

Kvantitativno određivanje glifosata i njegovih metabolita vezanim sustavom tekućinska kromatografija-spektrometrija masa u hrani životinjskog podrijetla

Denžić Lugomer, Marija

Doctoral thesis / Disertacija

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:786969>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-02**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Marija Denžić Lugomer

**Kvantitativno određivanje glifosata i njegovih
metabolita vezanim sustavom tekućinska
kromatografija-spektrometrija masa u hrani
životinjskog podrijetla**

DOKTORSKI RAD

Mentor:
Dr. sc. Nina Bilandžić

Zagreb, 2021.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Marija Denžić Lugomer

Quantitative determination of glyphosate and its metabolites by liquid chromatography-mass spectrometry in food of animal origin

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor:
Dr. Nina Bilandžić

Zagreb, 2021.

Teško je riječima opisati put izrade moje doktorske disertacije. Konačno nakon svih uspona i padova, nakon što je čamac već jednom potonuo, došla sam i do tog cilja. No, toga svega ne bi bilo da nije bilo osoba koje su mi omogućile da prođem taj put.

Ovim putem htjela bih zahvaliti predstojnicima Veterinarskog zavoda Križevci i ravnateljima Hrvatskog veterinarskog Instituta što su mi omogućili odlazak na doktorski studij i izradu disertacije. Hvala akademiku Željku Cvetniću na razumijevanju i podršci.

Veliko hvala mojoj mentorici dr.sc. Nini Bilandžić što je vjerovala u mene i moj rad i bila mi podrška od prvih dana.

Veliko hvala i mojim dvjema personama koje mi nikad nisu dale da odustanem i posustanem.

Veliko hvala i mojoj obitelji, posebice svekrvi na svim molitvama, bezrezervnoj podršci, razumijevanju i čuvanju Paule.

Hvala mom suprugu što je vjerovao u mene i poticao me na ovo od prvog dana.

Posvećeno jednoj maloj budućoj kemičarki

Sadržaj

SAŽETAK.....	XI
ABSTRACT	XIII
§ 1. UVOD	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	4
2.1. Pesticidi	4
2.2. Herbicid glifosat	7
2.2.1. Sinteza glifosata	9
2.2.2. Formulacije glifosata	12
2.2.3. Metabolizam glifosata	13
2.2.4. Način djelovanja	14
2.2.5. Utjecaj na ljudsko zdravlje	16
2.2.6. Distribucija glifosata i njegovih metabolita u životinjskim tkivima	17
2.2.7. Kontrola ostataka glifosata u hrani životinjskog podrijetla	19
2.3. Metodologija određivanja glifosata	24
2.3.1. Analitičke metode za određivanje pesticida	24
2.3.1.1. Postupci pripreme uzoraka za analizu glifosata i njegovih metabolita u hrani životinjskog podrijetla	24
2.3.1.2. Instrumentalne tehnike za određivanje pesticida	31
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	35
3.1. Materijali	35
3.2. Metode	39
3.2.1. Tekućinska kromatografija vezana sa spektrometrijom mase	39
3.2.2. Postupci pripreme uzoraka	40
3.2.2.1. Postupci pripreme uzoraka masnog tkiva	40
3.2.2.2. Postupci pripreme uzoraka jetre	40
3.2.2.3. Postupci pripreme uzoraka mlijeka	41
3.2.2.4. Postupci pripreme uzoraka jaja	41
3.2.2.5. Postupci pripreme uzoraka meda	41
3.2.3. Validacija metoda	42
3.2.4. Mjerna nesigurnost	44
3.2.5. Primjena razvijenih metoda na realne uzorke	45
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	47
4.1. Optimiranje instrumentalnih uvjeta	47
4.2. Optimiranje kromatografskih uvjeta za odjeljivanje glifosata i njegovih metabolita	49
4.3. Postupci ekstrakcije glifosata i njegovih metabolita u različitim vrstama hrane životinjskog podrijetla	60
4.4. Validacija metoda	71

4.5. Mjerna nesigurnost	83
4.6. Analiza uzoraka	84
§ 5. ZAKLJUČAK	86
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA	89
§ 7. LITERATURNI IZVORI	91
§ 8. DODATAK	96
§ 9. ŽIVOTOPIS	103



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska
disertacija

SAŽETAK

KVANTITATIVNO ODREĐIVANJE GLIFOSATA I NJEGOVIH METABOLITA VEZANIM SUSTAVOM TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA-SPEKTROMETRIJA MASA U HRANI ŽIVOTINJSKOG PODRIJETLA

Marija Denžić Lugomer

Hrvatski veterinarski institut, Veterinarski zavod Križevci, Ivana Zakmardija Dijankovečkoga
10, 48260 Križevci, Hrvatska

Razvijena je metoda za kvantitativno određivanje ostataka glifosata i njegovih metabolita AMPA, N-acetil-AMPA i N-acetil-glifosat vezanim sustavom tekućinska kromatografija spektrometrija masa u masnom tkivu, jetri, jajima, mlijeku i medu. Analiti su ekstrahirani iz uzoraka sa 1 % mravljom kiselinom u vodi (v/v). Predloženi analitički postupci validirani su u skladu sa smjernicama SANTE/12682/2019 pri čemu su provedene validacije na svim matricama kroz određivanje granica kvantifikacije, preciznosti i točnosti. Preciznost, izražena kao relativna standardna devijacija, bila je <20 %, dok je točnost, izražena kao analitički povrat, bila u rasponu od 70 % do 120 %. U okviru validacije metoda procijenjena je mjerna nesigurnost koja je bila <50 % za sve analite. Predloženim analitičkim postupcima analizirano je 60 uzoraka hrane životinjskog podrijetla.

(106 stranica, 26 slika, 17 tablica, 87 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102a, Zagreb i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Ključne riječi: AMPA / glifosat/ hrana životinjskog podrijetla / LC-MS/MS / N-acetil-AMPA/ N-acetil-glifosat /

Mentor: dr. sc. Nina Bilandžić, znan. sav.

Rad prihvaćen: [dan sjednice Vijeća KO PMF]

Ocjenitelji:

1. Prof. dr. sc. Nives Galić
2. Dr. sc. Nina Bilandžić, zn. savj.
3. Izv. prof. dr.sc. Ivana Kmetič



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

QUANTITATIVE DETERMINATION OF GLYPHOSATE AND ITS METABOLITES BY LIQUID CHROMATOGRAPHY - MASS SPECTROMETRY IN FOOD OF ANIMAL ORIGIN

Marija Denžić Lugomer
Croatian Veterinary Institute, Veterinary Department Križevci, Ivana Zakmardija
Dijankovečkoga 10, 48260 Križevci, Croatia

A method for the quantitative determination of glyphosate residues and its metabolites AMPA, N-acetyl-AMPA and N-acetyl-glyphosate by liquid chromatography - mass spectrometry in fat tissue, liver, eggs, milk and honey was developed. Analytes were extracted from samples with 1% formic acid in water (v/v). The proposed analytical procedures were validated in accordance with the guidelines SANTE / 12682/2019, where validations were performed on all matrices by determining the limits of quantification, precision and accuracy. Precision, expressed as relative standard deviation, was <20%, while accuracy, expressed as analytical recovery, ranged from 70% to 120%. As part of the method validation, the measurement uncertainty was estimated to be <50% for all analytes. The proposed analytical procedures were used to analyze 60 samples of food of animal origin.

(106 pages, 26 figures, 17 tables, 87 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102A, Zagreb, Croatia and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

Keywords: AMPA / glyphosate/ food of animal origin / LC-MS/MS / N-acetyl-AMPA/ N-acetyl-glyphosate /

Supervisor: Dr. Nina Bilandžić

Thesis accepted: [dan sjednice Vijeća KO PMF]

Reviewers:

Dr. Nives Galić, Professor
Dr. Nina Bilandžić, Senior Scientist
Dr. Ivana Kmetič, Associate Professor

§ 1. UVOD

Potrošnja hrane važan je put izloženosti ljudi kemijskim kontaminantima. Kontaminanti, uključujući i pesticide, mogu ući u opskrbu hranom na različite načine. Većina se poljoprivrednih kultura tijekom uzgoja, po nekoliko puta, tretira različitim vrstama pesticida, te je stoga vrlo vjerojatno da će ostatci pesticida zaostati na tretiranim poljoprivrednim kulturama. Široka uporaba pesticida na poljoprivrednim kulturama uzrokuje ostajanje pesticida u hrani čak po nekoliko mjeseci nakon uporabe, kao i kontaminaciju okoliša (zraka, površinskih voda, izvorskih voda i tla).¹ Broj pesticida, odnosno aktivnih tvari koje se mogu primjenjivati u proizvodnji hrane, sve je veći te se procjenjuje da je u uporabi više od 1000 vrsta pesticida koji se mogu svrstati u 126 različitih kemijskih skupina. Prema biološkom djelovanju dijele se na: algicide, akaricide, fungicide, herbicide, insekticide, muluskicide, nematocide, regulatore rasta, rodenticide i dr., a najviše upotrebljavan herbicid je glifosat.

FAO (eng. *Food and Agriculture Organisation of the United Nations*) je 2005. g. izvjestio da su glifosat i njegov glavni metabolit, aminometilfosfonska kiselina (AMPA) potencijalno toksično opasni, uglavnom kao rezultat nakupljanja u prehrambenom lancu.² Studije koje je objavila EFSA (eng. *European Food Safety Authority*) pokazale su da su ostatci glifosata i AMPA stabilni najmanje 2 godine do više od 3 godina u različitim vrstama uzoraka.³ N-acetil-glifosat, također jedan od metabolita glifosata, stabilan je najmanje godinu dana u jako kiselim uzorcima te u uzorcima s visokim udjelom vode, proteina i škroba, dok još jedan značajan metabolit, N-acetil-AMPA je stabilan najmanje godinu dana u uzorcima s visokima udjelom vode, škroba i proteina i jedan mjesec u uljnim uzorcima. Glifosat i AMPA stabilni su u hrani životinjskog podrijetla između 14 i više od 26 mjeseci. Budući da su životinje indirektno izložene herbicidima kroz konzumaciju hrane, javlja se zabrinutost zbog mogućih ostataka u hrani životinjskog podrijetla i potencijalnoj štetnosti na zdravlje potrošača.

Kvantifikacija glifosata predstavlja velik izazov zbog velike polarnosti i amfoterne prirode molekule, male molekulske mase, velike topljivosti u vodi i nedostatku kromofora. Određivanje glifosata u okolišnim uzorcima, uključujući vodu, je dobro istraženo, međutim, informacije o određivanju glifosata i njegovih metabolita (AMPA, N-acetil-AMPA, N-acetil-glifosat) u kompleksnim uzorcima, kao što je hrana životinjskog podrijetla, su limitirane.

Cilj rada bio je razviti prikladnu potvrdnu metodu za određivanje glifosata i njegovih metabolita (AMPA, N-acetil-AMPA, N-acetil-glifosat) u hrani životinjskog podrijetla što uključuje masno tkivo, jetru, mlijeko, jaja i med. Hrana životinjskog podrijetla predstavlja veliki izazov prilikom analize budući se radi o kompleksnoj prirodi uzoraka te je potrebno uvesti dodatan korak pročišćavanja koji uključuje uklanjanje proteina i masti. Priprema uzoraka i ekstrakcija je tehnički najzahtjevnija faza u razvoju metode čiji je cilj ukloniti što veći broj tvari koje bi mogle interferirati s traženim analitima, a pritom osigurati što veći analitički povrat. Polarna priroda i velika topljivost u vodi otežava ekstrakciju navedenih analita osobito pri niskim koncentracijama. Razvoj metode uključivao je primjenu različitih ekstrakcijskih postupaka - ekstrakciju otapalima kao što su metanol i voda sa dodatkom mravlje kiseline, ekstrakciju na čvrstoj fazi (eng. *Solid Phase Extraction*, SPE), ekstrakcija raspršenjem čvrste faze i ultrafiltracija.

Kod razvoja i optimiranja kvantitativne metode tekućinske kromatografije - spektrometrije masa važan je odabir kromatografske metode, prikladne kolone te temperature i protoka mobilne faze kako bi se postigao dobar oblik pika i omogućilo dobro odijeljivanje analita od različitih interferencija. Korištene su dvije kromatografske kolone različitih stacionarnih faza- Hypercarb koja sadrži grafitizirani ugljik i anionska polarna kolona koja radi pod uvjetima HILIC (eng. *Hydrophilic Interaction Chromatography*)/slabe anionske izmjene. Testirane su različite mobilne faze- voda, metanol, acetonitril sa dodatkom octene i mravlje kiseline kako bi se dobio najbolji odziv željenih analita. Vrlo je važan i odabir internog standarda koji ima sličan ionizacijski odgovor i slično vrijeme zadržavanja kao tražena supstanca. Najvažniji korak je međutim podešavanje parametara izvora i kolizijske ćelije jer oni utječu na ionizaciju i desolvataciju te na fragmentaciju i masenu analizu, što će omogućiti postizanje najboljeg signala za odgovarajuće prekursor i produkt ione analita i optimalnih karakteristika metode. Postavke napona za najbolji prijenos iona između ionskog izvora i masenog analizatora namještaju se automatskim tuniranjem instrumenta. Na taj način optimira se intenzitet signala i rezolucija instrumenta. Parametri koji su optimirani zasebno su napon fragmentora kako bi se dobio maksimalan odgovor prekursor iona od interesa i kolizijska energija za optimalnu fragmentaciju prekursor iona radi postizanja najvećeg mogućeg odgovora produkt iona.

Nakon optimiranja metode provedena je validacija metode kako bi se utvrdila prikladnost metode za kvantitativno određivanje glifosata i njegovih metabolita, a prema kriterijima i zahtjevima dokumenta SANTE/11813/2017 i SANTE/12682/2019.^{4,5} Tijekom validacije određene su granice kvantifikacija i ispitana linearnost, analitički povrati i preciznost koji moraju zadovoljiti kriterije u skladu sa zahtjevima SANTE dokumenta. Također je određena mjerna nesigurnost metode za svaki pojedini analit.

Razvoj kvantitativne metode za određivanje glifosata i njegovih metabolita u hrani životinjskog podrijetla omogućit će bolji pregled stanja ostataka navedenog pesticida i njegovih metabolita čime će se doprinjeti boljem osiguranju zdravstvene ispravnosti hrane.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Pesticidi

Pesticidi su tvari namijenjene za sprječavanje, kontrolu i suzbijanje štetnih organizama i predstavljaju vrlo značajnu skupinu kemijskih spojeva koje je nužno kontrolirati u hrani ponajprije zbog njihove visoke toksičnosti i široke primjene. Današnji oblik poljoprivredne proizvodnje gotovo je nemoguće zamisliti bez upotrebe pesticida. Njihova upotreba u zaštiti poljoprivrednih kultura ima mnogo prednosti kao što su povećanje količine i kvalitete proizvodnje, učinkovitosti i ekonomske isplativosti. Međutim, uz prednosti mnogo je i negativnih učinaka, posebice na okoliš. Upotreba pesticida rezultira njihovim zaostajanjem u hrani te onečišćenjem okoliša. Pesticidi mogu, ovisno o vrsti i primijenjenoj dozi, zaostajati u hrani i okolišu čak i po nekoliko mjeseci. Od trenutka kad dospiju u okoliš postaju sastavni dio ciklusa prirodne izmjene tvari te se mogu detektirati ne samo u područjima gdje su korišteni već i daleko izvan njih. Raspodjela i interakcija pesticida u okolišu vrlo je složen proces koji ovisi o mnogo čimbenika kao što su fizikalno – kemijska svojstva spoja, kinetika njegove razgradnje te sklonost sorpciji u tlu.

Broj pesticida, odnosno aktivnih tvari koje se mogu primjenjivati u proizvodnji hrane, sve je veći te se procjenjuje da je u uporabi više od 1000 vrsta pesticida koji se mogu svrstati u preko 130 različitih kemijskih skupina.⁶ Općenito se klasificiraju u različite skupine ovisno o:

- načinu djelovanja (herbicidi, fungicidi, algicidi, insekticidi, ...)
- vrsti štetnog organizma kojeg suzbija (akaricidi, botriticidi...)
- kemijskoj strukturi (organoklorovi, organofosforni, piretroidi..)

Što se tiče kemijske strukture, pesticidi se najčešće svrstavaju u skupine obzirom na heteroatom kojeg sadrže u svojoj strukturi:

- organoklorovi spojevi
- organofosforni spojevi
- piretroidi
- karbamati i piretrini itd.

Iako je uporaba pesticida u hrani područje koje je zakonski najbolje regulirano, proizvođači hrane kao i vladine institucije zadužene za sigurnost hrane pod stalnim su pritiskom različitih organizacija potrošača koje zahtijevaju poboljšanje situacije vezane uz sigurnost hrane, a s posebnim naglaskom na dopuštenu uporabu velikog broja pesticida koji se smiju koristiti u različitim stupnjevima proizvodnje hrane. Programi sigurnosti hrane sve se više usmjeravaju na kontrolu hrane tzv. pristupom “od farme do stola”. Ovakvim se pristupom nastoji kontrolirati svaki korak vezan uz proizvodnju, skladištenje/čuvanje, distribuciju i pripremu hrane. Bez obzira na postupke kontrole hrane od njezine proizvodnje do pripreme prisutnost štetnih tvari u hrani je neizbježna.

2.1.1. *Herbicidi*

Biljne vrste koje se javljaju na površinama, a nisu cilj uzgoja smatramo neželjenim vrstama - korovima. Te vrste ometaju rast, razvoj i plodonošenje biljnih vrsta koje su cilj uzgoja te ih je stoga poželjno eliminirati odnosno spriječiti im daljnji razvoj. Osim mehaničkih, fizikalnih i bioloških metoda, njihova prisutnost može se spriječiti i primjenom kemijskih metoda tj. primjenom jedne od vrsta pesticida-herbicida odnosno herbistatika. Ta sredstva eliminiraju neželjene biljne vrste tako što u određenim stadijima inhibiraju (ometaju) biokemijske procese neophodne za njihov rast i razvoj bez negativnog utjecaja na vrstu koja je cilj uzgoja.⁷

Herbicidi u biljci mogu utjecati na više procesa. Proces koji je najviše pod utjecajem herbicida predstavlja njegovo primarno djelovanje. Ako molekule herbicida remete i neki drugi proces, ali ne u tolikoj mjeri, učinak na taj proces predstavlja sekundarno djelovanje.

Herbicide se može na temelju kemijskih svojstava svrstati u nekoliko skupina:

- Amide (beflubutamid, propizamid)
- Benzonitrile (bromoksinil, diklobenil)
- Cikloheksandione (cikloksidim, kletodim)
- Fenil ureja herbicide (izoptouton, klorotoluron, linuron)
- Fenoksi propionate (R-fenoksaprop-etil, fluazifop-p-butil, kvizalofop-p-etil/tefuril, propakvizafop)
- Karbamate (desmedifam, fenmedifam, prosulfokarb)
- Kloroacetanilide (acetoklor, dimetaklor, p-dinmetenamid, flufenacet, metazaklor, S-metolaklor, petoksamid)

- N-fenilftalimide (flumioksazin)
- Organofosforne herbicide (glifosat, glufosinat)
- Različitog kemijskog podrijetla (dikvat, bentazon, diflufenikan, etofumesat, flukloridon,...).⁸

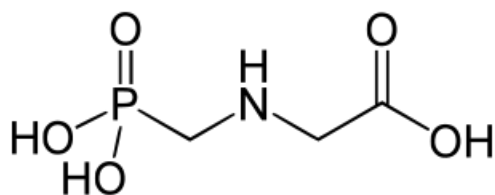
Općenito, prema mehanizmu djelovanja, herbicide možemo svrstati u četiri osnovne skupine:

- inhibitore fotosinteze
- inhibitore biljnog rasta
- inhibitore biosintetičkih procesa
- herbicide nepoznatog mehanizma djelovanja.

Inhibirajući fiziološke procese u biljci, herbicidi dovode do njezina odumiranja. No, herbicidi ne iskazuju isti (fitotoksičan) učinak prema svim biljnim vrstama. Pojedine vrste su u stanju otpjeti njihov učinak te u tom slučaju govorimo o selektivnom učinku herbicida odnosno o vrstama koje su tolerantne na pojedine herbicide. Selektivan učinak nekog herbicida vrlo je kompleksan, a zasniva se na anatomsko-morfološkim i fiziološkim razlikama između kulture u korova, zatim na razlikama u vremenu i načinu sjetve, vremenu i načinu nicanja kulture i korova, razlikama u dozaciji herbicida, načinu aplikacije, tipu tla, klimatskim prilikama u vrijeme i nakon tretiranja te nizu ostalih čimbenika. Selektivnost zemljišnih herbicida zasniva se na razlikama u usvajanju (apsorpciji) količine herbicida i u razlikama u osjetljivosti između kulture i korova. Ovaj tip selektivnosti znatno je ovisan o tipu tla, oborinama i uopće o klimatskim čimbenicima. Selektivnost se može postignuti i načinom aplikacije herbicida. Pripravci rubne selektivnosti primjenjeni pod list nekih povrtnica iskazuju visok stupanj selektivnosti. Totalni herbicidi (*Reglone*, *Basta*, *Roundup* i *Touchdown* i dr.) u voćnjacima i vinogradima primjenju se tako da mlaz škropiva usmjeri pod list kulture. Tako samo korovne biljke dođu u dodir sa škropivom, te se ubrzo osuše.⁸

2.2. Herbicid glifosat

Glifosat, odnosno N-(fosfonometil)-glicin, je najprodavaniji herbicid diljem svijeta koji se koristi kao arboricid za suzbijanje jednogodišnjih i višegodišnjih uskolisnih i širokolisnih korova, višegodišnjih zeljastih te drvenastih korova s dubokim korijenom u vinogradima, voćnjacima, šumskim nasadima, na strništima i nepoljoprivrednim površinama (Slika 1).

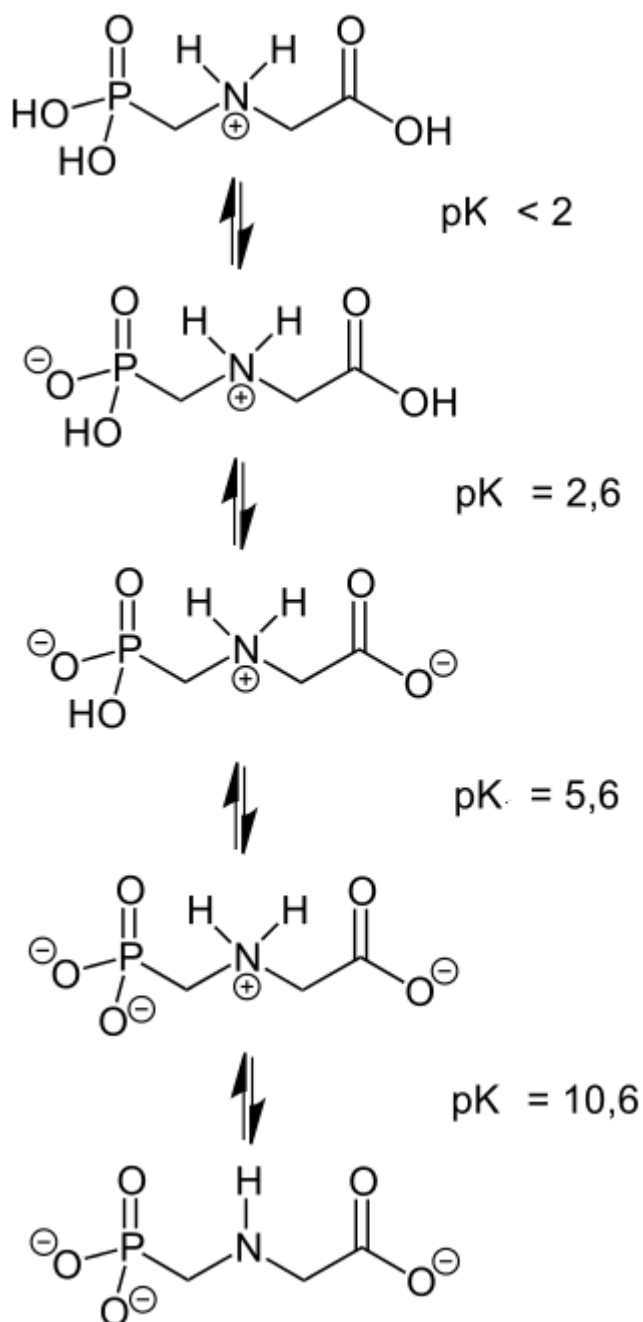


Slika 1. Kemijska struktura glifosata

Kemijski spoj koji spada u skupinu amino kiselinskih pesticida prvi je puta sintetiziran u maloj švicarskoj farmaceutskoj tvrtki, međutim prvi puta je testiran kao herbicid od strane John E Franza iz Monsanto grupe u 1970-tima.⁹ Njegova popularnost kao neselektivnog herbicida raste te prema podacima iz 2018. g. zauzima više od 60 % na globalnom tržištu pružajući širok spektar djelovanja.¹⁰ U Velikoj Britaniji glifosat je najkorišteniji herbicid u uzgoju žitarica i u proizvodnji voća. U Danskoj 35 % svih korištenih herbicida otpada na glifosat.¹¹ Procjenjuje se da se 39 % poljoprivrednih površina u Njemačkoj tretira glifosatom, a najviše u poljima uljane repice, pšenice i ječma. Francuska, Mađarska i Rumunjska tretiraju 50-60 % suncokreta glifosatom prije žetve. Podatci pokazuju da je diljem svijeta u 2011. godini potrošeno preko 650,000 tona glifosata, a potrošnja je u kontinuiranom porastu.¹² Upotreba glifosata na globalnoj razini povećana je za gotovo 15 puta od kada su 1996. g. uvedeni genetski modificirani usjevi otporni na glifosat. Procjenjuje se da je u razdoblju od 1974. do 2014. g. u Sjedinjenim Američkim Državama, samo unatrag zadnjih deset godina raspršeno dvije trećine ukupne količine glifosata. Na popisu Ministarstva poljoprivrede u Republici Hrvatskoj trenutno je registrirano 21 sredstvo za zaštitu bilja sa glifosatom kao aktivnom tvari: Glyphogan, Comic, Ouragan system 4, Boom efekt, Cidokor max, Cidokor plus, Roundup rapid, Satellite, Roundup biactive, Chikara duo, Catamaran 360, Total tf, Glifokor 360 TF, Herkules, Karda, Gallup super 480, Barbarian xtra 610, Resolva 24h i Glyfoon 480, Galaxia max i Total up.¹³ Prema analizi podataka Fitosanitarnog informacijskog sustava glifosat je najprodavaniji pesticid u Hrvatskoj.¹⁴ U razdoblju

2012.-2017. u Hrvatskoj je prodano 217-300 t glifosata, što čini 12-15 % svih pesticida ili 27-37 % svih herbicida.

Glifosat je aminofosfonski analog prirodne aminokiseline glicin te kao i sve aminokiseline, postoji u različitim ionskim stanjima, ovisno o pH (Slika 2). Skupine fosfonske kiseline i karboksilne kiseline mogu se ionizirati, a aminska skupina se može protonizirati, tako da može biti prisutan u nekoliko oblika zwitteriona. Glifosat je bijeli prah bez mirisa topiv u vodi do 12 g L^{-1} na sobnoj temperaturi.

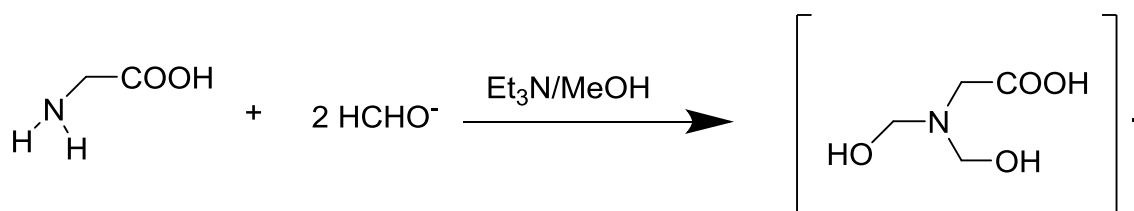


Slika 2. Ionska stanja glifosata

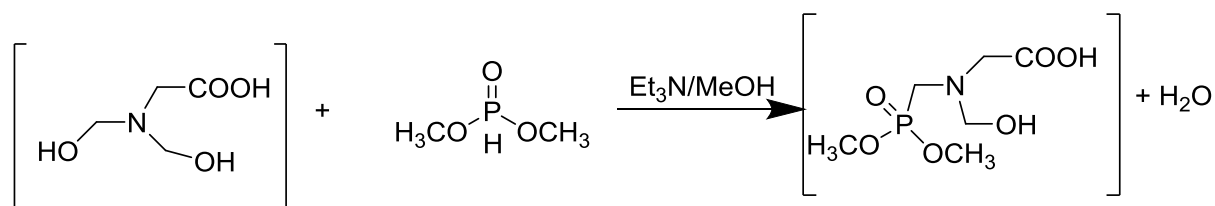
2.2.1. *Sinteza glifosata*

Zabilježeno je mnogo kemijskih putova za sintezu glifosata, a svi su povezani sa činjenicom da je glifosat relativno stabilan u različitim reakcijskim okruženjima (tj. pH, temperatura, oksidacije, redukcije itd.), što rezultira raznolikošću metoda sinteze.¹⁵ Iako je prijavljeno mnogo puteva sinteze, samo mali dio njih čini ih pogodnim za komercijalne svrhe. Trenutno postoje dva dominantna kemijska puta za komercijalnu proizvodnju glifosata: put „alkil estera“ i put „iminodiocetene kiseline“.

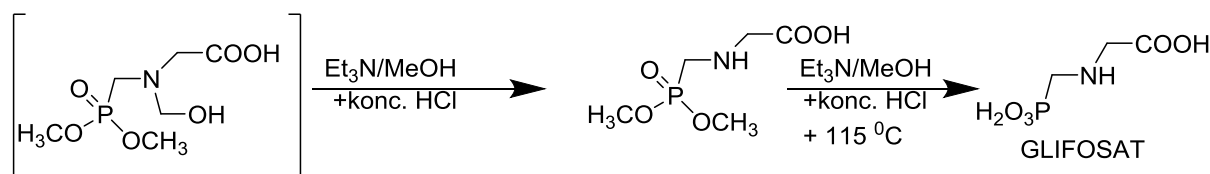
Značajan broj kineskih proizvođača koristi postupak temeljen na putu „alkil estera“. Iako postoji nekoliko varijacija ovog puta, komercijalno se primarni put alkil estera temelji na razvijenom i patentiranom putu mađarskog Alkaloida. Postupak Alkaloid koristi glicin, dimetilfosfit (DMP) i paraformaldehid kao sirovine. U procesu Alkaloida, reakcija se odvija u nevodnom mediju, pri čemu se glicin prvi dodaje smjesi trietilamina i paraformaldehida (otprilike dva ekvivalenta) u metanolu. Pod tim uvjetima nastaje međuprodukt hidroksimetilglicina:



DMP se zatim dodaje u reakcijsku smjesu, formirajući sljedeći fosfonatni ester:

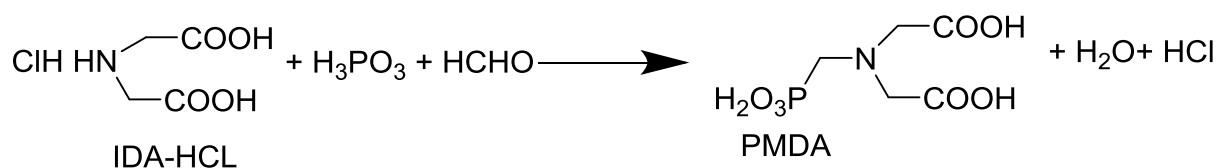


Zatim se dodaje koncentrirana HCl na sobnoj temperaturi, što rezultira uklanjanjem hidroksimetilne skupine. Naknadno zagrijavanje otopine rezultira daljnjom hidrolizom fosfonatnog estera radi dobivanja glifosata:

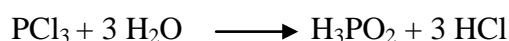


Tijekom reakcije nisu izolirani razni međuprodukti čime su reakcije vrlo jednostavne i mogu se odvijati u „jednom loncu“. Konačna otopina koja sadrži glifosat i metanol se može dalje obrađivati kako bi se izolirao glifosat ili takva otopina može biti prikladna kao konačni produkt. Neke ključne prednosti ovog postupka (npr. stabilniji i neutralniji pH, rad na nižoj temperaturi) proizlaze iz činjenice da se reakcija provodi u organskom otapalu umjesto u vodenoj otopini i u izboru baze (Et₃N). Ovi poželjni uvjeti uzrokuju povoljne reakcijske uvjete, tako da su poboljšani ukupni prinosi glifosata. Razvoj procesne tehnologije doveo je do uporabe i recikliranja metanola i Et₃N u postupku. Također, pažnja je posvećena razvoju tehnologije za obnavljanje klorometana stvorenog tijekom hidrolize. Ovaj zarobljeni klorometan može se prodati ili koristiti u drugim postupcima (npr. proizvodnji organosilikona) poboljšavajući cjelokupnu ekonomičnost postupka.

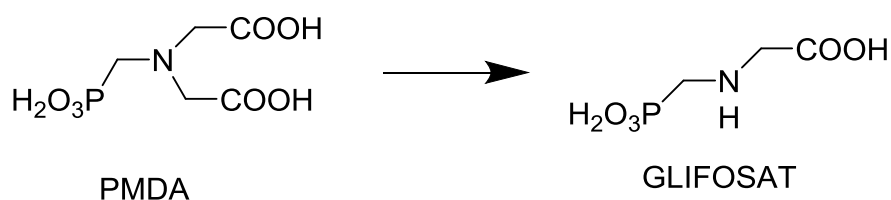
Drugi dominantni put komercijalne proizvodnje glifosata baziran je na upotrebi iminodiectene kiseline. Hidrokloridna sol iminodiectene kiseline sudjeluje u fosfonometilacijskoj reakciji putem modificirane Mannichove reakcije kako bi se formirala N-fosfonometiliminodiectena kiselina:



Često se tijekom reakcije fosfonometilacije za dobivanje N-fosfonometiliminodiectene kiseline pogodno dovodi i klorovodična i fosforna kiselina doziranjem PCI₃ u vodenu otopinu iminodiectene kiseline:



Formirana N-fosfonometiliminodiectena kiselina se izolira, a zaštitna grupa se može ukloniti putem oksidacije kako bi se formirao glifosat:

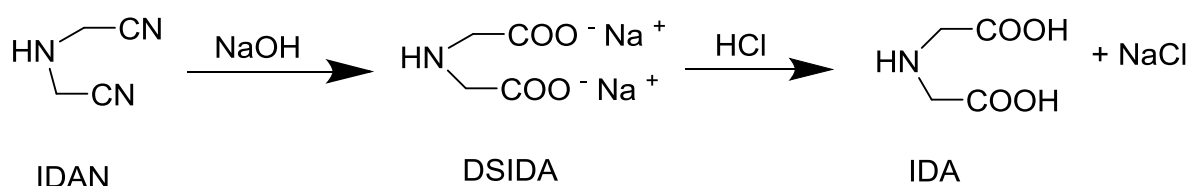


Oksidacije se može sprovesti koncentriranom sulfatnom kiselinom, vodikovim peroksidom, elektrolizom ili kisikom/zrakom kao katalizatorom.

Proizvodnja iminodioctene kiseline često je dio integriranog procesa glifosata. Postoje tri primarna pristupa koja proizvođači glifosata koriste za njezinu proizvodnju, a oni su sažeti u nastavku.

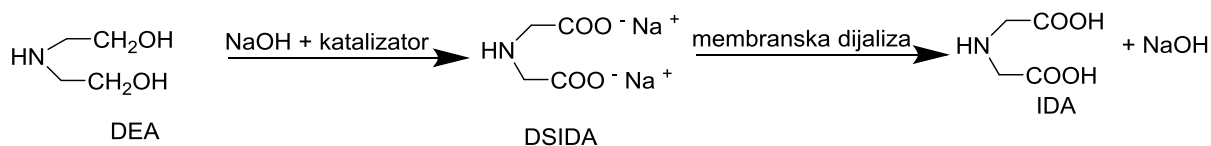
a) Iminodioctene kiseline iz iminodiacetonitrila (IDAN)

Iminodiacetonitrilu se dodaje uz natrijev hidroksida kako bi nastao dinatrijev iminodiacetat (DSIDA). Zatim se dodaje klorovodična kiselina kako bi nastala iminodioctena kiselina (IDA).



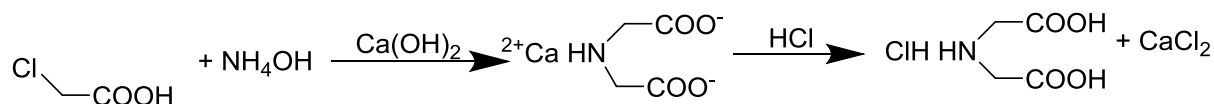
b) Iminodioctena kiselina iz dietanol amina (DEA)

Dietanol amin reagira sa natrijevim hidroksidom uz katalizator tvoreći dinatrijev iminodiacetat koji se može hidrolizirati u iminodioctenu kiselinu ili korištenjem membranske dijalize tvoreći iminodioctenu kiselinu i natrijev hidroksid:



c) Iminodioctena kiselina iz klorooctene kiseline

Klorooctena kiselina se dodaje u otopinu NH_3 i $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Nakon reakcije, otopina je neutralizirana sa HCl kako bi se formirala hidrokloridna sol iminodioctene kiseline:



2.2.2. Formulacije glifosata

Komercijalne formulacije pesticida su smjese spojeva od kojih je jedna aktivna komponenta pesticid kao što je npr. glifosat u *Roundup* i sličnim herbicidima na bazi glifosata, dok drugu inertnu komponentnu čine različiti spojevi koji se dodaju kako bi poboljšali efikasnost glavnog aktivnog sastojka, a istovremeno su inertni u odnosu na način djelovanja pesticida koji cilja određenu vrstu štetočina. Formulacije glifosata koje se prodaju godinama su zapravo vodene otopine glifosatnih soli sa surfaktantima kao inertnim spojevima koji čine 5–15% mase koncentriranog produkta.¹⁶ Glifosatne soli čine 40–60% masenog udjela koncentriranog produkta, a ostatak je voda. Prve korištene formulacije glifosata sadržavale su izopropilaminske soli, a osim njih prodaju se natrijeve, tetrametilsulfonij, kalijeve, amonijeve, monietanolaminske i dimetilaminske soli. Formulacija mora biti stabilna u širokom temperaturnom rasponu, lako se rijediti u vodi i biti prikladna za špricanje bez začepljenja mlaznica korištene opreme. Također mora imati efikasnost herbicida, a istovremeno biti minimalno toksična za ljude i okoliš. Topljivost soli vrlo je važan faktor u pripremi topljive koncentrirane formulacije glifosata. Topljivost mora biti dovoljno velika da kad je formulacija izložena ekstremno niskim temperaturama, ne dolazi do kristalizacije i taloženja soli. Većina formulacija sadrži mono soli glifosata. Jedan od načina za povećanje topljivosti manje topljive soli je napraviti dikationsku sol koristeći drugo mjesto kiseline na molekuli glifosata kao što je slučaj u npr. diamonijevoj soli.

