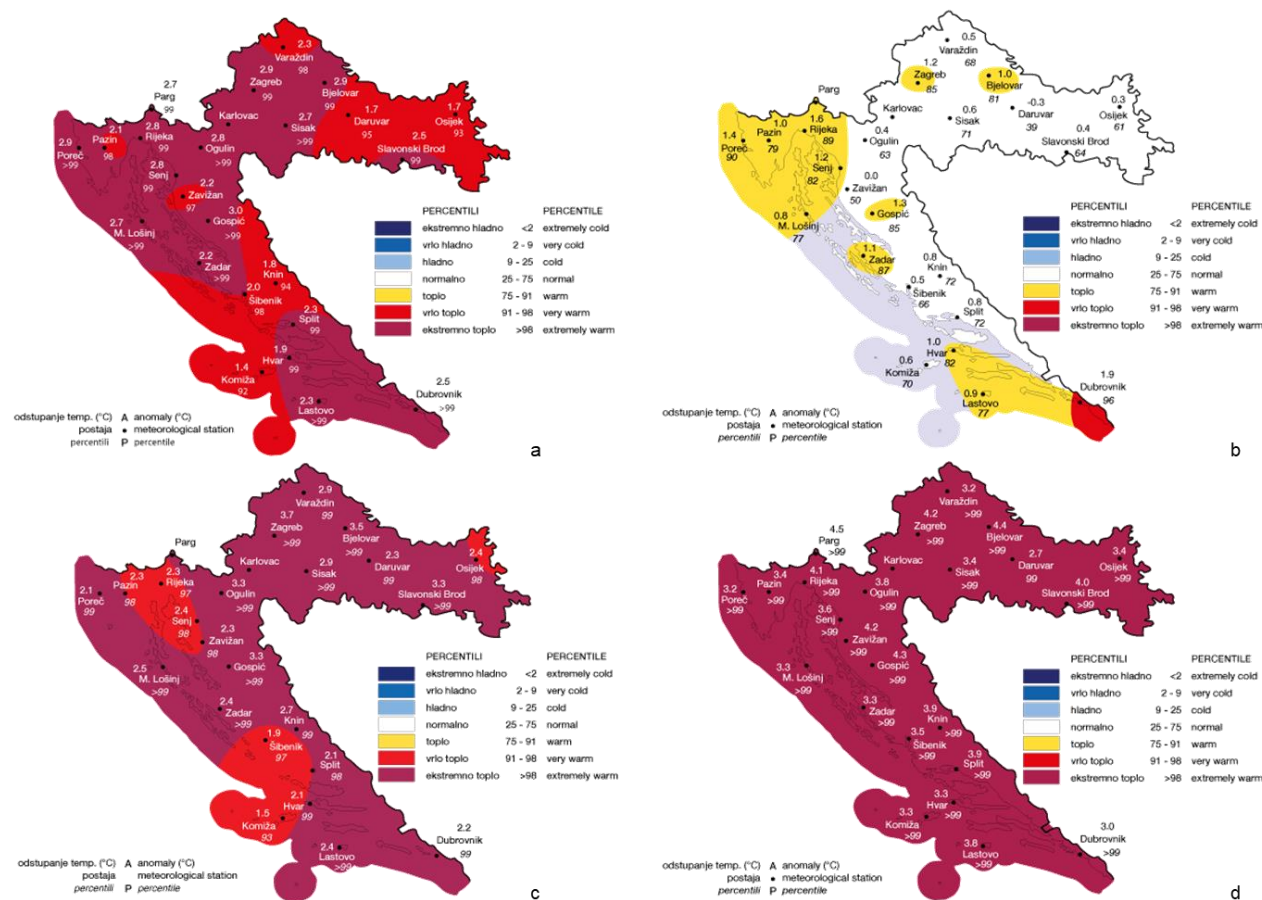
Prilog 6 Temperaturne i kišne mape Hrvatskog hidrometeorološkog zavoda za relevantna vremenska razdoblja 2016. i 2017. godine



