

Utjecaj mikrofiltracije na odabrane zakonski regulirane mikotoksine

Mijatović, Anto

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:122:197663>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

[University North Digital Repository](#)





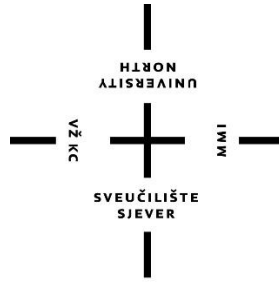
Sveučilište Sjever

Završni rad br. 41/PREH/2022

Utjecaj mikrofiltracije na odabrane zakonski regulirane mikotoksine

Anto Mijatović, 0336030472

Koprivnica, rujan 2022. godine



Sveučilište Sjever

Odjel za Prehrambenu tehnologiju

Završni rad br. 41/PREH/2022

Utjecaj mikrofiltracije na odabrane zakonski regulirane mikotoksine

Student

Anto Mijatović, 0336030472

Mentor

dr.sc. Marija Kovač Tomas

Koprivnica, rujan 2022. godine

Prijava završnog rada

Definiranje teme završnog rada i povjerenstva

ODJEL	Odjel za prehrambenu tehnologiju		
STUDIJ	preddiplomski stručni studij Prehrambena tehnologija		
PRISTUPNIK	Anto Mijatović	MATIČNI BROJ	0336030472
DATUM	6.9.2022.	KOLEGIJ	Kontrola kakvoće i sigurnosti hrane
NASLOV RADA	Utjecaj mikrofiltracije na odabrane zakonski regulirane mikotoksine		
NASLOV RADA NA ENGL. JEZIKU	The impact of microfiltration on selected legislatively regulated mycotoxins		
MENTOR	dr.sc. Marija Kovač Tomas	ZVANJE	Predavač
ČLANOVI POVJERENSTVA	1. doc.dr.sc. Predrag Putnik (predsjednik)		
	2. doc.dr.sc. Dunja Šamec (članica)		
	3. dr.sc. Marija Kovač Tomas (mentorica)		
	4. dipl.ing. Ivana Dodlek Šarkanj (zamjena)		
	5. _____		

Zadatak završnog rada

BROJ	41/PREH/2022
OPIS	Mikotoksini, sekundarni metaboliti nekih vrsta plijesni, su neizbježni kontaminanti hrane i hrane za životinje. Obzirom da se u metodama koje se koriste za utvrđivanje pojavnosti mikotoksina u pripremi uzoraka često zahtijeva korištenje mikrofiltracije, zadatak ovog rada je bio ispitati utjecaj različitih materijala (mikro)filtera na 11 zakonski reguliranih mikotoksina (aflatoksini B1, B2, G1 i G2, deoksnivalenol, fumonizini B1 i B2, zearalenon, T-2 i HT-2 toksini te ohratoksin A) s ciljem utvrđivanja mogućih gubitaka mikotoksina tijekom procesa mikrofiltracije.

ZADATAK URUČEN

8.9.2022.

POTPIS MENTORA

SVEUČILIŠTE
SJEVER



Predgovor

Zahvaljujem svima koji su bili uz mene tijekom školovanja, a ponajviše mojoj obitelji, profesorima i kolegama s fakulteta. Posebno bih zahvale uputio mojoj mentorici koja mi je pomogla u pisanju završnog rada. Velika joj hvala na savjetima i sugestijama koje mi je davala.

Posebno hvala mojim roditeljima koji su bili uz mene i omogućili mi školovanje.

Sažetak

Mikotoksini, sekundarni metaboliti nekih vrsta plijesni, neizbježni su kontaminanti hrane i hrane za životinje. Obzirom na njihovu visoku pojavnost te toksikološka djelovanja neophodne su stalne kontrole pouzdanim analitičkim metodama i tehnikama, među kojima je najznačajnija tekućinska kromatografija-tandemska spektrometrija masa. U metodama koje se koriste za ispitivanje pojavnosti mikotoksina priprema uzoraka često zahtijeva korištenje mikrofiltracije, iako moguće interakcije između materijala korištenih membrana filtera i analita uglavnom nisu dovoljno ispitane, a mogu dovesti do gubitaka te pogrešaka u prikupljenim podacima o razini kontaminacije. U ovom radu ispitan je utjecaj pet različitih materijala filtera (najlon, politetrafluoretilen, polietersulfon, miješani celulozni ester te celulozni acetat) na 11 zakonski reguliranih mikotoksina (aflatoksini B1, B2, G1 i G2, deoksnivalenol, fumonizini B1 i B2, zearalenon, T-2 i HT-2 toksini te ohratoksin A). Politetrafluoretilen se pokazao kao materijal koji najmanje utječe na gubitak svih analiziranih mikotoksina tijekom mikrofiltracije, dok ostali materijali mogu značajno doprinijeti smanjenju iskorištenja, posebice ukoliko se pravilno ne koriste.

Ključne riječi: mikotoksini, tekućinska kromatografija-tandemska spektrometrija masa, pojavnost, priprema uzoraka, mikrofiltracija

Summary

Mycotoxins, fungal secondary metabolites, are unavoidable contaminants of food and feed. Due to their high occurrence and toxicological effects, constant control using reliable analytical methods and techniques is necessary, among which liquid chromatography-tandem mass spectrometry is the most important. In such methods sample preparation often requires the use of microfiltration, although possible interactions between the materials of the used filter membranes and the analyte are generally not sufficiently tested, and may lead to loss and errors in the collected data on the level of mycotoxin contamination. In this work, the effect of five different filter materials (nylon, polytetrafluoroethylene, polyethersulfone, mixed cellulose ester and cellulose acetate) on 11 legally regulated mycotoxins (aflatoxins B1, B2, G1 and G2, deoxynivalenol, fumonisins B1 and B2, zearalenone, T-2 and HT-2 toxins and ochratoxin A) was tested. Polytetrafluoroethylene proved to be the material that least affects the loss of all analyzed mycotoxins during microfiltration, while other materials can significantly contribute to their reduction, especially if they are not used properly.

Keywords: mycotoxins, liquid chromatography-tandem mass spectrometry, occurrence, sample preparation, microfiltration

Sadržaj

1. Uvod	1
2. Mikotoksini.....	2
2.1. Definicija i pojam mikotoksina	2
2.2. Klasifikacija mikotoksina	4
2.2.1. Zakonski regulirani mikotoksini.....	6
2.3. Pojavnost mikotoksina i klimatske promjene.....	8
2.4. Metode analize mikotoksina.....	9
2.4.1. ELISA.....	9
2.4.2. Kromatografske metode	10
2.5. Priprema uzorka za analizu mikotoksina.....	13
2.5.1. Uzorkovanje.....	13
2.5.2. Ekstrakcija i pročišćavanje	13
2.5.4. Mikrofiltracija.....	14
3. Praktični dio.....	16
3.1. Materijali i kemikalije	16
3.2. Metode.....	16
4. Analiza rezultata	19
5. Zaključak	22
6. Literatura	23

1. Uvod

Mikotoksini su neizbježni kontaminanti hrane i hrane za životinje, čija je pojavnost uvelike vezana za meteorološke uvjete te može značajno varirati od godine do godine. Shodno tome, stalna kontrola prehrambenih proizvoda je neophodna za osiguranje njihove zdravstvene ispravnosti, odnosno dokazivanja sukladnosti sa zakonodavnim zahtjevima. Pri tome, nužna je upotreba pouzdanih analitičkih metoda/tehnika koje omogućuju istovremeno određivanje većeg broja analita, kao što je tekućinska kromatografija-tandemska spektrometrija masa (LC-MS/MS), a upotrijebljene metode moraju biti dobro isplanirane te validirane. U metodama koje se koriste za ispitivanje pojavnosti mikotoksina priprema uzoraka često zahtijeva korištenje (mikro)filtracije, kako bi se, u prvom redu sačuvalo instrument od čestica matrice uzorka, a onda i osigurala učinkovitost analitičkog postupka. Ipak, malo je poznato o mogućim interakcijama između materijala korištenih membrana filtera i analita te o potencijalnim gubitcima analita. Obzirom na kemijsku različitost mikotoksina, neki mogu biti pod utjecajem adsorptivnog ili apsorptivnog fenomena tijekom filtracije, što može dovesti do pogrešaka u određivanju i prikupljenim podacima o pojavnosti te naposljetku pogrešaka u procjeni rizika za zdravlje i ljudi i životinja.

Obzirom na navedeno, u ovom radu cilj je bio ispitati utjecaj različitih materijala tzv. *syringe* filtera koji se većinom preporučuju za kromatografske analize u fazi pripreme uzoraka na 11 zakonski reguliranih mikotoksina, uključujući aflatoksine B1, B2, G1 i G2 (AFB1, AFB2, AFG1 i AFG2), deoksinivalenol (DON), fumonizine B1 i B2 (FB1 i FB2), zearalenon (ZEA), T-2 i HT-2 toksine (T-2 i HT-2), te ohratoksin A (OTA).

Rad se sastoji od pet glavnih poglavlja. U prvom poglavlju uvodi se u samu tematiku rada. U drugom poglavlju se pobliže objašnjava sam pojam mikotoksina, metode analize, priprema uzorka te važnost mikrofiltracije. Treće poglavlje opisuje korištene materijale i metode za provođenje praktičnog dijela rada, čiji se rezultati prikazuju i komentiraju u četvrtom poglavlju. Posljednje, peto poglavlje zaključak je cjelokupnog istraživanja navedene problematike uz izražavanje zaključne misli.

