

# LC-MS/MS u kontroli zdravstvene ispravnosti hrane

---

**Mezga, Ines**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2023**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University North / Sveučilište Sjever**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:122:031365>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-28**



*Repository / Repozitorij:*

[University North Digital Repository](#)





**Sveučilište  
Sjever**

**Završni rad br. 56/PREH/2023**

## **LC-MS/MS u kontroli zdravstvene ispravnosti hrane**

**Ines Mezga, 0336048715**





# Sveučilište Sjever

Odjel za prehrambenu tehnologiju

Završni rad br. 56/PREH/2023

## LC-MS/MS u kontroli zdravstvene ispravnosti hrane

### Student

Ines Mezga, 0336048715

### Mentor

dr.sc. Marija Kovač Tomas, pred.

### Komentor

izv.prof.dr.sc. Bojan Šarkanj

Koprivnica, srpanj 2023. godine

# Prijava završnog rada

## Definiranje teme završnog rada i povjerenstva

ODJEL: Odjel za prehrambenu tehnologiju

STUDIJSKI PROGRAM: prediplomski stručni studij Prehrambena tehnologija

PREDAVAČ: Ines Mezga

ŠIFRA: 0336048715

DATA: 03.07.2023.

TEMA: Kontrola kakvoće i sigurnosti hrane

TEMA RADA: LC-MS/MS u kontroli zdravstvene ispravnosti hrane

TEMA RADA NA ENGL. JEZIKU: LC-MS/MS in the food safety control

PREDAVAČ: dr.sc. Marija Kovač Tomas

STANJE: pred

ČLANOVI POVJERENSTVA

1. doc. dr. sc. Dunja Šaman, predsjednica

2. dr.sc. Marija Kovač Tomas, pred., mentorica

3. izv. prof. dr. sc. Bojan Šarkanj, komentor

4. Ivana Dodlek Šarkanj, pred., članica

5. izv. prof. dr. sc. Natalija Uršulin Trsterjak, zamjena člana

## Zadatak završnog rada

ŠIFRA: 56/PRFH/2023

Zadatak ovog završnog rada jest pojasniti termin zdravstvene ispravnosti hrane, navesti neke primjere kontaminirane hrane i najznačajnije propise koji uređuju njihove najveće dozvoljene koncentracije u pojedinim prehrambenim proizvodima i sirovinama, pojasniti principe spregnute tehnike tekućinske kromatografije i tendenske spektrometrije mase (LC-MS/MS), navesti konkretne primjere upotrebe LC-MS/MS-a u kontroli određenih kontaminanta hrane, te pojasniti termin validacije analitičkih metoda.

DATA PRIJAVE: 24.06.2023.

PREDAVAČ MENTOR:

SVEUČILIŠTE  
SJEVER

Očisti obrazac



## Sažetak

Prema Uredbi (EZ) br. 178/2002 hrana je: „svaka tvar ili proizvod prerađen, djelomično prerađen ili neprerađen, a namijenjen je konzumaciji ili se može opravdano očekivati da će ga ljudi konzumirati”. Kao jedan od najvažnijih alata za osiguranje zdravstvene ispravnosti hrane, zakoni i propisi o hrani precizno definiraju maksimalne dopuštene razine za pojedine kontaminante u hrani bez štete po ljudsko zdravlje. Neki od najčešće spominjanih i analiziranih kontaminanata su mikotoksini te ostaci pesticida, čija je kontrola nedvojbeno važna za sigurnost i kvalitetu hrane. Vodeći se zakonima i propisima, razvijene su metode za utvrđivanje prisutnosti određenih tvari u hrani, primjerice primjenom tekućinske kromatografije s tandemskom spektrometrijom masa (LC-MS/MS), pri čemu se posebna pažnja usmjerava na pripremu uzorka za određene skupine spojeva uz korištenje validiranih analitičkih metoda, provjerenih kako bi se dokazala njihova učinkovitost i usklađenost sa zakonskim propisima.

Ključne riječi: hrana, zdravstvena ispravnost, kontrola, LC-MS/MS, validacija

## Summary

According to Regulation (EC) no. 178/2002 food is: "any substance or product processed, partially processed or unprocessed, and intended for consumption or can be reasonably expected to be consumed by humans". As one of the most important tools for ensuring food safety, food laws and regulations precisely define the maximum permissible levels for certain contaminants in food without harming human health. Some of the most frequently mentioned and analyzed contaminants are mycotoxins and pesticide residues, the control of which is undoubtedly important for food safety and quality. Guided by laws and regulations, methods have been developed to determine the presence of certain substances in food, for example using liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), whereby special attention is focused on sample preparation for certain groups of compounds using validated analytical methods, verified in order to prove their effectiveness and compliance with legal regulations.

Key words: food, health safety, control, LC-MS/MS, validation



## Popis korištenih kratica

**LC-MS/MS** – eng. *Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry*, tekućinska kromatografija s tandemskom spektrometrijom masa

**MRL** – eng. *Maximum Residue Level*, maksimalna (dozvoljena) razina ostatka

**ELISA** – eng. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, enzimsko imunokemijska metoda

**QqQ** – trostruki kvadrupolni analizator masa

**MRM** – eng. *Multiple Reaction Monitoring*, praćenje višestrukih reakcija

**CID** – eng. *Collision Induced Dissociation*, kolizijski inducirana disocijacija

**API** – eng. *Atmospheric Pressure Ionization*, tehnika ionizacije pri atmosferskom tlaku

**IAC** – eng. *Immunoaffinity Columns*, imunoafinitetne kolone

**QuEChERS** – eng. *Quick-Easy-Cheap-Effective-Rugged-Safe*, brza jednostavna jeftina efektivna robusna i sigurna (metoda)

**QuPPE** – eng. *Quick Polar Pesticide Extraction*, brza ekstrakcija polarnih pesticida

**dSPE** – eng. *Dispersive Solid Phase Extraction*, disperzivna ekstrakcija na čvrstoj fazi

# Sadržaj

1.	Uvod.....	1
2.	Mikotoksini i rezidue pesticida.....	2
2.1.	Mikotoksini .....	2
2.2.	Pesticidi .....	5
2.3.	Tehnike i metode analize.....	7
3.	Spregnuta tehnika LC-MS/MS .....	9
3.1.	Princip rada LC-MS/MS-a .....	9
3.2.	Priprema uzoraka za LC-MS/MS analizu .....	12
4.	Validacija analitičkih metoda .....	14
5.	Zaključak.....	16
6.	Literatura.....	17
	Popis slika .....	20
	Popis tablica .....	21



# 1. Uvod

Prema Uredbi (EZ) br. 178/2002 hrana je: „svaka tvar ili proizvod prerađen, djelomično prerađen ili neprerađen, a namijenjen je konzumaciji ili se može opravdano očekivati da će ga ljudi konzumirati”. Pića, žvakaće gume, voda i ostale druge stvari, koje se namjerno ugrađuju u hranu tokom njezine proizvodnje, pripreme ili prerade također se svrstavaju pod pojam hrane. Na tržište, prema istoj uredbi, nije dozvoljeno stavljati nesigurnu hranu, a takva hrana je ona koja je štetna za zdravlje ili neprikladna za konzumaciju [1].

Zakonom o hrani (NN 018/2023) propisana je zabrana stavljanja zdravstveno neispravne hrane na tržište, a samim time i njezina konzumacija. Zdravstveno neispravnom hranom smatra se, između ostalog, hrana koja ne zadovoljava mikrobiološke kriterije sigurnosti hrane, hrana koja sadrži patogene mikroorganizme, hrana koja potječe od ili sadrži nedozvoljene genetski modificirane organizme, hrana koja sadrži prehrambene aditive i arome čije količine prelaze maksimalno dozvoljenu granicu, hrana koja sadrži kontaminante poput mikotoksina koji prelaze najveće dopuštene količine, odnosno hrana u kojoj su sadržane rezidue pesticida u količinama koje predstavljaju rizik za ljudsko zdravlje [2].