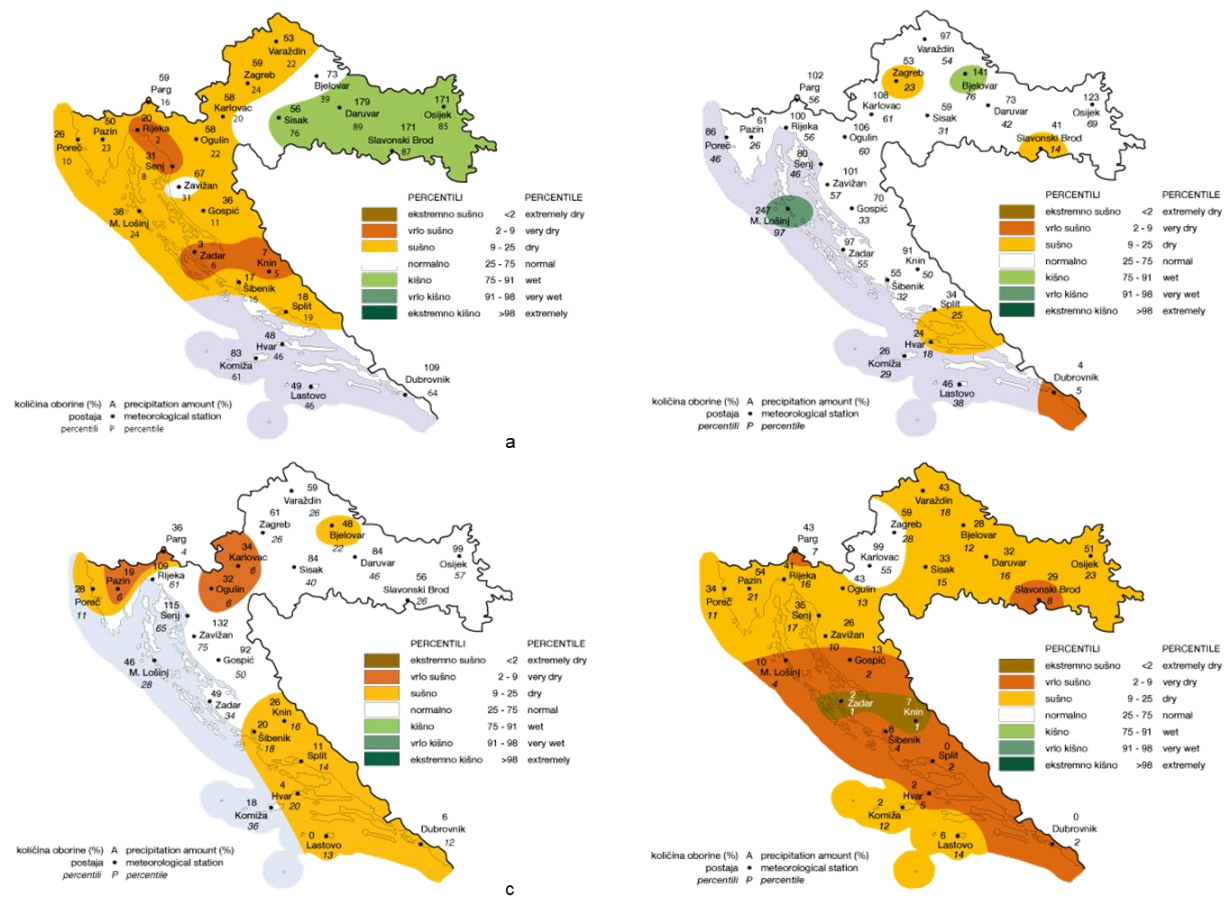
Slika 62 Srednje mjesečne temperature zraka za svibanj i lipanj 2016. (a i b) te svibanj i lipanj 2017. (c i d) (DHMZ, 2019.)



