

UNIVERZITET U BEOGRADU
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET

Nikolina N. Antić

**RAZVOJ I PRIMENA HPLC-MS/MS
METODE ZA ODREĐIVANJE TRAGOVA
PESTICIDA U UZORCIMA VODE**

doktorska disertacija

Beograd, 2018

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Nikolina N. Antić

**DEVELOPMENT AND APPLICATION OF
HPLC-MS/MS METHOD FOR
DETERMINATION OF PESTICIDE
TRACES IN WATER SAMPLES**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018

*Mentor: Dr Tatjana Đurkić, redovni profesor
Tehnološko-metalurškog fakulteta
Univerziteta u Beogradu*

*Članovi komisije: Dr Mila Laušević, redovni profesor u penziji
Tehnološko-metalurškog fakulteta
Univerziteta u Beogradu*

*Dr Svetlana Grujić, vanredni profesor
Tehnološko-metalurškog fakulteta
Univerziteta u Beogradu*

*Dr Milan Dimkić, redovni profesor
Fakultet tehničkih nauka
Univerziteta u Novom Sadu*

Datum odbrane:

Zahvaljujem svom mentoru, prof. dr Tatjani Đurkić, za podršku koju mi je pružila u toku mentorstva, na prenešenom znanju i podstreku da ga dalje nadograđujem. Zahvalna sam i na pomoći u eksperimentalnom radu, diskusijama rezultata i svim fazama izrade ove doktorske disertacije.

Veliku zahvalnost dugujem prof. dr Mili Laušević za ukazano poverenje što me je uvela u svoju laboratoriju i naučni rad uopšte, kao i za svo prenešeno znanje i svoje dugogodišnje iskustvo.

Posebnu zahvalnost dugujem prof. dr Svetlani Grujić za nesebično pruženu pomoć tokom izrade ove disertacije. Zahvaljujem joj se na idejama u vezi samog istraživanja i pomoći u sagledavanju rezultata ove doktorske disertacije.

Zahvaljujem se prof. dr Milanu Dimkiću za izuzetno podršku u realizaciji istraživačkog rada ove doktorske disertacije.

Zahvaljujem se svojim dragim kolegicama dr Marini Radišić, dr Tanji Radović i Zorici Jauković na pruženoj pomoći u eksperimentalnom radu, na zanimljivim naučnim ali i „nenaučnim“ diskusijama i podeli i lepih i teških trenutaka tokom laboratorijskog rada i našeg druženja.

Posebno se zahvaljujem svojoj porodici, na ljubavi, podršci i na razumevanju na putu ka ostvarenju ovog cilja.

Najlepše hvala mom suprugu kome je od srca posvećena ova doktorska disertacija.

Nikolina Antić

RAZVOJ I PRIMENA HPLC-MS/MS METODE ZA ODREĐIVANJE TRAGOVA PESTICIDA U UZORCIMA VODE

Rezime

Predmet ovog rada je razvoj, optimizacija, validacija i primena nove, brze i osetljive multirezidualne analitičke metode za određivanje tragova odabranih pesticida, koji pripadaju hemijski različitim grupama, u površinskim, podzemnim i otpadnim vodama. Pri odabiru pesticida prvenstveno je uzeto u obzir koji se najviše koriste u poljoprivrednoj praksi u Srbiji. Prvo je razvijena osetljiva analitička metoda za određivanje odabranih pesticida pomoću tačne hromatografije u sprezi sa tandem masenom spektrometrijom. Posebna pažnja je posvećena optimizaciji metode za pouzdanu maseno-spektrometrijsku detekciju tragova pesticida i razvoju metode potvrde prisustva analita. Zatim je razvijena i optimizovana metoda ekstrakcije na čvrstoj fazi za efikasnu pripremu uzoraka površinskih i podzemnih voda, koja obuhvata istovremenu ekstrakciju i prečišćavanje ekstrakta. Nakon razvoja i validacije metode za pripremu i analizu odabranih pesticida u površinskim i podzemnim vodama, ista je validirana i za uzorke komunalne otpadne vode. Pri validaciji metode određivani su sledeći parametri: prinos, ponovljivost, linearnost, granica detekcije i granica kvantifikacije za sve ispitivane pesticide u svim ispitivanim matricama. Dobre vrednosti prinosa (70%–120%) uz relativnu standardnu devijaciju $\pm 20\%$ i niske granice detekcije i kvantifikacije postignute su za većinu odabranih pesticida. Potom je razvijena, optimizovana i validirana metoda primenjena na realne uzorke površinskih, podzemnih i otpadnih voda u cilju dobijanja studije o stanju zagađenosti vode najčešće korišćenim pesticidima u našoj zemlji. Istraživanjem je obuhvaćen ceo sliv Dunava u Srbiji sa najvećim pritokama, kao i bunari podzemne vode koji se nalaze u neposrednoj blizini Dunava i pritoka. Uzorci vode prikupljeni su u dvanaest kampanja uzorkovanja. Mesta uzorkovanja površinske vode uključivala su poljoprivredna, šumska i gradska područja. Takođe su analizirani i uzorci komunalne otpadne vode Beograda, kao najvećeg grada u našoj zemlji koji bez prethodne obrade otpadne vode direktno ispušta u Dunav i Savu, kao i otpadna voda na ulazu i izlazu iz dva postrojenja za prečišćavanje otpadnih voda. Na osnovu rezultata se može videti uticaj poljoprivrede, i urbane sredine, kao najvećih i najčešćih izvora zagađenja površinskih i podzemnih voda pesticidima.

Ključne reči: pesticidi, multirezidualna analiza, ekstrakcija na čvrstoj fazi, tačna hromatografija, masena spektrometrija, jonski trap, površinske vode, podzemne vode, otpadne vode

Naučna oblast: Inženjerstvo zaštite životne sredine

DEVELOPMENT AND APPLICATION OF HPLC-MS/MS METHOD FOR DETERMINATION OF PESTICIDE TRACES IN WATER SAMPLES

Abstract

The subject of this thesis is the development, optimization, validation and application of a new, fast and sensitive multiresidual analytical method for determination of selected pesticides, belonging to chemically different groups, in surface and ground water, as well as wastewater. The selection of pesticides was based on their usage in agricultural practice in Serbia. Firstly, sensitive analytical method for the determination of selected pesticides based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry was developed. Also, optimization of the method for reliable confirmation of pesticides at trace levels was done. Then, solid-phase extraction method was developed and optimized for efficient preparation of surface and groundwater samples which involves simultaneous extraction and extract purification. Developed and validated method for the sample preparation and analysis of selected pesticides in surface and ground water was validated for municipal wastewater samples. The method was validated for accuracy, reproducibility, linearity, limits of detection and quantification for all investigated pesticides in all tested matrices. Good recoveries (70%–120%) with relative standard deviation $\pm 20\%$ and low detection and quantification limits have been achieved for the majority of selected pesticides. The developed, optimized and validated method was finally applied to real samples of surface and ground water, as well as wastewater, in order to obtain a study of water contamination with most frequently used pesticides in our country. The study covered the entire Danube basin in Serbia with the largest tributaries, as well as wells of groundwater located near the Danube and tributaries. Water samples were collected in twelve sampling campaigns. Surface water sampling sites included agricultural, forest and urban areas. Municipal wastewater from Belgrade, as the largest city in our country that directly discharges wastewater into the Danube and the Sava without any treatment, was also analyzed, as well as the wastewater at the inlet and the outlet from two wastewater treatment plants. Based on the results, the influence of agriculture and urban environments as the largest and most common sources of pesticide pollution in surface and ground water was determined.

Key words: pesticides, multiresidue analysis, solid-phase extraction, liquid chromatography, mass spectrometry, ion trap, surface water, groundwater, wastewater

Scientific field: Environmental Protection Engineering

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DEO	3
2.1. Pesticidi – osnovni pojmovi i podela	3
2.2. Izvori i koncentracije tragova pesticida u prirodnim vodotokovima	5
2.3. Zakonska regulativa	11
2.4. Pesticidi odabrani za analizu	13
2.5. Analitičke metode za određivanje tragova pesticida u uzorcima površinske, podzemne i otpadne vode	17
2.5.1. Priprema uzoraka pri određivanju tragova pesticida u uzorcima vode	18
2.5.1.1. Metoda ekstrakcije na čvrstoj fazi	19
2.5.2. Instrumentalne metode analize	24
2.5.2.1. Tečna hromatografija visoke performanse	24
2.5.2.2. Masena spektrometrija	26
3. EKSPERIMENTALNI DEO	34
3.1. Odabrani pesticidi i priprema korišćenih rastvora	34
3.2. Snimanje masenih spektara pesticida	34
3.3. Optimizacija hromatografskog razdvajanja pesticida	35
3.4. Optimizacija HPLC-MS/MS parametara	36
3.5. Optimizacija ekstrakcije tragova pesticida na čvrstoj fazi	37
3.5.1. Izbor odgovarajućeg sorbenta i rastvora za eluiranje	37
3.5.2. Izbor optimalne pH-vrednosti uzorka	40
3.5.3. Izbor optimalne zapremine uzorka	40
3.5.4. Validacija metode	40
3.6. Kalibracija	41
3.7. Oblast uzorkovanja i uzimanja uzoraka površinske i podzemne vode	42
3.8. Uzorkovanje otpadnih voda	46
3.8.1. Uzorci komunalne otpadne vode Beograda	46
3.8.2. Uzorci iz postrojenja za prečišćavanje otpadnih voda	47

4. REZULTATI I DISKUSIJA	48
4.1. Analiza pesticida u uzorcima površinskih i podzemnih voda	48
4.1.1. Maseni spektri pesticida	48
4.1.2. Optimizacija hromatografskog razdvajanja	54
4.1.3. Potvrda prisustva analita	54
4.1.4. Optimizacija metode pripreme uzorka	56
4.1.4.1. Izbor odgovarajućeg sorbenta i rastvarača za eluiranje.....	57
4.1.4.2. Izbor optimalne pH-vrednosti uzorka.....	59
4.1.4.3. Izbor optimalne zapremine uzorka	60
4.1.5. Validacija metode	63
4.1.6. Procena uticaja matrice uzorka	66
4.1.7. Analiza realnih uzoraka površinske i podzemne vode	68
4.2. Analiza pesticida u uzorcima otpadnih voda	74
4.2.1. Validacija metode	74
4.2.2. Procena uticaja matrice uzorka	78
4.2.3. Analiza realnih uzoraka komunalne otpadne vode Beograda i otpadne vode iz postrojenja za prečišćavanje otpadnih voda.....	79
5. ZAKLJUČAK	81
LITERATURA	84
PRILOG	100
BIOGRAFIJA AUTORA	113
OBJAVLJENI NAUČNI RADOVI IZ DOKTORSKE DISERTACIJE	114
Izjava o autorstvu	116
Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada	118
Izjava o korišćenju	119

1. UVOD

Pesticidi su hemijske supstance koje su široku primenu našle u poljoprivredi, voćarstvu, šumarstvu, kao i u komunalnoj higijeni. To su hemikalije koje se koriste za zaštitu bilja u bilo kom vidu. Ova jedinjenja dospevaju u vodu spiranjem sa površine zemljišta i biljaka, direktnim putem prilikom aerotretmana, pri nepravilnoj tehnologiji prskanja i zaprašivanja, itd. Dospevši u vodu, pesticidi neko vreme ostaju uglavnom nepromenjeni, ali se vremenom transformišu fizičkim, hemijskim i biološkim procesima. Migracija pesticida u vodi zavisi od ispuštene količine i brzine njihove transformacije. Tragovi pesticida u prirodnim vodotokovima, kao i u podzemnim vodama, već dugi niz godina predstavljaju problem od velikog značaja, s obzirom na to da je veliki broj pesticida, kao i proizvoda njihovog raspada, toksičan, kancerogen, mutagen i dugo vremena ostaje u prirodi.

Zakonski propisi Evropske unije (EU), kao i propisi Republike Srbije koji su delimično u skladu sa propisima EU u oblasti površinskih i podzemnih voda, veoma su rigorozni po pitanju maksimalno dozvoljenih koncentracija pojedinih pesticida, te je stoga neophodno praćenje i poznavanje stanja u ovoj oblasti.

Iako je razvijen veliki broj analitičkih metoda za ekstrakciju i analizu pesticida iz vode, multirezidualna analiza, kao i pouzdana identifikacija i kvantifikacija tragova pesticida i dalje predstavlja veliki analitički izazov. Sve stroži zakonski propisi u ovoj oblasti, kao i uvođenje novih vrsta pesticida na tržište, zahtevaju konstantno unapređivanje analitičkih metoda. Određivanje pesticida u realnim uzorcima je komplikovan zadatak zbog njihove polarnosti, termičke nestabilnosti i niskih koncentracija, najčešće reda veličine ng dm^{-3} . U našoj zemlji standardna kontrola kvaliteta vodotokova ograničena je na praćenje organohlorinih i triazinskih pesticida. Ostale grupe pesticida koje se koriste nisu uključene u monitoring i podaci o njihovoj zastupljenosti u životnoj sredini su veoma oskudni.

Cilj ovog rada je razvoj i primena nove, brze i osetljive multirezidualne analitičke metode za određivanje tragova odabranih pesticida u površinskim, podzemnim i otpadnim vodama pomoću tačne hromatografije u sprezi sa tandem masenom spektrometrijom. Poseban deo ovog rada jeste i monitoring površinskih, podzemnih i otpadnih voda u cilju dobijanja studije o stanju zagađenosti vode pesticidima u našoj zemlji. Mesta uzorkovanja su odabrana tako da

rezultati ispitivanja sagledavaju uticaj poljoprivrednih aktivnosti, kao i komunalnih otpadnih voda na zagađenje površinskih voda pesticidima, stepen infiltracije pesticida iz površinskih voda kroz obale u vode reči bunara i efikasnost sistema za prečišćavanje otpadnih voda u pogledu uklanjanja pesticida.

2. TEORIJSKI DEO

2.1. Pesticidi – osnovni pojmovi i podela

Pesticidi su jedinjenja koja se koriste u poljoprivredi, šumarstvu i urbanim sredinama da bi se sprečili ili ograničili štetni efekti bioloških agenasa, kao što su insekti, glodari, prouzrokovajući biljnih bolesti, nepoželjne biljne vrste (korovi) i dr. [1]. To su proizvodi hemijskog ili biološkog porekla i predstavljaju veoma heterogenu i brojnu grupu jedinjenja. Mogu se proučavati sa stanovišta fizičkih, hemijskih, toksikoloških, ekotoksikoloških osobina, kao i sa stanovišta farmakologije, farmakogenetike, farmakopofilakse, farmakoterapije i farmakografije pesticida. Nauka koja ima zadatak da pesticide sagleda sa svih navedenih aspekata naziva se fitofarmacija.

Pesticidi se mogu podeliti na razne načine. U literaturi se susreću podele pesticida prema nameni, tj. prema grupi živih organizama koje suzbijaju, prema načinu i karakteru delovanja, prema toksičnosti, kancerogenosti, mutagenosti, perzistentnosti, pripadnosti hemijskoj grupi jedinjenja, sistemčnosti i mehanizmu delovanja [2].

Osnovna podela pesticida izvršena je prema nameni tj. prema vrsti štetnih organizama koje kontrolišu i suzbijaju [2]:

- herbicidi – jedinjenja za uništavanje korova i drugih biljaka
- algicidi – sredstva za suzbijanje algi
- insekticidi – sredstva za suzbijanje insekata
- akaricidi – sredstva za suzbijanje grinja
- nematocidi – sredstva za suzbijanje nematoda
- muluskocidi – sredstva za suzbijanje puževa
- rodenticidi – sredstva za suzbijanje glodara
- avicidi – sredstva za suzbijanje ptica
- fungicidi – jedinjenja za suzbijanje i prevenciju pojave fitopatogenih gljiva
- baktericidi – jedinjenja za suzbijanje fitopatogenih bakterija
- virucidi – sredstva za suzbijanje virusa

Podela pesticida prema načinu delovanja je sledeća [2]:

- repelenti i atraktanti – repelenti su sredstva za odbijanje insekata, grinja, ptica i glodara, a atraktanti su sredstva za primamljivanje insekata, grinja, ptica i glodara, kako bi se oni koncentrisano skupljali i tako uspešno suzbijali
- hemosterilizanti – sredstva za izazivanje sterilnosti muških ili ženskih individua štetnih organizama, kako bi se smanjila njihova populacija
- fumiganti – sredstva koja ispuštaju gasovite supstance koje uništavaju štetočine
- fiziotropi – jedinjenja koja usporavaju ili modifikuju pojedine fiziološke procese kod biljaka
- defolijanti – sredstva koja izazivaju opadanje lišća kod biljaka
- desikanti – sredstva koja izazivaju sušenje živih tkiva
- regulatori rasta – sredstva koja menjaju očekivani period rasta, cvetanja ili reprodukcije biljaka
- sinergisti – sredstva koja pojačavaju dejstvo drugih pesticida

Prema hemijskim osobinama pesticidi se dele na: neorganske supstance (jedinjenja S, As, Cu itd.), prirodne organske supstance koje potiču iz biljaka, bakterija i gljiva, i organske sintetičke supstance kojima pripadaju triazini, organofosfati, karbamati, benzimidazoli, neonikotinoidi, benzohidrazidi, feniluree i dr.

Pesticidi su u suštini otrovne supstance koje unete u organizam čoveka mogu, pod izvesnim okolnostima, izazvati bolest ili smrt. Upravo zbog toga se proučavanju toksikoloških osobina pridaje veliki značaj i ulažu se ogromna sredstva. Polaznu tačku toksikoloških ispitivanja pesticida predstavljaju eksperimenti sa životinjama. Ovi eksperimenti su neophodni za procenu opasnosti koje se mogu očekivati prilikom upotrebe pesticida, jer nas prvenstveno interesuju toksični efekti na čoveka [2, 3].

Postoje određeni parametri koji se odnose na unos pesticida u organizam, kao i na sadržaj pesticida u hrani. Dozvoljena dnevna doza – DDD (engl. acceptable daily intake – ADI) izražava se u mg/kg telesne mase čoveka u danu, a predstavlja količinu ostataka pesticida koja pri dugotrajnom unošenju u organizam ne predstavlja opasnost za zdravlje čoveka. DDD je vrednost određena na osnovu istraživanja na životinjama uzimajući u obzir tzv. „faktor sigurnosti” prema kojem se rezultati dobijeni na životinjama umanjuju za 50 do 500 puta. Maksimalno dozvoljena koncentracija (MDK) pesticida i njihovih ostataka (engl. maximum

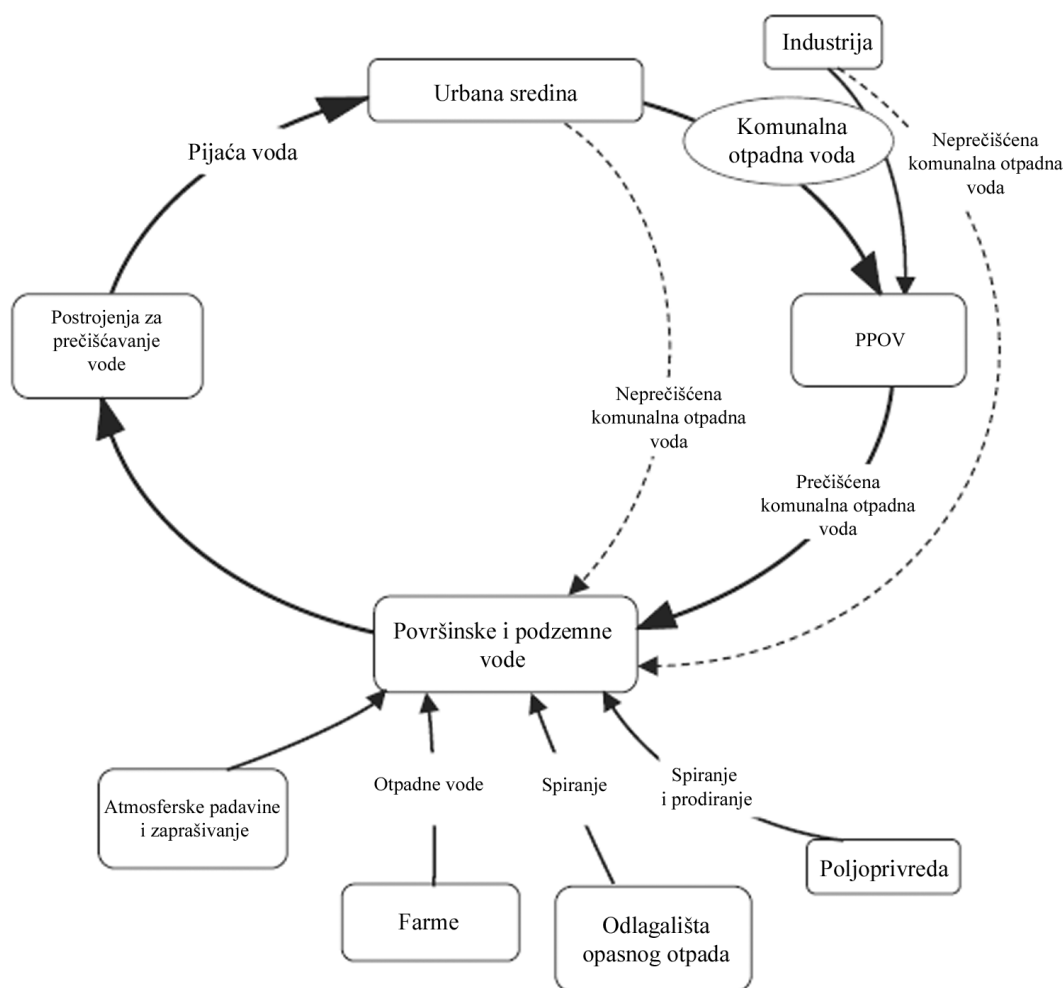
residue level – MRL) je kvantitativna veličina koja određuje maksimalno dozvoljeni maseni udeo pesticida i njihovih ostataka u poljoprivrednim proizvodima u trenutku njihove berbe ili žetve. MDK vrednost zavisi od toksičnosti pesticida, dakle od vrednosti prihvatljivog dnevnog unosa, kao i od procenjene izloženosti, odnosno ostvarenog dnevnog unosa. Vrednost MDK se izražava u mg/kg, tj. masenim udelom pesticida i njihovih ostataka u jednom kilogramu svežeg poljoprivrednog proizvoda. DDD i MDK vrednosti usklađuju međunarodne organizacije [3].

2.2. Izvori i koncentracije tragova pesticida u prirodnim vodotokovima

Stalan rast čovečanstva i tehnološki razvoj imaju za posledicu i povećanje potreba za vodom, a time i porast zagađenja. Pitanje dostupnosti i kvaliteta vode postaje jedan od najvažnijih problema savremenog čoveka. Do zagađenja vode u prirodi dolazi pojavom mnogih tačkastih i rasutih izvora kao što su: otpadne vode naselja i industrije, deponije otpadnih materija, pesticidi, mineralna đubriva iz poljoprivrede itd. Zagađujuće materije u vodu dospevaju direktnim i indirektnim putem. Tačkasti oblici zagađenja podrazumevaju formiranje posebnih otpadnih voda u koje čovek ubacuje štetne materije i koje direktno izliva u rečne tokove [4, 5].

Poljoprivreda predstavlja jedan od značajnih korisnika vodnog resursa, u zavisnosti od specifičnih faktora kao što su područje, klima ili vrsta zemljišta, ali je i jedan od osnovnih rasutih izvora zagađenja voda. Osim direktnog uticaja na količinu raspoloživog vodnog resursa potrošnjom u svrhu navodnjavanja, poljoprivreda znatno utiče i na kvalitet površinskih i podzemnih voda. Pesticidi predstavljaju veoma značajnu komponentu moderne poljoprivredne industrije. Pokušaj da se gubici pri uzgoju poljoprivrednih kultura svedu na što manju meru doveli su do razvoja širokog spektra jedinjenja koja se danas upotrebljavaju kao pesticidi [5]. Oko 70%–80% od ukupne količine proizvedenih pesticida primenjuje se u poljoprivredi. Na slici 1 predstavljeno je kako pesticidi dospevaju u površinsku i podzemnu vodu. Jedan od načina dospevanja je spiranje tretiranog poljoprivrednog zemljišta. Bez obzira da li u zemljište dospevaju direktnom primenom ili na indirektnan način, dalja sudbina pesticida će zavisiti od međusobnog dejstva niza složenih fizičko-hemijskih procesa. Ovi procesi se mogu grupisati u tri celine: adsorpcija (vezivanje pesticida za mineralnu i organsku

materiju zemljišta), degradacija (hemijska, fotohemijska i mikrobiološka) i transport (kretanje pesticida u životnoj sredini – isparavanje, spiranje i usvajanje biljkama). Tako će se oni pesticidi koji se slabije vežu za zemljište lakše infiltrirati vodom u niže slojeve i ujedno predstavljati veću opasnost za kontaminaciju podzemnih i površinskih voda [1, 6].



Slika 1. Izvori pesticida u površinskoj i podzemnoj vodi [7]

Iako značajnije količine pesticida koje dospevaju u vodotokove potiču iz poljoprivrede, ne možemo zanemariti ni one koje dolaze iz urbane sredine (slika 1) [7–10]. U urbanim sredinama pesticidi se koriste u domaćinstvu za suzbijanje štetočina, prilikom distribucije hrane, u baštama, parkovima i na golf terenima, te dospevaju u septičke jame, komunalne vode, a zatim i u prirodne vodotokove [11]. Komunalne otpadne vode se svakodnevno ispuštaju u prirodne vodotokove i imaju negativne efekte kako na zdravlje ljudi, tako i na

životnu sredinu. Njihovim ispuštanjem dolazi do smanjenja kvaliteta vodenih resursa u meri u kojoj prirodni mehanizam prečišćavanja ne može nadoknaditi posledice zagađenja kojem su svakodnevno izloženi. U Srbiji se danas prerađuje samo 5%–10% otpadnih voda. Ni Beograd, kao grad sa više od dva miliona stanovnika, nema postrojenje za prečišćavanje otpadnih voda, te se sve otpadne vode glavnog grada ulivaju u Dunav i Savu. U Srbiji samo 20% gradova ima postrojenja za prečišćavanje komunalnih otpadnih voda, tako da ih nemaju ni drugi veliki urbani centri, poput Novog Sada i Niša, zbog čega se danas nalazimo pri dnu lestvice evropskih zemalja u pogledu komunalne opremljenosti. Neprečišćene komunalne i industrijske otpadne vode predstavljaju ključne izvore zagađivanja površinskih i podzemnih voda u Republici Srbiji [12]. Nepoznavanje kvantiteta i kvaliteta otpadnih voda, uticaja na recipijente, kao i veoma nizak stepen prečišćavanja urbanih otpadnih voda u celoj Srbiji, predstavlja ozbiljan problem u oblasti zaštite životne sredine naše zemlje. Navedeni problemi, kao i harmonizacija propisa sa Evropskom unijom, naglašavaju potrebu za praćenjem zagađenja životne sredine komunalnim otpadnim vodama pre svega da bi se utvrdio njihov sastav pre nego što budu ispuštene u prirodne vodotokove.

Oko 85% od ukupne količine pesticida koji se koriste u urbanoj sredini čine herbicidi koji na kraju svog ciklusa dospevaju u komunalnu vodu [13–15]. Tako da i komunalna voda predstavlja jedan od značajnijih tačkastih izvora zagađenja površinskih voda i čini 20%–90% od ukupnog zagađenja pesticidima u različitim slivovima, i to posebno u sušnom periodu [16–21].

Neadekvatno odlaganje ambalaže od pesticida, korišćenje neispravne opreme, slučajno ili namerno prosipanje ovih supstanci takođe može dovesti da zagađenja vodotokova. Na ovaj način, direktno ili preko otpadne vode, oko 20% pesticida dospe u površinske vode [19, 20, 22].

Najčešće detektovani pesticidi u površinskim i podzemnim vodama su herbicidi [14]. Učestalost i koncentracije se menjaju sezonski. Nakon prolećne aplikacije češće su detektovani i u većim koncentracijama, dok su koncentracije u jesen i zimu znatno smanjene [23, 24]. Iz tabele 1 vidi se da su triazinski herbicidi, inače široko primenjivani, najčešće i u najvećim koncentracijama detektovani u površinskim vodama. Atrazin je prema Evropskoj direktivi iz 2001. godine na listi prioriternih supstanci koje ugrožavaju životinjski i biljni svet, kao i zdravlje ljudi [25]. U zemljama Evropske unije isključen je iz prometa i upotrebe

od 2004. godine, a u Srbiji od 2007, pa se njegovo prisustvo u vodotokovima pripisuje visokoj mobilnosti usled visoke rastvorljivosti u vodi i slabog afiniteta ka akumulaciji u sedimentima. Herbicidi feniluree, poput diurona, monurona i linurona, koji se dosta koriste u poljoprivrednoj praksi bez obzira na njihovu toksičnost, moguću kancerogenost i dugo vreme zadržavanja u životnoj sredini, su takođe često detektovani u površinskoj vodi [26]. Što se tiče podzemne vode, situacija je ista, pesticidi koji se najviše koriste su i najčešće detektovani (atrazin, simazin i diuron).

Tabela 1. Koncentracije detektovanih pesticida u površinskoj i podzemnoj vodi u svetu

Pesticidi	Koncentracija (ng dm⁻³)	Matrica	Literatura
Bentazon	30510	Površinska voda (Španija)	[27]
MCPA	1877		
Simazin	45		
Atrazin	314		
Propanil	969		
2,4-D	24		
Metalohlor	27		
Diuron	15		
MCPA	150	Površinska voda (Australija)	[28]
Atrazin, Acetohlor	200–1000	Površinska voda (Mađarska)	[29]
Prometrin, Terbutrin, Diazinon	100–400		
Atrazin	126	Površinska voda (Španija)	[30]
Simazin	31		
Diuron	24		
Terbutilazin	49		
Bentazon	93	Površinska voda (Francuska)	[31]
Diuron	33		
Izoproturon	379		
Izoproturon	4	Površinska voda (Nemačka)	[32]
Diuron	9		
Hlortoluron	1		
Simazin	12		
Atrazin	5		
Terbutilazin	1		
Prometrin	4		
Atrazin	31	Podzemna voda (Španija)	[33]
Simazin	37		
Diuron	9		
DDT	150–190	Podzemna voda (Indija)	[34]
α-Endosulfan	1340–2140		
β-Endosulfan	210–870		
Lindan	680–1380		
Atrazin	380	Podzemna voda (SAD)	[35]
Metalohlor	3200		

Tabela 1. (nastavak)

Pesticidi	Koncentracija (ng dm⁻³)	Matrica	Literatura
Atrazin	253	Podzemna voda (Evropa)	[36]
Simazin	127		
Terbutilazin	716		
Bentazon	11		
Propazin	25		
Diuron	279		
Endosulfan	1–12	Podzemna voda (Maroko)	[37]
Atrazin	1–40	Podzemna voda (SAD)	[38]
Metalahlor	1–100		
Alahlor	1–1000		
Hloroturon	160–1550	Površinska i podzemna voda	[39]
Atrazin	180–1500	(Španija)	
Simazin	520	Površinska i podzemna voda	[40]
Karbendazim	370	(Španija)	
Diuron	370		
Bromacil	570		
Atrazin	30–280	Površinska i podzemna voda	[41]
Simazin	10–140	(Španija)	
Atrazin	56–73	Površinska i podzemna voda	[42]
Terbutilazin	27–132	(Portugal)	
Diuron	56		
Karbendazim	2273	Površinska i podzemna voda	[43]
Simazin	918	(Španija)	
Diuron	1233		
Heksahlorocikloheksan (HCH)	60–390	Površinska i podzemna voda	[44]
Endosulfan	80–780	(Indija)	
Hlorpirifos	110–440		
Dihlorovos	80–200		
Paration-metil	20–420		
Atrazin	434	Površinska voda (Argentina)	[45]
α -Cipermetrin	122		
Endosulfan	107		
Irgarol	250	Površinska voda (Brazil)	[46]
Ciprokonazol	60		
Terbutilazin	6,4	Površinska voda (Španija)	[47]
Prometrin	9,2		
Metazahlor	6,4		
Metolahlor	1,4		
Atrazin	198	Podzemna voda (Srbija)	[48]
Deetilatriazin (DEA)	116		
Deizopropilatriazin (DIA)	43		
Deetildeizopropilatriazin (DEIA)	77		

Iz tabele 1 može se zaključiti da su koncentracije pesticida atrazina, simazina, diurona i izoproturona u površinskim vodama bile ispod, a u slučaju endosulfana i heksahlorocikloheksana znatno iznad, maksimalno dozvoljenih vrednosti koje su propisane u Evropskoj uniji za površinske vode [49]. U podzemnim vodama koncentracije pesticida su se kretale znatno iznad 0,1 $\mu\text{g dm}^{-3}$ dozvoljenih za pojedinačne pesticide u Evropskoj uniji u nekoliko studija. Karbendazim iz grupe benzimidazola, fungicid koji se koristi za suzbijanje

uzročnika bolesti koštičavog voća, suncokreta, šećerne repe i pšenice, pronađen je u nekoliko površinskih i podzemnih voda [40, 43]. Bentazon, pesticid koji se u Evropi koristi za suzbijanje korova u usevima pirinča takođe je prijavljen u nekoliko studija [27, 31, 36]. Najčešće detektovani pesticidi (atrazin, simazin i diuron) i povremeno detektovani (izoproturon i endosulfan) uključeni su u listu prioriternih supstanci u oblasti voda [25].

Što se tiče komunalnih otpadnih voda i efluenta iz postrojenja za prečišćavanje otpadnih voda, postoji veliki broj studija koje se bave ovom temom. Rezultati studije iz Nemačke [50], u kojoj je analizirano 45 pesticida u recipijentu pre i posle postrojenja za prečišćavanje otpadnih voda, pokazuju da se značajno povećao broj pesticida, kao i koncentracije, u recipijentu nakon postrojenja za prečišćavanje. Primećene su znatno veće koncentracije pesticida u junu u odnosu na sve ostale mesece uzorkovanja. Najčešće detektovani pesticidi bili su acetamiprid, imidaklopid, tiaklopid, karbendazim i izoproturon. Koncentracije za izoproturon premašivale su maksimalno dozvoljenu koncentraciju za površinske vode od $1,0 \mu\text{g dm}^{-3}$ [49]. U Seulu, u Južnoj Koreji, ispitivana je efikasnost postrojenja za prečišćavanje otpadnih voda od mikropolutanata, među kojima su i pesticidi. Od pesticida detektovan je 2,4-D u otpadnoj vodi na ulazu i izlazu iz postrojenja u koncentracijama od 2 do 482 ng dm^{-3} , pri čemu je efikasnost uklanjanja za ovaj pesticid iznosila čak 80% [51]. Ispitivani su i pesticidi u komunalnoj otpadnoj vodi u Španiji. Najčešće detektovani bili su, između ostalih, karbendazim (oko 170 ng dm^{-3}), acetamiprid (oko 400 ng dm^{-3}), imidaklopid (oko 300 ng dm^{-3}) i diuron (oko 100 ng dm^{-3}) [52]. S obzirom na to da se efluenti iz postrojenja za prečišćavanje otpadnih voda smatraju jednim od važnih izvora pesticida u površinskim vodama, studija u Irskoj bavi se upravo analizom uzoraka iz postrojenja. Najviše koncentracije detektovanih pesticida bile su za simazin (510 ng dm^{-3}), prometon (140 ng dm^{-3}), diuron (210 ng dm^{-3}) i atrazin (190 ng dm^{-3}) [53].

Kontaminacija površinske i podzemne vode pesticidima iz urbane sredine se ne može zanemariti. Studija rađena u Španiji pokazuje pojavu ovih zagađujućih materija u veoma visokim koncentracijama u sirovoj otpadnoj vodi (do 684 ng dm^{-3} za diazinon) i njihovu perzistentnost nakon prečišćavanja u postrojenjima sa konvencionalnim, sekundarnim (pa čak i tercijskim) tretmanom otpadnih voda. Najzastupljeniji pesticidi bili su diazinon i diuron, prisutni u više od 80% uzoraka, a zatim izoproturon i malation [54].

Ispitivana otpadna voda pre i posle postrojenja za prečišćavanje u Španiji i Italiji pokazuje da je i ovde slična situacija kao i sa prethodno pomenutim studijama i da su pesticidi pronađeni

u skoro svim uzorcima. Najčešće su detektovani sledeći pesticidi: karbendazim, karbaril, imidakloprid, diazinon, terbutrin i tiabendazol [55]. U Švajcarskoj je analizirana otpadna voda pre i nakon postrojenja za prečišćavanje, sa primarnom, sekundarnom i tercijskom obradom otpadne vode. Najčešće detektovani pesticidi i u ovom istraživanju bili su: diazinon (1130 ng dm⁻³ u primarnom efluentu, ali ne i u tercijskom), karbendazim (110 ng dm⁻³ u primarnom efluentu i 60 ng dm⁻³ u tercijskom efluentu), diuron (60 ng dm⁻³ u primarnom efluentu i 40 ng dm⁻³ u tercijskom efluentu), izoproturon (90 ng dm⁻³ u primarnom efluentu i 30 ng dm⁻³ u tercijskom efluentu) i terbutrin (70 ng dm⁻³ u primarnom efluentu i 20 ng dm⁻³ u tercijskom efluentu). Efikasnost uklanjanja pesticida nakon tretmana otpadnih voda kretala se od 36% do 72% [56]. Istraživanje koje se odnosi na komunalne i industrijske otpadne vode, sa i bez tretmana za prečišćavanje, u regionu zapadnog Balkana (Bosna i Hercegovina, Hrvatska i Srbija), takođe obuhvata i prisustvo pesticida. Atrazin, simazin, terbutilazin i terbutrin detektovani su u komunalnoj otpadnoj vodi u koncentracijama do 250 ng dm⁻³. Posebno visoka koncentracija atrazina (28 mg dm⁻³) je primećena samo u otpadnoj vodi grada Siska (Hrvatska), verovatno zbog toga što tome doprinosi industrijski otpad iz proizvodnje herbicida na toj lokaciji. Istraživanje je sprovedeno 2004. i 2005. godine u vreme kada atrazin i simazin nisu bili zabranjeni na ovom području [57].

2.3. Zakonska regulativa

Primenu pesticida često prati rizik od neželjenih posledica po životnu sredinu, jer sve veći broj podataka govori da se tragovi pesticida mogu naći svuda gde živimo i radimo; u vazduhu koji dišemo, u vodi koju pijemo, u hrani koju jedemo. Oni mogu kontaminirati površinske i podzemne vode; mogu ispoljiti štetne efekte na gajenim biljkama, korisnim organizmima u zemljištu, korisnim artropodama, sitnim sisarima i pticama; mogu se naći kao ostaci u hrani i mogu prouzrokovati pojavu rezistentnosti bioloških agenasa [58, 59]. Pošto su pesticidi više ili manje toksične supstance postoji prirodna zabrinutost za njihovo prisustvo u životnoj sredini i delovanje na zdravlje ljudi i kvalitet okoline.

U periodu 1962–1975. godine u svetu su se vodile velike debate o pesticidima i njihovim mogućim štetnim efektima, koje su bile preteča kasnijeg povećanog interesa za životnu sredinu. Od tog vremena do danas uspostavljeni su novi kriterijumi i normativi u cilju

svođenja na minimum količine pesticida u hrani i vodi za piće i stvaranja uslova da pesticidi budu što bezbedniji za ljude, i da se zagađenje životne sredine (zemlje, vode, vazduha) svede na najmanju moguću meru. Zbog toga današnje sinteze pesticida idu za tim da daju jedinjenja koja će biti više polarna, termonestabilna i manje isparljiva sa specifičnim načinom delovanja, izraženom selektivnošću, dovoljnom dužinom zadržavanja na objektu i povoljnim ekotoksikološkim karakteristikama. Sa ovim promenama i analitičke tehnike za detekciju pesticida u uzorcima iz životne sredine su se menjale i prilagođavale [60–62].

Spisak pesticida koji se upotrebljavaju kako u poljoprivredi, tako i u urbanim sredinama, je veoma dugačak, ali su samo neki od njih regulisani u površinskim i podzemnim vodama Evropske unije. Okvirna direktiva o vodama (engl. *Water Framework Directive – WFD*) predstavlja osnovni dokument na području zaštite voda, te svi ostali normativi proizilaze iz ove direktive [63]. Glavni cilj ove direktive je uspostavljanje okvira za zaštitu površinskih i podzemnih voda raznim merama, među kojima su i mera za postepeno smanjenje ispuštanja opasnih supstanci sa prioritetne liste. Kao dodatak WFD, uspostavljena je prioritetna lista u kojoj su navedene 33 opasne supstance koje predstavljaju značajan rizik za vodenu sredinu, čija emisija mora da se kontroliše i zbog kojih je potrebno sprovoditi mere za smanjenje i/ili potpuno zaustavljanje ispuštanja u vodenu sredinu [25]. Trećinu ove liste čine pesticidi. Direktivom iz 2008. godine uspostavljeni su standardi kvaliteta životne sredine na polju WFD i maksimalno dozvoljene koncentracije opasnih supstanci sa prioritetne liste u površinskim i ostalim vodama [49]. Evropska komisija je u avgustu 2013. usvojila novu direktivu na području kontrole i identifikacije opasnih supstanci koja dopunjuje WFD i direktivu iz 2008. godine [64]. Novom direktivom lista je revidirana i dodato je još 12 novih opasnih supstanci na prioritetnu listu. Takođe je formirana i tzv. „watch lista”, tj. popis od najviše 10 opasnih supstanci ili grupa supstanci (povećavajući se za jednu u svakom ažuriranju do maksimalno 14) koje prethodno nisu bile uključene u monitoring, niti su bile predmet dosadašnje prioritetne liste, tako da o njihovoj pojavi u vodenoj sredini nema puno podataka. Svaka supstanca je izabrana na osnovu procene izloženosti, opasnosti i rizika, kao i nedostatka podataka o praćenju u EU. Ova lista je formirana radi poboljšanja informacija za identifikaciju budućih prioritetnih supstanci. Za uključivanje na prvu „watch listu” 2015. godine izabrano je i 7 pesticida, pri čemu su dva (imidakloprid i acetamiprid) analizirana u uzorcima vode i u ovom radu [65]. Direktivom EU koja se bavi zaštitom podzemnih voda od zagađenja postavljene su maksimalno dozvoljene koncentracije od $0,1 \mu\text{g dm}^{-3}$ za

pojedinačne pesticide i $0,5 \mu\text{g dm}^{-3}$ za ukupne pesticide (uključujući aktivne supstance i njihove relevantne metabolite i proizvode degradacije) u podzemnim vodama [66].

U Republici Srbiji Zakonom o vodama uređuje se stanje površinskih i podzemnih voda i ovaj dokument predstavlja osnovni zakon u ovoj oblasti [67]. Iz ovog zakona proizilazi niz uredbi i pravilnika koji bliže određuju i zabranjuju ispuštanje opasnih supstanci ili prioriternih hazardnih supstanci, kako u površinske, tako i u podzemne vode. Pored Zakona o vodama, doneto je i nekoliko uredbi kojima je regulisana zaštita voda, od kojih je za zagađivače voda najznačajnija Uredba o graničnim vrednostima emisije zagađujućih materija u vode i rokovi za njihovo dostizanje [68]. Ova uredba se odnosi na emisiju određenih grupa ili kategorija zagađujućih supstanci u tehnološkim otpadnim vodama pre njihovog ispuštanja u kanalizaciju, tehnološkim i drugim otpadnim vodama koje se neposredno ispuštaju u recipijent, vodama koje se posle prečišćavanja ispuštaju iz sistema javne kanalizacije u recipijent i otpadnim vodama koje se iz septičkih i sabirnih jama ispuštaju u recipijent, odnosno na regulisanje ispuštanje komunalnih i industrijskih otpadnih voda u prijemnike. Rok za dostizanje definisanih vrednosti je 31. decembar 2030. godine, dok nova postrojenja moraju odmah zadovoljiti pomenute vrednosti emisije. Takođe su donete još dve uredbi i jedan pravilnik kojima je regulisana zaštita voda, a to su: Uredba o graničnim vrednostima prioriternih i prioriternih hazardnih supstanci koje zagađuju površinske vode i rokovima za njihovo dostizanje [69]; Uredba o graničnim vrednostima zagađujućih materija u površinskim i podzemnim vodama i sedimentima i rok za njihovo dostizanje [70], kao i Pravilnik o parametrima ekološkog i hemijskog statusa površinskih voda i parametrima hemijskog i kvantitativnog statusa podzemnih voda [71]. Zakon o vodama, kao i ostali podzakonski akti u ovoj oblasti, proizašli su iz WFD, ali su još uvek samo delimično u skladu sa ovom i drugim direktivama EU. U našoj zemlji takođe su uspostavljene maksimalno dozvoljene koncentracije kako za individualne, tako i za ukupne pesticide u podzemnim vodama, i iste su kao u EU [70].

2.4. Pesticidi odabrani za analizu

Određivanje pesticida u prirodnim uzorcima je veoma značajno, s obzirom na to da je veliki broj pesticida, kao i proizvoda njihovog raspada, toksičan, kancerogen, mutagen i dugo

vremena ostaju u prirodi. Pri odabiru pesticida prvenstveno je uzeto u obzir koji se najviše koriste u poljoprivrednoj praksi u Srbiji. Takođe je razmatrano kojoj hemijskoj grupi jedinjenja pripadaju odabrani pesticidi. Cilj je bio da se razvije multirezidualna metoda za određivanje pesticida koji pripadaju hemijski različitim grupama. Odabrani pesticidi prikazani su u tabeli 2.