Stalne kontrole korištenjem dokazanih analitičkih metoda i tehnika kao što su spregnuta tekućinska kromatografija i tandemski spektrometrija masa (LC-MS/MS) potrebne su kako bi se utvrdila sukladnost sirovina i prehrambenih proizvoda sa zakonskim propisima vezanima za hranu. Mikotoksini i rezidue pesticida među najčešćim su kontaminantima koji se analiziraju u hrani, posebice u prehrambenim sirovinama kao što su žitarice [3], a strogo definirani propisi koji ih zakonski reguliraju jesu u prvom redu Uredba Komisije (EU) 2023/915 o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani [4], Preporuka Komisije 2013/165/EU o prisutnosti toksina T-2 i HT-2 u žitaricama i proizvodima od žitarica [5], te Uredba (EZ) br. 396/2005 o maksimalnim razinama ostataka pesticida u ili na hrani i hrani za životinje biljnog i životinjskog podrijetla [6].

## 2. Mikotoksini i rezidue pesticida

### 2.1. Mikotoksini

Mikotoksini su spojevi male molekulske mase koji nastaju tijekom sekundarnog metabolizma nekih vrsta plijesni, a imaju toksičan učinak na zdravlje ljudi i životinja pri niskim koncentracijama. Vrlo su česti onečišćivači hrane koji izazivaju brojne štete u gospodarstvu, te je prema istraživanjima čak do 80% svjetskih usjeva kontaminirano mikotoksinima [7]. Poznato je više stotina mikotoksina od kojih je prema gore navedenoj zakonskoj regulativi Europske Unije (EU) regulirano samo nekoliko. U Tablici 1. prikazani su neki regulirani mikotoksini s pripadajućim najvećim dozvoljenim vrijednostima u pojedinim namirnicama [4].

Tablica 1. Najveće dopuštene količine određenih mikotoksina u pojedinim namirnicama, izvor: prilagođeno iz [4].

Naziv mikotoksina	Namirnica	Najveća dopuštena količina (µg/kg)
Aflatoksin B1	Sušeno voće koje se sortira ili drugačije fizikalno obrađuje prije stavljanja na tržište za krajnjeg potrošača	5,0
	Bademi, pistacije i jezgre marelice koji se sortiraju ili drugačije fizikalno obrađuju prije stavljanja na tržište za krajnjeg potrošača	12,0
	Žitarice i proizvodi dobiveni od žitarica, osim kukuruza	2,0
	Đumbir (sušeni)	5,0
	Dječja hrana i prerađena hrana na bazi žitarica za dojenčad i malu djecu	0,10
	Sušeni začini: Čili, papar, muškatni oraščić, kurkuma	5,0

Tablica 1. nastavak

Naziv mikotoksina	Namirnica	Najveća dopuštena količina (µg/kg)
Okrotoksin A	Nepretrađena zrna žitarica, sjemenke suncokreta i bućine sjemenke	5,0
	Kakao prah	3,0
	Vino, aromatizirano vino	2,0
	Dječja hrana i prerađena hrana na bazi žitarica za dojenćad i malu djecu	0,50
Patulin	Voćni sokovi, alkoholna pića i fermentirana pića dobivena od jabuke	50
Deoksinivalenol	Nepretrađena zrna žitarica osim tvrde pšenice i kukuruza	1250
	Tjestenina	750
	Kruh, keksi i žitarice za doručak	500
Zearalenon	Nepretrađena zrna kukuruza	350
	<i>Snack</i> proizvodi na bazi kukuruza	100
Fumonizini	Nepretrađena zrna kukuruza	4000
	Kukuruzno brašno koje se ne stavlja na tržište za krajnjeg potrošaća	2000
	Dječja hrana koja sadržava kukuruz	200
Citrinin	Dodaci prehrani na bazi riže fermentirane kvascem <i>Monascus purpureus</i>	100
Alkaloidi glavice raži	Proizvodi meljave jećma, pšenice, pira i zobi	100

Mikotoksini su prilično stabilni i dugo ostaju u biljnim i životinjskim proizvodima te predstavljaju veliku prijetnju za zdravlje ljudi i životinja u mnogim zemljama, posebice zemljama u razvoju. Bolesti uzrokovane mikotoksinima nazivaju se mikotoksikoze, a jesu li akutne ili kronične mikotoksikoze, ovisi o dozi i trajanju izloženosti organizama tim mikotoksinima. Kod akutnih mikotoksikoza tijelo je izloženo visokim koncentracijama mikotoksina tijekom kratkog vremenskog razdoblja i može rezultirati iznenadnim oštećenjem organa, pa čak i smrću, dok je kod kroničnih mikotoksikoza tijelo izloženo mikotoksinima kroz dulje vremensko razdoblje [7].

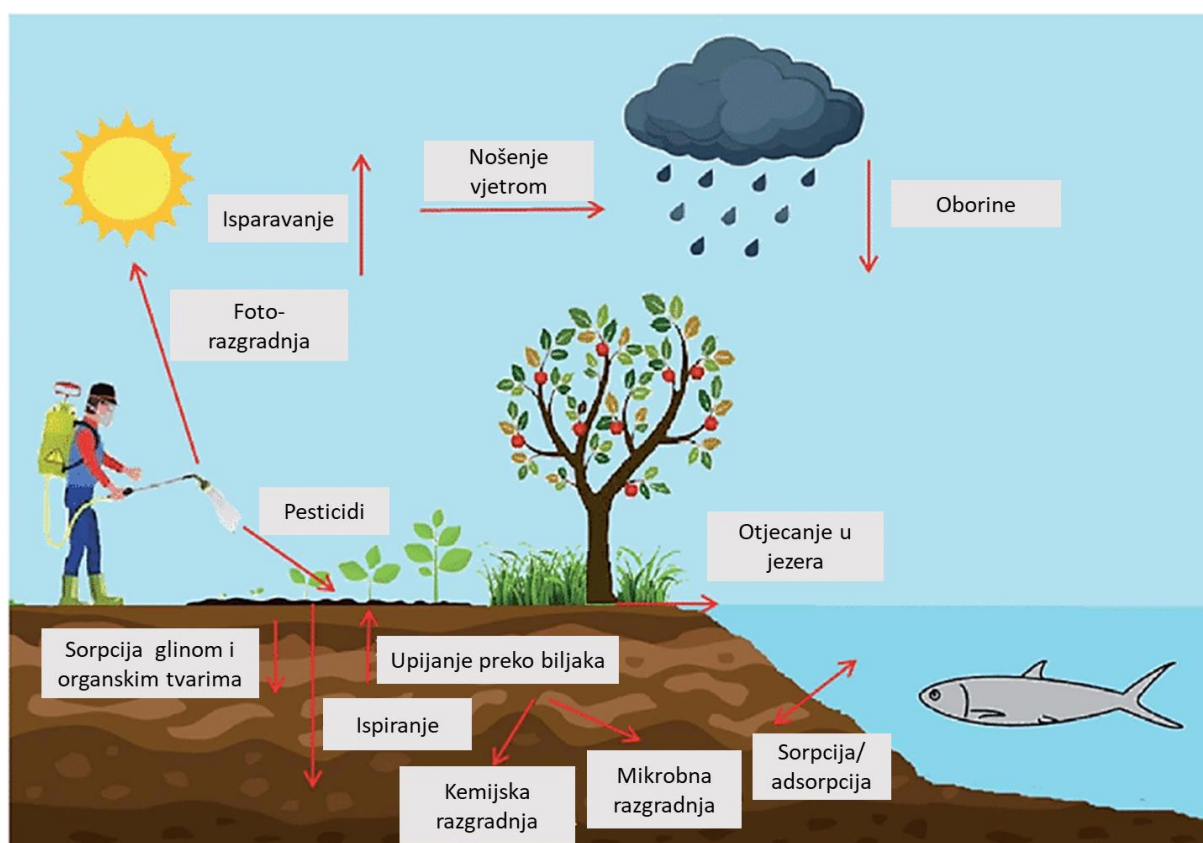
Obzirom na navedene zdravstvene implikacije, potrebno je kontrolirati koncentraciju mikotoksina u prehrambenim proizvodima, ali i sirovinama kako bi se pravovremeno mogle poduzeti mjere za sprječavanje kontaminacije te naposljetku konzumacije zdravstveno neispravne hrane. Što se tiče pojave mikotoksina u Republici Hrvatskoj, istraživanja na žitaricama pokazuju da prevladavaju mikotoksini koje proizvode plijesni roda *Fusarium* te da je pojava mikotoksina općenito povezana s klimatskim promjenama, posebice temperaturom i vlagom, ali i primjenom agrotehničkih mjera i sl. Tako se visoka pojavnost *Fusarium* mikotoksina (deoksinivalenola) u hrvatskim žitaricama veže uz umjerene temperature zraka s razdobljima visoke vlažnosti, dok se pojavnost *Asperigillus* mikotoksina (aflatoksina) veže uz ekstremno vruća i suha vremenska razdoblja tijekom kritičnih faza rasta biljke [3,8].