2. Mikotoksini

2.1. Definicija i pojam mikotoksina

Mikotoksini (grč. *mykes* – gljiva, lat. *toxikon* – otrov) su ekstra celularni metaboliti nekih vrsta pljesni, koji su toksični pri niskim koncentracijama. Raznorodna su skupina kemijskih spojeva, male molekularne težine [1], koji nemaju biokemijsku važnost u rastu i razvoju same plijesni [2].

Čovjek može mikotoksine unijeti u tijelo na više načina. Najčešći ulazak mikotoksina u tijelo je konzumacijom hrane, no moguće je unijeti ga dišnim putevima te kroz kožu. Do danas je otkriveno nekoliko stotina spojeva koji se svrstavaju u mikotoksine, od kojih su samo neki toksikološki ispitani, te se njihov utjecaj na zdravlje još mora istražiti. Neki od najčešće spominjanih mikotoksina su: aflatoksini, ohratoksin A, fumonizini, trihoteceni (deoksinivalenol, T-2 i HT-2 toksini), zearalenon, *Alternaria* toksini te patulin [3].

Iako Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) procjenjuje da 25% hrane sadrži mikotoksine, nedavna istraživanja o učestalosti mikotoksina pokazuju razinu kontaminacije 30-100% [4]. Uz navedeno se povezuje činjenica da ovi česti kontaminanti hrane uzrokuju bolesti i kod ljudi i životinja koje se nazivaju mikotoksikoze [5], a neki od zdravstvenih problema koje uzrokuju navedeni su u Tablici 1. Količina mikotoksina u usjevima općenito ovisi o meteorološkim uvjetima tijekom uzgoja, ponajprije temperaturi zraka te količini oborina [6,7]. Osim toga, razvoj plijesni i kontaminaciju mikotoksinima potiču i insekti koji oštećuju biljke čineći ih podložnijima infekciji [8,9].

Tablica 1: Bolesti ljudi povezane s mikotoksinima. Izvor: izrada autora prema [3].

Sustav	Zdravstveni problemi	Mikotoksini
Kardiovaskularni sustav	Smanjena elastičnost žila, unutrašnja krvarenja	Aflatoksini Satratoksin Roridin
Gastrointestinalni sustav	Dijareja, mučnina, povraćanje, oštećenje jetre, nekroze, fibroze, rane na mukoznim membranama, anoreksija	Aflatoksini T-2 toksin Deoksinivalenol (Vomitoksin)
Respiratorni sustav	Poteškoće s disanjem, krvarenje iz pluća	Trihoteceni
Živčani sustav	Drhtavica, nekoordinirani pokreti, depresija, glavobolja	Trihoteceni
Koža	Osip, osjet vrućine, fotosenzitivnost	Trihoteceni
Urinarni sustav	Oštećenje bubrega	Ohratoksini Citrinin
Reproduktivni sustav	Promjene u reproduktivnim ciklusima, sterilnost	T-2 toksin Zearalenon
Imunosustav	Promjene ili potpuno uništenje	Puno mikotoksina

2.2. Klasifikacija mikotoksina

Postoje različite podjele mikotoksina. Kliničari ih dijele prema toksikološkom učinku (hepatotoksini, nefrotoksini, neurotoksini, imunotoksini, itd.), molekularni biolozi ih stavljaju u generičke grupe (teratogeni, karcinogeni, mutageni, alergeni, itd.), organski kemičari i biokemičari ih razvrstavaju prema strukturi (derivati terpena, derivati kumarina, derivati laktona i sl.), a mikolozi ih dijele prema vrsti mikotoksikogene plijesni (npr. *Fusarium* mikotoksini, *Aspergillus* mikotoksini) [10,11].

Najučestalije utvrđene vrste plijesni koje produciraju mikotoksine (Tablica 2) u/na hrani pripadaju rodovima *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, ali i *Alternaria* te *Cladosporium* [12]. Ako se u obzir uzme vrijeme u kojem se odvija kontaminacija biljke ili ploda, plijesni se mogu podijeliti na: plijesni s polja (rodovi *Alternaria*, *Helminthosporium*, *Cladosporium* i *Fusarium*), skladišne plijesni (rodovi *Penicillium* i *Aspergillus*) te plijesni uznapredovanog kvarenja (rodovi *Papulospora*, *Sordaria*, *Mucor*, *Chaetomium* i *Rhizopus*) [13].



Slika 1: Plijesni roda *Fusarium*. Izvor: <https://veterina.com.hr/?p=68170>

Tablica 2: Najvažniji mikotoksini i toksikogene plijesni koje proizvode mikotoksine. Izvor: izrada autora prema: [14-17]

Mikotoksini	Mikotoksikogene plijesni
Aflatoksini	<i>Aspergillus flavus, A. parasiticus</i>
Citrinin	<i>Aspergillus terreus, A. carneus, Monascus ruber, M. purpureus, P. citrinum, P. odoratum, P. radicialis, P. verrucosum</i>
Deoksinivalenol	<i>Fusarium graminearum, F. culmorum, F. pseudograminearum</i>
Fumonizini	<i>Fusarium verticillioides, F. proliferatum, F. nygamai, F. napiforme, F. thapsinum, F. anthophilum, F. dlamini</i>
Okratoksin A	<i>Aspergillus affinis, A. albertensis, A. allianceus, A. welwitschiae, A. carbonarius, A. cretensis, A. flocculosus, A. lacticoffeatus, A. niger, A. ochraceus, A. pseudoelegans, A. roseoglobulosus, A. sclerotiorum, A. sclerotium, A. steinii, A. sulphureus, A. westerdijkiae, Neopetromyces muricatus, Penicillium nordicum, P. verrucosum</i>
Patulin	<i>Aspergillus clavatus, A. giganteus, A. longivesia, Paecilomyces filvus, P. niveus, P. saturatus, Penicillium antarcticum, P. carneum, P. clavigerum, P. compactum, P. concentricum, P. coprobium, P. dipodomycicola, P. expansum, P. gladioli, P. glandicola, P. griseofulvum, P. marinum, P. novae-zeelandiae, P. paneum, P. psychrosexualis, P. samsonianum, P. sclerotigenum, P. vulpinum, Xylaria longiana</i>
Zearalenon	<i>Fusarium graminearum, F. culmorum, F. equiseti, F. crookwellense</i>
Ergot alkaloidi	<i>Claviceps purpurea, C. paspali</i>
T-2 i HT-2 toksin	<i>Fusarium sporotrichioides, F. langsethiae, F. poae, F. sambucinum</i>

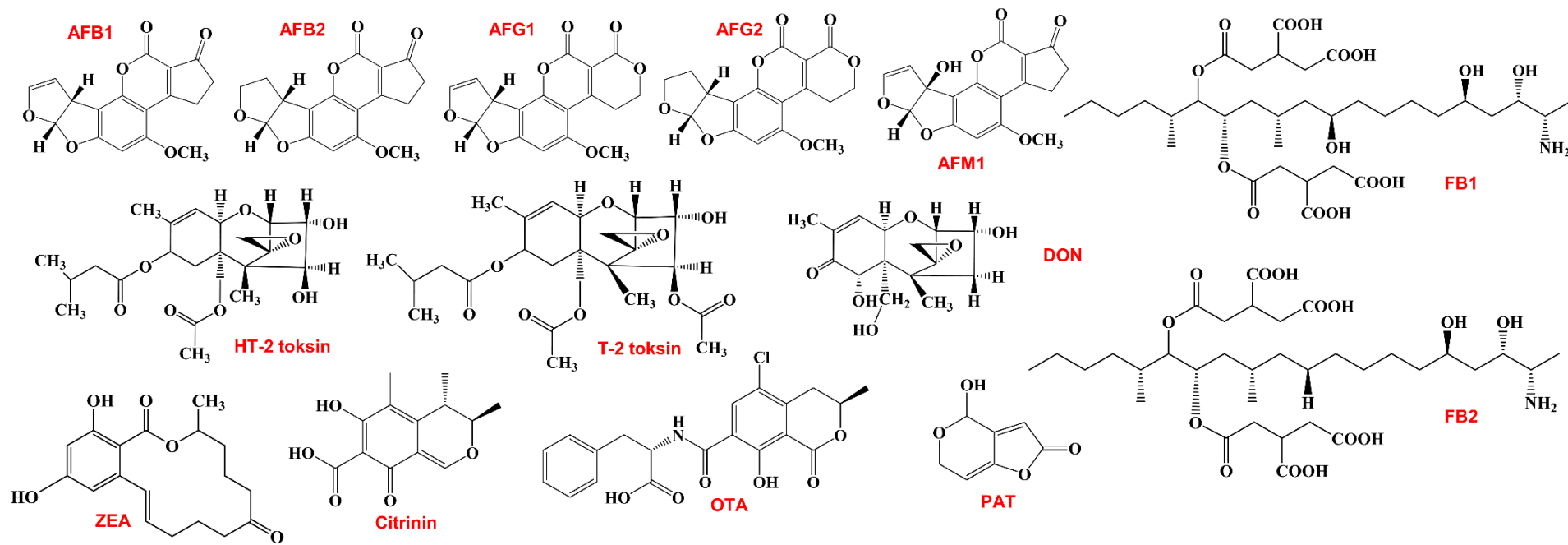
Aflatoksini su prvi izolirani mikotoksini koji su otkriveni sredinom 20. stoljeća nakon pomora pernatih životinja koje su konzumirale hranu kontaminiranu aflatoksikogenim plijesnima [10]. Ovi mikotoksini se ponajviše povezuju s oštećenjima jetre [18], a Međunarodna agencija za istraživanje raka (IARC) je aflatoksine (uključujući AFB1, AFG1, AFM1) svrstala u skupinu 1, kao dokazane karcinogene [19].