Biološka efikasnost glifosata vrlo je ovisna o primjeni surfaktanta u formulaciji. Većina neionskih surfaktanta poput alkilfenola ili alkoholnih etoksilata nisu topljivi u velikoj mjeri u otopinama koje sadrže znatnu količinu soli glifosata. Izuzetak od ovog pravila je alkil poliglikozid. Ovi surfaktanti su općenito topljivi u otopinama soli, a posebno u otopinama soli glifosata. Mnoge komercijalne formulacije glifosata sadrže takozvane kationske surfaktante ili surfaktante koje mogu zadržati pozitivan naboj u kiselim uvjetima, npr. alkilamin etoksilati. Prvi korišteni surfaktanti u pripravi glifosatnih formulacija bili su etoksilirani amini koji su sintetizirani iz životinjskog loja i sadržavali su prosječno 15 eilen oksidnih jedinica. Zbog toksičnosti navedenog surfaktanta i iritacije očiju i kože uzrokovane njegovim korištenjem, pripremljene su formulacije koje sadrže fosfatni ester kako bi neutralizirali polietoksilirani aminski surfaktant. Korištenjem estera smanjene su iritacije, međutim i dalje je ostala problematika toksičnosti. Kako bi se poboljšala učinkovitost herbicida glifosata u formulacijama su korišteni i eteramini kao alternativa alkilaminima, međutim toksičnost

etoksiliranih eteramininskih surfaktanta se pokazala sličnom onom etoksiliranih alkilamina. Formulacije glifosata koje sadrže etoksilirane surfaktante u Europi su postupno zamijenjene novim generacijama surfaktanta kao što su propoksilirani kvaterni amonijev surfaktant za koje se pokazalo da su i do 100 puta manje toksični od prethodno spomenutih surfaktanta.

Brojne studije su provedene za procjenu čimbenika koji utječu na razlikovanje učinkovitosti glifosata.¹⁷ Djelotvornost na različite vrste korova ovisi o različitim formulacijama. Dokazano je da nema značajnih razlika na djelotvornost *Sida rhombifolia*, *Senna obtusifolia* i *Cyperus Rotundus* u obliku izopropilaminskih i trimesijskih soli, dok je vrtni slak podložniji utjecaju trimesijum soli više nego izopropilaminoj soli. S druge strane, konfliktni rezultati nastali su kod specifičnih korova, npr. mračnjaka, tretiranog različitim glifosatnim solima. Utjecaj pomoćnih sredstava također ovisi o vrstama i zabilježene su značajne razlike među brojnim dostupnim površinski aktivnim tvarima. Organosilikonske aktivne tvari antagoniziraju aktivnost glifosata u slučaju *Panicuma maximuma*. U većini studija potvrđen je blagotvorni učinak amonijeva sulfata na poboljšanje suzbijanja korova.

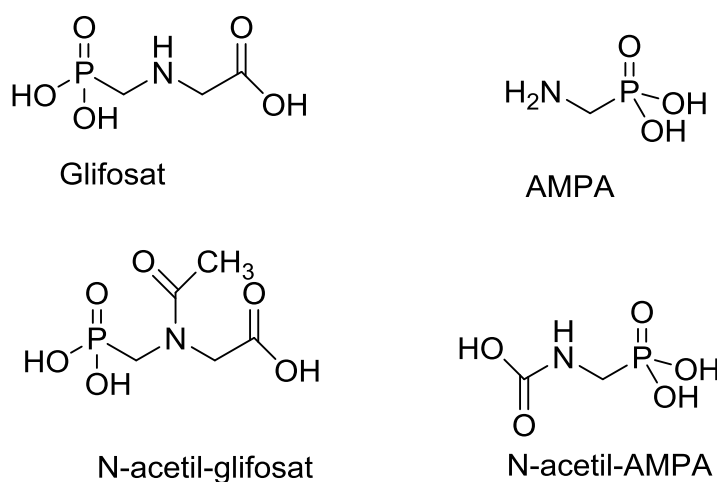
Interakcije između formulacija soli glifosata s jedne strane i pomoćnih sredstava s druge strane su složene, ovisne o slučaju i ovise o mnogima faktorima, uključujući karakteristike biljke ciljane vrste, uvjete okoliša, tip pomoćnog sredstava i kemijski oblik herbicida.

Provedena su ispitivanja kako bi se istražili učinci kalcijevih i magnezijevih iona na učinak triju formulacija glifosata (izopropilaminska, diamonijeva i kalijeva sol) sa i bez diammonijevog sulfata.¹⁸ Pripravci su primijenjeni na korov u vodi obogaćenoj kalcijem ili magnezijem u koncentracijama 0, 250, 500, 750 i 1000 ppm. Aktivnost glifosata smanjena je samo kada je koncentracija kationa bila > 250 ppm, a taj antagonizam nije primijećen kada je u otopinu spreja dodan diamonijev sulfat.

2.2.3. Metabolizam glifosata

Kod životinja i biljaka, glifosat je vrlo slabo metaboliziran sa glavnim metabolitom aminometilfosfonskom kiselinom (AMPA).¹⁹ Ostali mogući metaboliti su acetamidometilfosfonska kiselina (N-acetil-AMPA) i N-acetil-(fosfometil)glicin (N-acetil-glifosat). Na slici 3. prikazane su kemijske strukture glifosata i njegovih metabolita. Kod konvencionalnih biljaka i genetski modificiranih (GM) usjeva koji sadrže CP4-EPSPS (eng. *5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate (EPSP) Synthase*) modifikaciju, glavna komponenta

ostataka je nepromijenjen glifosat, dok u usjevima koji sadrže glukoza oksidazu (eng. *Glucose oxidase, GOX*) AMPA je prisutna u jednakim ili većim količinama u usporedbi s glifosatom. Za GM biljke koje sadrže glicin N-fenilacetiltransferazu (akronim GAT) modifikaciju, glavnu ostataka čini metabolit N-acetil-glifosatom nastao djelovanjem GAT enzima. Osim toga, metabolit N-acetil-AMPA, koji nije uočen u konvencionalnim kulturama, također je identificiran kao značajan metabolit. U Europskoj uniji glifosat je odobren za primjenu na širokom rasponu konvencionalnih usjeva, odobreno je svega nekoliko uvezenih GM kultura otpornih na glifosat, dok GAT-modificirane kulture trenutno nisu prisutne na tržištu Europske Unije.



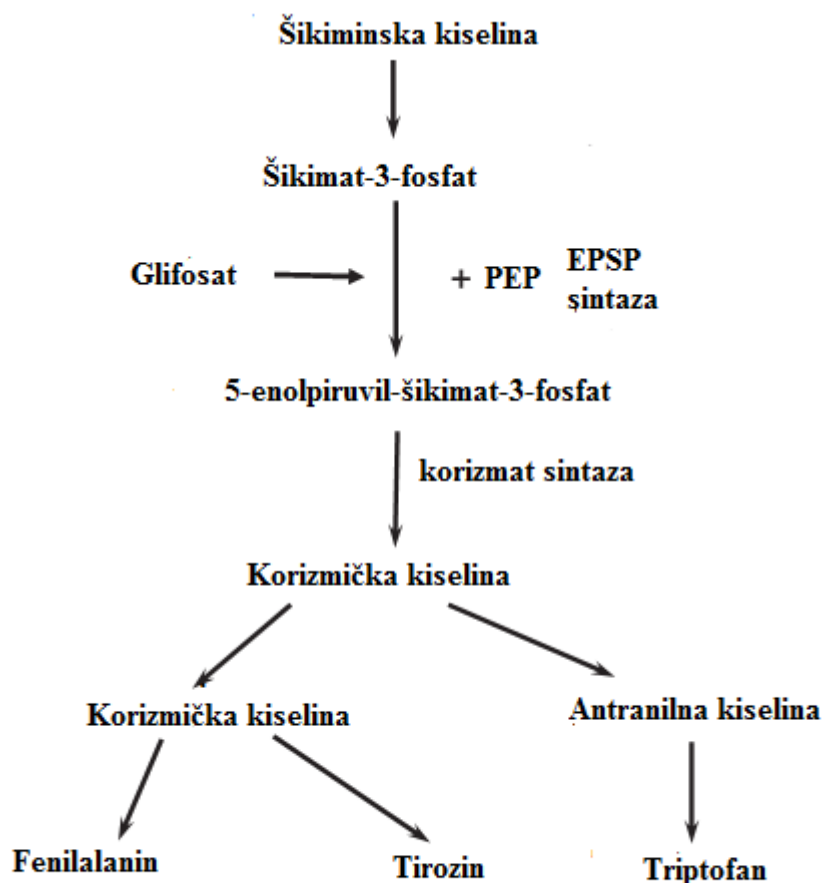
Slika 3. Kemijske strukture glifosata i njegovih metabolita

2.2.4. Način djelovanja

Kako bi bio efikasan, glifosat se mora pošpricati na lišće bilja s kojih se apsorbira i tada započinje destruktivno djelovanje unutar biljke. To je sasvim drukčiji mehanizam od insekticida koji ostaju na površini te se mogu isprati s biljaka ili njihovih plodova. Glifosat satire biljke tako da interferira sa sintezom aminokiselina fenilalanina, tirozina i triptofana koji su sastavni blokovi proteina. Bez proteina nemoguća je izgradnja biljne stanice, ona

ugiba, listovi suše i dolazi do propadanja cijele biljke. Zanimljivo, univerzalni prekursor za sintezu ovih triju aminokiselina je šikiminska kiselina koja se u živom svijetu nalazi u bakterijama i gljivicama. Stoga je logično očekivati negativni učinak glifosata na ove mikroorganizme. Djelovanje glifosata je jedinstveno u tome što je jedina molekula koja je izrazito efektivna u inhibiciji enzima 5-enolpiruvil-šikimat-3-fosfat sintaze (EPSPS) šikiminskog puta (Slika 4).¹⁵ Glifosat je prijelazno stanje analoga fosfoenilpiruvata, jednog od supstrata za EPSPS. Inhibicija EPSPS-a dovodi do smanjenja povratne inhibicije metaboličkog puta, što rezultira masivnim protokom ugljika u šikimat-3-fosfat, koji se pretvara u visoke razine šikimata. Kako glifosat inducira inhibiciju šikiminskog puta koji zapravo ubija biljke nije posve jasno. Mnogi pretpostavljaju da je njegov primarni učinak nedovoljna proizvodnja aromatske amino kiseline za održavanje potrebne sinteze proteina, a to je u skladu sa sporim razvojem simptoma. Druga istraživanja potkrepljuju stajalište da povećanje protoka ugljika šikiminskog puta deregulacijom metaboličkog puta inhibicijom EPSPS-a rezultira nedostatkom ugljika za druge bitne metaboličke puteve. Brz prestanak fiksacije ugljika u glifosat-tretiranoj šećernoj repi bolje je objašnjen ovim mehanizmom nego redukcijom aromatskih amino kiselina.

Čini se da je EPSPS svih viših biljaka inhibiran glifosatom, što ga čini neselektivnim herbicidom, aktivnim na vrlo širokom rasponu vrsta biljaka. Utvrđeno je da je samo glifosat odličan EPSPS inhibitor, bez komercijalnog analoga ili alternativnog kemijskog spoja koji djeluje na taj enzim. To svojstvo, zajedno s mnogim drugim poželjnim svojstvima, čine glifosat jedinstvenim, idealnim herbicidom.

Slika 4. Mjesto inhibicije glifosata¹⁵

2.2.5. Utjecaj na ljudsko zdravlje

Zabrinutost u vezi sigurnosti herbicida na bazi glifosata izrazili su i znanstvenici i ekolozi. Novija istraživanja govore, naime, kako ga ima u hrani na našim tanjurima, u kruhu, pivu, zraku, vodi, našoj krvi i urinu, cjepivima.²⁰⁻²⁶ U istraživanju Krüger i sur. (2014) pronađena je srednja koncentracija glifosata u urinu, od oko 1 ppb, kod ljudi koji konzumiraju pretežno organsku hranu koncentracija je bila značajno niža nego u urinu ljudi koji konzumiraju konvencionalnu hranu.²⁰ Također, glifosat u mokraći općenito zdrave populacije bio je značajno niži nego u urinu kronično oboljele populacije. Na temelju nezavisnog istraživanja ostataka glifosata u mlijeku dojilja u SAD-u koje je ukazalo na prisutnost glifosata u koncentracijama od 76 do 166 $\mu\text{g L}^{-1}$ u 3 od 10 uzoraka^{21,22}, provedeno je

detaljnije istraživanje u Njemačkoj na čak 114 uzoraka mlijeka dojilja, a niti u jednom uzorku nije detektiran glifosat.²³

Koliko je sveprisutan, možda najzornije dočarava nedavno istraživanje grupacije Zelenih/ESS-a među zastupnicima u Europskom parlamentu. Testiranjem uzoraka urina na prisutnost glifosata dokazali su njegovu prisutnost u mokraći svih 48 zastupnika iz 13 država članica EU, koji su dobrovoljno sudjelovali u provedenom istraživanju, među kojima je bio i hrvatski zastupnik.²⁴ Kao četvrti na toj listi i jedini iz RH koji se testirao, on je imao 2,46 $\mu\text{g L}^{-1}$, četiri Talijana najviše – u prosjeku 2,84, dok je najniža razina zabilježena kod zastupnika iz Češke Republike, Finske, Irske i Velike Britanije – manje od 1. U prosjeku, svih 48 eurozastupnika u testiranom je urinu imalo 1,7 $\mu\text{g L}^{-1}$ što je 17 puta viša razina od europske norme za pitku vodu (0,1 $\mu\text{g L}^{-1}$) što je vjerojatno posljedica nekontrolirane primjene glifosata.

Kao što je već rečeno, glifosat djeluje sprečavanjem metaboličkog puta šikiminske kiseline koja je dio procesa važnoga za opstanak biljaka. Smatralo se da ovaj mehanizam ne postoji kod ljudi.²⁷ Međutim, sada je poznato da šikimatski put postoji kod ljudi u regulaciji bakterija u crijevima, a ove crijevne bakterije su od vitalnog značaja za ljudski imunološki sustav. Istraživanja pokazuju povezanost glifosata s velikim brojem rakova kod ljudi, uključujući i ne-Hodgkinovog limfom i multipli mijelom.²⁸ Pokazalo se da također da utječe na ljudske receptore estrogena, te da uzrokuje proliferaciju hormonski ovisnog raka dojke kod ljudi.²⁹ Osim potrošača ili potencijalnih potrošača, postoji posebna zabrinutost za one koji rukuju pesticidima. Istraživanje triju generacija vodenih puževa pokazalo je da kod treće generacije glifosat imao štetne učinke na reprodukciju i razvoj, što bi također moglo imati implikacije i za ljude.³⁰

2.2.6. *Distribucija glifosata i njegovih metabolita u životinjskim tkivima*

Kod stoke metabolizam je proučavan kod koza i kokoši pomoću glifosata i AMPA označenih na fosfonometil-skupinama.³¹ U ovim studijama, glifosat je identificiran kao glavna komponenta radioaktivnih ostataka, čineći 21-99 % TRR (eng. *Total Radioactive Residues*) u svim životinjskim matricama, dok je AMPA nađena u značajnim udjelima u jetri (do 36 % TRR), mišićima i masti (do 19 % TRR) i žumanjcima (14 % TRR). Provedene su dodatne studije koje zbog loše metodologije koja se koristila za identifikaciju radioaktivnih ostataka ne pružaju mnogo informacija, međutim potvrđeno je da se glifosat ne metabolizira

značajno u preživača i peradi, te čini 88–91 % TRR. Kako bi se istražio metabolizam kod životinja koje se hrane genetski modificiranih usjevom, proučavani su metabolizmi koza i kokoši pomoću ^{14}C -N-acetil-glifosata. U tim studijama, N-acetil-glifosat je identificiran kao glavni sastojak radioaktivnih ostataka, čineći 17–77 % TRR. Razgradnja u N-acetil-AMPA je uočena u mastima (10-15 % TRR), u glifosat u jetri (15 % TRR), masti peradi (37 % TRR) i bjelanjku (11 % TRR), a u AMPA kod mišića peradi i masti (11–17 % TRR).

N-acetil-glifosat je primijenjen oralno kao vodena otopina kod mliječnih krava dvaput dnevno tijekom 28 uzastopnih dana.³² Doziranje je provedeno na razinama liječenja od 1,25 (dozna skupina 1), 3,75 (dozna skupina 2), 12,5 (dozna skupina 4) i 37,5 mg/kg tjelesne težine (dozna skupina 5). Dodatno su dvije krave dozirane s 37,5 mg/kg tjelesne težine, nakon čega je uslijedilo 7-dnevno razdoblje čišćenja. Uzorci mlijeka prikupljeni su tijekom cijelog razdoblja doziranja. Nakon žrtvovanja, tkiva i mlijeko analizirani su na ostatke N-acetil-glifosata, glifosata, AMPA i N-acetil-AMPA. U mlijeku nisu otkriveni ostaci ni u jednoj doznoj skupini. U jetri su ostaci N-acetil-glifosata otkriveni samo u doznim skupinama 4 i 5 (srednja koncentracija N-acetil-glifosata bila je $0,07 \text{ mg kg}^{-1}$ za dozirnu skupinu 4, odnosno $0,43 \text{ mg kg}^{-1}$ za skupinu 5). AMPA je detektiran u niskim koncentracijama ($0,028 \text{ mg kg}^{-1}$) u skupini s najvećom dozom nakon perioda čišćenja. U bubrezima ostaci N-acetil-glifosata detektirani su u svim skupinama u rasponu od $0,082 \text{ mg kg}^{-1}$ u skupini s najnižom dozom do $2,8 \text{ mg kg}^{-1}$ za pokusnoj skupini 5. Kod viših doziranja također su pronađeni ostaci glifosata, AMPA i N-acetil-AMPA u niskim koncentracijama ($0,21 \text{ mg kg}^{-1}$, $0,063 \text{ mg kg}^{-1}$ odnosno $0,077 \text{ mg kg}^{-1}$). U masti, koncentracije N-acetil-glifosata iznad granice kvantifikacije, LOQ (eng. *Limit of Quantification*) od $0,05 \text{ mg kg}^{-1}$ izmjerene su samo kod veće primjenjene doze (maksimalna vrijednost $0,12 \text{ mg/kg}$ u skupini 5). Drugi srodni spojevi (glifosat, AMPA ili N-acetil-AMPA) nisu detektirani iznad LOQ od $0,05 \text{ mg kg}^{-1}$. U mišiću N-acetil-glifosat i njegovi srodni spojevi nisu detektirani, uz LOQ od $0,025 \text{ mg kg}^{-1}$.

Prijenos N-acetil-glifosata u životinjske proizvode ispitan je u tri skupine kokoši nesilica koje su dozirane s 1,5; 5,0; 15 i 50 mg po kg tjelesne težine tijekom 35 uzastopnih dana. Tijekom cijelog vremenskog razdoblja skupljana su jaja. Od skupine s najvećom primjenjenom dozom neke su životinje držane radi čišćenja dodatnih 19 dana tijekom kojih su sakupljana jaja. Kod žrtvovanja analizirana su tkiva i jaja na ostatke N-acetil-glifosata, glifosata, AMPA i N-acetil-AMPA. U jajima su detektirani ostaci N-acetil-glifosata u svim doznim skupinama. Stalna razina postignuta je nakon 14 do 24 dana. Maksimalne

koncentracije u različitim doznim skupinama bile su $0,037 \text{ mg kg}^{-1}$ (nakon doziranja od $1,5 \text{ mg/kg}$ tjelesne težine) do $0,66 \text{ mg kg}^{-1}$ u skupini s najvećom dozom. Tijekom perioda čišćenja, koncentracije ostataka su smanjene i nakon 10 dana nije bilo ostataka iznad granice detekcije. Glifosat je izmjeren samo na jedan dan uzorkovanja pri najvišoj primjenjenoj dozi u koncentraciji od $0,036 \text{ mg kg}^{-1}$, dok ostaci AMPA i N-acetil-AMPA nisu detektirani iznad LOQ u bilo kojem uzorku. U jetri, masti i mišiću N-acetil-glifosat pronađen je u svim doznim skupinama. U skupini sa najnižom primjenjenom dozom, srednje koncentracije iznosile su $0,19 \text{ mg kg}^{-1}$ u jetri, $0,11 \text{ mg kg}^{-1}$ masti peradi i $0,031 \text{ mg kg}^{-1}$ za mišiće. Ostali analiti (glifosat, AMPA i N-acetil-AMPA) nisu bili detektirani ni u jednoj matrici. Studija je provedena na svinjama kojima su davani glifosat i AMPA u omjeru 9:1 u dozi od 400 mg kg^{-1} .³³ Maksimalni ostaci od $0,72 \text{ mg kg}^{-1}$ glifosata pronađeni su u jetri, $9,1 \text{ mg kg}^{-1}$ u bubregu i $0,06 \text{ mg kg}^{-1}$ u mišićima. Ostaci u masti tijekom pokusa i u svim tkivima 28 dana nakon zaustavljenog pristupa treniranoj hrani bili su u koncentracijama $<0,05 \text{ mg kg}^{-1}$. Sličan eksperiment proveden je na kokošima nesilicama koje su bile izložene glifosatu i AMPA u omjeru 9:1 na ukupnoj dnevnoj prehrambenoj razini od 40, 120 i 400 mg kg^{-1} tijekom razdoblja od 28 dana što je rezultiralo s $0,12 \text{ mg kg}^{-1}$ glifosata u jajima kod primjene najveće doze hranjenja, dok kod primjene manjih doza nisu pronađeni ostaci glifosata.

Znanstvenici su u istraživanju učinka glifosata na pčele koristili iste one doze glifosata koje se koriste u poljoprivrednoj proizvodnji, na zelenim površinama i duž prometnica.³⁴ Tri dana nakon kontakta pčela s glifosatom primijećeno je da glifosat znatno smanjuje crijevni mikrobiom što potencijalno može voditi uginuću pčela. U 14 uginulih medonosnih pčela određivani su ostaci glifosata i njegovog metabolita AMPA; u svega jednom uzorku koncentracije glifosata bile su oko LOQ vrijednosti, dok je AMPA primijećena u tragovima.³⁵ Rezultati ukazuju na potrebu razvoja osjetljivije metode što bi moglo rezultirati detektiranjem više pozitivnih uzoraka.

2.2.7. Kontrola ostataka glifosata u hrani životinjskog podrijetla

Visoki rizik za zdravlje ljudi zbog konzumacije hrane koja je kontaminirana tijekom poljoprivredne proizvodnje predstavljaju ostatci pesticida i gnojiva. Ostacima pesticida (sredstava za zaštitu bilja) smatraju se aktivne tvari, njihovi metaboliti i/ili produkti razgradnje ili reakcije s drugim tvarima. To se odnosi na aktivne tvari koje se trenutno nalaze na tržištu, ali i one tvari koje su se ranije koristile (ako su izraženije perzistentnosti, i danas ih

je moguće pronaći uokolišu pa tako i na hrani). Za svaku takvu tvar određuje se granična količina kojom se određuje je li takva hrana zdravstveno ispravna ili nije, a naziva se maksimalno dopuštena razina – MDK. MDK predstavlja najvišu zakonski dopuštenu koncentraciju ostataka pesticida u ili na hrani ili krmivu (mg ostataka / kg hrane ili krmiva) da bi se izbjegla rizična izloženost konzumenata ostacima pesticida, vodeći posebno računa o zaštiti osjetljivih skupina konzumenata (djece, starih, bolesnih i dr.). MDK se propisuje za ostatke svake tvari koja je dozvoljena za primjenu u biljnoj proizvodnji, i to za svaku kulturu na kojoj se smije koristiti.³⁶ Svaka dozvola za upotrebu sredstava za zaštitu bilja (pesticida) mora sadržavati MDK određen za svaku kulturu na kojoj je dozvoljena primjena tog pesticida. MDK predstavlja količinu pesticida kojoj svaki konzument (uključujući i osjetljive populacije) može unositi hranom svaki dan kroz cijeli život bez ikakvih posljedica. Iz toga je jasno da se sprečava pojava kronične otrovnosti. Važno je istaknuti da MDK nije granična količina tvari koja u laboratorijskim pokusima na životinjama nije uzrokovala nikakvu reakciju, nego je to prihvatljivi dnevni unos tvari koji se izračunava kao masa tvari u odnosu na tjelesnu masu konzumenta – prihvatljivi dnevni unos (engl. *acceptable daily intake* – ADI). Taj se iznos prilagođava dnevnom unosu hrane, tjelesnoj masi konzumenata i drugim parametrima koje određuju toksikolozi, nutricionisti i drugi relevantni stručnjaci. Dobivene se vrijednosti prema preporuci Svjetske zdravstvene organizacije dijele sa sigurnosnim faktorom koji iznosi između 100 i 1.000. Iznosi ostataka pesticida koji su dozvoljeni na hrani u trenutku stavljanja u promet (MDK) obično iznose od 0,05 do približno 1 mg, katkad i više mg ostataka po kg hrane.³⁷ To su iznimno male količine koje se izvan specijaliziranih laboratorija ne mogu odrediti, ali je njihova kontrola od presudne važnosti za osiguravanje zdravstvene sigurnosti hrane na tržištu. Da bi se podigla razina sigurnosti hrane na tržištu, donosi se koordinirani višegodišnji program kontrole Europske zajednice za osiguranje sukladnosti s maksimalnim razinama ostataka pesticida i ocjenu izloženosti potrošača ostacima pesticida u i na hrani biljnog i životinjskog podrijetla.³⁸ Shodno tome, sve su učestalije kontrole inspektora koji s prodajnih mjesta uzimaju uzroke hrane i šalju ih na laboratorijske analize kojima se utvrđuje razina ostataka pesticida. Pri takvim analizama utvrđuje se prisutnost ostataka velikog broja pesticida. Ovisno o laboratoriju, može se analizirati i više stotina aktivnih tvari pesticida, njihovih metabolita i produkata razgradnje. Za hranu domaćih proizvođača odgovorni su sami proizvođači, a za hranu inozemnih proizvođača odgovorni su njihovi uvoznici u Hrvatsku. Inspektori obavještavaju proizvođače

ili uvoznike hrane čiji je proizvod uzet na analizu kada je to učinjeno i kako mogu uzeti dio uzorka za vlastito slanje na alternativnu analizu ostataka. Potrebno je da se proizvođač dosljedno pridržava svih uputa navedenih u dozvoli za primjenu korištenog sredstva za zaštitu bilja (pesticida), a pogotovo ovih:

- namjene pesticida (poglavito kulture na kojoj je pesticid dozvoljen);
- vremena primjene pesticida;
- utroška škropiva (količina škropiva po hektaru) ako je propisan;
- doze (ili propisane koncentracije za drvenaste kulture);
- karence.

Iznimno je važno pridržavati se namjene pesticida koji se koristi jer ako neki pesticid nije dozvoljen za primjenu na proizvodu na kojemu je pronađen, automatski se takva hrana smatra zdravstveno neispravnom.

Nepridržavanje propisanog vremena primjene pesticida može uzrokovati izostanak željenog učinka na ciljane štetne organizme, fitotoksičnost tretirane biljke, te može štetno utjecati na okoliš (uključujući i korisne organizme poput pčela) i drugo. Pritom ne nastaje visoki rizik kontaminacije hrane ako se proizvođač pridržava svih ostalih propisa, ali već su i nabrojani razlozi dovoljni za pridržavanje propisanog vremena primjene.

Za ispunjavanje standarda sigurne hrane postizanjem razine rezidua pesticida u ili na hrani (i krmivu) na tržištu ispod propisanih MDK-a, najvažnije je pridržavati se propisane doze i karence. Iako se karenca najčešće definira kao najkraće vrijeme koje mora proći između svake primjene pesticida i skupljanja biljnih proizvoda (berbe, žetve, vađenja iz tla i dr.), karenca se može definirati i kao vrijeme potrebno da se (propisana) doza pesticida nakon primjene razgradi na razinu nižu od MDK do vremena skupljanja biljnih proizvoda.

Glifosat šprican na konvencionalne kulture ostaje kemijski nepromijenjen, a u genetski modificiranim kulturama se metabolizira u razgradne produkte: AMPA i N-acetil-AMPA čija se pojava i koncentracija moraju uzeti u obzir kod toksikoloških ispitivanja i utvrđivanja ostataka. Jednom kada je primijenjen, glifosat i njegovi razgradni produkti prenose se cijelom biljkom u listove, zrna (žito) i plodove (voće, povrće).

Po pitanju kontrole ostataka glifosata u hrani životinjskog podrijetla prema trenutnoj važećoj Uredbi komisije br. 293/2013 o maksimalnim razinama ostataka u hrani životinjskog podrijetla postavljene su MDK vrijednosti koje su prikazane u Tablici 1.³⁹ Pri tome se uzima u obzir isključivo masena koncentracija glifosata, dok EFSA u svom najnovijem izvješću razmatra definiciju kojom bi se kod monitoringa procjena temeljila na zbroju masenih koncentracija glifosata, AMPA i N-acetil-glifosata izraženo kao glifosat, a kod procjene rizika zbroju glifosata, AMPA, N-acetilglifosata i N-acetil-AMPA izraženo kao glifosat.⁴⁰ Razmatrane MDK vrijednosti također su prikazane u Tablici 1.

Zoller i suradnici objavili su rad o ostacima glifosata na švicarskom tržištu hrane.⁴¹ Pri tome su, među ostalim, obuhvatili uzorke mlijeka (3), meda (16), jaja (1), te mesa i ribe (13). Kod meda, čak 15 uzoraka bilo je iznad granice kvantifikacije od $0,001 \text{ mg kg}^{-1}$ za glifosat, sa najvećom izmjerenom koncentracijom od $0,0159 \text{ mg kg}^{-1}$, dok su 23 % pretražena uzoraka mesa i ribe imala koncentraciju iznad LOQ. U svim navedenim uzorcima izmjerene koncentracije za metabolit AMPA bile su ispod LOQ od $0,0025 \text{ mg kg}^{-1}$. Istraživanja provedena na kravljem mlijeku i hrani za djecu koja uključuje mlijeko nisu pokazala nikakvu prisutnost glifosata i njegovog metabolita AMPA.^{42,43}

Tablica 1. Maksimalno dopuštene koncentracije (MDK) ostataka glifosata u hrani životinjskog podrijetla prema važećoj Uredbi 293/2013 i predložene vrijednosti MDK (zbroj masenih koncentracija glifosata i njegovih metabolita)

Vrsta	Životinjska vrsta	Postojeći MDK prema Uredbi 293/2013 (mg kg ⁻¹)	Predloženi MDK prema EFSA (mg kg ⁻¹)
Mišić	svinja, govedo,	0,05	0,2
	ovca, koza, konj, perad		
Masno tkivo	svinja, govedo, konj, perad	0,05	0,2
	ovca, koza	0,05	0,3
	svinja	0,05	0,4
Jetra	govedo	0,2	0,7
	ovca, koza	0,05	0,9
	konj	0,05	0,7
	perad	0,05	0,2
	svinja	0,5	3
Bubreg	govedo	2	7
	ovca, koza	0,05	10
	konj	0,05	7
	govedo, ovca, koza, konj	0,05	0,1
Jaja	perad	0,05	0,1
Med		0,05	bez preporuka

2.3. Metodologija određivanja glifosata

2.3.1. Analitičke metode za određivanje pesticida

S novim saznanjima o toksičnosti i ponašanju pesticida u okolišu, maksimalno dozvoljene masene koncentracije ili dozvoljeni maseni udjeli u različitim tipovima uzoraka pomiču se prema sve nižim vrijednostima što zahtijeva visoku osjetljivost i pouzdanost analitičkih metoda. Osnovni zahtjev koji mora zadovoljiti svaka analitička metoda za određivanje ostataka pesticida je točno i precizno određivanje niskih koncentracija pesticida različitih svojstava uz što niže granice detekcije.

Analitičke metode trebale bi zadovoljiti sljedeće zahtjeve:

- osigurati brzu analizu i što kraće vrijeme između sakupljanja i analize uzoraka
- biti što jednostavnije kako bi ih mogao obavljati što veći broj osoba u laboratoriju
- biti ekonomične, koristiti što manje kemikalija i aparatura
- osigurati visok stupanj automatizacije s ciljem smanjivanja pogrešaka
- biti izvodljive s malim količinama otapala i reagensa kako bi se smanjio ukupni otpad.

Cjelokupna analitička metoda za određivanje ostataka pesticida u različitim uzorcima okoliša i biološkim uzorcima obuhvaća tri glavna koraka: uzorkovanje, pripremu uzorka za analizu (ekstrakcija pesticida iz matrice uzorka) te instrumentnu analizu. Svaki je korak bitan kako bi se izbjegli gubici pesticida iz matrice uzorka. Uz poznavanje rada na instrumentu i stručnost koju analitičar mora posjedovati za uspješno provođenje analize, jedan od najzahtjevnijih dijelova analitičke metode je priprema uzorka.

2.3.1.1. Postupci pripreme uzoraka za analizu glifosata i njegovih metabolita u hrani životinjskog podrijetla

Analiza tragova pesticida u složenim matricama uzoraka zahtijeva opsežnu pripremu uzorka. Priprema uzorka obično obuhvaća nekoliko koraka kao što su homogenizacija, ekstrakcija, pročišćavanje ekstrakta i koncentriranje. Pojedini postupci uključuju još i

derivatizaciju analita. Postupci pripreme uzorka ovise o analitu/pesticidu i o matrici uzorka. Analize pesticida često su otežane značajnim udjelom drugih spojeva (interferencija) prisutnih u matrici uzorka. Uvjet koji je zajednički svim postupcima pripreme uzorka je odabir odgovarajuće količine uzorka potrebne za analizu što ovisi o vrsti matrice uzorka, svojstvima analiziranih pesticida te njihovim očekivanim koncentracijama.⁴⁴ Za analize uzoraka u kojima se očekuju više koncentracije pesticida, potrebna je manja količina uzorka. S druge strane, pri analizi tragova pesticida, posebice ako je njihova koncentracija u uzorku blizu granice detekcije, potrebne su veće količine uzorka kako bi se postigli zadovoljavajući rezultati. Međutim, veća količina uzorka zahtijeva i dodatna pročišćavanja te dulje vrijeme pripreme što smanjuje točnost i preciznost analize. Uz navedeno, vrlo bitan korak u svim postupcima pripreme uzorka je optimiranje. Optimiranjem pripreme uzorka smanjuju se pogreške što je od izuzetne važnosti kod određivanja niskih koncentracija pesticida. Kako bi se smanjila varijabilnost analitičkih rezultata, odnosno mjerna nesigurnost koja ovisi o svakom koraku analitičkog postupka, bitno je reducirati broj koraka obuhvaćenih analizom. Tako se odabirom i optimiranjem odgovarajućeg postupka pripreme uzorka (ekstrakcije) može smanjiti broj potrebnih koraka te istodobno maksimalno ukloniti interferencije koje često koeluiraju zajedno s analitom/pesticidom.

Prilikom analize uzoraka voda, ovisno o podrijetlu, oni eventualno zahtijevaju malu predobradu ili pročišćavanje, dok s druge strane uzorci hrane, tla i bioloških matrica se smatraju laboratorijski zahtjevnima i u nekim slučajevima neizbježni su rezultati niskih analitičkim povrata i visokih detekcijskih granica.^{45,46} Izazov za analitičara je prevladati takove probleme i osigurati točnost izazovne metode uz njenu istovremenu jednostavnost. Izbor postupka pročišćavanja je osnova studije za konstantne i pouzdane analitičke rezultate i smatra se integriranim dijelom analitičkog protokola.

Do danas je razvijen veliki broj postupaka pripreme uzorka za analizu pesticida u različitim matricama. Međutim, ovisno o broju i svojstvima pesticida te o matrici uzorka, često se postupci pripreme uzorka kombiniraju ili prema potrebi modificiraju.

Prvi cilj pripreme uzorka je uklanjanje mogućih smetnji. Primjerice prilikom analize bioloških matrica potrebno je ukloniti anorganske soli prije analize spektrometrijom masa, budući da one suzbijaju ionizaciju organskih analita i smanjuju osjetljivost. Kod analize malih

molekula, poput lijekova, masnih kiselina i šećera potrebno je ukloniti fosfate, proteine i glikoproteine.

Drugi cilj pripreme uzorka je ukoncentriravanje analita za postizanje odgovarajućih intenziteta signala. Obično se provodi ekstrakcijskim metodama, poput ekstrakcije otapalom ili ekstrakcijom na čvrstoj fazi.

Dostupni su različiti postupci pripreme uzoraka, a u većini slučajeva je jedan postupak rijetko dovoljan te se obično nekoliko njih koristi u kombinaciji. Priprema uzoraka obično započinje odvajanjem uzorka na različite frakcije. Prvo, čestice (poput stanica, vlakana, itd.) se odvajaju pomoću centrifugiranja i / ili filtriranja kako bi se osigurala homogena otopina. U sljedećem koraku se odvajaju male molekule iz makromolekula. To se obično vrši precipitacijom proteina ili ultrafiltracijom.

Centrifugiranje je vrlo uobičajena tehnika odvajanja čvrstih čestica dispergiranih u tekući medij, npr. krvne stanice i plazma. Tekući uzorak se stavlja u posebne kivete za centrifugu, a komponente uzorka su odvojene zbog centrifugalne sile na temelju njihove razlike u gustoći. Centrifugacija se uobičajeno koristi u kombinaciji s različitim tehnikama pripreme uzoraka, a također se može koristiti za odvajanje emulzija (poput mlijeka) i nemiješivih otapala (npr. u kombinaciji s ekstrakcijom otapalom).