Posebnu pozornost izaziva činjenica da prehrambene sirovine i proizvodi mogu istovremeno biti kontaminirani s više različitih kontaminanata, iste ili druge vrste. Primjerice, često je zabilježena i supojavnost mikotoksina u žitaricama [8], kao i istovremena prisutnost mikotoksina, teških metala i rezidua pesticida [3], što upućuje na važnost kontrole usjeva, ali i općenito hrane namijenjene za ljudsku ili životinjsku konzumaciju.

## 2.2. Pesticidi

Pesticidi se općenito mogu definirati kao tvari koje se koriste za suzbijanje, iskorjenjivanje i sprečavanje pojave organizama koji se smatraju štetnima [9]. Sastavni su dio konvencionalne poljoprivredne proizvodnje zbog svoje važne uloge u smanjenju gubitaka. Prema procjenama, bez upotrebe pesticida došlo bi do gubitka u proizvodnji voća od čak 78%, u proizvodnji žitarica 32%, te povrća od 54% [10].

Ipak, pesticidi imaju i širok raspon štetnih svojstava za životinje, ljude i okoliš. Jednom aplicirani, rijetko ostaju u obliku u kojem su bili korišteni. Posljedica njihove postojanosti je kruženje u prirodi (Slika 1), a prenositi se mogu pomoću vjetra, oborina, podzemnih i površinskih tokova, ali i biološkim putem, odnosno hranidbenim lancem. Osim što zagađuju tlo, također uništavaju i mikrofloru tla, a samim time otežavaju rast i razvoj biljaka. U ljudsko tijelo mogu doprijeti kroz kožu, udisanjem i oralno, a simptomi koji se pojavljuju kod trovanja ovise o koncentraciji pesticida i vremenu izlaganja djelovanju pesticidima [11].



Slika 1. Ciklus kruženja pesticida u prirodi. Izvor: prilagođeno prema [11].



Primijenjeni pesticidi, iako imaju benefite u poljoprivrednoj proizvodnji i zaštiti usjeva, izazivaju i zabrinutost obzirom da mogu ostaviti svoje i rezidue u prehrambenim sirovinama i proizvodima. Stoga su unutar EU-a zakonski propisane maksimalne dozvoljene razine ostataka (MRL) pesticida u i na hrani i hrani za životinje biljnog i životinjskog porijekla Uredbom (EZ) br. 396/2005 [6]. Također, od strane Europske komisije uspostavljena je i EU baza pesticida ([https://food.ec.europa.eu/plants/pesticides/eu-pesticides-database\\_en](https://food.ec.europa.eu/plants/pesticides/eu-pesticides-database_en)) radi lakšeg pretraživanja informacija o aktivnim tvarima pesticida te MRL-ovima u pojedinim proizvodima kako bi se lakše ocjenjivala sukladnost, a time i zdravstvena ispravnost analiziranih sirovina i proizvoda.

### 2.3. Tehnike i metode analize

S obzirom na niske zakonski propisane dozvoljene vrijednosti, te same toksičnosti spomenutih kontaminanata već pri niskim koncentracijama, potrebne su pouzdane analitičke metode analize, a kako bi se očuvalo ljudsko zdravlje te smanjile ekonomske štete u poljoprivredi. Općenito se analiza kontaminanata sastoji od nekoliko koraka, uključujući inicijalnu pripremu uzorka, ekstrakciju analita iz uzorka i eventualnu manipulaciju dobivenog ekstrakta (pročišćavanje, koncentriranje ili razrjeđivanje), te identifikaciju i kvantifikaciju spoja od interesa. Metode analize se općenito dijele u orijentacijske i potvrdne, a osim toga dijele se i na kvalitativne i kvantitativne. Pomoću orijentacijskih metoda dokazuje se prisutnost neke tvari ili vrste tvari na razini značajnosti, a odlikuje ih jednostavnost i mogućnost brze obrade velikog broja uzoraka. Jedna od najčešćih orijentacijskih metoda je ELISA, enzimsko-imunokemijska metoda. S druge strane, potvrdne metode su selektivne metode koje zahtijevaju skupu laboratorijsku opremu za dobivanje podataka o kemijskoj strukturi analita, a najpoznatije su one koje se temelje na tehnikama poput tekućinske i plinske kromatografije s različitim konvencionalnim detektorima, odnosno u kombinaciji sa spektrometrijom masa kao detekcijskom tehnikom. Kvalitativnim metodama se utvrđuje sama prisutnost ispitivanog spoja u uzorku, dok se kvantitativnim metodama utvrđuje i njegova koncentracija. Za ove je metode važno da granica detekcije/kvantifikacije bude dovoljno niska, tj. da je metoda dovoljno osjetljiva za određivanje niskih koncentracija analita te da omogućuje prihvatljivu upotrebu analitičke metode [12-14].

Za određivanje rezidua pesticida i kontaminanata općenito najpoželjnija metoda je ona koja koristi spregnutu tehniku tekućinske kromatografije i tandemске spektrometrije masa (LC-MS/MS), budući da ovaj sustav omogućuje razdvajanje smjese na komponente i njihovu analizu na temelju omjera mase i naboja ( $m/z$ ) nabijenih čestica. LC-MS/MS omogućuje kvantitativnu i kvalitativnu analizu, uključujući određivanje molekulske mase spoja, snimanje spektra uzorka, analizu fragmentacije pojedinog molekuskog iona te određivanje prekursora određenog fragmenta [14]. Primjer spregnutog sustava LC-MS/MS prikazan je na Slici 2.



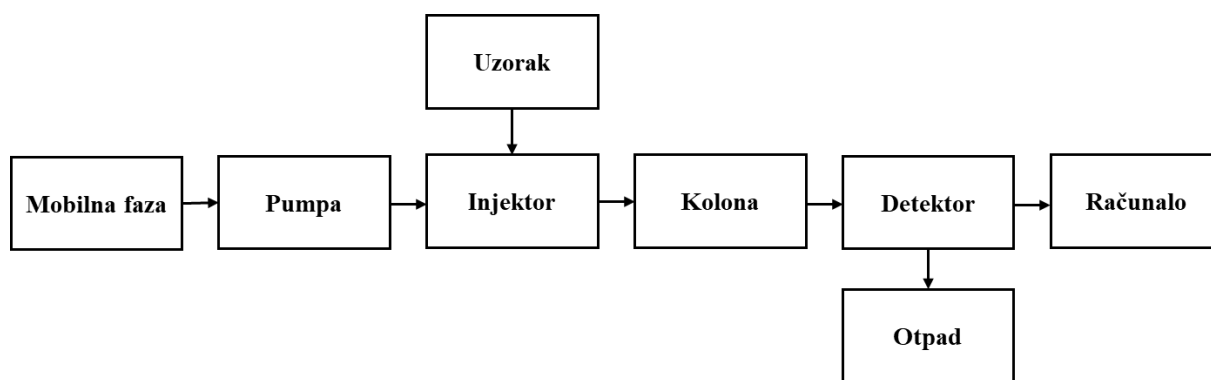
Slika 2. LC-MS/MS sustav (Agilent 1290 Infinity II – Sciex QTRAP 6500+), izvor:

<https://uapv.vscht.cz/research/equipment/21913>

### 3. Spregnuta tehnika LC-MS/MS

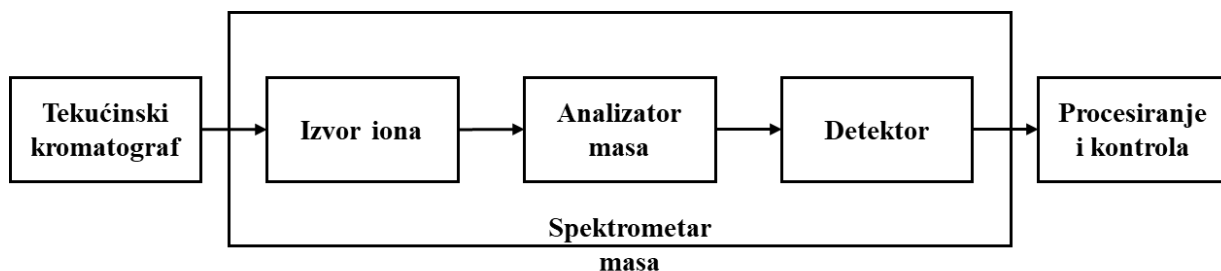
#### 3.1. Princip rada LC-MS/MS-a

Kromatografija je fizikalno-kemijska metoda za odvajanje složenih smjesa tvari koju je otkrio ruski botaničar Tswet i opisao kao fenomen separacije koja se bazira na različitom afinitetu različitih molekula za interakcije s površinom adsorbensa [14]. Prema načinu odvajanja i mobilnoj fazi razlikuje se nekoliko vrsta kromatografije, primjerice kod tekućinske kromatografije (LC) mobilna faza je tekućina. Tekućinski kromatograf (shematski prikazan na Slici 3) sastoji se od sustava za dobivanje mobilne faze, sustava za injektiranje, analitičke kolone i njenog kućišta, detektora i sustava za prikupljanje podataka i kontrolu [14].