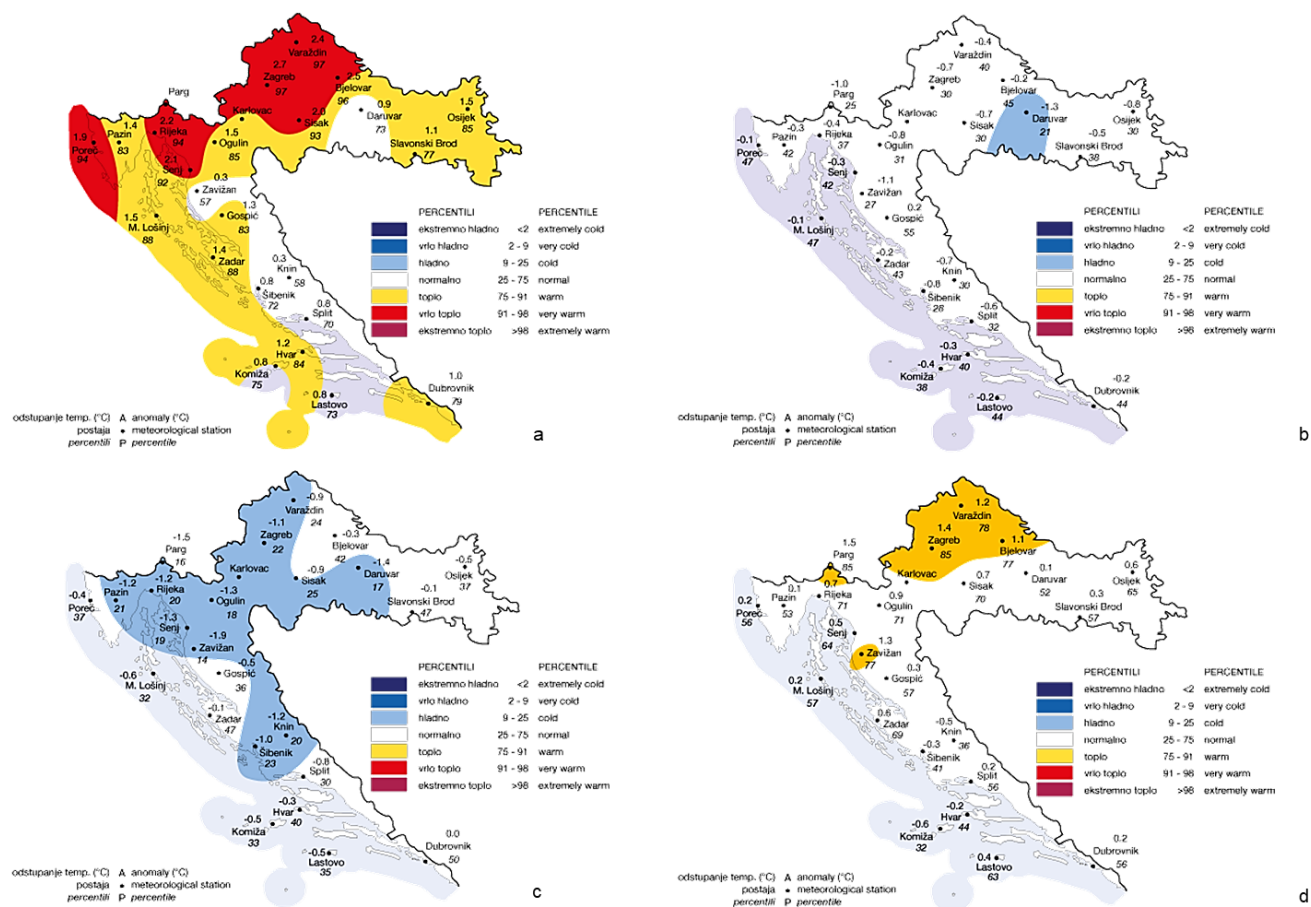
Slika 63 Količine oborine za svibanj i lipanj 2016. (a i b) te svibanj i lipanj 2017. (c i d) (DHMZ, 2019.)