Vjerojatno najjednostavniji način odvajanja proteina od malih molekula je *precipitacija proteina*. Postupak se koristi kod analize spojeva niskih molekularnih masa, ispod 2–5 kDa, jer prisutnost makromolekula obično pogoršava analitičke performanse. U kromatografiji podižu baseline, uzrokuju šum i mogu čak oštetiti performanse kromatografskih kolona, a kod spektrometrije masa pogoršavaju ionizaciju i mogu blokirati ionski izvor. Taloženje se vrši dodavanjem organskog otapala (acetonitrila, metanola), anorganske kiseline (perklorna kiselina) ili sol (cink sulfat) u uzorak. Nakon miješanja, bjelančevine se precipitiraju i nakon centrifugiranja formiraju talog na dnu kivete s uzorkom. Dobiveni talog može se lako ukloniti iz preostale tekućine, čineći razdvajanje proteina i malih molekula lako i brzo. Nedostatak taloženja proteina je taj što se razni proteini talože pod različitim uvjetima, pa uklanjanje proteina nije savršeno. Istaloženi proteini mogu vezati različite male molekule i ukloniti ih iz otopine što može utjecati na njihovu kvantifikaciju. Kod analize glifosata za precipitaciju proteina prema literaturnim podacima koriste se mravlja⁴⁷ ili octena kiselina⁴⁸, diklormetan i acetonitril, bilo pojedinačno ili u smjesi.^{49,50,51}
52,53,54

Ekstrakcija otapalom (eng. *Liquid Liquid Extraction, LLE*) jedan je od najstarijih postupaka pripreme uzorka koji se još uvijek koristi, zbog svoje jednostavnosti, prvenstveno u rutinskim analizama. Namijenjen je za ekstrakciju analita iz tekućih uzoraka, dok se čvrsti uzorci prvo moraju homogenizirati, odnosno prevesti u tekući oblik. Osnovni princip je raspodjela analita između dviju faza koje se ne miješaju, ovisno o topljivosti analita. Jedna je faza vodena, dok je druga faza organska (organska otapala). Odabir organskog otapala za ekstrakciju ovisi o polarnosti pesticida. Također, ovim postupkom troši se velika količina toksičnih otapala što zahtijeva njihovo zbrinjavanje te poskupljuje cjelokupni analitički postupak. Unatoč navedenom, ekstrakcija otapalom još se koristi pri analizama ostataka glifosata. Klasična ekstrakcija sa organskim otapalima (npr. heksanom i diklormetanom) nije prikladna kod analize glifosata i njegovih metabolita zbog njihove velike polarnosti i topljivosti u vodi. Tako je od strane Europskog referentnog laboratorija razvijena nova multi metoda za ekstrakciju polarnih analita, tzv. brza metoda za polarne pesticide (eng. *Quick Polar Pesticides Method, QuPPE*) koja se bazira na ekstrakciji kiselim metanolom.⁴⁷ Nekoliko ekstrakcijskih procedura je objavljeno u radovima, a najčešće uključuju ekstrakciju sa vodom^{55,56,57}, smjesom vode-metanola^{58,59} ili vode-acetonitrila.^{52,53,54} Pojedini autori upozoravaju na problem niskog analitičkog povrata glifosata prilikom ekstrakcije sa acetonitriplom budući da on djeluje na precipitaciju proteina, te je najveći omjer uzorka: acetonitrila koji je uspješno primjenjen bez gubitaka analita 1:1.5.⁵⁶ Veliki nedostatak ekstrakcije uzorka otapalom je što nije prikladan za ekstrakciju polarnijih pesticida iz vodenih matrica te se u pripremu uzorka mora uvesti dodatni korak pročišćavanja.

Ekstrakcija na čvrstoj fazi (eng. *Solid Phase Extraction, SPE*) jedan je od najčešćih postupaka pripreme uzoraka za analizu pesticida iz uzoraka hrane i okoliša. SPE se često koristi kao samostalni postupak ekstrakcije ili u kombinaciji s dodatnim postupkom pročišćavanja ekstrakta. Ekstrakcija na čvrstoj fazi je metoda u kojoj se analit iz tekuće faze (obično vodena otopina) ekstrahira na čvrstu fazu (sorbens). Dobar sorbens je onaj kod kojeg je proces sorpcije reverzibilan, na kojeg se analit apsorbira brzo i reproducibilno, ali i lako eluira odgovarajućim otapalom. Važno je da je sorbens porozan, stabilan u matrici uzorka i u otapalu za eluiranje, da nije onečišćen te da posjeduje veliku površinu za kontakt s otopinom uzorka. Prilikom ekstrakcije na čvrstoj fazi moguće je kontrolom pH, protoka tvari te ionske jakosti postići zadržavanje samo jedne željene vrste na sorbensu. Postupak obuhvaća ukupno četiri koraka: kondicioniranje sorbensa u koloni,

propuštanje uzorka kroz sorbens, ispiranje sorbensa i eluiranje sorbiranog analita s odgovarajućim otapalom. Prvi korak ekstrakcije na čvrstoj fazi jest kondicioniranje, odnosno solvatacija sorbensa propuštanjem male količine otapala istih karakteristika kao i uzorak radi što bolje sorpcije analita. Najčešće se koristi kombinacija organskog otapala i vode (npr. metanol ili diklormetan). Kondicioniranjem se postiže bolji kontakt sorbensa i uzorka. Sorbens se može nalaziti na disku ili u mikrokoloni te se u sljedećem koraku kontinuiranim propuštanjem uzorka na njega adsorbira analit. Uspješnost ekstrakcije ovisi o načinu propuštanja uzorka, koje mora biti kontinuirano i jednoliko pri čemu je sorbens cijelo vrijeme ispunjen uzorkom. Vrlo često se događa da pri ekstrakciji složenijih uzoraka uz ciljane analite koeluiraju i drugi neželjeni sastojci uzorka. Da bi se to spriječilo, prije eluiranja analita sorbens je potrebno isprati s odgovarajućim otapalom. Otapalo mora biti takvo da ispere interferirajuće sastojke uzorka, a da pri tom analit ostane sorbiran na sorbensu. Najčešće je riječ o čistoj vodi, no koristi se i voda koja sadrži malu količinu organskog otapala. Na kraju se adsorbirani analit eluira prikladnim otapalom ili smjesom otapala.

U novije je vrijeme postupak SPE automatiziran pri čemu se može direktno povezati s kromatografskim sustavima te se na taj način može uvelike poboljšati osjetljivost i selektivnost analitičkih metoda te omogućiti visoku ponovljivost rezultata. Postupak SPE karakterizira brzina, jednostavnost, smanjena upotreba otapala, visoka ponovljivost te mogućnost određivanja niskih koncentracija analita.⁴⁴

Najvažniji korak u SPE je odabir odgovarajućeg sorbensa. Odabir sorbensa ovisi o vrsti analita i kemijskoj prirodi matrice uzorka. Postoji podjela na tri najvažnije vrste ovisno o prirodi sorbensa: SPE normalnih faza (polarni sorbens), obrnutih faza (nepolarni sorbens) i ionske izmjene. SPE obrnutih faza je najbolji za pročišćavanje polarnih uzoraka iz vodene faze; SPE normalnih faza je najbolji za nepolarne spojeve otopljene u organskoj matrici, dok se ionski spojevi najbolje zadržavaju na ionsko-izmjenjivačkim SPE. Mehanizam zadržavanja na SPE sorbensima je suštinski isti kao u kromatografiji. Najčešći nepolarni sorbensi su kemijski modificirani silikagel (oktadecilsilicijev dioksid C18 ili oktalsilicijev dioksid C8), sorbensi na bazi aktivnog ugljika te polimerni sorbensi (kopolimer polistiren – divinilbenzen). Postoje SPE sorbensi hidrofilno – lipofilnog karaktera kao što je SPE komercijalnog imena OASIS HLB kojeg čini sorbens sa divinil-benzenskim i N-vinilpirolidonskim skupinama. Efikasnije su od drugih kolona za ekstrakciju na čvrstoj fazi jer su primjenjive u širokom rasponu pH vrijednosti (od 1 do 14) pa mogu ekstrahirati kisele,

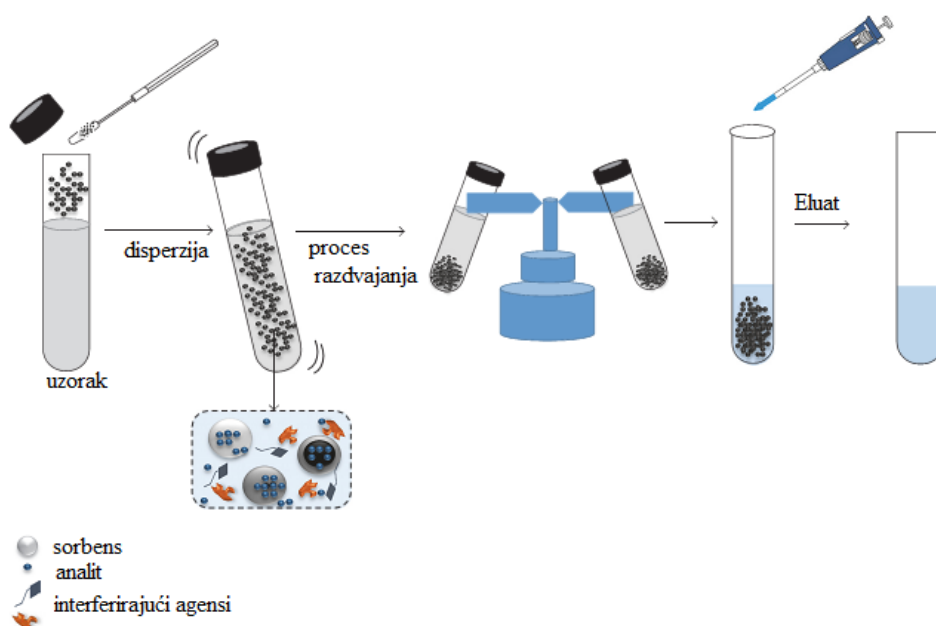
neutralne i bazične analite. Iz navedenih razloga, kolone Oasis HLB mogu se koristiti za ekstrakcije analita bez prethodnog podešavanja pH vrijednosti. Ove kolone ne sadrže slobodne silanolne skupine na koje bi se mnoge vrste analita mogle čvrsto vezati čime bi se onemogućilo njihovo eluiranje dodatkom organskog otapala. U novije vrijeme koriste se i ionsko – izmjenjivački sorbensi koji se koriste za ekstrakciju ioniziranih spojeva ili spojeva koji mogu postati ionski promjenom pH. Negativno nabijeni spojevi mogu se zadržati sa sorbensom s jakom anionskom izmjenom (eng. *Strong anion Exchange, SAX*) ili slabom anionskom izmjenom (eng. *Weak Anion Exchange, WAX*). Pozitivno nabijeni spojevi zadržani su na sorbensima sa jakom kationskom izmjenom (eng. *Strong Cation Exchange, SCX*) ili slabom kationskom izmjenom (eng. *Weak Cation Exchange, WCX*). Mehanizam zadržavanja temelji se na elektrostatičkoj privlačnosti između nabijene funkcionalne skupine spoja i nabijene skupina koja je vezana na površinu silike. U slučaju SAX-a, sorbens sadrži alifatske skupine kvaternih amina vezane na površinu silike. Radi se o jakoj bazi u obliku trajnog kationa (pK_a kvaternarnog amina je vrlo visoko, veći od 14) koji privlači anionske vrste prisutne u otopini. Osim toga, sorbensi s jakim ili slabim anionskim izmjenama mogu se koristiti za ekstrakciju pozitivno nabijenih analita.

Sličnost glifosata i njegovih metabolita prirodnim aminokiselinama i malim aminokiselinama doprinosi poteškoćama u određivanju ostataka tih spojeva u usjevima i životinjskim proizvodima što zahtijeva korištenje dugotrajnih postupaka čišćenja koji ponekad uključuju i primjenu SPE postupka pročišćavanja. Najčešći korišteni sorbensi su SAX prilikom analitike pive, čaja i tla.^{57,60} Za zadržavanje nepolarnih interferencija u vodenim ekstraktima primjenjen je HLB kod analize grejpa⁴⁸, kukuruza i soje⁵⁰, krvi,⁵² tla⁶¹ i mlijeka.⁶² Kako bi se uklonile nepolarne interferencije kod metanolnih ekstrakata povrća i voća korišten je također HLB i usporedno SCX i WCX, međutim nisu primijećena znatna poboljšanja u postuku pročišćavanja te nisu korišteni u daljnjem radu.⁵⁸ Međutim, u uzorcima hrane životinjskog podrijetla upravo je SCX pokazao najbolje rezultate pružajući zadovoljavajuće analitičke rezultate.⁶³ Kombinacija SAX i SCX sorbensa primjenjena je pri analizi slada i kukuruza budući da sam SAX sorbens nije uspješno uklonio komponente matrice što je uzorkovalo pad osjetljivosti u spektrometriji masa, a primjenom SCX sorbensa uklonjene su aminske komponente i pigmenti.⁵⁷ Automatizirani SPE sustav primjenjen je kod analize meda korištenjem HLB sorbensa.⁶⁴ Pri vodenoj ekstrakciji meda isprobano je nekoliko različitih sorbensa-amino, WAX i SAX, a rezultati su bili različiti. SAX nije efikasno zadržao metabolit

AMPA, a WAX sorbens pokazao je dobre analitičke povrate za oba analita-glifosat i AMPA, no međutim nije se pokazao efikasnim kod nastojanja da se smanje detekcijski limiti AMPA.⁶⁵

Ekstrakcija raspršenjem čvrste faze (eng. *Dispersive Solid Phase Extraction, dSPE*) je postupak koji se uspješno primjenjuje kao metoda ekstrakcije, izolacije i čišćenja u analitici. DSPE je pojednostavljeni postupak SPE koji omogućuje analizu više uzoraka odjednom, prilično je brz i zahtijeva malu potrošnju otapala. Postupak se sastoji od dodavanja čvrstog sorbenta, obično na bazi silike ili polimera, izravno u otopinu uzorka. Procesom disperzije povećava se kontaktno područje između sorbenta i analita. Najčešće korišteni sorbensi su čvrste tvari kemijski modificirane dodatkom nekoliko kemijskih spojeva koji mijenjaju njihov afinitet. Ove modifikacije osiguravaju selektivnost za analite od interesa, što omogućava maksimalno zadržavanje, minimizirajući smetnje u analitičkoj matrici. Nakon disperzije, sorbens se izolira postupkom centrifugiranja ili filtracije. Jednom kada se kruta faza izolira, analiti ili smetnje adsorbirani na površini sorbenta mogu se lako eluirati ili eliminirati dodavanjem odgovarajućih organskih otapala. Sorbensi upotrijebljeni u dSPE temelje se uglavnom na silicijum dioksidu modificiranom s nekoliko funkcionalnih skupina, poput primarnog sekundarnog amina (PSA), oktadesil, etilsilana, aminopropila. Sorbenti na bazi silike najčešće se koriste u postupku ekstrakcije spojeva u širokom rasponu pH ili u uklanjanju smetnji prisutnih u prehrambenom matricama, kao što su organski spojevi, boje, lipidi i proteini. Primjena oktadesil sorbensa dSPE postupka pokazala se efikasnom prilikom analize polarnih pesticida u uzorcima bogatim mastima nakon ekstrakcije zakiseljenim metanolom.⁴⁷ S druge strane, interakcije na bazi Lewis-kiseline i Lewisa-baze sorbensa sa cirkonijevim nanočesticama, korišteni su za poboljšanje čišćenja uzoraka za složene matrice, omogućujući učinkovito uklanjanje masnoće i boje s ekstrakta uzoraka u usporedbi s tradicionalnim sorbensima. Ova vrsta sorbenata omogućuje dobivanje robusne analize, a u nekim slučajevima mogu zamijeniti uobičajene sorbense u nekoliko metodologija bez dodatnog razvoja metoda. DSPE je jedan od koraka vrlo popularnog postupka pripreve uzoraka tzv. *QuEChERS* (eng. *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) koji se primjenjuje u analizi ostataka pesticida i veterinarskih lijekova u hrani. Razvili su ga Anastassiades i sur. (2003)⁶⁶ te je prvotno bio namijenjen prvenstveno za analizu pesticida u krutim uzorcima, međutim njegova primjena proširena je i na ostale matrice i analite.

Postupak se sastoji od dva koraka: ekstrakcije uzorka s acetonitrilom i pročišćavanja ekstrakta s odgovarajućim sorbensom.



Slika 5. Schema dSPE postupka

Ultrafiltracija je još jedan uobičajeni način odvajanja malih i velikih molekula (npr., natrij u odnosu na albumin). Tekući uzorak distribuira se u ultrafiltracijsku kivetu. Dno te kivete je membrana, obično izrađena od regenerirane celuloze. Nakon što se kiveta stavi u centrifugu, centrifugalna sila gura otapalo i male molekule kroz membranu. Makromolekule (u ovom primjeru albumin) zadrže se na membrani. Nakon ultrafiltracije prema potrebi analize mogu biti isprana s membrane. I makromolekule i otopina koja sadrži male molekule mogu se koristiti za daljnju analizu. Najvažnija karakteristika ultrafiltracijske kivete je njezina „cutoff“ vrijednost molekularne mase, koja se obično izražava u kilodaltonima. Tako primjerice kiveta s cut-off od 10 kDa zadržava molekule s molekularnom masom većom od približno 10 kDa.

Postoje razni filtri s cut-off vrijednostima u rasponu 3–100 kDa. Kod analize polarnih pesticida ultrafiltracija je primjenjena kod hrane životinjskog podrijetla, uključujući jetru, bubreg, jaja⁴⁷, te u analizama seruma, plazme i stočne hrane.^{56, 67}

2.3.1.2. Instrumentne tehnike za određivanje pesticida

Analitičke tehnike za određivanje pesticida ekstrahiranih iz različitih tipova uzoraka moraju biti visoko selektivne te omogućiti kvalitativnu i kvantitativnu analizu pri vrlo niskim koncentracijama analita. Uz odabir prikladnog postupka pripreve uzorka, odabir instrumentne tehnike često je ključan korak za uspješnu analizu. Najčešće analitičke metode koje se koriste za određivanje pesticida su plinska kromatografija (GC) koja je pogodna za određivanje nepolarnih i isparljivih spojeva i tekućinska kromatografija (LC) koja je pogodnija za određivanje nehlapljivih i termički nestabilnih polarnih organskih spojeva. Posljednjih godina sve se više koriste polarni, termički labilni i manje isparljivi pesticidi, koje je teško otkriti upotrebom GC-a, što praktično znači da tekućinska kromatografija ima prednost u analizi pesticida. LC je u kombinaciji s detektorom mase postao jedan od vodećih analitičkih alata za analiza pesticida koji osiguravaju osjetljivost, selektivnost i udovoljavaju EU propise za analizu pesticida. Analizu pesticida u hrani otežava raznolikost i složenost vrste hrane koje je potrebno analizirati kao i niske koncentracije u kojima su pesticidi obično prisutni u hrani.

Kontrola ostataka pesticida u hrani, postaje sve veći problem kako za institucije koje su zadužene za sigurnost hrane tako i za proizvođače hrane. U zadnjih nekoliko godina analitika pesticida u hrani suočena je s različitim problemima zbog implementacije novih i strožijih zakonskih propisa koji se odnose na pesticide i njihove maksimalno dopuštene količine koje se smiju naći u hrani. U svrhu očuvanja ljudskog zdravlja potrebno je osigurati stalno praćenje njihove koncentracije u hrani životinjskog podrijetla (masno tkivo, mlijeko i mliječni proizvodi, riba i proizvodi od ribe, meso i mesne prerađevine). Veliki broj aktivnih supstanci koje se mogu koristiti u proizvodnji hrane te kemijska različitost aktivnih supstanci, različita funkcionalnost i različita fizikalno-kemijska svojstva, s analitičkog gledišta otežavaju ispitivanje zdravstvene ispravnosti hrane s obzirom na prisutnost ostataka pesticida u hrani.

U kromatografiji se kvalitativna analiza provodi na temelju vremena zadržavanja, pri čemu se uspoređuje vrijeme zadržavanja analita iz testiranog uzorka s onim za standardnu otopinu, snimljenoj u istim eksperimentalnim uvjetima. Međutim, vrijeme zadržavanja nije dovoljno za pouzdanu identifikaciju analita, pa se ovaj problem rješava kombiniranjem kromatografije sa spektrometrijom masa koja pruža dodatne informacije o analitu. S obzirom na to da su spektri masa specifični za svaku vrstu tvari, moguće je identificirati analite s

visokim stupnjem sigurnosti. Tako spajanje kromatografije, kao tehnike razdvajanja, sa spektrometrijom masa omogućuje precizniju identifikaciju tvari s istim ili sličnim vremenima zadržavanja na temelju različitih spektara masa.

Analize glifosata temelje se na direktnim analizama tekućinskom kromatografijom uz detektor sa nizom dioda ili spektrometrijom masa ili indirektnom analizom nakon derivatizacije uz primjenu fluorescentnog detektora ili spektrometrije masa.^{68,69} Derivatizacija je vremenski zahtjevan i dugotrajan proces koji često nije prikladan za širok raspon različitih uzoraka hrane, a uključuje primjenu reagensa kao što su 9-fluoroenilmetil kloroformata (FMOC-Cl), *o*-nitrobenzensulfonil klorid, *p*-ftalaldehid i *p*-toluensulfonil klorid. Liao i sur. (2018)⁴³ objavili su metodu za određivanje glifosata korištenjem FMOC derivatizacijskog reagensa koja je prikladna za širok raspon uzoraka-od onih sa visokim udjelom vode do onih sa malim udjelom vode, bogatim proteinima pa i uzorke životinjskog podrijetla. Derivatizacija sa FMOC pokazala se prikladnom i kod određivanja glifosata i njegovog metabolite AMPA u mlijeku.⁴²

Postupak derivatizacije može se provesti prije ili nakon kolone, a derivatizacija prije kolone pokazala se preciznijom u odnosu na post-kolonsku derivatizaciju kod koje je teže kontrolirati reakciju. ESI (eng. *Electro Spray Ionization*) se koristi za produkciju bilo pozitivnih ili negativnih glifosat-FMOC derivatnih iona, a pri tome praćenje u pozitivnom načinu snimanja daje signale gotovo dvostruko veće osjetljivosti od onih u negativu. Tekućinska kromatografija pokazala se kao brza, osjetljiva i ponovljiva za analizu ostataka glifosata, međutim glavni nedostatak je primjena derivatizacijskih procesa što zahtjeva skupu opremu. Jednostavna, brza, robusna metoda za određivanje glifosata i AMPA u vodi u koncentracijskim razinama $\mu\text{g L}^{-1}$ razvijena je korištenjem derivatizacijskog reagensa 6-aminokvinolil-N-hidroksisukcinimidil karbamata direktno u bočici za uzorak.⁷⁰

Direktno kromatografsko određivanje je moguće sprovesti korištenjem kolona ionske izmjene bez derivatizacije prilikom čega se razdvajanje analita postiže interakcijama iona analita i nabijenih mjesta na stacionarnoj fazi, a detekcija praćenjem negativnih iona. Ionska kromatografija je primjenjiva kod analize uzoraka s jednostavnim koracima pročišćavanja. Kod analize uzoraka kao što su tla koja uključuju prisutnost nekoliko kompetitivnih iona i različite varijacije okoliša kao što su pH, organska tvar i mikroorganizmi treba uzeti u obzir kompleksnost uzorka koje mogu otežati ekstrakciju i dovesti do nereproducibilnih rezultata prilikom analize ionskom kromatografijom. Direktno određivanje je također moguće provesti

korištenjem HILIC kolona (eng. *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*) kao što su propilaminske kolone ili HILIC-WAX stacionarne faze. Također se koriste kolone mješovitog djelovanja koje kombiniraju svojstva obrnute faze i slabe anionske i/ili kationske izmjene u jednome, te Hypercarb kolone koje su punjene 100 % poroznim grafitiziranim ugljikom.

Plinska kromatografija (GC) nije najbolji izbor prilikom analize polarnih pesticida zbog kompliciranih derivatizacijskih postupaka za derivatizaciju fosfonske, karboksilne i sekundarno-aminske skupine prije analize. U literaturi su opisana dva različita derivatizacijska procesa koja uključuju ili trialkilsililaciju ili istovremenu acilaciju i esterifikaciju, a potonja se pokazala prikladnom kod analize kukuruznog zrna, sojine stočne hrane i orahovog ploda.²³ Za derivatizaciju se koriste trifluoroetanol, trifluoroacetatni anhidrid i diazometan, heptafluoro-1-butanol, te smjese fluoriranih anhidrida i perfluoriranih alkohola.⁷¹

Usporedba direktne LC-MS/MS i derivatizacijske GC-MS/MS metode pokazala je veće analitičke povrate kod direktne metode, dok su granice kvantifikacije u obje metode bile iste, međutim derivatizacijska metoda bila je znatno sporija zbog korištenja dodanog koraka pročišćavanja kako bi se uklonio višak derivatizacije čime je metoda postala kompliciranija i iscrpnija.²³

Prilikom zadnjeg EFSA izvješća razmatrana je HPLC-MS/MS metoda za praćenje glifosata, AMPA i N-acetil-glifosata sa kombiniranim granicama kvantifikacije od 0,1 mg kg⁻¹, odnosno 0,025 mg kg⁻¹ za svaki pojedini analit u mesu, mlijeku i jajima, te 0,2 mg kg⁻¹ (odnosno 0,05 mg kg⁻¹ za svaki pojedini analit) u jetri, bubregu i masti.¹⁹ Potvrдна metoda plinske kromatografije sa spektrometrijom mase (GC-MS) prikladna je samo za određivanje glifosata u mlijeku, jajima i mesu. Stoga potvrдна metoda za određivanje glifosata u masti, jetri i bubregu, te potvrдна metoda za određivanje AMPA i N-acetil-glifosata u svim matricama i dalje nedostaju.

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

Za razvoj metode određivanje glifosata i njegovih metabolita u hrani životinjskog podrijetla korišteni su analitički standardi poznate čistoće prikazani u Tablici 2.

Tablica 2. Analitički standardi korišteni za razvoje metode određivanja ostataka glifosata i njegovih metabolita u hrani životinjskog podrijetla

	Analit	Proizvođač
1.	AMPA, čistoće 99,7 %	CPA chem, Bogomilovo, Bugarska
2.	glifosat, čistoća 99,5 %	Chem service inc., Wester Chester, SAD
3.	N-acetil-AMPA, $\gamma = 999,91 \text{ mg L}^{-1}$ u otapalu voda:acetonitril 9:1 (v/v)	QPP-Lab, Putignano Alberobello, Italija
4.	N-acetil-glifosat, $\gamma = 1000,36 \text{ mg L}^{-1}$ u otapalu voda:acetonitril 9:1 (v/v)	QPP-Lab, Putignano Alberobello, Italija
5.	glifosat- $^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}$, $\gamma = 200,01 \text{ mg L}^{-1}$ u otapalu voda:acetonitril 9:1 (v/v)	QPP-Lab, Putignano Alberobello, Italija
6.	AMPA- $^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$, $\gamma = 1000,21 \text{ mg L}^{-1}$ u otapalu voda:acetonitril 9:1 (v/v)	QPP-Lab, Putignano Alberobello, Italija
7.	N-acetil-glifosat-D3, $\gamma = 1000,74 \text{ mg L}^{-1}$ u otapalu voda:acetonitril 9:1 (v/v)	QPP-Lab, Putignano Alberobello, Italija

Uz analitičke standarde pesticida korištene su sljedeće kemikalije opisane u Tablici 3.

Tablica 3. Kemikalije korištene za razvoj metode određivanja ostataka glifosata i njegovih metabolita u hrani životinjskog podrijetla

	Kemikalija	Karakteristike	Proizvođač
1.	acetonitril	za tekućinsku kromatografiju	J. T. Baker, Deventer, Nizozemska
2.	mravlja kiselina	za LC-MS, čistoće $\geq 98\%$	Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka
3.	metanol	za tekućinsku kromatografiju	J. T. Baker, Deventer, Nizozemska
4.	SPE OASIS HLB	60 mg/3 mL	Waters, Milford, SAD
5.	diklormetan	p.a.	J. T. Baker, Deventer, Nizozemska
6.	oktadecilsilicijev dioksid (C18) sorbens	p.a.	Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD
7.	SPE Plexa PAX	polimerni anionski izmjenivač, 60 mg, 3mL	Agilent Technologies, Santa Clara, SAD
8.	primarni sekundarni amin (PSA)	-	Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD
9.	SPE Plexa PCX	polimerni kationski izmjenjivač, 60 mg, 3 mL	Agilent Technologies, Santa Clara, SAD

U sljedećim tablicama opisani su pribor i uređaji korišteni tijekom razvoja metoda za određivanje glifosata i njegovih metabolita u hrani životinjskog podrijetla.

Tablica 4. Pribor korišten za razvoj metode određivanja ostataka glifosata i njegovih metabolita u hrani životinjskog podrijetla

	pribor	karakteristike	proizvođač
1.	homogenizator uzoraka- Grindomix GM 300	brzina 500 do 4000 min ⁻¹	Retsch GmbH, Haan, Njemačka
2.	laboratorijska pipeta, mehanička	2-20 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL	Mettler Toledo, Columbus, SAD
3.	uređaj za vakuumsku filtraciju	-	Supelco, St. Louise, SAD
4.	ultrafiltracijski filteri (Vivaspin ® 5 kDa)	s 5 kDa prekidom molekulske mase prikladnim za centrifuge	Sartorius, Göttingen, Njemačka
5.	filteri za šprice	regenerirana celuloza, 0,2 µm, promjera 4 mm duljina 100 mm,	Whatman, Maidstone, UK
6.	Torus Dea kromatografska kolona	promjer 2,1 mm i veličina čestica 1,7 µm duljina 100 mm,	Waters, Mildford, SAD
7.	Hypercarb kromatografska kolona	promjer 2,1 mm i veličina čestica 5 µm duljina 100 mm,	Thermo Scientific, Waltham, SAD
8.	APP kromatografska kolona	promjer 2,1 mm i veličina čestica 5 µm	Waters, Mildford, SAD

Tablica 5. Uređaji korišteni za razvoj metode određivanja ostataka glifosata i njegovih metabolita u hrani životinjskog podrijetla

	pribor	karakteristike	proizvođač
1.	analitička vaga (XSE205)	točnost $\pm 0,01$ mg	Mettler Toledo, Columbus, SAD
2.	analitička vaga (HR-202)	točnost ± 1 mg	A&D company, Tokyo, Japan
3.	vakuumska pumpa	-	Sartorius, Göttingen, Njemačka
4.	uređaj za ekstrakciju na čvrstoj fazi	-	Agilent Technologies, Santa Clara, SAD
5.	centrifuga	do 4500 rpm i s termostatom	VWR, Radnor, SAD
6.	centrifuga	do 14000 rpm i s termostatom	Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD
7.	vortex – miješalica (Ika Vortex 3 Genius)	-	Ika, Staufen, Njemačka
8.	vezani sustav tekućinski kromatograf (1290) – spektrometar masa (6460C)	-	Agilent Technologies, Santa Clara, SAD

3.1.1. Radne otopine

Za pripremu standardnih otopina korišteni su certificirani referentni materijali pesticida poznate čistoće različitih proizvođača (Tablica 2). Prema potrebi pripremane su bazne otopine iz referentnih standarda u krutom obliku približnih masenih koncentracija $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ u smjesi voda:acetonitril 9:1 (v/v). Iz referentnih standarda ili baznih otopina pesticida pripremane su otopine miješovitih standarda, masenih koncentracija 10 ili $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ također u istom otapalu. Otopine radnih standarda čuvane su 7 mjeseci pri $+ 2 - + 8$ °C. Pri pripremi korišteno je plastično posuđe.

3.2. Metode

3.2.1. Tekućinska kromatografija vezana sa spektrometrijom masa

Za razvoj metode određivanja ostataka glifosata i njegovih metabolita korišten je vezani sustav tekućinska kromatografija - spektrometrija masa proizvođača Agilent (Agilent Technologies, SAD). Za kromatografsko razdvajanje korišten je 1290 UHPLC Infinity instrument opremljen s kvaternom pumpom (G4204A), termostatiranim samouzorkivačem (G1330B) i termostatiranim odjeljkom za kolonu (G1316C). Kromatograski sustav spojen je sa sustavom tandemne spektrometrije masa (6460C QQQ) opremljenim ESI sustavom za ionizaciju, s uređajem za samouzorkovanje a sve je povezano računalom sa softverom za upravljanjem instrumentima, prikupljanje i obradu podataka (MassHunter). Prilikom rada potrebno je sve metalne kapilare zamijeniti plastičnima kako bi se smanjile interakcije polarnih spojeva sa metalom. Tijekom razvoja i optimiranja metode korištene su kolone različitog kemijskog sastava i djelovanja: Hypercarb kolona duljine 100 mm, promjera 2,1 mm, veličina čestica punila 5 μm (Thermo Scientific, Waltham, SAD), Torus Dea kolona duljine 100 mm, promjera 2,1 mm, veličina čestica punila 1,7 μm (Waters, Mildford, SAD) i tzv. APP kolona (*engl. Anionic Polar Pesticides*) duljine 100 mm, promjera 2,1 mm i veličine čestica punila 5 μm (Waters, Mildford, SAD). Kromatografsko razdvajanje postignuto je korištenjem Hypercarb kolone uz 1,2 % mravlju kiselinu u vodi (v/v) kao pokretnu fazu A i 0,9 % mravlju kiselinu u acetonitrilu (v/v) kao pokretnu fazu B. Korišteno je sljedeće gradijentno eluiranje prikazano u Tablici 6. uz konstantan protok od 0,35 mL min⁻¹ i kolonu termostatiranu na 40 °C.

Tablica 6. Gradijentni program eluiranja

Vrijeme/minute	Pokretna faza A (%)	Pokretna faza B (%)
0	100	0
4,5	98	2
6	100	0
7	100	0

Također je korišten program ispiranje igle u otopini voda:metanol:acetonitril:izopropanol 1 : 1 : 1 : 1 (v/v), uz dodatak 1% mravlje kiseline (v/v).

Volumen od 5 μ L kod ekstrahiranog uzorka masnog tkiva odnosno od 20 μ L za ostalu vrstu uzoraka injektiran je u sustav.

Za ionizaciju ciljanih analita korišteni su pozitivni i negativni načini ionizacije. Napon kapilare postavljen je na 2000 V, dok su protoci plina postavljeni na 10 mL min⁻¹. Temperatura izvora podešena je na 275 °C, a temperatura „sheath“ plina na 400 °C.

3.2.2. Postupci priprave uzorka

Za razvoj metoda korišteni su uzorci masnog tkiva, jetre, mlijeka, jaja i meda za koje je potvrđeno da ne sadrže odabrane analite. Postupci su razvijeni i optimirani analizom modelnog uzorka pripremljenog dodatkom standardne otopine smjese analita u slijepu matricu uzorka prije početka ekstrakcije.

3.2.2.1. Postupci priprave uzoraka masnog tkiva

Uzorak masnog tkiva mora se dobro homogenizirati kako bi se dobila homogena, tekuća smjesa. Dobro homogeniziranom izvaganom uzorku od 5 g u plastičnoj kivetu za centrifugiranje od 50 mL doda se 10 mL 1% mravlje kiseline u vodi (v/v). Slijedi ručno mučkanje ili korištenje rotacijske tresilice u trajanju od 5 minuta. Nakon toga doda se 5 mL diklormetana, snažno promućka i centrifugira na 4000 o/min, 10 minuta pri čemu se vodeni sloj odvaja od organskog. Bistri vodeni sloj profiltriran je kroz filter od regenerirane celuloze (4 mm, 2 μ m) u plastičnu bočicu za uzorak i podvrgnut LC-MS analizi.

3.2.2.2. Postupci priprave uzoraka jetre

Za pripravu uzoraka jetre optimalni postupak bio je sljedeći: 2 g homogeniziranog uzorka jetre stavi se u plastičnu kivetu za centrifugiranje od 50 mL, doda se 10 mL 1% mravlje kiseline u vodi (v/v) kako bi se ekstrahirali analiti, zatim se ručno promućka ili stavi u rotacijsku tresilicu na 10 minuta. Nakon toga slijedi centrifugiranje na 4000 o/min, 15 minuta pri 4 °C pri čemu dolazi do taloženja organskih tvari. Volumen od 2 mL gornjeg sloja prebaci se u plastične epruvetice za centrifugu od 2 mL i centrifugira na 14000 o/min 15 minuta pri 4 °C kako bi se istaložili proteini. U ultrafiltracijske filtere doda se 1 mL redestilirane vode i 1 mL srednjeg centrifugiranog sloja, te centrifugira na 6000 okretaja 30-45 minuta. Volumen od 1 mL centrifugiranog filtrata propušten je kroz SPE kolonicu (Plexa PCX, 60 mg, 3 mL) prethodno kondicioniranu s 1 mL metanola i 1 mL 0,5% mravlje kiseline u vodi (v/v). Eluati

su sakupljani u plastičnim epruvetama i prebačeni u plastične bočice za uzorke i podvrgnuti LC-MS analizi.

3.2.2.3. Postupci pripreve uzoraka mlijeka

Uzorku mlijeka (2 g) u plastičnoj kivetu za centrifugiranje od 50 mL dodano je 10 mL 1% mravlje kiseline u vodi (v/v), ručno mučkano ili stavljeno u rotacijsku tresilicu na 5 minuta. Zatim je dodano 2 mL diklormetana, promućkano i centrifugirano na 14000 o/min, 10 minuta pri čemu dolazi do odvajanja vodenog i organskog sloja. Bistri gornji sloj prebačen je u plastičnu vialu i podvrgnut LC-MS analizi.

3.2.2.4. Postupci pripreve uzoraka jaja

Izvaganom homogeniziranom uzorku jaja (2g) u plastičnoj kivetu za centrifugu od 50 mL, dodano je 8,5 mL 1% mravlje kiseline u vodi (v/v), ručno mučkano ili stavljeno u rotacijsku tresilicu na 5 minuta. Nakon toga slijedi centrifugiranje na 4000 o/min, 15 minuta pri 4 °C pri čemu dolazi do taloženja organskih tvari. Volumen od 2 mL gornjeg sloja prebaci se u plastične epruvetice za centrifugu od 2 mL i centrifugira na 14000 o/min 15 minuta pri 20 °C kako bi se istaložili proteini. U ultrafiltracijske filtere doda se 1 mL redestilirane vode i 1 mL srednjeg centrifugiranog sloja, te centrifugira na 6000 okretaja 30-45 minuta. Volumen od 1 mL centrifugiranog filtrata propušten je kroz SPE kolonicu (Plexa PCX, 60 mg, 3 mL) prethodno kondicioniranu s 1 mL metanola i 1 mL 0,5% mravlje kiseline (v/v). Eluati su sakupljani u plastičnim epruvetama i prebačeni u plastične bočice za uzorke i podvrgnuti LC-MS analizi.

3.2.2.5. Postupci pripreve uzoraka meda

Izvaganom uzorku meda (5 g) u plastičnoj kivetu za centrifugu od 50 mL, dodano je 19 mL 1% mravlje kiseline u vodi (v/v), ručno mučkano ili stavljeno u rotacijsku tresilicu na 5 minuta. Nakon toga slijedi centrifugiranje na 4000 o/min, 15 minuta pri 4 °C pri čemu dolazi do taloženja organskih tvari. Vodeni sloj profiltriran je kroz filter od regenerirane celuloze (4mm, 2µm) u plastičnu bočicu za uzorke i podvrgnut LC-MS analizi.

3.2.3. Validacija metoda

U okviru istraživanja provedena je validacija razvijenih metoda u skladu sa smjernicama SANTE/11813/2017 i SANTE/12682/2019 za sustavno praćenje ostataka pesticida. Metode su validirane prema razvijenim postupcima ekstrakcije različitih matrica hrane životinjskog podrijetla, a uključivale su: specifičnost, utjecaj matrice, linearnost, točnost, preciznosti i granicu kvantifikacije.

Specifičnost je procjenjena analizom nekoliko slijepih matrica uzoraka. Tandemna spektrometrija masa je vrlo selektivna analitička tehnika, a time i vrlo specifična. Pri analizi uzoraka praćena su dva MRM prijelaza (2 prekursora i 2 produkta); jedan prijelaz korišten je za kvantitativno određivanje, a drugi za potvrdu.