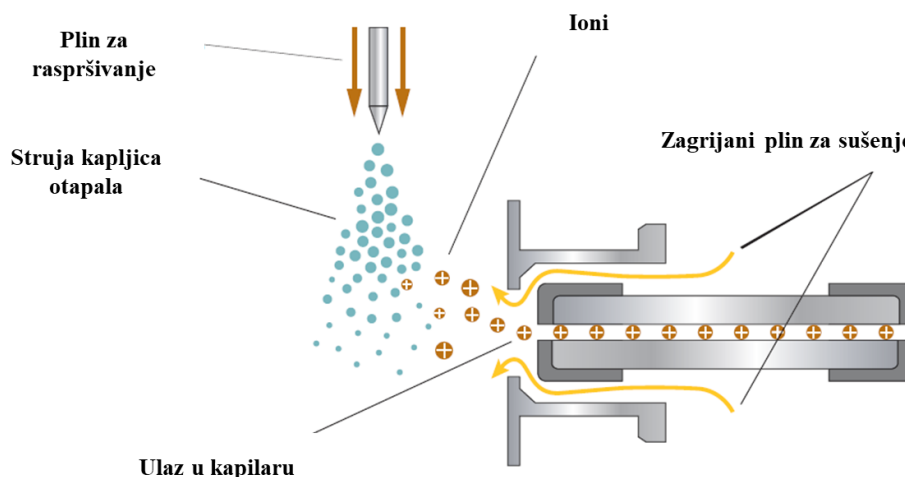
Slika 3. Blok shema tekućinskog kromatografa, izvor: preuzeto iz [14].

Kombinirajući separaciju tekućinskom kromatografijom sa detekcijom pomoću spektrometrije masa, pospješuje se razdvajanje i detektiranje komponenata. Tekućinska kromatografija posjeduje sposobnost razdvajanja komponenata smjese, dok strukturnu identifikaciju komponenata smjese sa visokom molekularnom preciznošću i osjetljivošću omogućuje spektrometrija masa [14]. Pojednostavljena blok shema spregnutog sustav LC-MS prikazana je na Slici 4. Međuspoj, kojim su povezani tekućinski kromatograf i spektrometar mada, omogućuje otparavanje tekuće faze koja dolazi iz tekućinskog kromatografa, ionizaciju neutralnih molekula analita te njihovo uvođenje u analizator (masa) spektrometra masa koji razdvaja ione sa različitim  $m/z$  omjerom, nakon čega slijedi prevođenje nastalih iona u mjerljivi signal u detektoru [14,15].



Slika 4. Blok shema spregnutog sustava LC-MS, izvor: preuzeto iz [14].

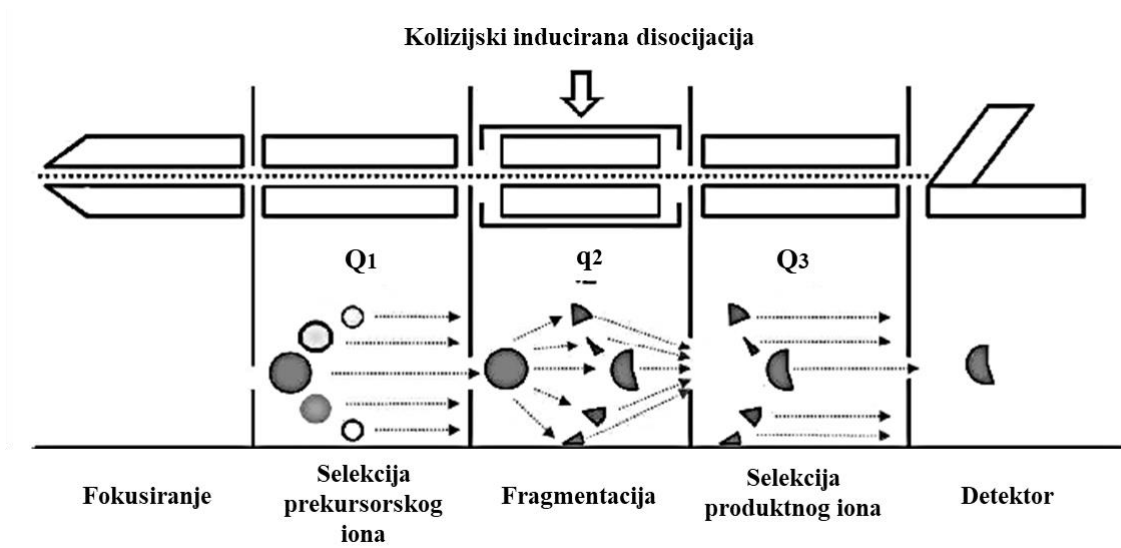
Najčešća vrsta ionizacije u spregnutom sustavu LC-MS je elektrosprejna ionizacija (ESI), jedna od tehnika ionizacije pri atmosferskom tlaku (API). ESI se smatra „mekom“ ionizacijskom tehnikom jer se relativno malo energije prenosi analitu u usporedbi s nekim drugim vrsta ionizacije, te se odvija mali broj fragmentacija u izvoru iona [10]. Princip rada ESI-a prikazan je na Slici 5.



Slika 5. Princip ESI tehnike, izvor: prilagođeno iz [15].

Najčešći analizatori masa koji se koriste u rutinskim kontrolama zdravstvene ispravnosti hrane su trostruki kvadrupolni analizatori masa (QqQ) koji se koriste u tzv. MRM način rada, a što se odnosi na istovremeno praćenje barem dviju tranzicija iona spoja od interesa, odnosno njegovog kvantifikacijskog i potvrdnog iona. Načelo rada QqQ analizatora masa i MRM načina prikazan je na Slici 6. U prvom kvadrupolu (Q1), prekursorski ion (najčešće protonirana ili deprotonirana molekula analita), odabire se na temelju  $m/z$  vrijednosti, dok se u drugom kvadrupolu (Q2) prekursorski ion fragmentira u sudaru s inertnim plinom (kolizijski inducirana disocijacija) te rezultira stvaranjem produktnih iona koji se dalje prate i odabiru uz pomoć trećeg kvadrupola (Q3), dajući tako strukturnu informaciju molekularnog iona. U kvantitativnim analizama određenih

spojeva postiže se visoka osjetljivost zbog visoke selektivnosti koja je uključena u MRM način rada [15,16].

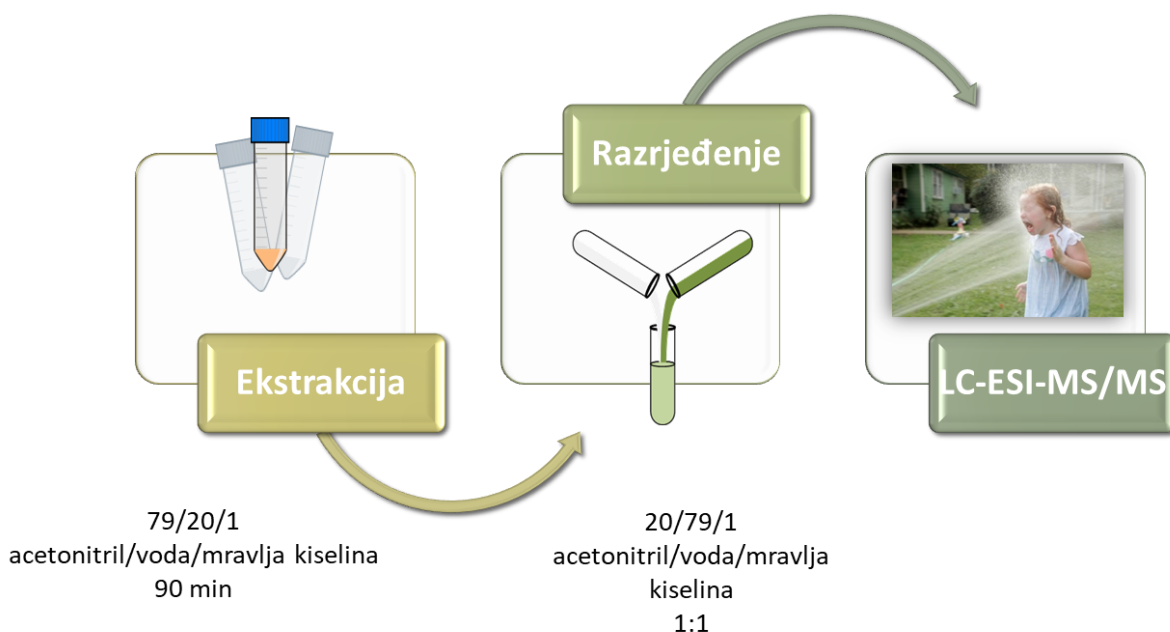


Slika 6. Princip QqQ analizatora masa i MRM načina rada, izvor: preuzeto iz [14].