Karbamati predstavljaju grupu kontaktnih insekticida koji se uglavnom koriste za suzbijanje krompirove zlatice. Svoju aktivnost ispoljavaju na nervnom sistemu, prouzrokujući ireverzibilnu blokadu postsinaptičkih nikotinergičnih acetilholin receptora. Osnovno toksično delovanje jeste inhibicija enzima acetilholinesteraze, usled čega dolazi do nagomilavanja acetilholina. Acetilholinesteraza se nalazi u nervnim tkivima, žlezdama i eritrocitima. Acetilholin je hemijski medijator nervnog sistema i neophodan je za transmisiju nervnih impulsa [2, 3]. Karbamati se vrlo brzo izlučuju iz organizma, tako da je rizik po toplokrvne životinje mali. Vrlo brzo se razlažu u životnoj sredini tako da perzistentnost nije problem. Na osnovu EU regulative i regulative Republike Srbije, karbaril je zabranjen za upotrebu, a karbofuran se nalazi na Listi aktivnih supstanci, odnosno osnovnih supstanci za koje postoji odluka o neodobravanju na nivou EU, a koje su u prometu u Republici Srbiji [72, 73, 74]. Po klasifikaciji IARC (engl. International Agency for Research on Cancer – IARC), karbaril se nalazi u grupi koju čine supstance koje nisu klasifikovane [75, 76]. Karbofuran je svrstan u grupu visoko toksičnih supstanci po WHO (engl. World Health Organization – WHO) klasifikaciji [75].

Monokrotofos, dimetoat i malation odabrani su kao predstavnici organofosfata. Ovo je grupa pesticida koja uz sistemsko imaju izraženo i kontaktno dejstvo pa se koristi za suzbijanje insekata koji sisaju (lisne vaši, buvač, tripus, kupusna stenica, grinje, gusenice i dr.). Malation se smatra veoma toksičnim po živi svet u vodi, sa dugotrajnim posledicama, štetan je za ptice i kišne gliste, i kao i dimetoat veoma je toksičan za pčele i druge korisne artropode [77]. Na žive organizme deluju tako što pogađaju njihov nervni sistem. Organofosforni pesticidi reaguju nepovratno sa enzimom acetilholinesteraze, koji je odgovoran za neaktiviranje acetilholina, sa dejstvom na središnji i periferni nervni sistem [2, 3]. Vreme raspada organofosfata, kao i pesticida iz grupe karbamata, u životnoj sredini je znatno kraće od organohlorinih pesticida. Na osnovu WHO klasifikacije, monokrotofos je svrstan u grupu visoko toksičnih pesticida, dimetoat u grupu srednje toksičnih, a malation u grupu slabo

toksičnih pesticida, dok se u IARC klasifikaciji nalazi samo malation, i to u grupi verovatno kancerogenih supstanci po ljude [75, 76]. Na osnovu EU regulative i regulative Republike Srbije od ispitivanih pesticida iz ove grupe samo je monokrotofos zabranjen za upotrebu [73, 74].

Tabela 2. Pregled ispitivanih pesticida

Pesticid	Hemijska grupa	Dejstvo	WHO ^[75] toksičnost	IARC ^[76] kancerogenost	Rastvorljivost u vodi ^[73] (mg dm ⁻³) (25 °C)	DT ₅₀ ^{b [73]} (u danima)
Monokrotofos	Organofosfat	Insekticid	Ib	-	818000	1–5
Dimetoat	Organofosfat	Insekticid	II	-	23800 ^a	2–4
Malation	Organofosfat	Insekticid	III	2a	145	1
Imidakloprid	Neonikotinoid	Insekticid	II	-	610 ^a	191
Acetamiprid	Neonikotinoid	Insekticid	-	-	4250	15–30
Karbofuran	Karbamat	Insekticid	Ib	-	351	30–60
Karbaril	Karbamat	Insekticid	II	3	120 ^a	7–28
Tebufozid	Benzohidrazid	Insekticid	U	-	0,8	400
Karbendazim	Benzimidazol	Fungicid	III	-	8,0	180–360
Simazin	Triazin	Herbicid	U	3	6,2 ^a	27–102
Atrazin	Triazin	Herbicid	III	3	33 ^a	16–77
Propazin	Triazin	Herbicid	U	-	5,0 ^a	80–100
Linuron	Fenilurea	Herbicid	III	-	64 ^a	38–67
Monuron	Fenilurea	Herbicid	-	3	230	170

^a20 °C

^bDT₅₀ – vreme poluraspada (vreme poluživota) - vreme potrebno da koncentracija pesticida opadne na polovinu od početne vrednosti

Atrazin, simazin i propazin pripadaju grupi triazina koja je razvijena 1952. godine od strane švajcarske firme J. R. Geigy Limited. To je grupa herbicida za suzbijanje širokolisnog korova i travnatog korova u kukuruzu, pamuku, šećernoj trsci, soji i dr. Apsorbuju se korenima i transportuju ksilemom u grančice i listove. Inhibiraju fotosintezu pri čemu dolazi do zaustavljanja rasta biljke [2, 3]. Atrazin i simazin nisu klasifikovani po IARC klasifikaciji. Atrazin je slabo toksičan, a za simazin i propazin se veruje da nema opasnosti od akutnog trovanja. Ova tri triazina su zabranjena za upotrebu u EU i kod nas [73–76].

U grupi benzimidazola, koja je razvijena 1966. godine, najčešća aktivna supstanca jeste karbendazim. Karbendazim je sistemski fungicid sa protektivnim i kurativnim delovanjem. Inhibira sintezu građivnog proteina ćelijskog jedra gljiva i na taj sprečava deobu, formiranje apresoria i rast micelija. Apsorbuje se kroz koren i zelena tkiva biljke. Karbedazim je efikasan u suzbijanju velikog broja patogenih gljiva žita, voćaka i vinove loze, povrća,

ukrasnog bilja, pamuka, lana, šećerne repe, uljane repice, tikava, duvana i jestivih gljiva. U Republici Srbiji ovaj fungicid je registrovan za suzbijanje uzročnika bolesti koštunjavo voća, suncokreta, šećerne repe i pšenice [2, 77]. Pokazuje značajnu stabilnost u površinskim i otpadnim vodama, zemljištu i hrani [78]. Jako je otrovan za alge, dafnije i ribe, štetan za pčele i praktično neotrovan za ptice [77]. Karbendazim je zabranjen u EU, dok se kod nas još nalazi na listi dozvoljenih supstanci [73, 74]. Po predloženoj klasifikaciji pesticida od strane WHO, karbendazim spada u grupu pesticida za koje se smatra da nema opasnosti od akutnog trovanja [75].

Iz grupe neonikotinoidea odabrani su acetamiprid i imidaklopid. Navedeni pesticidi ove grupe koriste se kao insekticidi za suzbijanje štetočina krompira, paradajza, pasulja, suncokreta, duvana, hmelja, paprike, paradajza, kao i insekata voća i vinove loze. Svoju aktivnost ispoljavaju na nervnom sistemu, prouzrokujući ireverzibilnu blokadu postsinaptičkih nikotinergičnih acetilholin receptora [2, 3]. Zabeležena su trovanja pčela imidaklopidom, koji je tipičan nervni otrov. Na kraju vegetacije može se naći u polenu kukuruza i suncokreta koji skupljaju pčele, te tako dolazi do trovanja istih [79]. Zbog toga se imidaklopid i acetamiprid smatraju veoma toksičnim po živi svet u vodi, sa dugotrajnim posledicama, veoma su toksični za pčele, kao i za ptice, kišne gliste i ostale korisne artropode [77]. Ova dva pesticida nisu zabranjena za upotrebu u EU i Republici Srbiji, ali se nalaze na „watch listi” [65]. Imidaklopid se smatra srednje toksičnim po predloženoj WHO klasifikaciji [75].

Monuron i linuron pripadaju grupi fenilurea. Herbicidi feniluree se u značajnim količinama koriste kao selektivni i neselektivni pesticidi u poljoprivredi, industriji i domaćinstvu. Njihovo dejstvo je zasnovano na sposobnosti da blokiraju fotosintezu biljaka [2, 3]. Linuron se koristi za suzbijanje širokolisnih korova u kukuruzu, soji, suncokretu, krompiru i šargarepi. Linuron je veoma toksičan po živi svet u vodi, sa dugotrajnim posledicama [77]. Monuron je zabranjen kod nas i u EU [73, 74] i nije svrstan na osnovu IARC klasifikacije [76], dok se po WHO klasifikaciji smatra zastarelim pesticidom i nije klasifikovan. Linuron spada u slabo toksične pesticide na WHO listi [75].

Predstavnik grupe benzohidrazida je tebufenozid, dizajniran kao alternativa sintetičkim insekticidima širokog dejstva. Deluje kao agonist receptora za egdizon, indukuje prevremeno (letalno) presvlačenje insekata i utiče na sve razvojne stadijume larve. Namenjen je za tretiranje stabala jabuke, kruške i vinove loze. Toksičan je po živi svet u vodi, sa dugotrajnim

posledicama [77]. Po WHO klasifikaciji spada u grupu pesticida za koje se veruje da nema opasnosti od akutnog trovanja [75].

2.5. Analitičke metode za određivanje tragova pesticida u uzorcima površinske, podzemne i otpadne vode

Analiza pesticida u prirodnim uzorcima je veoma kompleksna, što potiče od njihove hemijske raznolikosti, niske koncentracije i složenog sastava prirodnih uzoraka. Današnje analitičke metode su primetno unapređene, što i čini mogućim detektovanje tragova pesticida u uzorcima kao što je voda. Koja analitička metoda će biti odabrana u analizi pesticida zavisi od hemijskih osobina analita, kao i od očekivanih koncentracija. Da bi se dokazalo da odabrana metoda odgovara nameni, potrebno je izvršiti validaciju analitičke metode. Pri validaciji određuju se osetljivost, prinos, preciznost, linearnost, granica detekcije i granica kvantifikacije za predloženu analitičku metodu. Osnovni zahtevi koje jedna analitička metoda mora da ispunjava su [80]:

- Za svaku reprezentativnu matricu iz relevantne grupe uzoraka prinos metode mora biti u opsegu od 70% do 120%.
- Ponovljivost metode, izražena preko relativne standardne devijacije (RSD), mora biti $\leq 20\%$.
- Granice detekcije i kvantifikacije mora biti niske. Granica detekcije (engl. limit of detection – LOD) kod hromatografskih metoda definiše se kao koncentracija pri kojoj je odnos signala i šuma jednak 3, dok se granica kvantifikacije (engl. limit of quantification – LOQ) definiše kao koncentracija pri kojoj je odnos signala i šuma jednak 10.
- Metoda mora biti linearna. Linearnost je još jedan parametar valjanosti analitičke metode koji se definiše kao mogućnost da se u datom opsegu detektuje signal koji je direktno proporcionalan koncentraciji ili količini analita.

Svaka analitička metoda se sastoji od nekoliko stupnjeva kao što su: priprema uzorka, separacija, kvantifikacija i analiza podataka. Svaki od ovih koraka je podjednako kritičan za dobijanje tačnih i reproduktivnih rezultata. U određivanju tragova pesticida zastupljene su

moderne instrumentalne tehnike, kao što su gasna hromatografija (engl. gas chromatography – GC) i tečna hromatografija visokih performansi (engl. high performance liquid chromatography – HPLC).

2.5.1. Priprema uzorka pri određivanju tragova pesticida u uzorcima vode

Uzorci iz životne sredine, kao što su površinske i podzemne vode, sadrže analite u veoma niskim koncentracijama, te nije moguće direktno injektovanje uzorka u hromatografski sistem. Materije neorganskog porekla, huminske materije, kao i druge organske materije koje se nalaze u prirodnim uzorcima, mogu da utiču na određivanje pesticida, tako da je neophodno pripremiti uzorak tj. ukloniti sve komponente koje mogu da utiču na rezultat, izolovati komponente od interesa i povećati koncentraciju analita [81].

Koja će se metoda pripreme uzorka primeniti, pored fizičko-hemijskih osobina analita i prirode uzorka, zavisi i od metode koja će se primenjivati za kvantitativnu analizu (osetljivosti, selektivnosti, i sl.) [82, 83]. Tehnike pripreme uzoraka za određivanje tragova analita uglavnom obuhvataju sledeće korake [83]:

- homogenizacija uzorka;
- ekstrakcija – analit od interesa se prenosi iz matrice uzorka u rastvarač koji može biti unet u merni instrument. Pod idealnim uslovima analit se selektivno ekstrahuje iz matrice uzorka, a sve nepoželjne komponente zaostaju;
- predkoncentrisanje – povećanje koncentracije ekstrahovanih analita i na taj način poboljšanje ukupne osetljivosti analize. Koncentrovanje analita koji se nalazi u rastvaraču može se postići raznim tehnikama uparavanja;
- prečišćavanje ekstrakta – izolovanje analita od interesa od ostalih delova matrice uzorka koji su koekstrahovani i mogu da interferiraju sa analitima. Većina tehnika prečišćavanja koristi klasično gravitaciono prolaženje ekstrakta uzorka kroz kolonu pakovanu odgovarajućim sorbentima (npr. aluminijum-oksidi, silika-gel, florisil i razne smole za prečišćavanje).

Za predkoncentrisanje tragova pesticida iz vode mogu se koristiti tečno-tečna i tečno-čvrsta ekstrakcija [81, 83]. Tečno-tečna ekstrakcija predstavlja ekstrakciju analizirane supstance iz jedne tečne faze u drugu u kojoj je njena rastvorljivost veća. Prednosti tečno-tečne ekstrakcije

su jednostavnost i cena, a nedostaci mala selektivnost, ograničeni broj rastvarača koji se ne mešaju, kao i upotreba velikih zapremina rastvarača [83, 84]. Novija alternativa tečno-tečna ekstrakcije je i membranska ekstrakcija koja predstavlja nedisperzivnu tečno-tečno ekstrakciju u kojoj dolazi do razmene mase između dve nemešljive tečnosti razdvojene mikroporoznom membranom. Postoje dva načina primene membranske ekstrakcije: dvofazna membranska ekstrakcija (engl. microporous membrane liquid-liquid extraction – MMLLE) i trofazna membranska ekstrakcija, tzv. pertrakcija (engl. supported liquid membrane extraction – SLME). MMLLE se uglavnom koristi za ekstrakciju nepolarnih jedinjenja, dok je SLME pogodnija za ekstrakciju polarnih jedinjenja [85].

Tečno-čvrsta ekstrakcija zasniva se na raspodeli analita između tečne faze (uzorka) i čvrste faze (sorbenta). Ekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. solid-phase extraction – SPE) je široko primenjivana tečno-čvrsta ekstrakcija koja se najviše koristi za ekstrakciju i koncentrovanje supstanci i prečišćavanje ekstrakata uzorka vode [83, 86]. On-line SPE se smatra elegantnom alternativom (uključuje automatizaciju i minijaturizaciju), kao i mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. solid-phase microextraction – SPME) koja je ekološki prihvatljiva (potrebna je mala količina uzorka vode i veoma mala zapremina rastvarača), ali se obe manje koriste [87].

2.5.1.1. Metoda ekstrakcije na čvrstoj fazi

Ekstrakcija na čvrstoj fazi je brza i efikasna metoda za pripremu uzorka koju koristi oko polovina onih koji se danas bave analizom pesticida u uzorcima vode. Ova metoda ima značajne prednosti u odnosu na klasičnu tečno-tečnu ekstrakciju: izbegnut je problem loše separacije ili mešanja faza, mogu se koristiti hemijski različiti sorbenti, prevaziđen je problem niskih prinosa, smanjena je potrošnja organskih rastvarača, lakše se i brže izvodi, a može se i automatizovati [83, 87]. Kao što se može videti u tabeli 3, ova tehnika se široko primenjuje za pripremu uzorka vode za analizu ostataka pesticida. Takođe, u tabeli 3 navedene su i druge metode za pripremu uzorka vode za analizu pesticida, koje se nešto manje primenjuju.

Tabela 3. Pregled primene metoda pripreme uzoraka i metoda analize u određivanju ostataka pesticida u uzorcima vode

Pesticidi	Matrica	Priprema uzorka	Hromatografija-Detektor			Literatura
			Hromatografija, Kolona	Mobilna faza	Detektor	
12, triazini i njihovi metaboliti	Površinska voda	SPE (LiChrolut EN)	LC, Spherisorb S5 ODS2 (250 mm × 40 mm i.d × 5 µm)	Voda/(5 mM fosfatni pufer)/ /Acetonitril	PDA	[88]
16 pesticida (različitih hemijskih grupa)	Površinska i podzemna voda	LLE	GC, Agilent DB-5 (30 m × 0,25 mm i.d. × 0,25 µm)	Helijum	ECD	[44]
31 pesticid (različitih hemijskih grupa)	Površinska voda	SPE (Oasis HLB)	LC, Acquity BEH C18 (100 mm × 2,1 mm i.d. × 1,7 µm)	Voda/(0,1% HCOOH)/ /Acetonitril	ESI – QqQ	[31]
9 pesticida (različitih hemijskih grupa)	Podzemna voda	SPE (Oasis HLB)	LC, Acquity BEH C18 (100 mm × 2,1 mm i.d. × 1,7 µm)	Voda/(0,1% HCOOH)/ /Acetonitril	ESI – QqQ	[89]
101 pesticid (različitih hemijskih grupa)	Površinska voda	SPE (Sep-pak C18)	LC, Zorbax Eclipse XDB-C8 (15 mm × 4,6 mm i.d. × 5 µm)	Voda/(0,1% HCOOH)/ /Acetonitril	ESI – TOF	[90]
12 pesticida (različitih hemijskih grupa)	Površinska, podzemna i otpadna voda	SPE (Strata-C18)	LC, Uptispher C18 3HDO (100 mm × 2 mm i.d × 3 µm)	Voda/(10 mM NH ₄ OAc)/ /Metanol	ESI – QqQ	[91]
14 pesticida (različitih hemijskih grupa)	Površinska, podzemna i otpadna voda	SPE (Oasis HLB)	LC, Atlantis dC18 (150 mm × 2 mm i.d. × 5 µm)	Voda/(5 mM NH ₄ OAc)/ /Metanol	ESI – QqQ	[92]
20 pesticida (različitih hemijskih grupa)	Površinska i podzemna voda	on-line SPE (PLRP-s)	LC, Purospher STAR-RP-18e (125 mm × 2 mm i.d. × 5 µm)	Voda/Acetonitril	ESI – QqQ	[93]
12, karbamati i njihovi degradacioni proizvodi	Površinska voda	SPE (Bond Elut Jr. C18)	LC, X-Terra (250 mm × 4,6 mm i.d. × 5 µm)	Voda/Acetonitril	ESI – QqQ	[94]
11 pesticida (različitih hemijskih grupa)	Površinska voda	SBSE (PDMS)	GC, Agilent HP-5MS (30 m × 0,25 mm i.d. × 0,25 µm)	Helijum	EI – Q	[95]
5, triazini i hloroacetamidi	Otpadna voda sa farme	On-line SPME (PDMS)	GC, Varian CP5860 WCOT (30 m × 0,25 mm i.d. × 0,25 µm)	Helijum	EI – IT	[96]
58 pesticida (različitih hemijskih grupa)	Površinska voda	SD-DLLME	LC, Kinetex C8 (50 mm × 3 mm i.d. × 2,6 µm)	Voda/(0,1% HCOOH)/ /Metanol	ESI – TQ	[46]

Tabela 3. (nastavak)

Pesticidi	Matrica	Priprema uzorka	Hromatografija-Detektor			Literatura
			Hromatografija, Kolona	Mobilna faza	Detektor	
8 pesticida (različitih hemijskih grupa)	Površinska voda	SPME	GC, Factor Varian VF-5 (30 m × 0,25 mm i.d. × 0,25 μm)	Helijum	ECD	[45]
16 pesticida (različitih hemijskih grupa)	Rečna voda, jezerska voda, voda iz kanala za navodnjavanje	HF – LPME	LC, Zorbax Eclipse XDB-C18 (75 mm × 4,6 mm i.d. × 3,5 μm)	Voda/(0,1% CH ₃ COOH)/ /Metanol	ESI – IT	[85]
49 pesticida (različitih hemijskih grupa)	Površinska voda	SBSE (PDMS)	GC, DB-5 kolona (30 m × 0,25 mm i.d. × 0,25 μm)	Helijum	EI – QqQ	[97]
18, organohlorni	Morska voda	SBSE (PDMS)	GC, DB-5 kolona (30 m × 0,25 mm i.d. × 0,25 μm)	Helijum	EI – Q	[98]
27 pesticida (različitih hemijskih grupa)	Otpadna voda	DAI	UHPLC, Zorbax Eclipse XDB C18 (50 mm × 4,6 mm i.d. × 1,8 μm)	0,1% HCOOH/Acetonitril	QqLIT	[99]
5, triazini	Površinska voda	SPE	GC, DB-5 kolona (30 m × 0,25 mm i.d. × 0,25 μm)	Helijum	IT	[100]
5, karbamati	Otpadna voda sa farme, voda za piće	LPME	GC, DB-5 kolona (30 m × 0,32 mm i.d. × 0,25 μm)	Helijum	NPD	[101]
13, organofosforni	Površinska i podzemna voda, otpadna voda sa farme	DLLME	GC, dual 30 m kapilarne kolone	Vodonik	NPD,FPD	[102]
6, organofosforni	Jezerska voda	SDME	GC, HP-5 kolona 30 m × 0,32 mm i.d. × 0,25 μm	Vodonik	FPD	[103]

SBSE – engl. Stir-Bar Sorptive Extraction

SDME – engl. Single-Drop Microextraction

DLLME – engl. Dispersive Liquid-Liquid Microextraction

DAI – engl. Direct Aqueous Injection

LPME – engl. Liquid-Phase Microextraction

EI – Q – engl. Electron Ionization-Quadrupole mass analyzer

QqLIT – engl. Triple Quadrupole Linear Ion Trap

ECD – engl. Electron-Capture Detector

NPD – engl. Nitrogen-Phosphorus *Detector*

FPD – engl. Flame Photometric *Detector*

ESI-IT – engl. Electrospray Ionization-Ion Trap

PDA – engl. Photodiode Array Detector

ESI-QqQ – engl. Electrospray Ionization-Triple Quadrupole

Prilikom primene SPE tehnike, do zadržavanja analita dolazi tako što se tečan uzorak propušta kroz poroznu čvrstu fazu sa velikim afinitetom prema analitu. Analit se kasnije pogodnim rastvaračem eluira sa čvrste faze [104].

Kolone (ili kertridži), koje su razvijene specijalno za ekstrakciju na čvrstoj fazi, omogućuju brz, ekonomski prihvatljiv i efikasan sistem za pripremu uzoraka. Kertridži mogu biti stakleni ili polietilenski špricevi određene zapremine, koji su punjeni nekim od sorbenata. Da bi se sorbent zadržao u kertridžu, ispod i iznad se stavljaju teflonske ili polietilenske frite određene poroznosti. Zapremina kertridža se kreće u opsegu od 1 do 60 cm³, a masa sorbenta može biti od 0,1 do 10 g [104]. Veličine čestica materijala za pakovanje su, uglavnom, prečnika oko 50 μm. Debljina sloja sorbenta je dovoljno mala da dopusti lagan protok uzorka kroz kertridž, gravitacijom ili uz pomoć pritiska ili vakuuma.

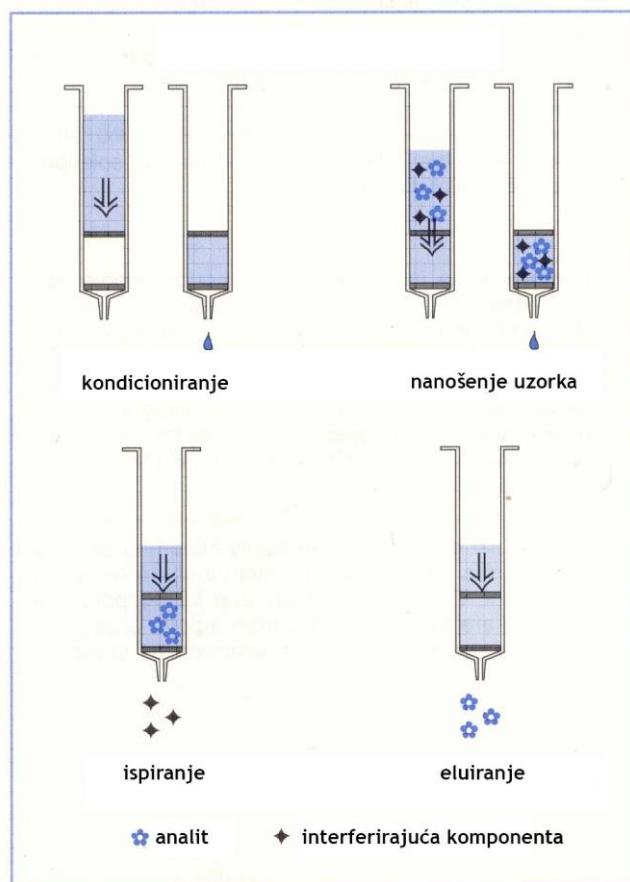
Najčešće korišćen SPE sorbent je hemijski modifikovan silika-gel koji sadrži različite funkcionalne grupe: nepolarne, polarne i jonske. Na osnovu mehanizma zadržavanja analita na sorbentu, ekstrakcija na čvrstoj fazi može biti reverzno-fazna, normalno-fazna i jonoizmenjivačka. Reverzno-fazna ekstrakcija na čvrstoj fazi se odvija na nepolarnom sorbentu sa nepolarnim ili slabo polarnim analitom iz polarne matrice uzorka. Za reverzno-faznu ekstrakciju najčešće se koriste silikatni materijali sa alkil (C₁₈ i C₈) ili aril grupama, kao i ugljenični materijali za ekstrakciju polarnih jedinjenja [105]. Normalno-fazna ekstrakcija na čvrstoj fazi podrazumeva interakcije između polarnog analita iz nepolarne matrice uzorka i polarnog sorbenta. Najčešće se koriste silikatni sorbenti sa polarnim funkcionalnim grupama, poput -NH₂ ili -CN. Mehanizam jonoizmenjivačke ekstrakcije na čvrstoj fazi zasniva se na zadržavanju jona analita na sorbentu sa anjonskim ili katjonskim funkcionalnim grupama.

Prednosti upotrebe organskih polimernih sorbenata su: mogu se koristiti u širokom opsegu pH od 0 do 14, omogućavaju izvođenje multirezidualne analize za uzorke koji sadrže bazna, neutralna i kisela jedinjenja, bolje zadržavaju kisele analite bez zakišeljavanja uzorka, itd. Upotrebom ovih kertridža priprema uzorka je pojednostavljena, nije neophodno prečišćavanje uzorka radi uklanjanja huminskih i fulvo kiselina i smanjena je mogućnost kisele hidrolize drugih analita u multirezidualnoj analitičkoj proceduri [105]. Za analizu tragova pesticida prilikom pripreme uzorka vode najčešće se koriste polimerni sorbenti, kao što je Oasis HLB (Waters, Milford, SAD) [106–111]. Sastoji se od smole napravljene kombinovanjem polimera divinilbenzena i N-vinilpirolidona. Divinilbenzen poseduje lipofilne, a N-

vinilpirolidon hidrofilne osobine. HLB (engl. hydrophilic-lipophilic balance – HLB) sorbent se može koristiti za širok spektar analita (kisele, bazne i neutralne) jer je stabilan pri pH = 0–14.

Nakon izbora odgovarajuće kolone, SPE procedura obuhvata četiri faze (slika 2):

- kondicioniranje kolone – izvodi se propuštanjem rastvarača kroz kolonu (kertridž) napunjenu sorbentom (čvrstom fazom) što omogućava aktiviranje čvrste faze;
- nanošenje uzorka – uzorak vode se propušta kroz kolonu, a sve komponente (analit, nečistoće, sastojci matrice i sl.) adsorbiraju se na čvrstu fazu;
- ispiranje kolone – vrši se propuštanjem rastvarača koji će odstraniti sastojke matrice i nečistoće, dok analit ostaje vezan za čvrstu fazu;
- eluiranje – propuštanje pogodnog rastvarača koji će desorbirati analit sa čvrste faze.



Slika 2. Prikaz ekstrakcije na čvrstoj fazi

2.5.2. Instrumentalne metode analize

Najčešće analitičke metode koje se koriste za određivanje pesticida su gasna hromatografija (GC) koja je pogodna za određivanje nepolarnih i isparljivih jedinjenja [100, 112, 113] i tečna hromatografija (engl. liquid chromatography – LC) koja je pogodnija za određivanje neisparljivih i termički nestabilnih polarnih organskih jedinjenja [91–93]. Poslednjih godina se sve više koriste polarni, termički labilni i manje isparljivi pesticidi, koji se teško detektuju pomoću GC, što praktično znači da tečna hromatografija uzima primat u analizi pesticida. HPLC u kombinaciji sa masenim detektorom je postala jedan od vodećih analitičkih alata za analizu pesticida na nivou ng dm^{-3} , koji obezbeđuju osetljivost, selektivnost i ispunjavaju EU propise za analizu pesticida u kompleksnim uzorcima kao što je voda [87]. Međutim, pouzdana kvantifikacija velikog broja pesticida različitih hemijskih grupa pri niskim koncentracijama i/ili u složenim matricama i dalje predstavlja analitički izazov.

2.5.2.1. Tečna hromatografija visokih performansi

Princip razdvajanja kod metode tečne hromatografije je u različitoj raspodeli komponenata između stacionarne faze (može biti čvrsta ili tečna) i mobilne faze (tečna faza, rastvarač). Stacionarnu fazu čini nepokretno pakovanje kolone. Međusobne interakcije između komponenti uzorka i mobilne faze, kao i stacionarne faze, određuju na koji način će doći do separacije analita. Molekuli koji formiraju jače veze sa stacionarnom fazom nego sa mobilnom, sporije eluiraju sa kolone i imaju veća retenciona vremena (vreme zadržavanja analita na koloni), dok molekuli koji formiraju jače veze sa mobilnom fazom imaju kraća retenciona vremena [104].

Na osnovu prirode interakcije između stacionarne faze i komponenti uzorka razlikujemo sledeće tipove hromatografije [114] :

- podeona hromatografija – predstavlja najčešće korišćeni tip hromatografije kod koje je rastvorljivost analita u dve faze različita. U zavisnosti od relativne polarnosti stacionarne i mobilne faze razlikuju se:
 - hromatografija sa normalnom fazom – mobilna faza je nepolarna, dok je stacionarna faza polarna (polarniji analit se duže zadržava u koloni);
 - hromatografija sa reverznom fazom – mobilna faza je polarna, dok je stacionarna faza nepolarna (manje polarni analit se duže zadržava u koloni);

- adsorpciona hromatografija – na stacionarnoj fazi dolazi do fizičke adsorpcije analita, a usled razlike u jačini adsorpcije komponenti smeše dolazi do razdvajanja;
- jonoizmenjivačka hromatografija – materijal stacionarne faze na površini ima naelektrisane jone koji su suprotnog naelektrisanja od jona analita. Joni sa većim naelektrisanjem i manjim radijusom ostvaruju jače interakcije sa stacionarnom fazom, a samim tim imaju i duže vreme eluiranja;
- hromatografija razdvajanja po veličini – do razdvajanja komponenti smeše dolazi na osnovu veličine molekula. Veliki molekuli prolaze kroz kolonu, a u porama na površini stacionarne faze zadržavaju se mali molekuli koji mogu da difunduju unutar pora.

U zavisnosti od zahteva separacije može se menjati i mobilna faza. Kao mobilna faza koriste se različiti rastvarači, pod uslovom da poseduju sledeće osobine: dobra rastvorljivost analita, visoka čistoća, kompatibilnost sa detektorom, mala viskoznost, hemijska inertnost, razumna cena [114, 115].

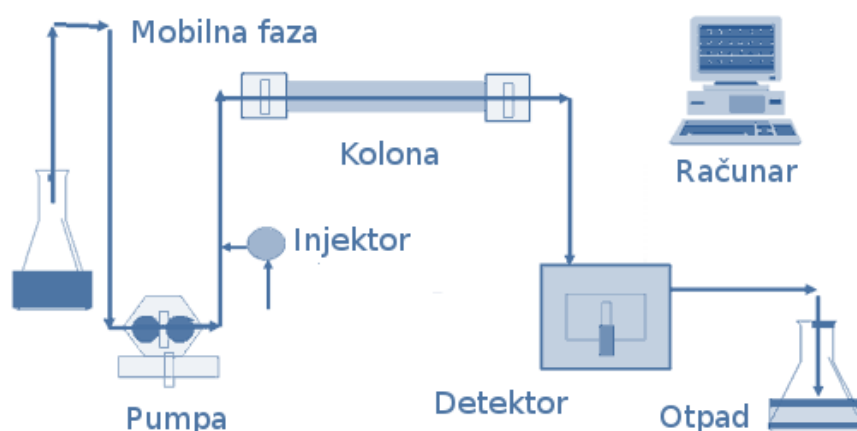
Stacionarna faza se sastoji od centralnog jezgra na čijoj površini su vezane željene funkcionalne grupe. Osobine koje stacionarna faza mora da poseduje su: nerastvorljivost u mobilnoj fazi, stabilnost na promene pritiska, temperature i pH, kao i što uniformnija raspodela čestica [114, 115].

Kod tečne hromatografije visokih performansi stacionarna faza se sastoji od čestica veoma malih dimenzija što omogućava veliku kontaktnu površinu i ,kao posledicu, visoku moć razdvajanja (visoku rezoluciju), po kojoj je metoda i dobila naziv.

Osnovni delovi HPLC uređaja (slika 3) su:

- rezervoari za mobilnu fazu;
- pumpa;
- sistem za unošenje uzorka (injektor);
- kolona (stacionarna faza);
- detektor;
- sistem za snimanje i obradu podataka [114, 115].

HPLC



Slika 3. Osnovna šema HPLC uređaja

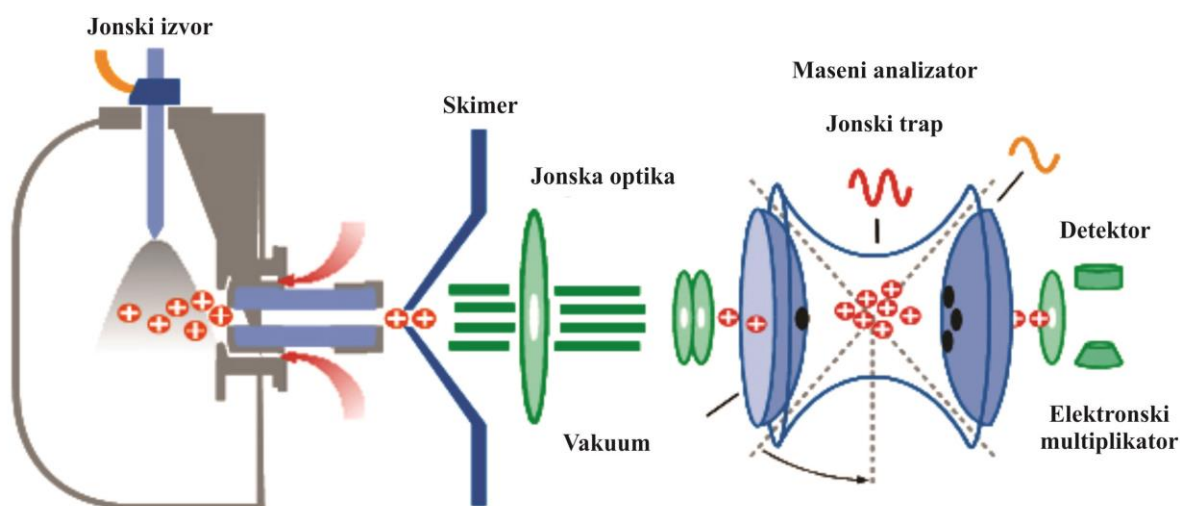
2.5.2.2. Masena spektrometrija

U hromatografiji se kvalitativna analiza vrši na osnovu retencionog vremena, pri čemu se upoređuje retenciono vreme analita iz ispitivanog uzorka sa onim za standardni rastvor, sniman pod istim eksperimentalnim uslovima. Međutim, retenciono vreme nije dovoljno za pouzdanu identifikaciju analita, pa se taj problem rešava kombinovanjem hromatografije sa masenom spektrometrijom koja pruža dodatne informacije o analitu. S obzirom na to da su maseni spektri svake supstance specifični, omogućena je identifikacija analita sa visokim stepenom sigurnosti. Tako sprega hromatografije, kao separacione tehnike, sa masenom spektrometrijom omogućava precizniju identifikaciju supstanci sa istim ili sličnim retencionim vremenima na osnovu različitih masenih spektara [115, 116].

Masena spektrometrija (engl. mass spectrometry – MS) je analitička metoda kojom se razdvajaju naelektrisane čestice prema odnosu mase i naelektrisanja (m/z). Na slici 4 prikazan je maseni spektrometar koji se sastoji iz jonskog izvora, analizatora, detektora, vakuum sistema i računara. U jonskom izvoru dolazi do jonizacije molekula uzorka, koji se zatim prebacuju u maseni analizator. Zatim analizator razdvaja jone prema odnosu mase i naelektrisanja. Nakon separacije, signal jona se detektuje i analizira. Svi maseni spektrometri rade pod visokim vakuumom da bi se međusobno reagovanje jona dovelo na minimum, kao i da ne dođe do njihovog raspršivanja i neutralizacije [115, 116].

Maseni spektrometar se sastoji od sledećih delova (slika 4) [115, 116]:

- sistem za unošenje uzorka;
- jonski izvor – vrši jonizaciju uzorka;
- maseni analizator – vrši razvrstavanje jona prema odnosu mase i naelektrisanja (m/z) koristeći električno ili magnetno polje ili njihovu kombinaciju. U HPLC-MS konfiguracijama najčešće se koriste sledeći analizatori:
 - jonski trap
 - kvadrupolni jonski filter
 - analizator vremena preleta (engl. time of flight – TOF)
 - ili njihove kombinacije
- detektor – registruje prisustvo i relativnu koncentraciju izdvojene jonske vrste;
- vakuum sistem – sprečava da se joni na svom putu od jonskog izvora do detektora sudaraju;
- računar – vrši obradu podataka. Kao krajnji rezultat daje vizuelnu i trajnu registraciju električnih signala detektora. Svakoј jonskoј vrsti odgovara po jedan pik, a skup svih pikova čini maseni spektar uzorka.

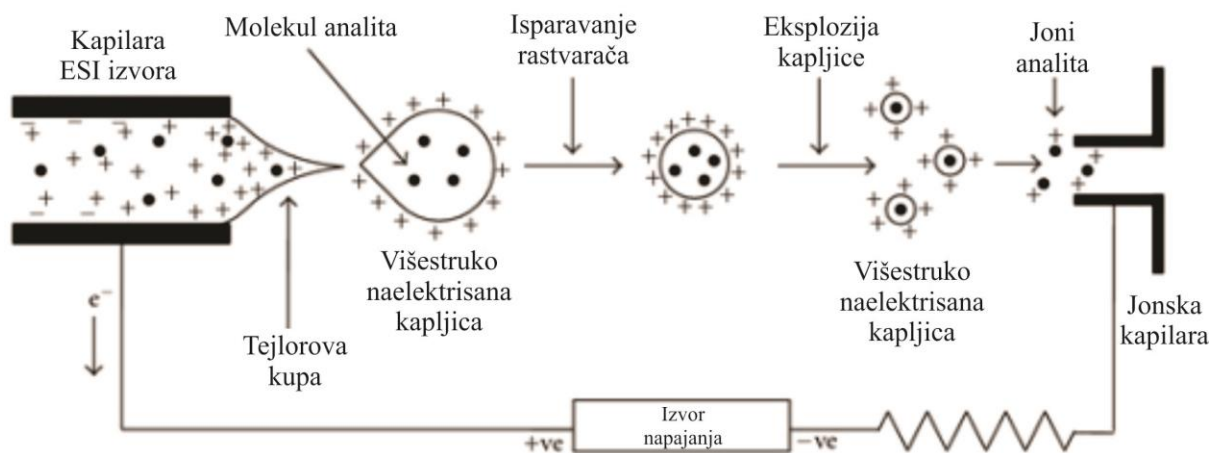


Slika 4. Prikaz masenog spektrometra

Tehnike jonizacije koje se koriste u masenoj spektrometriji su brojne. Jonizacija uzorka u jonskom izvoru se može izvesti na nekoliko načina [115–117]: termosprej jonizacija (engl. thermospray ionization – TS), jonizacija elektronskim udarom (engl. electron impact ionization – EI), hemijska jonizacija (engl. chemical ionization – CI), hemijska jonizacija na atmosferskom pritisku (engl. atmospheric pressure chemical ionization – APCI), elektrosprej jonizacija (engl. electrospray ionization – ESI), itd. Termosprej, elektrosprej i hemijska jonizacija na atmosferskom pritisku su pogodne za jonizaciju neisparljivih i termonestabilnih jedinjenja. Jonizacija elektronskim udarom i hemijska jonizacija mogu da se koriste samo u slučaju kada su analiti u gasovitom stanju [115, 117].

APCI i ESI su najčešće korišćene tehnike jonizacije prilikom HPLC-MS analize tragova zagađujućih supstanci u životnoj sredini [118, 119]. ESI se koristi za analizu polarnih analita, ali i u analizi manje polarnih jedinjenja, zbog čega se većina analitičara opredeljuje za ovu tehniku. APCI se koristi za analizu jedinjenja srednje i male polarnosti.

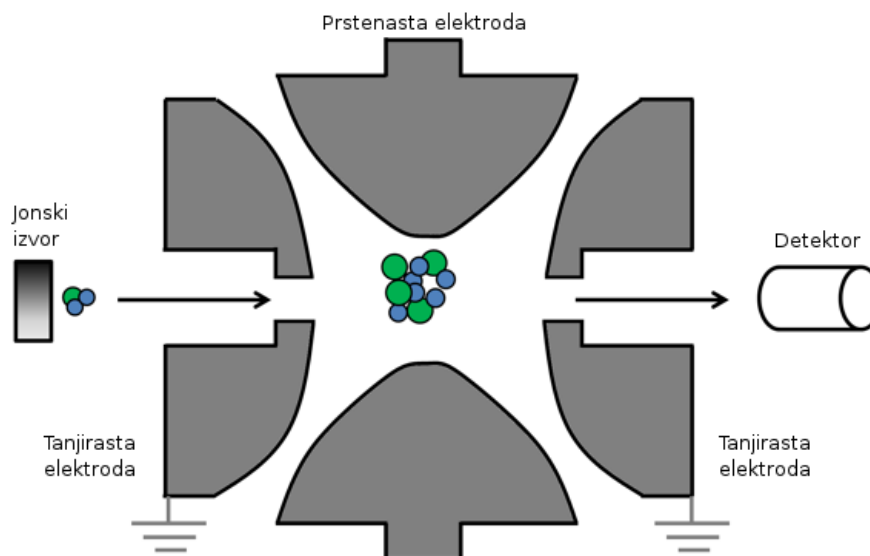
Nastanak jona elektrosprej jonizacijom (slika 5) postiže se pomoću finog spreja tečnosti u prisustvu jakog električnog polja, pri čemu dolazi do desolvatacije jona analita na atmosferskom pritisku. Uzorak rastvoren u isparljivom, polarnom rastvaraču u struji azota se raspršuje kroz čeličnu kapilaru čiji je vrh pod visokim naponom (3-6 kV). Uzorak napušta kapilaru u vidu aerosola sastavljenog od visoko naelektrisanih kapljica. U zavisnosti od polarnosti električnog polja kapljice poseduju pozitivno, odnosno negativno naelektrisanje. Usled isparavanja rastvarača dolazi do smanjivanja površine kapljica i u jednom trenutku, kada površinski napon ne može da izdrži nagomilano naelektrisanje, dolazi do eksplozije kapljica. Ovaj proces se ponavlja i kao rezultat se dobijaju joni analita, oslobođeni od rastvarača, koji kroz jonsku kapilaru stižu do analizatora [116, 120].



Slika 5. Prikaz elektrosprej jonizacije

U zavisnost od električnog polja, ESI tehnikom se dobijaju protonovani ili deprotonovani molekuli ($[M+H]^+$, odnosno $[M-H]^-$). Česta je pojava i višestruko naelektrisanih jona, tipa $[M+nH]^{n+}$ ili $[M-nH]^{n-}$, kao i adukata jona sa rastvaračem ($[M+R+H]^+$, odnosno $[M+R-H]^-$). Nastankom višestruko naelektrisanih jona, molekuli sa velikom molekulskom masom se pojavljuju na nižim m/z vrednostima. Ovo povećava merni opseg analizatora, što omogućava analizu molekula sa velikom molekulskom masom upotrebom jeftinijih analizatora. Na proces jonizacije, kao i na jačinu ESI signala, utiču osobine mobilne faze (isparljivost, viskoznost, površinski napon, provodljivost, dielektrična konstanta, koncentracija elektrolita i pH) i fizičko-hemijske osobine analita (pK_a -vrednost, hidrofobnost, površinska aktivnost, kiselo-bazna svojstva, itd.) [121].

Maseni analizator vrši razvrstavanje jona prema odnosu mase i naelektrisanja (m/z) koristeći električno ili magnetno polje ili njihovu kombinaciju. Jonski trap je maseni analizator u kome mogu da se analiziraju ili čuvaju joni primenom kvadrupolnog radiofrekventnog električnog polja. Sastoji se iz tri elektrode, jedne u obliku prstena i dve tanjiraste elektrode koje zatvaraju trap sa obe strane (slika 6). Joni ulaze i napuštaju trap kroz otvore na tanjirastim elektrodama. Dovođenjem radiofrekventnog signala na prstenastu elektrodu postiže se skladištenje jona u trapu, što dovodi do stvaranja polja unutar prstena, dok su tanjiraste elektrode uzemljene. U centralnom delu trapa joni imaju ograničeno kretanje u aksijalnom pravcu, dok se u radijalnom pravcu ubrzavaju prema tanjirastim elektrodama i nisu zadržani. Menjanjem smera električnog polja svaki put kada se joni približe elektrodama postiže se istovremeno zadržavanje jona u oba pravca [116].