Ohratoksin A je najtoksičniji i najučestaliji predstavnik skupine ohratoksina [20]. Otkriven je kao metabolit plijesni *Aspergillus ochraceus*, a može ga se pronaći u zobi, ječmu, pšenici, zrnju kave i drugim proizvodima za ljudsku i životinjsku potrošnju [21]. Međunarodna agencija za istraživanje raka je svrstala OTA u skupinu mogućih karcinogena (kategorija 2B) [22].

Fusarium (fuzarijski) mikotoksini su česti onečišćivači ljudske hrane i hrane za životinjske vrste, prvobitno žitarica i proizvoda od žitarica [23]. Većina plijesni roda *Fusarium* može proizvesti više različitih mikotoksina u različitim količinama [24]. Najvažniji fuzarijski mikotoksini u žitaricama i proizvodima od žitarica su: zearalenon (kukuruz, pšenica), deoksinivalenol (pšenica, kukuruz, raž), fumonizini (kukuruz) te T-2/HT-2 toksini (zob, pšenica, ječam) [23].

2.2.1. Zakonski regulirani mikotoksini

Najveće dozvoljene koncentracije (NDK) koje su propisane za pojedinačni mikotoksin zasnivaju se na znanstvenim čimbenicima kao što su toksikološki podaci i podaci o pojavnosti, ali također se uzima u obzir i stvarni udio mikotoksina koji se nalazi u poljoprivrednim proizvodima [25]. Najznačajnijim mikotoksinima, s obzirom na pojavnost i toksično djelovanje, se smatraju: AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, DON, FB1, FB2, ZEA, T-2, HT-2 i OTA, citrinin (CIT), patulin (PAT) te ergot alkaloidi. Unutar Europske Unije su NDK vrijednosti u pojedinačnim prehrambenim proizvodima regulirane sukladno Uredbi (EZ) br. 1831/2003 [26] i Preporuci 2013/165/EU [27]. Akti Europske Unije o mikotoksinima su preuzeti u zakonodavstvo Republike Hrvatske Zakonom o kontaminantima NN 39/2013 (s izmjenama i dopunama) [28]. Slika 2 daje prikaz strukture nekih od mikotoksina koji su regulirani zakonom.



Slika 2: Strukture nekih zakonski reguliranih mikotoksina. Izvor: preuzeto iz [10].

2.3. Pojavnost mikotoksina i klimatske promjene

Klimatske promjene dovode u pitanje zdravstvenu ispravnost hrane. Biosinteza mikotoksina povezana je s čimbenicima kao što su temperatura, relativna vlažnost zraka te količina oborina, a koji su pod utjecajem klimatskih promjena [5].

Prema predviđanjima, kad posljedice klimatskih promjena nastupe u dovoljnoj velikoj mjeri, utjecat će na geografsku preraspodjelu populacije mikotoksikogenih plijesni i promjene u obrascima proizvodnje mikotoksina. Tako se s povišenjem temperature na kopnu očekuje pomicanje bolesti i štetnika prema sjevernoj geografskoj širini [30].

Prema Paterson i Lima [31], osnovne premise učinaka klimatskih promjena na pojavnost mikotoksikogenih plijesni i mikotoksina su:

- Migracija termo tolerantnih plijesni (na primjer *A. flavus*) iz regija tropske klime u regije gdje je klima umjerena;
- Problema s mikotoksinima neće biti jer će postojati regije gdje usjevi neće više rasti;
- U regijama u kojima će temperatura zraka biti iznad 41°C aflatoksikogene plijesni će zamijeniti termofilne.

Prema rezultatima istraživanja utjecaja klime na rast mikotoksikogenih plijesni i proizvodnju mikotoksina koje su proveli Medina i sur. [32], na rast plijesni i proizvodnju mikotoksina utječe stres koji je uzrokovan nedostatkom vode i visokom temperaturom, što znači da bi pri višim temperaturama zraka i nedostatku oborina produkcija mikotoksina bila manja nego u slučaju velikih oborina [5].

2.4. Metode analize mikotoksina

Budući da različiti mikotoksini imaju različita fizikalno-kemijska svojstva, jedna metoda za njihovo određivanje uglavnom nije dovoljna, zbog čega je razvijen velik broj metoda za analizu [5]. Obzirom na toksičnost mikotoksina pri niskim koncentracijama, pouzdane i osjetljive analitičke metode su uvelike potrebne u kontrolama koje za cilj imaju očuvanje zdravlja ljudi te smanjenje ekonomske štete u poljoprivredi [33]. Metode za analizu mikotoksina grupiraju se u orijentacijske i potvrdne metode, a dijele se i na kvalitativne i kvantitativne metode [5].

Od orijentacijskih metoda u određivanju mikotoksina najčešće se koristi enzimsko-imunokemijska metoda (ELISA). Neke prednosti orijentacijskih metoda su jednostavnost te mogućnost analize većeg broja uzoraka u kratko vrijeme [5]. Također, osim orijentacijskih metoda postoje i potvrdne metode. Potvrdne metode su selektivne metode koje zahtijevaju kvalitetniju laboratorijsku opremu s ciljem osiguranja podataka o kemijskoj strukturi analita. U takve svrhe mogu se koristiti tehnike kao što su: tekućinska kromatografija (LC) i plinska kromatografija (GC) s različitim konvencionalnim detektorima ili tekućinska kromatografija u kombinaciji sa spektrometrijom masa (MS) kao detekcijskom tehnikom [5].

Kvalitativnim metodama se utvrđuje prisutnost određenog analita u uzorku, dok se kvantitativnim metodama utvrđuje njegova koncentracija. Bilo koja metoda koja se koristi trebala bi imati nisku granicu detekcije, odnosno biti dovoljno specifična da se odrede niske koncentracije mikotoksina te imati prihvatljivo iskorištenje analitičkog postupka [11].

2.4.1. ELISA

ELISA je najčešće korištena orijentacijska metoda u kontroli određenih spojeva i njihovih rezidua u životinjama i proizvodima životinjskog podrijetla. ELISA-om se određuje i prisutnost i količina antigena (analita) u uzorku, a reakcija ove metode temeljena je na vezanju antitijela i antigena iz uzorka, te spektrofotometrijskom mjerenju nastale reakcije do koje dolazi zbog promjene boje. Potrebno je istaknuti da se ova metoda može koristiti uglavnom za detekciju samo jednog mikotoksina, a sam ELISA kit predviđen je za jednokratnu upotrebu. Značajne prednosti ELISA metode ogledaju se upravo u jednostavnosti i brzini njezina obavljanja [11,34,35].

2.4.2. Kromatografske metode

Kromatografske metode služe za kvantitativno određivanje mikotoksina, a tehnike koje se pri tome najčešće koriste su tekućinska i plinska kromatografija u kombinaciji s različitim detektorima, poželjno spektrometrom masa. Kromatografske metode zahtijevaju opsežniju pripremu uzoraka što omogućuje određivanjem većeg broja spojeva u niskim koncentracijama, a koriste se i kao referentne metode za provjeru ELISA metoda [5].

U Tablici 3 navedene su neke od prednosti i nedostataka ovih analitičkih metoda. Prednosti kromatografskih metoda su točnost i selektivnost te takve metode omogućuju analizu više različitih mikotoksina. S druge strane, jedan veliki nedostatak je što su te metode vrlo skupe.

Tablica 3: Pozitivne i negativne strane analitičkih metoda kod određivanja mikotoksina.

Izvor: izrada autora prema [36].