### 3.2. Priprema uzoraka za LC-MS/MS analizu

Priprema uzoraka važan je korak u analizi spojeva od interesa, a koji prethodi instrumentalnom određivanju. Započinje homogenizacijom i usitnjavanjem uzoraka, nakon čega slijedi ekstrakcija odabranim otapalom ili smjesom otapala, te prema potrebi pročišćavanje ekstrakta uzorka, koncentriranje ili razrjeđivanje. Općenito izbor metode pripreme uzoraka ovisi o vrsti analita i njegovoj koncentraciji, vrsti uzorka (matrici), ali i instrumentalnoj tehnici kojom se vrši mjerenje [14].

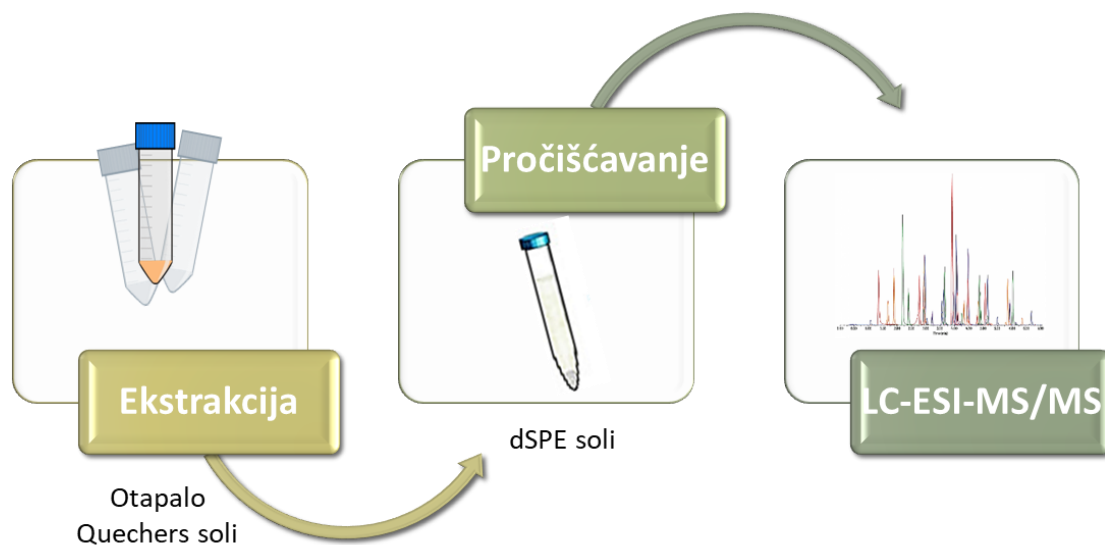
Kad se radi o određivanju mikotoksina, posebno za istovremeno određivanje većeg broja spojeva, naglasak je na minimalističkom pristupu, bez posebnih tehnika pročišćavanja, uz primjenu tzv. razrijedi i mjeri principa, prikazanom na Slici 7, koji se bazira na jednostavnoj ekstrakciji analita iz uzorka te razrjeđenju dobivenog ekstrakta u prikladnom omjeru. Iako „čuva“ analite, ovakav pristup „čuva“ i komponente uzorka što može dovesti do značajnog utjecaja matrice prilikom LC-MS/MS određivanja što ima posljedicu na izvedbene značajke metode [17].



Slika 7. Razrijedi i mjeri postupak za određivanje mikotoksina, izvor: prilagođeno iz [14].

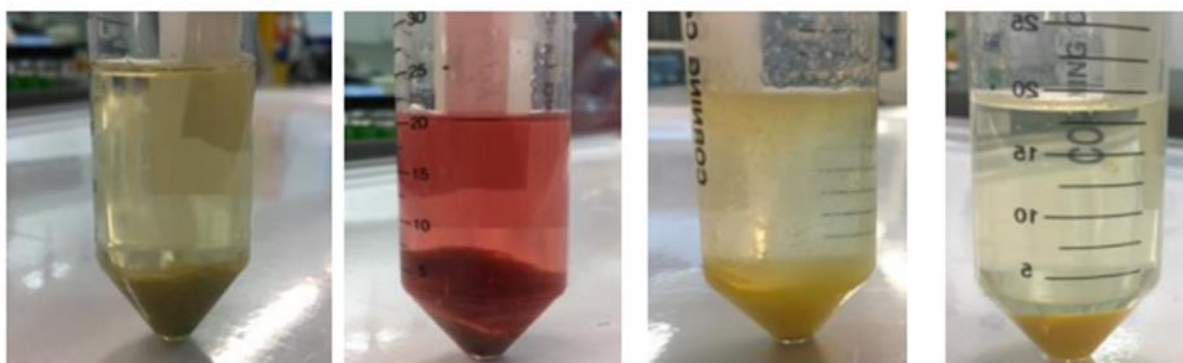
Za specifično određivanje uglavnom manjeg broja spojeva, koriste se antitijela imobilizirana u koloni, tzv. imunoafinitetne kolone (IAC), koje selektivno vežu određeni spoj prilikom prolaska kroz kolonu, koji se nakon ispiranja neželjenih tvari matrice i drugih spojeva eluiraju s kolone nekim organskim otapalom. QuEChERS postupak (eng. *Quick-Easy-Cheap-Effective-Rugged-Safe*), izvorno razvijen za analizu višestrukih ostataka pesticida, također se koristi u analizi mikotoksina, gdje se mora obratiti pozornost na vrstu spoja koji se određuje. U pripremi uzorka QuEChERS (Slika 8), analit se ekstrahira iz uzorka otapalom (acetonitril) u prisutnosti smjese soli

(magnezijev sulfat i natrijev klorid), a zatim se pročišćava disperzivnom ekstrakcijom na čvrstoj fazi (d-SPE) s odgovarajućom smjesom soli [14].



Slika 8. Princip QuEChERS pripreme, izvor: prilagođeno iz [14].

Iako relativno brza i jednostavna metoda, QuEChERS priprema nije univerzalna te se ne može koristiti za primjerice spojeve visoke polarnosti poput pesticida glifosata. U pripremi uzoraka za analizu takvih spojeva primjenjuje se tzv. QuPpe (eng. *Quick Polar Pesticide Extraction*) metoda pripreme koja se bazira na ekstrakciji analita iz uzorka (Slika 9) zakiseljenim metanolom prije LC-MS/MS određivanja [18].



Slika 9. Primjer QuPpe ekstrakata uzoraka biljnog porijekla, izvor: preuzeto iz [14].



## 4. Validacija analitičkih metoda

Cilj validacije analitičke metode je dokazati njenu prikladnost za namjeravanu uporabu, pri čemu treba jasno definirati i metodu i njezinu namjenu što znači da se metoda mora u potpunosti razviti i optimizirati prije pokretanja postupka validacije metode. Zbog iznimne važnosti u kontroli kontaminanata, performanse korištene metode moraju biti u skladu sa zakonski postavljenim kriterijima kvalitete [19]. Za svrhu službenih analiza, EU je putem Odluke o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata 2002/657/EZ dala naputke za postupke validacije analitičkih metoda te parametre učinkovitosti koje je potrebno provjeriti [20]. Kad se radi o konkretnim analizama spomenutih mikotoksina i rezidua pesticida, Uredba Komisije (EZ) br. 401/2006 o utvrđivanju metoda uzorkovanja i analize za službenu kontrolu razina mikotoksina u hrani propisuje kriterije učinkovitosti metoda za određivanje mikotoksina [21], dok SANTE dokument 11312/2021 daje smjernice za kontrolu kvalitete i validaciju metoda za određivanje rezidua pesticida [22].