Slika 6. Prikaz jonskog trapa

Joni koji su proizvedeni eksterno na ulasku u jonski trap imaju vrednosti kinetičke energije koje onemogućavaju njihovo efikasno zadržavanje. Ovaj problem se rešava tako što se u trap uvodi gas helijum pri pritisku od oko 0,13 Pa. Putem elastičnih sudara jona sa atomima helijuma umanjuje se njihova kinetička energija i samim tim se joni grupišu u centru trapa. Pozitivni efekti se mogu videti i kada je rezolucija u pitanju, jer je rasipanje jona u toku masene analize slabo, omogućujući da se joni istog m/z odnosa izbacuju u kompaktnim paketima. Postoji ograničenje u broju jona koji se mogu čuvati u trapu, usled odbojnih kulonovih sila. Kada se dostigne zasićenje trapa dolazi do smanjenja rezolucije i osetljivosti [115, 116]. Glavni nedostatak ovog masenog analizatora je ograničen dinamički opseg, usled ograničenog broja jona koji mogu biti prisutni u trapu.

Nakon razvoja **tandem masene spektrometrije** (MS/MS ili MS^2) postala je moguća precizna i pouzdana detekcija veoma niskih koncentracija analita u kompleksnim matricama. Tandem masena spektrometrija koristi dve faze masene analize. Prva faza je izolovanje jona od interesa, dok je druga faza analiza fragmenata nastalih npr. pri sudaru jona sa inertnim gasom (argonom ili helijumom). Ova dvostepena analiza može se izvršiti tandemom u vremenu ili tandemom u prostoru. Tandem u vremenu znači da se analize izvode u istom prostoru, ali u različito vreme. Tandem u prostoru znači da su dva masena spektrometra

vezana serijski i da se analize simultano izvode, ali su prostorno odvojene. Rešenje problema identifikacije i kvantifikacije analita koji imaju istu molekulsku masu, ali različite fragmentne jone, ili jedinjenja koje nije moguće potpuno hromatografski razdvojiti je upravo tandem masena spektrometrija [115, 116]. Ipak, da bi se postiglo povećanje signala analita i smanjio uticaj matrice, određeni stepen razdvajanja je potreban.

Grafički prikaz odgovora masenog detektora u toku vremena predstavlja maseni hromatogram. Kada se u toku rada izabere snimanje celog masenog spektra dobija se ukupni jonski hromatogram (engl. total ion chromatogram – TIC). Registracijom samo određenog jona od interesa dobija se hromatogram odabranog jona (engl. selected ion monitoring – SIM), a ukoliko se odabere detektovanje jona koji je nastao kao rezultat fragmentacije određenog jona dobija se hromatogram odabrane reakcije (engl. selected reaction monitoring – SRM) [115, 116].

Kombinovanjem tačne hromatografije sa tandem masenom spektrometrijom (HPLC-MS/MS) dobijena je visoko selektivna i osetljiva tehnika za analizu velikog broja pesticida, čak i u kompleksnim matricama, čime je značajno pojednostavljena priprema uzorka [91, 122, 123]. Bez sumnje, elektrosprej jonizacija i hemijska jonizacija na atmosferskom pritisku, koje omogućavaju jonizaciju širokog spektra supstanci, odgovorni su za sve veći uspeh ove metode u analizi tragova analita u različitim matricama. Međutim, jedno od ograničenja jeste pojava uticaja matrice koji može dovesti do pogrešne kvantifikacije [124]. Zbog toga se pre same hromatografske analize vrši i priprema uzorka koja podrazumeva predkoncentrisanje i prečišćavanje od jedinjenja koja se nalaze u matrici (npr. huminske kiseline) i koja se lako eluiraju i mogu izazvati probleme prilikom analize. Sadržaj huminskih kiselina u površinskoj vodi obično se kreće između 1–5 mg dm⁻³, mada, u nekim slučajevima, ova vrednost može dostići i više od 10 mg dm⁻³ [125]. Uticaj matrice definiše se kao supresija ili povećanje signala prilikom jonizacije analita, pri čemu komponente matrice koeluiraju sa analitom i mogu dovesti do promene efikasnosti njegove jonizacije. Na taj način, komponente matrice utiču na ponovljivost i tačnost razvijene metode što dovodi do pogrešne kvantifikacije [124, 126]. Uticaj matrice izražava se kao odnos signala analita u matrici i signala analita u rastvaraču, izražen u procentima. Uticaj matrice od 100% označava da su signali isti i da nije došlo do uticaja matrice, dok se vrednosti od 100 ± 20% smatraju prihvatljivim. Supresija signala, kao posledica uticaja matrice, je češća pojava od povećanja intenziteta signala, posebno u slučajevima gde se analizira veliki broj jedinjenja prisutnih u tragovima u

kompleksnim matricama. Mehanizam i poreklo uticaja matrice u HPLC-MS analizi i dalje nisu potpuno objašnjeni, ali mogu biti rezultat kompeticije analita i neisparljivih komponenata matrice za mesto na površini kapljice prilikom prelaska jona iz tečne u gasovitu fazu. Takođe, molekuli sa većom masom mogu prikrivati signal manjih molekula formiranjem većih kompleksa koji često imaju veću mogućnost jonizacije, a polarniji molekuli su podložniji supresiji jona [127]. Pretpostavlja se da adsorpcija analita na neisparljivim komponentama matrice može dovesti do supresije signala kada se koristi APCI jonizacija. Prilikom korišćenja ESI jonskog izvora za analizu organskih baza dolazi do smanjenja signala u prisustvu drugih organskih baza u matrici. Pokazano je da jedinjenja sa visokim afinitetom ka protonima, kao i jedinjenja koja mogu da formiraju jonske parove sa jonima analita, vrše supresiju signala prilikom elektrosprej jonizacije [127–132].

Postoji nekoliko načina da se otkloni ili bar smanji uticaj matrice, kao na primer selektivnija ekstrakcija, efikasnije prečišćavanje ekstrakta uzorka, kao i re-optimizacija hromatografske metode za postizanje potpunog razdvajanja komponenti uzoraka. Ponekad, ovi pristupi nisu efikasni pa mogu dovesti do gubitaka analita ili do povećanja vremena analize. Međutim, problem uticaja matrice može se otkloniti upotrebom odgovarajućih kalibracionih tehnika, kao što su: eksterna kalibracija sa upotrebom standarda u matrici (engl. matrix-matched standard – MMS) [89, 131, 132], metoda internog standarda, metoda standardnog dodatka ili razblaživanje ekstrakta [89, 124, 126, 131, 132]. Najbolji način da se proceni uticaj matrice je da se uporedi signal analita u čistom rastvaraču sa signalom analita u ekstraktu matrice. Metoda interne kalibracije, korišćenjem izotopski obeleženih analita kao internih standarda, je veoma pouzdana. Međutim, za primenu ove metode, kada je potrebno odrediti veliki broj analita u jednom analitičkom postupku, neophodno je koristiti veći broj internih standarda koji odgovaraju različitim analitima u smeši, a oni nisu uvek dostupni ili su skupi. U literaturi se često preporučuje metoda standardnog dodatka, koja je pouzdana i značajno poboljšava tačnost i preciznost određivanja, ali zahteva dosta vremena jer se za svaki uzorak mora napraviti posebna kalibraciona kriva [126, 132–134].

S obzirom na to da je jedan od ciljeva ovog rada razvoj multirezidualne metode za identifikaciju i kvantifikaciju pesticida u uzorcima površinske, podzemne i otpadne vode HPLC-ESI-MS metodom, potrebno je obratiti pažnju na pouzdanu i nedvosmislenu potvrdu prisustva analita koji su detektovani u uzorcima. Dve najintenzivnije reakcije fragmentacije (prva za kvantifikaciju, druga za potvrdu) za svaki analit korišćene su da se zadovolje

kriterijumi direktive 96/23/EC [135]. Praćenjem dve SRM reakcije fragmentacije po analitu smanjuje se rizik za pojavu lažnih pozitivnih rezultata i dostiže se minimalan broj identifikacionih tačaka potrebnih za pouzdanu identifikaciju i potvrdu prisustva analita prema direktivi 2002/657/EC [136]. Pozitivna identifikacija analita u uzorku mora striktno da ispunjava dva kriterijuma [137]: (1) retenciono vreme analita u uzorku mora biti u opsegu od $\pm 0,2$ min od retencionog vremena analita u standardnom rastvoru; (2) relativni intenzitet fragmentnih jona analita u uzorku mora biti u opsegu $\pm 30\%$ od onih dobijenih za standardni rastvor. Pomenuta pravila proistekla su iz direktiva koje su ustanovljene za pouzdanu identifikaciju tragova određenih supstanci u hrani, ali se široko primenjuju i u analizi uzoraka iz životne sredine [27, 33, 62, 93, 138].

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. Odabrani pesticidi i priprema korišćenih rastvora

Za istraživanje je odabrano 14 pesticida iz 7 različitih hemijskih grupa. U tabeli 4 dat je pregled ispitivanih pesticida, njihove strukturne formule i molarne mase (M). Odabrani su neki od najčešće korišćenih pesticida u Srbiji: monokrotofos, karbendazim, imidaklopid, acetamiprid, dimetoat, monuron, simazin, karbofuran, karbaril, atrazin, propazin, linuron, malation i tebufenozid. Analitički standardi pesticida visoke čistoće ($> 90\%$) obezbeđeni su iz Riedel-de Haën (Seelze, Nemačka). Pojedinačni standardni rastvori pesticida pripremljeni su u metanolu pri koncentraciji od $100 \mu\text{g cm}^{-3}$. Standardni rastvor smeše pesticida, koncentracije $1 \mu\text{g cm}^{-3}$, napravljen je razblaživanjem metanolom smeše po 1 cm^3 pojedinačnih standarda svakog pesticida koncentracije $100 \mu\text{g cm}^{-3}$ u normalnom sudu od 100 cm^3 . Svi rastvarači bili su analitičke čistoće i nabavljeni su od proizvođača Fluka (Buchs, Švajcarska) ili Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemačka). Dejonizovana voda dobijena je propuštanjem destilovane vode kroz GenPure sistem za prečišćavanje vode (TKA, Niederelbert, Nemačka).

3.2. Snimanje masenih spektara pesticida

Maseni spektri dobijeni su pomoću LCQ Advantage (Thermo Fisher Scientific, Valtham, SAD) masenog spektrometra sa jonskim trapom. Korišćena je tehnika elektrosprej jonizacije (ESI). Maseni spektri svakog ispitivanog pesticida dobijeni su direktnim unošenjem standardnih rastvora pesticida ($10 \mu\text{g cm}^{-3}$) u maseni spektrometar. Tom prilikom je podešena osetljivost instrumenta za odabrane jone ispitivanih pesticida. Optimalni radni parametri jonskog izvora su sledeći: temperatura kapilare ($290 \text{ }^\circ\text{C}$), protok glavnog gasa (26 au), protok pomoćnog gasa (4 au) i napon izvora 4,5 kV. Pri određivanju pesticida kao prekursor joni korišćeni su protonovani molekuli $[\text{M}+\text{H}]^+$, osim kod tebufenozida gde je kao prekursor jon korišćen adukt sa natrijumom $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

Tabela 4. Pesticidi odabrani za analizu

Pesticid	<i>M</i> (g mol ⁻¹)	Strukturna formula	Pesticid	<i>M</i> (g mol ⁻¹)	Strukturna formula
Monokrotofos	223		Karbofuran	221	
Dimetoat	229		Karbaril	201	
Malation	330		Simazin	201	
Imidaklopid	255		Atrazin	215	
Acetamiprid	222		Propazin	229	
Karbendazim	191		Linuron	248	
Tebufenozid	352		Monuron	198	

3.3. Optimizacija hromatografskog razdvajanja pesticida

U ovom radu korišćen je Surveyor HPLC sistem (Thermo Fisher Scientific, SAD). Razdvajanje je vršeno na Zorbax Eclipse® XDB-C18 koloni (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornija, SAD) sa reverznom fazom, dimenzija 75 mm × 4,6 mm i.d. i veličine čestica 3,5 μm. Ispred hromatografske kolone postavljena je predkolona istog proizvođača, dimenzija 12,5 mm × 4,6 mm × 5 μm. Mobilna faza se sastojala od dejonizovane vode,

metanola i 10% rastvora sirćetne kiseline. Optimizovanjem različitih gradijenata mobilne faze pokazano je da se optimalno hromatografsko razdvajanje pesticida postiže korišćenjem gradijenta prikazanog u tabeli 5. Početni uslovi su ponovo uspostavljeni i zadržani 15 minuta. Protok mobilne faze bio je $0,5 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. U HPLC sistem je unošeno $10 \mu\text{l}$ uzorka.

Tabela 5. Sastav i gradijent mobilne faze za hromatografsko razdvajanje pesticida

VREME (min)	PROTOK ($\text{cm}^3 \text{ min}^{-1}$)	H ₂ O (%)	CH ₃ OH (%)	10% CH ₃ COOH (%)
0,00	0,5	66,0	33,0	1,0
7,50	0,5	41,0	58,0	1,0
15,00	0,5	0,0	100,0	1,0
15,10	0,5	66,0	33,0	1,0
30,00	0,5	66,0	33,0	1,0

3.4. Optimizacija HPLC-MS/MS parametara

Nakon izbora odgovarajuće mobilne faze, ponovo je podešena osetljivost masenog spektrometra i optimizovani su instrumentalni uslovi za nedvosmisleni identifikaciju tragova odabranih pesticida. Standardni rastvor svakog analita koncentracije $10 \mu\text{g cm}^{-3}$ unošeno je u tok mobilne faze. Za svaki analit su snimljeni maseni spektri u režimu pozitivne jonizacije u opsegu m/z 50–500. Najintenzivniji joni u MS spektru su dalje fragmentisani uz optimizaciju energije sudara za dobijanje najintenzivnijeg i najstabilnijeg fragmentnog jona. Na osnovu rezultata MSⁿ analize, izabrane su karakteristične reakcije fragmentacije za kvantitativno određivanje svakog analita u konačno razvijenoj HPLC-MS/MS metodi. Za svaki analit, u režimu praćenja odabrane reakcije fragmentacije (SRM) izvršena je optimizacija širine opsega izolacije prekursor jona, izbor optimalne energije sudara i identifikacija najintenzivnijeg fragmentnog jona. Najosetljivija reakcija u SRM režimu izabrana je za kvantifikaciju. Takođe je razvijena i metoda za potvrdu prisustva pesticida u realnim uzorcima, za svaki pesticid posebno, pod prethodno pomenutim hromatografskim uslovima.

SRM detekcija podeljena je na pet vremenskih segmenata, a u svakom segmentu su sakupljeni podaci za maksimalno četiri analita. Naime, korišćenje tandem masene spektrometrije generalno omogućava analizu bez potpune hromatografske separacije analita.

S obzirom na to da se osetljivost MS detektora smanjuje sa povećanjem broja istovremeno zabeleženih reakcija, ipak je neophodan određeni stepen razdvajanja kako bi se omogućilo praćenje manjeg broja reakcija fragmentacije u različitim vremenskim segmentima tokom analize.

3.5. Optimizacija ekstrakcije tragova pesticida na čvrstoj fazi

3.5.1. Izbor odgovarajućeg sorbenta i rastvarača za eluiranje

Detaljnim pregledom literature utvrđeno je da se za ekstrakciju ostataka pesticida iz vode koristi nekoliko poznatih vrsta sorbenata različitih proizvođača [4, 42, 43, 86, 91, 139, 140]. Za ovo istraživanje upotrebljeni su sledeći sorbenti:

OASIS HLB sorbent je proizvod američke kompanije Waters. To je vodonatopivi, makroporozni kopolimer napravljen od dva izbalansirana monomera, hidrofilnog N-vinilpirolidona i lipofilnog divinilbenzena. Takav sastav daje mu veću reverzno-faznu sposobnost za zadržavanje polarnih analita. Efikasan je za čestice prečnika 60 μm , pa čak i do 5 μm , a može se primenjivati za kisela, bazna i neutralna jedinjenja i u sredini koja može imati bilo koju pH vrednost ($\text{pH} = 0\text{--}14$). Pozitivna osobina je i to što u radu sa njim nema opasnosti od sušenja sorbenta usled potpunog prolaska rastvora. U ovom istraživanju korišćen je OASIS HLB kertridž (200 mg/6 cm^3) firme Waters, Milford, SAD.

SUPELLEAN ENVI-18 sorbent je namenjen za analiziranje sadržaja vodenih uzoraka iz životne sredine. Sastoji se od polimerno vezanih C18-grupa (17% C). Pogodan je za rad pri ekstremnim pH-vrednostima, a pokazao se odličnim za ekstrakciju herbicida i fungicida iz otpadnih voda. Mehanizam zadržavanja ciljnog jedinjenja je reverzno-fazni. U ovom istraživanju korišćen je Supelclean ENVI-18 kertridž čija je zapremina 6 cm^3 , a masa pakovanog sorbenta 500 mg (firme Supelco, Belfont, SAD).

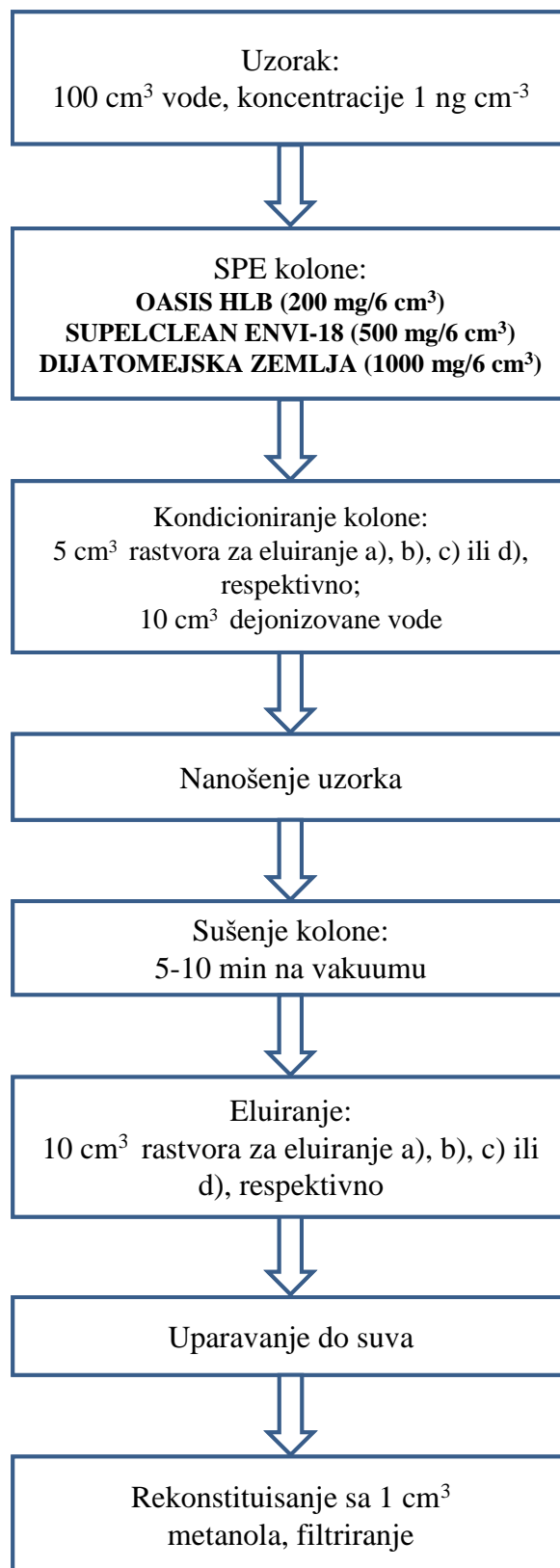
DIJATOMEJSKA ZEMLJA. Pored pomenutih industrijski proizvedenih kertridža, u ovom istraživanju korišćeni su i kertridži pripremljeni u laboratoriji. Dijatomejska zemlja (dijatomit) predstavlja prirodnu sedimentnu stenu koja je nastala od fosilnih ostataka diatoma,

najčešće vrste fitoplanktona. Uobičajen hemijski sastav dijatomita je: oko 89% SiO₂, 3,8% Al₂O₃, 1% Fe₂O₃, 2,5% Na₂O, 2,5% K₂O, 0,5% CaO, 0,5% MgO i 0,2% TiO₂. Usled velike poroznosti dijatomit je lagan, a zbog mekoće se lako usitnjava do praška sa abrazivnim svojstvima. Kertridži sa dijatomejskom zemljom (Sigma-Aldrich) su pripremljeni na sledeći način: sorbent mase 1000 mg pakovan je između dve porozne frite u praznoj SPE koloni, zapremine 6 cm³.

Kao rastvarači za eluiranje korišćeni su:

- a) čist metanol
- b) smeša metanol-dihlormetan, u zapreminskom odnosu 1:1
- c) smeša metanol-acetonitril, u zapreminskom odnosu 1:1
- d) smeša metanol-etilacetat, u zapreminskom odnosu 1:1

Za ovaj eksperiment uzorak vode pripremljen je na sledeći način: u 100 cm³ dejonizovane vode, bez prethodno podešene pH-vrednosti (pH ~ 4,5), dodat je rastvor smeše pesticida tako da koncentracija svakog analita u finalnom ekstraktu bude 100 ng cm⁻³. Pre nanošenja uzorka, vršeno je kondicioniranje pakovanja kolone za što veću sposobnost zadržavanja pesticida iz uzorka. Kondicioniranje je vršeno laganim nanošenjem 5 cm³ odabranog rastvarača za eluiranje, a zatim 10 cm³ dejonizovane vode. Nakon nanošenja uzorka, punjenje je sušeno 5-10 min na vakuumu. Za ekstrakciju analita sa pakovanja korišćen je odabrani rastvarač za eluiranje u zapremini od 10 cm³. Uparavanje do suva dobijenog ekstrakta vršeno je u blagoj struji azota u vodenom kupatilu na temperaturi od 30 °C. Zadnji korak procedure ekstrakcije je rekonstituisanje sa 1 cm³ metanola, zatim homogenizovanje pomoću Vorteks aparata i filtriranje kroz PVDF (poliviniliden-difluorid) filter, veličine pora 0,45 μm (Roth, Karlsruhe, Nemačka) u bočicu za autosempler. Procedura ekstrakcije na čvrstoj fazi prikazana je na slici 7.



Slika 7. Procedura ekstrakcije na čvrstoj fazi

3.5.2. Izbor optimalne pH-vrednosti uzorka

Nakon eksperimenta na osnovu kojeg su izabrani optimalni sorbent i eluent koji će se dalje koristiti u radu, određivana je optimalna pH-vrednost uzorka. Uticaj pH-vrednosti uzorka na prinos ekstrakcije ispitivan je na vrednostima 2,0 4,5 i 6,0. Vrednosti pH iznad 6,0 nisu istražene jer je ranije pokazano da vrednosti preko 6,0 (uključujući i 7,5 kao prosečnu pH-vrednost prirodnih voda) nisu povoljne za ekstrakciju nekoliko pesticida odabranih u ovoj studiji [141]. Za podešavanje pH-vrednosti korišćen je rastvor hlorovodonične kiseline koncentracije 1 mol dm^{-3} i rastvor amonijaka koncentracije 5 mol dm^{-3} . Svi reagensi bili su analitičke čistoće. Za ovaj eksperiment uzorak dejonizovane vode od 100 cm^3 pripremljen je tako što je podešena pH na jednu od ispitivanih vrednosti, a zatim je uzorku dodat rastvor smeše pesticida tako da koncentracija svakog analita u finalnom ekstraktu bude 100 ng cm^{-3} . Procedura ekstrakcije na čvrstoj fazi je izvedena na isti način kao i kod prethodnih eksperimenata.

3.5.3. Izbor optimalne zapremine uzorka

Sledeći korak u optimizaciji metode ekstrakcije na čvrstoj fazi je određivanje optimalne zapremine uzorka. Pri ovom određivanju vršen je odabir između sledećih vrednosti zapremina: 100 cm^3 , 250 cm^3 , 500 cm^3 i 1000 cm^3 . Zapremina krajnjeg ekstrakta u svim izvedenim eksperimentima je bila 1 cm^3 pri čemu je postignuto predkoncentrisanje uzorka od 100, 250, 500 i 1000 puta. U sve uzorke vode sa podešenom vrednošću $\text{pH} = 6$ dodata je ista zapremina rastvora smeše pesticida različite koncentracije tako da je krajnja koncentracija analita u finalnom ekstraktu za sve uzorke bila 100 ng cm^{-3} . Ekstrakti su dobijeni na isti način kao i kod prethodnih eksperimenata.

3.5.4. Validacija metode

Parametri koji su ispitivani prilikom validacije metode u ovom radu su prinos i ponovljivost metode, linearnost, granica detekcije (LOD) i granica kvantifikacije (LOQ). Nakon razvoja i optimizacije metode, ista je testirana na realnim uzorcima podzemne i površinske vode, koji su pripremljeni tako da sadrže odabrane pesticide u koncentracijama 40 ng dm^{-3} i 200 ng dm^{-3} . U konačno dobijenim ekstraktima očekuju se koncentracije od 10 ng cm^{-3} i 50 ng cm^{-3} . Prethodnom analizom uzoraka podzemne i površinske vode utvrđeno je da ne

sadrže tragove posmatranih analita. Pre dodatka rastvora smeše pesticida uzorci podzemne i površinske vode filtrirani su kroz filtere od staklenih vlakana poroznosti $< 1 \mu\text{m}$ (Whatman GmbH, Dassel, Nemačka). Pripremljeni uzorci vode analizirani su prema optimizovanoj SPE proceduri.

Prinosi metode i ponovljivost (izražena kao relativna standardna devijacija, RSD) utvrđeni su putem intra-dnevnih (tri probe istog uzorka u jednom danu) i inter-dnevnih analiza (po tri probe istog uzorka u tri dana u nizu). Granice detekcije i kvantifikacije razvijene metode za svaki pesticid su izračunate koristeći odnos signala i šuma (engl. signal to noise – S/N) iz SRM masenih hromatograma uzoraka podzemne i površinske vode sa dodatom smešom pesticida u koncentraciji od 40 ng dm^{-3} . LOD i LOQ su određene kao najmanje koncentracije analita koje je moguće detektovati sa S/N odnosom od 3 i 10, respektivno. Linearnost analitičke metode definiše se kao mogućnost da se u datom opsegu detektuje signal koji je direktno proporcionalan koncentraciji ili količini analita. Takođe, u toku validacije analitičke metode potrebno je odrediti i uticaj matrice poređenjem intenziteta signala analita u čistom rastvaraču i u rastvoru koji odgovara matrici uzorka.

3.6. Kalibracija

Kao metoda kalibracije korišćena je metoda eksterne kalibracije sa standardima koji odgovaraju matrici uzorka. Prilikom optimizacije analitičke metode, standard je pripremljen tako što je deionizovana voda prolazila kroz istu SPE proceduru, uporedo sa uzorkom, a nakon uparavanja ekstrakta dodato je 1 cm^3 standardnog rastvora pesticida, koncentracije 100 ng cm^{-3} . Za eksperimente sa uzorcima površinske i podzemne vode, za svaku vrstu vode pripremljeno je 5 kalibracionih rastvora koncentracija 10, 25, 50, 100 i 250 ng cm^{-3} , kako bi se formirala eksterna kalibraciona kriva sa pet tačaka, pri čemu je standardni rastvor analita dodat u ekstrakte slepe probe nakon SPE procedure. Standardi koji odgovaraju matrici uzorka pripremljeni su za svaki tip vode, tj. za svaku grupu uzoraka istog izvora (npr. iste reke). Pre pripreme kalibracionih rastvora, utvrđeno je da slepe probe svih tipova vode ne sadrže tragove odabranih pesticida.

3.7. Oblast uzorkovanja i uzimanje uzoraka površinske i podzemne vode

Dunavski sliv na teritoriji Srbije može se podeliti na gornju i donju deonicu. Prva deonica sliva pokriva područje od mađarske granice do Beograda. Druga deonica pokriva područje od Beograda do granice sa Bugarskom, uključujući i akumulaciona jezera hidroelektrana (HE) Đerdap I i Đerdap II, koja se nalaze u pograničnom području sa Rumunijom. Sliv reke Dunav na teritoriji Srbije čine podslivovi reka Tise, Save i Morave. Podsliv reke Tise je najveći u slivu Dunava (157186 km²), a prema proticaju Tisa je druga po veličini pritoka Dunava. Reka Tisa je najduža pritoka (966 km) Dunava, međutim, samo 5% (164 km) njenog slivnog područja nalazi se na teritoriji Srbije. Reka Sava je druga po veličini pritoka Dunava i predstavlja jedan od najznačajnijih basena u regionu (95419 km²). Ova reka je po vodnosti najveća pritoka Dunavu na teritoriji Republike Srbije. Donji tok ove reke (u dužini od 206 km) protiče kroz Srbiju i uliva se u Dunav u Beogradu. Reka Morava je duga 185 km, sa površinom sliva od 6126 km², a uliva se u Dunav severoistočno od Smedereva. Još jedna pritoka Dunava u Srbiji je reka Pek, duga 129 km sa slivnom površinom od 1230 km².

Poljoprivredno zemljište čini oko 66% ukupne površine Republike Srbije. Glavna poljoprivredna područja su regioni južno i severno od reka Save i Dunava, uključujući i dolinu reke Morave. Poljoprivredno zemljište duž reke Dunav uglavnom se koristi za uzgajanje žitarica (kukuruz i pšenice kao najrasprostranjenijih, kao i suncokreta, ječma, ovasa i raži), pa je stoga količina pesticida koja se koristi u ovom području znatno viša nego u ostalim područjima.

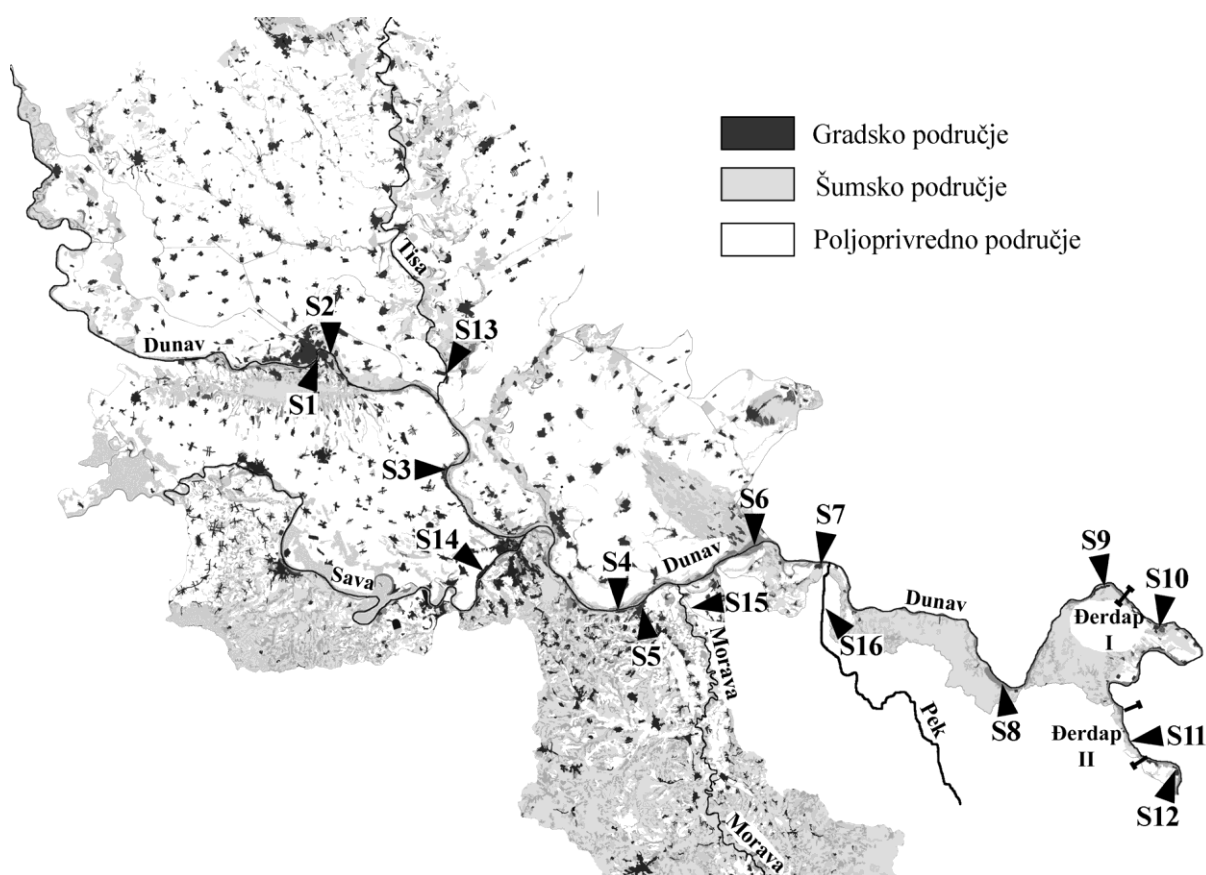
Praćenje stanja zagađenosti vode najčešće korišćenim pesticidima u Srbiji vršeno je na šesnaest mesta uzorkovanja (tabela 6 i slika 8), dvanaest na reci Dunav i četiri u područjima ulivanja pritoka u Dunav: reke Tise (1 km pre ušća), reke Save (5 km pre ušća), reke Morave (1 km pre ušća) i manje pritoke - reke Pek (8 km pre ušća). Ukupno je ispitano oko 410 km toka reke Dunav. Tri mesta uzorkovanja (Ledinci, Novi Sad, Stari Banovci, S1–S3) nalaze se u gornjoj deonici sliva Dunava u Srbiji. U donjoj deonici, šest mesta uzorkovanja (Smederevo, Kovin, Ram, Veliko Gradište, Donji Milanovac i Tekija, S4–S9) se nalaze pre HE Đerdap I, dva mesta uzorkovanja (Kladovo i Kusjak, S10 i S11) se nalaze pre HE Đerdap II, a jedno mesto uzorkovanja (Radujevac, S12) se nalazi nizvodno od akumulacije HE Đerdap II.

Uzorci vode prikupljeni su u dvanaest kampanja uzorkovanja, u junu i oktobru 2009. godine, februaru, aprilu, maju, junu, septembru i oktobru 2010. godine, u junu, septembru i novembru 2011. i u aprilu 2012. godine. Mesta uzorkovanja površinske vode uključivala su poljoprivredna, šumska i gradska područja (slika 8). Zemljište u blizini mesta uzorkovanja na pritokama Dunava – Tisi, Moravi i Peku (S13, S15 i S16), kao i u blizini mesta uzorkovanja Kovin (S5) i Kusjak (S11), uglavnom se koristi u poljoprivredne i šumske svrhe. Mesta uzorkovanja na reci Dunavu, kao što su Ram (S6), Veliko Gradište (S7), Tekija (S9), Kladovo (S10) i Radujevac (S12), i područje ulivanja reke Save u Dunav (S14) su visoko urbanizovana. Područja u blizini ostalih mesta na kojima je vršeno praćenje zagađenja pesticidima (Ledinci, Novi Sad, Stari Banovci, Smederevo, S1–S4, i Donji Milanovac, S8) uglavnom su urbanizovana, sa manjim brojem poljoprivrednih površina.

Tabela 6. Opis mesta uzorkovanja površinske vode

Mesto uzorkovanja	Oznaka mesta uzorkovanja	Opis mesta uzorkovanja	Prosečan godišnji protok (m³ s⁻¹)
Ledinci	S1	1260 km toka Dunava	2150
Novi Sad	S2	1254 km toka Dunava	2150
Stari Banovci	S3	1192 km toka Dunava	2150
Smederevo	S4	1112 km toka Dunava	5989
Kovin	S5	1098 km toka Dunava	5750
Ram	S6	1072 km toka Dunava	6217
Veliko Gradište	S7	1059 km toka Dunava	6432
Donji Milanovac	S8	991 km toka Dunava	6456
Tekija	S9	956 km toka Dunava	6561
Kladovo	S10	934 km toka Dunava	6523
Kusjak	S11	864 km toka Dunava	6506
Radujevac	S12	851 km toka Dunava	6499
Tisa	S13	1 km pre ušća	630
Sava	S14	5 km pre ušća	2110
Morava	S15	1 km pre ušća	126
Pek	S16	8 km pre ušća	30

Uzorci vode su uzimani na dubini od 50 cm ispod površine, u središnjem toku reke. Uzorci su prikupljeni u boce od 1 dm³ i čuvani u frižideru na 4 °C bez konzervansa, sve dok nisu pripremljeni za analizu, obično 1–2 dana nakon uzorkovanja. Pre pripreme svi uzorci vode su filtrirani kroz filtere od staklenih vlakana poroznosti < 1 μm.



Slika 8. Profil na Dunavu na kojima su vršena uzorkovanja

S obzirom na to da se danas u Republici Srbiji za vodosnabdevanje koristi uglavnom voda iz podzemnih izvora, i to nešto ispod 75%, pretežno iz aluvijalnih sredina, bilo je neophodno analizirati i uzorke podzemnih voda na prisustvo tragova pesticida. Mesta uzorkovanja podzemnih voda možemo podeliti na pet lokaliteta, i to: Knićanin – Čenta, Kovin – Dubovac, izvorište „Trnovče”, izvorište „Mediana” i izvorište „Ključ” (tabela 7). Odabir lokaliteta izvršen je na osnovu sadašnjeg i budućeg značaja u vodoprivredi Srbije. Ovi lokaliteti imaju veliki regionalni značaj kako zbog površine koju obuhvataju, tako i zbog broja stanovnika kojima obezbeđuju vodosnabdevanje. Lokalitet Knićanin – Čenta predstavlja područje sa veštački uređenim režimom podzemnih voda. To je oblast ušća Tise u Dunav, površine 92 km², sa razvijenom intenzivnom poljoprivredom. Na ovom lokalitetu analizirana je voda iz tri bunara i 2 pijeziometra. Kovin – Dubovac takođe predstavlja područje sa veštački uređenim režimom podzemnih voda, koje se nalazi se na Dunavu i obuhvata naselja Dubovac, Gaj, Malo Bavanište i Kovin, sa površinom od oko 177 km². Na ovom lokalitetu analizirana je voda iz 2 bunara i 4 pijeziometra. Lokalitet Kovin – Dubovac ima poseban

značaj zato što se razmatra kao potencijalno regionalno izvorište, a odlikuje ga razvijena intenzivna poljoprivreda. Izvorište „Trnovče” nalazi se na levoj obali Morave u blizini sela Trnovče. Planirano je kao deo većeg regionalnog izvorišta Trnovče – Miloševac – Lozovik za vodosnabdevanje Velike Plane i Smederevske Palanke, a analizirana je voda iz jednog bunara. Izvorište „Mediana” je značajno zbog toga što se koristi za vodosnabdevanje Niša i okolnih prigradskih naselja (sa 15%), a nalazi se na reci Nišavi. Na ovom lokalitetu analizirana je voda iz dva bunara. Izvorište „Ključ” nalazi se pored reke Morave, blizu Požarevca, a istraživanjem su obuhvaćena tri bunara i jedan pijezometar na ovom lokalitetu [142].

Tabela 7. Opis mesta uzorkovanja podzemne vode

Lokalitet	Mesto uzorkovanja	Opis mesta uzorkovanja	Oznaka mesta uzorkovanja
Knićanin – Čenta	Bunar B - 5	Ušće Tise u Dunav	GW 11
	Bunar B - 9		GW 12
	Bunar B - 9/P2		GW 12/2
	Bunar B - 14		GW 13
	Bunar B - 14/P2		GW 13/2
Kovin – Dubovac	Bp - 12	Dunav	GW 21
	Bp - 12/P1		GW 21/1
	Bp - 12/P2		GW 21/2
	Bp - 19		GW 22
	Bp - 19/P1		GW 22/1
	Bp - 19/P2		GW 22/2
Izvorište „Trnovče”	Trnovce BNZ 1	Morava	GW 31
Izvorište „Mediana”	Nova natega	Nišava	GW 41
	Natega EI		GW 42
Izvorište „Ključ”	Vb - 2	Morava	GW 51
	Vb - 2/P1		GW 51/1
	Vb - 6		GW 52
	Bunar 7		GW 53

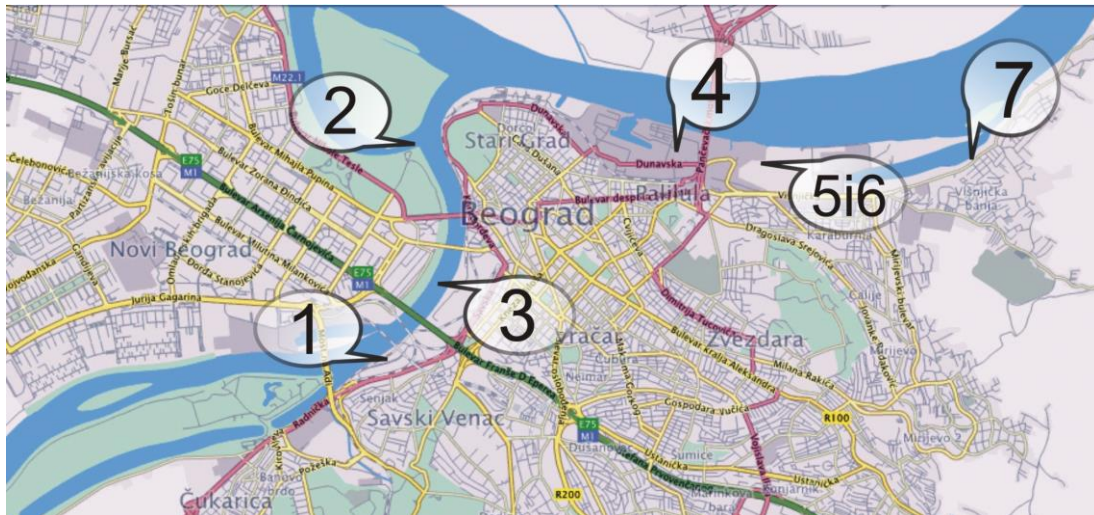
3.8. Uzorkovanje otpadnih voda

Analitička metoda razvijena za određivanje tragova pesticida u površinskoj i podzemnoj vodi, nakon validacije, primenjena je i na uzorke otpadne vode.

3.8.1. Uzorci komunalne otpadne vode Beograda

U cilju dobijanja realne ocene kvaliteta otpadnih voda beogradske kanalizacije uzorkovanje se vrši kontinualno tokom 24 h, automatskim uzorkivačem (sa po 24 boce), a zatim se pripremaju kompozitni ili zbirni uzorci mešanjem određenih zapremina uzetih u određenom vremenskom intervalu. Na taj način dobijaju se šestočasovni zbirni uzorci, tako da po 4 ovakva kompozitna uzorka pokrivaju praćenje kvaliteta otpadne vode ispitivanog mernog mesta tokom 24 h. Uzorci vode su prikupljeni u boce od 1 dm³ i čuvani u frižideru na 4 °C bez konzervansa, sve dok nisu analizirani, obično 1–2 dana nakon uzorkovanja. Pre pripreme svi uzorci vode su filtrirani dva puta kroz filtere od staklenih vlakana poroznosti < 1 µm.

Beogradski kanalizacioni sistem je složeni tehničko-tehnološki sistem koji se prostire na oko 180 km² površine grada. Osnovna delatnost beogradskog kanalizacionog sistema je prihvatanje, prepumpavanje i odvođenje atmosferskih i upotrebljenih voda, kao i ekološki monitoring zaštite kanalizacionog sistema i recipijenta. Kanalizacionu mrežu Beograda čini 22 km kolektora, 1463 km cevne mreže, 32820 slivnika i 53694 kanalizacionih priključaka. Mesta uzorkovanja obuhvataju 80% svih ispusta komunalne otpadne vode u Beogradu (slika 9). Uzorkovanje je izvršeno na sledećim tačkama: Sajam (1), Ušće (2), Lasta (3), Istovar (4), Ada Huja 1 (5), Ada Huja 2 (6) i Višnjica (7). U junu 2011. godine izvršena je analiza uzoraka vode uzetih sa svih 7 mernih lokacija, a u julu iste godine sa 4 merne lokacije (Sajam, Ušće, Ada Huja 1, Ada Huja 2).