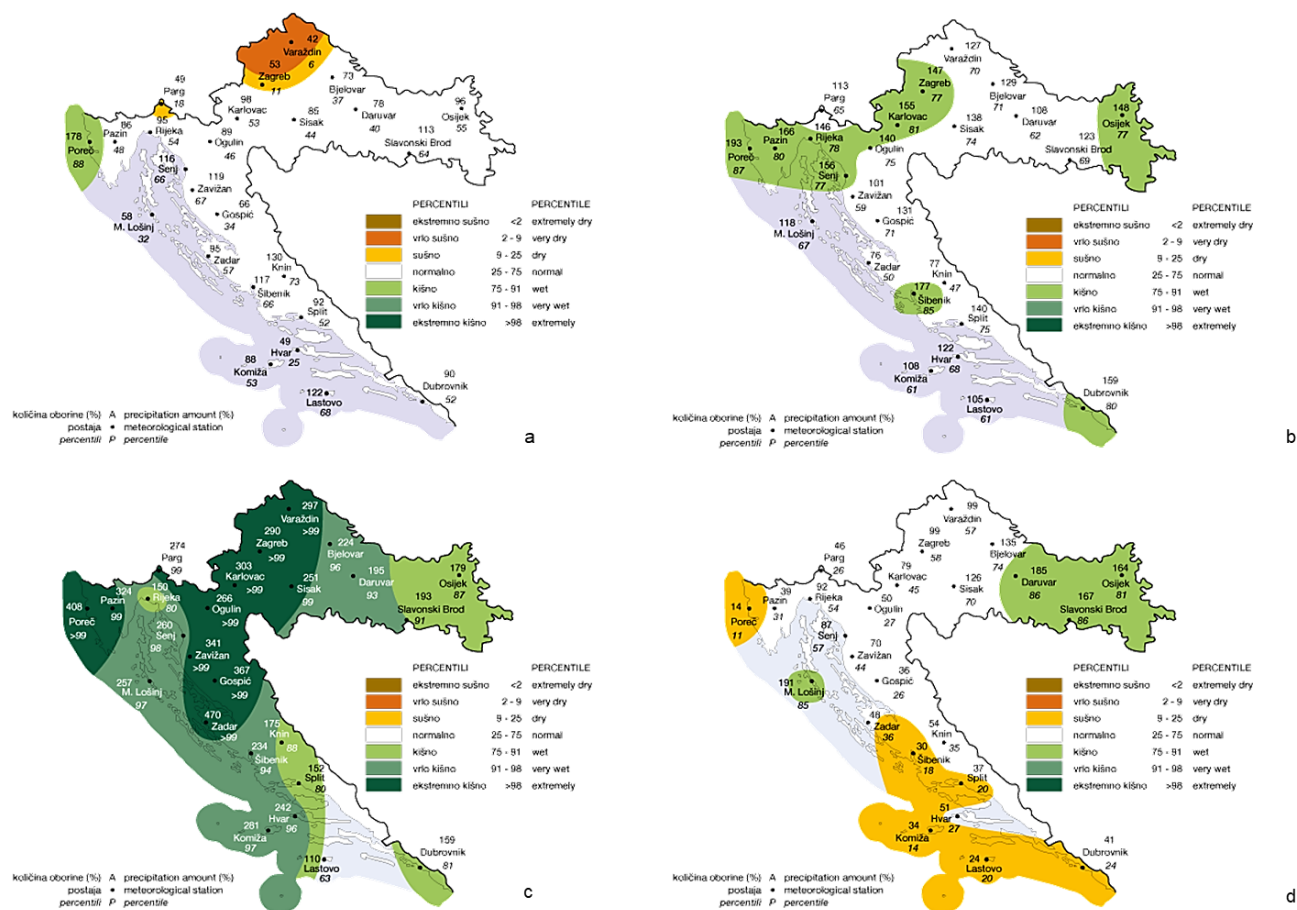
Slika 64 Srednje mjesečne temperature zraka za srpanj i kolovoz 2016. (a i b) te srpanj i kolovoz 2017. (c i d) (DHMZ, 2019.)



Slika 65 Količine oborine za srpanj i kolovoz 2016. (a i b) te srpanj i kolovoz 2017. (c i d) (DHMZ, 2019.)



Slika 66 Srednje mjesečne temperature zraka za rujan i listopad 2016. (a i b) te rujan i listopad 2017. (c i d) (DHMZ, 2019.)



Slika 67 Količine oborine za rujnan i listopad 2016. (a i b) te rujnan i listopad 2017. (c i d) (DHMZ, 2019.)