Metoda	Pozitivne strane	Negativne strane
Plinska kromatografija	Dobra osjetljivost metode Potvrдна metoda Mogućnost automatizacije	Potrebna derivatizacija Skupa oprema Mogući <i>carry-over</i> efekt
Tekućinska kromatografija	Dobra osjetljivost, selektivnost i ponovljivost metode Mogućnost automatizacije Kratko vrijeme trajanja analize	Skupa oprema Mogućnost potrebe za derivatizacijom Potrebno znanje i vještine stručnjaka
Tekućinska kromatografija u sprezi sa spektrometrijom masa	Simultano određivanje više mikotoksina Dobra osjetljivost metode Potvrдна metoda Mogućnost automatizacije	Vrlo skupa oprema Potrebne znanje i vještine stručnjaka
ELISA	Dobra osjetljivost metode Pogodna kao <i>screening</i> metoda Simultano određivanje više mikotoksina Jeftina metoda	Unakrsna reaktivnost sa sličnim mikotoksinima Mogućnost interferencija u matriksu Mogući lažni pozitivni ili negativni rezultati Potrebna potvrдна metoda

2.4.2.1. Plinska kromatografija

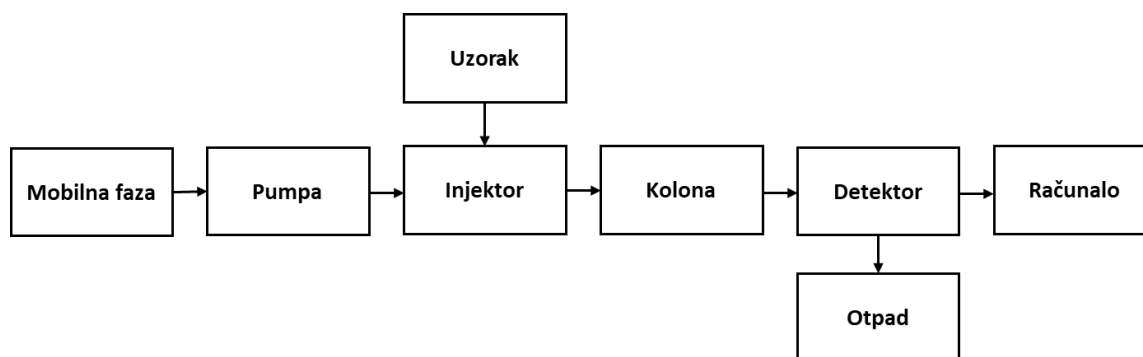
Plinska kromatografija je analitička tehnika koja se koristi za odvajanje i analizu uzoraka koji mogu isparavati bez termičke razgradnje [37]. Iako uzorak u plinski kromatograf ulazi kao tekućina, na kraju isparava u plinsku fazu. Postoje različiti detektori koji se koriste za plinsku kromatografiju, primjerice plameno-ionizacijski detektor, detektor hvatanja elektrona, detektor toplinske vodljivosti ili fotoionizacijski detektor.

Plinska kromatografija primjenjuje se kod određivanja mikotoksina, većinom u sprezi sa spektrometrom masa, plameno-ionizacijskim detektorom ili detektorom infracrvene spektroskopije s Fourierovom transformacijom za spojeve poput trihotecena ili PAT-a [9]. Zbog male hlapivosti te visoke polarnosti velikog broja mikotoksina, analize plinskom kromatografijom učestalo zahtijevaju derivatizaciju pa se ova tehnika rijetko koristi [35, 38].

2.4.2.2. Tekućinska kromatografija

Tekućinska kromatografija je osnovna separacijska tehnika koja se rabi u novijim biološkim znanostima i istovrsnim područjima molekularne biologije poput analitičke ili preparativne kemija. Tvari iz otopina stupaju u dodir s nepokretnom i tekućom pokretnom fazom zbog razlika u adsorpciji, ionskoj izmjeni, razdiobi među fazama ili veličini tvari koje se razdvajaju te imaju različito vrijeme zadržavanja na kromatografskoj koloni [39].

Sustav za tekućinsku kromatografiju ima više dijelova: sustav za dobavu mobilne faze (pumpa) i spremnik, sustav za injektiranje, analitička kolona i kućište za kolonu, detektor te sustav za prikupljanje podataka i kontrolu [39,40]. Središte tekućinskog kromatografa (Slika 3) je analitička kolona za razdvajanje analita iz smjese.



Slika 3: Pojednostavljena blok shema tekućinskog kromatografa. Izvor: preuzeto iz [10].

Najpoželjnija metoda/tehnika za određivanje kontaminanata i mikotoksina je spregnuta tehnika tekućinske kromatografije i (tandemske) spektrometrije masa (LC-MS/MS) [10]. Takav sustav omogućava razdvajanje smjese u komponente i njihovu analizu na temelju omjera mase i naboja (m/z) nabijenih čestica [40]. Ova analitička metoda omogućuje također i kvalitativnu analizu: snimanje spektra uzorka, određivanje molekulske mase spoja, analizu fragmentacije pojedinog molekuskog iona te određivanje prekursora određenog fragmenta [41].

2.5. Priprema uzorka za analizu mikotoksina

2.5.1. Uzorkovanje

Prema Uredbi Komisije (EZ) br. 401/2006 [42], tijekom uzorkovanja i pripreme uzoraka, moraju se poduzeti mjere da bi se izbjegle bilo kakve promjene koje mogu utjecati na koncentraciju mikotoksina te općenito nepovoljno utjecati na analitičko određivanje ili učiniti skupne uzorke nereprezentativnima. Koliko je god to moguće, pojedinačni uzorci se skupljaju s različitih mjesta raspoređenih unutar cijele serije ili podserije [42]. Zbog neravnomjerne distribucije mikotoksina unutar serije proizvoda [43,44], moguće su poteškoće vezane uz prikupljanje reprezentativnih uzoraka, stoga treba pažljivo provesti plan uzorkovanja [35].

2.5.2. Ekstrakcija i pročišćavanje

Ekstrakcija je postupak odvajanja sastojka iz smjese, koji se bazira na razlici u topljivosti tvari u raznim otapalima koja se ne miješaju [45]. Za postupak ekstrakcije mikotoksina se koristi uglavnom smjesa organskih otapala, ponekad uz dodatak modifikatora kao što su kiseline [43].

Nakon postupka ekstrakcije slijedi pročišćavanje ekstrakta [38]. Za analizu pojedinačnih mikotoksina ili grupa mikotoksina koriste se razne metode pročišćavanja koje uključuju primjerice tekućinsko-tekućinsku ekstrakciju (LLE) ili ekstrakciju na čvrstoj fazi (SPE). Komercijalno su dostupne SPE kolone s različitim punilima, čija upotreba ovisi o samom analitu, ali i vrsti uzorka te korištenom otapalu. Najspecifičnije pročišćavanje omogućuju imunoafinitetne kolone (IAC) koje sadrže antitijela specifična za točno određeni mikotoksin [10,38]. U novije vrijeme čestu primjenu ima i tzv. QuEChERS (eng. Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe) postupak, inicijalno razvijen za potrebe analize rezidua pesticida [10,46].



Slika 4: Primjer SPE kolone. Izvor: www.labsertchemical.com



Slika 5: Primjer IAC kolone. Izvor: <https://www.viams.net/hr/prodajni-program-hr/mikotoksini/imunoafinitetne-kolone/>



Slika 6: Primjer materijala za QuEChERS postupak. Izvor: <https://www.hawach.com/quechers/quechers-extraction-salts.html>

2.5.4. Mikrofiltracija

Mikrofiltracija je proces niskotlačne membranske filtracije kojim se pomoću membrana različite poroznosti (0,1-10 μm) uklanjaju čestice suspendirane u tekućem mediju [47]. Mikrofiltracija se primjenjuje u raznim područjima kao što su: obrada vode, sterilizacija, procesiranje hrane i sl., ali i u analitici kao korak u pripremi uzoraka za provođenje metoda određivanja poželjnih i nepoželjnih spojeva. Primjena filtracije kao dijela analitičkog postupka upotrebom tzv. *syringe* filtera (filtera za brizgalice), prikazanih na Slici 6, najčešće veličine pora 0,22 μm , omogućuje uklanjanje krutih čestica uzorka, štiti instrument i smanjuje nepoželjni utjecaj matrice na analitičko određivanje [48].



Slika 7: Brizgalice i filteri (lijevo) te filtriranje upotrebom *syringe* filtera (desno).

Izvori: <https://www.ddbiolab.com/frontoffice/article/051375> <https://www.chromtech.com/how-to-choose-a-syringe-filter>

3. Praktični dio

U praktičnom dijelu cilj ovog završnog rada je bio ispitati utjecaj različitih materijala membrana tzv. *syringe* filtera, odnosno filtera za brizgalice, koji se uobičajeno preporučuju za kromatografske analize u fazi pripreme uzoraka, na iskorištenje 11 odabranih zakonski reguliranih mikotoksina, uključujući AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, DON, FB1, FB2, ZEA, T-2, HT-2, te OTA.

3.1. Materijali i kemikalije

U eksperimentu je korišteno pet različitih materijala filtera: najlon (NY), politetrafluoretilen (PTFE), polietersulfon (PES), miješani celulozni ester (MCE) i celulozni acetat (CA), veličine pora 0,22 μm . Korišteni filteri prikazani su na Slici 8. Također, potrebne su bile plastične brizgalice volumena 5 ml te različite klipne pipete promjenjivog volumena.



Slika 8: *Syringe* filteri različitih materijala korišteni za eksperiment. Izvor: autor.

Od kemikalija bili su potrebni: ultračista voda, acetonitril (J.T. Baker, Nizozemska) mravlja kiselina LC-MS kvalitete (Sigma-Aldrich, SAD) te certificirani analitički standardi mikotoksina (RomerLabs, Austrija).

3.2. Metode

Za eksperiment je bila potrebna kombinirana otopina standarda 11 mikotoksina pripremljena razrjeđivanjem osnovne otopine koristeći ultračistu vodu, acetonitril i mravlju kiselinu (49,5/49,5/1, v/v/v) za konačne koncentracije analita između 0,125 i 50 ng/mL. Priprema otopina standarda mikotoksina prikazana je u Tablici 4.

Tablica 4: Priprema osnovne i razrijeđene kombinirane otopine mikotoksina. Izvor: autor.