Slika 9. Mesta uzorkovanja komunalnih otpadnih voda Beograda

3.8.2. Uzorci iz postrojenja za prečišćavanje otpadnih voda

U ovoj studiji ispitivan je i sadržaj pesticida u komunalnoj otpadnoj vodi pre i posle tretmana u dva postrojenja za prečišćavanje otpadnih voda (PPOV), u Somboru i Velikoj Plani. PPOV u Somboru ima primarni i sekundarni tretman otpadnih voda sa biološki aktivnim muljem. Projektovani kapacitet ovog postrojenja je 180000 ES (ekvivalentnih stanovnika – ES) ili tretman količine otpadne vode od 14800 m³/dan, dok je realni kapacitet postrojenja 50000 ES ili tretman količine otpadne vode od 9300 m³/dan. Ekvivalentni stanovnik označava jedinicu opterećenja koja se primenjuje u izražavanju kapaciteta postrojenja za prečišćavanje otpadnih voda i predstavlja organsko biorazgradivo opterećenje koje ima petodnevnu biohemijsku potrošnju kiseonika (BPK5) od 60 g O₂/dan. Postrojenje za prečišćavanje otpadne vode u Velikoj Plani takođe ima primarni i sekundarni vid prečišćavanja sa biološki aktivnim muljem i kapacitet od 35000 ES. Otpadna voda na ulazu i izlazu PPOV, uzorkovana je u februaru i martu 2011. godine.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

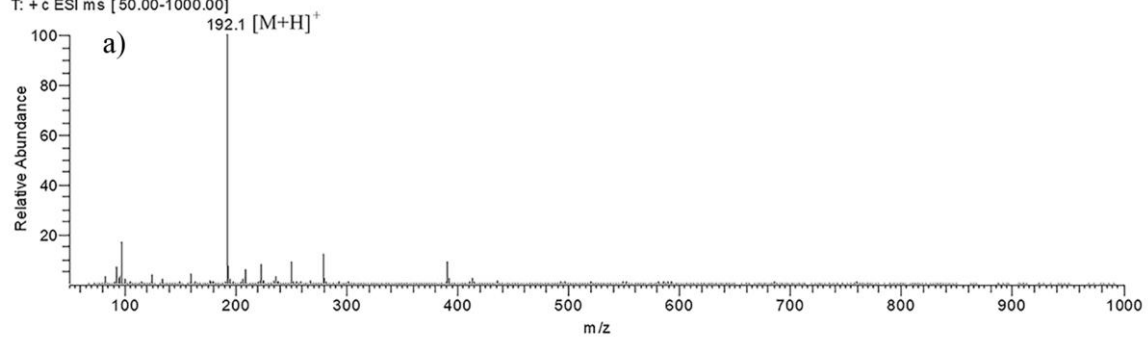
4.1. Analiza pesticida u uzorcima površinskih i podzemnih voda

4.1.1. Maseni spektri pesticida

Maseni spektri svakog ispitivanog pesticida dobijeni su direktnim unošenjem standardnog rastvora pesticida koncentracije $10 \mu\text{g cm}^{-3}$ u maseni spektrometar. Svi rastvori su ubrizgavani pomoću špric pumpe protokom $5 \mu\text{L min}^{-1}$ u mobilnu fazu koja se sastojala od dejonizovane vode (66%), metanola (33%) i 10% sirćetne kiseline (1%), pri brzini protoka od $0,5 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. Identifikacija prekursor jona za svaki analit vršena je u punom režimu skeniranja, snimanjem masenih spektara u opsegu m/z 50–500 u pozitivnom (ESI+) režimu rada elektrosprej jonskog izvora, a u slučaju tebufenozida i u negativnom (ESI–) režimu rada jonskog izvora. Kao prekursor joni za sve pesticide odabrani su protonovani molekuli $[\text{M}+\text{H}]^+$, osim u slučaju tebufenozida. Kod tebufenozida fragmentacijom protonovanog molekula nije bilo moguće dobiti stabilan fragmentni jon, ali je fragmentacijom adukta sa natrijumom ($[\text{M}+\text{Na}]^+$ dobijen veoma stabilan fragment koji je dalje korišćen za kvantifikaciju ovog analita. Takođe, za tebufenozid je dobijen i stabilan deprotonovani molekul, $[\text{M}-\text{H}]^-$. Najzastupljeniji joni u MS spektru podvrgnuti su daljoj MS^n analizi. Za svaki analit, vršeni su optimizacija širine opsega izolacije prekursor jona, izbor optimalne kolizije energije (energije sudara) i identifikacija najzastupljenijeg produkt jona. Najosetljivija reakcija u režimu praćenju odabrane reakcije fragmentacije izabrana je za kvantifikaciju. Kod polovine ispitivanih pesticida MS^2 fragmentacijom nastaje više od jednog fragmentnog jona. Većinu ovako dobijenih fragmenata bilo je moguće dalje fragmentisati (MS^3), dok šest pesticida daje i MS^4 spektre. Na osnovu dobijenih rezultata, za svaki analit je odabrana karakteristična reakcija fragmentacije prekursor jona u najintenzivniji i najstabilniji fragmentni jon na osnovu koje je vršena kvantifikacija. Maseni spektri za karbendazim, imidakloprid i tebufenozid prikazani su na slikama 10–12, a za ostale ispitivane pesticide nalaze se u Prilogu. Rezultati MS^n analize dati su u tabeli 8, u kojoj su obeleženi i joni korišćeni za potvrdu prisustva analita u uzorcima voda.

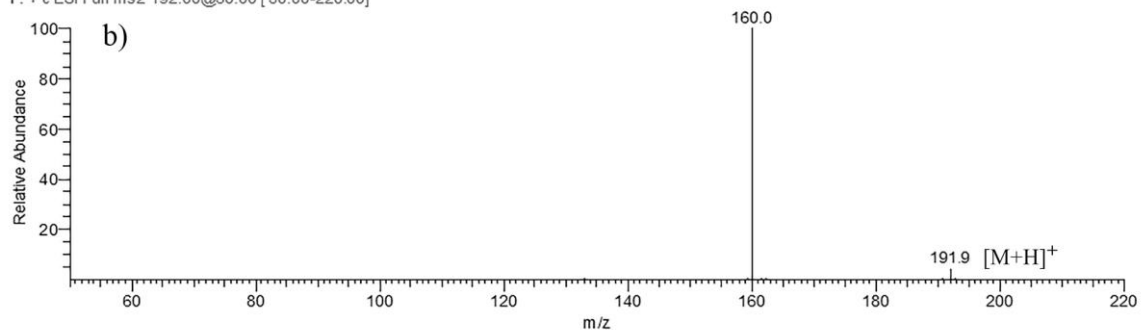
karbendazim RT: 0.22 AV: 1 NL: 2.29E7

T: + c ESI ms [50.00-1000.00]



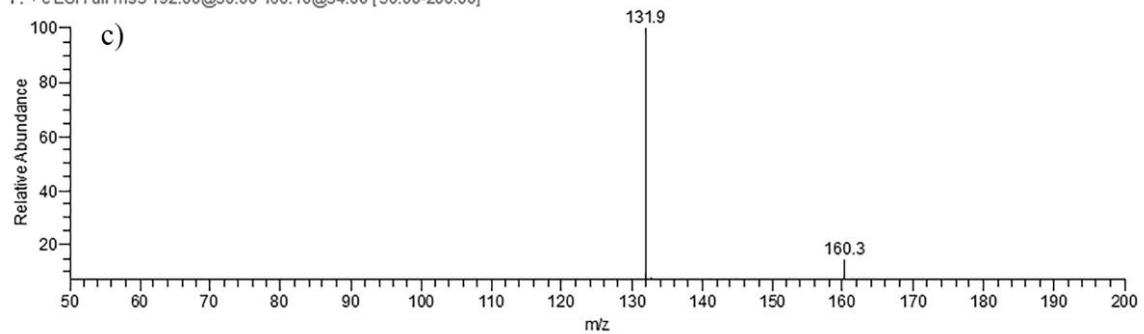
karbendazim RT: 0.79 AV: 1 NL: 2.22E7

F: + c ESI Full ms2 192.00@30.00 [50.00-220.00]



karbendazim RT: 2.62 AV: 1 NL: 1.07E5

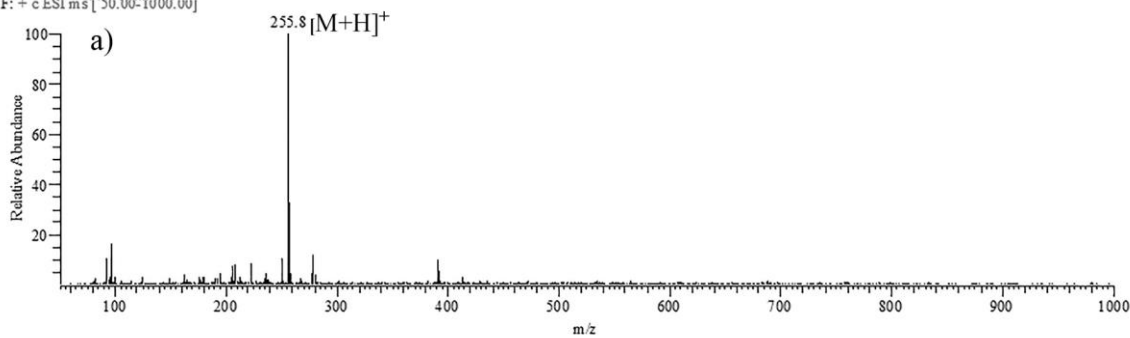
F: + c ESI Full ms3 192.00@30.00 160.10@34.00 [50.00-200.00]



Slika 10. Maseni spektri karbendazima: a) ESI(+) MS ; b) ESI(+) MS^2 $[M+H]^+$;
c) ESI(+) MS^3 $[M+H]^+$

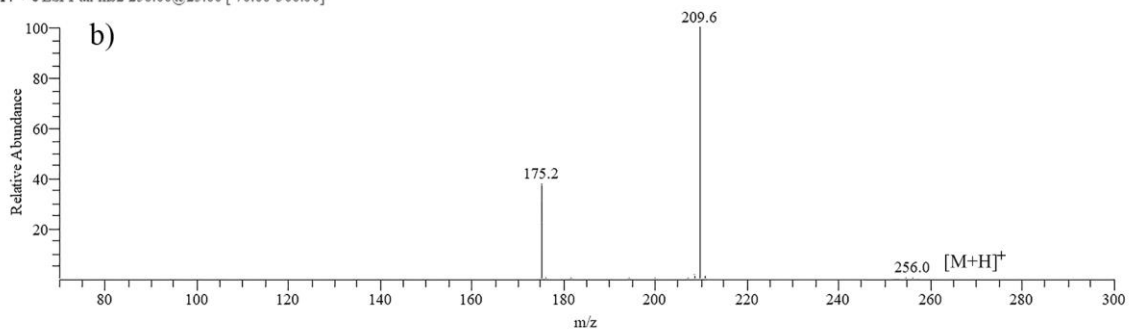
imidaklopid RT: 0.16 AV: 1 NL: 1.28E7

F: + c ESI ms [50.00-100.00]



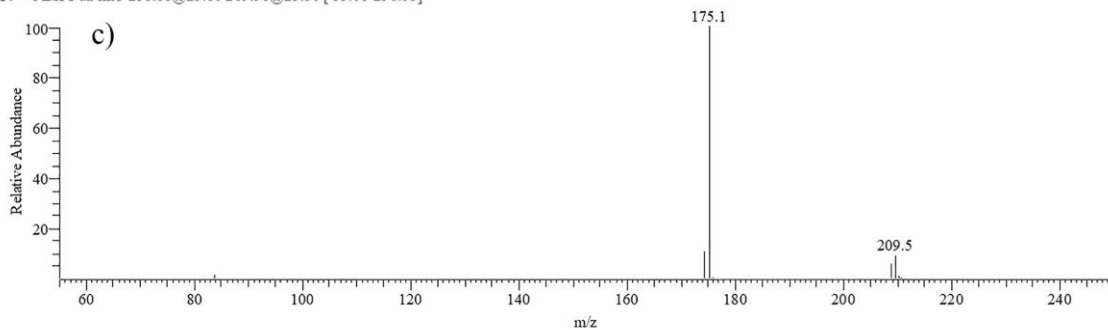
imidaklopid RT: 1.55 AV: 1 NL: 1.09E7

F: + c ESI Full ms2 256.00@25.00 [70.00-300.00]



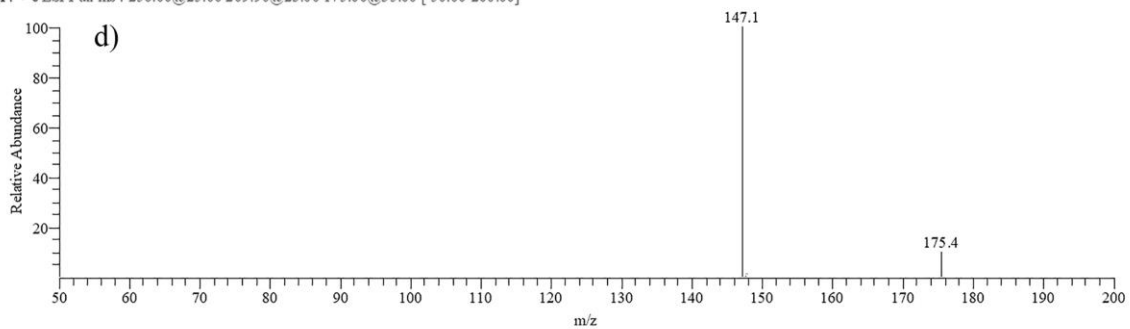
imidaklopid RT: 4.24 AV: 1 NL: 1.26E6

F: + c ESI Full ms3 256.00@25.00 209.90@25.00 [55.00-250.00]



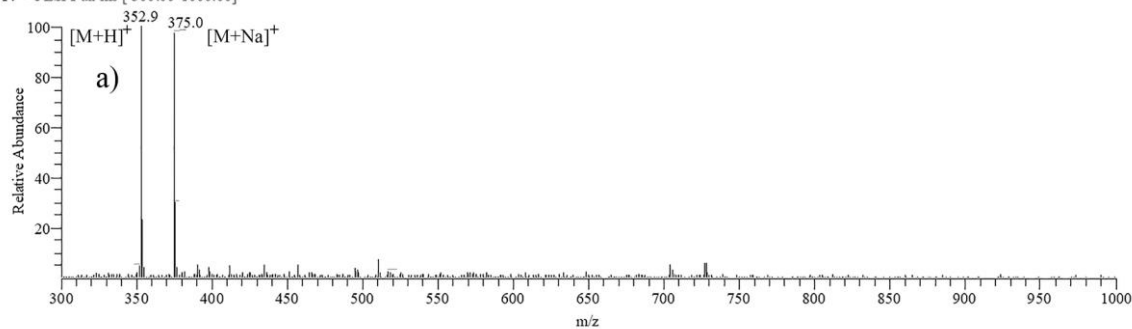
imidaklopid RT: 5.89-6.00 AV: 7 NL: 9.27E3

F: + c ESI Full ms4 256.00@25.00 209.90@23.00 175.00@35.00 [50.00-200.00]

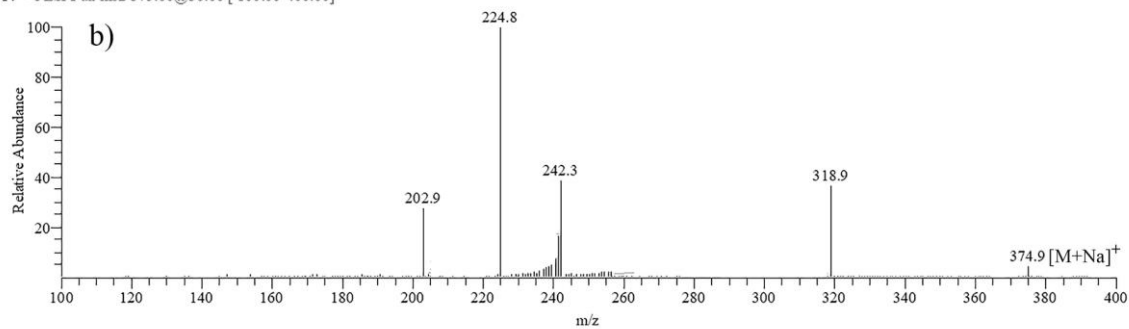


Slika 11. Maseni spektri imidaklopidra: a) ESI(+) MS ; b) ESI(+) MS^2 [M+H]⁺; c) ESI(+) MS^3 [M+H]⁺; d) ESI(+) MS^4 [M+H]⁺

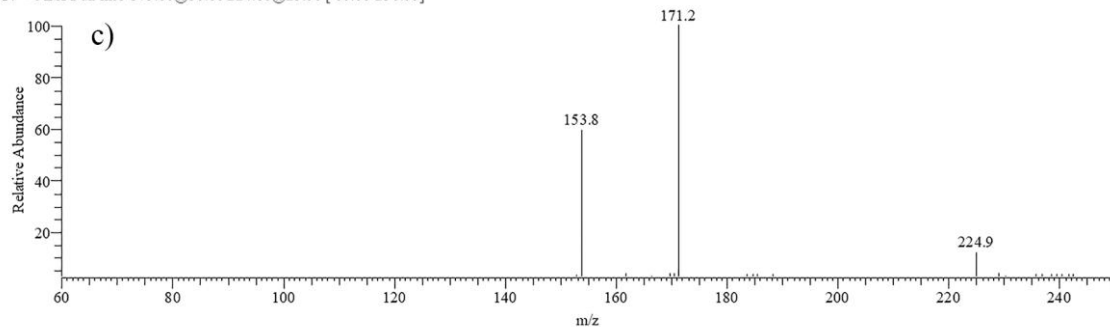
tebufenozid RT: 0.91 AV: 1 NL: 1.06E7
F: + c ESI Full ms [300.00-1000.00]



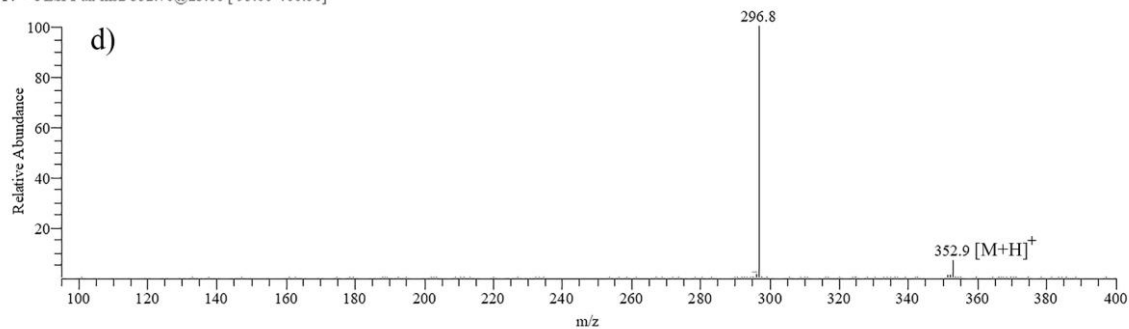
tebufenozid RT: 10.65-11.30 AV: 43 NL: 9.54E5
F: + c ESI Full ms2 375.00@30.00 [100.00-400.00]



tebufenozid RT: 11.92 AV: 1 NL: 7.07E4
F: + c ESI Full ms3 375.00@30.00 224.80@25.00 [60.00-250.00]

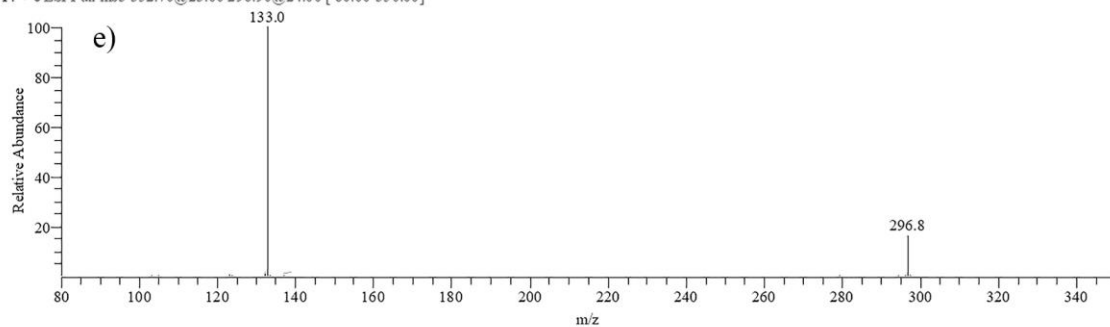


tebufenozid RT: 4.25-4.97 AV: 39 NL: 3.71E5
F: + c ESI Full ms2 352.70@23.00 [95.00-400.00]

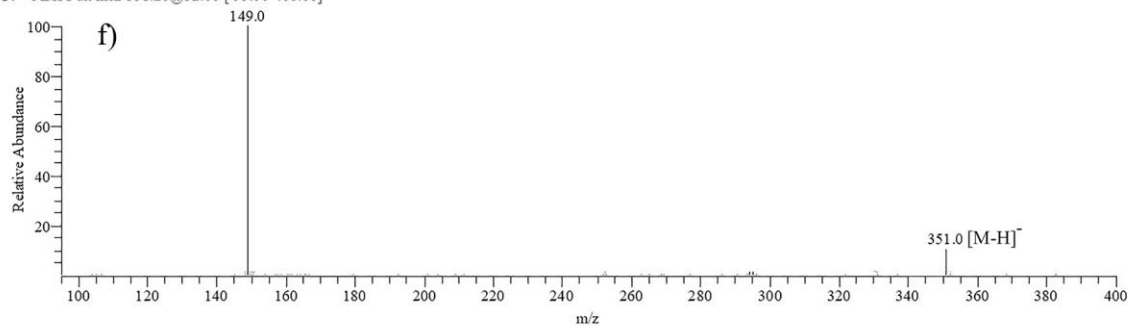


Slika 12. Maseni spektri tebufenozida: a) ESI(+) MS ; b) ESI(+) $MS^2 [M+Na]^+$;
c) ESI(+) $MS^3 [M+Na]^+$; d) ESI(+) $MS^2 [M+H]^+$

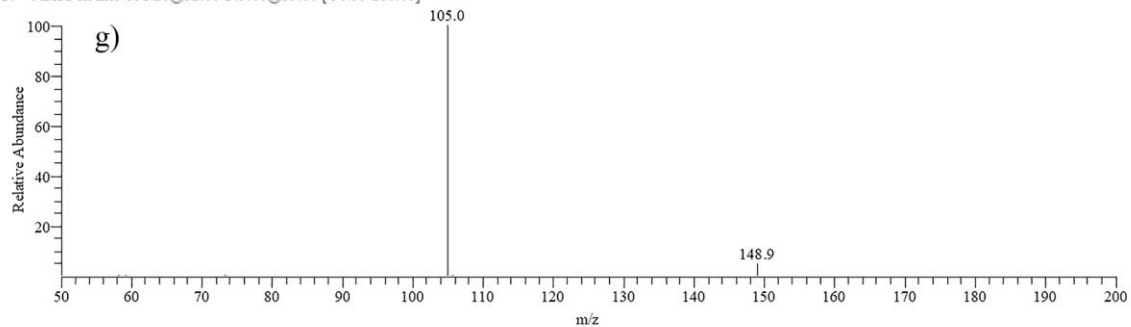
tebufenozid RT: 6.28-6.88 AV: 29 NL: 1.68E5
F: + c ESI Full ms3 352.70@23.00 296.90@24.00 [80.00-350.00]



tebufenozid RT: 18.73-19.20 AV: 23 NL: 9.80E5
F: - c ESI Full ms2 351.20@32.00 [95.00-400.00]



tebufenozid RT: 20.03-20.46 AV: 20 NL: 1.86E4
F: - c ESI Full ms3 351.20@32.00 149.00@35.00 [50.00-200.00]



Slika 12. (nastavak): e) ESI(+) MS^3 $[M+H]^+$; f) ESI(-) MS^2 $[M-H]^-$; g) ESI(-) MS^3 $[M-H]^-$

Tabela 8. Rezultati MSⁿ analize ispitivanih pesticida pomoću ESI-IT-MS/MS (obeleženi joni su korišćeni za potvrdu)

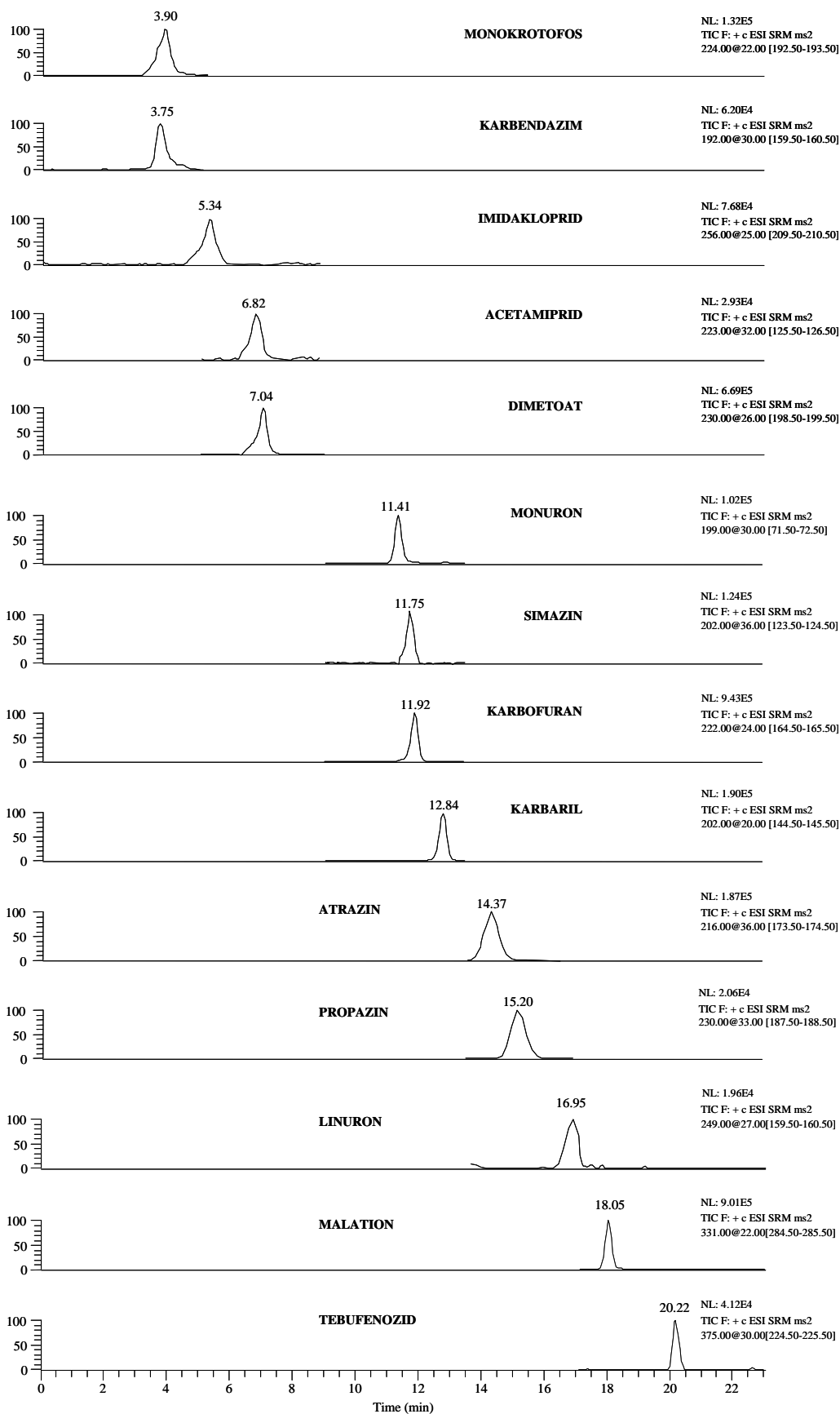
Pesticid	MS	Koliziona energija (%)	MS ²	Koliziona energija (%)	MS ³	Koliziona energija (%)	MS ⁴
Monokrotofos	224 [M+H] ⁺	22	193	25	127	–	–
			167	24	127	–	–
Karbendazim	192 [M+H] ⁺	30	160	30	132	–	–
Imidakloprid	256 [M+H] ⁺	25	210	25	175	35	147
			175	–	–	–	–
Acetamiprid	223 [M+H] ⁺	32	126	–	–	–	–
			187	33	146	–	–
			181	–	–	–	–
			206	34	171	–	–
			196	–	–	–	–
Dimetoat	230 [M+H] ⁺	26	199	22	171	28	143
					157	–	–
Monuron	199 [M+H] ⁺	30	72	–	–	–	–
Simazin	202 [M+H] ⁺	36	124	30	96	26	68
			132	29	104	–	–
			174	32	146	–	–
			–	–	132	–	–
Karbofuran	222 [M+H] ⁺	24	165	27	123	30	95
Karbaril	202 [M+H] ⁺	20	145	31	117	–	–
Atrazin	216 [M+H] ⁺	36	174	35	146	–	–
					132	27	104
					138	–	–
Propazin	230 [M+H] ⁺	33	188	33	146	–	–
			146	–	–	–	–
Linuron	249 [M+H] ⁺	27	160	30	133	–	–
			182	32	153	–	–
Malation	331 [M+H] ⁺	22	285	20	127	22	99
					113	–	–
Tebufenozid	375 [M+Na] ⁺	30	225	25	171	–	–
			319	–	–	–	–
			242	–	–	–	–
			203	24	72	–	–
			297	24	133	–	–
351 [M–H] [–]	32	149	35	105	–	–	

4.1.2. Optimizacija hromatografskog razdvajanja

Optimizacija hromatografskog razdvajanja vršena je u cilju pronalaženja najboljih instrumentalnih uslova koji bi omogućili jasnu identifikaciju analita u realnim uzorcima na nivou tragova. Snimanjem odabranih fragmentnih jona tokom HPLC-MS² analize dobijeni su hromatogrami odabrane reakcije fragmentacije. Tipični maseni hromatogrami dobijeni za standard smeše pesticida u ekstraktu podzemne vode, koncentracije 100 ng cm⁻³, tj. za standard koji odgovara matrici uzorka, prikazani su na slici 13. SRM detekcija podeljena je u pet vremenskih segmenata pri čemu se u svakom segmentu posmatra 3–4 analita, kao što je prikazano u tabeli 9. Pri korišćenju analizatora kao što je maseni detektor nije neophodno potpuno hromatografsko razdvajanje analita, ali da bi se obezbedila zadovoljavajuća osetljivost metode neophodno je podeliti snimanje analita, tokom hromatografskog razdvajanja, u vremenske segmente. Osetljivost MS detektora opada sa porastom broja analita koji se istovremeno posmatraju.

4.1.3. Potvrda prisustva analita

I pored velike selektivnosti tandem masene analize, mogući su lažno pozitivni rezultati. Zato je u cilju nedvosmislene identifikacije potrebno razviti metodu potvrde prisustva analita u uzorku. Za svaki pesticid optimizovani su koliziona energija i opsezi za izolovanje jona u MS, MS², MS³ i/ili MS⁴ analizi da bi se dobila metoda potvrde prisustva analita, kao što je prikazano u tabelama 8 i 9. Fragmentni joni su navedeni prema njihovom intenzitetu, a oni koji su korišćeni za potvrdu su jasno obeleženi pravougaonikom. Polovina odabranih pesticida proizvela je više od jednog fragmentnog jona pri MS² fragmentaciji. Pored jona koji je korišćen za kvantifikaciju, dodatni fragmenti joni su korišćeni u cilju potvrde prisustva analita. Druga polovina odabranih pesticida proizvela je fragmentne jone pri MS³ analizi koji su korišćeni za potvrdu. Metodu potvrde nije bilo moguće razviti samo u slučaju monurona jer se dodatni stabilni fragmenti nisu mogli dobiti iz njegovog protonovanog molekula.



Slika 13. SRM maseni hromatogrami smeše pesticida u ekstraktu podzemne vode koncentracije 100 ng cm^{-3}

Tabela 9. Optimizovani HPLC–MS i MS² parametri za analizu ispitivanih pesticida

Pesticid	Vreme (min)	Prekursor jon (m/z)	Izolacioni opseg za prekursor jon	Koliziona energija (%)	Produkt jon (m/z)	Izolacioni opseg za produkt jon
Monokrotofos		224	2	22	193	1
Karbendazim	0,0–5,0	192	1	30	160	1
Imidakloprid		256	1	25	210	1
Acetamiprid		223	1	32	126	1
Dimetoat	5,0–9,0	230	2	26	199	1
Imidakloprid		256	1	25	210	1
Monuron		199	1	30	72	1
Simazin	9,0–13,5	202	1	36	124	1
Karbofuran		222	2	24	165	1
Karbaril		202	1,5	20	145	1
Atrazin		216	1	36	174	1
Propazin	13,5–17,0	230	1	33	188	1
Linuron		249	1	27	160	1
Malation		331	2	22	285	1
Tebufenozid	17,0–25,0	375	2	30	225	1
Linuron		249	1	27	160	1

4.1.4. Optimizacija metode pripreme uzoraka

Optimizacija metode pripreme uzorka je važan proces za postizanje visokog prinosa metode, kao i visokog faktora koncentrovanja analita. Optimizovani su sledeći parametri koji mogu uticati na efikasnost postupka ekstrakcije na čvrstoj fazi: tip sorbenta u kombinaciji sa različitim rastvaračima za eluiranje, podešavanje pH-vrednosti uzorka pre ekstrakcije i zapremina uzorka.

Za ekstrakciju izabranih pesticida izvršeno je poređenje dva različita komercijalna kertridža za ekstrakciju na čvrstoj fazi: Oasis HLB i Supelclean ENVI-18, korišćenjem četiri različita rastvarača za eluiranje: metanola, metanol-dihlormetana (1:1), metanol-acetonitrila (1:1) i metanol-etilacetata (1:1). Kao sorbent testirana je i dijatomejska zemlja.

Nakon izbora sorbenta za ekstrakciju na čvrstoj fazi i rastvarača za eluiranje, podešena je pH-vrednosti uzorka pre ekstrakcije. Ispitivane pH-vrednosti bile su sledeće: 2,0, 4,5 i 6,0. Vrednosti pH iznad 6,0 nisu ispitivane jer je prethodno pokazano [141] da vrednosti iznad 6,0 (uključujući 7,5 kao prosečnu pH-vrednosti prirodnih voda) nisu povoljne za ekstrakciju nekoliko pesticida izabranih u ovoj studiji.

Kada su izabrani tip sorbenta i pH-vrednost uzorka, vršena je optimizacija zapremine uzorka. Ispitane su sledeće zapremine: 100 cm³, 250 cm³, 500 cm³ i 1000 cm³.

4.1.4.1. Izbor odgovarajućeg sorbenta i rastvarača za eluiranje

Odabir sorbenata za ekstrakciju na čvrstoj fazi i rastvarača za eluiranje vršen je polazeći od literaturnih podataka [4, 42, 43, 86, 91, 139, 140]. Za ovaj eksperiment, u 100 cm³ dejonizovane vode (bez podešavanja pH-vrednosti; pH ~ 4,5) dodat je standardni rastvor smeše pesticida kako bi se dobila krajnja koncentracija od 100 ng cm⁻³ za svaki analit u finalnom ekstraktu. Ispitana su dva komercijalna SPE kertridža u kombinaciji sa četiri različita rastvarača za eluiranje, kao i kertridži pravljeni sa dijatomejskom zemljom. Rezultati su prikazani u tabeli 10.

Za većinu izabranih pesticida prinosi su bili prihvatljivi za sve ispitane kombinacije komercijalnih kertridža/rastvarača. Pri upotrebi HLB sorbenta, eluiranje sa smešom CH₃OH/CH₃CN uglavnom je davalo niže, ali ipak prihvatljive prinose, osim u slučaju karbendazima (39%). Očigledno je da se ova smeša ne bi trebala koristiti za eluiranje karbendazima, ako se u obzir uzme činjenica da je i prinos pri korišćenju ENVI-18 kertridža bio izrazito nizak (29%). Takođe je primećeno da smešu sa etilacetatom ne bi trebalo koristiti za eluiranje malationa, jer su prinosi bili niski pri upotrebi oba ispitivana kertridža (58% sa HLB kertridžom i 54% sa ENVI-18 kertridžom). Uopšteno govoreći, kada je korišćen ENVI-18 sorbent dobijeni su niži prinosi za manje polarne pesticide. Za linuron i karbofuran prinosi su bili znatno niži kada je korišćen ENVI-18 kertridž (41%–75% i 50%–87%), nego kada je korišćen HLB kertridž (72%–108% i 83%–95%, respektivno). Pored toga, visoke vrednosti relativne standardne devijacije (RSD ≥ 25%) utvrđene su za samo dva pesticida pri upotrebi HLB kertridža, u odnosu na petnaest pesticida pri upotrebi ENVI-18 kertridža, što ukazuje na znatno bolju ponovljivost ekstrakcije pesticida na HLB sorbentu. Što se tiče kertridža

pravljenih sa dijatomejskom zemljom, dobijeni rezultati nisu prikazani jer se posmatrani pesticidi nisu zadržali na dijatomititu.

Tabela 10. Prinosi i ponovljivost (RSD) metode za analizu odabranih pesticida korišćenjem dva SPE kertridža (HLB, ENVI-18) u kombinaciji sa četiri različita rastvarača za eluiranje

Pesticid	Prinosi,% (RSD,%)							
	HLB CH ₃ OH	HLB CH ₃ OH/ CH ₂ Cl ₂	HLB CH ₃ OH/ CH ₃ CN	HLB CH ₃ OH/ CH ₃ COOC ₂ H ₅	ENVI-18 CH ₃ OH	ENVI-18 CH ₃ OH/ CH ₂ Cl ₂	ENVI-18 CH ₃ OH/ CH ₃ CN	ENVI-18 CH ₃ OH/ CH ₃ COOC ₂ H ₅
Monokrotofos	82 (7)	97 (20)	60 (21)	101 (2)	100 (25)	77 (21)	99 (29)	103 (26)
Karbendazim	74 (18)	117 (18)	39 (15)	70 (18)	75 (22)	94 (23)	29 (21)	49 (24)
Imidakloprid	92 (6)	76 (7)	74 (9)	97 (2)	106 (27)	89 (26)	120 (25)	108 (28)
Acetamiprid	101 (8)	98 (22)	114 (18)	128 (22)	103 (6)	180 (4)	136 (8)	165 (9)
Dimetoat	98 (8)	91 (11)	74 (11)	98 (22)	88 (21)	73 (29)	92 (24)	80 (28)
Monuron	72 (21)	101 (23)	71 (19)	99 (25)	144 (14)	108 (24)	108 (20)	118 (16)
Simazin	104 (11)	118 (20)	94 (22)	96 (13)	120 (10)	101 (10)	111 (18)	101 (19)
Karbofuran	92 (7)	95 (3)	83 (22)	94 (14)	87 (20)	50 (26)	80 (4)	75 (9)
Karbaril	83 (5)	103 (28)	82 (14)	93 (10)	95 (21)	66 (19)	100 (19)	74 (18)
Atrazin	74 (14)	88 (0)	98 (15)	79 (7)	104 (13)	98 (22)	103 (27)	115 (16)
Propazin	67 (4)	85 (3)	77 (24)	60 (11)	74 (6)	74 (9)	72 (15)	78 (10)
Linuron	82 (3)	108 (4)	94 (19)	72 (7)	56 (27)	75 (13)	73 (3)	41 (14)
Malation	74 (17)	79 (16)	76 (7)	58 (2)	68 (25)	53 (18)	57 (27)	54 (28)
Tebufenozid	73 (1)	93 (8)	68 (5)	71 (6)	76 (11)	75 (12)	95 (8)	72 (10)

Konačno je utvrđeno da su najbolji rezultati za sve ispitivane pesticide (prinosi u opsegu 76%–118% i ponovljivost u opsegu 3%–28%) postignuti upotrebom HLB kertridža i smeše metanol-dihlormetan (1:1) kao rastvarača za eluiranje. Ovi rezultati su verovatno dobijeni zbog karakteristične, hidrofilne i lipofilne polimerne strukture sorbenta Oasis HLB, koji je pogodan za ekstrakciju analita različitih polarnosti, kao i zbog izabranog rastvarača, smeše metanol/dihlormetan, koja predstavlja kombinaciju nepolarnog i polarnog rastvarača.

4.1.4.2. Izbor optimalne pH-vrednosti uzorka

Ispitan je i efekat tri različite pH-vrednosti uzoraka. U cilju ovog eksperimenta, pH-vrednost dejonizovane vode (100 cm^3), kojoj je dodat standardni rastvor smeše pesticida da bi se dobila koncentracija od 100 ng cm^{-3} za svaki analit u finalnom ekstraktu, podešavana je na vrednosti 2,0, 4,5 i 6,0. Ekstrakti su dobijeni na isti način kao i u prethodnom eksperimentu. Rezultati su prikazani u tabeli 11.

Tabela 11. Prinosi i ponovljivost (RSD) metode za analizu odabranih pesticida na različitim pH-vrednostima uzorka vode

Pesticid	Prinosi,% (RSD,%)		
	pH = 2,0	pH = 4,5	pH = 6,0
Monokrotofos	113 (17)	89 (9)	90 (6)
Karbendazim	90 (22)	115 (4)	99 (6)
Imidakloprid	108 (13)	88 (13)	89 (5)
Acetamiprid	113 (21)	134 (18)	102 (12)
Dimetoat	109 (15)	90 (10)	95 (6)
Monuron	102 (16)	92 (16)	96 (13)
Simazin	89 (22)	85 (17)	93 (12)
Karbofuran	88 (19)	78 (11)	90 (9)
Karbaril	111 (11)	93 (3)	85 (13)
Atrazin	118 (17)	77 (4)	89 (12)
Propazin	101 (18)	72 (6)	89 (7)
Linuron	77 (27)	76 (19)	85 (19)
Malation	83 (22)	69 (11)	84 (4)
Tebufenozid	105 (16)	79 (15)	96 (13)

Za većinu odabranih pesticida prinosi su bili prihvatljivi za sve ispitivane pH-vrednosti. Pri pH = 2 postignuti su najveći prinosi (77%–118%), ali najmanja ponovljivost (RSD do 27%), dok su na pH = 4,5 postignuti najlošiji prinosi (69%–134%). Za pH-vrednost 6,0 dobijeni su

veoma dobri prinosi (84%–102%), kao i ponovljivost (4%–19%, RSD). Stoga je vrednost pH od 6,0 izabrana kao optimalna vrednost za ekstrakciju odabranih pesticida iz uzoraka vode.

4.1.4.3. Izbor optimalne zapremine uzorka

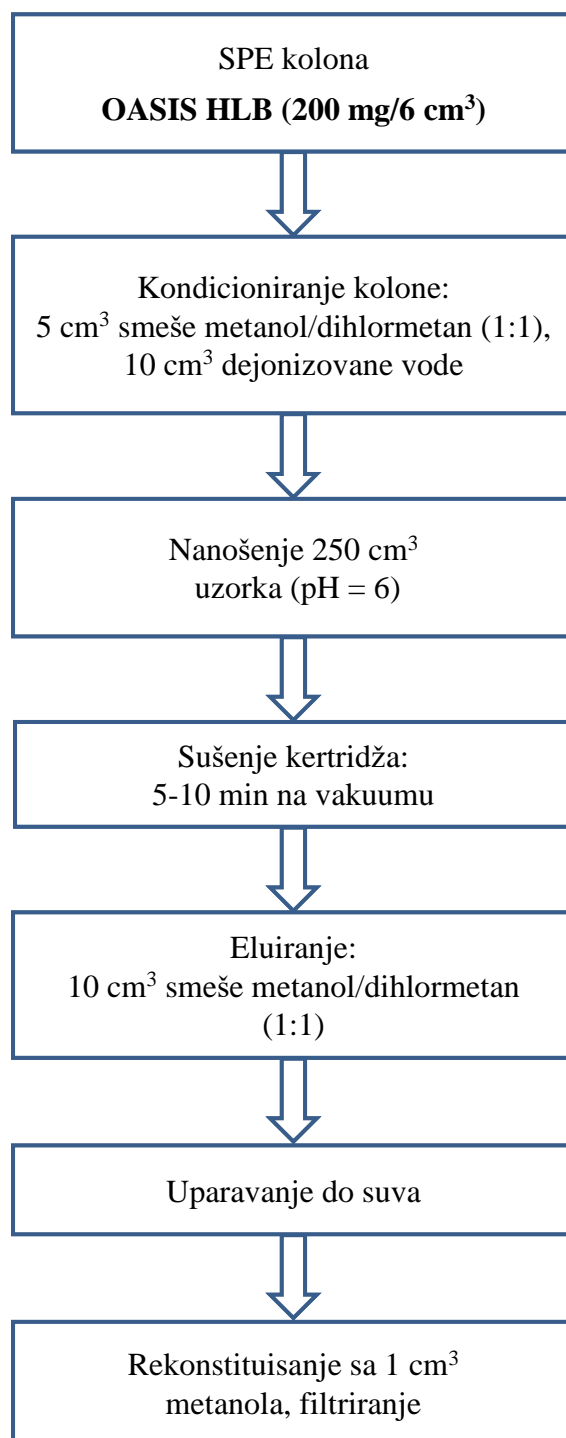
Sledeći korak u optimizaciji postupka ekstrakcije na čvrstoj fazi bila je optimizacija zapremine uzorka. Odabrana zapremina uzorka trebalo bi da obezbedi visok faktor koncentrovanja koji je neophodan za praćenje tragova pesticida. Međutim, ako je zapremina uzorka prevelika može doći do gubitka analita spiranjem sa kolone pre samog eluiranja. Ispitane su sledeće zapremine uzorka vode: 100 cm³, 250 cm³, 500 cm³ i 1000 cm³. Uzorci su pripremljeni tako što je dejonizovanoj vodi dodat standardni rastvor smeše pesticida kako bi se dobila koncentracija od 100 ng cm⁻³ za svaki pesticid u finalnom ekstraktu, a pH-vrednost je podešena na 6,0. Ekstrakti su pripremljeni na isti način kao u prethodnom eksperimentu. Rezultati su prikazani u tabeli 12.

Za većinu odabranih pesticida najviši prinosi (90%–130%) dobijeni su sa zapreminom uzorka od 250 cm³. Niži, ali ipak prihvatljivi prinosi (> 70%), dobijeni su i za većinu pesticida pri ispitivanim zapreminama od 500 cm³ i 1000 cm³. U slučaju tebufenozida primećeno je značajno smanjenje prinosa za 50% kada se ekstrahuje 500 cm³ uzorka vode u odnosu na zapreminu od 100 cm³, što je ukazalo na to da je došlo do spiranja analita sa pakovanja kertridža. Pokazano je i da je zapremina uzorka od 1000 cm³ prevelika, u pogledu trajanja analize. Što se tiče analita koji su pokazali najviše prinose pri ekstrakciji 100 cm³ uzorka vode, njihovi prinosi pri analizi zapremine od 250 cm³ nisu bili mnogo niži i još uvek su bili prihvatljivi. Da bi se postigao veći faktor predkoncentrisanja, kao i dobri prinosi uz kraće vreme analize, odlučeno je da se za ekstrakciju koristi zapremina od 250 cm³ uzorka vode. S obzirom na to da su dobijeni prinosi prilikom nanošenja 250 cm³ uzorka vode bili veoma visoki (> 90%), zaključeno je da je zapremina od 10 cm³ rastvarača za eluiranje odgovarajuća za uspešno eluiranje analita sa kolone.