Hrana životinjskog podrijetla su složene matrice uzorka i za očekivati je da će imati utjecaj na određivanje pesticida. Radi postizanja bolje djelotvornosti cjelokupnog analitičkog postupka ispitan je utjecaj matrice uzorka obzirom na primijenjeni postupak pripreme uzorka te obzirom na vrstu analizirane hrane životinjskog podrijetla-masno tkivo, jetra, mlijeko, jaje i med. Utjecaj matrice određen je usporedbom nagiba kalibracijskih krivulja dobivenih linearnom regresijom odziva detektora i koncentracije analita u standardnim otopinama pripravljenim u slijepoj matrici uzorka odnosno u otapalu prema izrazu (1):

$$ME(\%) = \frac{s_m}{s_s} \cdot 100 \quad (1)$$

gdje je:

s_m nagib kalibracijske krivulje dobivene linearnom regresijom odziva detektora (površine pikova) i koncentracije analita u standardnim otopinama smjese analita pripravljenim u slijepoj matrici uzorka, a

s_s nagib kalibracijske krivulje dobivene linearnom regresijom odziva detektora (površine pikova) i koncentracije analita u standardnim otopinama smjese analita pripravljenim u otapalu.

Linearnost metode testirana je na način da:

- Radno područje kalibracijskog pravca mora biti šire od ciljnih koncentracija validacije metode što znači da prva i zadnja točka na kalibracijskom pravcu moraju biti niže odnosno više koncentracije od koncentracijskih nivoa na kojima

se provodi validacija metoda ili može biti u području od LOQ do $10 \times \text{LOQ}$ ili veće

- Kriterij prihvaćanja linearnosti jest da devijacija izračunate koncentracije od prave koncentracije mora biti $< \pm 20\%$.

Ispitivanje linearnosti provodilo se kreiranjem kalibracijskog pravca za sve odabrane ione analita. Kalibracijski pravac predstavlja ovisnost odziva detektora o koncentraciji analita, a kvantitativno određivanje koncentracije pesticida provodi se na temelju kreiranog kalibracijskog pravca ciljnog iona. Kalibracijski pravac se kreirao na najmanje 3 točke. Kreirao se dodatkom poznate koncentracije standarda u matricu koja ne sadrži pesticide prije postupka ekstrakcije. Priređene su otopine analita od $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ te su sa njima dodatkom poznatog volumena u uzorak masnog tkiva priređene kalibracijske točke 12,5; 20, 25, 40, 50 i 100 ng mL^{-1} , kod jetre 5, 10, 20, 50, 80 i 100 ng mL^{-1} , mlijeka i meda 5, 8, 10, 20, 50, 80, 100 i 160 ng mL^{-1} , te jaja 2,5; 4, 5, 10, 20, 40, 50 i 60 ng mL^{-1} .

Granice kvantifikacije (GK) određene su dodavanjem određene količine pesticida u slijepu matricu uzorka. GK je najmanja količina analita u uzorku koja se može kvantificirati uz odgovarajuću preciznost i točnost. Pri određivanju je potrebno zadovoljiti kriterij istinitosti u rasponu od 70 do 120 % sa preciznošću iskazanom kao relativna standardna devijacija (RSD) do 20%. Granica kvantifikacije metode treba biti manja ili jednaka dopuštenoj koncentraciji pesticida u skladu sa Uredbom Komisije 293/2013.

Preciznost kao ponovljivost mjerenja i izraz slaganja između niza mjerenja koja se provode u istom homogenom uzorku pod propisanim uvjetima provedena je na način da su od uzoraka masnog tkiva, jetre, mlijeka, jaja i meda za koje je potvrđeno da ne sadrže odabrane analite pripremljeni modelni uzorci dodatkom standardne otopine smjese analita u slijepu matricu uzorka. Ispitivanje je provedeno na minimalno pet mjerenja za svaki koncentracijski nivo, što uključuje minimalno 3 različita koncentracijska nivoa. Izračunate su srednje vrijednosti masenih koncentracija po svakom obogaćenom koncentracijskom nivou, standardne devijacije (SD) i relativne standardne devijacije (RSD). Metoda je prikladna ukoliko zadovoljava kriterije propisane u dokumentu SANTE/12682/2019 da je $\text{RSD} \leq 20\%$.

Točnost je stupanj podudaranja između stvarne, tj. prihvaćene referentne vrijednosti i srednje vrijednosti koja se dobije primijenjenim postupkom određeni broj puta. Brojčana vrijednost točnosti dobije se kao razlika ili kao količnik aritmetičke sredine rezultata i referentne vrijednosti tj. prihvaćene vrijednosti, a ovaj se postupak računanja posebno primjenjuje kod određivanja analitičkog povrata. Analitički povrati računati su na minimalno

3 koncentracijska nivoa. Provedena su minimalno pet mjerenja za svaki koncentracijski nivo. Pripremljene su ishodne otopine pesticida $\gamma = 10 \mu\text{g mL}^{-1}$ te su prije početka ekstrakcije dodani poznati volumeni da bi se dobili gore navedeni koncentracijski nivoi. Apsolutni analitički povrati (R) izračunati su prema sljedećem izrazu (2):

$$R(\%) = \frac{\gamma_s}{\gamma_t} \times 100 \quad (2)$$

gdje je:

γ_s izmjerena masena koncentracija analita dodanih u slijepu matricu uzorka,

γ_t teoretska masena koncentracija pesticida dodanih u slijepu matricu uzorka

3.2.4. Mjerna nesigurnost

Mjerna nesigurnost određena je na temelju podataka prikupljenih u okviru validacije koja je opisana u prethodnom poglavlju koristeći izmjerene koncentracije analita dodanih u slijepu matricu uzoraka.

Za računanje mjerne nesigurnosti korišten je "top down" empirijski model kod kojega se mjerna sigurnost računa se prema formuli (3):

$$U(\%) = k \sqrt{RSD^2 + \left(\frac{100 - R}{2\sqrt{3}} \right)^2} \quad (3)$$

gdje je:

U(%) - proširena mjerna nesigurnost,

k - faktor pokrivanja,

RSD - srednja relativna standardna devijacija (%), i

R - srednji apsolutni analitički povrat (%) dobiveni validacijom.

Račun je proveden za minimalno tri koncentracijske razine pesticida u uzorku, a prema validacijskim podacima. Proširena mjerna nesigurnost analitičke metode konačno je određena iz mjerne nesigurnosti metode koristeći faktor $k = 2$ čime je određen interval s 95 % – tnom sigurnosti za određivanje prave vrijednosti masene koncentracije pesticida (γ) u odnosu na izmjerenu masenu koncentraciju (γ). Sa sigurnošću od 95 % može se tvrditi da je prava masena koncentracija analita $\gamma - U(Y) < \gamma_{sr} < \gamma + U(Y)$.

3.2.5. *Primjena razvijenih metoda na realne uzorke*

Razvijene metode primjenjene su za analizu glifosata i njegovih metabolita u hrani životinjskog podrijetla. U okviru istraživanja ukupno je analizirano 60 uzoraka različitih vrsta matrica: 10 uzoraka masnog tkiva (uzorak 1-10), 10 jetre (uzorak 11-20), 10 jaja (uzorak 21-30), 10 svježeg mlijeka (uzorak 31-40) i 20 meda različitih vrsta (uzorak 41-60). Identifikacija i kvantifikacija analita izvodila se praćenjem višestrukih tranzicijskih reakcija (MRM) pri čemu je analit identificira prema vremenu zadržavanja, a u skladu sa vremenom zadržavanja analita iz odgovarajuće otopine standarda te prema prisutnosti i omjeru intenziteta zadanih iona. Procjena masene koncentracije analita u uzorku izvodila se usporedbom površine (ili visine) kromatografskog pika analita prisutnog u uzorku i površine (ili visine pika) dobivenog iz standardne otopine analita u matrici. Ako je signal detektiranog analita (pik) padao u kalibrirano područje MS-a koncentracija analita prisutna u uzorku se očitala direktno s kalibracijskog pravca. Za koncentracije analita izvan kalibracijskog područja potrebno je bilo izvesti produljenje krivulje umjeravanja kako bi uvjeti lineariteta bili zadovoljeni, ili razrijediti uzorak u dano područje linearnosti. Proračun rezultata izvodio se pomoću softwaerskog programa instrumenta MassHunter Quantitative analysis for QQQ. Kalibracijska krivulja je grafički prikaz odnosa relativnog odgovora (Relative response) izmjerene površine analita i odgovarajućeg internog standarda te teoretske koncentracije kalibracijske točke. Otopine internih standarda i standarda za izradu kalibracijske krivulje dodavane su u slijepu matricu uzorka prije postupka ekstrakcije. Program preračunava koncentracije ispitnih uzoraka prema dobivenoj krivulji.

Nakon uključivanja instrumenta i stabilizacije sustava, injektiranje uzoraka tekao je prema sljedećem rasporedu:

- Slijepa kontrolna otopina - uzorak koji predstavlja slijepu probu reagensa pripremljen na isti način kao i uzorak izostavljajući samo uzorak kako bi se detektirala eventualna kontaminacija prilikom pripreme ili u instrumentu
- Kontrolni uzoraka stanja instrumenta - otopina standarda i internih standarda u ekstrakcijskom otapalu koji odgovara masenoj koncentraciji analita iz područja kalibracijske krivulje
- Slijepa kontrolna otopina
- Slijepa matrica - uzorak matrice kojem je prethodnim analizama utvrđena odsutnost bilo kojeg od analita. Uzorci su provedeni kroz cijelu analizu.

-
- Kontrolni uzorak matrice - u svakoj analizi potrebno je obogatiti slijepu matricu uzorka na barem jednoj razini
 - Slijepa kontrolna otopina
 - Uzorci
 - Kontrolni uzorak stanja instrumenta
 - Slijepa kontrolna otopina

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Optimiranje instrumentalnih uvjeta

Na razlučivanje, odnosno uspješno odjeljivanje uzastopnih kromatografskih pikova, utječu postupci pripreme uzorka, kromatografske tehnike (u ovom radu tekućinska kromatografija), te tehnike detekcije (u ovom radu spektrometrija masa). Praćenje analita u složenim matricama uzorka moguće je postići uporabom spektrometra masa kao detektora. Odabirom karakterističnih vrijednosti omjera mase i naboja iona (m/z) postiže se visoka selektivnost i osjetljivost detekcije. Najvažniji korak je podešavanje parametara izvora i kolizijske ćelije jer oni utječu na ionizaciju i desolvataciju te na fragmentaciju i masenu analizu, što će omogućiti postizanje najboljeg signala za odgovarajuće prekursor i produkt ione analita i optimalnih performansi metode. Postavke napona za najbolji prijenos iona između ionskog izvora i masenog analizatora namještaju se automatskim tuniranjem instrumenta. Na taj način optimira se intenzitet signala i rezolucija instrumenta.

U pretražnom načinu rada spektrometar masa detektira sve vrijednosti m/z , pa se često uz ione ciljnih analita detektiraju i ioni ostalih sastojaka prisutnih u matrici uzorka. Praćenjem ciljnih vrijednosti m/z karakterističnih za pojedini analit smanjuju se moguće interferencije ostalih sastojaka matrice detektiranih u pretražnom načinu rada. Uz navedeno, na isti se način mogu detektirati i odrediti i nepotpuno odijeljeni analiti. Selektivnost analize nepotpuno odijeljenih analita postiže se odabirom i praćenjem najintenzivnijih signala, tj. najzastupljenijih iona (vrijednosti m/z) u spektru masa pojedinog analita. Valja napomenuti da se praćene vrijednosti m/z nepotpuno odijeljenih analita ne smiju preklapati. Ciljni i potvrdni ioni odabrani su u pretražnom načinu rada analizom standardnih otopina analita pripremljenih u otapalu voda:acetonitril 9:1 (v/v), uz dodatak 1 % mravlje kiseline (v/v). Korištenjem restriksijske kapilare direktno u maseni sustav injektirano je po 5 μL individualne otopine svakog analita (5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) korištenjem pokretne faze smjese acetonitrila i voda (50:50, v/v) uz protok od 0,2 mL min^{-1} istovremenim snimanjem u pozitivnom i negativnom načinu snimanja. U prilogu su prikazani spektri masa u rasponu m/z od 50 do 250. Kao što je vidljivo, za glifosat u pozitivnom načinu snimanja najintenzivniji ion je m/z 170, a u negativnom m/z 168 što odgovara $[\text{M-H}]^+$, odnosno $[\text{M-H}]^-$ ionu glifosata (m/z 169). Nešto intenzivniji ion pokazao se onaj u pozitivnom načinu snimanja, te je on korišten u

daljnjem optimiranju. U slučaju analita AMPA najintezivniji ion je onaj u negativnom načinu snimanja m/z 110, dok kod N-acetil-AMPA m/z 152, a N-acetil-glifosat m/z 210 što odgovara deprotoniranoj molekuli $[M-H]^-$. Nakon odabira najzastupljenijeg iona, pristupilo se otpimizaciji kolizijske energije za dva najzastupljenija produkt iona. Fragmentacijom protoniranog molekularnog iona glifosata m/z 170 proizlazi produkt iona m/z 88 koji odgovara gubitku fosfonata i m/z 62 koji odgovara $[HNPO]$. Fragmentacija deprotoniranog molekularnog iona AMPA dala je dva produkta kod m/z 79 i m/z 63 što odgovara fosforatnom, odnosno fosfinatnom ionu.⁷² Fragmentacije analita AMPA usporedive su sa onima objavljenima u radu M. Chiarello i sur. (2003).⁵⁵ Prekursor ion N-acetil-glifosata fragmentira karakteristične produkte ione m/z 150 i m/z 124 što odgovara gubitku acetilne grupe i vode iz karboksilatne grupe odnosno i gubitku CO_2 . Analit N-acetil-AMPA fragmentira na m/z 134, m/z 110 i m/z 63 što odgovara gubitku vode, odnosno karboksilatne grupe, te $[COONHCH_2OH]$. Svi analiti imaju slične kemijske strukture, svi sadrže metil fosfonsko kiselinsku grupu i amino grupu. Budući da se analiti mogu pojaviti kao zwitter ioni u plinovitoj fazi, postoji mogućnost da se analiti podvrgnu unutarnjem prijenosu protona tijekom prijelaza iz vodene faze kako bi neutralizirali pozitivni naboj na amino grupi i negativni naboj na karboksilnoj ili metilfosfinatskoj grupi. Svi analiti pokazuju tendenciju fragmentacije tvoreći ione koji sadrže fosfor. Tipični fragment za sve analite u negativnom načinu snimanja je m/z 63, koji odgovara fosfinatnom ionu, PO_2^- . U tablici 7. navedeni su optimirani parametri. Parametri koji su optimirani zasebno su napon fragmentora kako bi se dobio maksimalan odgovor prekursor iona od interesa i kolizijska energija za optimalnu fragmentaciju prekursor iona radi postizanja najvećeg mogućeg odgovora produkt iona te su također navedeni u tablici. Spektri masa za sve analite i njihove interne standarde prikazani su u PRILOGU I i II.

Tablica 7. Optimirani MRM parametri za LC-MS analizu glifosata i njegovih metabolita

	Kvantifikacija	Napon fragmentora /V	Kolizijska energija /eV	Identifikacija	Napon fragmentora/V	Kolizijska energija /eV
AMPA	110 > 79	80	28	110 > 63	80	18
glifosat	170 > 88,2	50	2	170 > 60,2	50	12
N-acetil-AMPA	152 > 134	70	8	152 > 110	70	8
N-acetil-glifosat	210 > 124	170	12	210 > 150	70	6
glifosat- ¹³ C ₂ , ¹⁵ N	173 > 91	50	2	173 > 62,2	50	12
AMPA- ¹³ C ₂ , ¹⁵ N	112 > 79	80	30	112 > 63	80	16
N-acetil-glifosat-D3	213 > 153	70	6	213 > 126	70	12

4.2. Optimiranje kromatografskih uvjeta za odjeljivanje glifosata i njegovih metabolita

Kvantifikacija glifosata predstavlja velik izazov zbog velike polarnosti i amfoterne prirode molekule, male molekulske mase, velike topljivosti u vodi i nedostatku kromofora. Iz tih razloga, glifosat nije moguće obuhvatiti multimetodama koje se primjenjuju u analizama pesticida.

Kromatografsko razdvajanje uz MS/MS detekciju u ESI negativnom načinu snimanja moguće je postići bez korištenja derivatizacije. Tipične kolone sa silikatnim C18 obrnutim fazama predstavljaju problem sa zadržavanjem takvih polarnih spojeva što rezultira nerazdvojenim, koeluirajućim pikovima sa polarnim analitima koji eluiraju u mrtvom volumenu kolone. Najčešće korištene kolone kod LC-MS/MS analiza za određivanje nederivatiziranih polarnih spojeva su Hypercarb,^{47,55,56,73} kolone anionske izmjene, HILIC kolone, i kolone mješovitog djelovanja koje kombiniraju svojstva obrnute faze i slabe anionske i/ili kationske izmjene u jednome.^{62,74,75,76} Korištenje navedenih kolona često

ukazuje na problem nakon nekoliko injektiranja uzoraka, pikovi za glifosat postaju širi sa pretjeranim razvlačenjem što ukazuje na jače zadržavanje analita.

Hypercarb kolona je napravljena od 100 % poroznog grafitiziranog ugljika te se koristi kod analitike izrazito polarnih spojeva pri čemu izbor mobilne faze ima značajnu ulogu: udio od 1 % mravlje kiseline značajnije poboljšava izgled pika glifosata i osjetljivost u odnosu na udio od 0,1 % mravlje kiseline.⁷⁷ Glavni nedostatak Hypercarb kolone je nepredvidljivost gubitka vremena zadržavanja analita koja može biti povezana s kontaminacijom kolone.⁷⁸ Kako bi se osigurala reproducibilnost vremena zadržavanja potrebno je koristiti odgovarajuću pokretnu fazu koja će u gradijentnom ispiranju osigurati interakciju analita sa istom nepokretnom fazom sa svakim injektiranjem. Polarni analiti tvore nabijene interakcije sa površinom nepokretne faze, dok nepolarni analiti tvore disperzivne sile čija snaga može biti pod utjecajem indukcija naboja pokretne faze. Površina nepokretne faze može biti promjenjena zbog efekta pokretne faze na ionizacijske funkcionalne skupine. Osim toga, pokretna faza može biti uključena u interakciju formiranja elektronskih parova sa površinom nepokretne faze. Promjena sastava pokretnih faza može rezultirati u promjeni površine nepokretne faze kolone što rezultira promjenama u vremenima zadržavanja analita. Metanol i voda kao pokretne faze se ponašaju slično, tvoreći elektronske parove sa površinom kolone što omogućava vezanje svih analita na koloni i postizanje konzistentnih analitičkih vremena zadržavanja.

HILIC je varijanta tekućinske kromatografije normalnih faza, međutim mehanizmi djelovanja su znatno kompliciraniji.⁷⁹ Kao nepokretne faze koriste se polarne faze kao što su silika, amino i cijano skupine, međutim pokretne faze su sličnije onima koje se koriste u tekućinskoj kromatografiji obrnutih faza kao što su voda, methanol, acetonitril. Istovremeno, HILIC omogućava odjeljivanje nabijenih analita, slično kao i u ionskoj kromatografiji. Prikladan je za određivanje spojeva koji eluiraju blizu mrtvog volumena u kromatografiji obrnutih faza. Prikladna je za izokratno eluiranje sa visokim udjelom organskih otapala ili gradijentno eluiranje koje započinje visokim udjelom organskog otapala, a završava visokim udjelom vode. Ionski aditivi, kao što su amonijev acetat i amonijev format, koriste se za kontrolu pH i ionske jakosti, a osim toga mogu utjecati na polarnost analita, rezultirajući u razlikama u vremenima zadržavanja.

Postoje tri glavna puta separacijskih mehanizama kod HILIC kolona koja uključuju razdjeljivanje analita između pokretne i nepokretne faze, adsorpciju analita na površinu

adsorbensa ili povlaštenu adsorpciju organskog modifikatora pokretne faze na površinu adsorbensa, nakon čega slijedi razdjeljivanje analita u adsorbiranom sloju.

Zbog polarne prirode glifosata i njegovog metabolita AMPA kromatografsko razdvajanje je izazovni zadatak, a još je veći izazov razdvajanje jako polarnih analita sa manje polarnim analitima kao što su N-acetil-AMPA i N-acetil-glifosat. Mnogi autori ukazuju na probleme sa kolonama vezane uz slabu reproducibilnost i degradaciju kolone nakon samo nekoliko injektiranja uzoraka. Prema metodi objavljenoj od strane referentnog laboratorija, Hypercarb kolona zahtjeva dugotrajno predkondicioniranje koje zahtjeva minimalno 50 injektiranja ekstrakta špinata kako bi se aktivirala mjesta na nepokretnoj fazi i postigli zadovoljavajući kromatografski uvjeti. Pri tome su korištene pokretne faze metanol sa 1 % octenom kiselinom (v/v) kao pokretna faza A i smjesa voda: metanol: octena kiselina (94 : 5:1, v/v/v) kao pokretna faza B. Testirane su različite mobilne faze koje su sadržavale vodu, metanol i acetonitril sa ili bez dodatka octene ili mravlje kiseline. Mravlja kiselina se primjenjuje u svim koracima LC-MS analitičkih metoda - od obrade uzoraka, kromatografskog razdvajanja do MS analize, no najvažnija je primjena kao aditiva u pokretnoj fazi budući da već i mala količina može poboljšati kromatografsko razdvajanje i oblik pika.⁸⁰ Slično kao i kod Lee i sur. (2017)⁷⁷ dodatkom mravlje kiseline znatno je povećana osjetljivost i poboljšan izgled pika. Premda autori izbjegavaju dodatak acetonitrila zbog širenja i razvlačenja pikova, u ovom slučaju, dodatak acetonitrila u pokretnoj fazi do 2 % rezultirao je poboljšanjem izgleda pikova N-acetil-AMPA i N- acetil-glifosata (Slika 6). Dodatkom nije narušena stabilnost vremena zadržavanja analita niti dugotrajnost kolone budući da je jedna kolona izdržala i do 2000 injektiranja. Hypercarb kolone su poznate kao kolone koje ovise o komponentama matrice. Slično kao i kod Nørskov i sur. (2019)⁵⁶ primijećeno je da ovisno o matricama koje su se nanosile na kolonu dolazi do pomaka u vremenima zadržavanja analita, međutim, jednom kad se kolona zasitila pojedine matrice, vremena zadržavanja bila su stabilna i stoga reproducibilna. U tablici su prikazana vremena zadržavanja analita na koloni Hypercarb uz pokretne faze 1,2 % mravlje kiseline u vodi (v/v) i 0,5 % mravlje kiseline u acetonitrilu (v/v).

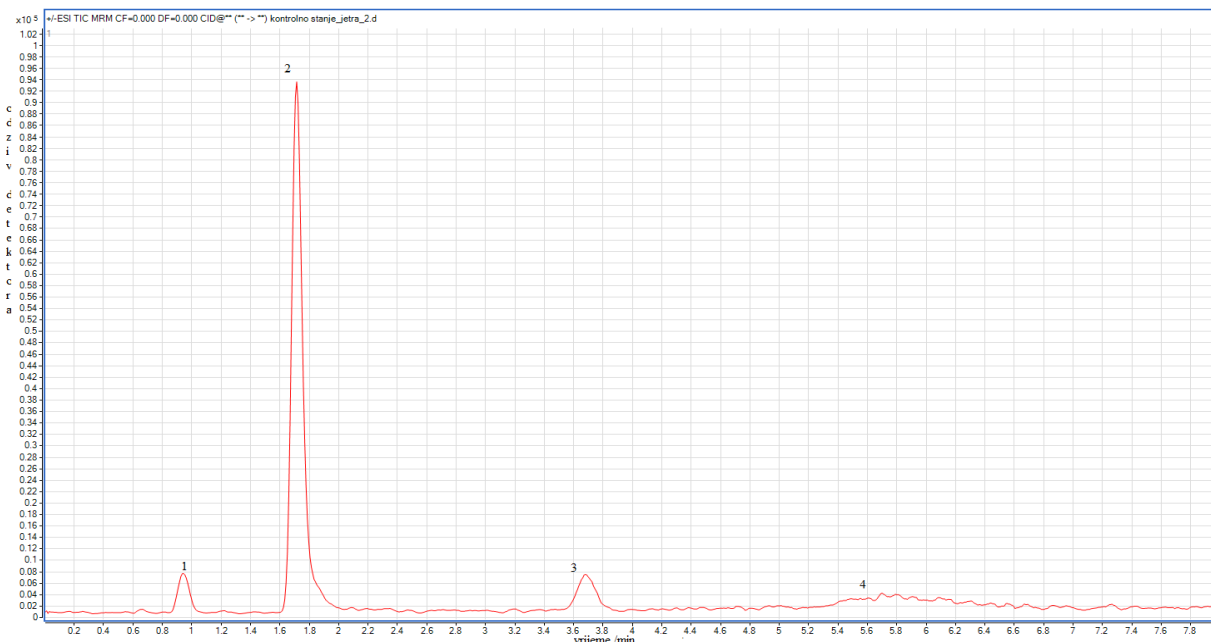
Tablica 8. Vremena zadržavanja analita na koloni Hypercarb uz pokretne faze 1,2 % mravlje kiseline u vodi i 0,5 % mravlje kiseline u acetonitrilu.

Analiti	Vrijeme zadržavanja /min
AMPA	0,95
glifosat	1,39
N-acetil-glifosat	4,93
N-acetil-AMPA	4,85
glifosat- ¹³ C ₂ , ¹⁵ N	1,39
AMPA- ¹³ C ₂ , ¹⁵ N	0,95
N-acetil-glifosat-D3	4,91

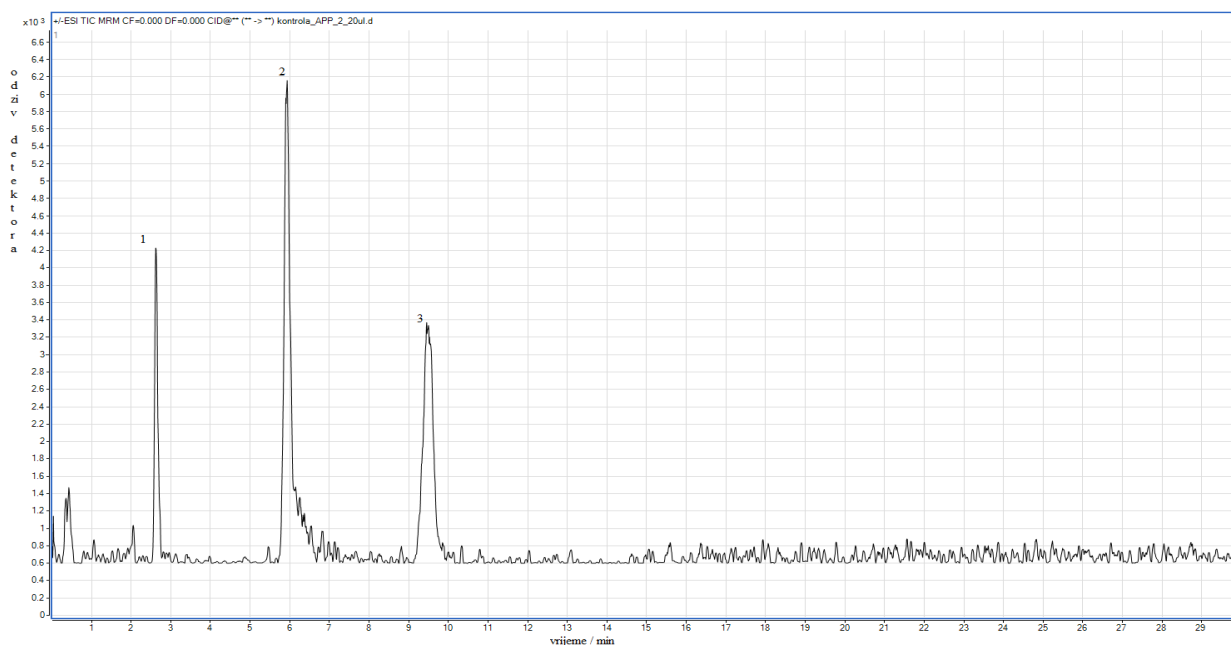
Tijekom razvoja metoda osim Hypercarb kolone testirane su još dvije kolone različitog načina djelovanja, tzv. HILIC izmjene - Torus Dea i APP (eng. *Anionic Polar Pesticide*) kolona. Kolone zahtjevaju također prekondicioniranje, korištenjem mobilnih faza, a u slučaju Torus Dea kolone i 5 mM Na₂EDTA otopine u smjesi voda:acetonitril 80:20 (v/v) kako bi se ujedno provela inaktivacija cijelog sustava budući da su analiti poznati po vezivanju sa metalima. Postupak kondicioniranja pokazao se nešto bržim u odnosu na onaj opisan sa Hypercarb kolonom koristeći ekstrakt špinata. Najbolji kromatografski uvjeti postignuti su uz korištenje 1,2 % mravlje kiseline u vodi (v/v) i 0,5 % mravlje kiseline u acetonitrilu (v/v), što je i predloženo od strane proizvođača kolone, no problem se javljao kod kromatografskog razdvajanja N-acetil-glifosata koji unatoč različitim kromatografskim promjenama ili nije izlazio sa kolone ili je njegov kromatografski pik bio vrlo položen i razvučen preko 5, a u nekim slučajevima i do 8 minuta (Slika 7). Zbog nemogućnosti postizanja kromatografski zadovoljavajućih uvjeta za sve tražene analite, kolone HILIC načina djelovanja su odbačene, te se daljnjem razvoju metode pristupilo korištenjem Hypercarb kolone.

Budući da je riječ o analitima koji imaju sklonost vezanju na metale, primijećen je blagi prijenos mase analita, posebice glifosata pri analizi otapala provedene neposredno poslije analize standarda u otapalu što može rezultirati u lažno pozitivnom tumačenju rezultata. Budući da su svi metalni putevi zamijenjeni plastičnim kapilarama, jedini mogući izvor vezanja nalazi se u injektorskoj jedinici. Mikotoksin fumonizin pokazuje također svojstvo vezanja na metalne površine kao i glifosat, a kao rješenje za smanjenje prijenosa

mase nudi se ispiranje igle u otopini voda:metanol:acetonitril:izopropanol 1: 1: 1: 1 (v/v), uz dodatak 1% mravlje kiseline i 10 mmol L⁻¹ trinatrij citrata (v/v).⁸¹



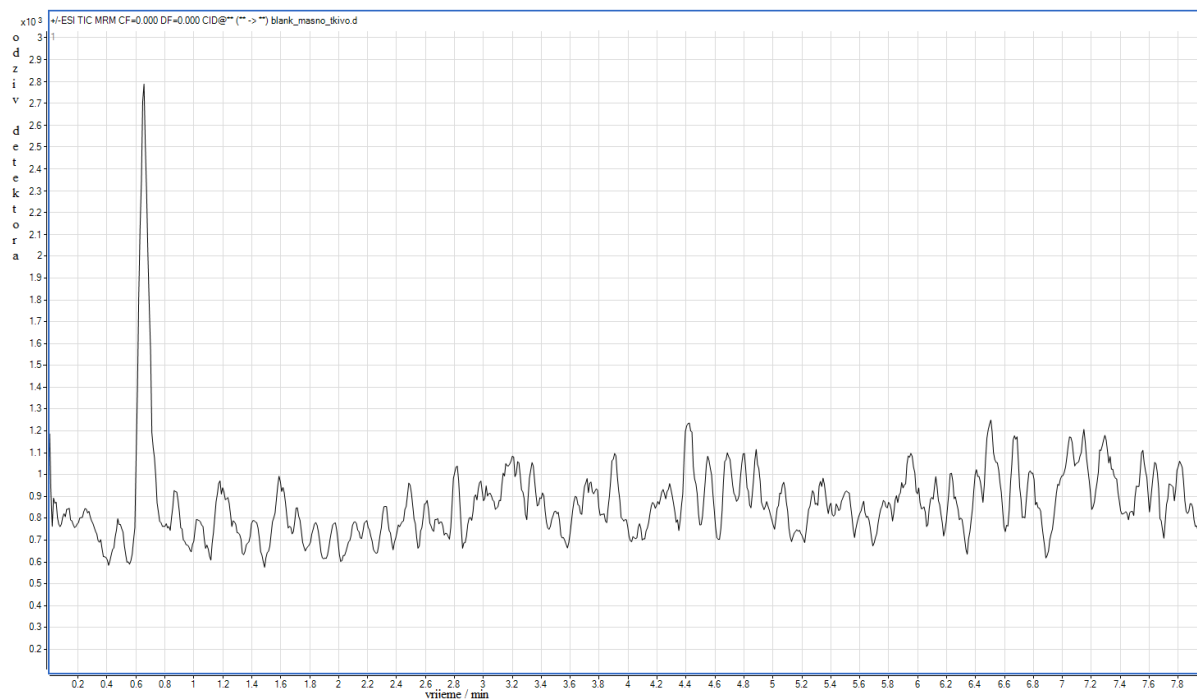
Slika 6. Kromatogram standardne otopine smjese analita u 1 % mravljoj kiseline u vodi (v/v), $\gamma = 10 \mu\text{g mL}^{-1}$ na koloni Hypercarb (1- AMPA, 2-Glifosat, 3-N-acetil-AMPA, 4- N-acetil-glifosat)



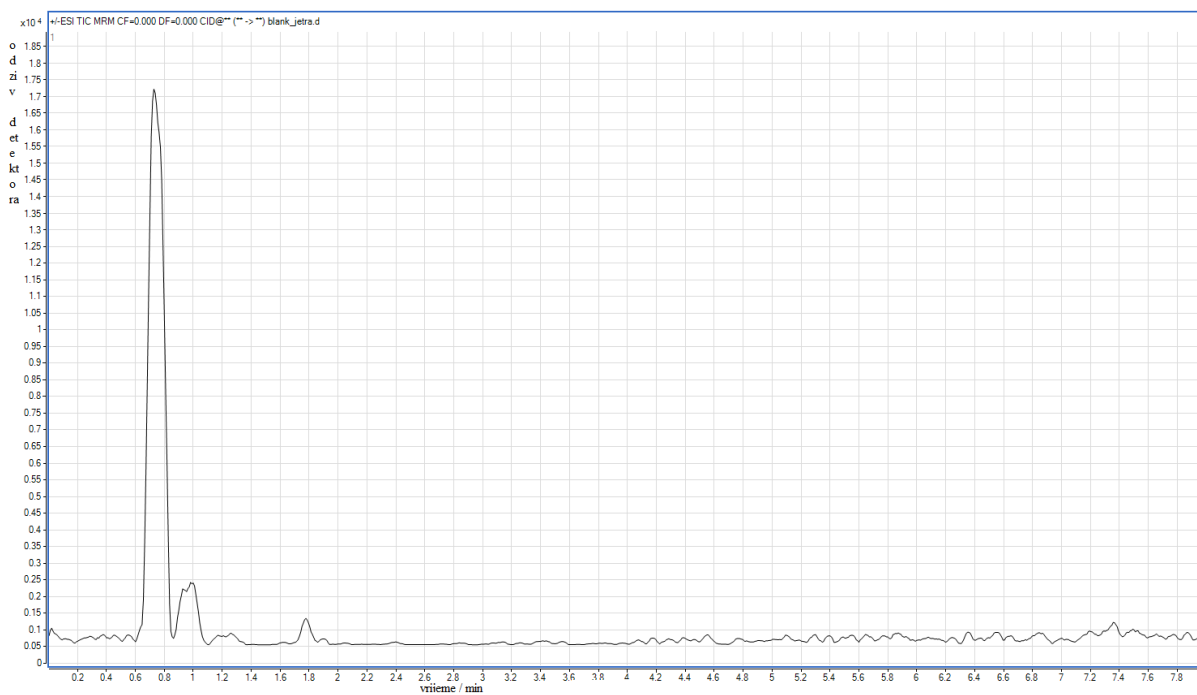
Slika 7. Kromatogram standardne otopine smjese analita u u otapalu voda:acetonitril 9:1 (v/v), uz dodatak 1 % mravlje kiseline (v/v), $\gamma = 10 \mu\text{g mL}^{-1}$ na koloni APP (1- AMPA, 2- Glifosat, 3-N-acetil-AMPA)

Određivanje glifosata u okolišnim uzorcima, uključujući vodu, je dobro istraženo.^{45,68} Objavljeni su i radovi koji uključuju glifosat i eventualno njegov metabolit AMPA u soji i kukuruzu i grejpu.^{48,76} Herrera Lopez i sur. (2019) obuhvatili su glifosat i sve navedene njegove metabolite u hrani koja uključuje grejp, naranče i zobi.⁵⁸ Međutim, informacije o njegovom određivanju u kompleksnim uzorcima, kao što je hrana životinjskog podrijetla, su limitirane te je objavljeno svega nekoliko radova koje ne uključuju sve navedene metabolite glifosata.^{41,43,47,51,62,63,65,82,83}

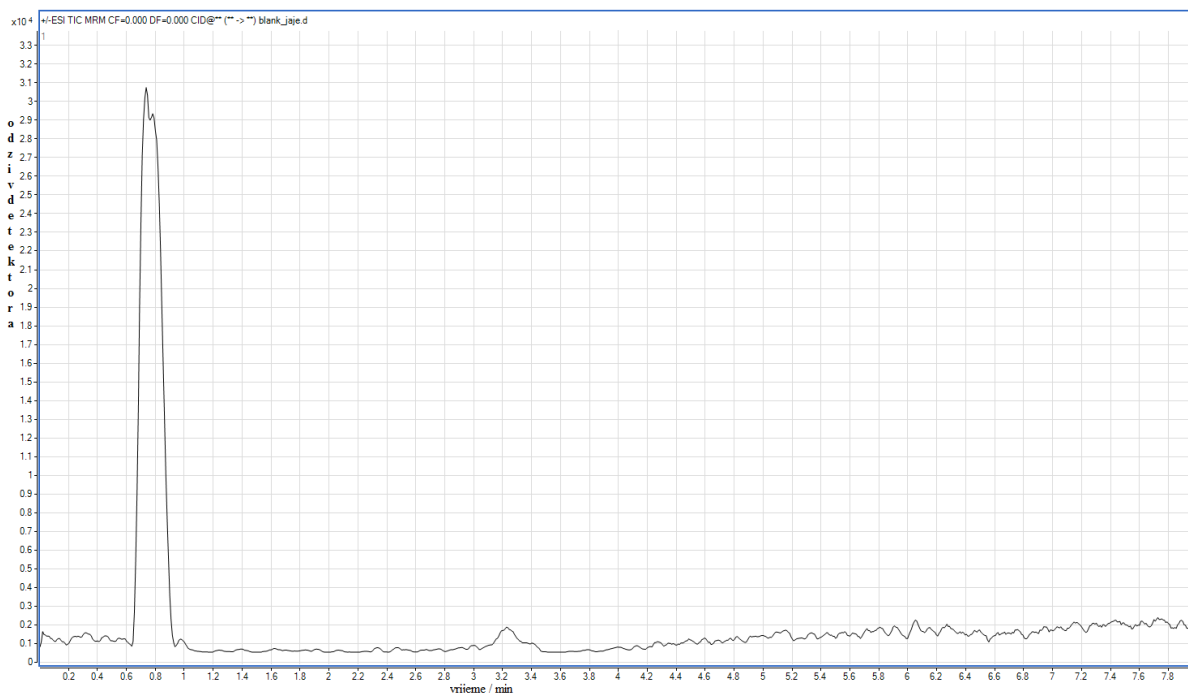
Radi utvrđivanja i uklanjanja mogućih interferencija sastojaka matrice uzorka, nakon odabira iona karakterističnih za pojedine analite analizirane su i slijepa matrice uzoraka hrane životinjskog podrijetla (Slike 8.-12.). Identitet svakog analita utvrđen je na temelju ciljnog iona te dvaju potvrđnih iona pri čemu je vrlo važno slaganje omjera površine pikova ciljnog iona i potvrđnih iona u kromatogramima uzorka i kromatogramu standardne otopine smjese analita. Osim navedenog, za potvrdu identiteta analiziranih spojeva neophodno je i podudaranje vremena zadržavanja analita zabilježenih u kromatogramu uzorka s vremenima zadržavanja istih analita u kromatogramu standardne otopine smjese analita u otapalu (Slike 13.-17.) s maksimalno dopuštenim odstupanjem od $\pm 0,2$ min. Primijećen je blagi pomak vremena zadržavanja N-acetil-AMPA u medu i N-acetil-glifosata u mlijeku u odnosu na vremena zadržavanja standardne otopine smjese analita u otapalu, a kao uzrok tome moguće je nedovoljno zasićenje kolone matricama budući su Hypercarb kolone poznate kao kolone ovisne o matricama. U kromatogramima slijepih matrica, posebice jaja i jetra, uočeni su interferirajući pikovi sa analitom AMPA (Slike 14. i 16.). Koeluirajući spojevi su vrlo polarni spojevi koji izlaze na samom početku, no u njihovim spektrima ne pojavljuju se signali pri istim vrijednostima m/z kao što su vrijednosti m/z ciljnih i potvrđnih iona analita AMPA koji s kolone eluira u sličnom vremenu.