Sama validacija treba biti opsežna u mjeri da se zadovolji područje primjene metode, a proces općenito uključuje definiranje svrhe i opsega korištenja metode, definiranje izvedbenih značajki i granica (kriterija) prihvatljivosti, provjeru usklađenosti sa zahtjevima pomoću odabrane metode i izjavu o valjanosti metode za određenu svrhu [19].

Pod pojmom izvedbenih značajki metode podrazumijevaju se specifičnost i selektivnost, osjetljivost metode (granica detekcije i kvantifikacije), mjerno područje i linearnost, robusnost, mjerna preciznost (ponovljivost, međupreciznost, obnovljivost) te mjerna istinitost. Specifičnost se može definirati kao mogućnost nedvosmislenog određivanja samo jednog analita u složenoj matrici uzoraka, a selektivnost je svojstvo multikomponentnih metoda analiza da istovremeno identificira nekoliko analita. Robusnost je obilježje pouzdanosti analitičkih postupaka kod malih promjena radnih uvjeta metode. Granica detekcije i kvantifikacije se odnose na najnižu koncentraciju analita koja se može kvantitativno i kvalitativno odrediti, a linearnost jest svojstvo metode koje daje linearan odnos odziva o koncentraciji analita unutar definiranog mjernog područja. Mjerna preciznost odnosi se na rasipanje rezultata dobivenih mjernih vrijednosti u danim uvjetima dok se mjerna istinitost odnosi na stupanj podudarnosti rezultata mjerenja i prihvaćene referentne vrijednosti. Uz navedene značajke, u LC-MS/MS metodama u kojima utjecaj na proces ionizacije imaju i ekstrahirane komponente matrice, kao izvedbena značajka se navodi i tzv. utjecaj matrice [13,19].

Po provedenom postupku validacije, dobiveni rezultati ispitivanih izvedbenih značajki uspoređuju se s uspostavljenim kriterijima prihvatljivosti (učinkovitosti) baziranima na zakonski uspostavljenim zahtjevima, od kojih su neki navedeni u Tablici 2. Na temelju provedene usporedbe donosi se sud o valjanosti metode, odnosno njenoj prikladnosti za predviđenu namjenu.

Tablica 2 Neki kriteriji učinkovitosti za pojedine izvedbene značajke metode i analite, izvor: prilagođeno iz [21,22].

<b>Analit</b>	<b>Razina µg/kg</b>	<b>Iskorištenje metode %</b>	<b>Ponovljivost metode, RSD %</b>	<b>Propis</b>
Deoksinivalenol	> 100	60-110	≤ 20	Uredba Komisije (EZ) br. 401/2006
	≥ 500	70-120	≤ 20	
Fumonizini	≤ 500	60-120	≤ 30	
	> 500	70-110	≤ 20	
Oktratoksin A	< 1	50-120	≤ 40	
	≥ 1	70-110	≤ 20	
Ostaci pesticida	Sve testirane razine	70-120	≤ 20	SANTE dokument 11312/2021

## 5. Zaključak

Hrana jest osnovno sredstvo za život i kao takva zahtjeva strogo regulirane parametre svoje zdravstvene ispravnost, koja će omogućiti odsutnost štetnog utjecaja na zdravlje. Neki od najčešćih kontaminanata u hrani koji mogu narušiti njenu zdravstvenu ispravnost jesu mikotoksini i pesticidi, a njihova je maksimalna dopuštena koncentracija regulirana zakonskim propisima.

U svrhu kontrole stupnja kontaminacije mikotoksinima, pesticidima i drugim tvarima, odnosno provjere usklađenosti sa zakonskim propisima, razvijaju se suvremene metode koje pružaju mogućnost nedvojbenog dokazivanja kontaminanata, a uglavnom se temelje na primjeni spregnute tehnike tekućinske kromatografije i tandemske spektrometrije masa, uz odgovarajuću pripremu uzorka prije instrumentalnog određivanja.

Kako bi se takve metode mogle implementirati, posebno kad se radi o službenim analizama, potrebno ih je validirati, odnosno utvrditi njihovu prikladnost za korištenje u određenu svrhu.

Konstantnom i kontinuiranom analizom uzoraka prehrambenih sirovina i proizvoda sprječava se značajna pojava kontaminanata, osigurava zdravstvena ispravnost te smanjuje opasnost za ljudsko zdravlje prilikom konzumacije.

## 6. Literatura

[1] Uredba (EZ) br. 178/2002 Europskog parlamenta i vijeća od 28. siječnja 2002. o utvrđivanju općih načela i uvjeta zakona o hrani, osnivanju Europske agencije za sigurnost hrane te utvrđivanju postupaka u područjima sigurnosti hrane.

<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A02002R0178-20220701&qid=1687168905238> (pristupljeno 19.6.2023.)

[2] Zakon o hrani (NN 018/2023).

[https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/full/2023\\_02\\_18\\_302.html](https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/full/2023_02_18_302.html)

(pristupljeno 19.6.2023.)

[3] Kovač, M.; Bulaić, M.; Jakovljević, J.; Nevistić, A.; Rot, T.; Kovač, T.; Dodlek Šarkanj, I.; Šarkanj, B. Microorganisms 2021. Mycotoxins, Pesticide Residues, and Heavy Metals Analysis of Croatian Cereals. *Microorganisms*, 2021, 9, 216.

[4] Uredba Komisije (EU) 2023/915 o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani i o stavljanju izvan snage Uredbe (EZ) br. 1881/2006. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/?uri=CELEX:32023R0915&qid=1688037137133> (pristupljeno, 19.6.2023.)

[5] Preporuka Komisije o prisutnosti toksina T-2 i HT-2 u žitaricama i proizvodima od žitarica.

<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32016H1319&qid=1688493226240>

(pristupljeno 19.6.2023.)

[6] Uredba (EZ) br. 396/2005 o maksimalnim razinama ostataka pesticida u ili na hrani i hrani za životinje biljnog i životinjskog podrijetla i o izmjeni Direktive Vijeća 91/414/EEZ. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/?uri=CELEX:32005R0396> (pristupljeno 10.6.2023.)

[7] Palfi, M.; Knežević, N.; Vrandečić, K.; Čosić, J (2020). Mikotoksini u hrani – zakonodavni okvir. *Glasiilo biljne zaštite*, 2020, 20 (4), 472-483.

[8] Kovač, M.; Bulaić, M.; Nevistić, A.; Rot, T.; Babić, J.; Panjičko, M.; Kovač, T.; Šarkanj, B. Regulated Mycotoxin Occurrence and Co-Occurrence in Croatian Cereals. *Toxins*, 2022, 14, 112.

- [9] Europski parlament. Informativni članci o Europskoj uniji, Kemikalije i pesticidi. <https://www.europarl.europa.eu/factsheets/hr/sheet/78/kemikalije-i-pesticidi> (pristupljeno 19.06.2023.)
- [10] Studi, M.; Tuan, H. D.; Wang, Lu.; Lyu, J.; Sadler, R.; Connel, D.; Chu, C.; Phung, D. National Library of Medicine. Agriculture Development, Pesticide Application and Its Impact on the Environment. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2021, 27;18(3):1112.
- [11] Pirsahab M.; Moradi N. Sonochemical degradation of pesticides in aqueous solution: investigation on the influence of operating parameters and degradation pathway – a systematic review. *RSC Advances*, 2020, 10, 7396-7423.
- [12] Kuveždić, T. Mikotoksini i utjecaj klimatskih promjena na njihovu produkciju. Diplomski rad. Agronomski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2020. <https://repositorij.agr.unizg.hr/islandora/object/agr%3A1839/datastream/PDF/view> (pristupljeno 19.06.2023.)
- [13] Kovač M. Kromatografske metode analize. Predavanja iz kolegija Kontrola kakvoće i sigurnosti hrane, Odjel za prehrambenu tehnologiju, Sveučilište Sjever, 2021. [https://moodle.srce.hr/2021-2022/pluginfile.php/5934774/mod\\_resource/content/1/4.%20Kromatografske-metode-analize\\_KKiSH\\_26-10-2021.pdf](https://moodle.srce.hr/2021-2022/pluginfile.php/5934774/mod_resource/content/1/4.%20Kromatografske-metode-analize_KKiSH_26-10-2021.pdf) (pristupljeno 19.06.2023.)
- [14] Kovač, M. Razvoj LC-MS/MS metode za određivanje reguliranih mikotoksina te njihova supojavnost u uzorcima hrvatskih žitarica. Doktorska disertacija, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, 2020. <https://dabar.srce.hr/islandora/object/ptfos:1986> (pristupljeno 19.06.2023.)
- [15] Niessen WMA, Falck D: Introduction to Mass Spectrometry, a Tutorial, chapter 1. U: Kool J, Niessen WMA, editors. *Analyzing Biomolecular Interactions by Mass Spectrometry*. Wiley-VCH Weinheim, Germany, 1-54, 2015.
- [16] Han, J.; Datla, R.; Chan, S.; Borchers, C. Mass Particle Sciences: Mass spectrometry-based technologies for high-throughput metabolomics. *Bioanalysis*, 2009, 1(9):1665-84.