Tabela 12. Prinosi i ponovljivost (RSD) metode za analizu odabranih pesticida korišćenjem različitih zapremina uzorka vode

Pesticid	Prinosi, % (RSD, %)			
	100 cm ³	250 cm ³	500 cm ³	1000 cm ³
Monokrotofos	110 (1)	118 (2)	94 (12)	86 (11)
Karbendazim	115 (12)	110 (23)	84 (10)	81 (13)
Imidakloprid	96 (4)	145 (14)	86 (9)	85 (8)
Acetamiprid	100 (7)	90 (10)	79 (3)	61 (9)
Dimetoat	105 (6)	112 (15)	89 (7)	88 (14)
Monuron	102 (1)	96 (3)	80 (8)	79 (5)
Simazin	104 (1)	130 (4)	89 (3)	99 (7)
Karbofuran	95 (1)	103 (1)	87 (4)	78 (9)
Karbaril	102 (8)	105 (12)	88 (5)	94 (4)
Atrazin	98 (0)	110 (10)	109 (7)	104 (6)
Propazin	102 (4)	100 (4)	73 (15)	89 (10)
Linuron	89 (23)	79 (9)	69 (11)	79 (11)
Malation	97 (11)	92 (18)	84 (21)	93 (19)
Tebufenozid	93 (4)	61 (15)	48 (23)	46 (21)

Optimizovani SPE postupak (slika 14) je sledeći: HLB kertridž (200 mg/6 cm³) je prethodno kondicioniran sa 5 cm³ smeše metanol-dihlormetan (1:1), a zatim sa 10 cm³ dejonizovane vode. Zapremina od 250 cm³ uzorka vode, čija je pH-vrednost podešena na 6,0, naneta je na kondicionirani HLB kertridž, koji je zatim sušen 10 min na vakuumu. Kertridž je eluiran sa 10 cm³ smeše metanol-dihlormetan (1:1); dobijeni ekstrakt je uparen do suva, a nakon toga rekonstitusan sa 1 cm³ metanola. Finalni ekstrakt je filtriran kroz PVDF filter, veličine pora 0,45 μm, u bočicu za autosempler, a zatim analiziran.



Slika 14. Optimizovani SPE postupak za analizu ispitivanih pesticida u uzorcima vode

4.1.5. Validacija metode

Razvijena i optimizovana metoda je validirana tj. potvrđena u analizi uzoraka podzemnih i površinskih voda kojima je dodat standardni rastvor smeše pesticida pri koncentracijama od 40 ng dm^{-3} i 200 ng dm^{-3} , da bi se dobile koncentracije od 10 ng cm^{-3} i 50 ng cm^{-3} u finalnim ekstraktima. Prinosi metode i ponovljivost, izražena kao relativna standardna devijacija, utvrđeni su ponovljenom intra-dnevnom i inter-dnevnom analizom (analiza tri probe istog uzorka u jednom danu, i po tri probe istog uzorka u tri dana u nizu), a rezultati su prikazani u tabeli 13.

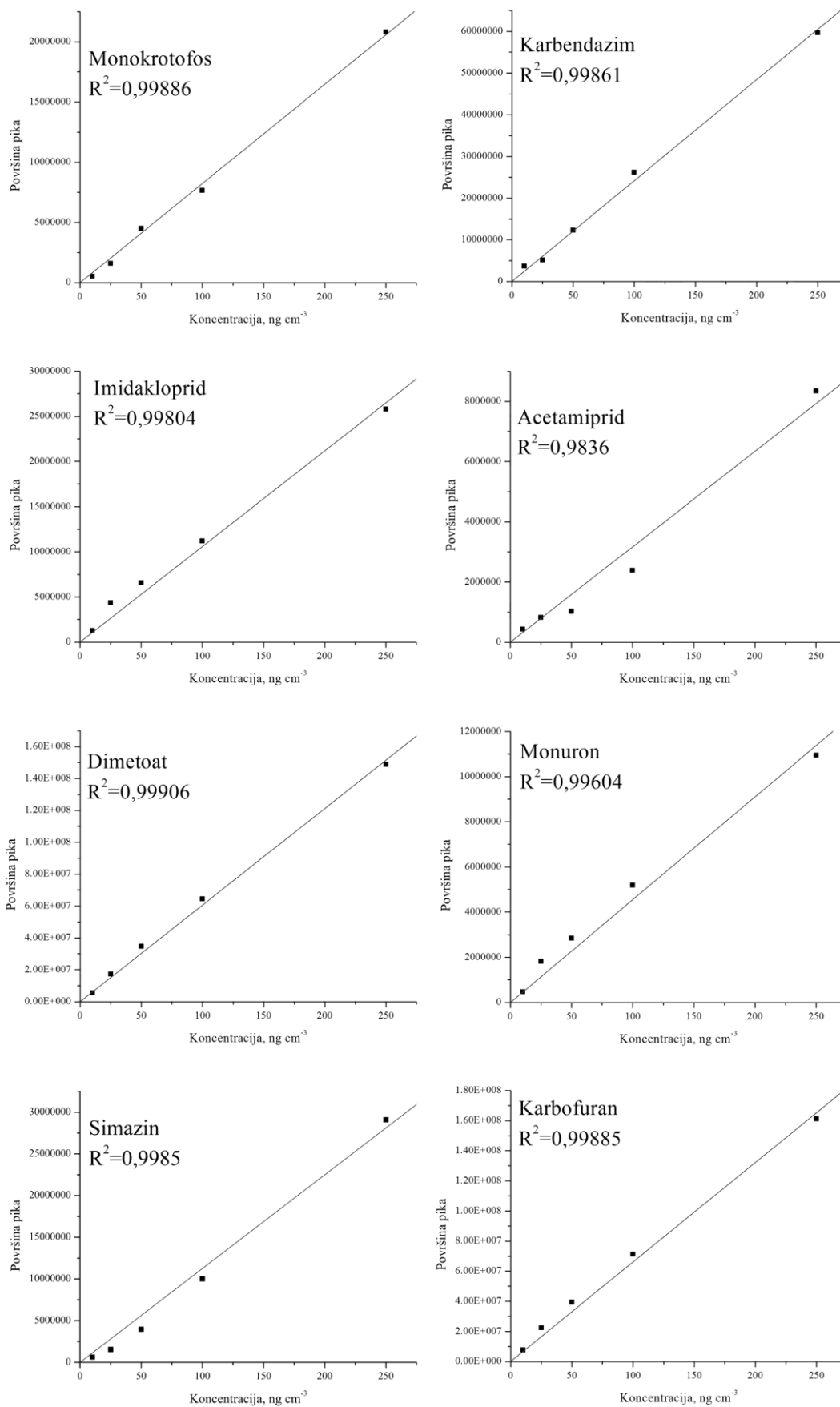
Tabela 13. Prinosi i ponovljivost (RSD), granica detekcije (LOD) i kvantifikacije (LOQ) optimizovane metode za analizu odabranih pesticida u podzemnoj (GW) i površinskoj vodi (SW)

Pesticid	Prinosi, % (RSD, %)*				LOD (ng dm^{-3})		LOQ (ng dm^{-3})	
	Koncentracija (ng dm^{-3})				GW	SW	GW	SW
	40		200					
	GW	SW	GW	SW				
Monokrotofos	99 (1)	103 (4)	95 (2)	89 (15)	3,3	3,5	11,0	11,7
Karbendazim	119 (12)	93 (9)	99 (23)	88 (16)	1,1	1,8	3,8	6,1
Imidakloprid	105 (4)	91 (16)	87 (14)	76 (7)	4,1	5,0	13,5	16,5
Acetamiprid	91 (7)	88 (15)	94 (23)	121 (22)	3,5	3,2	11,6	10,7
Dimetoat	109 (6)	104 (11)	94 (15)	90 (17)	0,4	0,5	1,1	1,3
Monuron	101 (1)	81 (5)	106 (3)	76 (1)	3,5	3,2	11,8	10,7
Simazin	98 (1)	86 (3)	91 (4)	87 (11)	4,0	4,0	12,0	13,1
Karbofuran	102 (1)	99 (5)	88 (1)	84 (9)	0,5	1,1	1,6	3,6
Karbaril	89 (8)	84 (4)	102 (12)	92 (3)	3,4	4,3	11,5	14,4
Atrazin	100 (1)	82 (14)	118 (10)	97 (5)	1,5	3,0	5,1	10,3
Propazin	95 (4)	97 (22)	129 (4)	105 (10)	0,6	0,7	1,9	2,2
Linuron	72 (23)	73 (17)	90 (9)	95 (13)	5,5	4,3	18,2	14,2
Malation	86 (11)	75 (9)	100 (18)	83 (12)	1,0	1,0	2,9	3,1
Tebufenozid	94 (4)	86 (7)	129 (15)	106 (9)	4,5	4,9	14,9	16,3

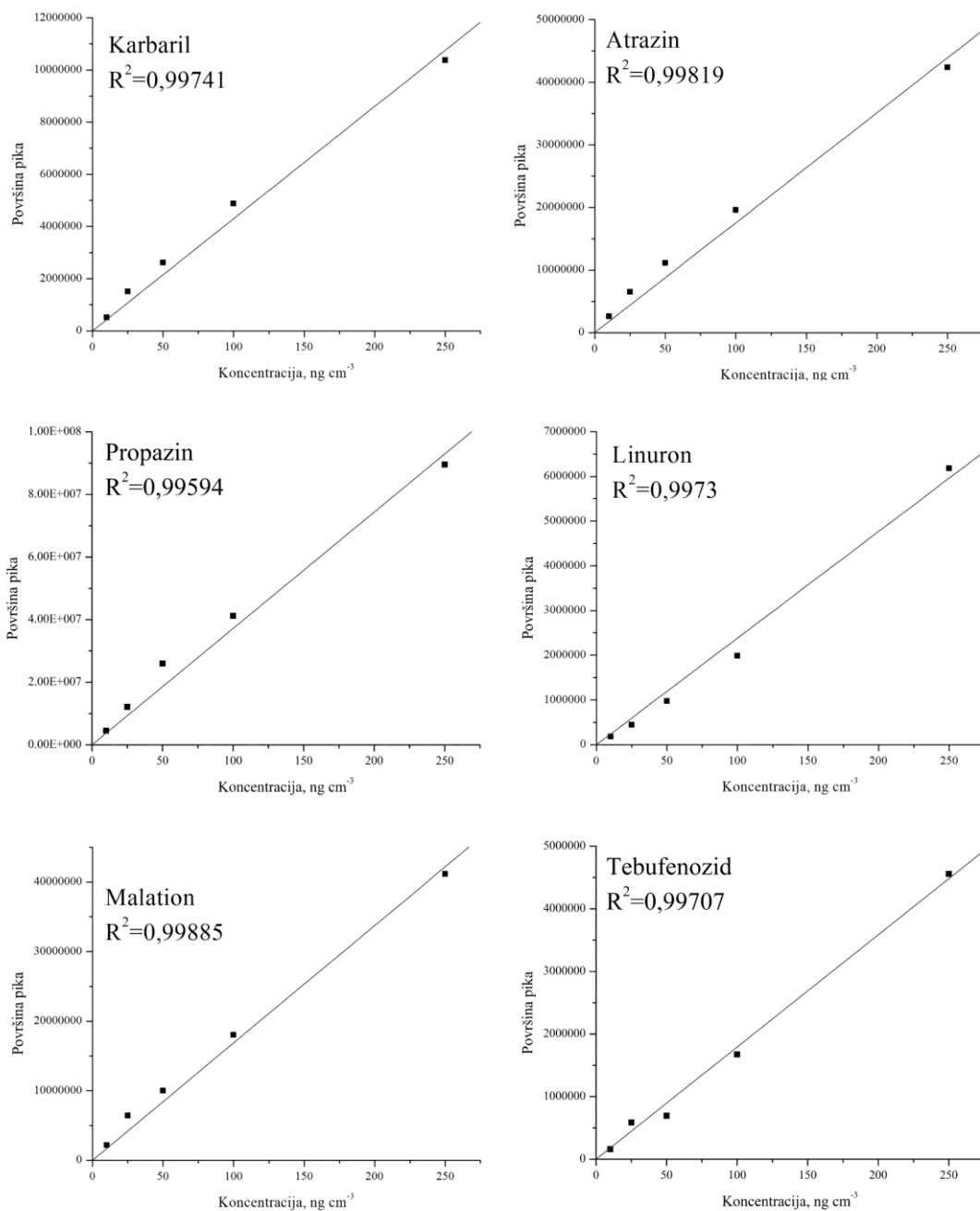
*intra-dnevnom i inter-dnevnom analizom (analiza tri probe istog uzorka u jednom danu, i po tri probe istog uzorka u tri dana u nizu, $n = 9$).

Prinosi dobijeni za odabrana jedinjenja, kako u uzorcima podzemnih, tako i u uzorcima površinskih voda, kretali su se u opsegu od 72% do 121%, uz izuzetak propazina i tebufenozida (po 129%, za uzorak podzemne vode), dok je ponovljivost metode bila u opsegu 1%–23%. Granice detekcije i kvantifikacije određene su kao najmanja koncentracija analita koju je moguće detektovati sa odnosom signala i šuma od 3 i 10, respektivno, za uzorke podzemne i površinske vode koji su pripremljeni tako da sadrže odabrane pesticide u koncentraciji 40 ng dm⁻³. Niske LOD (0,4–5,5 ng dm⁻³) i LOQ (1,1–18,2 ng dm⁻³) postignute su za sve ispitivane pesticide (tabela 13).

Prethodno je objašnjeno da je kvantifikacija analita u uzorcima vode izvršena pomoću standarda koji odgovaraju matrici uzorka, koncentracija 10, 25, 50, 100 i 250 ng cm⁻³. Ovi standardi su pripremljeni za svaki tip vode, tj. za svaku grupu uzoraka istog izvora (npr. iste reke). Pre pripreme kalibracionih rastvora, utvrđeno je da slepe probe svih tipova vode ne sadrže tragove odabranih pesticida. Linearnost kalibracionih krivih je ispitana za sve pesticide, a kalibracione krive su generisane primenom linearne regresione analize. Unutar utvrđenog raspona koncentracija (10–250 ng cm⁻³) dobijeni su dobri koeficijenti korelacije (R^2 u opsegu od 0,9836 za acetamiprid do 0,99906 za dimetoat). Kalibracione krive za ispitivane pesticide u površinskoj vodi su prikazane na slici 15, dok su kalibracione krive za analite u podzemnoj vodi date u Prilogu.



Slika 15. Kalibracione krive za ispitivane pesticide u površinskoj vodi



Slika 15. (nastavak)

4.1.6. Procena uticaja matrice uzorka

Standardi koji odgovaraju matrici uzorka korišćeni su u cilju eliminisanja uticaja matrice, tj. suzbijanja ili poboljšanja intenziteta signala analita u prisustvu matrice. Da bi se ispitaio uticaj matrice pripremljeni su standardi koji odgovaraju matrici uzoraka površinske i podzemne vode (prethodno je utvrđeno da ovi uzorci ne sadrže pesticide), sa podešenom vrednošću pH

na 6,0, kojima je dodata smeša pesticida nakon SPE procedure u koncentraciji od 100 ng cm⁻³. Uticaj matrice izračunat je na sledeći način:

$$\text{Uticaj matrice} = \frac{A_{\text{mms}} \cdot 100}{A_{\text{rastvarač}}} - 100$$

gde je A_{mms} – površina pika analita u standardu koji odgovara matrici uzorka, a $A_{\text{rastvarač}}$ – površina pika analita u čistom rastvaraču. Pozitivne vrednosti ukazuju na povećanje, a negativne na suzbijanje signala analita u prisustvu komponenata matrice.

Tabela 14. Uticaj matrice u površinskim (SW) i podzemnim (GW) vodama pri koncentraciji pesticida od 100 ng cm⁻³

Pesticid	Uticaj matrice (%)	
	SW	GW
Monokrotofos	15	17
Karbendazim	17	28
Imidakloprid	19	49
Acetamiprid	-10	-18
Dimetoat	20	10
Monuron	24	36
Simazin	19	25
Karbofuran	8	9
Karbaril	4	8
Atrazin	-14	-19
Propazin	6	8
Linuron	14	26
Malation	8	10
Tebufenozid	-8	-14

Za većinu pesticida, kako u uzorcima podzemnih, tako i u uzorcima površinskih voda, suzbijanje ili povećanje signala analita bilo je manje od 20%. Imidakloprid i monuron su pokazali najveće poboljšanje signala, do 49% i 36%, pojedinačno, u podzemnim vodama. Uticaj matrice, tj. povećanje signala za linuron, simazin i karbendazim bilo je oko 30%. Za acetamiprid, tebufenozid i atrazin primećeno je suzbijanje signala od oko 20%. Zbog promenljivog uticaja matrice (tabela 14), za preciznu kvantifikaciju neophodno je koristiti standarde koji odgovaraju matrici uzorka.

4.1.7. Analiza realnih uzoraka površinske i podzemne vode

Razvijena i optimizovana metoda primenjena je u analizi uzoraka podzemnih i površinskih voda. Uzorkovanje je vršeno na šesnaest mesta uzorkovanja (tabela 6 i slika 8, Eksperimentalni deo), dvanaest na reci Dunav i četiri u područjima ulivanja pritoka u Dunav: Tise, Save, Morave i manje pritoke - Peka. Uzorci vode prikupljeni su u dvanaest kampanja uzorkovanja, od 2009. do 2012. godine. U tabeli 15 prikazani su detektovani pesticidi u uzorcima vode reke Dunav i njenih pritoka prilikom uzorkovanja sprovedenih 2009, 2010, 2011. i 2012. godine.

Tabela 15. Pesticidi detektovani u uzorcima vode reke Dunav i njenih pritoka

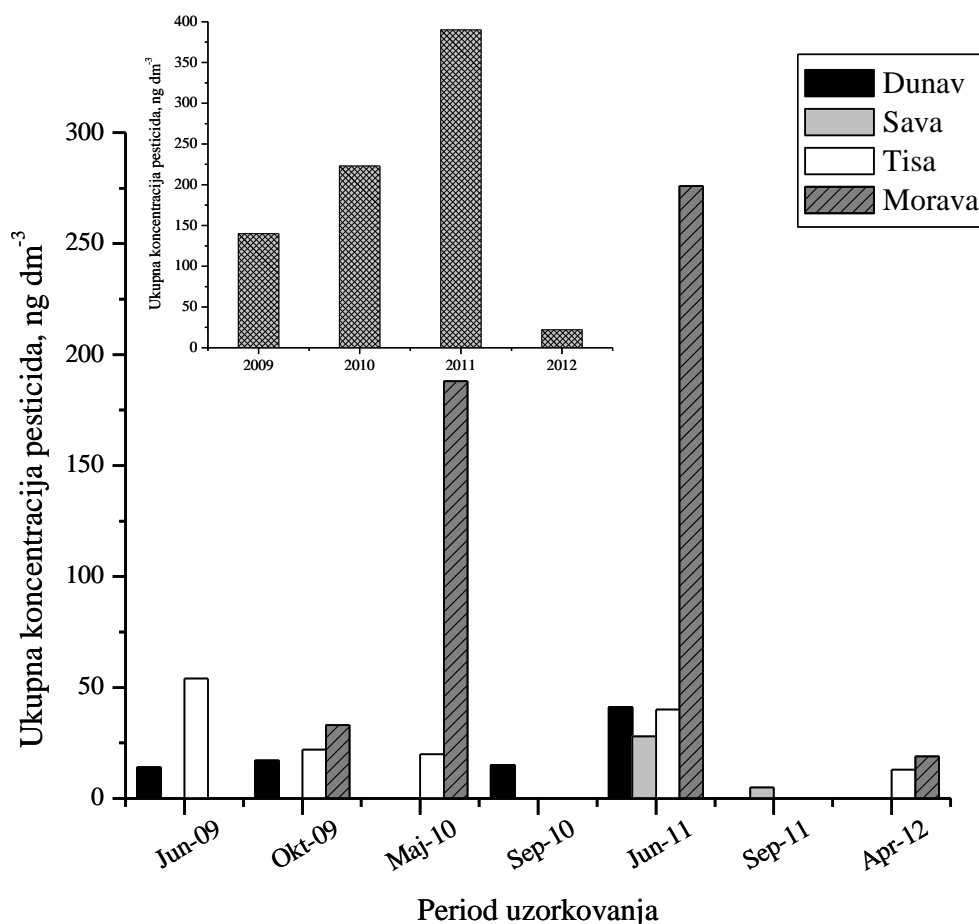
		Karbendazim	Atrazin	Propazin	Karbofuran	Dimetoat		
Koncentracija \pm SD ^a , ng dm ⁻³	Dunav	S3 '09	<1,8 ^b	<3,0	<0,7	<1,1	<0,5	
		'10	15 \pm 3 (sep)	<3,0	<0,7	<1,1	<0,5	
		'11	<1,8	<3,0	<0,7	<1,1	<0,5	
	S4	'09	14 \pm 2 (jun)	<3,0	<0,7	<1,1	<0,5	
		'10	<1,8	<3,0	<0,7	<1,1	<0,5	
		'11	23 \pm 4 (jun)	<3,0	<0,7	<1,1	<0,5	
	S5	'09	<1,8	<3,0	<0,7	<1,1	<0,5	
		'10	<1,8	<3,0	<0,7	<1,1	<0,5	
		'11	10 \pm 2 (jun)	<3,0	8 \pm 2 (jun)	<1,1	<0,5	
	S6	'09	9 \pm 2 (okt)	<3,0	<0,7	<1,1	<0,5	
		'10	<1,8	<3,0	<0,7	<1,1	<0,5	
		'11	<1,8	<3,0	<0,7	<1,1	<0,5	
	S7	'09	8 \pm 2 (okt)	<3,0	<0,7	<1,1	<0,5	
		'10	<1,8	<3,0	<0,7	<1,1	<0,5	
		'11	<1,8	<3,0	<0,7	<1,1	<0,5	
	Pritoke	S13	'09	22 \pm 5 (okt)	<3,0	6 \pm 2 (jun)	25 \pm 4 (jun)	23 \pm 3 (jun)
			'10	<1,8	20 \pm 4 (maj)	<0,7	<1,1	<0,5
			'11	21 \pm 4 (jun)	<3,0	9 \pm 2 (jun)	<1,1	10 \pm 2 (jun)
			'12	13 \pm 4 (apr)	<3,0	<0,7	<1,1	<0,5
		S14	'09	<1,8	<3,0	<0,7	<1,1	<0,5
			'10	<1,8	<3,0	<0,7	<1,1	<0,5
'11			28 \pm 4 (jun)	<3,0	<0,7	<1,1	<0,5	
S15		'09	15 \pm 3 (okt)	<3,0	18 \pm 3 (okt)	<1,1	<0,5	
		'10	<1,8	188 \pm 7 (maj)	<0,7	<1,1	<0,5	
		'11	269 \pm 10 (jun)	<3,0	<0,7	<1,1	7 \pm 2 (jun)	
		'12	16 \pm 8 (apr)	<3,0	<0,7	<1,1	3 \pm 2 (apr)	

^aSD – standardna devijacija

^bkoncentracije ispod LOD (<LOD)

Pesticidi su detektovani na pet mesta uzorkovanja na reci Dunav (S3–S7) i na njenim pritokama Tisi, Savi i Moravi (S13–S15). Pesticidi nisu detektovani u uzorcima uzetim na

reci Pek (S16). Na slici 16 prikazane su ukupne koncentracije pesticida po godinama uzorkovanja i ukupna koncentracija pesticida u rekama. Kao što je i očekivano, najviši nivoi pesticida pronađeni su u maju 2010. godine i junu 2011. godine, što se podudara sa njihovom primenom u poljoprivredi. Međutim, u junu 2009. godine, koncentracije pesticida nisu bile toliko visoke. Godišnja promena u ukupnim nivoima pesticida, za isti period uzorkovanja, mogla bi se objasniti različitim godišnjim trendom u količini padavina. Naime, u maju 2010. godine količina padavina je okarakterisana kao izrazito iznad normale (za taj period godine), a u junu 2011. opisana je kao iznad normale, što je dovelo do vrlo izraženog spiranja poljoprivrednog zemljišta i veoma visokih nivoa pesticida u rekama. U junu 2009. godine količina padavina je okarakterisana kao normalna, sa spiranjem zemljišta koje je rezultiralo niskim nivoima pesticida, što je bilo naročito očigledno za reku Dunav u kojoj je u tom periodu detektovan jedan pesticid u niskoj koncentraciji (karbendazim, 14 ng dm⁻³).



Slika 16. Ukupne koncentracije pesticida u površinskoj vodi

Uopšteno govoreći, učestalost pronađenih pesticida i njihove koncentracije bili su veći u pritokama, nego u reci Dunav. Najveće ukupne koncentracije pesticida pronađene su u Moravi, i to u maju 2010. i junu 2011. godine, a zatim u Tisi. Ovo se može prvenstveno objasniti upotrebom zemljišta u blizini mesta uzorkovanja na pritokama Moravi i Tisi u poljoprivredne svrhe, kao i niskim prosečnim godišnjim protokom ovih reka (npr. u 2011. godini: $234 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ za Moravu i $794 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ za Tisu). Vrednost prosečnog protoka reke Dunav za maj 2010. godine ($11670 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$) bila je značajno veća u poređenju sa junom 2009 ($4447 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$) i 2011. godine ($5264 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$), čime je potvrđena prethodno pomenuta izrazito visoka količina padavina u maju 2010. Kada je protok reke izuzetno visok, može se pojaviti i efekat razblaženja koji utiče na smanjenje nivoa pronađenih pesticida.

Dobijeni rezultati pokazuju da u pesticide koji su pronađeni u najvećim koncentracijama u slivu reke Dunav spadaju: karbendazim (269 ng dm^{-3}) i atrazin (188 ng dm^{-3}). Najčešće pronađeni pesticid bio je karbendazim. Karbendazim je fungicid iz grupe benzimidazola koji ima široko rasprostranjenu upotrebu u poljoprivredi; naročito se koristi za voće, suncokret, šećernu repu i pšenicu [44, 143]. Zbog usporene razgradnje u životnoj sredini (tabela 2, Teorijski deo), ovaj pesticid se smatra veoma postojanim i često se može naći u površinskim vodama. Nivoi karbendazima pronađeni u slivu reke Dunav u Srbiji ($8\text{--}269 \text{ ng dm}^{-3}$) su uglavnom niži od nivoa zabeleženih u površinskim vodama u Španiji ($150\text{--}2300 \text{ ng dm}^{-3}$ i 370 ng dm^{-3}) [40, 43], Japanu ($110\text{--}320 \text{ ng dm}^{-3}$) [144] i Čileu ($400\text{--}4500 \text{ ng dm}^{-3}$) [145].

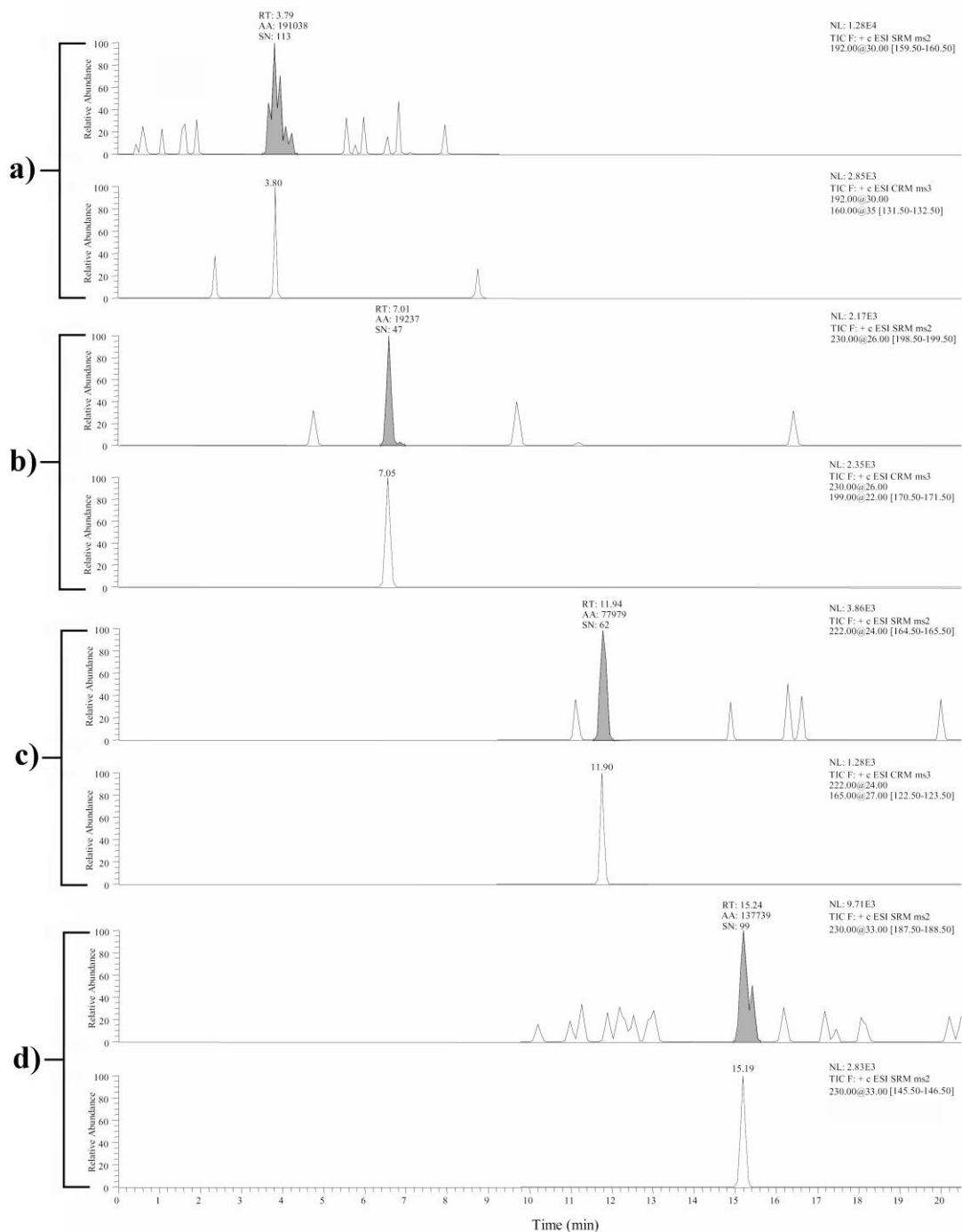
Atrazin pripada herbicidima iz grupe triazina čija je upotreba bila široko rasprostranjena u Evropi za kontrolu korova u proizvodnji žitarica, a koristio se i u nepoljoprivredne svrhe [146]. Ovaj pesticid se smatra zagađujućom supstancom zbog svoje postojanosti (tabela 2, Teorijski deo) i pokretljivosti u životnoj sredini [147]. Rezultati ove studije se mogu uporediti sa rezultatima dobijenim za reku Dunav i njene glavne pritoke u sklopu Drugog zajedničkog istraživanja Dunava (engl. Joint Danube Survey 2) u kome je ispitano 2600 km toka Dunava [36]. U tom istraživanju, atrazin je otkriven u nižim koncentracijama, do 2 ng dm^{-3} u reci Dunav, i do 25 ng dm^{-3} u pritokama Dunava. Iako je upotreba atrazina zabranjena u Srbiji 2008. godine, a u drugim evropskim zemljama još ranije, atrazin je otkriven u našem istraživanju (20 i 188 ng dm^{-3}), kao i u drugim površinskim vodama Evrope: Španiji ($10\text{--}630 \text{ ng dm}^{-3}$) [39, 41, 112], Francuskoj ($30\text{--}40 \text{ ng dm}^{-3}$) [148], Mađarskoj ($200\text{--}10000 \text{ ng dm}^{-3}$) [29], Portugaliji ($80\text{--}630 \text{ ng dm}^{-3}$) [149] i Švajcarskoj (30 ng dm^{-3}) [56]. Pronađen je samo u pritokama Dunava, za koje smo prethodno utvrdili da imaju nizak

prosečan godišnji protok, u uzorcima uzetim u maju 2010. godine što odgovara vremenskom periodu nakon njegove primene na usevima [39, 112, 149]. Atrazin je uključen u listu 33 prioritetne supstance u oblasti politike voda definisane u Aneksu X Direktive 2008/105/EC [49].

Pri prvom uzorkovanju sprovedenom 2009. godine (u junu), najveće koncentracije pesticida bile su 25 ng dm^{-3} za karbofuran i 23 ng dm^{-3} za dimetoat, oba pronađena u reci Tisi. Karbofuran (jedan od najtoksičnijih pesticida iz grupe karbamata) se koristi za kontrolu štetočina kod šećerne trske, šećerne repe i kukuruza. Njegovo prisustvo u životnoj sredini moglo bi se objasniti postojanošću i visokom rastvorljivošću u vodi (tabela 2, Teorijski deo). Karbofuran je pronađen u površinskim vodama u količini od oko 1000 ng dm^{-3} u SAD-u [150] i Keniji [151], što je mnogo više od koncentracija pronađenih u Srbiji. Dimetoat, insekticid iz grupe organofosfata, pronađen je samo u junu, što je u skladu sa podacima zabeleženim u SAD-u gde su organofosfati otkriveni tokom sezone navodnjavanja [152]. Ovaj pesticid se brzo razgrađuje u životnoj sredini. Međutim, pronađeni nivoi dimetoata se mogu objasniti visokom rastvorljivošću u vodi. Pri drugom uzorkovanju sprovedenom u oktobru 2009. godine, niski nivoi karbendazima pronađeni su u uzorcima iz reka Tise (22 ng dm^{-3}), Morave (15 ng dm^{-3}) i Dunava (8 i 9 ng dm^{-3}), a pronađen je i propazin (18 ng dm^{-3}) u reci Moravi.

Prilikom uzorkovanja sprovedenih u maju i junu 2010. godine, zabeležena je visoka koncentracije atrazina (188 ng dm^{-3}) u reci Moravi. Ovaj period godine je prilično tipičan za primenu pesticida. U septembru 2010. godine pronađen je samo jedan pesticid (karbendazim, 15 ng dm^{-3}) u reci Dunav.

U uzorcima iz juna 2011. godine, karbendazim je pronađen u Dunavu i u sve tri njegove pritoke, u koncentracijama od 10 ng dm^{-3} (S5) do 269 ng dm^{-3} (S15, Morava). Bio je prisutan i u septembru 2011. godine, otkriven u pritoci Savi u koncentraciji od 5 ng dm^{-3} . Propazin i dimetoat su takođe pronađeni u junu 2011. godine, u niskim koncentracijama. Pesticid propazin, koji se smatra postojanim u životnoj sredini (tabela 2, Teorijski deo), pronađen je u ovoj studiji u nivoima ($6\text{--}18 \text{ ng dm}^{-3}$) koji su slični nivoima zabeleženim u površinskim vodama u Nemačkoj ($1,1\text{--}3,7 \text{ ng dm}^{-3}$) [153] i Kanadi ($1\text{--}6 \text{ ng dm}^{-3}$) [154]. Na slici 17 prikazani su maseni hromatogrami potvrde prisustva pesticida u uzorcima površinske vode (S13) iz juna i oktobra 2009. godine.



Slika 17. Maseni hromatogrami potvrde prisustva pesticida u uzorcima iz reke Tise iz 2009. godine: a) karbendazima; b) dimetoata; c) karbofurana; d) propazina

Što se tiče uzoraka podzemne vode, rezultati su prikazani u tabeli 16. Tragovi pesticida su detektovani u tri od jedanaest analiziranih bunara i u tri pijezometra koji odgovaraju bunarima. Pesticidi su pronađeni na lokalitetu Knićanin – Čenta i to u jednom bunaru i njemu odgovarajućem pijezometru, kao i na lokalitetu Kovin – Dubovac u dva bunara i njima

odgovarajućim pijezometrima. Na lokalitetima izvorišta „Trnovče”, „Mediana” i „Ključ” nije detekovan nijedan analit. Oba lokaliteta na kojima su pronađeni pesticidi predstavljaju područje sa razvijenom poljoprivredom. Bunar GW 13 se nalazi u samom naselju Knićanin, a pijezometar koji odgovara ovom bunaru (GW 13/2) se nalazi na profilu između bunara i reke Tise i služi za analizu kvaliteta vode u bunaru. Može se primetiti da su koncentracije pronađenih pesticida nešto veće u pijezometru (karbendazim) ili iste (dimetoat), pa verovatno dolazi do mešanja vode iz Tise sa bunarskom vodom. Vrlo slična situacija je i kod bunara GW 21 i GW 22 i njihovim pijezometrima koji se nalaze na profilu između bunara i reke Dunav. Ovde se isto mogu primetiti iste ili nešto veće koncentracije pesticida u pijezometrima nego u bunarima, što bi se ponovo moglo objasniti mešanjem sa dunavskom vodom. Od ispitivanih četrnaest pesticida pronađeno je četiri. Detektovani su: karbendazim u sedam uzoraka, atrazin i karbofuran u po jednom uzorku i dimetoat u dva uzorka. Ostali pesticidi nisu detektovani. Najviše koncentracije pesticida pronađene su u junu 2011. godine, što se može objasniti njihovom najvećom primenom u poljoprivredi u tom periodu. Međutim, u 2009. godini u istom periodu nije detektovan nijedan pesticid. Kada se uporede koncentracije detektovanih pesticida u površinskoj i podzemnoj vodi primećuje se da su generalno detektovane znatno niže koncentracije u podzemnoj vodi.

Tabela 16. Pesticidi detektovani u uzorcima podzemnih voda

		Karbendazim	Atrazin	Dimetoat	Karbofuran	
Koncentracija \pm SD ^a , ng dm ⁻³	GW 13	'09	<1,1 ^b	<1,5	<0,4	<0,5
		'10	<1,1	<1,5	<0,4	<0,5
		'11	18 \pm 2 (jun)	<1,5	12 \pm 2 (jun)	<0,5
	GW 13/2	'09	<1,1	<1,5	<0,4	<0,5
		'10	<1,1	<1,5	<0,4	<0,5
		'11	47 \pm 5 (jun)	<1,5	11 \pm 2 (jun)	<0,5
	GW 21	'09	<1,1	<1,5	<0,4	<0,5
		'10	<1,1	<1,5	<0,4	<0,5
		'11	8 \pm 2 (nov)	<1,5	<0,4	6 \pm 2 (nov)
	GW 21/2	'09	<1,1	<1,5	<0,4	<0,5
		'10	<1,1	<1,5	<0,4	<0,5
		'11	11 \pm 5 (nov)	<1,5	<0,4	<0,5
	GW 22	'09	<1,1	<1,5	<0,4	<0,5
		'10	84 \pm 3 (jun)	<1,5	<0,4	<0,5
		'11	<1,1	<1,5	<0,4	<0,5
	GW 22/2	'09	<1,1	<1,5	<0,4	<0,5
		'10	<1,1	<1,5	<0,4	<0,5
		'11	86 \pm 3 (jun) 87 \pm 3 (nov)	5 \pm 2 (nov)	<0,4	<0,5

^aSD – standardna devijacija

^bkoncentracije ispod LOD (<LOD)

Kao i u površinskim vodama, najčešće pronađen pesticid u uzorcima podzemnih voda bio je karbendazim, što još jednom potvrđuje da se sporo razgrađuje u životnoj sredini i da je veoma postojan. Nivoi karbendazima pronađeni u uzorcima podzemne vode u ovom istraživanju znatno su niži od onih zabeleženih u podzemnim vodama u Španiji (370 ng dm^{-3} i 2273 ng dm^{-3}) [40, 43], Italiji ($\sim 350 \text{ ng dm}^{-3}$) [155] i Kini ($> 100 \text{ ng dm}^{-3}$) [156]. Atrazin i karbofuran su detektovani u po jednom uzorku u veoma niskoj koncentraciji u novembru 2011. godine. Dimetoat je pronađen u dva uzorka, i to u junu 2011. godine, a koncentracije su bile slične onim za površinsku vodu.

4.2. Analiza pesticida u uzorcima otpadnih voda

Metoda koja je razvijena, optimizovana i validirana za analizu pesticida u površinskim i podzemnim vodama, nakon 1e, primenjena je za analizu pesticida u otpadnoj vodi. S obzirom na to da su uzorci otpadnih voda opterećeni fizičkim nečistoćama, pa je vreme filtriranja ovih uzoraka, u postupku pripreme, suviše dugo, umesto nanošenja zapremine uzorka od 250 cm^3 , nanošena je zapremina od 100 cm^3 .

Postupak kojim su pripremani uzorci otpadne vode sastojao se u sledećem: uzorci otpadne vode su, pre nanošenja na SPE kertridž, filtrirani dva puta na filter papiru veličine pora $0,47 \text{ mm}$ (Whatman GmbH, Dassel, Nemačka), pomoću vakuum pumpe, da bi se uklonile fizičke nečistoće koje bi mogle da ometaju proces. Priprema OASIS HLB kolone za ekstrakciju vršena je laganim nanošenjem 5 cm^3 smeše rastvarača metanol-dihlormetan (1:1) i 10 cm^3 dejonizovane vode. Nakon pripreme kertridža, nanošeno je 100 cm^3 uzorka otpadne vode, sa pH-vrednošću podešenom na 6,0. Kolona je zatim sušena 10 min na vakuumu i eluirana sa 10 cm^3 smeše metanol-dihlormetan (1:1). Dobijeni ekstrakt je uparen do suva u struji azota, u vodenom kupatilu na $30 \text{ }^\circ\text{C}$, a zatim rekonstituisan u 1 cm^3 metanola. Ovako dobijen ekstrakt filtriran je kroz filter veličine pora $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ i zatim analiziran.

4.2.1. Validacija metode

U cilju provere valjanosti analitičke metode, ispitivani su sledeći parametri: prinos i ponovljivost metode, linearnost, granica detekcije i granica kvantifikacije (tabela 17). Za

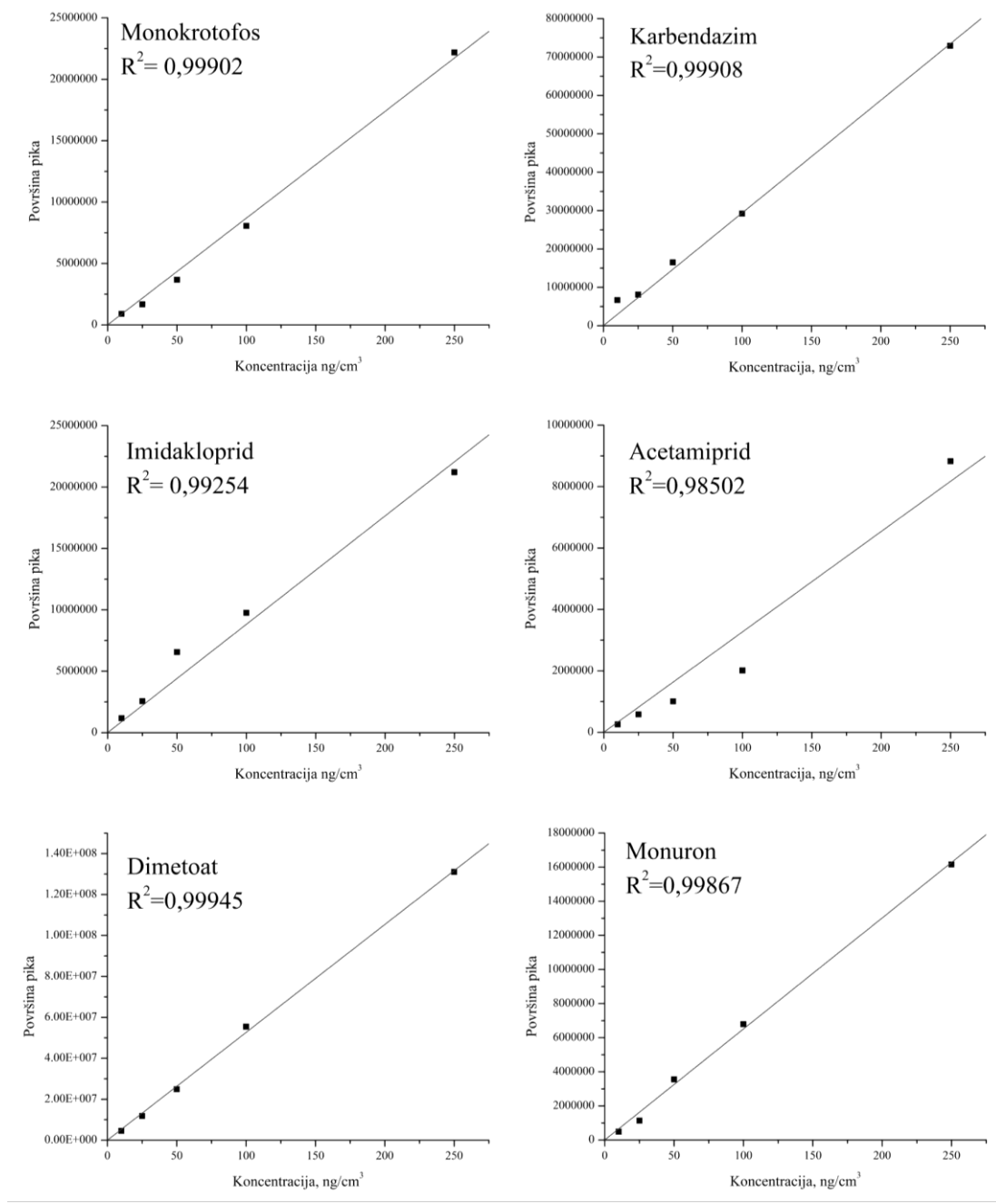
ispitivanje su korišćeni uzorci otpadne vode zapremine od 100 cm³ u koje je dodata smeša svih ispitivanih pesticida pri koncentracijama od 500 ng dm⁻³ i 1000 ng dm⁻³, da bi se dobile koncentracije od 50 ng cm⁻³ i 100 ng cm⁻³ u finalnom ekstraktu. Prinosi metode i ponovljivost (izražena kao relativna standardna devijacija) utvrđeni su ponovljenom intra-dnevnom i inter-dnevnom analizom (analiza tri probe istog uzorka u jednom danu, i po tri probe istog uzorka u tri dana u nizu).