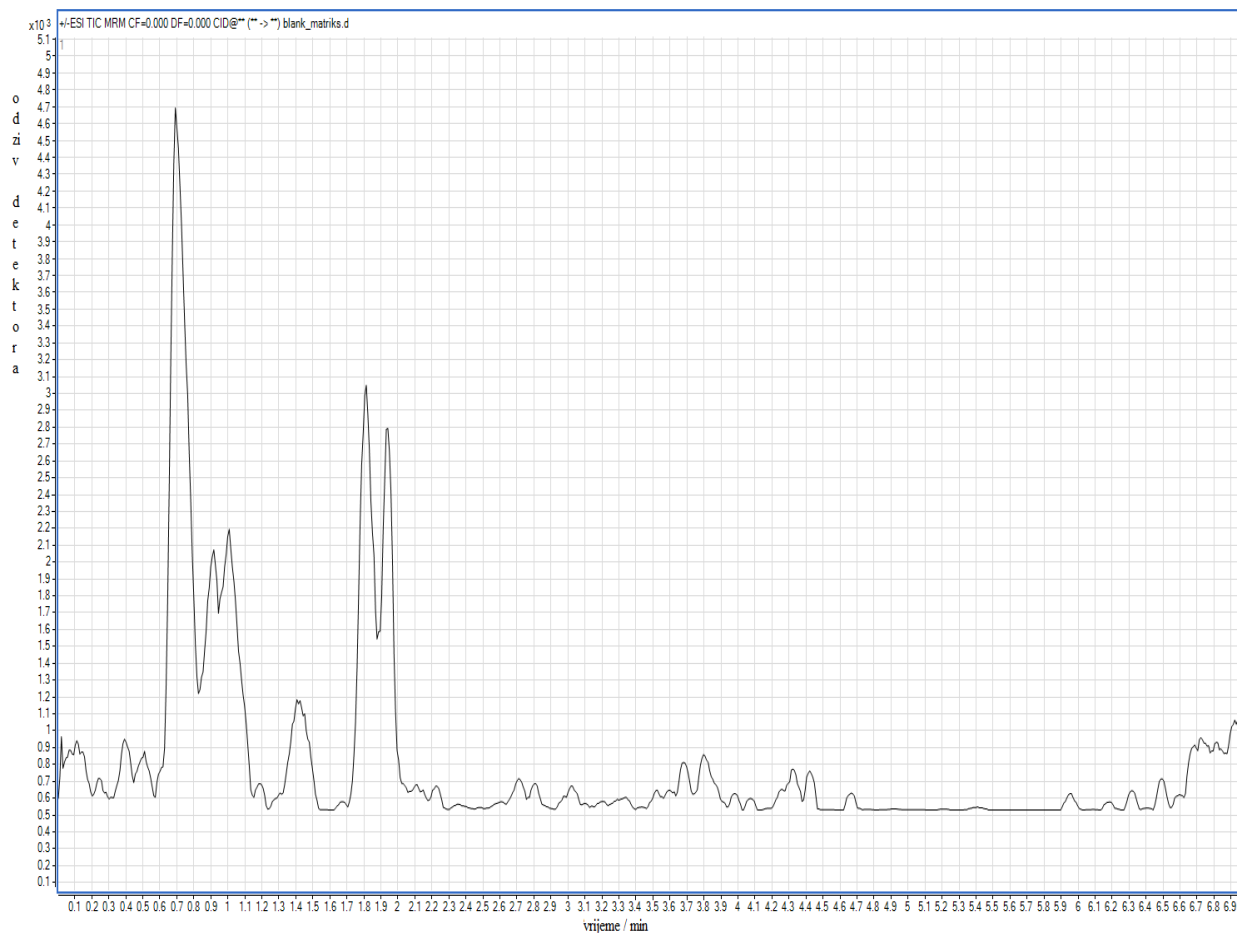
Slika 8. Kromatogram ekstrakata slijepe matrice masnog tkiva



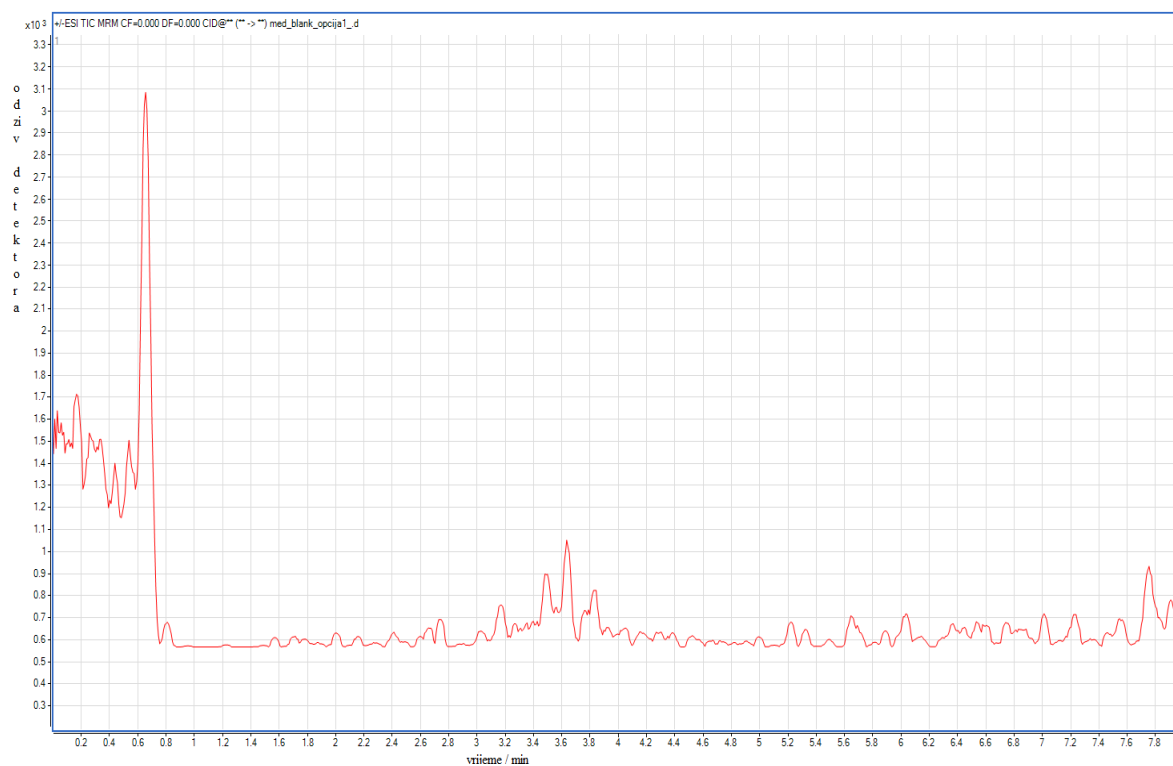
Slika 9. Kromatogram ekstrakata slijepe matrice jetre



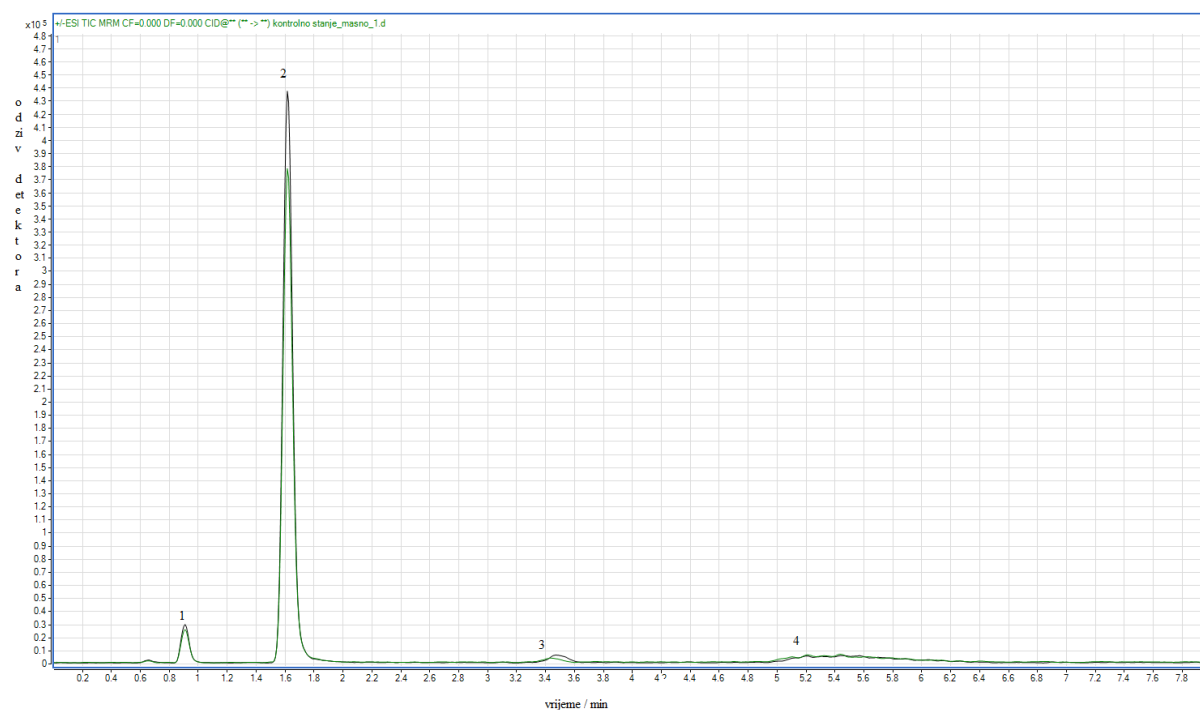
Slika 10. Kromatogram ekstrakata slijepe matrice jaja



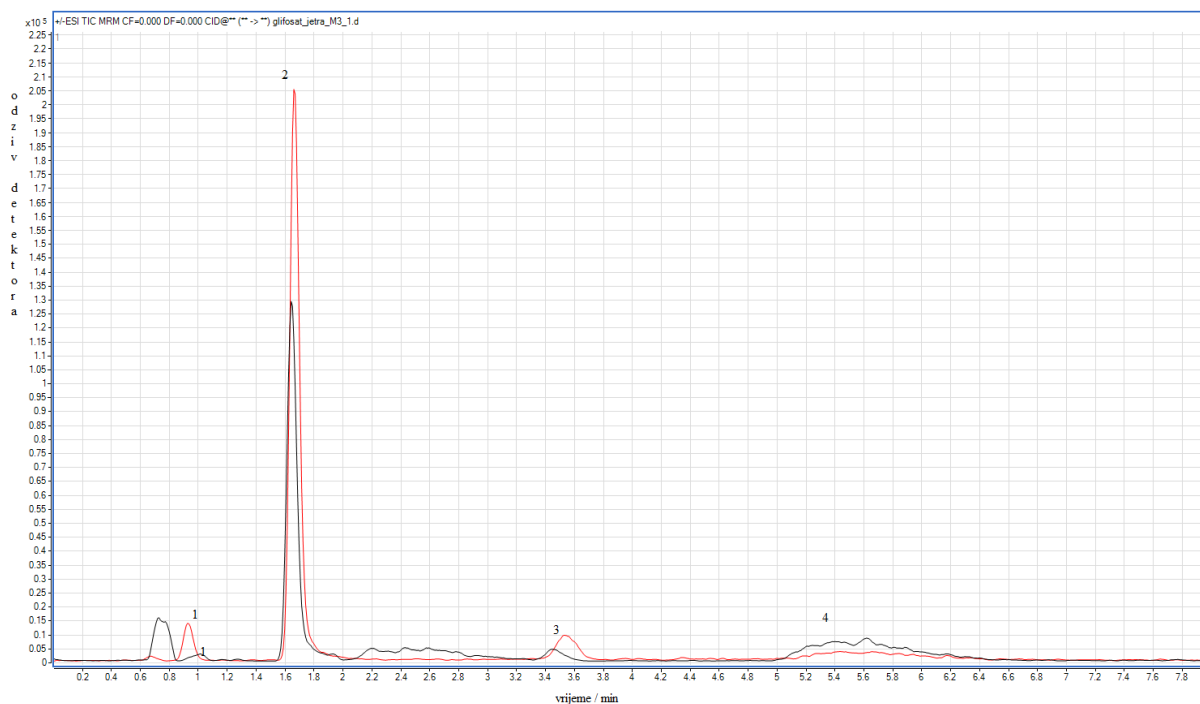
Slika 11. Kromatogram ekstrakata slijepe matrice mlijeka



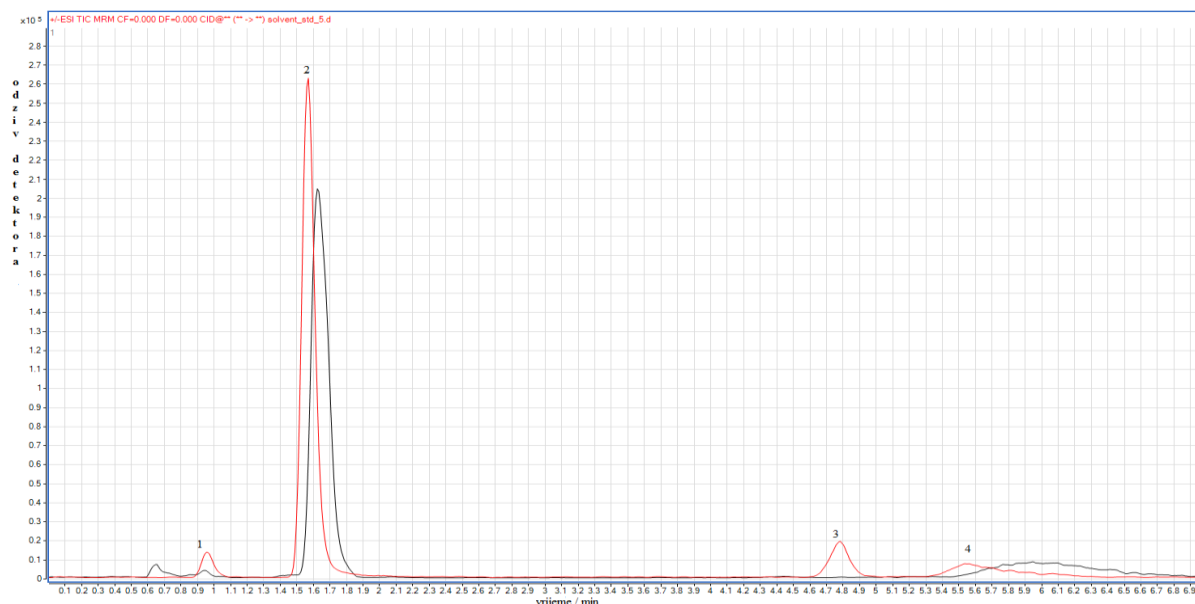
Slika 12. Kromatogram ekstrakata slijepe matrice meda



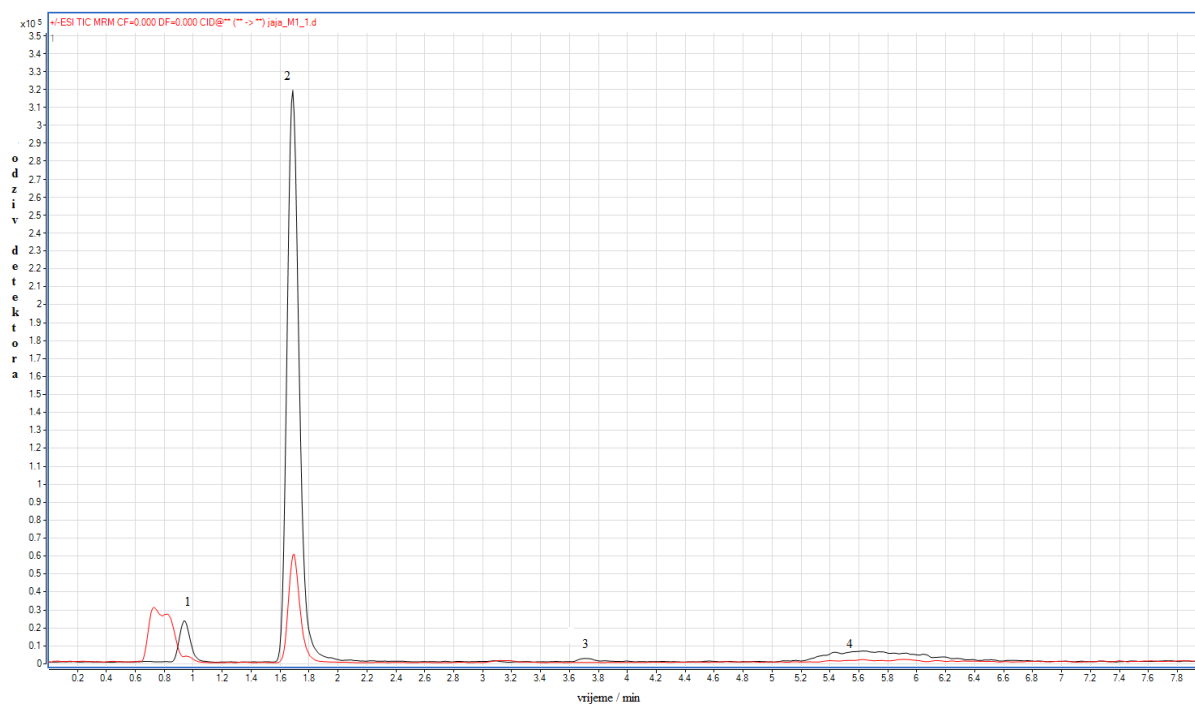
Slika 13. Kromatogrami standardne otopine smjese analita u 1 % mravljoj kiselinu u vodi (v/v), $\gamma = 12,5 \text{ ng mL}^{-1}$ (zelena boja) i ekstrakta slijepe matrice masnog tkiva obogaćene analitima (crna boja) (1- AMPA, 2-Glifosat, 3-N-acetil-AMPA, 4-N-acetil-glifosat)



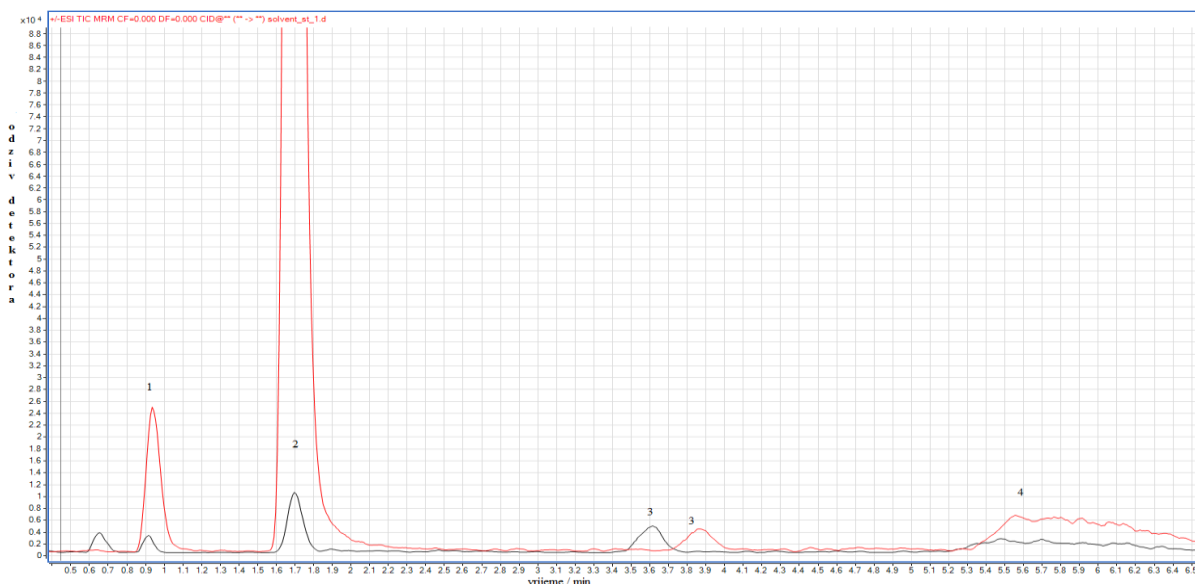
Slika 14. Kromatogrami standardne otopine smjese analita u 1 % mravljoj kiselinu u vodi (v/v), $\gamma = 20 \text{ ng mL}^{-1}$ (crvena boja) i ekstrakta slijepe matrice jetre obogaćene analitima (crna boja) (1- AMPA, 2-Glifosat, 3-N-acetil-AMPA, 4-N-acetil-glifosat)



Slika 15. Kromatogrami standardne otopine smjese analita u 1 % mravljoj kiselinu u vodi (v/v), $\gamma = 40 \text{ ng mL}^{-1}$ (crvena boja) i ekstrakta slijepe matrice mlijeka obogaćene analitima (crna boja) (1- AMPA, 2-Glifosat, 3-N-acetil-AMPA, 4-N-acetil-glifosat)



Slika 16. Kromatogrami standardne otopine smjese analita u 1 % mravljoj kiselinu u vodi (v/v), $\gamma = 10 \text{ ng mL}^{-1}$ (crna boja) i ekstrakta slijepe matrice jaja obogaćene analitima (crvena boja) (1- AMPA, 2-Glifosat, 3-N-acetil-AMPA, 4-N-acetil-glifosat)



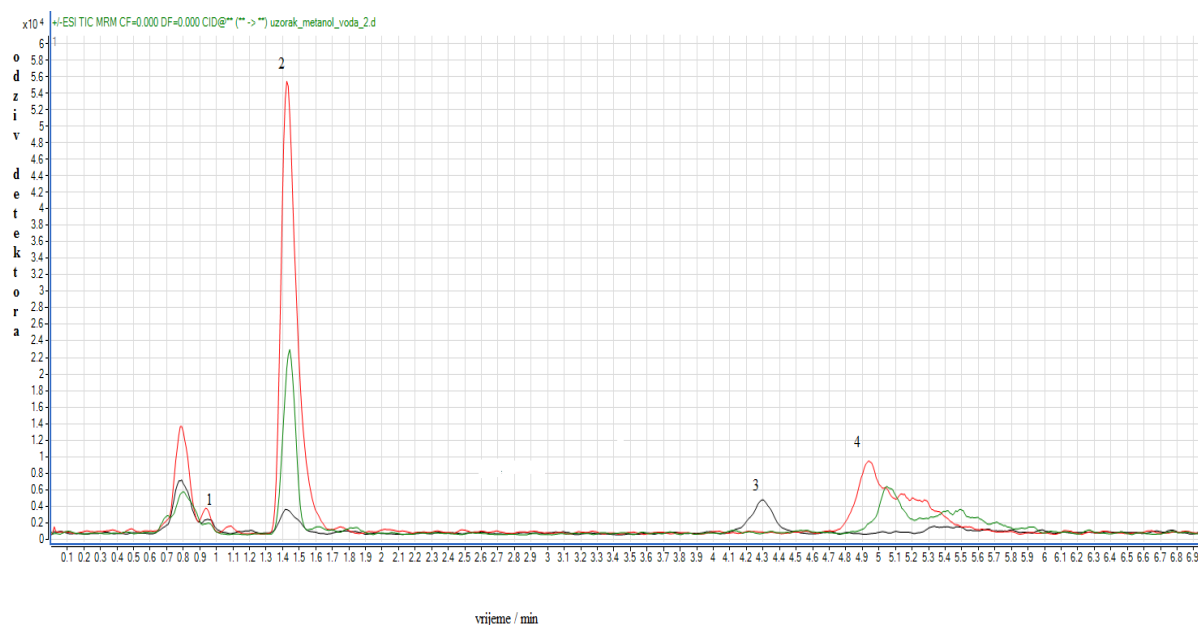
Slika 17. Kromatogrami standardne otopine smjese analita u 1 % mravljoj kiselinu u vodi (v/v), $\gamma = 10 \text{ ng mL}^{-1}$ (Crvena boja) i ekstrakta slijepe matrice meda obogaćene analitima (1- AMPA, 2-Glifosat, 3-N-acetil-AMPA, 4-N-acetil-glifosat)

4.3. Postupci ekstrakcije glifosata i njegovih metabolita u različitim vrstama hrane životinjskog podrijetla

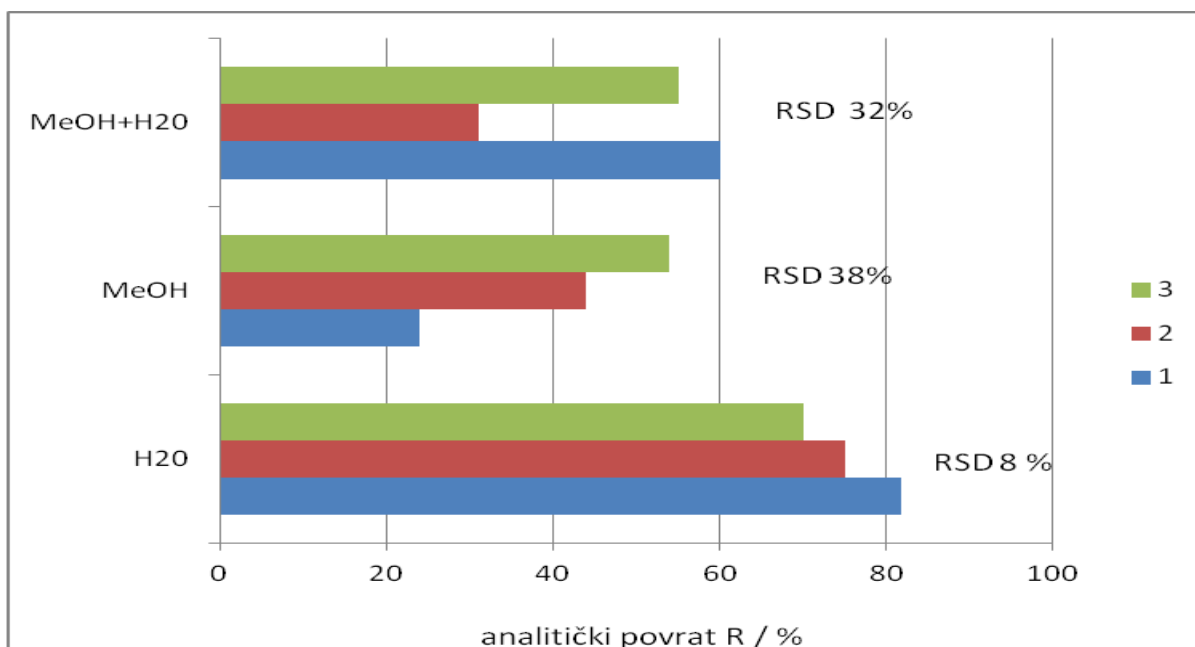
Hrana životinjskog podrijetla predstavlja veliki izazov prilikom analize budući se radi o kompleksnoj prirodi uzoraka. Premda je metoda objavljena od strane referentnog laboratorija podobna za širi raspon polarnih analita, ekstrakti mogu sadržavati visoke koncentracije koekstraktiva matrice koji mogu kontaminirati instrument stoga je potrebno razviti efikasne postupke ekstrakcije kako bi se utjecaj matrice sveo na minimum.

4.3.1. *Masno tkivo*

Masno tkivo je sastavljeno od krupnih okruglastih ćelijica koje su obavijene vezivnim tkivom kroz koje prolaze krvne žile, te kod zaklanih životinja sadrži od 50 do 90 % masti koje najvećim dijelom čine trigliceridi. Za ekstrakciju željenih analita iz uzoraka masnog tkiva istražena su tri različita ekstrakcijska otapala: voda, metanol i smjesa metanol:voda 1:1 (v/v), svi uz dodatak 1 % mravlje kiseline (v/v). Svaki postupak pripreme uzoraka razvijen je i optimiran uz iste uvjete LC-MS analize koji su opisani u poglavlju 3.2.1. Slika 18. prikazuje kromatograme ekstrakata obogaćenih slijepih uzoraka matrice masnog tkiva. Budući da je riječ o vrlo polarnim analitima, vrlo polarna otapala su i korištena za njihovu ekstrakciju, no voda uz dodatak 1% mravlje kiseline (v/v) se pokazala najprikladnijim ekstrakcijskim otapalom uz najviše odzive detektora i zadovoljavajuće analitičke povrate (> 80 %). Ekstrakcijom vodom dobiven je bistri vodeni sloj, dok je ekstrakcijom metanolom dobiven obojeni, a smjesom vode i metanola bijeli zamućeni vodeni sloj. Također, analitički povrati iznosili su manje od 60 %, najniži prilikom ekstrakcije metanolom, s relativnom standardnom devijacijom (RSD) većom od 30 % (Slika 19.). Slične rezultate objavili su u svom radu Chiarello i sur. (2019)⁵⁵ kod kojih se zakiseljena voda pokazala kao najbolji izbor ekstrakcijskog otapala prilikom analize maslinovog ulja.



Slika 18. Kromatogrami ekstrakata slijepe matrice masnog tkiva obogaćene analitima dobivenih triju različitim ekstrakcijskim otapalima: crvena linija - voda, zelena – smjesa metanol:voda 1:1 (v/v) i crna-metanol, svi uz dodatak 1 % mravlje kiseline (v/v) (1- AMPA, 2-Glifosat, 3-N-acetil-AMPA, 4-N-acetil-glifosat)



Slika 19. Ovisnost analitičkog povrata (R) analita iz masnog tkiva o korištenom ekstrakcijskom otapalu sa pripadajućim relativnim standardnim devijacijama (RSD %) računatima iz tri mjerenja

Budući da je masni sloj plivao na površini, što je otežavalo uzimanje vodenog sloja, dodan je diklormetan kako bi istaložio taj masni sloj. U svrhu istraživanja otpimalnog volumena dodatka diklormetana isproban je dodatak od 1, 2, 3 i 5 mL. Manji volumeni nisu bili dovoljni za taloženje masnoća, ostavljajući i dalje gornji masni ili zamućeni sloj. Najučinkovitijim se pokazao dodatak volumena od 5 mL pri čemu su slojevi bili lijepo odvojeni, a vodeni sloj gornji i bistri. Različiti volumeni nisu utjecali na analitičke povrate analita budući da masno tkivo ne sadrži proteine koji bi dodatkom diklormetana precipitali i za sobom povukli analite kao što je primijećeno u studiji Nørskov i sur. (2019).⁵⁶ Istraženi su dodatni koraci pročišćavanja filtrata korištenjem ekstrakcije raspršenjem čvrste faze i ekstrakcije na čvrstoj fazi u svrhu uklanjanja utjecaja matrice i postizanja što nižih granica kvantifikacija. Kod ekstrakcije raspršenjem kao čvrste faze korišteni su sorbensi C18 i PSA (50 mg) sa 1 mL filtrata. U ekstrakciji na čvrstoj fazi korišten je polimerni sorbens ionske izmjene (PCX) koji je prethodno kondicioniran sa 1 mL metanola i 1 mL zakiseljene vode (1 % mravlje kiseline u vodi, v/v). Prije nanošenja 1 mL filtrata uzorka, kolonice su spojene na vakuum kako bi se uklonile sve kapljice vode. Pročišćeni filtrati podvrgnuti su LC-MS analizi. Kako bi se istražila prikladnost različitih postupaka ekstrakcije analita iz masnog tkiva, pripravljena je modelna otopina standardne smjese analita u slijepoj matrici uzoraka. Učinkovitost ekstrakcije praćena je određivanjem analitičkog povrata, odnosno usporedbom masene koncentracije svakog pojedinog spoja u pojedinim frakcijama eluata s njegovom masenom koncentracijom u modelnoj otopini. Direktnim postupkom, tj. ekstrakcijom vodom uz dodatak 1 % mravlje kiseline (v/v) te dodatkom diklormetana kako bi se istaložio gornji masni sloj, dobiveni su najbolji analitički povrati (> 80%). Kod ekstrakcije na čvrstoj fazi kao sorbens odabran je PCX za uklanjanje iona u matrici koji bi mogli interferirati ionima ciljnih analita, dok su C18 i PSA sorbensi korišteni za uklanjanje nepolarnih interferencija. Također je testirano zagrijavanje uzorka masnog tkiva u vodenoj kupelji s ciljem dobivanja homogenijeg uzorka, no sam korak nije utjecao na poboljšanje analitičkih povrata. Budući da primjena ekstrakcijskih postupaka nije utjecala na poboljšanje analitičkih povrata, daljnji ekstrakcijski koraci nisu korišteni. Ekstrakcijom vodom izbjegava se koekstrakcija nepolarnih spojeva čime se dobivaju „čišći“ ekstrakti te dodatni koraci pročišćavanja nisu korišteni slično kao i kod Chiarello i sur. (2019).⁵⁵

4.3.2. *Jetra*

Jetra predstavlja matricu bogatu proteinima i fosfolipidima koji mogu uzrokovati ionsku supresiju u MS instrumentu te je nužan korak uklanjanja proteina prilikom pripreme uzorka. Postoji nekoliko procedura za uklanjanje proteina: korištenjem acetonitrila i diklormetana, te korištenjem ultrafiltracije uz cut-off filtere od 10 kDa.^{47,56} Za ekstrakciju željenih analita iz uzoraka jetre istražena su tri različita ekstrakcijska otapala: voda, metanol i smjesa metanol:voda 1:1 (v/v), svi uz dodatak 1 % mravlje kiseline (v/v). Samom primjenom ekstrakcijskih otapala dobiveni su obojeni i zamućeni, nejasno odijeljeni vodeni slojevi koji nisu primjenjeni u direktnoj LC-MS analizi zbog moguće kontaminacije instrumenta te su istraženi dodatni koraci pročišćavanja. Testirano je nekoliko različitih metoda pročišćavanja: ekstrakcija na čvrstoj fazi kod koje je korišten polimerni sorbens ionske izmjene (PCX), ultrafiltracija i zamrzavanje na - 20 °C. Nakon ekstrakcije sa zakiseljenom smjesom metanol:voda 1:1 (v/v), uzorci obogaćene slijepo matrice jetre stavljeni su na zamrzavanje na - 20 °C na 90 minuta. Nakon toga uzorci su centrifugirani na 4000 rpm 15 minuta na temperaturi 10 °C. Centrifugiranjem je dobiven lagano obojeni vodeni sloj koji je podvrgnut daljnjem pročišćavanju korištenjem PCX kolonice prethodno kondicioniranih sa metanolom, a zatim LC-MS analizi. Snimanjem uzoraka obogaćenih na dvije razine 0,2 mg kg⁻¹ i 0,5 mg kg⁻¹, zbog jakog utjecaja matrice, analit AMPA nije detektiran. Razrjeđivanjem finalnog ekstrakta sa 1 % mravlje kiseline u vodi (v/v) kako bi se smanjio utjecaj matrice, AMPA je detektirana samo u slučaju više koncentracije. Slično je primijećeno prilikom ekstrakcije zakiseljenim metanolom, prema metodi objavljenoj od strane EURL koja uključuje primjenu acetonitrila i C18 sorbensa kod ekstrakcije raspršenjem. Primjenom dodatnih koraka pročišćavanja dobiveni su bistriji ekstrakti prikladniji za LC-MS analizu. Kod ekstrakcije zakiseljenim metanolom zabilježen je najniži odziv detektora, što upućuje na najnižu osjetljivost metode.

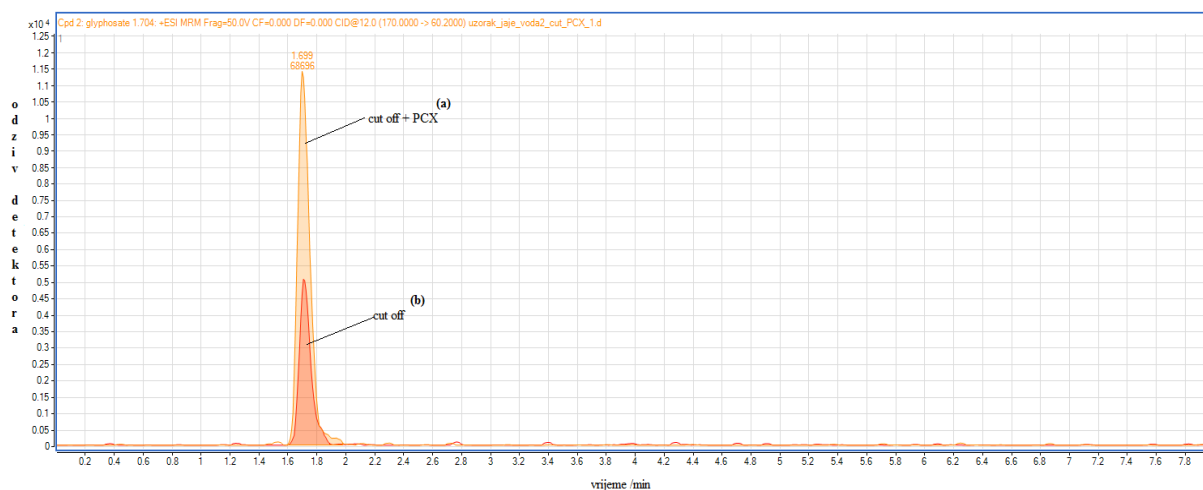
Kao i kod masnog tkiva, pripremljene su modelne otopine standardne smjese analita u slijepoj matrici uzoraka. Učinkovitost ekstrakcije praćena je određivanjem analitičkog povrata, odnosno usporedbom masene koncentracije svakog pojedinog spoja u pojedinim frakcijama eluata s njegovom masenom koncentracijom u modelnoj otopini, te su kao i kod masnog tkiva, najbolje vrijednosti analitičkih povrata dobivene prilikom ekstrakcije zakiseljenom vodom. Korištenje ultrafiltracije kao zamjenskog koraka taloženja proteina organskim otapalima se pokazala dobrom alternativom, no sama ultrafiltracija nije dovoljna

za efikasno uklanjanje interferencija te je primjenjen i SPE sa PCX sorbensom kako bi se poboljšao odziv. Sorbens PCX je polimerni sorbens miješanog djelovanja koji se koristi za veću selektivnost i osjetljivost kod ekstrakcije bazičnih spojeva sa kationsko-izmjenjivačkom skupinom. Nakon kondicioniranja metanolom i zakiseljenom vodom, polarni analiti će samo proći kroz njega, dok će neke hidrofobne i pozitivno nabijene komponente matrice reagirati i ostati zadržane na sorbensu.