Mikotoksin	Koncentracija analitičkog standarda mikotoksina ($\mu\text{g/mL}$)	Volumen standarda za pripremu 1000 μL osnovne kombinirane otopine* (μL)	Koncentracija osnovne kombinirane otopine (ng/mL)	Koncentracija razrijeđene kombinirane otopine mikotoksina (ng/mL) – razrjeđenje 100 \times
DON	100	50	5000	50
AFB1	2,0	25	50	0,5
AFB2	0,5	25	12,5	0,125
AFG1	2,0	25	50	0,5
AFG2	0,5	25	12,5	0,125
FB1	50	75	3750	37,5
FB2	50	75	3750	37,5
ZEA	100	7,5	750	7,5
T-2	100	2,5	250	2,5
HT-2	100	2,5	250	2,5
OTA	10	2,5	25	0,25
Volumen osnovne kombinirane otopine mikotoksina za pripremu 1000 μL razrijeđene otopine** – razrjeđenje 100 \times (μL)				10

*otapalo čisti acetonitril; **otapalo ultračista voda/acetonitril/mravlja kiselina (49,5/49,5/1, v/v/v)

Pripremljena razrijeđena kombinirana otopina mikotoksina filtrirana je upotrebom filtera različitih materijala na način da su se prikupljale prve tri kapi filtrata u jednu vijalu te ostatak u drugu vijalu. Oba filtrata svakog korištenog filtera te nefiltrirana otopina injektirani su u triplicatu u LC-MS/MS sustav prikazan na Slici 9 te analizirani validiranom instrumentalnom metodom.



Slika 9: Korišteni LC-MS/MS sustav: Acquity H-class Xevo TQ-S micro. Izvor: Waters, SAD

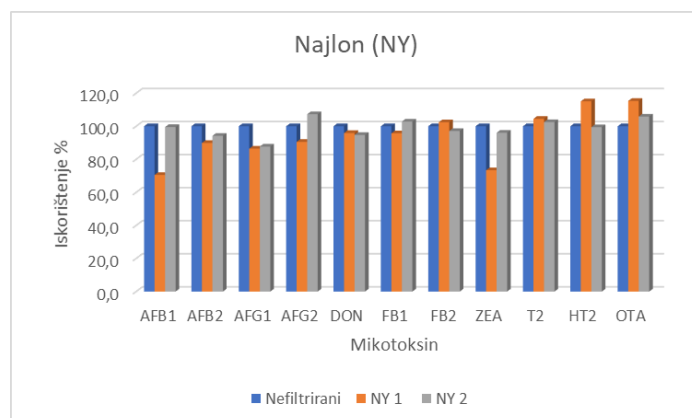
Iz dobivenih rezultata mjerenja površine pika svakog analita izraženo je iskorištenje svakog mikotoksina iz otopine upotrebom svake vrste materijala filtera (za svaki filter dvije vrijednosti iskorištenja, prva i druga vijala prema gornjem opisu) i to usporedbom srednjih vrijednosti izmjerenih površina pika analita u filtriranoj i nefiltriranoj otopini standarda, prema jednadžbi (1):

$$\text{Iskorištenje \%} = \frac{\text{Površina pika filtrirana otopina (vijala 1 ili 2)}}{\text{Površina pika nefiltrirana otopina}} \times 100 \quad (1)$$

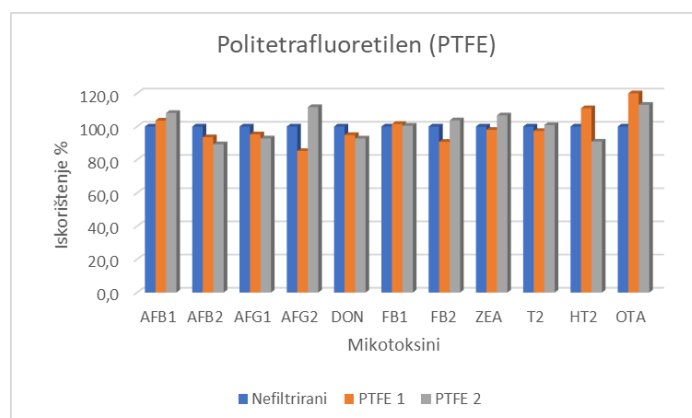
Rezultati iskorištenja za svaki mikotoksin te upotrijebljeni materijal filtera prikazani su stupičastim grafikonima u poglavlju 4.

4. Analiza rezultata

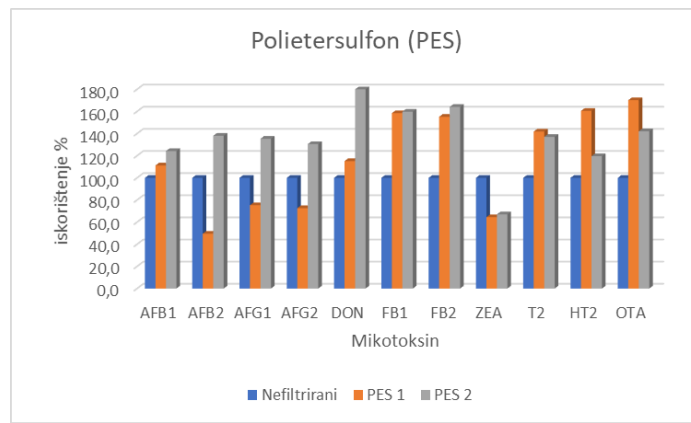
Slikama 10 – 14 prikazane su izračunate vrijednosti iskorištenja mikotoksina iz filtrirane otopine za svaku upotrijebljenu vrstu filtera (prvi dio filtrata - 1 i ostatak filtrata - 2) u odnosu na nefiltriranu razrijeđenu kombiniranu otopinu mikotoksina, čije je zadano iskorištenje 100%. Pri procjeni utjecaja različitih materijala na odabrane zakonski regulirane mikotoksine fokus je usmjeren na gubitak analita te smanjenje iskorištenja tijekom mikrofiltracije, odnosno vrijednosti niže od 100%.



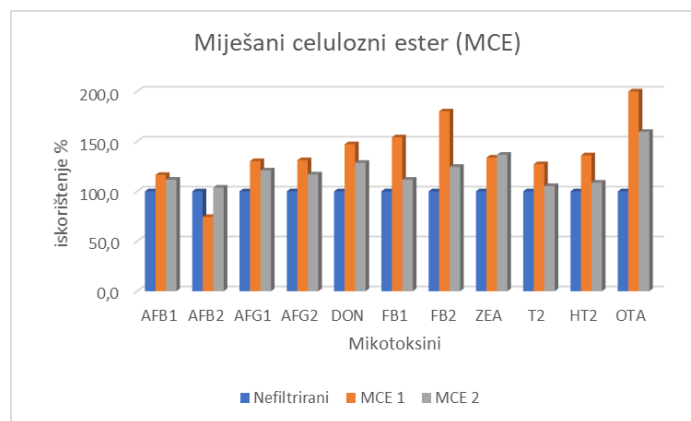
Slika 10: Iskorištenje mikotoksina upotrebom NY filtera



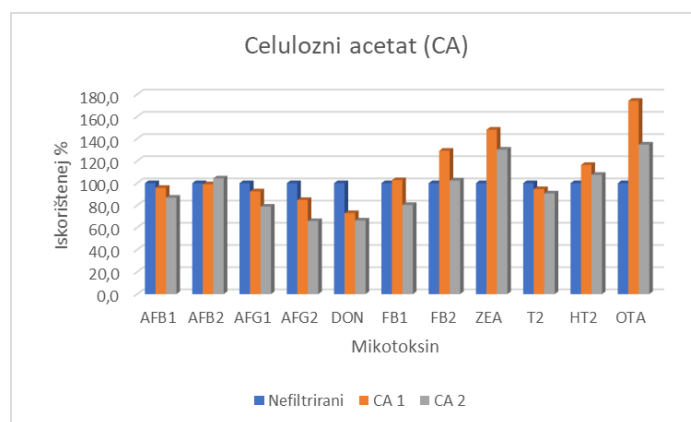
Slika 11: Iskorištenje mikotoksina upotrebom PTFE filtera



Slika 12: Iskorištenje mikotoksina upotrebom PES filtera



Slika 13: Iskorištenje mikotoksina upotrebom MCE filtera



Slika 14: Iskorištenje mikotoksina upotrebom CA filtera

Iz prikazanih rezultata vidljiv je značajan negativni utjecaj određenih vrsta materijala membrana *syringe* filtera na iskorištenje ispitivanih mikotoksina, te značajna razlika između prvih kapi filtrata (1) te ostatka filtrata (2). Iskorištenja niža od 100% zabilježena su uglavnom u prvim kapima filtrata dobivenih različitim filterima: u prvom dijelu NY filtrata za AFB1 i ZEA (NY 1), za AFB2, AFG1, AFG2 i ZEA u prvom dijelu PES filtrata (PES 1), za AFB2 u prvom dijelu MCE filtrata (MCE 1) te za DON u prvom dijelu CA filtrata (CA 1). Značajno sniženje iskorištenja mikotoksina u ostatku filtrata zabilježeno je tek za ZEA u PES filtratu (PES 2) te AFG1, AFG2, DON i FB1 u CA filtratu (CA 2).

U usporedbi s ostalim materijalima, jedino PTFE nije uzrokovao značajan gubitak iskorištenja niti jednog analiziranog mikotoksina, pri čemu je prosječno iskorištenje svih mikotoksina prvog dijela filtrata iznosilo $99,8 \pm 11,1\%$, a ostatka $101,0 \pm 8,5\%$.