[17] Kovač, M.; Nevistić, A.; Kovač, T.; Babić, J.; Šarić, A.; Miličević, B.; Panjičko, M.; Šarkanj, B. Development and Validation of an UHPLC-MS/MS Method for the Simultaneous Determination of 11 EU-Regulated Mycotoxins in Selected Cereals. *Journal of Fungi*, 2022, 8, 665.

[18] Quick Method for the Analysis of Highly Polar Pesticides in Food Involving Extraction with Acidified Methanol and LC- or IC-MS/MS Measurement. [https://www.eurl-pesticides.eu/library/docs/srm/meth\\_QuPPE.pdf](https://www.eurl-pesticides.eu/library/docs/srm/meth_QuPPE.pdf) (pristupljeno 19.6.2023.)

[19] Kovač, M. Validacija. Predavanja iz kolegija Kontrola kakvoće i sigurnosti hrane, Odjel za prehrambenu tehnologiju, Sveučilište Sjever, 2021. [https://moodle.srce.hr/2021-2022/pluginfile.php/5850127/mod\\_resource/content/1/3.%20Validacija\\_MN\\_uzorkovanje\\_KKiS\\_H\\_19-10-2021.pdf](https://moodle.srce.hr/2021-2022/pluginfile.php/5850127/mod_resource/content/1/3.%20Validacija_MN_uzorkovanje_KKiS_H_19-10-2021.pdf) (pristupljeno 19.6.2023.)

[20] Odluka Komisije o primjeni Direktive Vijeća 96/23/EZ o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata.

<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/ALL/?uri=celex%3A32002D0657>

(pristupljeno 2.7.2023.)

[21] Uredba Komisije (EZ) br. 401/2006o utvrđivanju metoda uzorkovanja i analize za službenu kontrolu razina mikotoksina u hrani.

<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/ALL/?uri=CELEX%3A32006R0401>

(pristupljeno 2.7.2023.)

[22] Document N° SANTE/11312/2021 Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed .

[https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlALL/SANTE\\_11312\\_2021.pdf](https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlALL/SANTE_11312_2021.pdf)

(pristupljeno 2.7.2023.)

## Popis slika

Slika 1. Ciklus kruženja pesticida u prirodi.....	5
Slika 2. LC-MS/MS sustav (Agilent 1290 Infinity II – Sciex QTRAP 6500+).....	7
Slika 3. Blok shema tekućinskog kromatografa.....	8
Slika 4. Blok shema spregnutog sustava LC-MS.....	9
Slika 5. Princip ESI.....	9
Slika 6. Princip QqQ analizatora masa i MRM načina rada.....	10
Slika 7. Razrijedi i mjeri postupak za određivanje mikotoksina.....	11
Slika 8. Princip QuEChERS pripreme.....	12
Slika 9. Primjer QuPPE ekstrakata uzoraka biljnog porijekla.....	12

## **Popis tablica**

Tablica 1. Najveće dopuštene količine određenih mikotoksina u karakteristično kontaminiranoj hrani.....	2
Tablica 2. Kriteriji učinkovitosti za pojedine izvedbene značajke metode i analite.....	14



# Sveučilište Sjever



SVEUČILIŠTE  
SJEVER

## IZJAVA O AUTORSTVU

Završni/diplomski rad isključivo je autorsko djelo studenta koji je isti izradio te student odgovara za istinitost, izvornost i ispravnost teksta rada. U radu se ne smiju koristiti dijelovi tuđih radova (knjiga, članaka, doktorskih disertacija, magistarskih radova, izvora s interneta, i drugih izvora) bez navođenja izvora i autora navedenih radova. Svi dijelovi tuđih radova moraju biti pravilno navedeni i citirani. Dijelovi tuđih radova koji nisu pravilno citirani, smatraju se plagijatom, odnosno nezakonitim prisvajanjem tuđeg znanstvenog ili stručnoga rada. Sukladno navedenom studenti su dužni potpisati izjavu o autorstvu rada.

Ja, INES HEZBA (ime i prezime) pod punom moralnom, materijalnom i kaznenom odgovornošću, izjavljujem da sam isključivi autor/ica završnog/diplomskog (obrisati nepotrebno) rada pod naslovom LC-HSMS U KONTROLI ISPRAVNOSTI I SPRAVNOSTI (upisati naslov) te da u navedenom radu nisu na nedozvoljeni način (bez pravilnog citiranja) korišteni dijelovi tuđih radova.

Student/ica:  
(upisati ime i prezime)

Ines Hezba  
(vlastoručni potpis)

Sukladno čl. 83. Zakonu o znanstvenoj djelatnosti i visokom obrazovanju završne/diplomske radove sveučilišta su dužna trajno objaviti na javnoj internetskoj bazi sveučilišne knjižnice u sastavu sveučilišta te kopirati u javnu internetsku bazu završnih/diplomskih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice. Završni radovi istovrsnih umjetničkih studija koji se realiziraju kroz umjetnička ostvarenja objavljuju se na odgovarajući način.

Sukladno čl. 111. Zakona o autorskom pravu i srodnim pravima student se ne može protiviti da se njegov završni rad stvoren na bilo kojem studiju na visokom učilištu učini dostupnim javnosti na odgovarajućoj javnoj mrežnoj bazi sveučilišne knjižnice, knjižnice sastavnice sveučilišta, knjižnice veleučilišta ili visoke škole i/ili na javnoj mrežnoj bazi završnih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice, sukladno zakonu kojim se uređuje znanstvena i umjetnička djelatnost i visoko obrazovanje.

**22.6%**

Date: 2023-07-05 18:10 UTC

\* All sources 43 | Internet sources 36 | Organization archive 4 | Plagiarism Prevention Pool 3