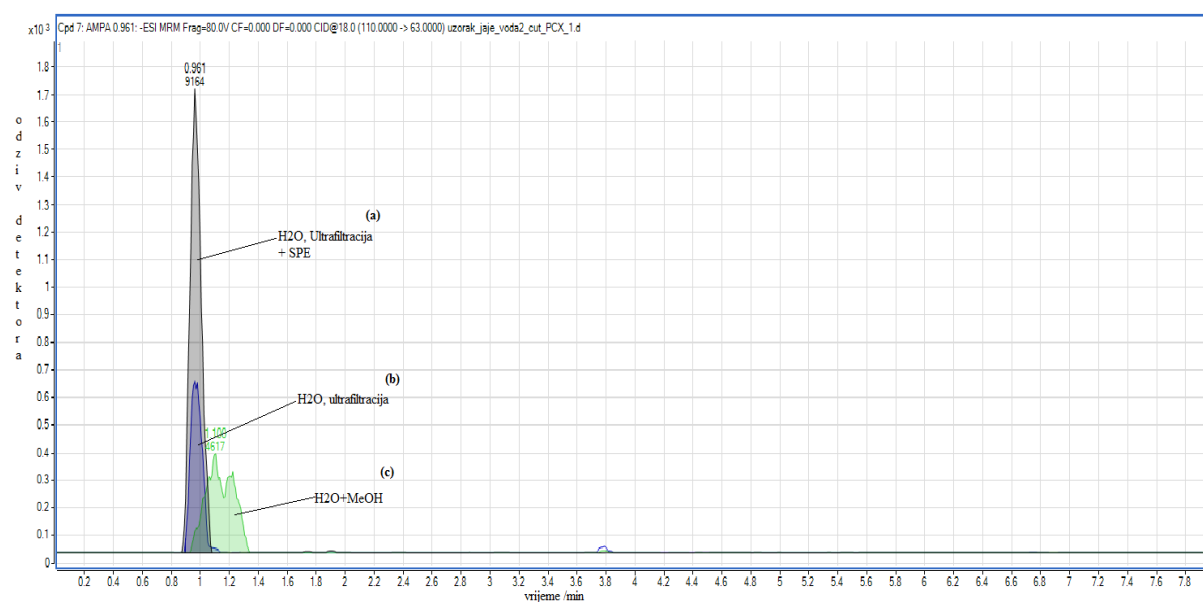
4.3.3. Jaja

Jaja sadrže približno 75 % vode koja može imati utjecaj na ukupni ekstrakcijski volumen, a ostatak najvećim dijelom čine proteini i lipidi. Jaja su posebno problematična matrica budući da sadrže lecitin, emulzifier koji može povezati lipide u jajima sa ekstrakcijskim otapalom i na taj način formirati zamućenje otopine. Za ekstrakciju željenih analita iz uzoraka jaja istražena su dva različita ekstrakcijska otapala: voda i metanol uz dodatak 1 % mravlje kiseline (v/v.). Metoda sa zakiseljenim metanolom opisana je u radu Herrea López i sur. (2020)⁶³ a uključuje ekstrakciju zakiseljenim metanolom uz dodatak vode, zamrzavanje na - 20 °C na 90 minuta, centrifugiranje te pročišćavanje korištenjem ekstrakcije na čvrstoj fazi prilikom čega je korišten PCX sorbens. U prvim analizama, nakon zamrzavanja dobiven je bistri gornji sloj, no ponavljanjem analiza, dolazilo je do stvaranja mutnog sloja, koji je vrlo teško ili nikako prolazio kroz PCX sloj sorbensa i dalje mutan te kao takav nije korišten za daljnu analizu. Prve analize ukazivale su na rašireni pik za analit AMPA, znatno manjeg inteziteta nego kod ekstrakcije zakiseljenom vodom (Slika 20).

Ekstrakti dobiveni ekstrakcijom zakiseljenom vodom, dodatno su pročišćavani na nekoliko načina. Jedan je uključivao dodatak diklormetana kako bi se efikasno uklonila mast iz uzoraka jaja. Zbog velike gustoće, mast sa diklormetanom staložila se na dno kivete, međutim gornji vodeni sloj ostao je vrlo zamućen te podvrgnut dodatnom koraku pročišćavanja ekstrakcijom na čvrstoj fazi s HLB sorbensom koji se koristi kao univerzalni polimerni sorbens obrnutih faza za ekstrakciju širokog raspona kiselih, bazičnih i neutralnih spojeva, uklanjanje soli, proteina i fosfolipida. Nakon primjene HLB sorbensa, ekstrakt je i dalje bio premutan i kao takav neprikladan za LC-MS analizu te se pristupilo ultrafiltraciji kao koraku pročišćavanja vodenog ekstrakta. Ultrafiltracijom dobiveni su bistri filtrati koji su podvrgnuti LC-MS analizi. Kao i kod jetre, kombinacijom ultrafiltracije i PCX znatno je poboljšao odziv budući da su smanjene interferencije matrice (Slika 21).



Slika 20. Usporedba kromatograma ekstrakta glifosata iz jaja dobivenih a) ultrafiltracijom i ekstrakcijom na čvrstoj fazi i b) samo ultrafiltracijom. Koncentracija glifosata u oba slučaja je ista.



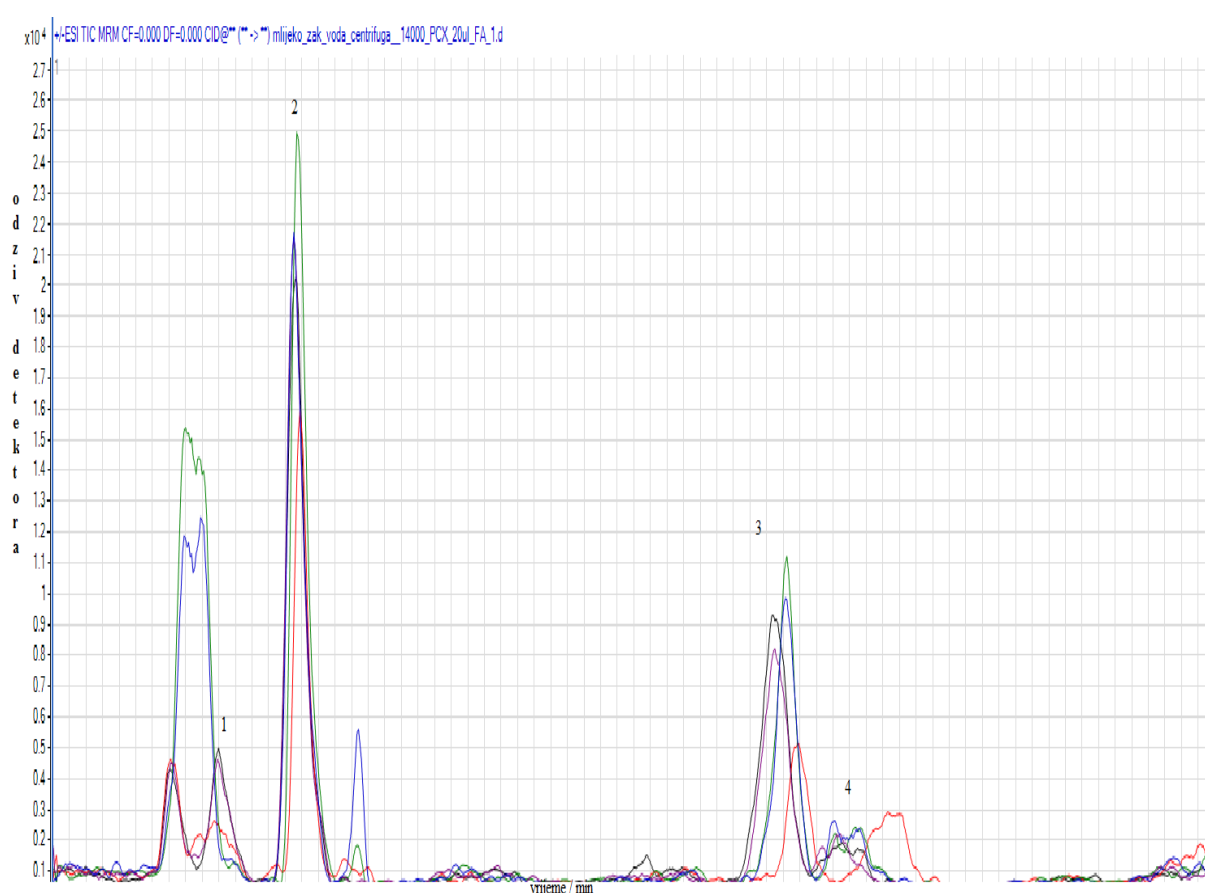
Slika 21. Usporedba kromatograma ekstrakta glifosata iz jaja dobivenih a) ultrafiltracijom i ekstrakcijom na čvrstoj fazi b) samo ultrafiltracijom kod ekstrakcije zakiseljenom vodom c) ekstrakcijom zakiseljenim metanolom i vodom. Koncentracija analita u svim slučajevima je ista.

4.3.4. Mlijeko

Mlijeko je vodena otopina smjese ugljikohidrata, proteina i masti što zahtjeva dodatan korak pročišćavanja koji uključuje uklanjanje proteina i masti. Organska otapala i/ili kiseline koriste se za efektivno taloženje proteina primjenom specifičnih interakcija koje djeluju na strukturu proteina. Organsko otapalo smanjuje dielektričnu konstantu otopine proteina i također razmješta molekule vode oko hidrofobnih regija na površini proteina, pri čemu prvo pojačava elektrostatska privlačenja između nabijenih molekula proteina što minimizirala hidrofobne interakcije između proteina. Kiseli reagensi formiraju netopljive soli s pozitivno nabijenim amino skupinama proteina kod pH vrijednosti koje su ispod njihove izoelektrične točke. U radu Chankasem i sur. (2015)⁶² za pročišćavanje su korišteni acetonitril i metanol, sa i bez dodatka 0,1 % octene ili mravlje kiseline, međutim analitički povrati glifosata bili su manji od 50 %, a mogući razlog niskog iskorištenja je ionska interakcija između analita i komponenti mlijeka. Mlijeko sadrži visok udio polivalentnih metalnih kationa kao što su ioni kalcija, magnezija i željeza. Ovi minerali mogu tvoriti kelate s glifosatom što rezultira njegovim gubitkom tijekom procesa taloženja proteina. Dodatkom Na₂EDTA u ekstrakcijsko otapalo, analitički povrati glifosata značajno su poboljšani. Uspješna ekstrakcija provedena je sa otopinom koja sadrži $50 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ octenu kiselinu i $10 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ Na₂EDTA pri čemu octena kiselina snizuje pH uzorka mlijeka kako bi se istaložili protein, a Na₂EDTA sprječava stvaranje kelacijskih kompleksa između polivalentnih metalnih iona i analita. Fosfolipidi su glavna komponenta prisutna u mlijeku i mogu se ekstrahirati zajedno s analitima.

Korištenje izrazito vodenih pokretnih faza uzrokuje taloženje na analitičkoj koloni što dovodi do degradacije njenih performansi i zbog toga je potrebno ubaciti korak pročišćavanja uzoraka kako bi se uklonili fosfolipidi i drugi nepolarni spojevi što se može postići dodatkom diklormetana ili ekstrakcijom na čvrstoj fazi. U radu su analizirani uzorci dobiveni ekstrakcijom vodom i smjesom metanol:voda 1:1 (v/v), svi uz dodatak 1 % mravlje kiseline (v/v). Kod ekstrakcije smjesom otapala korišteno je zamrzavanje uzorka kao metoda pročišćavanja, dok je kod ekstrakcije vodom isprobano nekoliko metoda pročišćavanja. Ekstrakcija smjesom rezultirala je cijepanjem pika AMPA, te manjim odzivom u odnosu na ekstrakciju vodom te se pristupilo daljnjem razvoju metode ekstrakcije vodom. Uz početno centrifugiranje na 4000 rpm, isprobano je centrifugiranje na 14000 rpm, ekstrakcija na čvrstoj fazi sa PCX sorbensom i primjena ultrafiltracije. Najviši odziv za analite, a ujedno i najbistriji

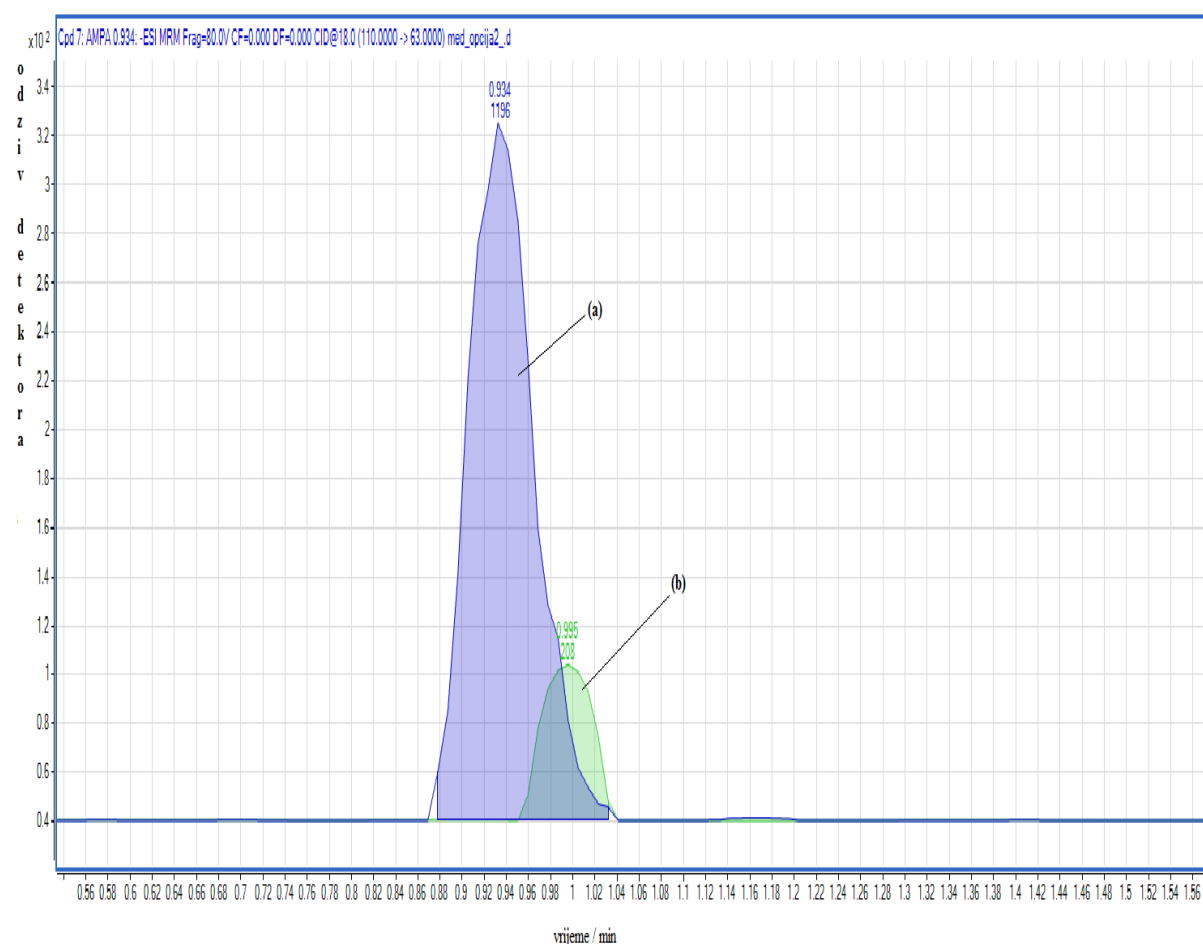
ekstrakti primijećeni su primjenom centrifugiranja pri višim okretajima i korištenjem SPE, međutim kod vremena zadržavanja analita AMPA primijećen je jak odziv interefencije, stoga se pristupilo korištenju diklormetana kao i u radu od Jensen i sur. (2016).⁵¹ Primjena otopine Na₂EDTA također je evaluirana. Poznato je da se glifosat zbog svoje kemijske strukture može ponašati kao kelat za metalne ione. Korištenje EDTA otopine kao kelacijskog sredstva u uzorcima mlijeka kod određivanja veterinarskih lijekova kao što su antibiotici tetraciklini, opisana je u literaturi. U istraživanju je također procjenjen utjecaja dodatka otopine EDTA zajedno sa ostalim, ranije spomenutim koracima pročišćavanja, te u slučaju mlijeka nisu uočena nikakva poboljšanja, štoviše, došlo je do supresije signala.



Slika 22. Kromatogrami ekstrakata zakiseljene vode slijepe matrice mlijeka obogaćene analitima, $\gamma = 0, 1 \text{ mg kg}^{-1}$ (zelena boja-primjena 14000 rpm i SPE, plava boja-14000 rpm + PCX + dodatak 1 % mravlje kiseline, crna boja- 14000 rpm, ljubičasta- 4000 rpm, crvena- 14000 rpm + ultrafiltracija)(1- AMPA, 2-Glifosat, 3-N-acetil-AMPA, 4-N-acetil-glifosat)

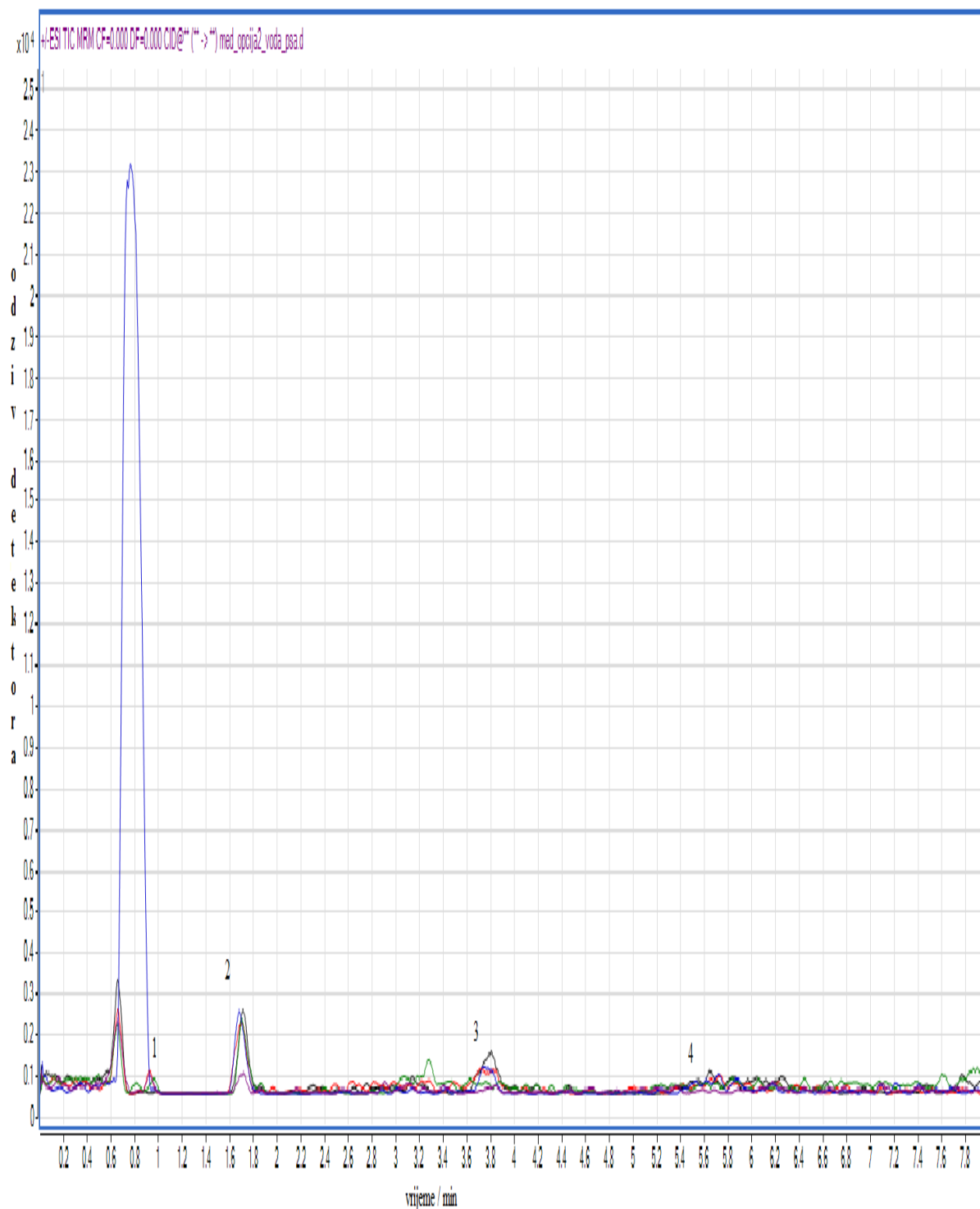
4.3.5. Med

Med kao matrica sadrži većinom šećere koji su polarni spojevi i koji mogu koeluirati sa glifosatom i njegovim metabolitima, posebice metabolitom AMPA, a sadrži i teške metale koji mogu utjecati na analitičke povrate analita. Vrlo je malo dostupne literature koja se bavi analitikom glifosata i najčešće njegovog metabolita AMPA u medu, a uključuje ekstrakciju zakiseljenom vodom ili modificiranom QuPPE metodom koja uz zakiseljeni metanol uključuje i dodatak vode.⁴⁷ Prilikom razvoja metode isprobana je voda uz dodatak 1 % mravlje kiseline (v/v) kao ekstrakcijsko otapalo te metanol uz dodatak 1 % mravlje kiseline (v/v) i vode. Ekstrakcija zakiseljenom vodom pokazala se boljom opcijom budući da sadrži manje interferencija matrice i veće odzive analita (Slika 23).

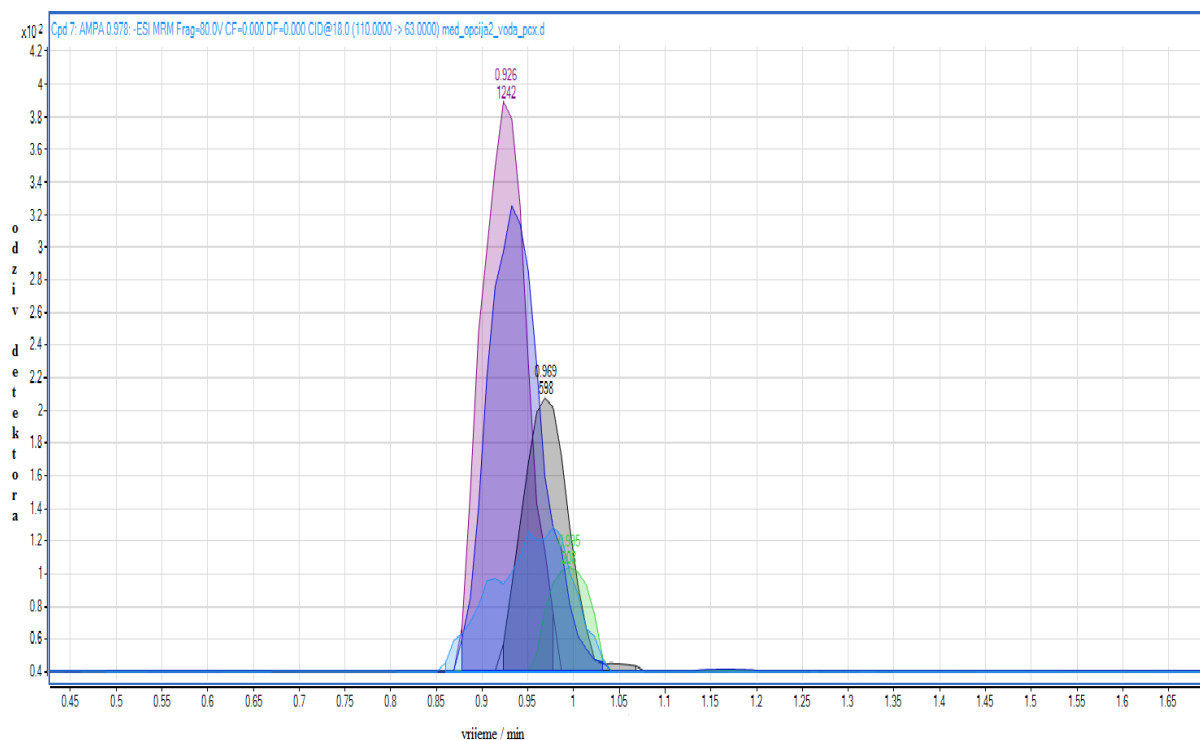


Slika 23. Usporedba kromatograma ekstrakata za analit AMPA iz meda dobivenih a) ekstrakcijom zakiseljenom vodom i b) ekstrakcijom zakiseljenim metanolom i vodom. Koncentracija analita u oba slučaja je ista.

Nakon ekstrakcije zakiseljenom vodom, pristupilo se ekstrakciji na čvrstoj fazi korištenjem dviju vrsta polimernih sorbensa - anionski (PAX) i kationski (PCX). Zbog svoje fosfonatne skupine, glifosat i njegovi metaboliti mogu se zadržati i efikasno pročititi korištenjem anionskog sorbensa, dok šećeri kao neionski spojevi neće biti zadržani. Također je korištena disperzivna ekstrakcija na čvrstoj fazi korištenjem PSA sorbensa. Kao što je vidljivo na Slici 24. korištenjem PCX sorbensa javlja se interferencija matrice velikog inteziteta koja interferira sa mjestom zadržavanja analita AMPA. Korištenjem PSA sorbensa kod dSPE, dolazi do smanjenja analitičkog povrata glifosata, dok je odziv za analit AMPA u odnosu na druge metode pročišćavanja najveći (Slika 25). Budući da niti jedan od koraka pročišćavanja nije utjecao na postizanje nižih granica kvantifikacija, izostavljen je bilo kakav dodatan korak pročišćavanja.



Slika 24. Kromatogrami ekstrakata zakiseljene vode slijepe matrice meda obogaćene analitima, $\gamma = 0,025 \text{ mg kg}^{-1}$ (plava boja-PCX, crvena-PAX, crna-ekstrakcija metanolom i vodom, zelena-ekstrakcija vodom, ljubičasta-PSA) (1- AMPA, 2-Glifosat, 3-N-acetil-AMPA, 4-N-acetil-glifosat)



Slika 25. Usporedba kromatograma ekstrakata AMPA u medu. Zeleno obojen kromatogram odgovara ekstrakciji zakiseljenim metanolom i vodom, a ružičasti zakiseljenom vodom. Ljubičasta boja-dSPE sa PSA, siva- SPE PAX, svijetlo plava boja- SPE PCX. Koncentracija analita u svim slučajevima je ista.

4.4. Validacija metoda

Razvijene metode određivanja ostataka glifosata i njegovih metabolita u uzorcima hrane životinjskog podrijetla validirane su radi utvrđivanja njihove ispravnosti i pouzdanosti prema smjernicama SANTE/12682/2019 koje se odnose na validaciju analitičkih metoda za određivanje ostataka pesticida. Za potrebe validacije korištene su slijepa matrice masnog tkiva, jetre, jaja, mlijeka i meda za koje je predloženim metodama potvrđeno da ne sadrže analizirane analite. U okviru ovog istraživanja provedeno je ukupno pet validacija, jedna po svakoj vrsti analizirane matrice.

Za validaciju metode u slijepu matricu uzorka životinjskog podrijetla dodani su analiti u odgovarajućim masenim koncentracijama neposredno prije provedbe validacije. Specifičnost metode provjerena je usporedbom kromatograma standardne otopine smjese analita pripravljene u otapalu (Slika 6.) s kromatogramima ekstrakta slijepa matrice uzorka

masnog tkiva (Slika 8.), jetre (Slika 9.), jaja (Slika 10.), mlijeka (Slika 11.) i meda (Slika 12.). Obzirom da nije bilo interferencija u području eluiranja (vremena zadržavanja) analiziranih pesticida istih m/z potvrđena je specifičnost metode.

Linearnost metode ispitana je u rasponu masenih koncentracija analita u uzorku masnog tkiva od granice određivanja do 100 ng mL^{-1} . U tu su svrhu pripravljene radne standardne otopine smjese analita u kojima su masene koncentracije pojedinih analita bile $10 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. Te su otopine dodane u slijepu matricu uzorka neposredno prije početka ekstrakcije. Kalibracijske krivulje za svaki su analit dobivene linearnom regresijom površina kromatografskih pikova (y – os) i masenih koncentracija (x – os) analita. Koeficijent determinacije (r^2) za svaki je analit izračunat na temelju kalibracijske krivulje s najmanje pet točaka, svaka sa minimalno 5 ponavljanja. Koeficijenti determinacije za svaki pojedini analit u masnom tkivu, jetri, mlijeku, jajima i medu prikazani su u Tablici 9. Za sve analizirane analite koeficijenti determinacije bili su $\geq 0,95$. Kriterij prihvaćanja linearnosti da devijacija izračunate koncentracije od prave koncentracije mora biti $< \pm 20 \%$ zadovoljen je za sve analite. Time je potvrđena linearnost metode za analizirane analite u cijelom navedenom koncentracijskom području. Najniži koeficijenti determinacije određeni su za analit AMPA budući da on izlazi na samom početku kao i interferencije matrice. Za većinu analiziranih analita potvrđena je linearnost metode u cijelom ispitanom rasponu masenih koncentracija (od granice određivanja do maksimalno 160 ng mL^{-1}).

Tablica 9. Linearnost metode određivanja glifosata i njegovih metabolita u masnom tkivu, jetri, jajima, mlijeku i medu

Vrsta matrice	Analit	AMPA	Glifosat	N-acetil-AMPA	N-acetil-glifosat
	r^2	0,985	0,996	0,992	0,991
Masno tkivo	Linearno područje/ ng mL^{-1}	12,5-100	12,5-100	12,5-100	12,5-100
	r^2	0,967	0,996	0,992	0,993
Jetra	Linearno područje/ ng mL^{-1}	10-100	5-100	5-100	5-100
	r^2	0,978	0,996	0,988	0,987
Jaja	Linearno područje/ ng mL^{-1}	2,5-60	4-60	4-60	2,5-60
	r^2	0,984	0,983	0,961	0,986
Mlijeko	Linearno područje/ ng mL^{-1}	20-160	5-160	20-160	20-160
	r^2	0,992	0,993	0,996	0,995
Med	Linearno područje/ ng mL^{-1}	5-160	5-160	5-160	5-160

U sklopu validacije određene su granice kvantifikacije analita u masnom tkivu, jetri, jajima, mlijeku i medu te prikazane u Tablici 10. Granice kvantifikacije su određene kao najniža granica obogaćenja matrice analitima pri kojima su zadovoljeni uvjeti ponovljivosti ($\text{RSD} < 20\%$) i analitičkog povrata (70-120%). Dobivene granice kvantifikacije su jednake ili ispod trenutno postojećih najvećih dopuštenih masenih udjela prema Uredbi 293/2013 za glifosat (Tablica 1.). Budući da EFSA predlaže razmatranje najvećih dopuštenih masenih

udjela kao zbroj koncentracija glifosata i njegovih metabolita, ukupne koncentracije tada bi bile brojčano veće, no raspoređeno na svaki analit, potrebno bi bilo postići niže granice kvantifikacije. U tom slučaju, metoda za masno tkivo i goveđu jetru zadovoljila bi granice kvantifikacije za sve analite. Vrlo malo je objavljenih radova koje uključuju sve navedene analite i matrice. Tako su autori Herrera López i sur. (2020)⁶³ u svom radu obuhvatili glifosat i sve njegove metabolite u kravljem mlijeku, svinjskom masnom tkivu, bubrezima, jetri, mesu i jajima. Dobivene vrijednosti upućuju na niže vrijednosti granica kvantifikacija (0,01 mg kg⁻¹ za gotovo sve analite u svim matricama) u usporedbi sa provedenim istraživanjem osim u slučaju glifosata u jetri u kojoj su granice kvantifikacije iznosile 0,2 mg kg⁻¹.

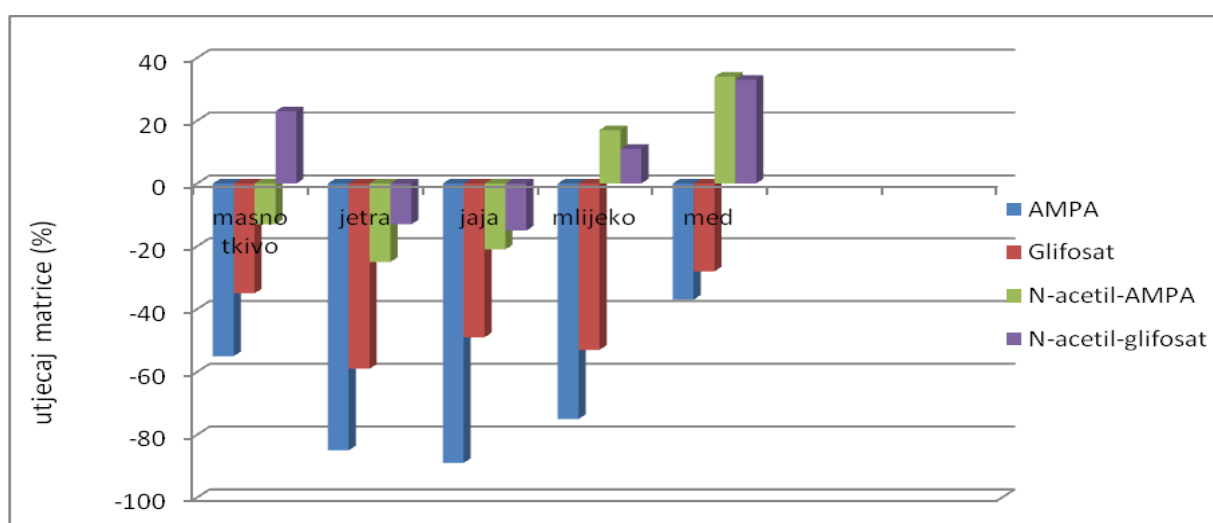
Glifosat i njegov metabolit AMPA u medu određivani su u radu Chamkasem i sur. (2017) pri čemu su dobivene granice kvantifikacije od 16 ng g⁻¹ za glifosat, odnosno 4 ng g⁻¹ za AMPA.⁶⁵ Primjenom vezanog sustava ionska kromatografija - spektrometrija masa postignute su znatno niže vrijednosti granica kvantifikacija za glifosat i AMPA u medu, 0,005 odnosno 0,02 mg kg⁻¹,⁸⁴ dok primjena derivatizacijskog koraka i online SPE sustava vezanog na sustav tekućinska kromatografija - spektrometrija masa je omogućio još niže granice kvantifikacije za oba analita od 1 µg kg⁻¹.⁶⁴ Vrlo niske granice kvantifikacije za glifosat i AMPA od 0,0005, odnosno 0,0025 mg kg⁻¹ u mlijeku i 0,001, odnosno 0,0025 mg kg⁻¹ dobivene su u medu, jajima, mesu i ribi pri čemu su granice određene zadovoljavajući kriterij da je odnos signala i šuma veći od 10.⁴¹ U mlijeku su objavljene najniže koncentracije obogaćenja od 0,025 mg kg⁻¹ za glifosat i AMPA,⁶² te granice kvantifikacije od 10 µg L⁻¹.⁵¹ Podaci o granicama kvantifikacija za glifosat i sve njegove metabolite u drugim matricama nisu dostupni.

Tablica 10. Granice kvantifikacije za glifosat i njegove metabolite u masnom tkivu, jetri, jajima, mlijeku i medu

Granice kvantifikacije (mg kg ⁻¹) po vrstama matrica					
Analit	Masno tkivo	Jetra	Jaja	Mlijeko	Med
AMPA	0,025	0,2	0,04	0,2	0,1
Glifosat	0,025	0,05	0,04	0,025	0,05
N-acetil-AMPA	0,025	0,1	0,04	0,1	0,05
N-acetil-glifosat	0,025	0,2	0,04	0,04	0,08

Kao što je već rečeno, EFSA je u svom izvješću razmatrala metodu za praćenje glifosata, AMPA i N-acetil-glifosata sa kombiniranim granicom kvantifikacije od $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$, odnosno $0,025 \text{ mg kg}^{-1}$ za svaki pojedini analit u mesu, mlijeku i jajima, te $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$ (odnosno $0,05 \text{ mg kg}^{-1}$ za svaki pojedini analit) u jetri, bubregu i masti. Prema istom izvješću, potvrdna metoda za određivanje glifosata u masti, jetri, bubregu, te potvrdna metoda za određivanje AMPA i N-acetil-glifosata u svim matricima i dalje nedostaju, a prema informacijama koje su dostavili Referentni laboratoriji Europske unije, trenutno nema dovoljno podataka o validaciji metoda za rutinsku provedbu predložene definicije ostataka u hrani životinjskog podrijetla.

Utjecaj matrice uzorka procijenjen je na temelju usporedbe nagiba kalibracijskih krivulja dobivenih linearnom regresijom rezultata analize standardnih otopina smjese analita pripremljenih u čistom otapalu i standardnih otopina pripremljenih u matrici uzorka. Utjecaj matrice uzorka izračunat je prema izrazu (1). Na ovaj način procjenjuje se utjecaj matrice uzorka u cijelokupnom linearnom području analitičke metode, a izražava se kao prigušenje i/ili pojačanje kromatografskog signala. Vrijednosti do $\pm 10 \%$, od 100% znači da nema utjecaja matrice uzorka; vrijednosti do $\pm 20 \%$ od 100% upućuju na mali utjecaj matrice uzorka, vrijednosti $\pm 20 \%$ do $\pm 50 \%$, od 100% upućuju na srednji utjecaj matrice, dok vrijednosti veće od $\pm 50 \%$, od 100% upućuju na jak utjecaj matrice. Rezultati utjecaja različitih matrica prikazani su na Slici 26.