5. Zaključak

Značajna pojavnost mikotoksina na svjetskoj razini, posebno uz promjenjive vremenske uvjete i utjecaj klimatskih promjena, zahtjeva konstanto i kontinuirano praćenje njihovih koncentracija u različitim prehrambenim proizvodima. Pri tome je nužna upotreba pouzdanih analitičkih tehnika, kao što je LC-MS/MS, koja često zahtijeva korištenje mikrofiltracije tijekom pripreme uzorka, kako bi se, u prvom redu očuvao sam instrument, a onda i osigurala učinkovitost analitičkog postupka. Ipak, mogućnost interakcija materijala membrana korištenih filtera i mikotoksina, koji bi uzrokovali eventualne gubitke te utjecali na pogreške u određivanju razine kontaminacije mikotoksinima, nisu dovoljno ispitane.

Rezultati praktičnog dijela rada otkrivaju da PTFE filteri najmanje utječu na gubitak mikotoksina tijekom mikrofiltracije, dok ostali materijali, uključujući često korištene NY filtere, mogu značajno doprinijeti smanjenju iskorištenja mikotoksina ukoliko se pravilno ne koriste. Naime, smanjenje iskorištenja većine mikotoksina primijećeno je u prvom dijelu filtrata, dok je ostatak filtrata sadržavao uglavnom zadovoljavajuće količine analiziranih mikotoksina. Prema tome, za točno određivanje koncentracija mikotoksina, osim odabira prikladnog materijala filtera zavisno od vrste uzorka, važno je da se prve kapi filtrata odbace, budući da služe za zasićenje materijala membrane filtera, što još jednom ukazuje na važnost adekvatnog razvoja i validacije analitičkih metoda kojima će se ispitati svi značajni čimbenici koji mogu utjecati na analitički postupak.

6. Literatura

- [1] Chu, F. S. Recent progress on analytical techniques for mycotoxins in feed stuffs. *Journal of animal science*, 70(12), 3950-3963, 1992
- [2] Moss, M. O. The environmental factors controlling mycotoxin formation. *Mycotoxins and animal foods*, 23, 37-56., 1991
- [3] Katalenić, M. Toksini *Fusarium* plijesni i drugi toksini (I. dio). *MESO: Prvi hrvatski časopis o mesu*, 6(5), 31-35, 2004
- [4] Magnoli, A. P., Poloni, V. L., & Cavaglieri, L. Impact of mycotoxin contamination in the animal feed industry. *Current Opinion in Food Science*, 29, 99-108, 2019
- [5] Kuveždić, T. Mikotoksini i utjecaj klimatskih promjena na njihovu produkciju (Diplomski rad, Sveučilište Zagreb), 2020
- [6] Shelby, R. A., White, D. G., & Bauske, E. M. Differential fumonis in production in maize hybrids. *Plant Disease*, 78(6), 582-584, 1994
- [7] Thiel, P. G., W. F. O. Marasas, E. W. Sydenham, G. S. Shephard, W. C. A. Gelderblom. The implications of naturally occurring levels of fumonisins in corn for human and animal health. *Mycopathologia* 117,3-9, 1992
- [8] Miller J. D. Factors affecting the occurrence of fumonisins in corn. Abstract of papers (p.21) International Conference on the toxicology of Fumonisin, June 28-30, 1999, Arlington, VA, 1999
- [9] Bacon C. W. i Nelson P. E. Fumonisin production in corn by toxigenic strains of *Fusarium moniliforme* i *Fusarium proliferatum*. *J. Food Prot.* 57(6), 514 -521, 1994
- [10] Kovač, M. Razvoj LC-MS/MS metode za određivanje reguliranih mikotoksina te njihova supojavnost u uzorcima hrvatskih žitarica (Doktorat, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. Prehrambeni fakultet, 2020
- [11] Pleadin, J., Vasilj, V., & Petrović, D. Mikotoksini: pojavnost, prevencija i redukcija. Sveučilište u Mostaru, 2018
- [12] Kocić-Tanackov, S. D., Dimić, G. R. Gljive i mikotoksini – kontaminanti hrane. *Hemijska industrija*, 67 (4), 639–653, 2013
- [13] Ožegović, L., Pepeljnjak, S. Mikotoksikoze. Zagreb, Školska knjiga, 1995

- [14] Frisvad, J. C., Thrane, U., Samson, R. A., Pitt, J. I. Important mycotoxins and the fungi which produce them. U: *Advances in food mycology*. Hocking, A. D., Pitt, J. I., Samson, R. A., Thrane, U. (ur.). Springer, Boston, MA, 3-31., 2006
- [15] Heperkan, D., Meric, B. E., Sismanoglu, G., Dalkiliç, G., Güler, F. K. Mycobiota, mycotoxigenic fungi, and citrinin production in black olives. U: *Advances in food mycology*. Hocking, A. D., Pitt, J. I., Samson, R. A., Thrane, U. (ur.). Springer, Boston, MA, 203-210, 2006
- [16] Wang, Y., Wang, L., Liu, F., Wang, Q., Selvaraj, J. N., Xing, F., Zhao, Y., Liu, Y. Ochratoxin A producing fungi, biosynthetic pathway and regulatory mechanisms. *Toxins*, 8 (3), 83, 2016
- [17] Frisvad, J. C. A critical review of producers of small lactone mycotoxins: patulin, penicillic acid and moniliformin. *World Mycotoxin Journal*, 11 (1), 73-100, 2018
- [18] Peraica M., Rašić D. i Glušić V. Utjecaj aflatoksina na zdravlje ljudi, 2014
- [19] 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
- [20] Delaš F: Mikrobni toksini. U: *Kemijske i fizikalne opasnosti u hrani*. HAH, Osijek, 2010.
- [21] Bošnjir J i sur. Određivanje ohratoksina A u bijelom i crnom vinu – *Med Jad*50(4):277-28, 2020
- [22] Leblanc J. C., Tard A., Volatier JL., Verger P. Estimated dietary exposure to principal food mycotoxins from the first French Total Diet Study. *Food Addit Contam* 22:652-672, 2005
- [23] Pleadin J i sur.: *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* 10 (1-2), 6-13, 2015
- [24] SCF (Scientific Committee on Food) Opinion of the Scientific Committee on Food on Fusarium toxins. Part 6: Group evaluation of T-2 toxin, HT-2 toxin, nivalenol and deoxynivalenol. European Commission, Brussels, 27 February 2002SCF/CS/CNTM/MYC/27 Final, 2002
- [25] 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

- [26] EC, European Commission: Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in food stuffs. Official Journal of the European Union, L364:5-24, 2006
- [27] 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
- [28] HS, Hrvatski sabor: Zakon o kontaminantima. Narodne novine 39/2013, 2013
- [29] MP, Ministarstvo poljoprivrede: Pravilnik o sigurnosti hrane za životinje. Narodne novine 102/2016, 2016
- [30] Van Der Fels-Klerx H. J., Liu C., Battilani P. Modelling climate change impacts on mycotoxin contamination. World Mycotoxin Journal. 9 (5): 717-726, 2016
- [31] Paterson R. R. M., Lima N. Thermophilic Fungi to Dominate Aflatoxigenic/Mycotoxigenic Fungi on Food under Global Warming. International Journal of Environmental Research and Public Health. 14, 199., 2017
- [32] Medina A., Akbar A., Baazeem A., Rodriguez A., Magan N. Climate change and mycotoxigenic fungi: impacts on mycotoxin production. Current opinion in food science. 5:99-104, 2015
- [33] Grec M. Mikotoksini u žitaricama žetve 2013. u Hrvatskoj. Diplomski rad. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. Poljoprivredni fakultet u Osijeku. Osijek, 2014
- [34] Petrić J. Imuno enzimske (ELISA) metode u analitici prehrambenih proizvoda, 2016
- [35] Alshannaq, A., Yu, J.-H. Occurrence, Toxicity, and Analysis of Major Mxcotoxins in Food. Int. J. Environ. Res.Public Health 14, 632-652, 2017
- [36] Krpan M. Primjena HPLC-MS/MS multi-mikotoksinske metode za određivanje mikotoksina koji se pojavljuju u pekmezu, Diplomski rad, 2019
- [37] EFerrit.com, Raspoloživo na: <https://hr.eferrit.com/plinska-kromatografija-sto-je-i-kako-funkcionira/> (pristupljeno 04.08.2022.)
- [38] Turner NW, Subrahmanyam S, Piletsky SA: Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. Analytica Chimica Acta, 632:168-180, 2009
- [39] Cindrić M, Marković A, Horvatić A: Sprengnute tehnike tekućinski kromatograf-spektrometar masa: osnove metodologije i primjene. Medicina, 45:218-232, 2009