Tabela 17. Prinosi i ponovljivost (RSD), granica detekcije (LOD) i kvantifikacije (LOQ) metode za analizu odabranih pesticida u otpadnoj vodi

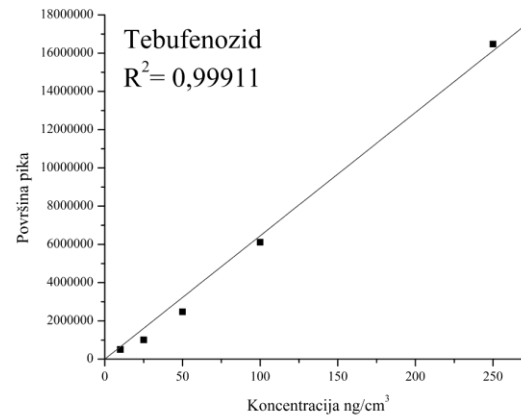
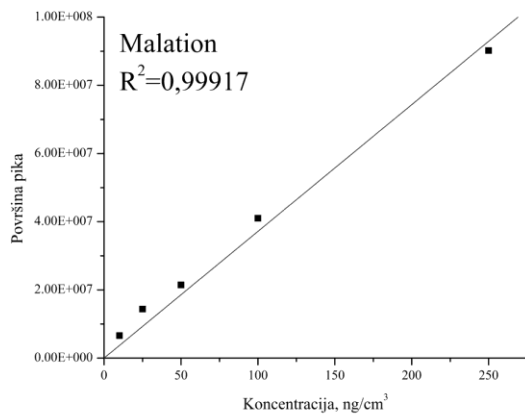
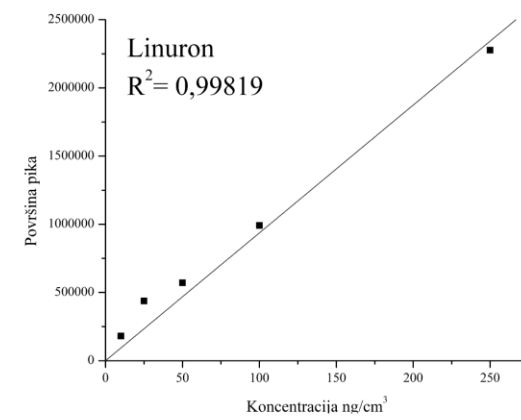
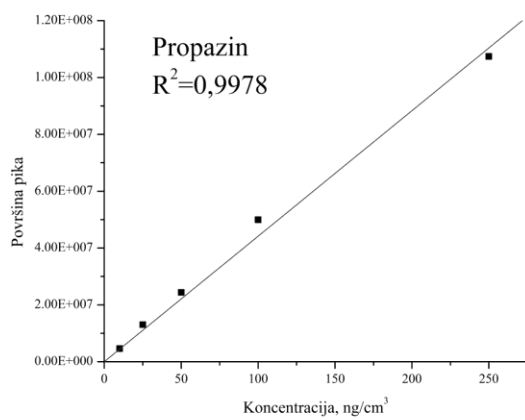
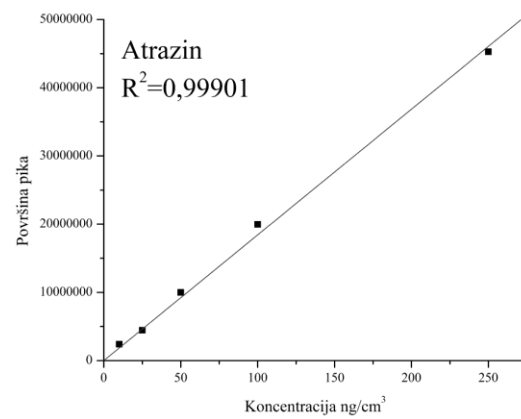
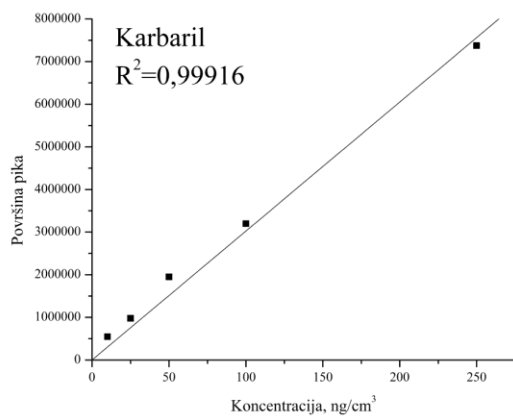
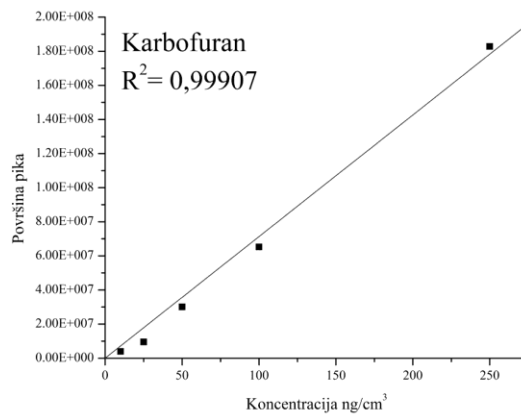
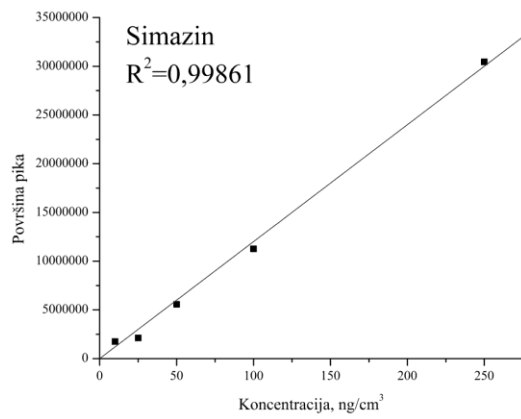
Pesticid	Prinosi, % (RSD, %)		LOD (ng dm ⁻³)	LOQ (ng dm ⁻³)
	Koncentracija (ng dm ⁻³)			
	500	1000		
Monokrotofos	80 (7)	88 (17)	1,0	3,3
Karbendazim	110 (7)	84 (22)	1,2	4,0
Imidakloprid	86 (20)	82 (13)	1,6	5,3
Acetamiprid	107 (19)	89 (21)	2,6	8,7
Dimetoat	89 (5)	84 (15)	0,4	1,3
Monuron	81 (9)	85 (16)	1,4	4,7
Simazin	85 (11)	88 (22)	1,2	4,0
Karbofuran	96 (23)	86 (19)	0,2	0,7
Karbaril	100 (18)	80 (11)	1,4	4,7
Atrazin	101 (2)	89 (17)	0,7	2,3
Propazin	104 (1)	88 (18)	0,5	1,7
Linuron	95 (5)	118 (27)	2,6	8,7
Malation	113 (20)	89 (22)	0,4	1,3
Tebufenozid	108 (3)	80 (16)	2,6	8,7

Dobijene vrednosti prinosa analitičke metode bile su u intervalu 80%–118% i može se zaključiti da su u prihvatljivom opsegu, sa vrednostima relativne standardne devijacije generalno manjim od 20%. Postignute su niske granice detekcije (0,2–2,6 ng dm⁻³) i kvantifikacije (0,7–8,7 ng dm⁻³) za sve posmatrane analite. Kalibracija je izvršena pomoću standarda koji odgovaraju matrici u opsegu koncentracija od 10 do 250 ng cm⁻³. Dobijena je

dobra linearnost kalibracionih krivih sa koeficijentima korelacije od $R^2 = 0,98502$ za acetamiprid do $R^2 = 0,99945$ za dimetoat, što ukazuje na to da je metoda linearna u posmatranom opsegu koncentracija (slika 18). Na osnovu ovih parametara je utvrđeno da je metoda odgovarajuća, dovoljno osetljiva, da daje zadovoljavajuće prinose i da se uspešno može primeniti za određivanje odabranih pesticida u otpadnoj vodi.



Slika 18. Kalibracione krive za ispitivane pesticide u otpadnoj vodi



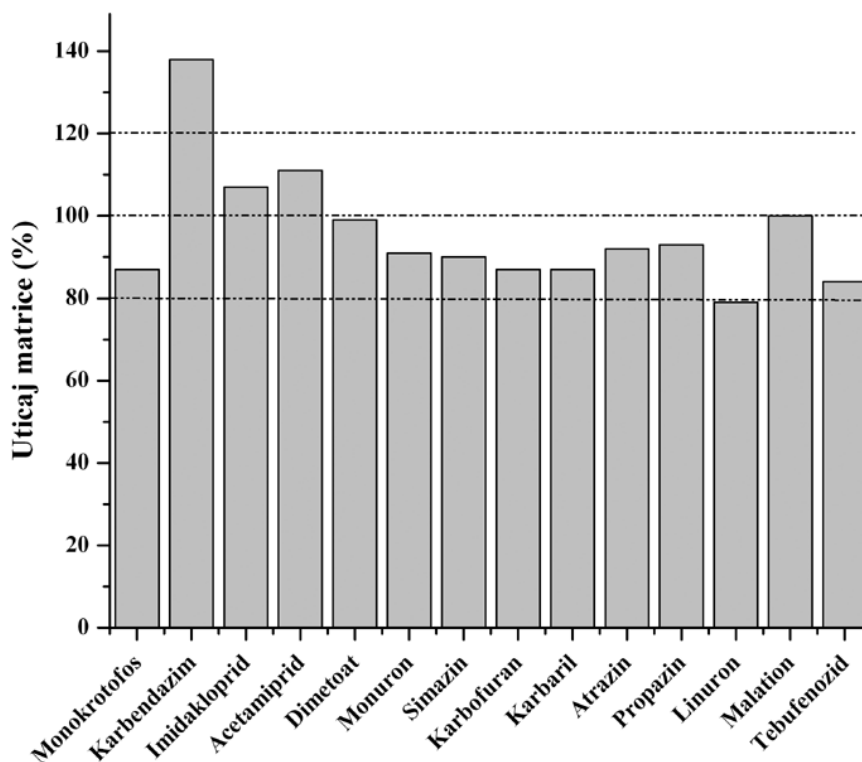
Slika 18. (nastavak)

4.2.2. Procena uticaja matrice uzorka

U cilju eliminisanja uticaja matrice pri analizi uzoraka otpadne vode korišćeni su standardi koji odgovaraju matrici uzorka. Uticaj matrice izračunat je na sledeći način:

$$\text{Uticaj matrice} = \frac{A_{\text{mms}} \cdot 100}{A_{\text{rastvarač}}}$$

Da bi se ispitao uticaj matrice, uzorak otpadne vode (za koga je prethodno utvrđeno da ne sadrži pesticide) je pripremljen podešavanjem pH-vrednosti na 6,0 i dodavanjem smeše pesticida nakon SPE procedure u koncentraciji od 100 ng cm⁻³. Na slici 19 prikazani su dobijeni rezultati. Za većinu pesticida, smanjenje ili povećanje signala analita bilo je manje od 20%. Karbendazim je pokazao najveće poboljšanje signala od 38%, dok je za pesticide imidakloprid i acetamiprid došlo do manje izraženog povećanja signala od 7% i 11%, pojedinačno. Za razliku od površinskih i podzemnih voda gde je samo za acetamiprid, atrazin i tebufenozid primećeno suzbijanje signala, kod otpadnih voda do smanjenje signala došlo je za većinu pesticida. Na osnovu rezultata ne može se utvrditi na koji način se javlja uticaj matrice, a s obzirom na promenljiv sastav otpadne vode neophodno je koristiti standarde koji odgovaraju matrici uzorka kako bi se obezbedila precizna kvantifikacija analita.



Slika 19. Uticaj matrice za uzorak otpadne vode pri koncentraciji pesticida od 100 ng cm⁻³

4.2.3. Analiza realnih uzoraka komunalne otpadne vode Beograda i otpadne vode iz postrojenja za prečišćavanje otpadnih voda

Validirana metoda je primenjena za analizu pesticida u komunalnim otpadnim vodama Beograda i vodi iz dva postrojenja za prečišćavanje otpadnih voda. Od četrnaest pesticida u otpadnoj vodi iz postrojenja nije detektovan nijedan pesticid, ni pre ni posle postrojenja za prečišćavanje otpadne vode, što se može objasniti time da je u toku perioda uzorkovanja (februar i mart 2011. godine) generalno manja upotreba pesticida.

Tabela 18. Pesticidi detektovani u uzorcima komunalnih otpadnih voda Beograda

		Karbendazim	Propazin	Dimetoat	Karbofuran	Imidakloprid	Malation	
Koncentracija \pm SD ^a , ng dm ⁻³	Sajam	jun	97 \pm 5 ^a	12 \pm 3	<0,4	<0,2	73 \pm 3	145 \pm 4
		jul	32 \pm 5	<0,5	25 \pm 4	81 \pm 6	<1,6	<0,4
	Ada Huja 1	jun	22 \pm 2	<0,5	<0,4	<0,2	<1,6	<0,4
		jul	<1,2 ^b	<0,5	<0,4	<0,2	<1,6	<0,4
	Ada Huja 2	jun	24 \pm 3	<0,5	<0,4	<0,2	<1,6	<0,4
		jul	<1,2	<0,5	<0,4	<0,2	<1,6	<0,4
	Istovar	jun	<1,2	<0,5	<0,4	<0,2	<1,6	<0,4
		jul	52 \pm 3	<0,5	<0,4	<0,2	<1,6	<0,4
	Višnjica	jun	32 \pm 4	<0,5	127 \pm 5	<0,2	<1,6	<0,4
		jul	<1,2	<0,5	<0,4	<0,2	<1,6	<0,4

^aSD – standardna devijacija

^bkoncentracije ispod LOD (<LOD)

U tabeli 18 prikazane su koncentracije detektovanih pesticida u uzorcima otpadne vode iz Beograda. Od 14 ispitivanih pesticida 6 je detektovano, a koncentracije detektovanih pesticida kreću se u opsegu od 12 ng dm⁻³ (propazin) do 145 ng dm⁻³ (malation). Pesticidi nisu detektovani na mernim mestima Ušće i Lasta. Najviše analita detektovano je na mernom mestu Sajam. Ovo se može objasniti činjenicom da se upravo ovde sakuplja najveća količina otpadne vode Beograda. Kao i u uzorcima površinske i podzemne vode, najčešće detektovani pesticid bio je karbendazim. Prisustvo karbendazima pronađeno je u većini uzetih uzoraka, izuzev u onim sa mernih mesta Ušće i Lasta. Nivoi karbendazima pronađeni u uzorcima u ovoj studiji kretali su se od 22 ng dm⁻³ na mernom mestu Ada Huja 1 u junu do 97 ng dm⁻³ na

mernom mestu Sajam takođe u junu. Slično je utvrđeno u studiji u Švedskoj gde je karbendazim pronađen u 100% uzoraka otpadne vode, u približno istim koncentracijama kao u beogradskoj komunalnoj otpadnoj vodi [157]. U drugoj studiji, u otpadnim vodama Danske i Švedske, karbendazim je detektovan u koncentracijama od 15 ng dm^{-3} do 58 ng dm^{-3} [158], dok je u Švajcarskoj pronađen u koncentraciji oko 40 ng dm^{-3} [56]. Kao objašnjenje za tako čestu pojavu karbendazima u otpadnim vodama autori navedenih studija navode činjenicu da se karbendazim koristi u fasadnim premazima, te je njegova pojava konstantna tokom cele godine, kao i u domaćinstvima.

U uzorcima beogradske komunalne otpadne vode detektovani su dimetoat (25 ng dm^{-3} i 127 ng dm^{-3}) u dva uzorka, kao i karbofuran (81 ng dm^{-3}), imidaklopid (73 ng dm^{-3}), malation (145 ng dm^{-3}) i propazin (12 ng dm^{-3}) u po jednom uzorku. U studiji koja je rađena u Španiji detektovano je prisustvo imidakloprida u otpadnim vodama, ali sporadično i u veoma niskim koncentracijama [55]. Malation i dimetoat pronađeni su u otpadnim vodama u studiji koja je rađena u Kataloniji, ali u znatno nižim koncentracijama nego u ovom radu (do $0,1 \text{ ng dm}^{-3}$).

5. ZAKLJUČAK

Cilj ovog rada je razvoj i primena nove, brze i osetljive multirezidualne analitičke metode za određivanje tragova odabranih pesticida u površinskim, podzemnim i otpadnim vodama pomoću tečne hromatografije u sprezi sa tandem masenom spektrometrijom. Ispitivano je osam insekticida, pet herbicida i jedan fungicid. Pri odabiru pesticida prvenstveno je uzeto u obzir koji se najviše koriste u poljoprivrednoj praksi u Srbiji.

Prvo je razvijena i optimizovana osetljiva analitička metoda za određivanje odabranih pesticida pomoću tečne hromatografije u sprezi sa tandem masenom spektrometrijom. Ova metoda uključuje pouzdanu maseno-spektrometrijsku detekciju tragova pesticida i potvrdu prisustva analita. Nakon toga, razvijena je i optimizovana metoda ekstrakcije na čvrstoj fazi za efikasnu pripremu uzoraka površinskih i podzemnih voda koja obuhvata istovremenu ekstrakciju analita i prečišćavanje ekstrakta. Nakon razvoja metode za pripremu uzoraka i analizu odabranih pesticida u površinskim i podzemnim vodama, ista je uspešno prilagođena i validirana i za uzorke komunalne otpadne vode. Potom je razvijena, optimizovana i validirana metoda primenjena na realne uzorke površinskih, podzemnih i otpadnih voda.

Na osnovu rezultata ovoga rada mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Kao prekursor joni za sve pesticide odabrani su protonovani molekuli, $[M+H]^+$, osim u slučaju tebufenozida kod kojeg nije bilo moguće izvršiti stabilnu fragmentaciju protonovanog molekula, već adukta sa natrijumom, $[M+Na]^+$.
- Kod polovine ispitivanih pesticida MS^2 fragmentacijom nastaje više od jednog jona, koje je uglavnom bilo moguće dalje fragmentisati (MS^3), a šest pesticida daje i MS^4 spektre. Najosetljivija reakcija u režimu praćenju odabrane reakcije, fragmentacija prekursor jona u najintenzivniji i stabilniji fragmentni jon, izabrana je za kvantifikaciju.
- Dodatne MS^n reakcije se mogu koristiti za potvrdu prisustva analita, tj. mogu se koristiti za potvrdu pozitivnih rezultata u realnim uzorcima.
- Najbolji prinosi metode, za sve ispitivane pesticide, postignuti su primenom sorbenta OASIS HLB i smeše rastvarača metanol-dihlormetana (1:1) kao eluenta.
- Optimalna pH-vrednost uzorka, pri kojoj je prinos metode najveći, je 6,0.

- Rezultati pokazuju da u ovom radu nije postignut proboj kertridža, ali je odabrana zapremina uzorka od 250 cm³ za površinske i podzemne vode i 100 cm³ za otpadne vode, zbog optimalne brzine rada.
- Dobijeni prinosi metode za sve ispitivane matrice, za većinu pesticida, bili su u optimalnom opsegu od 70% do 120%, sa RSD vrednostima uglavnom manjim od 20%. Dobijena je dobra linearnost kalibracionih krivih.
- Postignute su niske granice detekcije i kvantifikacije za sve odabrane pesticide u svim ispitivanim matricama.
- Za većinu pesticida u uzorcima površinske, podzemne i otpadne vode, uticaj matrice je bio prihvatljiv, do $\pm 20\%$, ali za neke od njih je bio značajno veći, zbog čega je za preciznu kvantifikaciju neophodno koristiti standarde prilagođene matrici.
- Razvijena metoda za pripremu, analizu i potvrdu prisustva odabranih pesticida u površinskim i podzemnim vodama, uspešno je prilagođena i validirana za komunalnu otpadnu vodu.
- Razvijena, optimizovana i validirana metoda je primenjena na realne uzorke površinskih i podzemnih voda u cilju dobijanja studije o stanju zagađenosti vode najčešće korišćenim pesticidima u našoj zemlji.
- Od četrnaest ispitivanih pesticida u površinskim vodama je detektovano pet, i to: karbendazim, atrazin, propazin, karbofuran i dimetoat. Generalno, učestalost pronađenih pesticida i njihove koncentracije bili su veći u pritokama, nego u reci Dunav. Najveće ukupne koncentracije pesticida pronađene su u Moravi, i to u maju 2010. i junu 2011. godine, a zatim u Tisi, što se može objasniti upotrebom zemljišta u blizini mesta uzorkovanja u poljoprivredne svrhe.
- U podzemnim vodama pronađeni su isti pesticidi kao u površinskim (u znatno nižim koncentracijama), sa izuzetkom propazina koji je detektovan samo u površinskoj vodi. Koncentracije pronađenih pesticida su iste ili nešto veće u piježometrima nego u bunarima, što bi se moglo objasniti mešanjem sa rečnom vodom. Slično površinskim vodama, najviše koncentracije pesticida pronađene su u junu 2011. godine, što se može objasniti njihovom najvećom primenom u poljoprivredi u tom periodu.
- Nivoi detektovanih pesticida u prirodnim vodama ne prelaze maksimalno dozvoljene koncentracije propisane regulativom Republike Srbije, kao i EU. U vreme uzorkovanja, od pronađenih pesticida jedino je herbicid atrazin bio zabranjen u Srbiji.

U međuvremenu je zabranjena upotreba propazina i karbofurana, po ugledu na evropsku regulativu.

- U komunalnoj otpadnoj vodi Beograda detektovano je šest pesticida, i to: karbendazim, propazin, karbofuran, dimetoat, imidaklopid i malation. Insekticid imidaklopid je 2015. godine uključen u prvu „watch listu”.
- U uzorcima pre i posle postrojenja za prečišćavanje otpadnih voda pesticidi nisu detektovani, najverovatnije zbog perioda uzorkovanja kada je njihova upotreba smanjena.
- Utvrđeno je da se od ispitivanih pesticida u Srbiji najčešće koriste karbendazim i dimetoat, s obzirom na njihovu pojavu kako u površinskoj i podzemnoj vodi, tako i u komunalnoj otpadnoj vodi. Karbendazim je danas zabranjen za korišćenje u EU, ali je u Srbiji njegova upotreba još uvek odobrena.
- Konačno, na osnovu rezultata se može zaključiti da iako je poljoprivreda značajan izvor pesticida u površinskim i podzemnim vodama, ne mogu se zanemariti količine pesticida koje dolaze iz urbane sredine.

LITERATURA

1. Radivojević Lj., Šantrić Lj. and Stanković-Kalezić R. (2007): Pesticidi u zemljištu: delovanje na mikroorganizme, *Pesticides and Phytomedicine*, **22**, 11–24.
2. Janjić M., and Mitrić S. (2004): *Pesticidi u poljoprivredi i šumarstvu*, Poljoprivredni fakultete, Banja Luka.
3. Tadeo José L. (2008): *Analysis of Pesticides in Food and Environmental Samples*, Taylor & Francis Group, Boca Raton.
4. Barrek S., Cren-Olive C., Wiest L., Baudot R., Arnaudguilhem C. and Grenier-Loustalot M.F. (2009): Multi-residue analysis and ultra-trace quantification of 36 priority substances from the European Water Framework Directive by GC–MS and LC-FLD-MS/MS in surface waters, *Talanta*, **79**, 712–722.
5. Reemtsma T., and Jekel M. (2006): *Organic pollutants in the water cycle*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
6. Vasiljević T, Grujić S., Radišić M., Dujaković N., and Laušević M. (2012): *Pesticide residues in surface water and groundwater. In: Rathore HS, Nollet LML, editors. Pesticides: evaluation of environmental pollution*. CRC Press, Boca Raton, 259–298.
7. Bucheli T.D., Müller S.R., Voegelin A. and Schwarzenbach R.P. (1998): Occurrence and behavior of pesticides in rainwater, roof runoff, and artificial stormwater infiltration, *Environmental Science & Technology*, **32**, 3465–3471.
8. Kolpin D.W., Barbash J.E. and Gilliom R.J. (1998): Occurrence of pesticides in shallow groundwater of the United States: Initial results from the National Water-Quality Assessment Program, *Environmental Science & Technology*, **32**, 558–566.
9. Blanchoud H., Moreau-Guigon E., Farrugia F., Chevreuil M. and Mouchel J.M. (2007): Contribution by urban and agricultural pesticide uses to water contamination at the scale of the Marne watershed, *Science of the Total Environment*, **375**, 168–179.
10. Wittmer I.K., Bader H.P., Scheidegger R., et al., (2010): Significance of urban and agricultural land use for biocide and pesticide dynamics in surface waters, *Water Research*, **44**, 2850–2862.
11. Manahan S.E. (2001): *Fundamentals of Environmental Chemistry*. CRC Press LLC, Boca Raton.
12. Bovan A. B., Barać Stojanović M., Dalmacija B. and Radovanović Jovin H. (2015): *Korišćenje i tretman komunalnih i industrijskih otpadnih voda u Republici Srbiji*,

Centalno-evropski forum za razvoj, CEDEF Pokrajinski Sekretarijat za urbanizam, graditeljstvo i zaštitu životne sredine APV.

13. Braman S.K., Oetting R.D. and Florkowski W. (1997): Assessment of pesticide use by commercial landscape maintenance and lawn care firms in Georgia¹, *Journal of Entomological Science*, **32**, 403–411.
14. Nitschke L. and Schüssler W. (1998): Surface water pollution by herbicides from effluents of waste water treatment plants, *Chemosphere*, **36**, 35–41.
15. Kolpin D.W., Thurman E.M., Lee E.A., Meyer M.T., Furlong E.T. and Glassmeyer S.T. (2006): Urban contributions of glyphosate and its degradate AMPA to streams in the United States, *Science of the Total Environment*, **354**, 191–197.
16. Kreuger J. (1998): Pesticides in stream water within an agricultural catchment in southern Sweden, 1990–1996, *Science of the Total Environment*, **216**, 227–251.
17. Müller K., Bach M., Hartmann H., Spiteller M. and Frede H.G. (2002): Point-and nonpoint-source pesticide contamination in the Zwestern Ohm catchment, Germany, *Journal of Environmental Quality*, **31**, 309–318.
18. Neumann M., Liess M. and Schulz R. (2003): A qualitative sampling method for monitoring water quality in temporary channels or point sources and its application to pesticide contamination, *Chemosphere*, **51**, 509–513.
19. Neumann M., Schulz R., Schäfer K., Müller W., Mannheller W. and Liess M. (2002): The significance of entry routes as point and non-point sources of pesticides in small streams, *Water Research*, **36**, 835–842.
20. Leu C., Singer H., Stamm C., Müller S.R. and Schwarzenbach R.P. (2004): Simultaneous assessment of sources, processes, and factors influencing herbicide losses to surface waters in a small agricultural catchment, *Environmental Science & Technology*, **38**, 3827–3834.
21. Holvoet K., Griensven A., Seuntjens P. and Vanrolleghem P.A. (2005): Sensitivity analysis for hydrology and pesticide supply towards the river in SWAT, *Physics and Chemistry of the Earth*, **30**, 518–526.
22. Gerecke A.C., Schärer M., Singer H.P., et al., (2002): Sources of pesticides in surface waters in Switzerland: pesticide load through waste water treatment plants—current situation and reduction potential, *Chemosphere*, **48**, 307–315.
23. Pereira W.E. and Hostettler F.D. (1993): Nonpoint source contamination of the Mississippi River and its tributaries by herbicides, *Environmental Science & Technology*, **27**, 1542–1552.

24. Bradford D.F., Heithmar E.M., Tallent-Halsell N.G., et al., (2010): Temporal patterns and sources of atmospherically deposited pesticides in Alpine Lakes of the Sierra Nevada, California, USA, *Environmental Science & Technology*, **44**, 4609–4614.
25. Council of the European Union. 2001. Decision 2455/2001/EC of the European Parliament and of the Council of 20 November 2001 establishing the list of priority substances in the field of water policy and amending Directive 2000/60/EC, *The Official Journal of the European Union*, **L331**, 1–5.
26. Barbash J.E., Thelin G.P., Kolpin D.W. and Gilliom R.J. (2001): Major Herbicides in Ground Water, *Journal of Environmental Quality*, **30**, 831–845.
27. Kuster M., López de Alda M.J., Barata C., Raldù D. and Barceló D. (2008): Analysis of 17 polar to semi-polar pesticides in the Ebro river delta during the main growing season of rice by automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Talanta*, **75**, 390–401.
28. Jordan T.B., Nichols D.S. and Kerr N.I. (2009): Selection of SPE cartridge for automated solid-phase extraction of pesticides from water followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **394**, 2257–2266.
29. Maloschik E., Ernst A., Hegedűs G., Darvas B. and Székács A. (2007): Monitoring water-polluting pesticides in Hungary, *Microchemical Journal*, **85**, 88–97.
30. Palma P., Kuster M., Alvarenga P., et al., (2009): Risk assessment of representative and priority pesticides, in surface water of the Alqueva reservoir (South of Portugal) using on-line solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Environment International*, **35**, 545–551.
31. Gervais G., Brosillon S., Laplanche A. and Helen C. (2008): Ultra-pressure liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry for multiresidue determination of pesticides in water, *Journal of Chromatography A*, **1202**, 163–172.
32. Asperger A., Efer J., Koal T. and Engewald W. (2002): Trace determination of priority pesticides in water by means of high-speed on-line solid-phase extraction–liquid chromatography– tandem mass spectrometry using turbulent-flow chromatography columns for enrichment and a short monolithic column for fast liquid chromatographic separation, *Journal of Chromatography A*, **960**, 109–119.
33. Postigo C., López de Alda M.J., Barceló D., Ginebreda A., Garrido T. and Fraile J. (2010): Analysis and occurrence of selected medium to highly polar pesticides in groundwater of Catalonia (NE Spain): An approach based on on-line solid phase

- extraction–liquid chromatography–electrospray-tandem mass spectrometry detection, *Journal of Hydrology*, **383**, 83–92.
34. Shukla G., Kumar A., Bhanti M., Joseph P.E. and Taneja A. (2006): Organochlorine pesticide contamination of ground water in the city of Hyderabad, *Environment International*, **32**, 244–247.
 35. Kolpin D.W., Schnoebelen D.J. and Thurman E.M. (2004): Degradates provides insight to spatial and temporal trends of herbicides in ground water, *Ground Water*, **42**, 601–608.
 36. Loos R., Locoro G., Comero S., et al., (2010): Pan-European survey on the occurrence of selected polar organic persistent pollutants in ground water, *Water Research*, **44**, 4115–4126.
 37. Bakouri E., Ouassini H. A., Morillo J. and Usero J. (2008): Pesticides in ground water beneath Loukkos perimeter, Northwest Morocco, *Journal of Hydrology*, **348**, 270–278.
 38. Tesoriero A.J., Saad D.A., Burow K.R., Frick E.A., Puckett L.J. and Barbash J.E. (2007): Linking ground-water age and chemistry data along flow paths: Implications for trends and transformations of nitrate and pesticides, *Journal of Contaminant Hydrology*, **94**, 139–155.
 39. Carabias-Martínez R., Rodríguez-Gonzalo E., Fernández-Laespada M.E., Calvo-Seronero L. and Sánchez-San Román. F.J. (2003): Evolution over time of the agricultural pollution of waters in an area of Salamanca and Zamora (Spain), *Water Research*, **37**, 928–938.
 40. Marín J.M., Sancho J.V., Pozo O.J., López F.J. and Hernández F. (2006): Quantification and confirmation of anionic, cationic and neutral pesticides and transformation products in water by on-line solid phase extraction–liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, **1133**, 204–214.
 41. Hildebrandt A., Guillamón M., Lacorte S., Tauler R. and Barceló D. (2008): Impact of pesticides used in agriculture and vineyards to surface and groundwater quality (North Spain), *Water Research*, **42**, 3315–3326.
 42. Carvalho J.J., Jerónimo P.C.A., Gonçalves C. and Alpendurada M.F. (2008): Evaluation of a multiresidue method for measuring fourteen chemical groups of pesticides in water by use of LC-MS-MS, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **392**, 955–968.

43. Belmonte Vega A., Garrido Frenich A. and Martínez Vidal J.L. (2005): Monitoring of pesticides in agricultural water and soil samples from Andalusia by liquid chromatography coupled to mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, **538**, 117–127.
44. Lari S.Z, Noor A.K., Kavita N.G., Tejal S.M. and Neeta P.T. (2014): Comparison of pesticide residues in surface water and ground water of agriculture intensive areas, *Journal of Environmental Health Science & Engineering*, **12**, 1-7.
45. Bonansea R.I., Amé M.V. and Wunderlin D.A. (2013): Determination of priority pesticides in water samples combining SPE and SPME coupled to GC–MS. A case study: Suquía River basin (Argentina), *Chemosphere*, **90**, 1860–1869.
46. Caldas S.S., Rombaldi C., Oliveira Arias J.L., Cardoso Marube L. and Primel E.G. (2016): Multi-residue method for determination of 58 pesticides, pharmaceuticals and personal care products in water using solvent demulsification dispersive liquid–liquid microextraction combined with liquid chromatography–tandem mass spectrometry *Talanta*, **146**, 676–688.
47. Hurtado-Sánchez M.C., Romero-González R., Rodríguez-Cáceres M.I., Durán-Merás I. and Garrido Frenich A. (2013): Rapid and sensitive on-line solid phase extraction–ultra high-performance liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry analysis of pesticides in surface waters, *Journal of Chromatography A*, **1305**, 193–202.
48. Pucarević M., Sovljanski M., Lazić M. and Marjanović N. (2002): Atrazine in groundwater of Vojvodina Province, *Water Research*, **36**, 5120–5126.
49. Council of the European Union. 2008. Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on environmental quality standards in the field of water policy, amending and subsequently repealing Council Directives 82/176/EEC, 83/513/EEC, 84/156/EEC, 84/491/EEC, 86/280/EEC and amending Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council. *Official Journal of the European Union*, **L348**, 84–97.
50. Münze R, Hannemann C., Orlinskiy P., Gunold R., et al., (2017): Pesticides from wastewater treatment plant effluents affect invertebrate communities, *Science of the Total Environment*, **599–600**, 387–399.
51. Nam S.W., Jo B.I., Yoon Y. and Zoh K.D. (2014): Occurrence and removal of selected micropollutants in a water treatment plant, *Chemosphere*, **95**, 156–165.

52. Campos-Manas M.C., Plaza-Bolanos P., Sánchez-Pérez J.A., Malato S. and Agüera A. (2017): Fast determination of pesticides and other contaminants of emerging concern in treated wastewater using direct injection coupled to highly sensitive ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, **1507**, 84–94.
53. Cahill M.G., Caprioli G., Stack M., Vittori S. and James K.J. (2011): Semi-automated liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS) method for basic pesticides in wastewater effluents, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **400**, 587–594
54. Köck-Schulmeyer M., Villagrasa M., López de Alda M., Sánchez R.C., Ventura F. and Barceló D. (2013): Occurrence and behavior of pesticides in wastewater treatment plants and their environmental impact, *Science of the Total Environment*, **458–460**, 466–476.
55. Rousisa N., Badeb R., Bijlsma L., Zuccato E., Sanchob J.V., Hernandezb F. and Castiglioni S. (2017): Monitoring a large number of pesticides and transformation products in water samples from Spain and Italy, *Environmental Research*, **156**, 31–38.
56. Singer H., Jaus S., Hanke I., Lück A., Hollender J. and Alder A.C. (2010): Determination of biocides and pesticides by on-line solid phase extraction coupled with mass spectrometry and their behaviour in wastewater and surface water, *Environmental Pollution* **158**, 3054–3064.
57. Terzić S., Senta I., Ahel M., Gros M., et al., (2008): Occurrence and fate of emerging wastewater contaminants in Western Balkan Region, *Science of the Total Environment*, **399**, 66–77.
58. Freemark K. and Boutin C. (1995): Impacts of agricultural herbicide use on terrestrial wildlife in temperate landscapes: A review with special reference to North America, *Agriculture, Ecosystems & Environment*, **52**, 67–91.
59. Nešković N. (1988): Pesticidi i životna sredina. *Pesticidi i njihovo delovanje na zdravlje ljudi i okolinu*, Jugoslovenski simpozijuma (sa međunarodnim učešćem), Bečej, Zbornik radova, 95–100.
60. Hodgson O., Mailnam R.B., Chambers J.E. and Dow R.E. (1998): *Dictionary of toxicology*. MacMilan, New York.
61. Stetter J. (1993): Trends in the future development of pest and weed control—An industrial point of view, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **17**, 346–370.

62. Kuster M., Lopez de Alda M. and Barcelo D. (2009): Liquid chromatography–tandem mass spectrometric analysis and regulatory issues of polar pesticides in natural and treated waters, *Journal of Chromatography A*, **1216**, 520–529.
63. Council of the European Union. 2000. Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy. *Official Journal of the European Union*, **L327**, 1–72.
64. Council of the European Union. 2013. Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the Council of 12 August 2013 amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy. *Official Journal of the European Union*, **L226**, 1–17.
65. Commission implementing decision (EU) 2015/495 of 20 March 2015 establishing a watch list of substances for Union-wide monitoring in the field of water policy pursuant to Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council. *Official Journal of the European Union*, **L78**, 40–42.
66. Council of the European Union. 2006. Directive 2006/118/EC of the European Parliament and of the Council of 12 December 2006 on the protection of groundwater against pollution and deterioration. *Official Journal of the European Union*, **L372**, 19–31.
67. Sl. gl. RS (Službeni glasnik Republike Srbije), br. 30/2010 i 93/2012. Zakon o vodama. Beograd, *JP Službeni glasnik*.
68. Sl. gl. RS (Službeni glasnik Republike Srbije), br. 67/2011 i 48/2012. Uredba o graničnim vrednostima emisije zagađujućih materija u vode i rokovima za njihovo dostizanje. Beograd, *JP Službeni glasnik*.
69. Sl. gl. RS (Službeni glasnik Republike Srbije), br. 24/2014. Uredba o graničnim vrednostima prioriternih i prioriternih hazardnih supstanci koje zagađujuu površinske vode i rokovima za njihovo dostizanje. Beograd, *JP Službeni glasnik*.
70. Sl. gl. RS (Službeni glasnik Republike Srbije), br. 50/2012. Uredba o graničnim vrednostima zagađujućih materija u površinskim i podzemnim vodama i sedimentu i rokovima za njihovo dostizanje. Beograd, *JP Službeni glasnik*.
71. Sl. gl. RS (Službeni glasnik Republike Srbije), br. 74/2011. Pravilnik o parametrima ekološkog i hemijskog statusa površinskih voda i parametrima hemijskog i kvantitativnog statusa podzemnih voda. Beograd, *JP Službeni glasnik*.

72. Sl. gl. RS (Službeni glasnik Republike Srbije), br. 117/2012. Lista zabranjenih supstanci. Beograd, *JP Službeni glasnik*.
73. European Commission, 2016. EU Pesticides database, ec.europa.eu/food/, (poslednji pregled maj 2016.godine).
74. Sl. gl. RS (Službeni glasnik Republike Srbije), br. 49/2017. Lista odobrenih supstanci. Beograd, *JP Službeni glasnik*.
75. www.pesticidi.org/ActiveMaterial/List, (poslednji pregled maj 2018.godine).
76. The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification (2009) WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, WHO Press, Geneva, Switzerland.
77. The International Agency for Research on Cancer–IARC, monographs.iarc.fr/ENG/Classification, (poslednji pregled maj 2018.godine).
78. Boundina A., Emmelin C., Beeliouamer A., Greier-Loustalot M.F. and Chovelon J.M. (2003): Photochemical behaviour of carbendazim in aqueous solution, *Chemosphere* **50**, 649–655.
79. www.spos.info/novi/, (poslednji pregled maj 2018.godine).
80. Tekel J. and Hatrik Š. (1996): Pesticide residue analyses in plant material by chromatographic methods: clean-up procedures and selective detectors, *Journal of Chromatography A*, **754**, 397–410.
81. Tadeo J. L. (2008): *Analysis of pesticides in food and environmental samples*, CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton.
82. Blasco C., Font G. and Picó Y. (2002): Comparison of microextraction procedures to determine pesticides in oranges by liquid chromatography–mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, **970**, 201–212.
83. Barcelo D. and Hennion M.C. (2005): *Trace determination of pesticides and their degradation products in water*, Elsevier Science, Amsterdam.
84. Hyötyläinen T. (2009): Critical evaluation of sample pretreatment techniques, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **394**, 743–758.
85. Trtić-Petrović T., Đorđević J., Dujaković N., Kumrić K., Vasiljević T. and Laušević M. (2010): Determination of selected pesticides in environmental water by employing liquid-phase microextraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **397**, 2233–2243.

86. Nogueira J.M.F., Sandra T. and Sandra P. (2004): Multiresidue screening of neutral pesticides in water samples by high performance liquid chromatography–electrospray mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, **500**, 209–215.
87. Masia A, Blasco C. and Pico Y. (2014): Last trends in pesticide residue determination by liquid chromatography–mass spectrometry, *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, **2**, 11–24.
88. Carabias-Martínez R., Rodríguez-Gonzalo E. and Herrero-Hernández E. (2005): Determination of triazines and dealkylated and hydroxylated metabolites in river water using a propazine-imprinted polymer, *Journal of Chromatography A*, **1085**, 199–206.
89. Mezcuca M., Agüera A., Lliberia J.L., Cortés M.A., Bagó B. and Fernández-Alba A.R. (2006): Application of ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry to the analysis of priority pesticides in groundwater, *Journal of Chromatography A*, **1109**, 222–227.
90. Ferrer I. and Thurman E.M. (2007): Multi-residue method for the analysis of 101 pesticides and their degradates in food and water samples by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, **1175**, 24–37.
91. Baugros J.B., Giroud B., Dessalces G., Grenier-Loustalot M.F. and Cren-Olivè C. (2008): Multiresidue analytical methods for the ultra-trace quantification of 33 priority substances present in the list of REACH in real water samples, *Analytica Chimica Acta*, **607**, 191–203.
92. Rodrigues A.M., Ferreira V., Cardoso V.V., Ferreira E. and Benoliel M.J. (2007): Determination of several pesticides in water by solid-phase extraction, liquid chromatography and electrospray tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, **1150**, 267–278.
93. Kampioti A.A., Borba da Cunha A.C., López de Alda M. and Barceló D. (2005): Fully automated multianalyte determination of different classes of pesticides, at picogram per litre levels in water, by on-line solid-phase extraction–liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **382**, 1815–1825.
94. El Atrache L.L., Sabbah S. and Morizur J.P. (2005): Identification of phenyl-*N*-methylcarbamates and their transformation products in Tunisian surface water by

- solid-phase extraction liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Talanta*, **65**, 603–612.
95. Penálver A., García V., Pocurull E., Borrull F. and Marc R.M. (2003): Stir bar sorptive extraction and large volume injection gas chromatography to determine a group of endocrine disrupters in water samples, *Journal of Chromatography A*, **1007**, 1–9.
 96. Rocha C., Pappas E.A. and Huang C. (2008): Determination of trace triazine and chloroacetamide herbicides in tile-fed drainage ditch water using solid-phase microextraction coupled with GC-MS, *Environmental Pollution*, **152**, 239–244.
 97. Camino-Sánchez F.J., Zafra-Gómez A., Cantarero-Malagón S. and Vílchez J.L. (2012): Validation of a method for the analysis of 77 priority persistent organic pollutants in river water by stir bar sorptive extraction in compliance with the European Water Framework Directive, *Talanta*, **89**, 322–334.
 98. Sánchez-Avila J., Quintana J., Ventura F., Tauler R., Duarte C.M. and Lacorte S. (2010): Stir bar sorptive extraction-thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry: An effective tool for determining persistent organic pollutants and nonylphenol in coastal waters in compliance with existing Directives, *Marine Pollution Bulletin*, **60**, 103–112.
 99. Campos-Manas M.C, Plaza-Bolanos P., Sánchez-Pérez J.A., Malato S. and Agüera A. (2017): Fast determination of pesticides and other contaminants of emerging concern in treated wastewater using direct injection coupled to highly sensitive ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, **1507**, 84–94.
 100. Ma W.T., Fu K.K., Zongwei C. and Jiang G.B. (2003): Gas chromatography/mass spectrometry applied for the analysis of triazine herbicides in environmental waters, *Chemosphere*, **52**, 1627–1632.
 101. Zhang J. and Hian K.L. (2006): Application of liquid-phase microextraction and on-column derivatization combined with gas chromatography-mass spectrometry to the determination of carbamate pesticides, *Journal of Chromatography A*, **1117**, 31–37.
 102. Hung T., Michael C. and Mehran A. (2004): Method for the determination of organophosphate insecticides in water, sediment and biota, *Chemosphere*, **54**, 41–47.
 103. Qin X., Bin H., Chunhe Y., Linbo X. and Zucheng J. (2006): Optimization of a single-drop microextraction procedure for the determination of organophosphorus

- pesticides in water and fruit juice with gas chromatography-flame photometric detection, *Talanta*, **69**, 848–855.
104. Rouessac F. and Rouessac A. (2007): *Chemical analysis: Modern Instrumentation Methods and Techniques*, John Wiley & Sons, Chichester.
 105. Mitra S. (2003): *Sample preparation techniques in analytical chemistry*, John Wiley & Sons, Hoboken.
 106. Liu F.M., Bischoff G., Pestemer W., Xu W. and Kofoet A. (2006): Multi-residue analysis of some polar pesticides in water samples with SPE and LC–MS–MS, *Journal of Chromatography A*, **63**, 233–237.
 107. Petropoulou S.S., Tsarbopoulos A. and Siskos P.A, (2006): Determination of carbofuran, carbaryl and their main metabolites in plasma samples of agricultural populations using gas chromatography-tandem mass spectrometry, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **385**, 1444–1456.
 108. Xue N.D., Xu X.B. and Jin Z.L. (2005): Screening 31 endocrine-disrupting pesticides in water and surface sediment samples from Beijing Guanting reservoir, *Chemosphere*, **61**, 1594–1606.
 109. Asperger A., Efer J., Koal T. and Engewald W. (2002): Trace determination of priority pesticides in water by means of high-speed on-line solid-phase extraction–liquid chromatography– tandem mass spectrometry using turbulent-flow chromatography columns for enrichment and a short monolithic column for fast liquid chromatographic separation, *Journal of Chromatography A*, **960**, 109–119.
 110. Ollers S., Singer H.P., Fassler P. and Muller S.R. (2001): Simultaneous quantification of neutral and acidic pharmaceuticals and pesticides at the low ng/l level in surface and waste water, *Journal of Chromatography A*, **911**, 225–234.
 111. Bossi R., Vejrup K.V., Mogensen B.B. and Asman W.A.H. (2002): Analysis of polar pesticides in rainwater in Denmark by liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, **957**, 27–36.
 112. Quintana J., Mart I. and Ventura F. (2001): Monitoring of pesticides in drinking and related waters in NE Spain with a multiresidue SPE-GC–MS method including an estimation of the uncertainty of the analytical results, *Journal of Chromatography A*, **938**, 3–13.
 113. Gonçalves C. and Alpendurada M.F. (2004): Solid-phase micro-extraction–gas chromatography–(tandem) mass spectrometry as a tool for pesticide residue analysis

- in water samples at high sensitivity and selectivity with confirmation capabilities, *Journal of Chromatography A*, **1026**, 239–250.
114. Meyer V.R. (2004): *Practical High-Performance Liquid Chromatography*, John Wiley & Sons. Weinheim.
 115. Ardrey R. E. (2003): *Liquid chromatography–Mass spectrometry: An introduction*, John Wiley & Sons, Huddersfield.
 116. Lindon J., Tranter G. and Koppenaal D. (2010): *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry-Academic*, Press Elsevier, Oxford.
 117. Boyd R.K., Basic C. and Bethem R.A. (2008): *Trace Quantitative Analysis by Mass Spectrometry*, John Wiley & Sons, Chichester.
 118. Potter T.L., Mohamed M.A., Ali H. and Agric J. (2007): Solid-phase extraction combined with high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry analysis of pesticides in water: Method performance and application in a reconnaissance survey of residues in drinking water in greater Cairo, Egypt, *Food Chemistry*. **55**, 204–210.
 119. Tankiewicz M., Fenik J. and Biziuk M. (2010): Determination of organophosphorus and organonitrogen pesticides in water samples, *Trends in Analytical Chemistry*, **29**, 1050–1063.
 120. Pramanik B.N., Ganguly A.K. and Gross M.L. (2002): *Applied electrospray mass spectrometry*, Taylor&Francis, USA.
 121. Kostianinen R. and Kauppila T.J. (2009): Effect of eluent on the ionization process in liquid chromatography–mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, **1216**, 685–699.
 122. Díaz L., Llorca-Pórcel J. and Valor I. (2008): Ultra-trace determination of 31 pesticides in water samples by direct injection-rapid resolution liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, **624**, 90–96.
 123. Greulich K. and Alder L. (2008): Fast multiresidue screening of 300 pesticides in water for human consumption by LC-MS/MS, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **391**, 183–197.
 124. Benijts T., Riet D., Willy L. and De Leenheer A. (2004): Countering matrix effects in environmental liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry water analysis for endocrine disrupting chemicals, *Journal of Chromatography A*, **1029**, 153–159.