Slika 26. Utjecaj matrice masnog tkiva, jetre, jaja, mlijeka i meda na analite AMPA, glifosat, N-acetil-ampa i N-acetil-glifosat

Općenito gledano, uočen je varijabilni utjecaj matrice u rasponu od -85 do +37 %. AMPA je pokazala izrazito negativan utjecaj matrice u svim analiziranim vrstama matrice u rasponu od - 39 do - 85 %. Koliko će biti izražen utjecaj matrice uzorka ovisi, osim o samoj matrici i postupku pripreme uzorka, i o fizikalno – kemijskim svojstvima određivanih analita. Ključna fizikalno – kemijska svojstva analita koja imaju važnu ulogu pri odabiru metodologije su topljivost analita u vodi i njihova hidrofobnost izražena koeficijentom razdjeljenja u sustavu oktanol – voda. Analiti određivani u ovom istraživanju polarnog su karaktera. Pri različitim postupcima pripreme uzorka utjecaj iste matrice uzorka na određivanje istih analita ne mora biti jednak niti sličan. Tako je u ovom istraživanju najmanji utjecaj matrice primijećen kod masnog tkiva. Dok su AMPA i glifosat pokazivali izrazito negativan utjecaj matrice, N-acetil-AMPA i N-acetil-glifosat pokazivali su varijabilne utjecaje matrice, od - 25 do 37 %. Zbog varijabilnih rezultata prilikom procjene utjecaja matrice, primjena izotopno obilježenih unutarnjih standarda je nužna kako bi se izvršila korekcija utjecaja matrice, ali i omogućila ispravna kvantifikacija nekih kombinacija spojeva/matrica budući da su primijećene razlike ne samo unutar matrica koje pripadaju istoj grupi kao što su npr. jetra i bubreg, nego i razlike unutar individualnih vrsta jetre, npr. svinjska i kokošja.⁶³ Analit N-acetil-AMPA pokazao je mali do srednji utjecaj matrice, a zbog nemogućnosti nabave prikladnog izotopno obilježenog unutarnjeg standard, njegovo korištenje je izostavljeno. Jak utjecaj matrice na glifosat i njegove metabolite primijećen je i u ostalim radovima koji su objavljeni u hrani životinjskog podrijetla, pri čemu je AMPA pokazivala najjači negativni utjecaj matrice.^{62,63,65} Kod analize glifosata primijećen je najekstremniji i izrazito suprotan utjecaj matrice od - 45 % u kravljem mlijeku do 47 % u bubrezima.⁶³ Negativan utjecaj matrice na glifosat primijećen je kod svinjskog masnog tkiva i kravljeg mlijeka, dok je pozitivan ili neznatjan utjecaj matrice primijećen kod jetre, bubrega, kokošnjih jaja i kokošnjeg mesa. AMPA je pokazala izrazito negativan utjecaj matrice u jetri (- 77 %), nešto manji u kravljem mlijeku (- 58 %), bubrezima (- 45 %), kokošnjem mesu (- 35 %), a najmanji u kokošnjim jajima (- 6 %) i svinjskom masnom tkivu (- 2 %). Analit N-acetil-AMPA pokazao je najmanji utjecaj matrice, najznačajniji od - 35 % u kokošnjem mesu, a slično se pokazao i analit N-acetil-glifosat sa pozitivnim utjecajem od 36 % kod kokošnjih jaja.

Točnost i ponovljivost metode određivanja glifosata i njegovih metabolita u matricama masno tkivo, jetra, jaja, mlijeko i med ispitane su na minimalno tri koncentracijska nivoa korištenjem izotopno obilježenih unutarnjih standarda, a rezultati su prikazani u

Tablicama 11.-15. Analiti kod kojih je zadovoljen kriterij iskorištenja od 70 do 120 % sa RSD-om do 20 % označeni su crnom bojom dok oni kod kojih to nije slučaj označeni crvenom. Točnost je izračunata kao srednja vrijednost analitičkog povrata minimalno pet ponavljanja po koncentracijskom nivou. Najniže vrijednosti za RSD % dobivene su za analit glifosat u gotovo svim matricama, a najniže u masnom tkivu u rasponu od 2,7 do 3,9 %. Najviše vrijednosti RSD % dobivene su za analit AMPA u svim matricama. Pojedini analiti nisu zadovoljavali postavljene kriterije na nižim koncentracijskim nivoima zbog smanjene osjetljivosti iona kvantifikacije ili kvalifikacije ili zbog interferancija matrica. Zadovoljavajući analitički povrati za AMPA kretali su se od 94 do 116 %. Najniži analitički povrat za glifosat dobiven je u medu, dok najviši od 139 % u jajima zadovoljavajući uvjete RSD %. Kod analita N-acetil-AMPA rasponi zadovoljavajućih analitičkih povrata kreću se od 80 do 122 %, a analita N-acetil-glifosata od 85 do 110 %. Korištenjem izotopno obilježenih standarda, prosječne vrijednosti analitičkih povrata u objavljenim radovima za glifosat i AMPA u mlijeku kretale su se između 84 i 111% uz RSD < 8 %, ⁶² odnosno između 89 i 107 % uz RSD < 7,4 %.⁵¹ U medu su se vrijednosti analitičkih povrata kretale između 95,2 do 105,3 % sa RSD između 1,6 i 7,2 %, ⁶⁴ odnosno između 87 i 111% sa RSD < 12 %.⁶⁵

Tablica 11. Točnost i ponovljivost metode određivanja glifosata i njegovih metablita u masnom tkivu

Obogaćenje/ mg kg ⁻¹	Matrica/ Masno tkivo	AMPA	glifosat	N-acetil- AMPA	N-acetil- glifosat
0,025	γ / mg kg ⁻¹	0,0262	0,0284	0,0254	0,0263
	R/ %	104,7	113,7	101,7	105,4
	RSD/%	13,2	3,9	13,7	20,8
0,04	γ / mg kg ⁻¹	0,0423	0,0416	0,0409	0,0413
	R/ %	105,7	104,0	102,2	103,2
	RSD/%	11,5	2,97	7,8	17,9
0,05	γ / mg kg ⁻¹	0,0516	0,0502	0,0504	0,0498
	R/ %	103,1	100,3	100,8	99,5
	RSD/%	11,3	2,9	7,5	10,4
0,1	γ / mg kg ⁻¹	0,0982	0,0999	0,1028	0,0996
	R/ %	98,2	99,9	102,8	99,6
	RSD/%	10,9	2,7	6,6	8,4

Tablica 12. Točnost i ponovljivost metode određivanja glifosata i njegovih metablita u jetri

Obogaćenje/ mg kg ⁻¹	Matrica / jetra	AMPA	glifosat	N-acetil- AMPA	N-acetil- glifosat
0,05	γ / mg kg ⁻¹	-	0,06	-	-
	R/ %	-	126,7	-	-
	RSD/%	-	8,7	-	-
0,1	γ / mg kg ⁻¹	-	0,11	0,10	-
	R/ %	-	107,1	99,9	-
	RSD/%	-	6,8	6,7	-
0,2	γ / mg kg ⁻¹	0,23	0,19	0,20	0,22
	R/ %	115,8	97,0	102,0	108,7
	RSD/%	22,4	4,1	5,8	5,7
0,5	γ / mg kg ⁻¹	0,50	0,47	0,52	0,50
	R/ %	100,6	93,9	103,0	101,1
	RSD/%	18,8	4,0	6,9	4,4
0,7	γ / mg kg ⁻¹	0,70	0,69	0,75	0,69
	R/ %	99,6	98,6	106,5	98,9
	RSD/%	20,1	3,11	13,6	7,6

Tablica 13. Točnost i ponovljivost metode određivanja glifosata i njegovih metablita u jajima

Obogaćenje/ mg kg ⁻¹	Matrica / jaja	AMPA	glifosat	N-acetil- AMPA	N-acetil- glifosat
0,025	γ / mg kg ⁻¹	0,025	0,035	0,029	0,025
	R/ %	98,22	139,3	116,0	99,6
	RSD/%	25,3	6,6	12,6	20,6
0,04	γ / mg kg ⁻¹	0,043	0,045	0,041	0,039
	R/ %	106,8	111,6	102,0	98,61
	RSD/%	16,5	3,5	16,2	19,3
0,05	γ / mg kg ⁻¹	0,052	0,053	0,052	0,049
	R/ %	104,6	105,4	104,5	97,13
	RSD/%	12,1	4,4	12,4	16,2
0,1	γ / mg kg ⁻¹	0,10	0,094	0,10	0,095
	R/ %	100,2	94,12	100,5	95,13
	RSD/%	24,1	4,3	9,3	19,4
0,2	γ / mg kg ⁻¹	0,19	0,19	01,9	0,21
	R/ %	98,55	94,18	92,52	104,0
	RSD/%	8,7	5,7	12,6	9,4
0,4	γ / mg kg ⁻¹	0,39	0,39	0,39	0,40
	R/ %	96,83	96,65	97,61	109,9
	RSD/%	3,6	2,7	5,7	4,8
0,5	γ / mg kg ⁻¹	0,51	0,50	0,50	0,48
	R/ %	102,3	99,39	99,77	96,90
	RSD/%	13,1	3,8	7,8	7,3
0,6	γ / mg kg ⁻¹	0,60	0,62	0,61	0,58
	R/ %	98,88	102,6	101,9	97,64
	RSD/%	10,6	1,6	7,4	3,3

Tablica 14. Točnost i ponovljivost metode određivanja glifosata i njegovih metablita u mlijeku

Obogaćenje/ mg kg ⁻¹	Matrica / mlijeko	AMPA	Glifosat	N-acetil- AMPA	N-acetil- glifosat
0,025	γ / mg kg ⁻¹	0,021	0,028	-	-
	R/ %	86,73	113,5	-	-
	RSD/%	73,44	5,63	-	-
0,04	γ / mg kg ⁻¹	0,032	0,041	-	0,034
	R/ %	79,78	101,5	-	85,22
	RSD/%	61,39	18,17	-	17,20
0,05	γ / mg kg ⁻¹	0,038	0,051	-	0,048
	R/ %	76,44	101,5	-	96,42
	RSD/%	54,30	3,58	-	15,72
0,1	γ / mg kg ⁻¹	0,099	0,096	0,12	0,10
	R/ %	92,67	95,63	122,5	100,8
	RSD/%	54,50	3,53	3,57	4,62
0,2	γ / mg kg ⁻¹	0,22	0,19	0,16	0,19
	R/ %	110,5	94,63	80,35	97,63
	RSD/%	17,16	2,07	6,58	10,20
0,4	γ / mg kg ⁻¹	0,38	0,38	0,35	0,37
	R/ %	94,75	95,62	86,90	91,45
	RSD/%	20,46	2,43	12,71	12,38
0,5	γ / mg kg ⁻¹	0,49	0,54	0,59	0,51
	R/ %	97,99	108,6	117,9	103,0
	RSD/%	11,71	14,1	9,14	10,01
0,8	γ / mg kg ⁻¹	0,85	0,78	0,78	0,81
	R/ %	106,5	98,13	97,1	101,1
	RSD/%	19,95	5,63	16,24	3,82

Tablica 15. Točnost i ponovljivost metode određivanja glifosata i njegovih metablita u medu

Obogaćenje/ mg kg ⁻¹	Matrica / med	AMPA	Glifosat	N-acetil- AMPA	N-acetil- glifosat
	γ / mg kg ⁻¹	0,028	0,018	0,023	0,012
0,02	R/ %	140,2	88,18	114,9	62,08
	RSD/%	25,70	31,84	9,80	27,11
	γ / mg kg ⁻¹	0,041	0,044	0,032	0,041
0,04	R/ %	101,7	110,5	79,05	101,8
	RSD/%	29,83	34,36	13,62	44,71
	γ / mg kg ⁻¹	0,056	0,059	0,054	0,062
0,05	R/ %	112,2	118,1	108,5	123,3
	RSD/%	30,83	20,6	8,90	32,60
	γ / mg kg ⁻¹	0,080	0,085	0,079	0,091
0,08	R/ %	99,6	106,8	99,26	113,3
	RSD/%	34,10	14,07	8,19	14,21
	γ / mg kg ⁻¹	0,10	0,13	0,10	0,099
0,1	R/ %	101,2	86,61	103,7	98,99
	RSD/%	20,95	6,38	10,40	9,33
	γ / mg kg ⁻¹	0,13	0,13	0,15	0,14
0,15	R/ %	87,72	86,61	96,88	92,50
	RSD/%	17,34	6,38	6,35	11,32
	γ / mg kg ⁻¹	0,22	0,21	0,21	0,21
0,2	R/ %	110,0	105,6	103,3	104,10
	RSD/%	10,99	8,00	4,12	9,35

4.5. Mjerna nesigurnost

Svrha svakog mjerenja odnosno kvantitativnog određivanja je procjena stvarne vrijednosti mjerene veličine. Vrlo često se najbolja procjena dobiva iz niza individualnih (ponovljenih) mjerenja koristeći statističke metode procjene. Rezultat svakog mjerenja mora sadržavati i nedvosmislenu informaciju o mjerenoj veličini i kvaliteti mjerenja. Stvarna vrijednost mjerene veličine nikad neće biti izmjerena pa se rezultat mjerenja prikazuje kao najbolja procjena mjerene veličine i pogreška povezana s tim mjerenjem odnosno mjerna nesigurnost.

Pristup “top down” izravno procjenjuje mjernu nesigurnost vrednovanjem podataka kontrole kvalitete ili validacije metode.⁸⁵ Navedeni pristup je praktičniji i isplativiji od drugih pristupa budući da se mogu koristiti podaci iz rutinske unutarnje kontrole kvalitete metode i testova osposobljenosti, a statistički nisu uočene značajnije razlike u usporedbi sa drugim pristupima procjeni mjerne nesigurnosti.

U analitičkoj kemiji rezultat procesa mjerenja prikazuje se kao srednja vrijednost i mjerna nesigurnost povezana s postupkom kvantitativnog određivanja. Validacija neke analitičke metode sastoji se od procjene mjernih karakteristika metode i kvantitativnog određivanja tih karakteristika.

Točnost metode ocijenjena je analizom analitičkih povrata pesticida ($70 \% < R < 120 \%$), a preciznost analizom relativnih standardnih devijacija analitičkih povrata ($RSD < 20 \%$), kao što je opisano u poglavlju 4.4. Za svaki je analit izračunata mjerna nesigurnost iz podataka srednje vrijednosti apsolutnih analitičkih povrata i relativnih standardnih devijacija koji uključuju minimalno tri koncentracijska nivoa. Rezultati su prikazani u tablici koja slijedi. Mjerna nesigurnost izračunata je iz podataka dobivenih validacijom uz k factor = 2 korištenjem izraza (3). Dobiveni podaci kreću se od 10,8 do 41,9 % što zadovoljava kriterij propisan u SANTE/12682/2019 u kojem se za prekoračenje MDK vrijednosti koristi zadana mjerna nesigurnost od $\pm 50\%$ ukoliko je mjerna nesigurnost dobivena validacijom niža. Očekivano najviše vrijednosti proširene mjerne nesigurnosti u gotovo svim matricama dobivene su za analit AMPA. Literaturno su dostupni samo podaci za proširenu mjernu nesigurnost glifosata i AMPA u među koje iznosi 14, odnosno 13 %.⁶⁴

Tablica 16. Proširena mjerna nesigurnost za glifosat i njegove metabolite u masnom tkivu, jetri, jajima, mlijeku i medu

Proširena mjerna nesigurnost (%) po vrstama matrica					
Analit	Masno tkivo	Jetra	Jaja	Mlijeko	Med
AMPA	15,7	41,9	28,6	37,6	32,9
Glifosat	10,8	13,4	12,4	13,9	31,7
N-acetil-AMPA	13,9	21,0	21,2	20,5	15,7
N-acetil-glifosat	26,0	12,8	25,1	22,0	22,4

4.6. Analiza uzoraka

Prema EFSA izvješću, u 2017. godini sveukupno je analizirano 8672, a u 2018. godini 9573 različitih prehrambenih proizvoda (uključujući prerađene proizvode) na glifosat; od toga 306 odnosno 192 bili su uzorci hrane životinjskog podrijetla (uključujući med).⁸⁶ Rezultati iz 2018. g. pokazali su da glifosat nije kvantificiran u 98 % uzoraka, a u 2017.g. u 97,5 %. U 1,9 % uzoraka (179 uzoraka) glifosat je kvantificiran iznad LOQ, ali ispod MDK, a u 12 uzoraka (0,1 %) razina ostataka premašila je MDK.⁸⁷ Postotak prekoračenja smanjen je u odnosu na 2017. g. (0,2 %). Ostaci glifosata u medu u 2017. i 2018. g. detektirani su u 162 odnosno 148 uzorka ispod LOQ, a iznad LOD. Ispod MDK bilo je 16 odnosno 4, a iznad MDK 8 odnosno 5 uzoraka. U ostaloj vrsti hrane životinjskog podrijetla glifosat nije detektiran, te se upravo med pokazao kao matrica u kojem je glifosat najčešće detektiran. U istraživanju provedenom na medovima iz različitih država svijeta koncentracije glifosata iznad LOQ metode (15 ng g^{-1}) pronađene su u 59 % uzoraka obuhvaćajući koncentracijski raspon od 17 do 63 ng g^{-1} .⁸² Koncentracije glifosata u medu određivane su u medovima Havajskog otočja pri čemu je u 27,1 % analiziranih medova pronađena koncentracija glifosata iznad LOQ od 15 ppb, sa najvećom izmjerenom koncentracijom od 342 ppb.⁸³ Na švicarskom tržištu, od 16 pretražena uzorka meda čak 15 uzoraka bilo je iznad granice kvantifikacije od $0,001 \text{ mg kg}^{-1}$ za glifosat, sa najvećom izmjerenom koncentracijom od $0,0159 \text{ mg kg}^{-1}$, a izmjerene koncentracije za metabolit AMPA bile su ispod LOQ od $0,0025 \text{ mg kg}^{-1}$.⁴¹ Od 200 analiziranih uzoraka meda, glifosat je detektiran u 197 uzoraka sa koncentracijom jednakom ili većom od LOQ od $1 \mu\text{g}$

kg⁻¹, sa najvećim masenim udjelom od 49,8 µg kg⁻¹, dok je dok je analit AMPA detektiran u 198 uzorka sa najvećim masenim udjelom od 50,1 µg kg⁻¹.⁶⁴ Unatoč velikom postotku uzoraka meda sa detekiranim glifosatom, vrlo velik broj tih uzoraka je znatno ispod trenutno postavljene MDK od 0,05 mg kg⁻¹.

Budući da prema trenutnim informacijama ne postoje saznanja o stanju glifosata i njegovih metabolita u masnom tkivu, jetri, mlijeku, jajima i medu u Republici Hrvatskoj, prikupljeni su uzorci kako bi se dobio preliminarni pregled najprodavanijeg herbicida. Od svake matrice je uzeto po 10 uzoraka, osim meda za koji se uzelo 20 budući da se prema provedenim istraživanjima u ostalim zemljama i EFSA izvješću očekivao veći broj uzoraka sa detektiranim glifosatom u odnosu na ostale matrice. Analizom svih uzoraka glifosat i njegovi metaboliti nisu detektirani niti kvantificirani niti u jednom uzorku (Tablica 17) te su udovoljavali trenutno postavljenim MDK vrijednostima propisanim Uredbom 293/2013.³⁹

Tablica 17. Izmjerene masene koncentracije (mg kg⁻¹) glifosata i njegovih metabolita u analiziranim uzorcima hrane životinjskog podrijetla

Vrsta uzoraka	Koncentracije (mg kg ⁻¹)			
	AMPA	Glifosat	N-acetil-AMPA	N-acetil-glifosat
Masno tkivo (uzorci 1-10)	< 0,025	< 0,025	< 0,025	< 0,025
Jetra (uzorci 11-20)	< 0,2	< 0,05	< 0,1	< 0,2
Jaja (uzorci 21-30)	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04
Mlijeko (uzorci 31-40)	< 0,2	< 0,025	< 0,1	< 0,04
Med (uzorci 41-60)	< 0,1	< 0,05	< 0,05	< 0,08

§ 5. ZAKLJUČAK

Razvijena je metoda za kvantitativno određivanje ostataka glifosata i njegovih metabolita AMPA, N-acetil-AMPA i N-acetil-glifosat vezanim sustavom tekućinska kromatografija – spektrometrija masa u masnom tkivu, jetri, jajima, mlijeku i medu. Razvojem metoda upotpunjeni su nedostaci koje EFSA navodi u svojim izvješćima odnosno nedostatak potvrdne metode za određivanje glifosata u masti, jetri i bubregu, te potvrdne metode za određivanje AMPA i N-acetil-glifosata u svim matricama životinjskog podrijetla.

Istraživanje je provedeno primjenom kromatografske kolone Hypercarb duljine 100 mm, promjera 2,1 mm, veličina čestica punila 5 μm , koja se pokazala prikladnom za odijeljivanje svih odabranih analita uz 1,2 % mravlju kiselinu u vodi (v/v) kao pokretnu fazu A i 0,9 % mravlju kiselinu u acetonitrilu (v/v) kao pokretnu fazu B. Identitet analita potvrđen je spektrometrijom masa praćenjem ciljnog iona i dvaju potvrdnih iona karakterističnih za svaki spoj. Uvjeti instrumentne analize optimirani su obzirom na parametre izvora i kolizijske ćelije, postavke napona, napon fragmentora i kolizijske energije s ciljem postizanja maksimalne osjetljivosti detekcije odabranih analita.

Tijekom optimiranja uvjeta ekstrakcije analita u hrani životinjskog podrijetla provjereni su analitički povrati uz primjenu različitih ekstrakcijskih otpala. Najbolji analitički povrati dobiveni su ekstrakcijom s 1 % mravlje kiseline u vodi (v/v). Kod masnog tkiva i mlijeka uveden je korak pročišćavanja ekstrakcijom diklormetanom. Jetra i jaja kao složenije matrice zahtijevaju pročišćavanje korištenjem ultrafiltracije i ekstrakcije na čvrstoj fazi kod koje je korišten polimerni sorbens ionske izmjene (PCX).

Procjenjen je i utjecaj matrice pri čemu je uočen varijabilni utjecaj matrice u rasponu od - 85 do + 37 %. AMPA je pokazala izrazito negativan utjecaj matrice u svim analiziranim vrstama matrice u rasponu od - 39 do - 85 %. Najmanji utjecaj matrice primijećen je kod masnog tkiva. Dok su AMPA i glifosat pokazivali izrazito negativan utjecaj matrice, N-acetil-AMPA i N-acetil-glifosat pokazivali su varijabilne utjecaje matrice, od - 25 do 37 %. Zbog varijabilnih rezultata prilikom procjene utjecaja matrice, primjena izotopno obilježenih unutarnjih standarda je nužna kako bi se izvršila korekcija utjecaja matrice.

Predloženi analitički postupci validirani su u skladu sa smjernicama SANTE/12682/2019 pri čemu su provedene validacije na svim matricama kroz određivanje granica kvantifikacije, preciznosti i točnosti. Pri određivanju granica kvantifikacija

zadovoljeni su kriteriji analitičkih povrata u rasponu od 70 do 120 % sa preciznošću iskazanom kao RSD < 20 %, te da je granica manja ili jednaka dopuštenoj koncentraciji u skladu sa Uredbom Komisije 293/2013. Najniže vrijednosti za RSD % dobivene su za analit glifosat u gotovo svim matricama, a najniže u masnom tkivu u rasponu od 2,7 do 3,9 %. Najviše vrijednosti RSD % dobivene su za analit AMPA u svim matricama. Pojedini analiti nisu zadovoljavali postavljene kriterije na nižim koncentracijskim nivoima zbog smanjene osjetljivosti iona kvantifikacije ili kvalifikacije ili zbog interferancija matrica. Zadovoljavajući analitički povrati za AMPA kretali su se od 94 do 116 %. Najniži analitički povrat za glifosat dobiven je u medu, dok najviši od 139 % u jajima zadovoljavajući uvjete RSD %. Kod analita N-acetil-AMPA rasponi zadovoljavajućih analitičkih povrata kreću se od 80 do 122 %, a analita N-acetil-glifosata od 85 do 110 %.

Prilikom zadnjeg EFSA izvješća razmatrana je HPLC-MS/MS metoda za praćenje glifosata, AMPA i N-acetil-glifosata sa kombiniranim granicama kvantifikacije od 0,1 mg kg⁻¹, odnosno 0,025 mg kg⁻¹ za svaki pojedini analit u mesu, mlijeku i jajima, te 0,2 mg kg⁻¹ (odnosno 0,05 mg kg⁻¹ za svaki pojedini analit) u jetri, bubregu i masti. Granice kvantifikacije postignute u ovom istraživanju jednake su ili ispod trenutno postojećih najvećih dopuštenih masenih udjela prema Uredbi 293/2013 za glifosat. Istraživanjem su postignute niže granice kvantifikacije za glifosat i sve njegove metabolite u masnom tkivu u odnosu na granice razmatrane od strane EFSA. U jetri i mlijeku postignute su razmatrane granice kvantifikacije samo za glifosat, dok za ostale metabolite zbog kompleksne prirode matrice uzorka nije bilo moguće postići tako niske granice kvantifikacije, kao niti kod jaja gdje su za sve analite postignute granice kvantifikacije od 0,04 mg kg⁻¹.

U okviru validacije razrađenih metoda ispitana je mjerna nesigurnost određivanja analita. Proširena relativna mjerna nesigurnost bila je niža od 50 % za sve analite, što je i bila ciljana vrijednost validiranih analitičkih metoda. Analit sa prosječno najvišim proširenim relativnim mjernim nesigurnostima bio je AMPA, dok su najniže proširene relativne mjerne nesigurnosti određene za glifosat.

Razrađeni analitički postupci primijenjeni su za analizu glifosata i njegovih metabolita u masnom tkivu, jetri, jajima, mlijeku i medu prikupljenima u Republici Hrvatskoj. Analizom svih uzoraka glifosat i njegovi metaboliti nisu detektirani niti kvantificirani niti u jednom uzorku ujedno zadovoljavajući trenutno postavljene MDK vrijednosti propisane u Uredbi 293/2013. Ukupan broj od 60 analiziranih uzoraka hrvatskog

podrijetla nije dovoljan kako bi se moglo garantirati da hrvatska regulativa o korištenju glifosata u agrikulturnoj praksi nije prekršena, ali barem ne ukazuje na neregistriranu upotrebu glifosata jer u hrani nije pronađena niti jedna velika kontaminacija.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

AMPA – aminometilfosfonska kiselina

dSPE – ekstrakcija raspršenjem čvrste faze

EFSA – Europska agencija za sigurnost hrane

EPSPS – 5-enolpiruvilšikamt-3-fosfat sintaza

FAO – Organizacija za hranu i poljoprivredu Ujedinjenih naroda

GAT – glicin N-fenilacetiltransferaza

GM – genetski modificirano

GOX – glukoza oksidaza

GC – plinska kromatografija

GC – MS – plinska kromatografija vezana sa spektrometrijom masa

GC – MS/MS – plinska kromatografija s tandemnom spektrometrijom masa

HILIC – hidrofilna interkacijska kromatografija (eng. *Hydrophilic Interaction Chromatography*)

HLB – hidrofilni – lipofilni balans (eng. *hydrophilic – lipophilic balance*)

LC – tekućinska kromatografija

LC – MS – tekućinska kromatografija sa spektrometrijom masa

LC – MS/MS – tekućinska kromatografija s tandemnom spektrometrijom masa

LLE – ekstrakcija otapalom (eng. *Liquid Liquid Extraction*)

LOD – granica detekcije (eng. *Limit of Detection*)

LOQ – granica kvantifikacije (eng. *Limit of Quantification*)

MDK – maksimalno dopušteni maseni udio

ME – utjecaj matrice uzorka

MRM – praćenje višestrukih tranzicijskih reakcija

m/z – omjer masa/naboja

MS – spektrometrija masa

QuEChERS – quick, easy, cheap, effective, rugged and safe

PSA – primarni sekundarni amin

QuPPE – brza metoda za polarne pesticide (eng. *Quick Polar Pesticides Method, QuPPE*)

QQQ – trostruki kvadrupol

R – analitički povrat

r^2 – koeficijent determinacije

RSD – relativna standardna devijacija

SAD – Sjedinjene američke države

SPE – ekstrakcija na čvrstoj fazi

TRR – ukupni radioaktivni ostaci (eng. *Total Radioactive Residues*)

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. Z. Knežević, N. Bilandžić i M. Sedak, *Vet.stn.* **41** (2010) 303–309.
2. FAO (2005): Glyphosate (158) and metabolites, dostupno na http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Evaluation1/Glyphosate.pdf (pristupljeno 18.1.2021.)
3. EFSA (2015): Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance glyphosate. *EFSA Journal* 13(11), 4302.
4. SANTE, Guidance Document on Analytical Control and Method Validation procedure for Pesticides Residues Analysis in Food and Feed. European Commission. Document No.SANTE/11813/2017, dostupno na https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2017-11813.pdf (pristupljeno 25.3.2020.)
5. SANTE, Guidance Document on Analytical Control and Method Validation procedure for Pesticides Residues Analysis in Food and Feed. European Commission. Document No.SANTE/12682/2019, dostupno na https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2019-12682.pdf (pristupljeno 5.8.2020.)
6. <https://www.eurl-pesticides-datapool.eu/> (pristupljeno 8.8.2020.)
7. D. Topolovec, *Glasnik zaštite bilja* **3** (2008) 61-66.
8. <https://www.agroklub.com/zastitna-sredstva/herbicidi-1> (pristupljeno 8.8.2020.)
9. S. Duke i S.B. Powels, *Pest. Manag. Sci.* **64** (2008) 319-325.
10. K. G. Melo, G. De Nucci, A.Z. Trape, S.R.F. Jacobucci, C.R. Garlipp i P.C.P. Rosa *MOJ Toxicol.* **4** (1) (2018) 39-42.
11. M. Šajina, Glifosat u nama, 7. studeni 2013., <https://nutricionizam.com/glifosat-u-nama> (pristupljeno 2.4.2020.)
12. Charles M. Benbrook, *Environ. Sci. Eur.* **28** (3) (2016) 1-15.
13. Ministarstvo poljoprivrede Republike Hrvatske: Popis registriranih sredstava za zaštitu bilja na dan 5.8.2020. <https://fis.mps.hr/trazilicaszb> (Pristupljeno 5.8.2020.)
14. Z. Ostojić, D. Brzoja i K. Barić, *Glasilo zaštite bilja* **18** (6) (2018) 531-541.
15. G. M. Dill, R. Douglas Sammons, P. C. C. Feng, F. Kohn, K. Kretzmer, A.Mehrsheikh, M. Bleeke, J. L. Honegger, D. Farmer, D. Wright i E. A. Haupfe, Glyphosate: discovery, development, applications and properties,

- https://media.johnwiley.com.au/product_data/excerpt/10/04704103/0470410310.pdf (preuzeto 2.4.2020.)
16. R. Mesnage, C. Benbrook i M. N. Antoniou, *Food Chem. Toxicol.* **128** (2019) 137-145.
 17. I. Travlos, N. Cheimona i D. Bilalis, *Agronomy* **7**(60) (2017) 1-9.
 18. T. C. Mueller, C. L. Main, M. A. Thompson i L. E. Steckel, *Weed Technol.* **20** (2006) 164-171.
 19. EFSA (2017): Peer review of the pesticide risk assessment of the potential endocrine activity of glyphosate. *EFSA Journal* **15** (9), 4979.
 20. M. Krüger, P. Schledorn, W. Schrödl, H.-W. Hoppe, W. Lutz i A. A. Shehata, *J Environ Anal Toxicol* **4** (2) (2014) 1-5.
 21. J. S. Bus, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **73** (2015) 758-764.
 22. Z. Honeycutt i H. Rowlands , Glyphosate testing report: Findings in American mothers' breast milk, urine and water. Neobjavljen izvještaj, dostupno na https://d3n8a8pro7vhmx.cloudfront.net/yesmaam/pages/774/attachments/original/1396803706/Glyphosate_Final_in_the_breast_milk_of_American_women_Draft6_.pdf?1396803706. (pristupljeno 23.1.2019.)
 23. A. Steinborn, L. Alder, B. Michalski, P. Zomer, P. Bending, S. Alesom Martinez, H. G.J. Mol, T. Class i N. Costa-Pinheiro, *J. Agric. Food Chem.* **64** (6) (2016), 1414-1421.
 24. M. Krüger, A. Linder i J. Heimrath, Members of the EU parliament excrete glyphosate with their urines, dostupno na https://www.greens-efa.eu/legacy/fileadmin/dam/Documents/Studies/Environment_health/EUMP-results.pdf (pristupljeno 5.8.2020.)
 25. S. Hosseini Bai i S. M. Ogbourne, *Environ. Sci. Pollut. Res.* **23** (19) (2016) 18988-19001.
 26. A. Conrad, C. Schröter-Kermani, H.-W. Hoppe, M. Rüter, S. Pieper i M. Koloss-Gehring, *Int. J. Hyg. Environ. Health* **220** (2017) 8-16.
 27. A. Samsel i S. Seneff, *Entropy* **15** (2013) 1416-1463.
 28. M. Eriksson, L. Hardell, M. Carlberg i M. Akerman, *Int. J. Cancer.* **123** (2008) 1657–1663.
 29. S. Thongprakaisang , A. Thiantanawat, N. Rangkadilok, T. Suriyo i J. Satayavivad, *Food Chem Toxicol.* **59** (2013) 129-136.
 30. T. M. Tate, J. O. Spurlock i F. A. Christian, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **33** (1997) 286-289.
 31. EFSA (2018): Review of the existing MRLs for glyphosate. *EFSA J.* **16** (5), 5263.
 32. EFSA (2009): Modification of the residues definition of glyphosate in genetically modified maize grain and soybeans, and in products of animal origin. *EFSA J.* **7** (9),1310.
 33. A. L. Eenennaam i A. E. Young, *J. Anim. Sci.* **95** (2017) 3247-3269.
 34. E. V. S. Motta, K. Raymann i N. A. Moran, *PNAS* **115** (2018) 10305-10310.

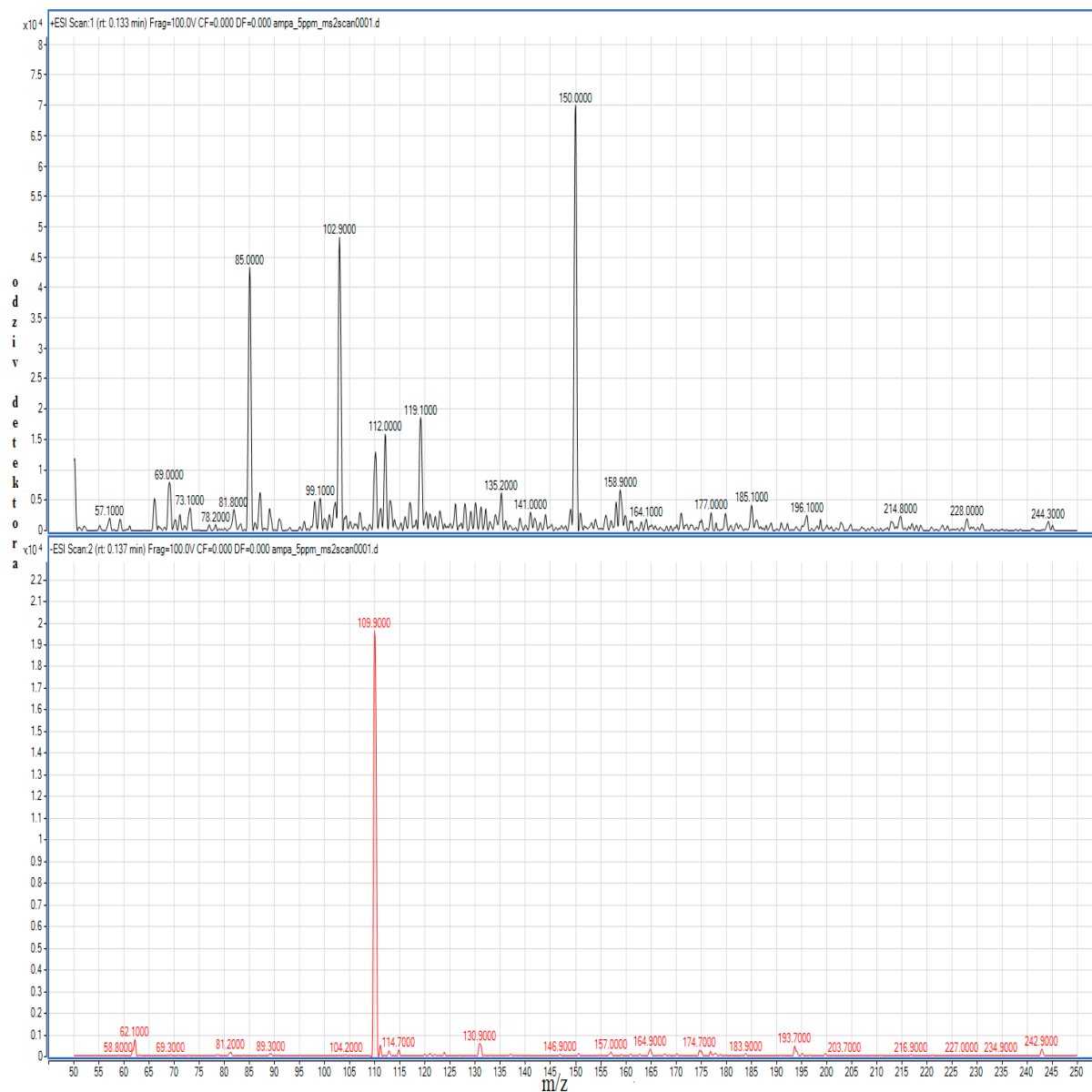
35. K. M. Kasiotis, Z. D. Tzouganaki i K. Machera, *HPPJ* **11** (2018) 40-46.
36. A. Mešić, I. Juran i I. Pajač Živković, *Glasilno biljne zaštite* **18** (5) (2018) 427-433.
37. Regulation (EC) NO 396/2005 of the European Parliament and of the Council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC, (EC) No 396/2005, European Commission, <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2005:070:0001:0016:en:PDF> (pristupljeno 8.8.2020.)
38. PROVEDBENA UREDBA KOMISIJE (EU) 2019/533 od 28. ožujka 2019. o koordiniranom višegodišnjem programu kontrole Unije za 2020., 2021. i 2022. za osiguranje sukladnosti s maksimalnim razinama ostataka pesticida i ocjenu izloženosti potrošača ostacima pesticida u i na hrani biljnog i životinjskog podrijetla. Sl.L. EU L 88, 28-41.
39. Uredba komisije br. 293/2013 od 20. ožujka 2013. o izmjeni priloga II. i III. Uredbi (EZ) br. 396/2005 Europskog parlamenta i Vijeća u pogledu maksimalnih razina ostataka za emamektin benzoat, etofenproks, etoksazol, flutriafol, glifosat, fosmet, piraklostrobin, spinosad i spirotetramat u ili na određenim proizvodima. Sl.L. EU L96/1, 252-281.
40. EFSA (2019): review of the existing maximum residue levels for glyphosate according to Article 12 of Regulation (EC) No 396/2005—revised version to take into account omitted data. *EFSA J.* 17(10) 5862.
41. O. Zoller, P. Rhyh, H. Rupp, J. A. Zarn, C. Geiser, *Food Addit Contam B* **11** (2) (2107) 83-91.
42. S. Ehling i T.M.Reddy, *J. Agric. Food Chem.* **63** (2015) 10562-10568.
43. Y. Liao, J.-M. Berthion, I.Colet, M. Merlo, A. Nougadere i R. Hu, *J. Chromatogr. A* **1549** (2018) 31-38.
44. M. Pelajić, Razvoj multirezidualne metode za određivanje pesticida u vinima vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa, Doktorski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2016., str.27
45. C. D. Stalikas i C. N. Konidari, *J. Chromatogr. A* **907** (201) 1-19.
46. G. Vas, K. Nagy i K. Vékey, u K. Vékey, A. Telekes i A. Vertes(ur.), *Medical Applications of Mass Spectrometry*, Elsevier Science Ltd, Oxford, 2008, str. 37-59.
47. M. Anastassiades, D. Kolberg, A. Benkenstein, S. Zechmann, D. Mack, A. Barth, Chr. Wildgrube, D. Dörk (2016): Quick method for the analysis of residue of numerous highly polar pesticides in food commodities involving simultaneous extraction with methanol and determination via LC-MS/MS (QuPpe-AO-Method), II Food of animal origin, version 2 (http://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlSRM/meth_QuPpe_AO.pdf, pristupljeno 27. 11. 2018.)
48. N. Chamkasem, *J.Agric. Food Chem.* **65** (2017) 7535-7541.