- [40] 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
- [41] Institut Ruđer Bošković, Raspoloživo na: <https://www.irb.hr/Gospodarstvo/Usluge-i-ekspertize/Vezani-sustav-tekucinska-kromatografija-visokog-ucinka-spektrometrija-mase-hplc-ms-ms?fbclid=IwAR3Aq3YILvaA7oWDSJnlT62pa0CI4-GuxehNKGmc1s2Ua-pkn5sE9eYGqfM> (pristupljeno 05.08.2022.)
- [42] Uredba komisije (EZ) br. 1881/2006., Raspoloživo na: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/PDF/?uri=CELEX%3A32006R1881&from=EN&fbclid=IwAR27EJg70xbUfgZ1ddIsu-YxUVYrCvJv3t33dJu95zGL1wI-mKk3lSrHjow> (pristupljeno 06.08.2022.)
- [43] Krska R, Schubert-Ullrich P, Molinelli A, Sulyok M, MacDonald S, Crews: mycotoxin analysis: An update. Food Additives & Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment, 25(2):152-163, 2008
- [44] 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
- [45] Turčinović D.; Halasz I. Opća kemija 1. 2. izd. Zagreb: Školska knjiga, 2007
- [46] Anastassiades M., Lehotay S. J., Štajnbaher D., & Schenck F. J. 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), 412-431, 2003
- [47] Bird J. The application of membrane systems in the dairy industry, J. Soc. Dairy Technol. 49 (1) 16-23., 1996
- [48] Aichinger i sur. Microfiltration results in the loss of analytes and affects the in vitro genotoxicity of a complex mixture of *Alternaria* toxins, 2020

Popis slika:

Slika 1: Plijesni roda <i>Fusarium</i>	4
Slika 2: Strukture nekih zakonski reguliranih mikotoksina.	7
Slika 3: Pojednostavljena blok shema tekućinskogkromatografa	11
Slika 4:Primjer SPE kolone.....	13
Slika 5: Primjer IAC kolone.....	14
Slika 6: Primjer materijala zaQuEChERSpostupak.	14
Slika 7: Brizgalice i filteri (lijevo) te filtriranje upotrebom <i>syringe</i> filtera (desno).....	15
Slika 8: <i>Syringe</i> filteri različitih materijala korišteni za eksperiment..	16
Slika 9: Korišteni LC-MS/MS sustav: Acquity H-classXevo TQ-S micro.....	18
Slika 10: Iskorištenje mikotoksina upotrebom NY filtera	19
Slika 11: Iskorištenje mikotoksina upotrebom PTFE filtera	19
Slika 12: Iskorištenje mikotoksina upotrebom PES filtera	20
Slika 13: Iskorištenje mikotoksina upotrebom MCE filtera.....	20
Slika 14: Iskorištenje mikotoksina upotrebom CA filtera.....	20

Popis tablica:

Tablica 1: Bolesti ljudi koje se povezuju s mikotoksinima.....	3
Tablica 2:Najznačajniji mikotoksini i toksikogene plijesni koje ih proizvode	5
Tablica 3: Pozitivne i negativne strane analitičkih metoda za određivanje mikotoksina.....	10
Tablica 4: Priprema osnovne i razrijeđene kombinirane otopine mikotoksina	17



Sveučilište
Sjever



IZJAVA O AUTORSTVU
I
SUGLASNOST ZA JAVNU OBJAVU

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, Anto Mijatović (ime i prezime) pod punom moralnom, materijalnom i kaznenom odgovornošću, izjavljujem da sam isključivi autor/ica završnog/diplomskog (obrisati nepotrebno) rada pod naslovom Utlječaj mikrofiltracije na odabrane zakonski regulirane mikotoksine (upisati naslov) te da u navedenom radu nisu na nedozvoljeni način (bez pravilnog citiranja) korišteni dijelovi tuđih radova.

Student/ica:
(upisati ime i prezime)

Anto Mijatović
(vlastoručni potpis)

Sukladno 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.

Ja, Anto Mijatović (ime i prezime) neopozivo izjavljujem da sam suglasan/na s javnom objavom završnog/diplomskog (obrisati nepotrebno) rada pod naslovom Utlječaj mikrofiltracije na odabrane zakonski regulirane mikotoksine (upisati naslov) čiji sam autor/ica.

Student/ica:
(upisati ime i prezime)

Anto Mijatović
(vlastoručni potpis)

17.9%

Date: 2022-09-18 16:13 UTC

* All sources 100 * Internet sources 47 * Organization archive 11 * Plagiarism Prevention Pool 42

<input checked="" type="checkbox"/>	[0]	☞ repozitorij.ptfos.hr/islandora/object/ptfos:1986/datastream/PDF/View	8.6%	57 matches	1 documents with identical matches
<input checked="" type="checkbox"/>	[2]	☞ zir.nsk.hr/islandora/object/agr:1839/datastream/PDF/View	6.6%	35 matches	
<input checked="" type="checkbox"/>	[3]	☞ www.hah.hr/doc/prirucnik.doc	2.0%	14 matches	
<input checked="" type="checkbox"/>	[4]	☞ bib.irb.hr/datoteka/1001168.Zbornik...Proceedings_2019.pdf	1.2%	9 matches	
<input checked="" type="checkbox"/>	[5]	☞ docplayer.rs/190410963-Sveučilište-u-zagrebu-prehrambeno-biotehnoški-fakultet-diplomski-rad-1136-ush.html	1.6%	5 matches	
<input checked="" type="checkbox"/>	[6]	☞ "doktorat Jasenka.docx" dated 2020-01-19	1.2%	7 matches	
<input checked="" type="checkbox"/>	[7]	☞ hrcak.srce.hr/file/33937	1.2%	5 matches	
<input checked="" type="checkbox"/>	[8]	☞ www.bib.irb.hr/784372/download/784372.Zbornik_Peradarski_dani_2013.pdf	0.9%	6 matches	
<input checked="" type="checkbox"/>	[9]	☞ link.springer.com/article/10.1007/s11356-021-14146-4	0.8%	5 matches	
<input checked="" type="checkbox"/>	[10]	☞ www.veinst.hr/dokumenti/doc_download/16-broj-4	0.9%	9 matches	
<input checked="" type="checkbox"/>	[11]	☞ www.tehnologijahrane.com/enciklopedija/mikotoksini	1.0%	4 matches	
<input checked="" type="checkbox"/>	[12]	☞ zir.nsk.hr/islandora/object/jbfl:170/preview	0.9%	4 matches	
<input checked="" type="checkbox"/>	[13]	☞ www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5334753/	0.8%	6 matches	
<input checked="" type="checkbox"/>	[14]	☞ repozitorij.fazos.hr/islandora/object/ptfos:2004/datastream/PDF/View	0.7%	7 matches	
<input checked="" type="checkbox"/>	[15]	☞ eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32014H0663&from=DE	0.9%	3 matches	
<input checked="" type="checkbox"/>	[16]	☞ dabar.srce.hr/en/islandora/object/ptfos:1986	0.9%	3 matches	
<input checked="" type="checkbox"/>	[17]	☞ library.net/article/popis-literature-antifungal-eficacy-lactobacillus-spp-wheat-grain.zpgr994z	0.6%	6 matches	
<input checked="" type="checkbox"/>	[18]	☞ zir.nsk.hr/islandora/object/medri:4494/datastream/PDF/download	0.6%	5 matches	
<input checked="" type="checkbox"/>	[19]	☞ www.researchgate.net/publication/6883534_Comparison_of_An_Acetonitrile_Extractionpartitioning_and_Dispersive_Solid-phase_Extraction_Method_with_Classical_Multiresidue_Methods_for_t	0.9%	5 matches	
<input checked="" type="checkbox"/>	[20]	☞ www.irb.hr/Gospodarstvo/Usuge-i-ekspertize/Vezani-sustav-tekucinska-kromatografija-visokog-ucinka-spektrometrija-mase-hplc-ms-ms	0.9%	2 matches	
<input checked="" type="checkbox"/>	[21]	☞ apps.unizg.hr/ Rektorova-nagrada/javno/radovi/1052/preuzmi	0.4%	3 matches	
<input checked="" type="checkbox"/>	[22]	☞ core.ac.uk/download/pdf/270120302.pdf	0.4%	3 matches	
<input checked="" type="checkbox"/>	[23]	☞ "Balaić Patricia Seminarski rad - Brze metode za detekciju mikroorganizama.docx" dated 2022-04-21	0.4%	3 matches	
<input checked="" type="checkbox"/>	[24]	☞ "Završni_rad_ivana_Madar.pdf" dated 2021-08-12	0.4%	3 matches	
<input checked="" type="checkbox"/>	[25]	☞ www.mdpi.com/1660-4601/14/2/199	0.4%	2 matches	
<input checked="" type="checkbox"/>	[26]	☞ "Kinetika enzima katalaze - završni rad_BS.docx" dated 2022-09-05	0.4%	3 matches	
<input checked="" type="checkbox"/>	[27]	☞ from a PlagScan document dated 2020-11-18 10:26	0.3%	4 matches	
<input checked="" type="checkbox"/>	[28]	☞ zir.nsk.hr/islandora/object/pharma:1864/datastream/PDF/View	0.2%	3 matches	
<input checked="" type="checkbox"/>	[29]	☞ "Metode dokazivanja virusa u hrani E.Bogdanovic.docx" dated 2022-04-21	0.3%	1 matches	
<input checked="" type="checkbox"/>	[30]	☞ pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12723926/	0.4%	2 matches	
<input checked="" type="checkbox"/>	[31]	☞ www.fao.org/faolex/results/details/en/c/LEX-FAOC120806/	0.3%	1 matches	
<input checked="" type="checkbox"/>	[32]	☞ www.semanticscholar.org/paper/Comparison-of-an-acetonitrile-and-*dispersive-with-Diez-Traag/db14b12892c57c0bbe26e7666ec867cdd205fc00	0.4%	2 matches	
<input checked="" type="checkbox"/>	[33]	☞ www.bib.irb.hr/pretraga?operators=and 113 text[institution&report=1&link=true&gr_kategorija=dissertations_and_thesis&pgr_kategorija=dt-doctoral_dissertation dt-master_thesis dt-graduation_th	0.4%	1 matches	
<input checked="" type="checkbox"/>	[34]	☞ from a PlagScan document dated 2021-09-15 18:12	0.3%	3 matches	