125. Dijkamn E., Mooibroek D., Hoogerbrugge R., Hogendoorn E., Sancho J.V., Pozo O. and Hernandez F. (2001): Study of matrix effects on the direct trace analysis of acidic pesticides in water using various liquid chromatographic modes coupled to tandem mass spectrometric detection, *Journal of Chromatography A*, **926**, 113–125.
126. Ambrose F., Merisa M., Vaishali B., Brian K. and Mary L. (2013): Ion suppression; A critical review on causes, evaluation, prevention and applications, *Talanta*, **115**, 104–122.
127. Wickramasekara S., Hernández-Ruiz S., Abrell L., Arnold R. and Chorover J. (2012): Natural dissolved organic matter affects electrospray ionization during analysis of emerging contaminants by mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, **717**, 77–84.
128. Tang L. and Kebarle P. (1993): Dependence of ion intensity in electrospray mass spectrometry on the concentration of the analytes in the electrosprayed solution, *Analytical Chemistry*, **65**, 3654–68.
129. Skeff W., Recknagel C., Detlef E. and Schulz B. (2016): The influence of salt matrices on the reversed-phase liquid chromatography behavior and electrospray ionization tandem mass spectrometry detection of glyphosate, glufosinate, aminomethylphosphonic acid and 2-aminoethylphosphonic acid in water, *Analytica Chimica Acta*, **717**, 77–84.
130. King R., Bonfiglio R., Fernandez-Metzler C., Miller-Stein C. and Olah T. (2000): Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **11**, 942–950.
131. Martínez D.B., Galera M.M., Vázquez P.P. and García M.D.G. (2007): Simple and rapid determination of benzoylphenylurea pesticides in river water and vegetables by LC–ESI–MS, *Chromatographia*, **66**, 533–538.
132. Furey A., Moriarty M., Bane V., Kinsella B. and Lehane M. (2013): Ion suppression; A critical review on causes, evaluation, prevention and applications, *Talanta*, **115**, 104–122.
133. Reemtsa T. (2001): The use of liquid chromatography-atmospheric pressure ionization-mass spectrometry in water analysis, Part II: Obstacles, *Trends in Analytical Chemistry*, **20**, 533–542.
134. Tauxe-Wuersch A., de Alencastro L.F., Gradjean D. and Tarradellas J. (2005): Occurrence of several acidic drugs in sewage treatment plants in Switzerland and risk assessment, *Water Research*, **39**, 1761–1172.

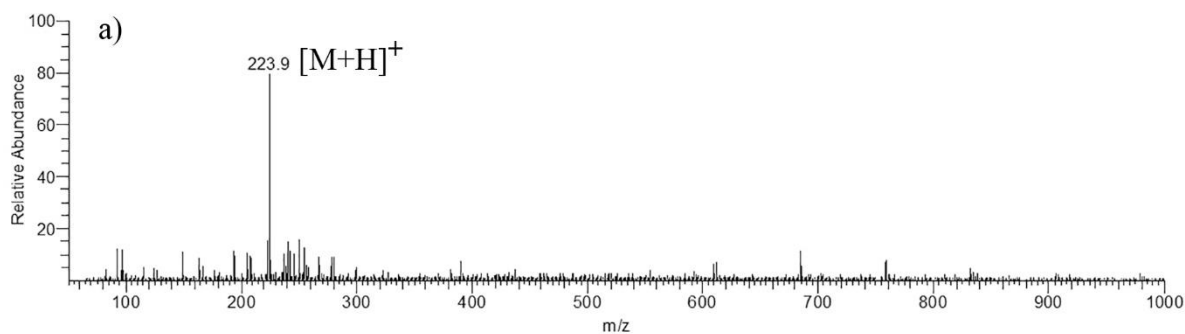
135. Council of the European Communities (1993) Commission Decision 93/256/EEC. *Official Journal of the European Union*, **L118**, 64–74.
136. Commission Decision 2002/657/EC, 2002. Decision of 12 August 2 implementing council directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of the results. *Official Journal of the European Union*, **L221**, 8–36, 19–31.
137. European Commission, 2014. Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed (SANCO/12571/2013).
138. Rubirola A., Boleda R.M. and Galceran T.M. (2017): Multiresidue analysis of 24 Water Framework Directive priority substances by on-line solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry in environmental waters, *Journal of Chromatography A*, **1493**, 64–75.
139. Almeida Azevedo D., Lacorte S., Vinhas T., Viana P. and Barceló D. (2000): Monitoring of priority pesticides and other organic pollutants in river water from Portugal by gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, **879**, 13–26.
140. Sabik H., Jeannot R. and Rondeau B. (2000): Multiresidue methods using solid-phase extraction techniques for monitoring priority pesticides, including triazines and degradation products, in ground and surface waters, *Journal of Chromatography A*, **885**, 217–236.
141. Radišić M., Grujić S., Vasiljević T. and Laušević M. (2009): Determination of selected pesticides in fruit juices by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Food Chemistry*, **113**, 712–719.
142. Dimkić M. (2010 i 2011): *Studija starenja bunara i održavanje objekata, Izveštaj za I, II i III fazu*, Institut za vodoprivredu "Jaroslav Černi", Beograd
-
143. Grujić S., Radišić M., Vasiljević T. and Laušević M. (2005): Determination of carbendazim residues in fruit juices by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Food Additives and Contaminants*, **22**, 1132–1137.
144. Makihata N., Kawamoto T. and Teranishi K. (2003): Simultaneous analysis of carbamate pesticides in tap and raw water by LC/ESI/MS, *Analytical Science*, **19**, 543–549.

145. Palma G., Sánchez A., Olave Y., Encina F., Palma R. and Barra R. (2004): Pesticide levels in surface waters in an agricultural–forestry basin in Southern Chile, *Chemosphere*, **57**, 763–770.
146. Konstantinou I.K., Hela D. G. and Albanis T.A. (2006): The status of pesticide pollution in surface waters (rivers and lakes) of Greece. Part I. Review on occurrence and levels, *Environmental Pollution*, **141**, 555–570.
147. Fushiwaki Y. and Urano K. (2001): Adsorption of pesticides and their biodegraded products on clay minerals and soils, *Journal of Health Sciences*, **47**, 429–432.
148. Botta F., Fauchon N., Blanchoud H., Chevreuil M. and Guery B. (2012): Application and validation of a programme to reduce surface water contamination with urban pesticides, *Chemosphere*, **86**, 166–176.
149. Cerejeira M.J., Viana P., Batista S., Pereira T., Silva E., Valério M., et al., (2003): Pesticides in Portuguese surface and ground waters, *Water Research*, **37**, 1055–1063.
150. Kimbrough R.A. and Litke D.W. (1996): Pesticides in streams draining agricultural and urban areas in Colorado, *Environmental Science and Technology*, **30**, 908–916.
151. Otieno P.O., Lalah J.O., Virani M., Jondiko I.O. and Schramm K.W. (2010): Soil and water contamination with carbofuran residues in agricultural farmlands in Kenya following the application of the technical formulation Furadan, *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, **45**, 137–144.
152. Ensminger M., Bergin R., Spurlock F. and Goh K.S. (2011): Pesticide concentrations in water and sediment and associated invertebrate toxicity in Del Puerto and Orestimba Creeks, California, 2007–2008, *Environmental Monitoring and Assessment*, **175**, 573–587.
153. Koal T., Asperger A., Efer J. and Engewald W. (2003): Simultaneous determination of a wide spectrum of pesticides in water by means of fast on-line SPE-HPLC-MS-MS, a novel approach, *Chromatographia*, **57**, 93–101.
154. Furtula V., Derksen G. and Colodey A. (2006): Application of automated mass spectrometry deconvolution and identification software for pesticide analysis in surface waters, *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, **41**, 1259–1271.
155. Licciardello F., Antoci M.L., Brugaletta L. and Cirell G.L. (2011): Evaluation of groundwater contamination in a coastal area of south-eastern Sicily, *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, **46**, 498–508.

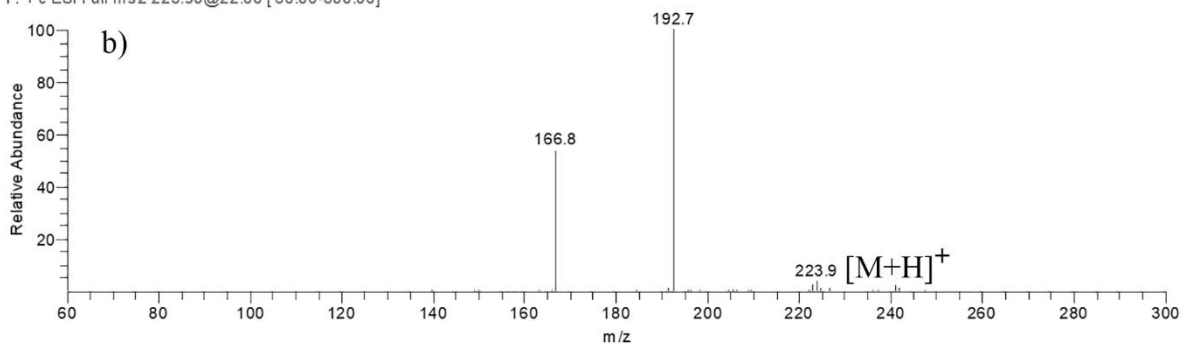
156. Kong L., Kasokami K., Duong H.T. and Chau H.T.C. (2016): Screening of 1300 organic micro-pollutants in groundwater from Beijing and Tianjin, North China, *Chemosphere*, **165**, 221–230.
157. Gros M., K. Blumb M., Jernstedt H., Renmanc G. *et. all*, (2017): Screening and prioritization of micropollutants in wastewaters from on-site sewage treatment facilities, *Journal of Hazardous Materials*, **328**, 37–45.
158. Bollmann U.E., Tang C., Eriksson E., Jonsson K., Vollertsend J. and Bester K. (2014): Biocides in urban wastewater treatment plant influent at dry and wet weather: Concentrations, mass flows and possible sources, *Water Research*, **60**, 64–74.

PRILOG

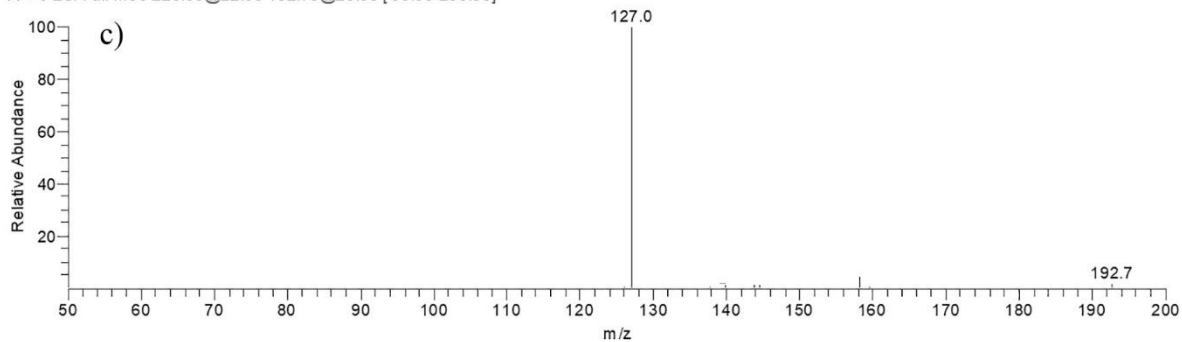
monokrotofos RT: 0.35 AV: 1 NL: 9.23E6
F: + c ESI Full ms [50.00-1000.00]



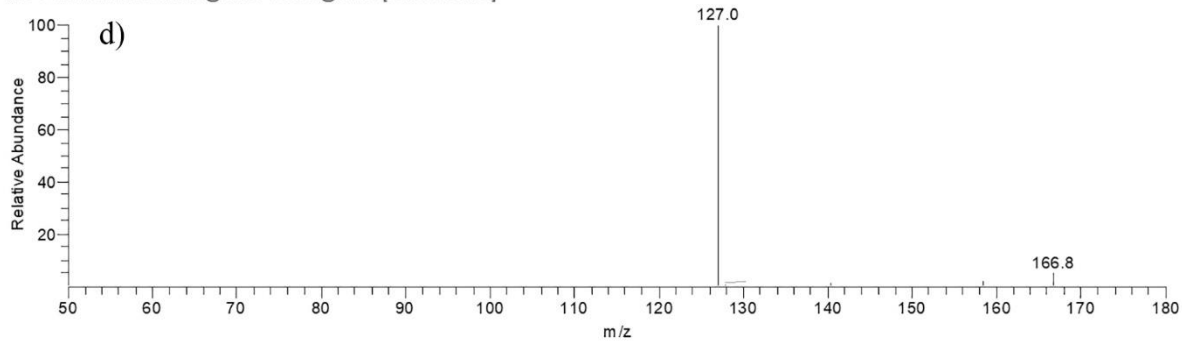
monokrotofos RT: 2.83 AV: 1 NL: 3.01E6
F: + c ESI Full ms2 223.90@22.00 [60.00-300.00]



monokrotofos RT: 4.21 AV: 1 NL: 1.73E6
F: + c ESI Full ms3 223.90@22.00 192.70@25.00 [50.00-200.00]

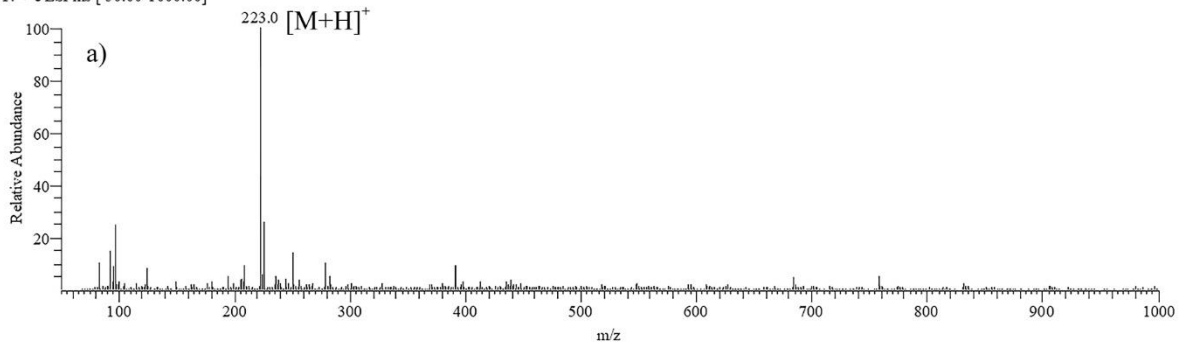


monokrotofos RT: 6.97 AV: 1 NL: 1.74E5
F: + c ESI Full ms3 223.90@22.00 166.80@24.00 [50.00-180.00]

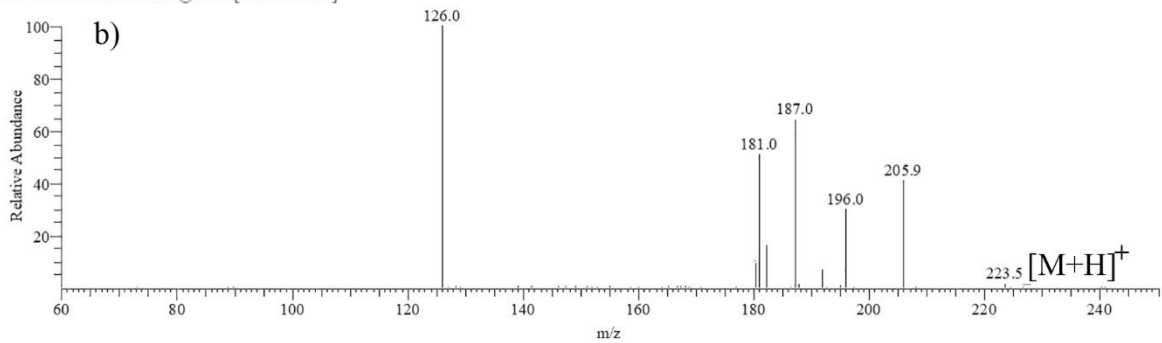


Slika 20. Maseni spektri monokrotofosa: a) ESI(+) MS ; b) ESI(+) MS^2 [M+H]⁺; c) ESI(+) MS^3 [M+H]⁺; d) ESI(+) MS^3 [M+H]⁺

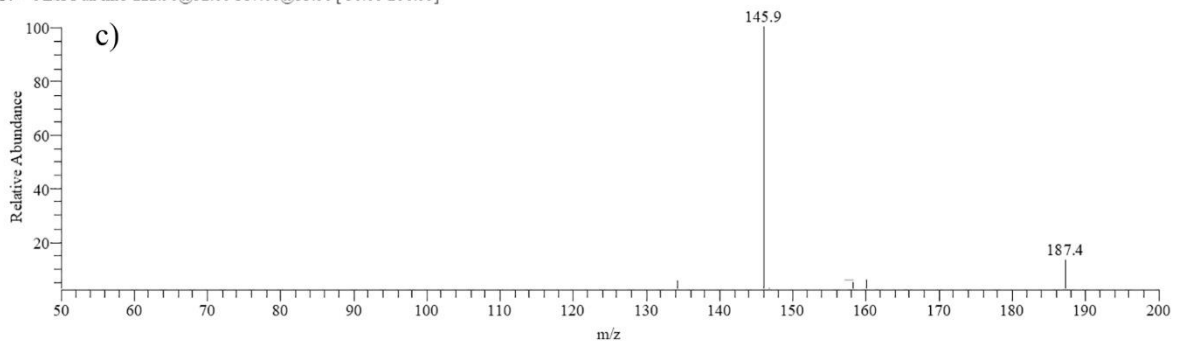
acetamidiprid RT: 0.14 AV: 1 NL: 1.04E7
T: + c ESI ms [50.00-1000.00]



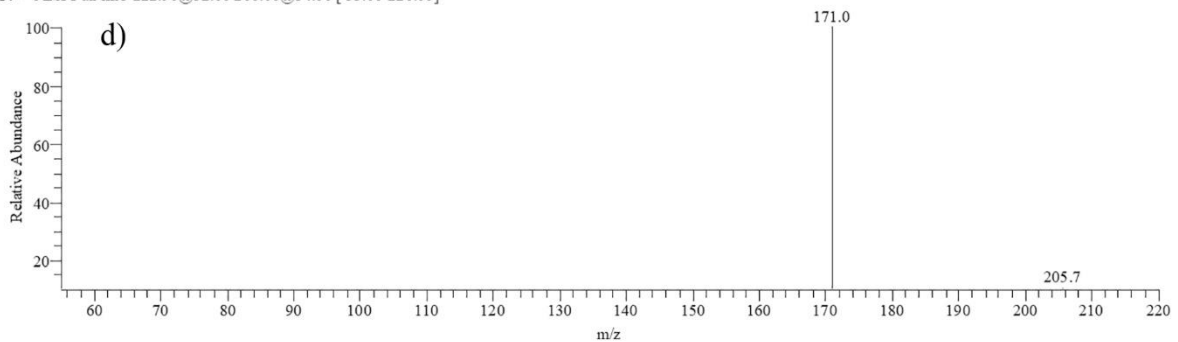
acetamidiprid RT: 0.79 AV: 1 NL: 2.14E6
F: + c ESI Full ms2 222.90@32.00 [60.00-250.00]



acetamidiprid RT: 2.56 AV: 1 NL: 2.39E5
F: + c ESI Full ms3 222.90@32.00 187.00@33.00 [50.00-200.00]

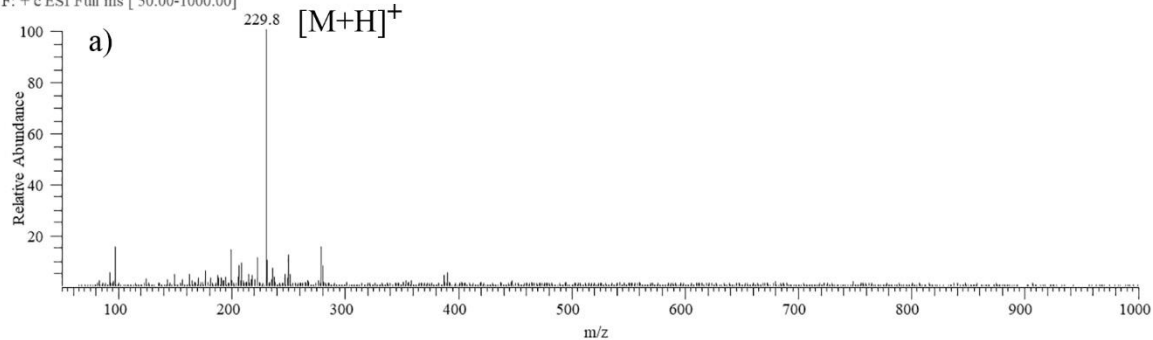


acetamidiprid RT: 4.20 AV: 1 NL: 8.63E4
F: + c ESI Full ms3 222.90@32.00 206.00@34.00 [55.00-220.00]

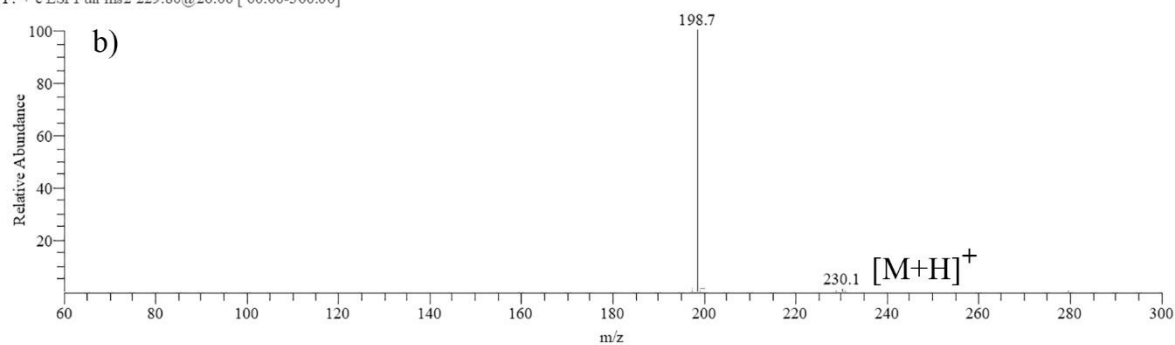


Slika 21. Maseni spektri acetamidiprida: a) ESI(+) MS^1 ; b) ESI(+) MS^2 [M+H]⁺; c) ESI(+) MS^3 [M+H]⁺; d) ESI(+) MS^3 [M+H]⁺

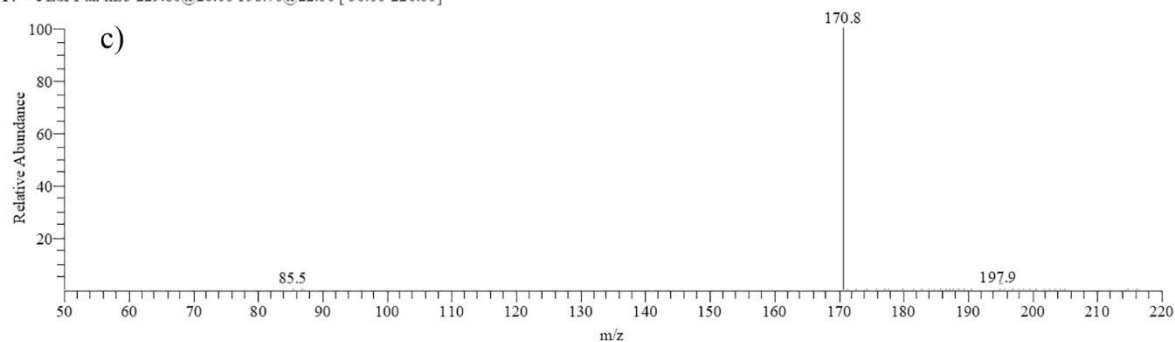
dimetoat RT: 0.81 AV: 1 NL: 1.07E7
F: + c ESI Full ms [50.00-1000.00]



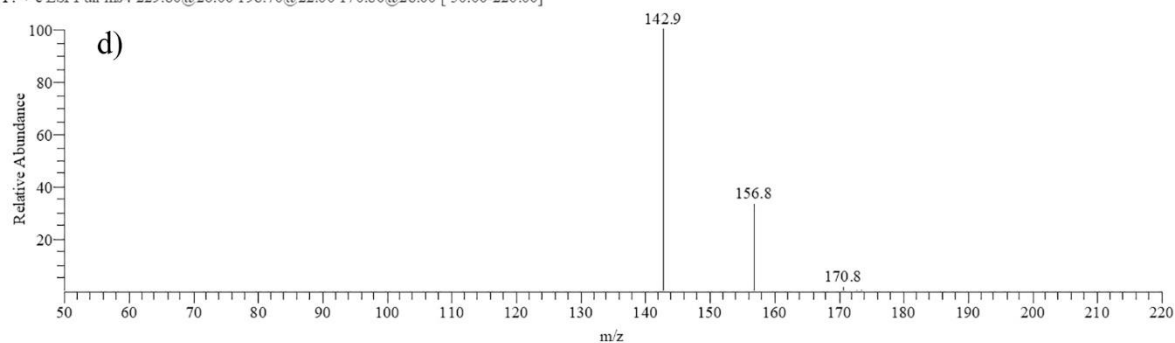
dimetoat RT: 3.01 AV: 1 NL: 1.37E7
F: + c ESI Full ms2 229.80@26.00 [60.00-300.00]



dimetoat RT: 5.08-5.87 AV: 50 NL: 6.98E6
F: + c ESI Full ms3 229.80@26.00 198.70@22.00 [50.00-220.00]

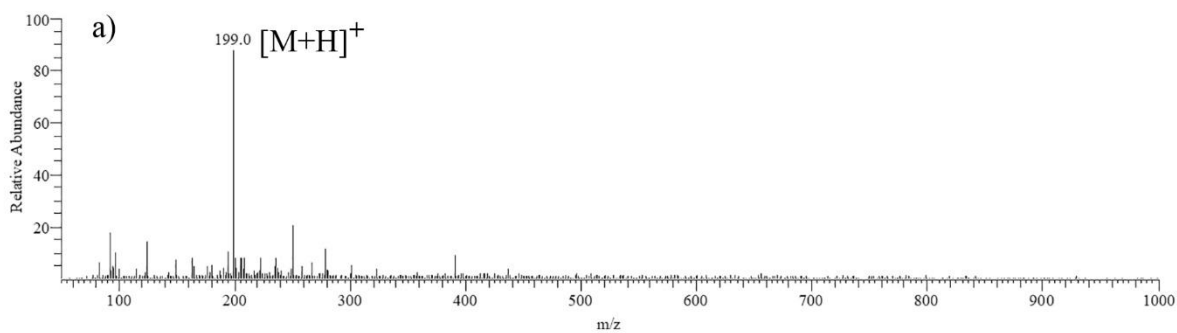


dimetoat RT: 6.78 AV: 1 NL: 3.09E6
F: + c ESI Full ms4 229.80@26.00 198.70@22.00 170.80@28.00 [50.00-220.00]

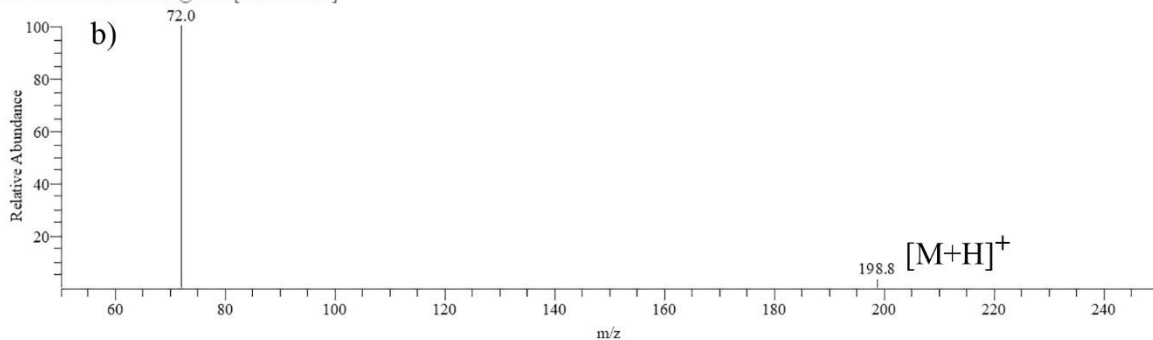


Slika 22. Maseni spektri dimetoata: a) ESI(+) MS ; b) ESI(+) MS^2 $[M+H]^+$; c) ESI(+) MS^3 $[M+H]^+$; d) ESI(+) MS^4 $[M+H]^+$

monuron RT: 0.10 AV: 1 NL: 5.62E6
F: + c ESI ms [50.00-1000.00]

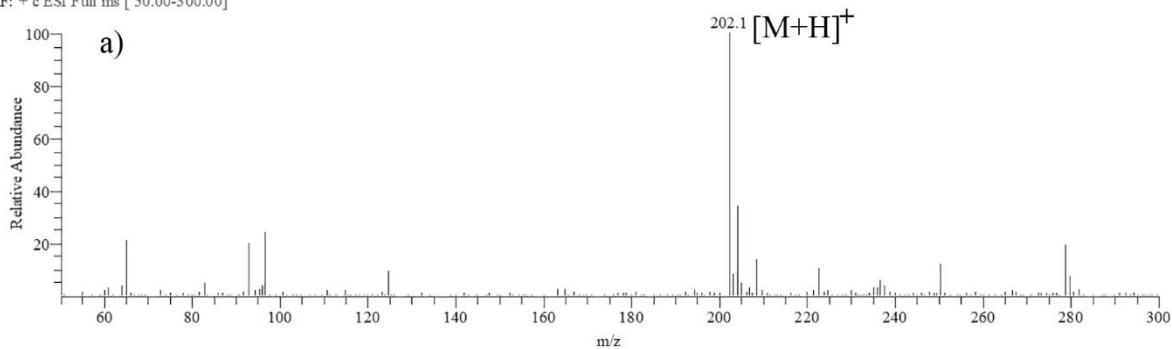


monuron RT: 2.50 AV: 1 NL: 2.36E6
F: + c ESI Full ms2 199.00@30.00 [50.00-250.00]

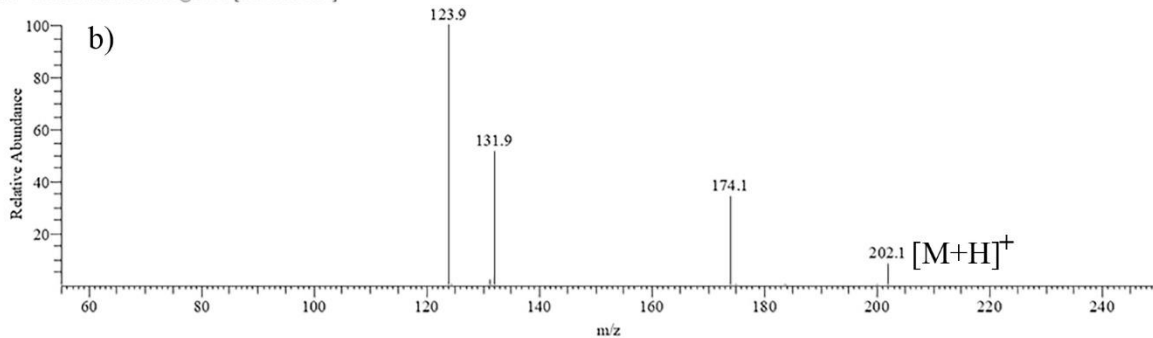


Slika 23. Maseni spektri monokrotofosa: a) ESI(+) MS ; b) ESI(+) MS^2 $[M+H]^+$

simazin RT: 15.57 AV: 1 NL: 1.60E7
F: + c ESI Full ms [50.00-300.00]

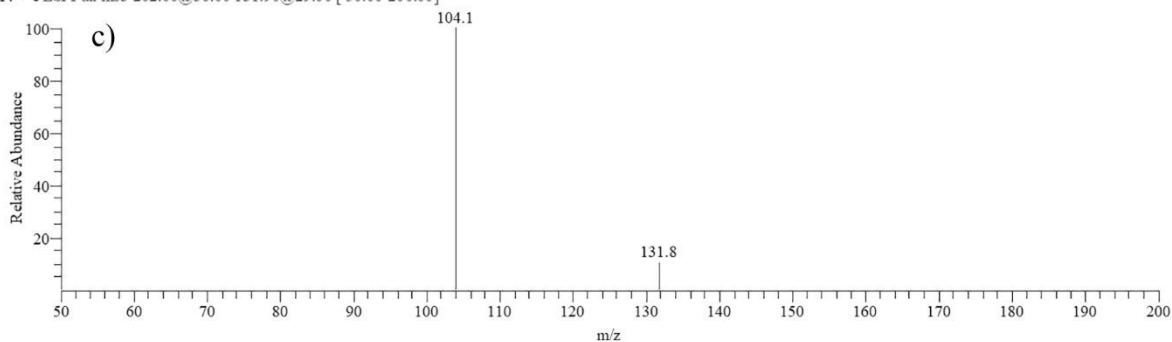


simazin RT: 1.61 AV: 1 NL: 2.43E6
F: + c ESI Full ms2 202.00@36.00 [55.00-250.00]

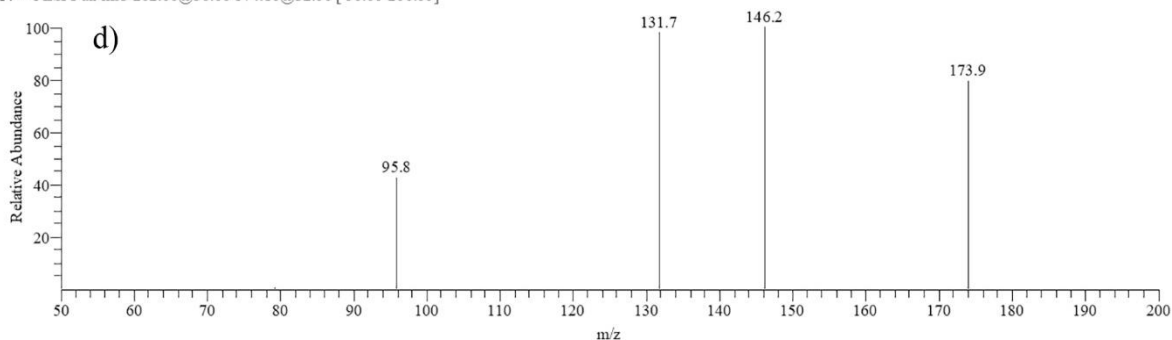


Slika 24. Maseni spektri simazina: a) ESI(+) MS ; b) ESI(+) MS^2 $[M+H]^+$

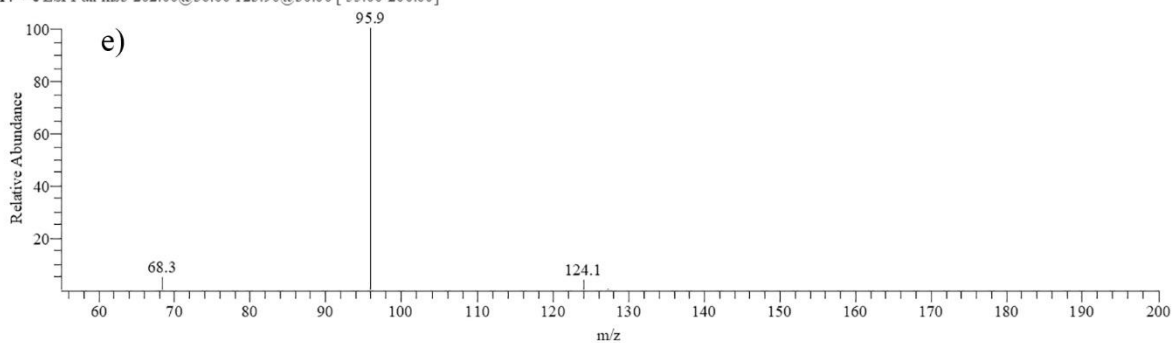
simazin RT: 7.93 AV: 1 NL: 2.30E5
F: + c ESI Full ms3 202.00@36.00 131.90@29.00 [50.00-200.00]



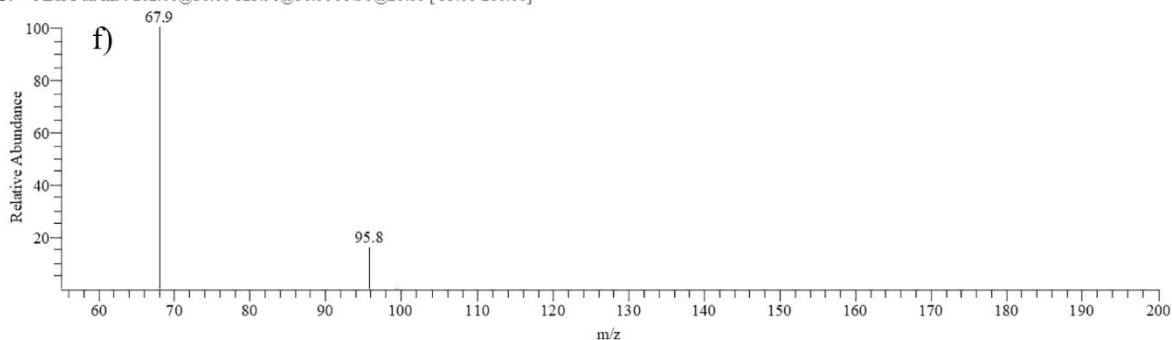
simazin RT: 15.46 AV: 1 NL: 1.81E4
F: + c ESI Full ms3 202.00@36.00 174.10@32.00 [50.00-200.00]



simazin RT: 2.62 AV: 1 NL: 6.52E5
F: + c ESI Full ms3 202.00@36.00 123.90@30.00 [55.00-200.00]

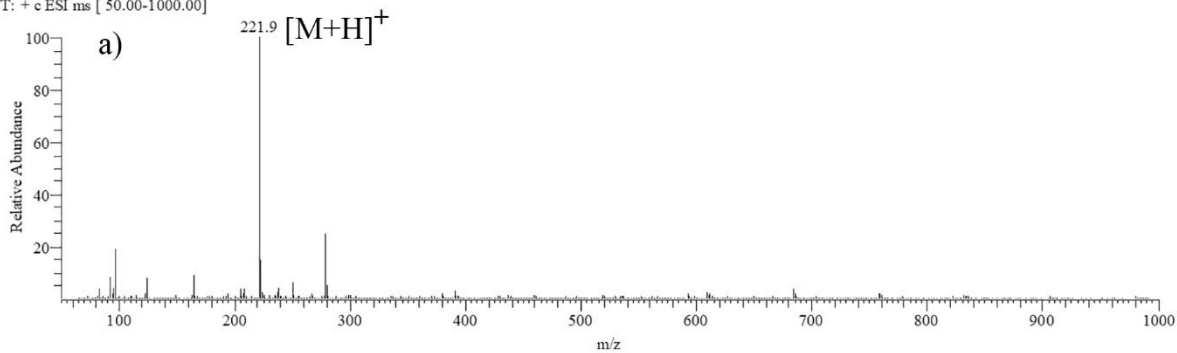


simazin RT: 6.17 AV: 1 NL: 1.15E5
F: + c ESI Full ms4 202.00@36.00 123.90@30.00 95.90@26.00 [55.00-200.00]

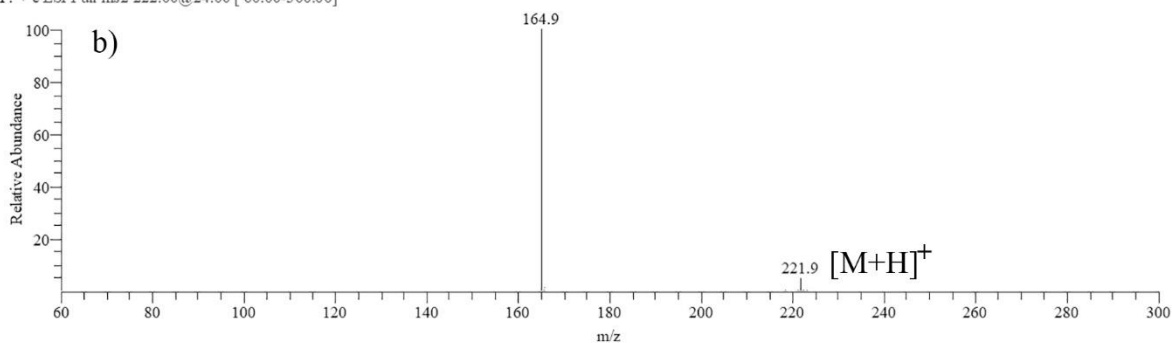


Slika 24. (nastavak) Maseni spektri simazina: c) ESI(+) MS^3 $[M+H]^+$; d) ESI(+) MS^3 $[M+H]^+$; e) ESI(+) MS^3 $[M+H]^+$; f) ESI(+) MS^4 $[M+H]^+$

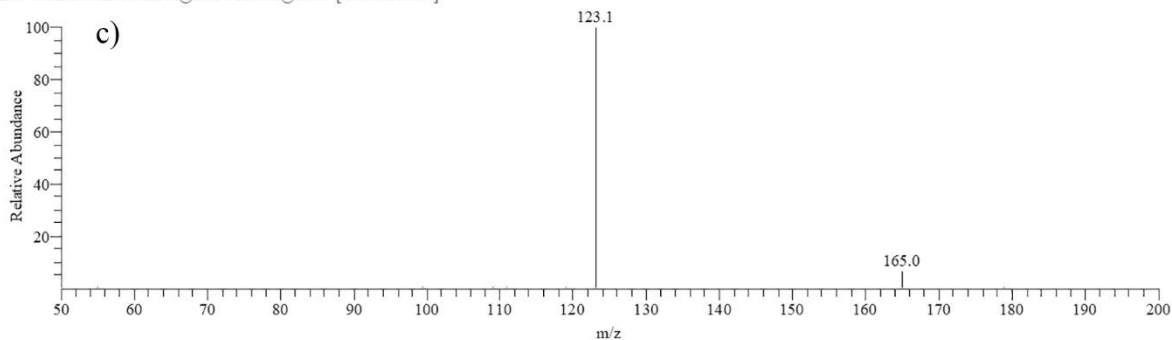
karbofuran RT: 0.23 AV: 1 NL: 2.93E7
T: + c ESI ms [50.00-1000.00]