49. H. A. Martins-Júnior, D. T. Lebre, A. Y. Wang, M. A. F. Pires i O. V. Bustillos, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **23** (2009) 1029-1034.
50. A. M. Botero-Coy, M. Ibáñez, J. V. Sancho i F. Hernández, *J. Chromatogr. A* **1313** (2013) 157-165.
51. P. K. Jensen, C. E. Wujcik, M. K. McGuire, M. A. McGuire, *J. Environ. Sci. Health B* **51** (2016) 254-259.
52. H. Guo, H. Wang, J. Zheng, W. Liu, J. Zhong i Q. Zhao, *Forensic Sci. Int.* **283** (2018) 111-117.
53. R. López-Ruiz, R. Romero-González i A. Garrido Frenich, *J. Pharmaceut. Biomed.* **190** (2020) 113492.
54. Y.-C. Tsao, Y. – C. Lai, H. – C. Liu, R. H. Liu i D. – L. Lin, *J. Anal. Toxicol.* **40** (2016) 427-436.
55. M. Chiarello, M. L. Jiménez-Medina, J. Marín Saéz, S. Moura, A. Garrido Frenich i R. Romero-González, *Food Addit. Contam. Part A* **36** (9) (2019) 1376-1384.
56. N.P.Nørskov, S. Krogh Jensen i M. Tang Sørensen, *J. Chromatogr. A* **1605** (2019) 360343.
57. Y. Nagatomi, T. Yoshioka, M. Yanasigawa, A. Uyama i N. Mochizuki, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **77** (11) (2013) 2218-2221.
58. S. Herrera López, J. Scholten, B. Kiedrowska, A. De Kok, *J. Chromatogr. A* **1594** (2019) 93-104.
59. S. Adams, J. Guest, M. Dickinson, R. J. Fussel, J. Beck i F. Schoutsen, *J. Agric. Food Chem.* **65** (34) (2017) 7294-7304.
60. P. Zhang, M. Rose i L. Van Zwiten, *J. AOAC Int.* **102** (3) (2019) 952-965.
61. A. M. Botero-Coy, M. Ibáñez, J. V. Sancho i F. Hernández, *J. Chromatogr. A* **1292** (2013) 132-141.
62. N. Chamkasem, C. Morris, T. Harmon, *J. Regul. Sci.* **02** (2015) 20-26.
63. S. Herrera López, J. Dias i A. De Kok, *Food control* **115** (2020) 1-12.
64. T. S. Thompson, J. P. van den Heever i R. E. Limanowka, *Food Addit. Contam. Part A* **36** (2) (2019) 1-13.
65. N. Chamkasem i J. D. Vargo, *J. Regul. Sci.* **5**(2) (2017) 1-9.
66. M. Anastassiades, S.J. Lehotay, D. Stajnbaher, F.J. Schenck, *J. AOAC Int.* **86** (2003) 412-431.
67. N. Yoshioka, M. Asano, A. Kuse, T. Mitsuhashi, Y. Nagasaki, Y. Ueno, *J. Chromatogr. A* **1218** (2011) 3675-3680.
68. R. Raina-Fulton, *J. AOAC Int.* **97**(4) (2014) 965-977.
69. A. L. Valle, F. C. C. Mello, R. P. Alves-Balvedi, L. P. Rodrigues i L. R. Goulart, *Environ Chem Lett* **17** (2019) 291-317.
70. L. Caretta, A. Cardinali, E. Marotta, G. Zanin, R. Masin, *J. Chromatogr. A* **1600** (2019) 65-72.
71. P. L. Alferness i Y. Iwata, *J. Agric. Food Chem.* **42** (1994) 2751-2759.

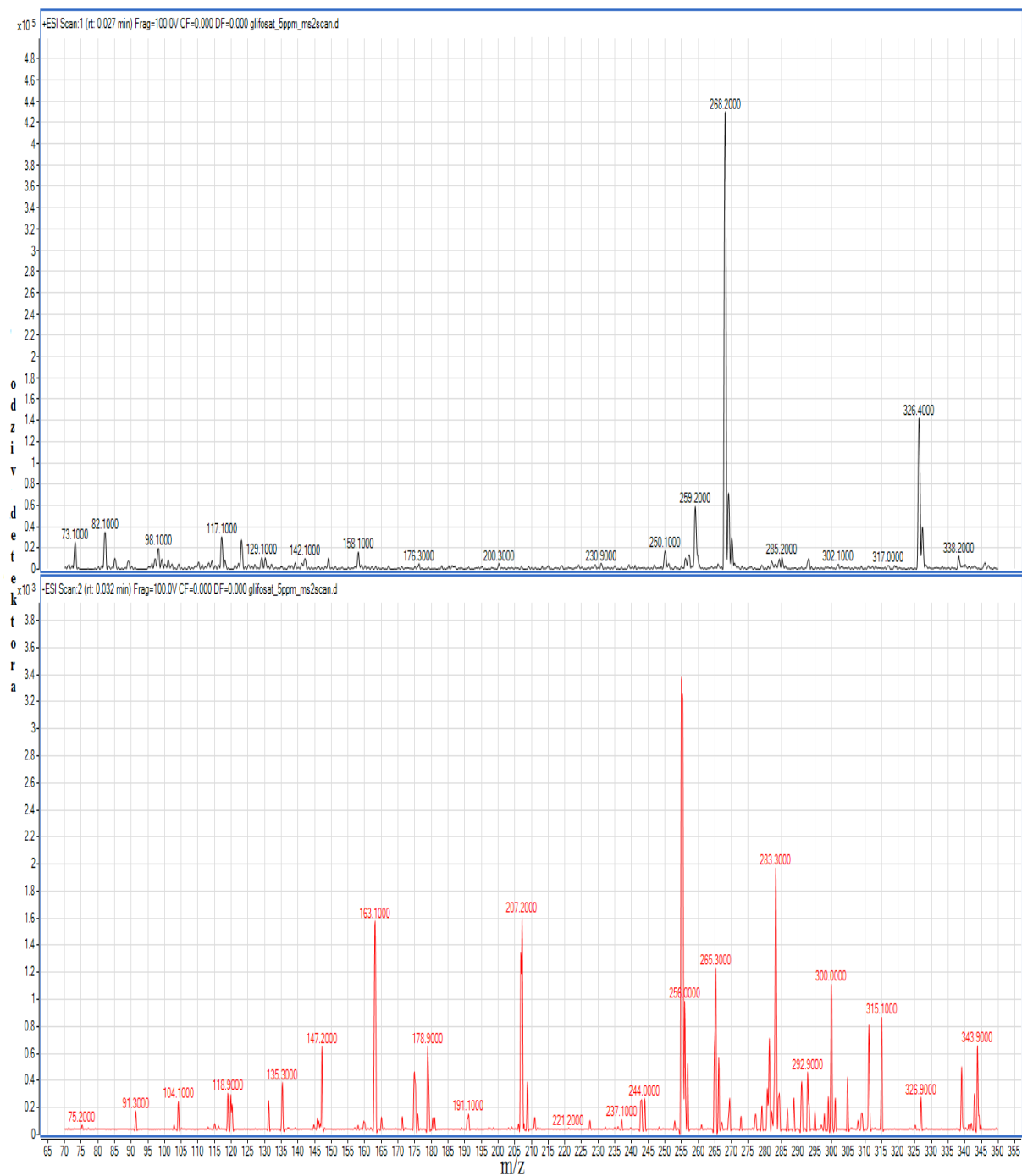
72. L. Goodwin, J. R. Startin, D. M. Goodall i B. J. Keely, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **17** (2003) 963-969.
73. E. N. Goncharova, M. A. Statkus, G. I. Tsizin i R. N. Selimov, *Mosc. Univ. Chem. Bull.* **73** (6) (2018) 265-271.
74. D. R. Baker, M. Levi i E. Capodanno, Highly polar pesticide multi-residue analysis in food safety by LC-MS/MS, dostupno na <http://www.spectroscopynow.com/details/advertorial/14cff8e8444/Highly-polar-pesticide-multi-residue-analysis-in-food-safety-by-LC-MSMS.html> (pristupljeno 18.1.2019.)
75. C. Hao, D. Morse, F. Morra, X. Zhao, P. Young i B. Nunn, *J. Chromatogr. A* **1218** (2011) 5638-5643.
76. N. Chamkasem i T. M. Harmon, *Anal. Bioanal. Chem.* **408** (18) (2016) 4995-5004.
77. J. H. Lee, H. N. Park, H.- J. Park, S. Heo, S. S. Park, S.-K. Park i S. Y. Baek, *Chromatographia* **80** (2017) 1741-1747.
78. T. E. Bapiro, F. M. Richards i D. I. Jodrell, *Anal. Chem.* **88** (2016) 6190-6194.
79. B. Buszewski i S. Noga, *Anal. Bioanal. Chem.* **402** (2012) 231-247.
80. O. Núñez i P. Lucci, Applications and uses of formic acid in liquid chromatography-mass spectrometry analysis, in: *Advances in Chemical Research*, Nova Science Publishers, Hauppauge, 2014, pp. 71-86.
81. M. Tamura, K. Matsumoto, J. Watanabe, J. Lida, Y. Nagatomi i N. Mochizuki, *J. Sep. Sci.* **37** (2014) 1552-1560.
82. F. Rubio, E. Guo i L. Kamp, *J. Environ. Anal. Toxicol.* **5** (2014) 1-8.
83. C. J. Berg, H. P. King, G. Delenstarr, R. Kumar, F. Rubio i T. Glaze, *PLoS ONE* **13** (7) (2018) 1-18.
84. L. Pareja, F. Jesús, H. Heinzen, M. D. Hernando, L. Rajska i A. R. Fernández-Alba, *Anal. Methods* **11** (2019) 2123-2128.
85. F. Martinello, N. Snoj, M. Skitek i A. Jerin, *Biochem. Med.* **30** (2) (2020) 1-9.
86. EFSA(2019): The 2017 European Union report on pesticide residues in food. *EFSA J.* **17** (6), 5743.
87. EFSA(2020), The 2018 European Union report on pesticide residues in food. *EFSA J.* **18** (4), 6057.

§ 8. DODATAK

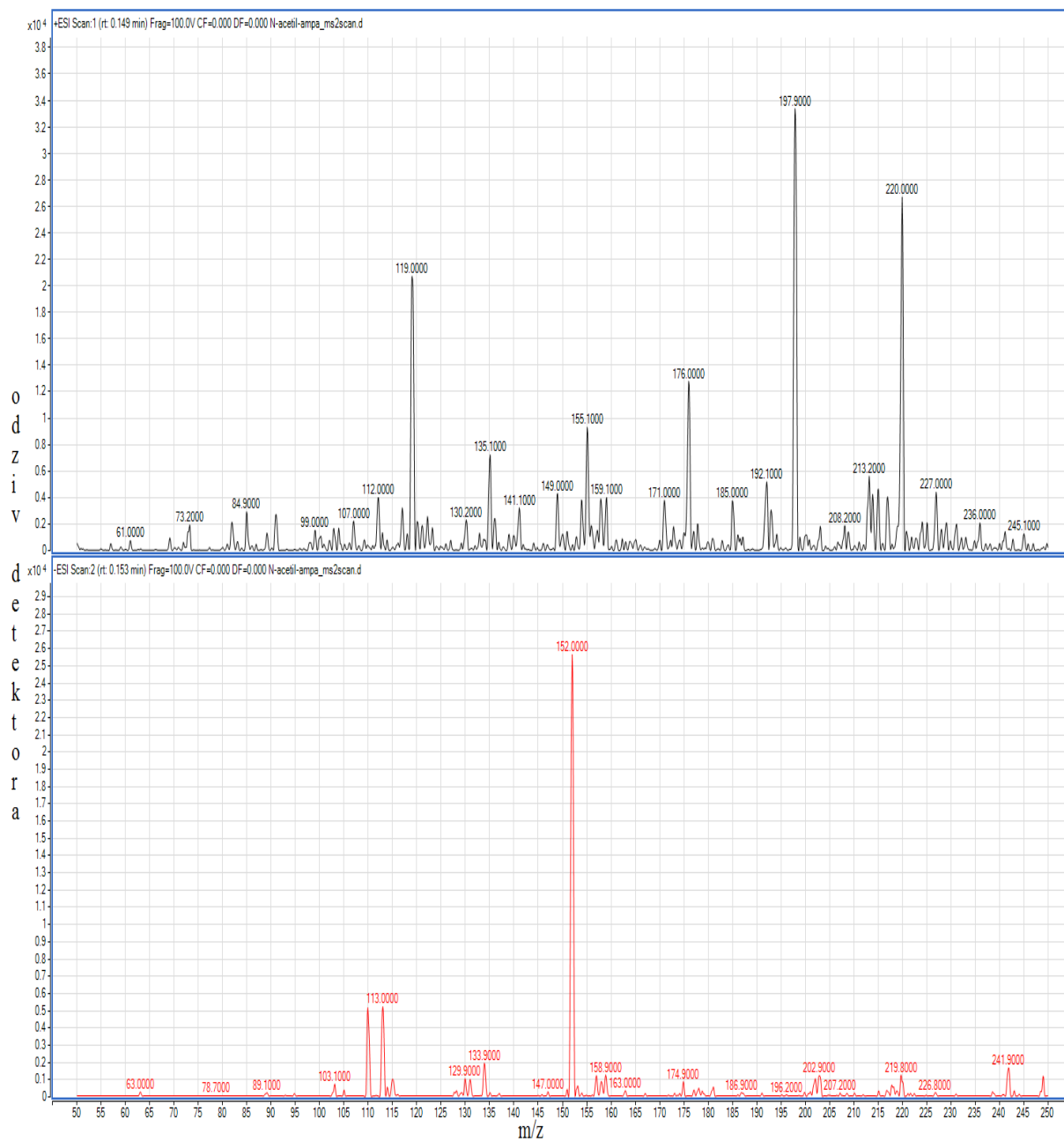
PRILOG I. Spektri masa sa najzastupljenijim masama u pozitivnom (crna boja) i negativnom (crvena boja) načinu snimanja za analite a) AMPA, b) glifosat, c) N-acetil-AMPA i d) N-acetil-glifosat



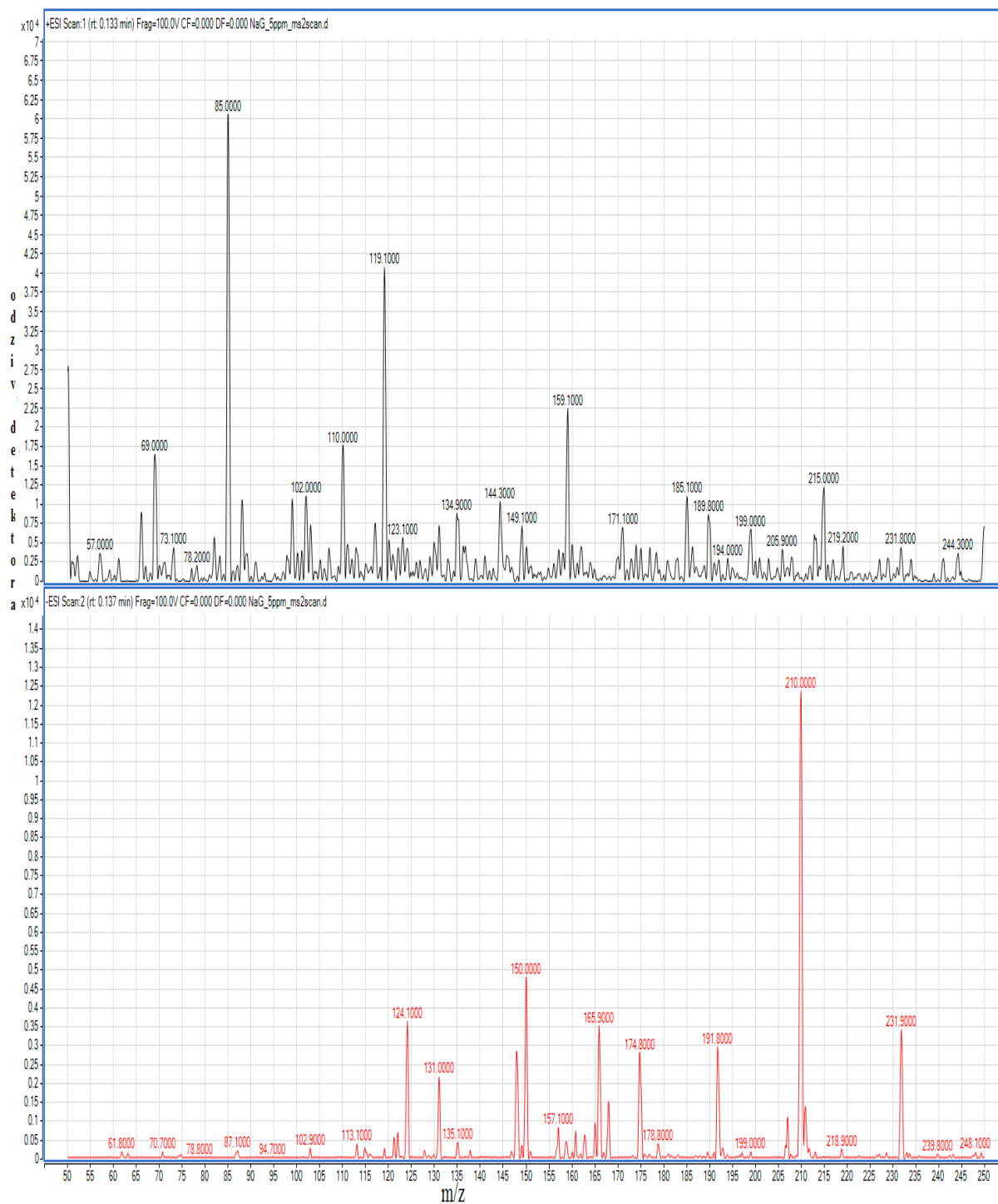
a) AMPA



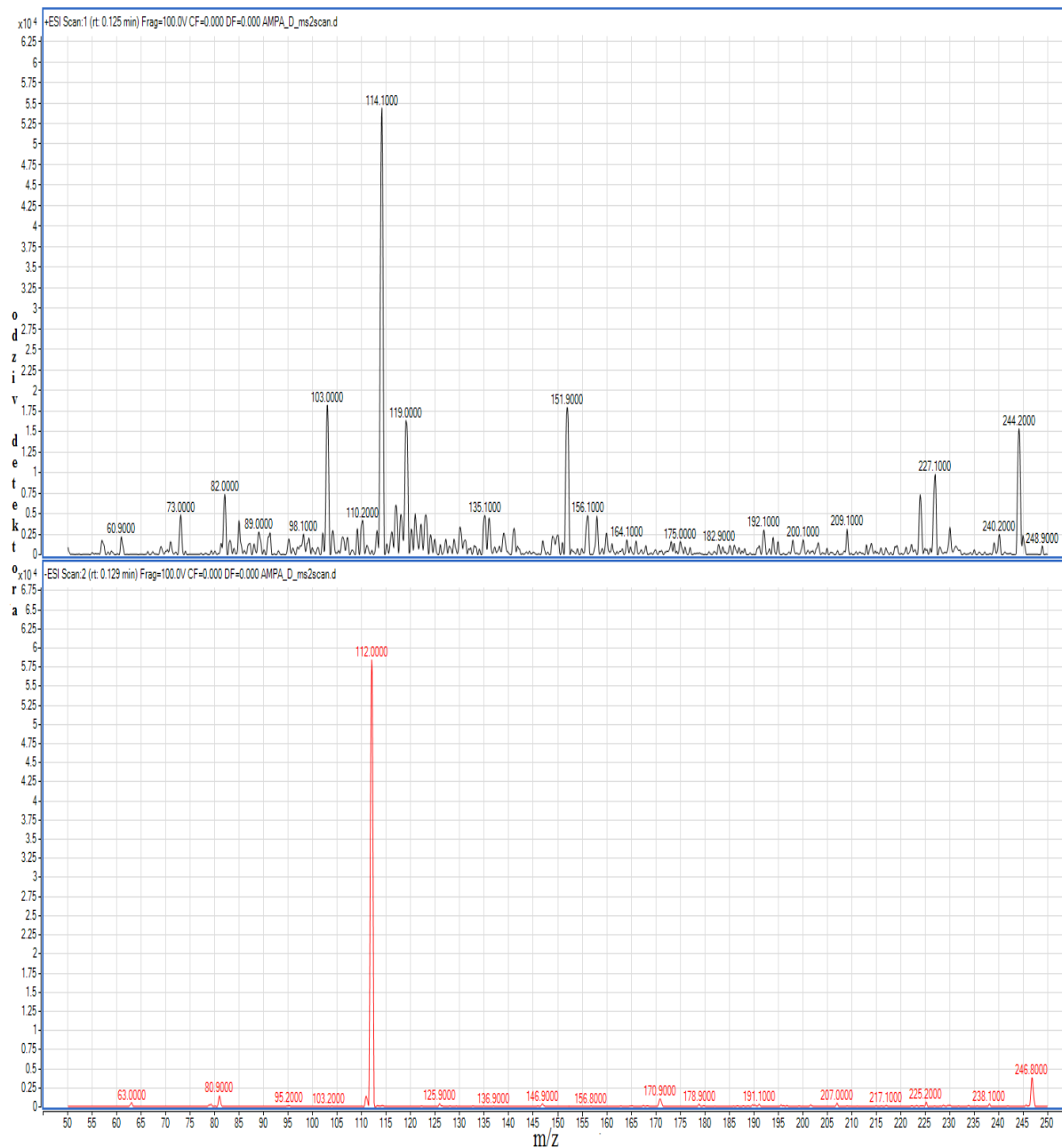
b) Glifosat



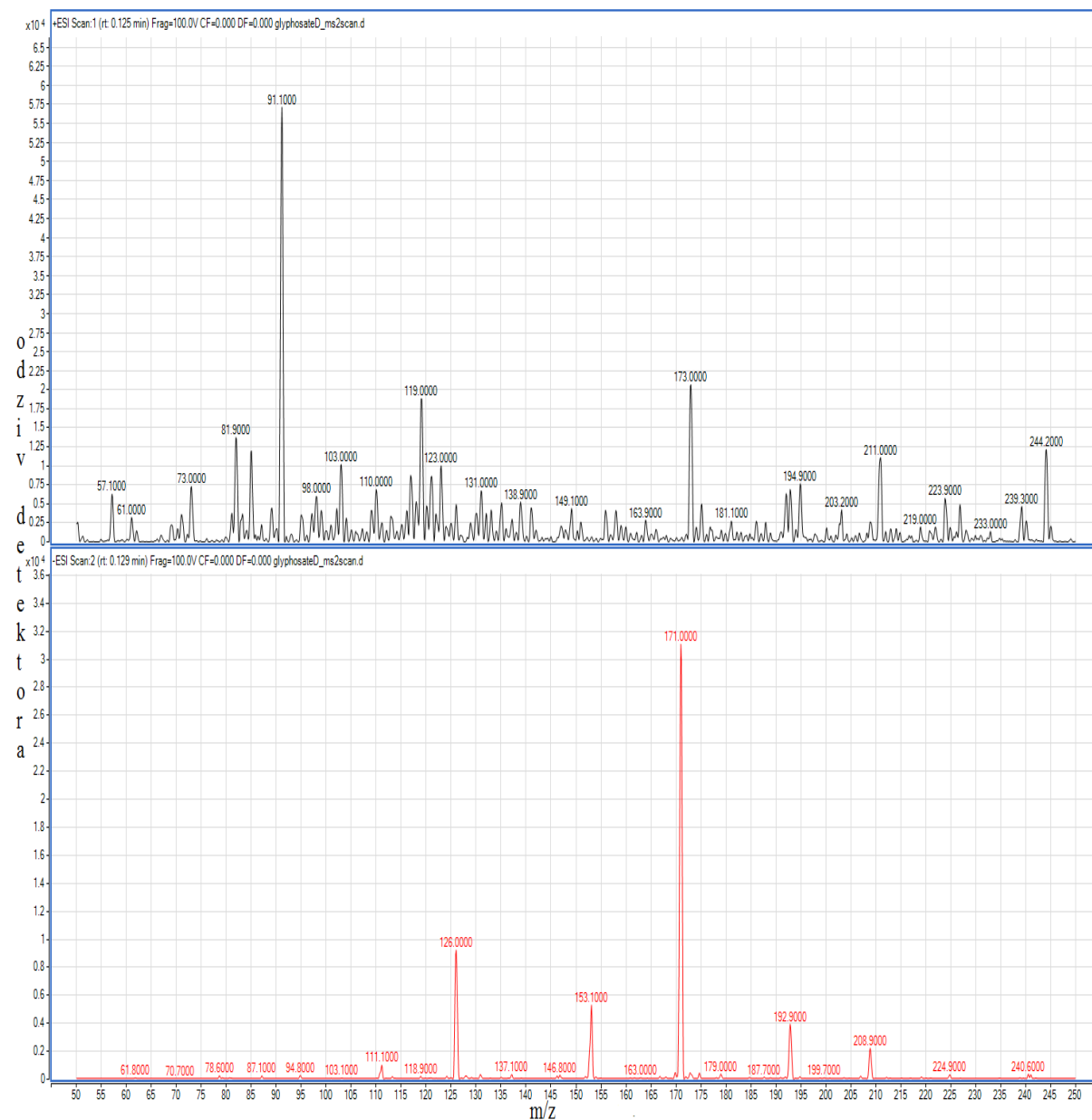
c) N-acetil-AMPA



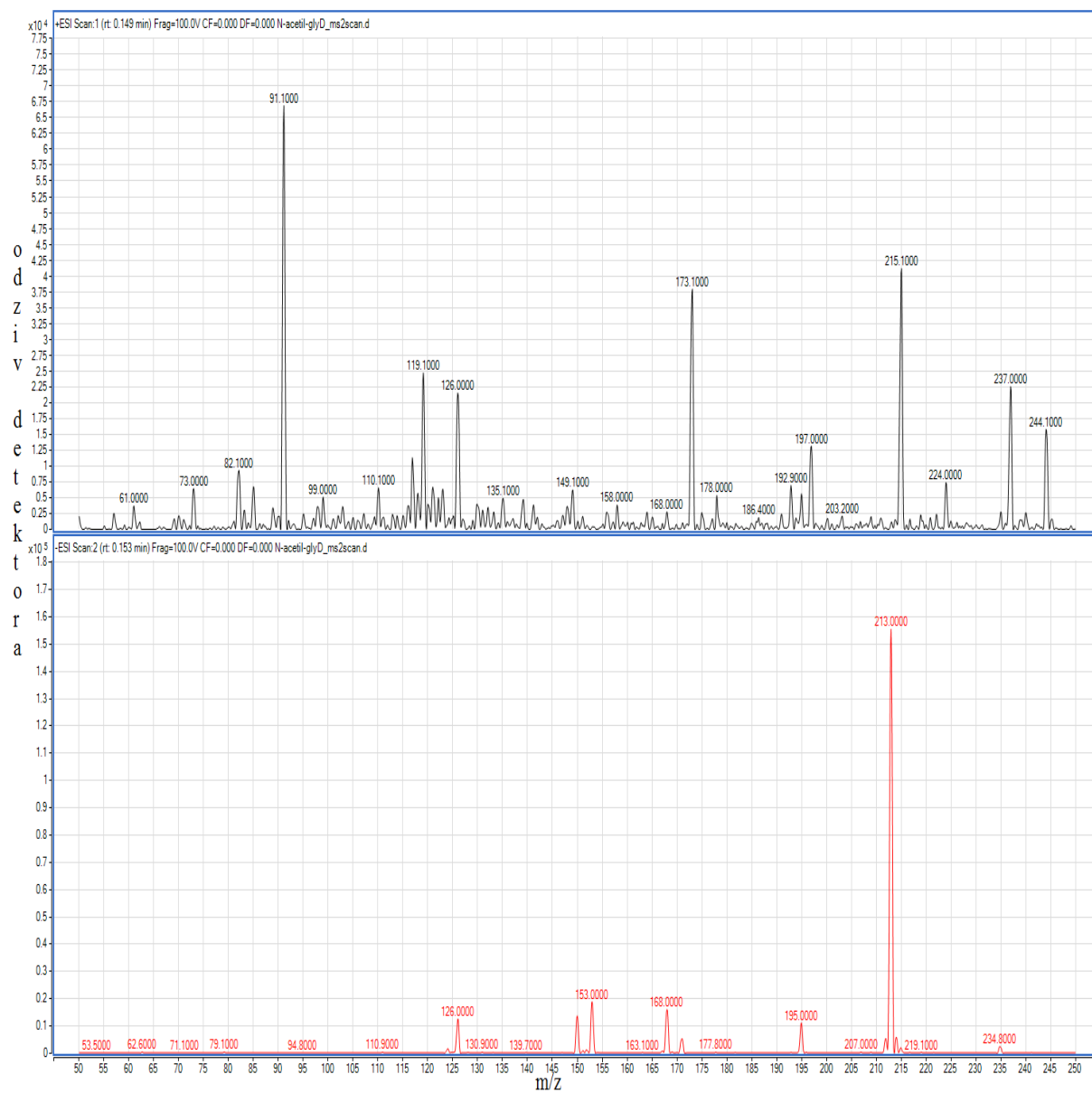
PRILOG II. Spektri masa sa najzastupljenijim masama u pozitivnom (crna boja) i negativnom načinu snimanja (crvena boja) za izotopno obilježene unutarnje standarde a) AMPA- $^{13}\text{C}_2$, ^{15}N , b) glifosat- $^{13}\text{C}_2$, ^{15}N , c) N-acetil-glifosat- D_3



a) AMPA- $^{13}\text{C}_2$, ^{15}N



b) glifosat-¹³C₂, ¹⁵N

c) N-acetil-glifosat-D₃

§ 9. ŽIVOTOPIS

Marija Denžić Lugomer rođena je 15. 12. 1984. godine u Koprivnici. Odrasla je u Križevcima gdje je završila osnovnoškolsko i srednjoškolsko obrazovanje (Gimnazija Ivana Zakmardija Dijankovečkoga, opći smjer). Prirodoslovno - matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisuje 2003.g. Diplomom inženjera kemije stekla je 19. 6. 2008. obranom diplomskog rada pod naslovom „Separacija kompleksa željeza(II) s miješanim ligandima kromatografskim metodama“ izrađenog pod mentorstvom prof. dr. sc. Sande Rončević i neposrednim voditeljstvom dr. sc. Renate Kobetić na Institutu Ruđer Bošković. Od 1. 10. 2008. zaposlena je u Laboratoriju za analitičku kemiju i rezidue Veterinarskog zavoda Križevci, podružnici Hrvatskog veterinarskog instituta, na mjestu stručnog suradnika analitičara. Sveučilišni poslijediplomski doktorski studij Kemije na Prirodoslovno – matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisala je 2011.g.

U okviru zaposlenja radi na područjima analitike vode za ljudsku potrošnju, otpadnih voda, hrane i hrane za životinje, te je 2012. godine imenovana voditeljicom Laboratorija za analitičku kemiju i rezidue.

Tijekom rada usavršavala se u području kemije veterinarskih lijekova i pesticida koji nisu obuhvaćeni multirezidualnim metodama te analitičkih postupaka koji uključuju njihovo određivanje (tekućinske kromatografije te spektrometrije masa). Tijekom 2010. usavršavala se u području određivanja ostataka veterinarskih lijekova iz skupine benzimidazola u hrani životinjskog podrijetla u Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit, Beč, Austrija. Godine 2018. sudjelovala je kao hrvatski delegat na radionici Europskog Referentnog Laboratorija " Workshop-residues of veterinary medicines", Berlin, Njemačka. Tijekom 2019. boravila je na usavršavanju iz područja određivanja pesticida koji nisu obuhvaćeni multirezidualnim metodama u hrani životinjskog podrijetla u EU Reference Laboratory for Single Residue Methods, Fellbach, Njemačka.

Aktivna je u područjima validacije analitičkih metoda i akreditacije laboratorija, te educirana za ustrojstvo laboratorija prema normi HRN EN ISO/IEC 17025 kao interni auditor.

Znanstveno područje interesa su razvoj analitičkih metoda za određivanje ostataka veterinarskih lijekova i pesticida koji nisu obuhvaćeni multirezidualnim metodama,

tekućinska kromatografija i spektrometrija masa, razvoj postupaka ekstrakcije analita iz uzoraka hrane životinjskog podrijetla, validacija i izračun mjerne nesigurnosti.

Koautor je šest znanstvenih radova u časopisima indeksiranim u Thomson Reutersovim bazi podataka Web of Science.

Znanstveni radovi indeksirani u Web of Science:

1. M. Lazarus, B. Tariba Lovaković, T. Orct, A. Sekovanić, N. Bilandžić, M. Đokić, B. Solomun Kolanović, I. Varenina, A. Jurič, **M. Denžić Lugomer**, D. Bubalo. Difference in pesticides, trace metal(loid)s and drug residues between certified organic and conventional honeys from Croatia, *Chemosphere* **226** (2021) 128954.
2. B. Solomun Kolanović, N. Bilandžić, B. Kos, J. Šušković, L. Cvetnić, I. Varenina, Đ. Božić Luburić, I. Varga, D. Pavliček, **M. Denžić Lugomer**, Ž. Cvetnić. Distribution and elimination of levamisole in eggs and tissues after oral administration to laying hens, determined by LC-MS/MS, *Food Addit. Contam. Part A-Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* **36(5)** (2019) 729–739.
3. M. Kiš, S. Furmeg, V. Jaki Tkalec, M. Zadravec, **M. Denžić Lugomer**, A. Končurat, M. Benić, D. Pavliček. Characterisation of Croatian honey by physicochemical and microbiological parameters with mold identification. *J. Food Saf.* **38(5)** (2018) 1–6.
4. B. Solomun Kolanović, N. Bilandžić, I. Varenina, Đ. Božić Luburić, I. Varga, L. Cvetnić, M. Benić, Ž. Cvetnić, **M. Denžić Lugomer**, D. Pavliček, J. Šušković, B. Kos. Estimation of the withdrawal time of levamisole in eggs after oral administration to laying hens, *J. Food Prot.* **81** (2018) 1627–1634.
5. **M. Denžić Lugomer**, D. Pavliček, N. Bilandžić, D. Majnarić. Determination of benzimidazole residues and their metabolites in raw milk using high performance liquid chromatography-diode array detection, *Mljekarstvo* **67(3)** (2017) 231-238.
6. R. Kobetić, **M. Denžić**, B. Zimmermann, S. Rončević, G. Baranović. Preparation and separation of mixed-ligand Fe(II) complexes containing 1, 10 -phenanthroline-5,6-dione as ligand, *J. Coord. Chem.* **65** (2012) 3433-3448.

Znanstveni radovi u drugim časopisima:

7. **M. Denžić Lugomer**, D. Pavliček, M. Kiš, V. Jaki Tkalec, S. Furmeg, J. Sokolović, D. Majnarić. Water quality on farms in the northwest Croatia. *Vet. stanica* **50** (2) (2019) 115–124.
8. **M. Denžić Lugomer**, D. Pavliček, M. Kiš, A. Končurat, D. Majnarić, Darko. Quality assessment of different types of Croatian honey between 2012 and 2016. *Vet. stanica* **48** (2) (2017) 93–99.
9. **M. Denžić Lugomer**, V. Jaki Tkalec, M. Kiš, D. Pavliček, S. Furmeg, J. Sokolović. Water quality on cattle farms in the northwest Croatia. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition*. **12** (3-4) (2017) 126130.

Ostali znanstveni radovi:

10. M. Kiš, S. Furmeg, V. Jaki Tkalec, **M. Denžić Lugomer**, D. Pavliček, D. Majnarić, J. Sokolović. Kvaliteta vode za napajanje peradi na farmama sjeverozapadne Hrvatske, XII. Simpozij Peradarski dani 2017. Knjiga sažetaka, Zagreb, Hrvatska, knjiga sažetaka 116–121.

Priopćenja na znanstvenim skupovima:

1. D. Pavliček, **M. Denžić Lugomer**, M. Kiš. Determination of benzimidazole and levamisole residues in animal liver using liquid chromatography-tandem mass spectrometry, 1. Kongres o sigurnosti i kvaliteti hrane, Opatija, 2017, Arhiv za higijenu rada i toksikologiju, str. 52.
2. **M. Denžić Lugomer**, D. Pavliček, M. Kiš, N. Bilandžić. Određivanje ostataka benzimidazolnih lijekova u mlijeku, 42. Hrvatski simpozij mljekarskih stručnjaka, Lovran, 2016, Knjiga sažetaka, str. 59–60.
3. **M. Denžić Lugomer**, V. Jaki Tkalec, M. Kiš, D. Pavliček, J. Sokolović, D. Majnarić. Analiza pitke vode na sabiralištima mlijeka u Bjelovarsko-bilogorskoj županiji u 2016. godini, XX. Znanstveno-stručni Skup Voda i javna vodoopskrba, Murter, 2016, Knjiga sažetaka str. 230–231.

-
4. M. Kiš, **M. Denžić Lugomer**, D. Pavliček, A. Končurat. Procjena kakvoće meda sjeverne Hrvatske, 10. Međunarodni znanstveno-stručni skup Hranom do zdravlja, Osijek, 2017, knjiga sažetaka str.104.