2 documents with identical matches

✓ [37]	"Određivanje alergena badema i lješnjaka u uzorcima čokolade ELISA metodom_BS2.docx" dated 2022-07-13 0.3% 2 matches
✓ [38]	from a PlagScan document dated 2022-03-14 00:47 0.3% 3 matches 1 documents with identical matches
✓ [40]	from a PlagScan document dated 2020-09-13 10:30 0.3% 3 matches 1 documents with identical matches
✓ [42]	from a PlagScan document dated 2017-04-05 07:20 0.3% 3 matches
✓ [43]	repozitorij.pbf.unizg.hr/en/user/profile/mbz/273891 0.3% 1 matches
✓ [44]	core.ac.uk/download/pdf/232128433.pdf 0.2% 2 matches
✓ [45]	www.mdpi.com/2072-6651/8/3/83 0.3% 2 matches
✓ [46]	zir.nsk.hr/slandora/object/pbf.4057/datastream/PDF/download 0.2% 2 matches
✓ [47]	"Informiranost potrošača o nutritivnoj i zdravstvenoj vrijednosti bučinog ulja završni rad Ivana Barukčić.docx" dated 2022-09-06 0.2% 2 matches
✓ [48]	from a PlagScan document dated 2022-06-15 08:01 0.2% 2 matches
✓ [49]	from a PlagScan document dated 2022-05-27 07:50 0.2% 2 matches
✓ [50]	from a PlagScan document dated 2022-05-17 13:03 0.2% 2 matches
✓ [51]	from a PlagScan document dated 2022-05-17 10:56 0.2% 2 matches
✓ [52]	from a PlagScan document dated 2022-02-28 09:22 0.2% 2 matches
✓ [53]	from a PlagScan document dated 2022-02-10 10:00 0.2% 2 matches
✓ [54]	from a PlagScan document dated 2022-02-03 21:40 0.2% 2 matches
✓ [55]	from a PlagScan document dated 2022-01-15 23:40 0.2% 2 matches
✓ [56]	from a PlagScan document dated 2021-11-11 15:09 0.2% 2 matches
✓ [57]	"Mediteranska prehrana zadnja verzija1.docx" dated 2021-09-11 0.2% 2 matches
✓ [58]	from a PlagScan document dated 2021-09-05 17:10 0.2% 2 matches
✓ [59]	"Fizikalno - kemijska i tehnološka usporedba kefira i jogurta (10) (1).docx" dated 2021-07-12 0.2% 2 matches
✓ [60]	from a PlagScan document dated 2021-06-29 09:57 0.2% 2 matches
✓ [61]	"Fizikalno - kemijska i tehnološka usporedba kefira i jogurta.docx" dated 2021-06-25 0.2% 2 matches
✓ [62]	from a PlagScan document dated 2021-06-07 11:24 0.2% 2 matches
✓ [63]	from a PlagScan document dated 2021-05-13 15:49 0.2% 2 matches
✓ [64]	from a PlagScan document dated 2021-03-23 20:00 0.2% 2 matches
✓ [65]	from a PlagScan document dated 2021-02-19 00:50 0.2% 2 matches 1 documents with identical matches
✓ [67]	from a PlagScan document dated 2020-12-18 10:18 0.2% 2 matches 1 documents with identical matches
✓ [69]	from a PlagScan document dated 2020-09-10 07:02 0.2% 2 matches 3 documents with identical matches
✓ [73]	from a PlagScan document dated 2020-05-28 14:48 0.2% 2 matches
✓ [74]	from a PlagScan document dated 2019-12-27 16:38 0.2% 2 matches
✓ [75]	from a PlagScan document dated 2019-12-09 13:47 0.2% 2 matches
✓ [76]	from a PlagScan document dated 2019-10-14 08:25 0.2% 2 matches
✓ [77]	from a PlagScan document dated 2018-12-14 09:34 0.2% 2 matches
...	from a PlagScan document dated 2018-08-30 12:49

<input checked="" type="checkbox"/>	[78]	0.2% 2 matches
<input checked="" type="checkbox"/>	[79]	from a PlagScan document dated 2018-04-06 10:56 0.2% 2 matches 1 documents with identical matches
<input checked="" type="checkbox"/>	[81]	from a PlagScan document dated 2017-11-09 14:54 0.2% 2 matches
<input checked="" type="checkbox"/>	[82]	from a PlagScan document dated 2017-04-06 09:58 0.2% 2 matches 2 documents with identical matches
<input checked="" type="checkbox"/>	[85]	from a PlagScan document dated 2017-04-06 06:19 0.2% 2 matches
<input checked="" type="checkbox"/>	[86]	from a PlagScan document dated 2017-04-06 08:18 0.2% 2 matches
<input checked="" type="checkbox"/>	[87]	from a PlagScan document dated 2017-04-06 06:06 0.2% 2 matches
<input checked="" type="checkbox"/>	[88]	from a PlagScan document dated 2017-04-05 11:53 0.2% 2 matches
<input checked="" type="checkbox"/>	[89]	from a PlagScan document dated 2017-04-05 09:50 0.2% 2 matches 1 documents with identical matches
<input checked="" type="checkbox"/>	[91]	from a PlagScan document dated 2017-04-05 08:21 0.2% 2 matches
<input checked="" type="checkbox"/>	[92]	from a PlagScan document dated 2017-04-05 08:03 0.2% 2 matches
<input checked="" type="checkbox"/>	[93]	from a PlagScan document dated 2017-04-05 08:01 0.2% 2 matches
<input checked="" type="checkbox"/>	[94]	from a PlagScan document dated 2017-04-05 07:02 0.2% 2 matches
<input checked="" type="checkbox"/>	[95]	www.researchgate.net/publication/313834635_Thermophilic_Fungi_to_Dominate_AflatoxinigenicMycotoxinigenic_Fungi_on_Food_under_Global_Warming 0.2% 1 matches
<input checked="" type="checkbox"/>	[96]	www.mdpi.com/2076-0817/11/3/376/htrn 0.2% 2 matches
<input checked="" type="checkbox"/>	[97]	www.unios.hr/en/ 0.2% 2 matches
<input checked="" type="checkbox"/>	[98]	hr.wikipedia.org/wiki/Sveučilište_Josipa_Jurja_Strossmayera_u_Osijeku 0.2% 2 matches
<input checked="" type="checkbox"/>	[99]	www.unios.hr/ 0.2% 2 matches
<input checked="" type="checkbox"/>	[100]	en.wikipedia.org/wiki/University_of_Osijek 0.2% 2 matches
<input checked="" type="checkbox"/>	[101]	from a PlagScan document dated 2019-11-23 18:14 0.2% 2 matches
<input checked="" type="checkbox"/>	[102]	pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27007394/ 0.2% 2 matches
<input checked="" type="checkbox"/>	[103]	glosbe.com/hr/en/spektrometrija_masa 0.1% 1 matches
<input checked="" type="checkbox"/>	[104]	www.scienceopen.com/document?vid=f4b88e97-388c-47d4-a352-6d0539613553 0.2% 1 matches
<input checked="" type="checkbox"/>	[105]	pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16408603/ 0.2% 1 matches
<input checked="" type="checkbox"/>	[106]	www.researchgate.net/publication/7362757_Mycobiota_mycotoxinigenic_fungi_and_citrinin_production_in_black_olives 0.2% 1 matches
<input checked="" type="checkbox"/>	[107]	link.springer.com/chapter/10.1007/0-387-28391-9_13 0.2% 1 matches
<input checked="" type="checkbox"/>	[108]	www.scienceopen.com/document?vid=191751c1-3403-4cd0-a075-71a4cc4cd09a 0.2% 1 matches
<input checked="" type="checkbox"/>	[109]	"Učjecaj čajne baze na tijek fermentacije te na antimikrobnu i antioksidativnu aktivnost kombuche.docx" dated 2021-09-09 0.1% 1 matches 3 documents with identical matches
<input checked="" type="checkbox"/>	[113]	from a PlagScan document dated 2019-04-25 10:11 0.2% 1 matches
<input checked="" type="checkbox"/>	[114]	eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/HTML/?uri=CELEX:32018R0782&from=EN 0.1% 1 matches
<input checked="" type="checkbox"/>	[115]	www.academia.edu/17349586/Old_and_new_concepts_of_species_differentiation_in_AspERGILLUS 0.1% 1 matches
<input checked="" type="checkbox"/>	[116]	journalseek.net/cgi-bin/journalseek/journalsearch.cgi?field=issn&query=1847-3423 0.2% 1 matches

36 pages, 5307 words

PlagLevel: 17.9% selected / 17.9% overall

106 matches from 117 sources, of which 48 are online sources.

Settings

Data policy: *Compare with web sources, Check against my documents, Check against my documents in the organization repository, Check against organization repository, Check against the Plagiarism Prevention Pool*

Sensitivity: *Medium*

Bibliography: *Bibliography excluded*

Citation detection: *Reduce PlagLevel*

Whitelist: --