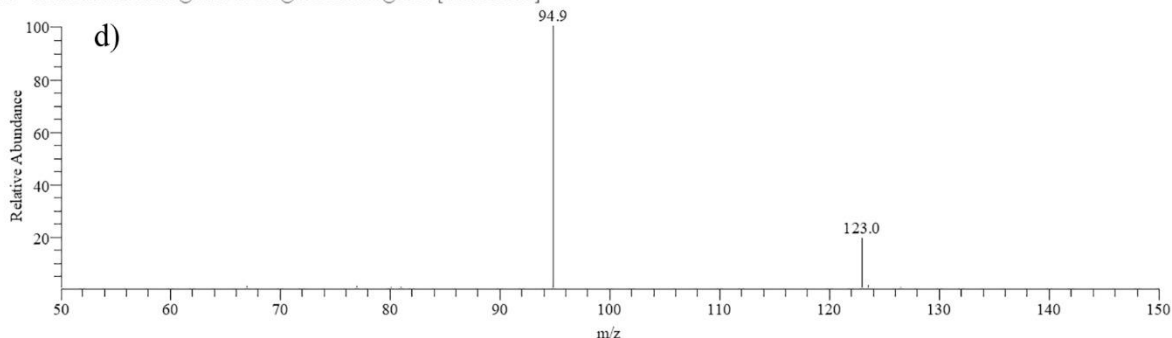
karbofuran RT: 0.91-1.20 AV: 26 NL: 3.58E7
F: + c ESI Full ms2 222.00@24.00 [60.00-300.00]



karbofuran RT: 2.00 AV: 1 NL: 1.47E7
F: + c ESI Full ms3 222.00@24.00 164.90@27.00 [50.00-200.00]

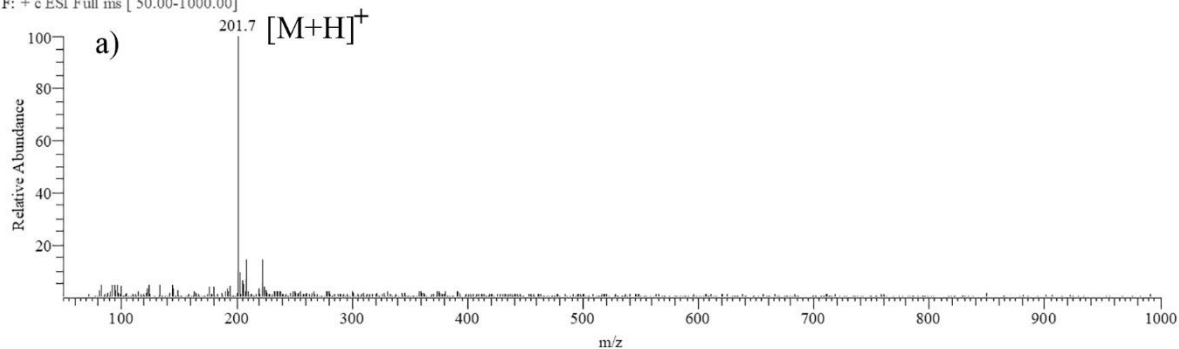


karbofuran RT: 2.77-3.02 AV: 16 NL: 1.30E5
F: + c ESI Full ms4 222.00@24.00 164.90@27.00 123.10@30.00 [50.00-150.00]

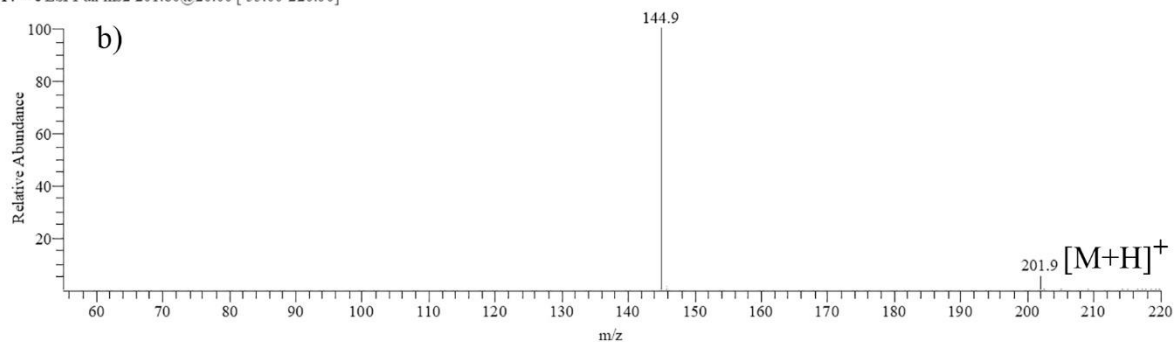


Slika 25. Maseni spektri karbofurana: a) ESI(+) MS ; b) ESI(+) MS^2 $[M+H]^+$; c) ESI(+) MS^3 $[M+H]^+$; d) ESI(+) MS^4 $[M+H]^+$

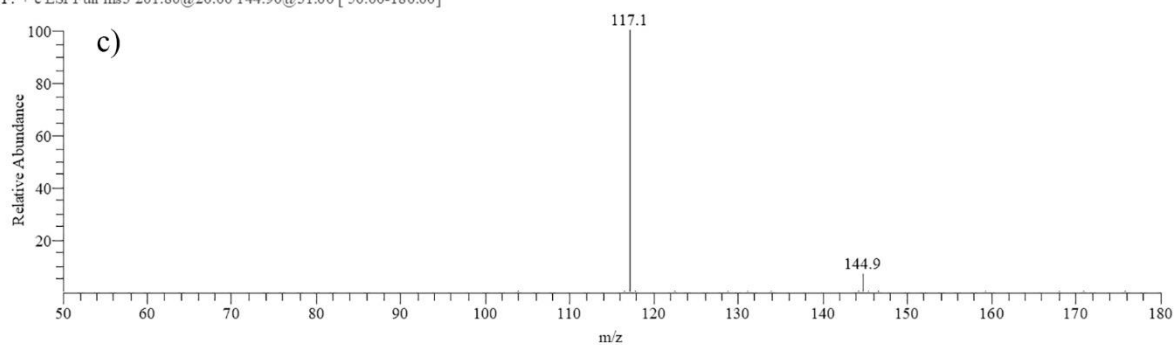
karbaril RT: 0.04 AV: 1 NL: 1.02E7
F: + c ESI Full ms [50.00-1000.00]



karbaril RT: 0.95-1.38 AV: 30 NL: 2.55E6
F: + c ESI Full ms2 201.80@20.00 [55.00-220.00]

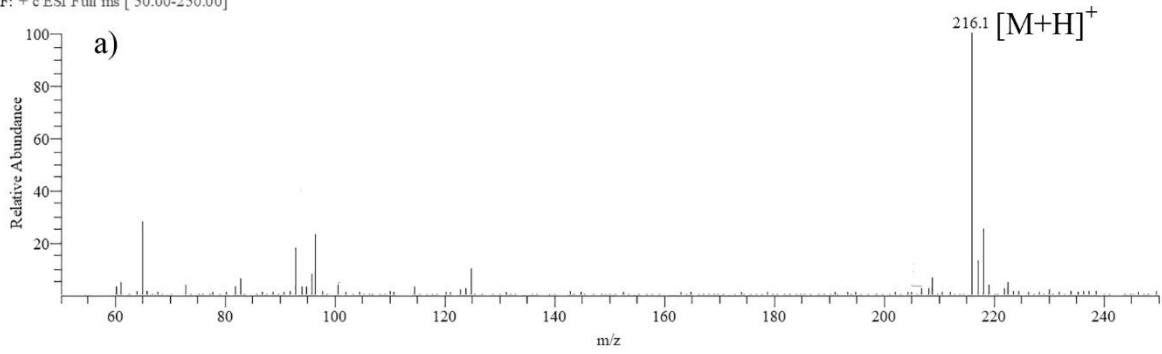


karbaril RT: 2.39-2.72 AV: 20 NL: 1.40E5
F: + c ESI Full ms3 201.80@20.00 144.90@31.00 [50.00-180.00]

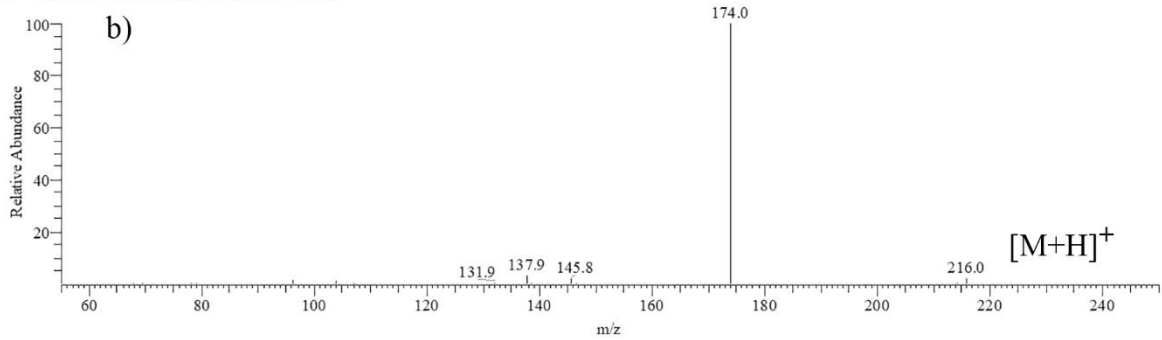


Slika 26. Maseni spektri karbarila: a) ESI(+) MS^1 ; b) ESI(+) MS^2 [M+H]⁺; c) ESI(+) MS^3 [M+H]⁺

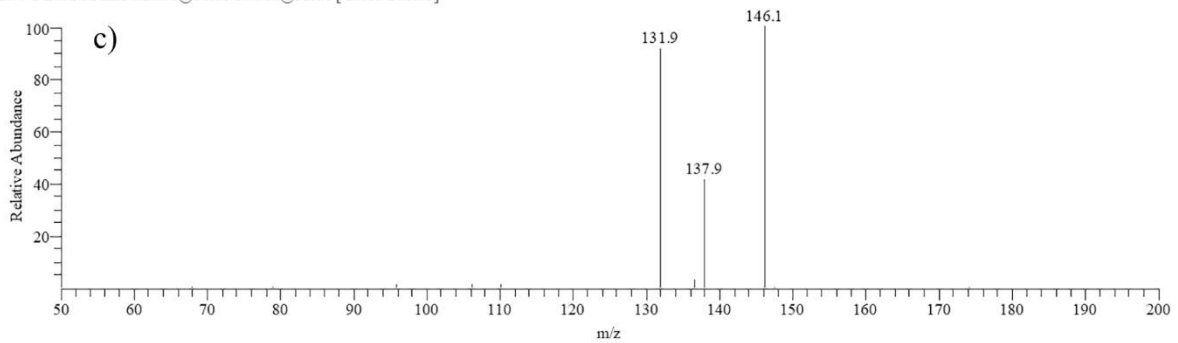
atrazin RT: 0.61 AV: 1 NL: 2.53E7
F: + c ESI Full ms [50.00-250.00]



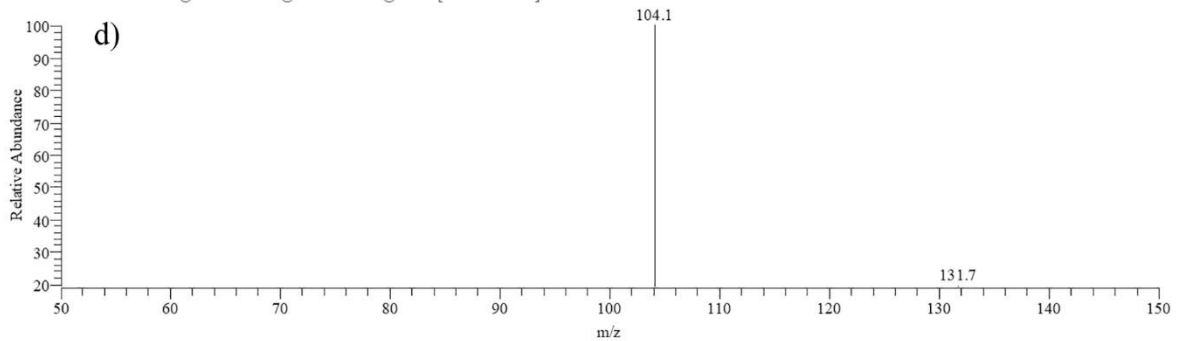
atrazin RT: 0.68 AV: 1 NL: 9.77E6
F: + c ESI Full ms2 216.00@36.00 [55.00-250.00]



atrazin RT: 1.50 AV: 1 NL: 2.02E5
F: + c ESI Full ms3 216.00@36.00 174.00@35.00 [50.00-200.00]

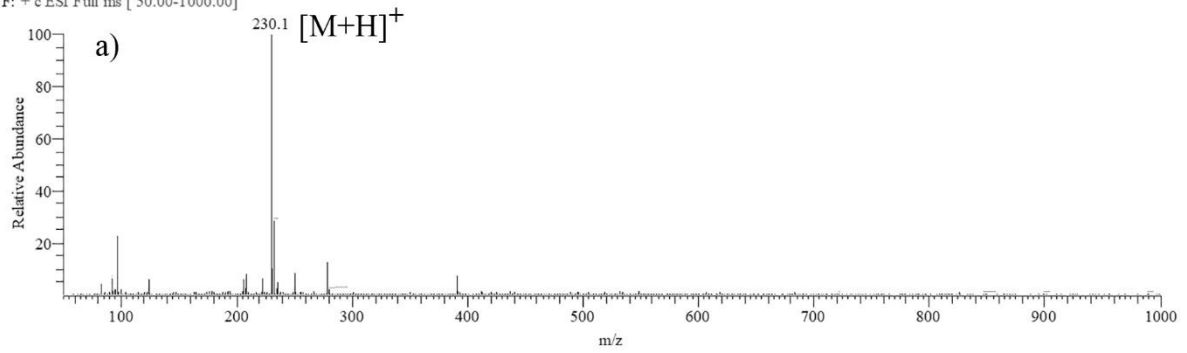


atrazin RT: 4.95 AV: 1 NL: 2.98E4
F: + c ESI Full ms4 216.00@36.00 174.00@35.00 132.00@27.00 [50.00-150.00]

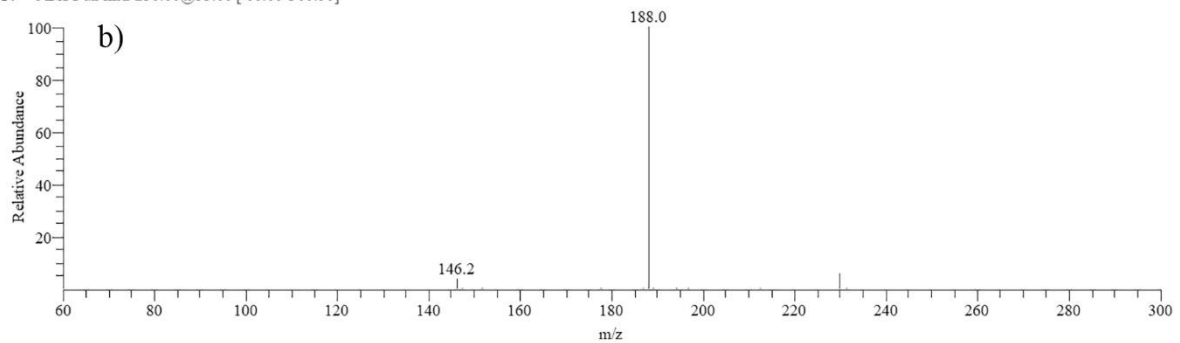


Slika 27. Maseni spektri dimetoata: a) ESI(+) MS ; b) ESI(+) MS^2 $[M+H]^+$; c) ESI(+) MS^3 $[M+H]^+$; d) ESI(+) MS^4 $[M+H]^+$

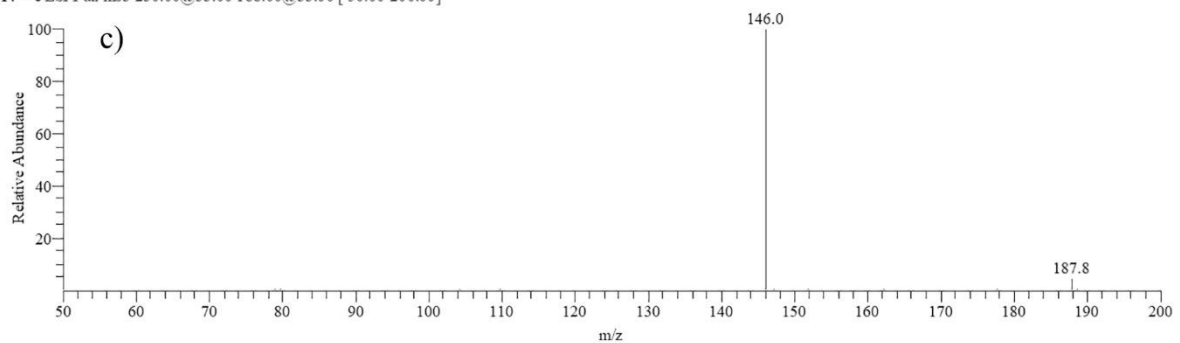
propazin RT: 4.22 AV: 1 NL: 2.43E7
F: + c ESI Full ms [50.00-1000.00]



propazin RT: 1.28 AV: 1 NL: 2.00E7
F: + c ESI Full ms2 230.00@33.00 [60.00-300.00]

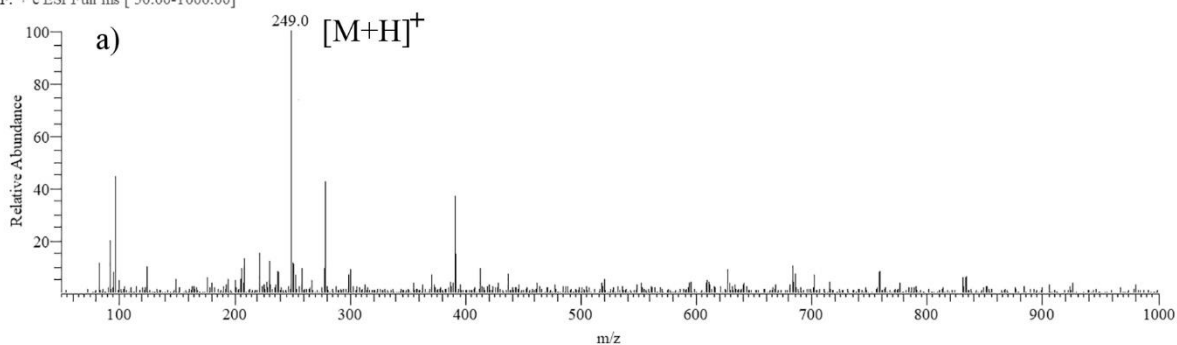


propazin RT: 2.62 AV: 1 NL: 6.04E6
F: + c ESI Full ms3 230.00@33.00 188.00@33.00 [50.00-200.00]

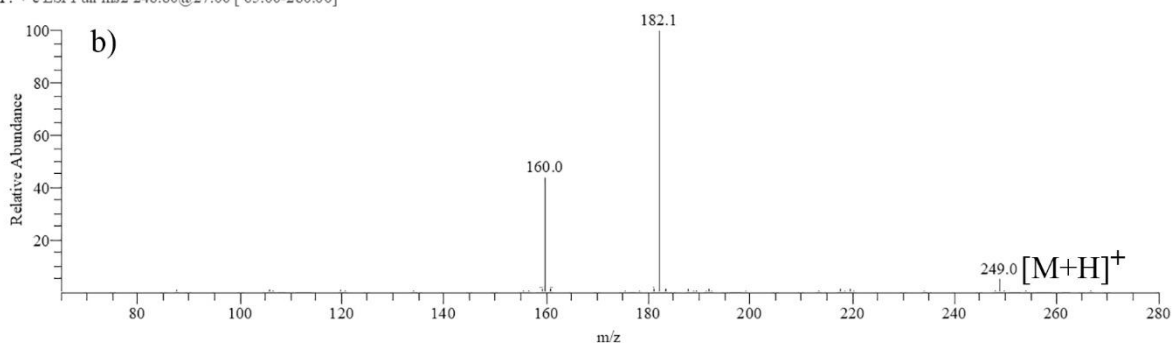


Slika 28. Maseni spektri propazina: a) ESI(+) MS ; b) ESI(+) MS^2 $[M+H]^+$; c) ESI(+) MS^3 $[M+H]^+$

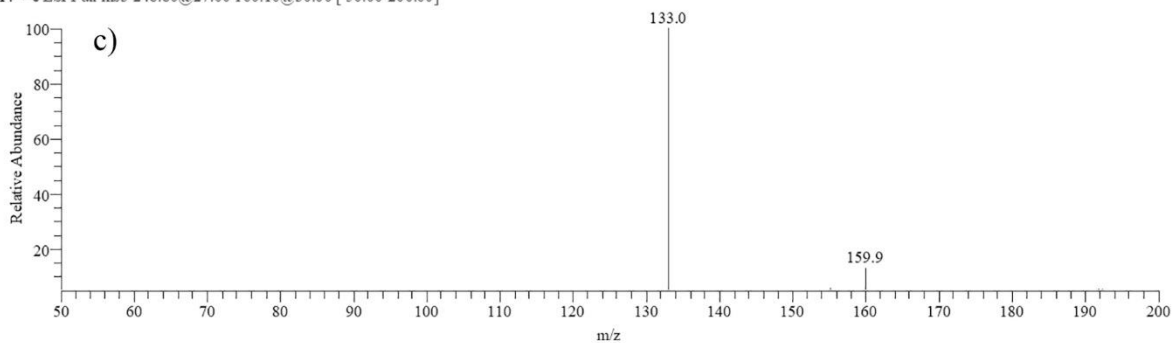
linuron RT: 0.23 AV: 1 NL: 8.27E6
F: + c ESI Full ms [50.00-1000.00]



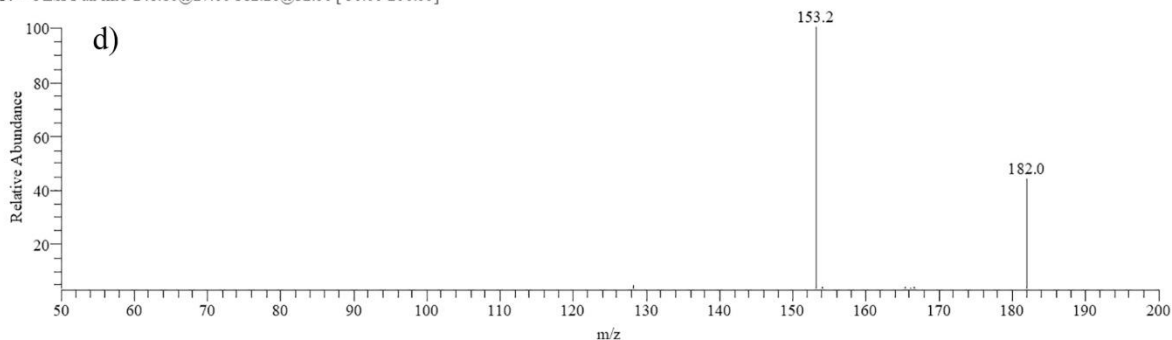
linuron RT: 2.06 AV: 1 NL: 3.71E6
F: + c ESI Full ms2 248.80@27.00 [65.00-280.00]



linuron RT: 4.34 AV: 1 NL: 9.30E4
F: + c ESI Full ms3 248.80@27.00 160.10@30.00 [50.00-200.00]

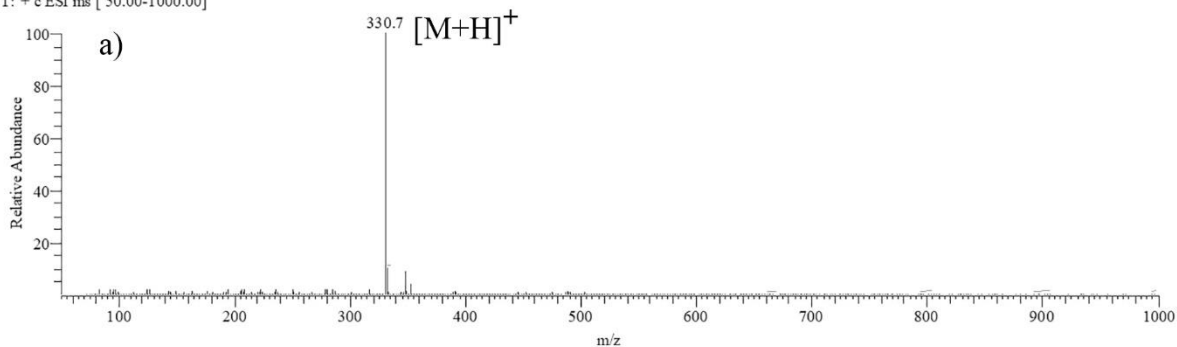


linuron RT: 3.13 AV: 1 NL: 8.23E4
F: + c ESI Full ms3 248.80@27.00 182.20@32.00 [50.00-200.00]

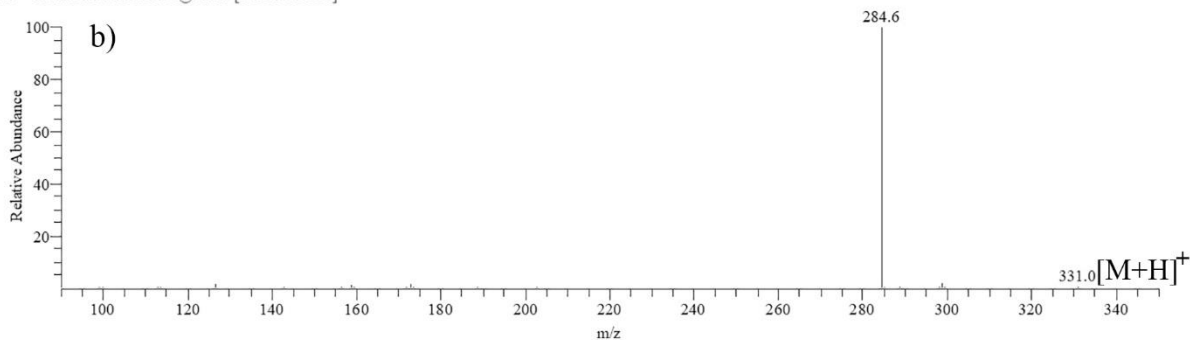


Slika 29. Maseni spektri linurona: a) ESI(+) MS ; b) ESI(+) MS^2 [M+H]⁺; c) ESI(+) MS^3 [M+H]⁺; d) ESI(+) MS^3 [M+H]⁺

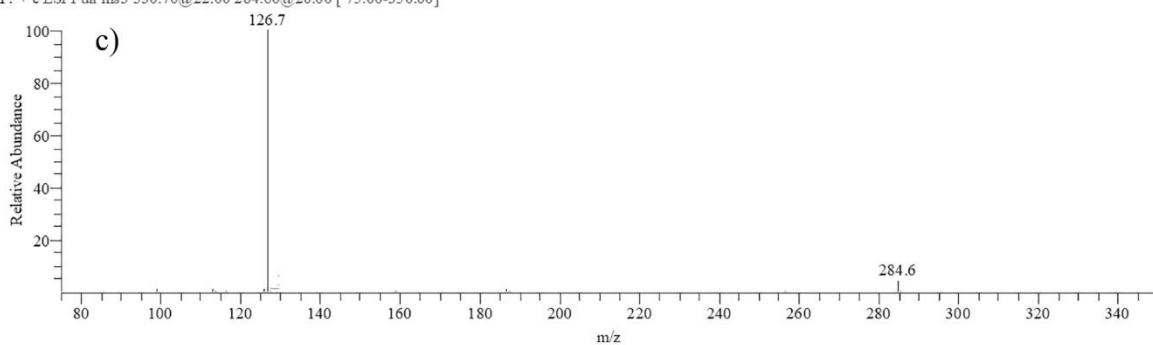
malation RT: 0.84 AV: 1 NL: 2.84E7
T: + c ESI ms [50.00-1000.00]



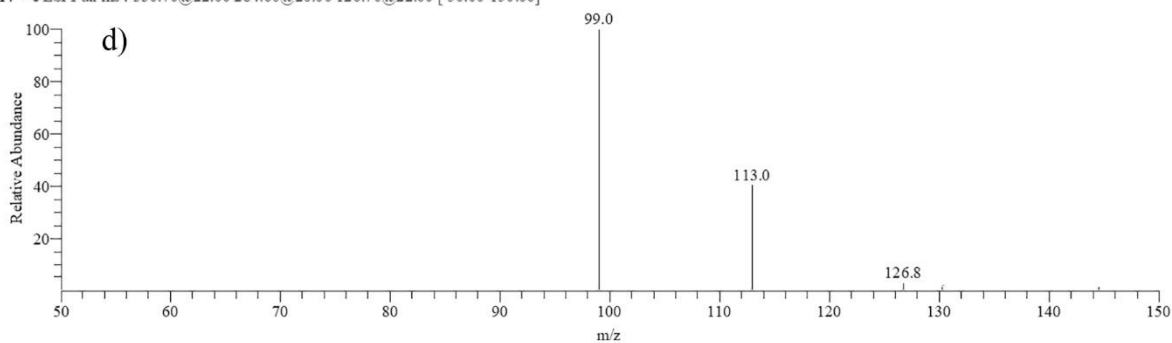
malation RT: 3.96 AV: 1 NL: 1.47E7
F: + c ESI Full ms2 330.70@22.00 [90.00-350.00]



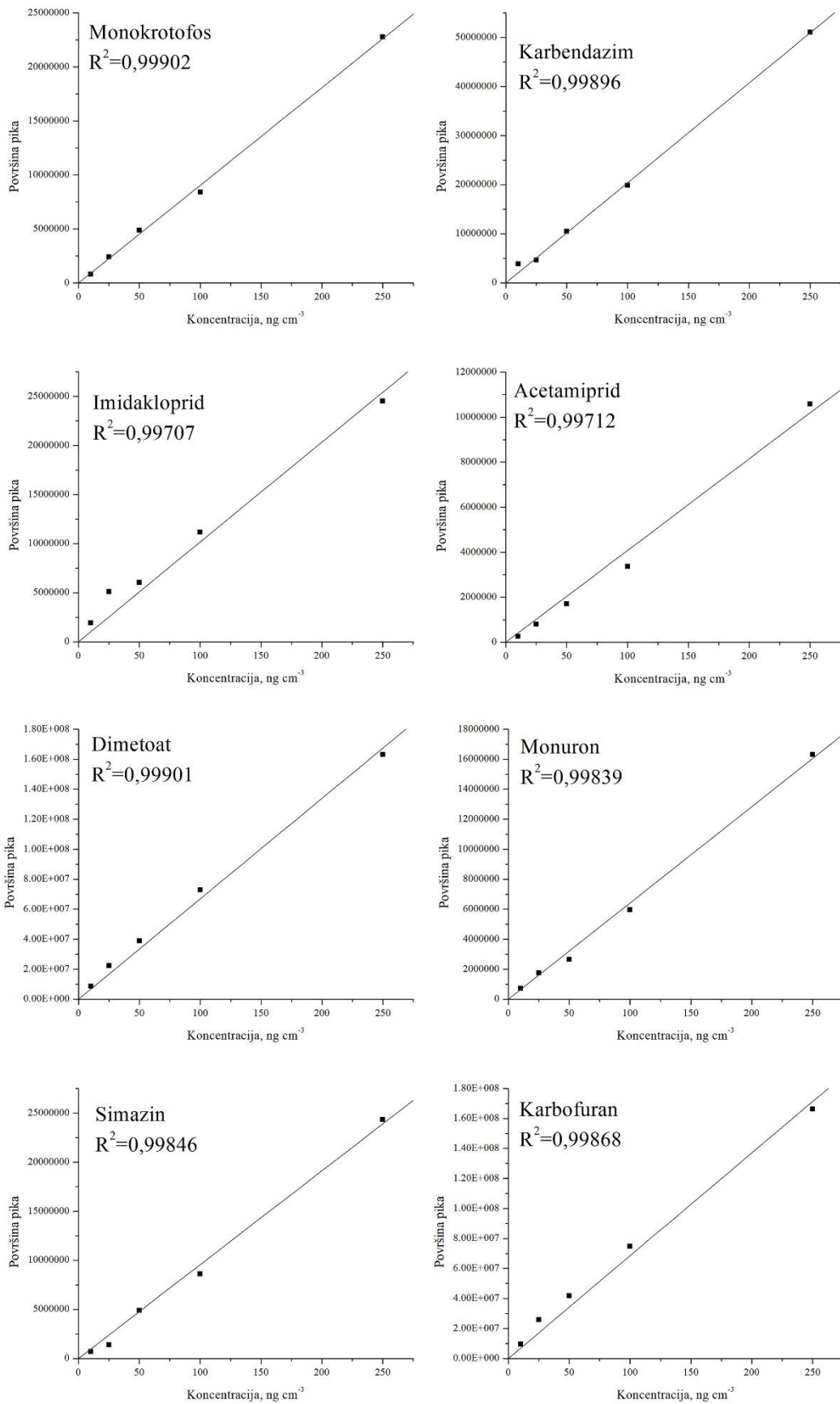
malation RT: 6.54 AV: 1 NL: 7.09E6
F: + c ESI Full ms3 330.70@22.00 284.60@20.00 [75.00-350.00]



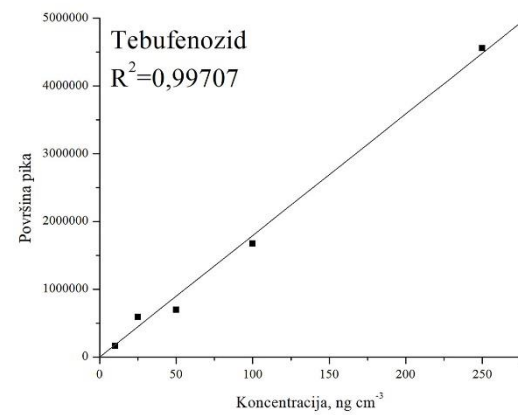
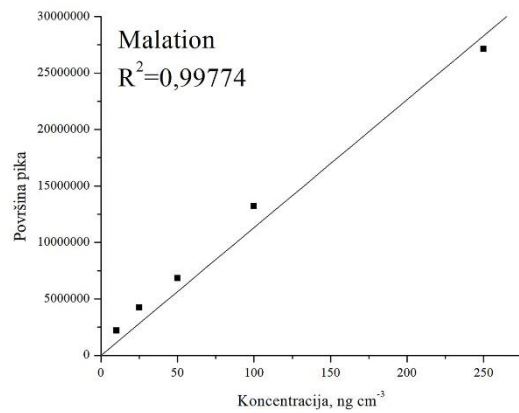
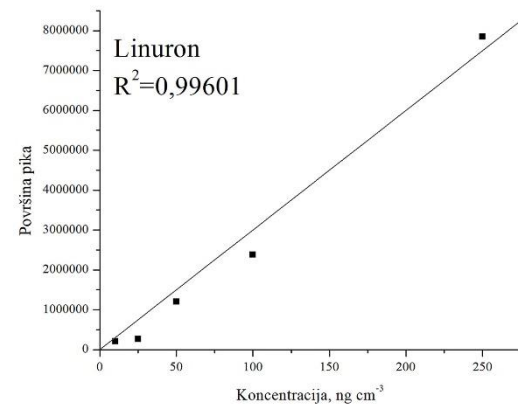
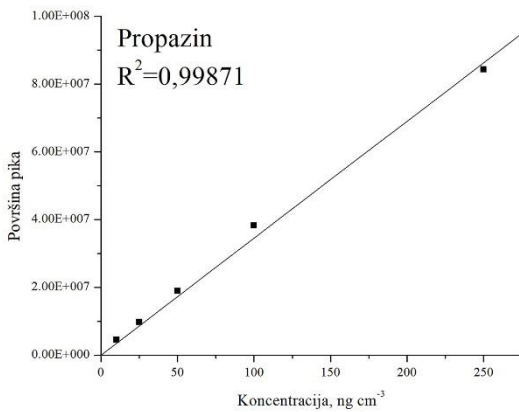
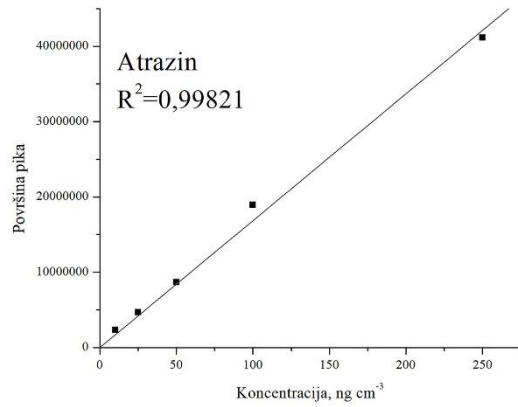
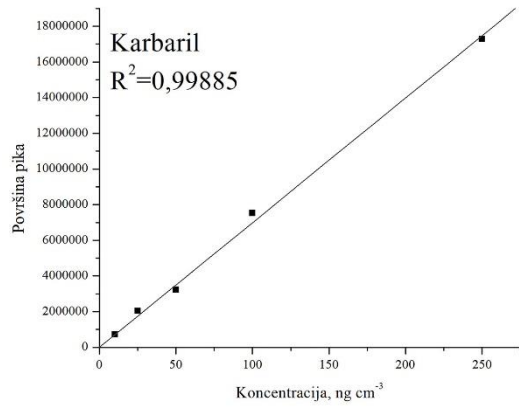
malation RT: 8.88 AV: 1 NL: 1.51E6
F: + c ESI Full ms4 330.70@22.00 284.60@20.00 126.70@22.00 [50.00-150.00]



Slika 30. Maseni spektri linurona: a) ESI(+) MS ; b) ESI(+) MS^2 $[M+H]^+$; c) ESI(+) MS^3 $[M+H]^+$; d) ESI(+) MS^4 $[M+H]^+$



Slika 31. Kalibracione krive za ispitivane pesticide u podzemnoj vodi



Slika 31. (nastavak)

BIOGRAFIJA AUTORA

Nikolina Antić rođena je 30. avgusta 1982. godine u Kninu. Tehnološko-metalurški fakultet Univerziteta u Beogradu, studijski program Inženjerstvo zaštite životne sredine, upisala je školske 2003/2004. godine. Diplomirala je 2008. godine. sa temom: „Optimizacija i primena metode za predkoncentrisanje pesticida u vodi”.

Školske 2008/2009. godine upisala je doktorske akademske studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu u Beogradu, smer Inženjerstvo zaštite životne sredine, pod rukovodstvom dr Tatjane Vasiljević, vanrednog profesora Tehnološko-metalurškog fakulteta. Na doktorskim studijama je položila sve ispite predviđene planom i programom sa prosečnom ocenom 9,42 i odbranila završni ispit.

Nikolina Antić je od 1. novembra 2008. do 1. marta 2010. godine bila zaposlena na Tehnološko-metalurškom fakultetu, a od 1. marta 2010 do 16. septembra 2013 godine. bila je zaposlena u Inovacionom centru Tehnološko-metalurškog fakulteta. U zvanje Istraživač saradnik izabrana je 4. novembra 2009. godine. Od 2008. godine Nikolina Antić bila je uključena u naučno-istraživačke projekte finansirane od strane Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije, odnosno Ministarstva za prosvetu i nauku Republike Srbije („Razvoj metoda za separaciju, predkoncentrisanje, određivanje i uklanjanje zagađivača okoline“, 2006-2010. i „Razvoj i primena metoda i materijala za monitoring novih zagađujućih i toksičnih organskih materija i teških metala“, od 2011. do 2013. godine). Od 16. septembra 2013. godine radi u Ministarstva finansija Republike Srbije, Uprava carina, kao carinski savetnik u Carinskoj laboratoriji.

Iz disertacije su proistekla dva rada objavljena u vrhunskim međunarodnim časopisima (**M21**), jedan rad u istaknutom međunarodnom časopisu (**M22**), jedno poglavlje u istaknutoj monografiji međunarodnog značaja (**M13**), jedno saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u celini (**M33**), četiri saopštenja sa međunarodnog skupa štampana u izvodu (**M34**), dva saopštenja sa skupa nacionalnog značaja štampana u celini (**M63**) i jedno saopštenje sa skupa nacionalnog značaja štampano u izvodu (**M64**).

OBJAVLJENI NAUČNI RADOVI IZ DOKTORSKE DISERTACIJE

Poglavlje u istaknutoj monografiji međunarodnog značaja – M13:

1. T. Vasiljević, S. Grujić, M. Radišić, **N. Dujaković**, M. Laušević: Pesticide residues in surface water and groundwater, In *Pesticides: Evaluation of Environmental Pollution*, ed. H.S. Rathore, L.M.L. Nollet, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, USA, 2012, pp. 259-298; (ISBN 978-1-4398-3624-8).

Rad u vrhunskom međunarodnom časopisu – M21:

1. **N. Dujaković**, S. Grujić, M. Radišić, T. Vasiljević, M. Laušević: Determination of pesticides in surface and ground waters by liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, Vol. 678 (2010) pp. 63–72, (**IF 2011=4,555**) (ISSN 0003-2670).
2. **N. Antić**, M. Radišić, T. Radović, T. Vasiljević, S. Grujić, A. Petković, M. Dimkić, M. Laušević: Pesticide residues in the Danube River basin in Serbia – a survey during 2009–2011, *Clean – Soil Air Water*, Vol. 43 (2015) pp. 197–204, (**IF 2014=1,945**) (ISSN 1863-0650).

Rad u istaknutom međunarodnom časopisu – M22:

1. T. Vasiljević, **N. Dujaković**, M. Radišić, S. Grujić, M. Laušević, M. Dimkić: Methods for monitoring of pesticide residues in water: current status and recent trends, *Water Science and Technology*, Vol. 66 (2012) pp. 965–975; (**IF 2011=1,122**) (ISSN 0273-1223).

Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u celini – M33:

1. **N. Antić**, M. Radišić, S. Grujić, T. Vasiljević, M. Laušević: Određivanje tragova lekova i pesticida u komunalnoj otpadnoj vodi Beograda, *43. Međunarodna konferencija Otpadne vode, komunalni čvrsti otpad i opasan otpad*, 10-12. april 2013, Subotica, Srbija, Knjiga radova, 81–85.

Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u izvodu – M34:

1. **N. Dujaković**, T. Radović, M. Radišić, S. Grujić, T. Vasiljević, M. Dimkić, M. Laušević: Pesticide and pharmaceutical residues in the Danube River Basin in Serbia, *Euroanalysis 2011: Challenges in Modern Analytical Chemistry*, September 11-15, 2011, Belgrade, Serbia, Abstracts, 361.
2. **N. Dujaković**, M. Radišić, S. Grujić, T. Vasiljević, M. Laušević: Determination of pesticide and pharmaceutical residues in urban wastewater samples, *Euroanalysis 2011: Challenges in Modern Analytical Chemistry*, September 11-15, 2011, Belgrade, Serbia, Abstracts, 360.
3. **N. Dujaković**, M. Radišić, T. Radović, S. Grujić, T. Vasiljević, A. Petković, M. Dimkić, M. Laušević: Pesticide residues in the Danube River Basin in Serbia, *IWA Specialist Groundwater Conference*, September 8-10, 2011, Belgrade, Serbia, Proceedings, 311.
4. **N. Antić**, M. Radišić, S. Grujić, T. Vasiljević, M. Laušević: Emerging pollutants in Belgrade wastewater, *UNESCO Conference on Emerging Pollutants in Water*, July 9-11, 2013, Belgrade, Serbia, Book of abstracts, 99.

Saopštenje sa skupa nacionalnog značaja štampano u celini – M63:

1. **N. Dujaković**, M. Radišić, T. Vasiljević, M. Laušević: Optimizacija metode na čvrstoj fazi za izolovanje i predkoncentrisanje ostataka pesticida u vodi, *47. savetovanje Srpskog hemijskog društva*, 21. mart 2009, Beograd, Zbornik radova, 19–22.
2. **N. Antić**, M. Radišić, S. Grujić, T. Vasiljević, M. Laušević: Analiza tragova lekova i pesticida u komunalnoj otpadnoj vodi Beograda, *50. savetovanje Srpskog hemijskog društva*, 14. i 15. jun 2012, Beograd, Knjiga radova, 137–140.

Saopštenje sa skupa nacionalnog značaja štampano u izvodu – M64:

1. **N. Antić**, M. Radišić, S. Grujić, T. Vasiljević, M. Laušević: Određivanje lekova i pesticida u komunalnoj otpadnoj vodi, *6. simpozijum Hemija i zaštita životne sredine (EnviroChem 2013)*, 21-24. maj 2013, Vršac, Knjiga izvoda, 64–65.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a: Nikolina Antić

Broj indeksa: 4019/2008

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

Razvoj i primena HPLC-MS/MS metode za određivanje tragova pesticida u uzorcima vode

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio/la intelektualnu svojinu drugih lica.

U Beogradu

Potpis doktoranda

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Nikolina Antić

Broj indeksa: 4019/2008

Studijski program: Inženjerstvo zaštite životne sredine

Naslov rada: **Razvoj i primena HPLC-MS/MS metode za određivanje tragova pesticida u uzorcima vode**

Mentor: Dr Tatjana Đurkić, redovni profesor

Potpisani/a: Nikolina Antić

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i publikacijama Univerziteta u Beogradu.

U Beogradu

Potpis doktoranda

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković “ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Razvoj i primena HPLC-MS/MS metode za određivanje tragova pesticida u uzorcima vode

koja je moje autorsko delo. Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo – nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poleđini lista).

U Beogradu

Potpis doktoranda

1. **Autorstvo** – Dozvoljavate umnožavanje, distribucija i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.

2. **Autorstvo – nekomercijalno.** Dozvoljavate umnožanje, distribuciju i javno saopštavanja dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

3. **Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade.** Dozvoljavate umnožavanje distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanje ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim korišćenja dela.

4. **Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.

5. **Autorstvo – bez prerade.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

6. **Autorstvo – deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence a ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.