<input checked="" type="checkbox"/>	[0]	<a href="https://repositorij.ptfos.hr/islandora/object/ptfos:1986/datastream/PDF/view">repositorij.ptfos.hr/islandora/object/ptfos:1986/datastream/PDF/view</a>	10.9%	36 matches
<input checked="" type="checkbox"/>	[1]	<a href="https://repositorij.unin.hr/islandora/object/unin:5295/datastream/PDF/download">repositorij.unin.hr/islandora/object/unin:5295/datastream/PDF/download</a>	4.4%	12 matches
<input checked="" type="checkbox"/>	[2]	<a href="https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2012_12_146_3162.html">narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2012_12_146_3162.html</a>	3.4%	8 matches 1 documents with identical matches
<input checked="" type="checkbox"/>	[4]	<a href="https://hrcak.srce.hr/file/349566">hrcak.srce.hr/file/349566</a>	3.1%	9 matches
<input checked="" type="checkbox"/>	[5]	<a href="https://repositorij.pbf.unizg.hr/islandora/object/pbf:4302/datastream/PDF/download">repositorij.pbf.unizg.hr/islandora/object/pbf:4302/datastream/PDF/download</a>	2.3%	8 matches
<input checked="" type="checkbox"/>	[6]	<a href="https://faolex.fao.org/docs/pdf/cro106141.pdf">faolex.fao.org/docs/pdf/cro106141.pdf</a>	1.6%	6 matches
<input checked="" type="checkbox"/>	[7]	<a href="http://www.zakon.hr/z/575/Zakon-o-kontaminantima">www.zakon.hr/z/575/Zakon-o-kontaminantima</a>	1.5%	5 matches
<input checked="" type="checkbox"/>	[8]	<a href="https://repository.medri.uniri.hr/en/islandora/object/medri:6587/datastream/PDF/view">repository.medri.uniri.hr/en/islandora/object/medri:6587/datastream/PDF/view</a>	1.4%	6 matches
<input checked="" type="checkbox"/>	[9]	"HACCP u proizvodnji pilećeg mesa - HORVAT LEON 2 15.05..docx" dated 2023-05-16	1.3%	5 matches
<input checked="" type="checkbox"/>	[10]	<a href="http://www.podravka.hr/storage/repository/download/4ee74b20-8a1f-11ea-b875-261ef5afbe95/">www.podravka.hr/storage/repository/download/4ee74b20-8a1f-11ea-b875-261ef5afbe95/</a>	1.2%	5 matches
<input checked="" type="checkbox"/>	[11]	<a href="https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=uriserv:DD.HRV.13.062.FULL.HRV">eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=uriserv:DD.HRV.13.062.FULL.HRV</a>	1.2%	5 matches
<input checked="" type="checkbox"/>	[12]	"Zakonodavstvo gotovo.docx" dated 2022-11-06	1.2%	5 matches
<input checked="" type="checkbox"/>	[13]	<a href="https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/HTML/?uri=OJ:C:2023:202:FULL">eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/HTML/?uri=OJ:C:2023:202:FULL</a>	1.0%	5 matches
<input checked="" type="checkbox"/>	[14]	<a href="http://www.sumt.hr/dokumenti/zakoni/150-zakon-o-zabrani-nepostenih-trgovackih-praksi">www.sumt.hr/dokumenti/zakoni/150-zakon-o-zabrani-nepostenih-trgovackih-praksi</a>	1.1%	3 matches
<input checked="" type="checkbox"/>	[15]	<a href="https://repositorij.pmf.unizg.hr/islandora/object/pmf:9093/datastream/PDF/view">repositorij.pmf.unizg.hr/islandora/object/pmf:9093/datastream/PDF/view</a>	1.0%	4 matches
<input checked="" type="checkbox"/>	[16]	<a href="https://zir.nsk.hr/islandora/object/pbf:3508/datastream/PDF/view">zir.nsk.hr/islandora/object/pbf:3508/datastream/PDF/view</a>	0.8%	3 matches
<input checked="" type="checkbox"/>	[17]	<a href="https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32014R0519&amp;from=SK">eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32014R0519&amp;from=SK</a>	0.7%	4 matches
<input checked="" type="checkbox"/>	[18]	<a href="http://zdravstvo.gov.hr/djelokrug-1297/javnozdravstvena-zastita/hrana-1359/kontaminanti-u-hrani/zakonodavstvo-na-razini-europske-unije/304">zdravstvo.gov.hr/djelokrug-1297/javnozdravstvena-zastita/hrana-1359/kontaminanti-u-hrani/zakonodavstvo-na-razini-europske-unije/304</a>	0.6%	4 matches
<input checked="" type="checkbox"/>	[19]	<a href="https://eur-lex.europa.eu/HR/legal-content/summary/maximum-levels-for-certain-contaminants-in-food.html">eur-lex.europa.eu/HR/legal-content/summary/maximum-levels-for-certain-contaminants-in-food.html</a>	0.7%	3 matches
<input checked="" type="checkbox"/>	[20]	<a href="https://repositorij.pbf.unizg.hr/islandora/object/pbf:4064/datastream/PDF/view">repositorij.pbf.unizg.hr/islandora/object/pbf:4064/datastream/PDF/view</a>	0.7%	3 matches
<input checked="" type="checkbox"/>	[21]	<a href="http://www.labosan.hr/novosti/opoziv-proizvoda-fruity-sensation-100-jabuka-1/">www.labosan.hr/novosti/opoziv-proizvoda-fruity-sensation-100-jabuka-1/</a>	0.7%	2 matches
<input checked="" type="checkbox"/>	[22]	<a href="https://core.ac.uk/download/pdf/198141736.pdf">core.ac.uk/download/pdf/198141736.pdf</a>	0.7%	1 matches
<input checked="" type="checkbox"/>	[23]	<a href="http://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2021/04/Obrazovni-materijali-PROŠIRENI-PROGRAM.pdf">www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2021/04/Obrazovni-materijali-PROŠIRENI-PROGRAM.pdf</a>	0.6%	3 matches
<input checked="" type="checkbox"/>	[24]	<a href="https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/full/2003_07_117_1633.html">narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/full/2003_07_117_1633.html</a>	0.6%	2 matches

- [25] 0.5% 1 matches


---

- [26] [pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35202139/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35202139/)  
0.6% 3 matches

---

- [27] [faolex.fao.org/docs/pdf/cro111505.pdf](https://faolex.fao.org/docs/pdf/cro111505.pdf)  
0.5% 2 matches

---

- [28]  from a PlagScan document dated 2022-10-31 10:56  
0.5% 2 matches

---

- [29] [www.researchgate.net/publication/348816197\\_Agriculture\\_Development\\_Pesticide\\_Application\\_and\\_Its\\_Impact\\_on\\_the\\_Environment](https://www.researchgate.net/publication/348816197_Agriculture_Development_Pesticide_Application_and_Its_Impact_on_the_Environment)  
0.5% 2 matches

---

- [30] [nardus.mpn.gov.rs/bitstream/id/38278/Disertacija.pdf](https://nardus.mpn.gov.rs/bitstream/id/38278/Disertacija.pdf)  
0.4% 2 matches

---

- [31] [www.kontekst.io/hrvatski/kontaminant](https://www.kontekst.io/hrvatski/kontaminant)  
0.4% 2 matches

---

- [32] [fsa.gov.ba/hr/objavljen-pravilnik-o-izmjenama-i-dopunama-pravilnika-o-maksimalno-dozvoljenim-kolicinama-odredenih-kontaminanata-u](https://fsa.gov.ba/hr/objavljen-pravilnik-o-izmjenama-i-dopunama-pravilnika-o-maksimalno-dozvoljenim-kolicinama-odredenih-kontaminanata-u)  
0.4% 2 matches



---

- [33] [pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33513796/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33513796/)  
0.4% 2 matches

---

- [34] [core.ac.uk/download/pdf/222816984.pdf](https://core.ac.uk/download/pdf/222816984.pdf)  
0.3% 2 matches


---

- [35]  from a PlagScan document dated 2022-01-31 07:03  
0.3% 2 matches  
 1 documents with identical matches

---

- [37] [faolex.fao.org/docs/pdf/cro159597.pdf](https://faolex.fao.org/docs/pdf/cro159597.pdf)  
0.3% 1 matches

---

- [38]  "Analiza mikotoksina-1.docx" dated 2020-03-15  
0.2% 1 matches

---

- [39] [www.researchgate.net/publication/358284897\\_Regulated\\_Mycotoxin\\_Occurrence\\_and\\_Co-Occurrence\\_in\\_Croatian\\_Cereals](https://www.researchgate.net/publication/358284897_Regulated_Mycotoxin_Occurrence_and_Co-Occurrence_in_Croatian_Cereals)  
0.2% 1 matches

---

- [40] [www.iusinfo.hr/zakonodavstvo/pravilnik-o-najvecim-dopustenim-kolicinama-odredenih-kontaminanata-u-hrani-3](https://www.iusinfo.hr/zakonodavstvo/pravilnik-o-najvecim-dopustenim-kolicinama-odredenih-kontaminanata-u-hrani-3)  
0.2% 1 matches


---

- [41] [www.poslovni.hr/hrvatska/hitna-obavijest-zbog-plijesni-povucen-popularni-prehrambeni-proizvod-4396651](https://www.poslovni.hr/hrvatska/hitna-obavijest-zbog-plijesni-povucen-popularni-prehrambeni-proizvod-4396651)  
0.2% 1 matches

---

- [42] [zir.nsk.hr/islandora/object/pbf:3980/datastream/PDF/download](https://zir.nsk.hr/islandora/object/pbf:3980/datastream/PDF/download)  
0.2% 1 matches

---

- [43]  from a PlagScan document dated 2019-03-05 01:22  
0.2% 1 matches

---

- [44] [www.researchgate.net/publication/311866740\\_Analyzing\\_Biomolecular\\_Interactions\\_by\\_Mass\\_Spectrometry](https://www.researchgate.net/publication/311866740_Analyzing_Biomolecular_Interactions_by_Mass_Spectrometry)  
0.2% 1 matches