



UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
DEPARTMAN ZA HEMIJU, BIOHEMIJU
I ZAŠTITU ŽIVOTNE SREDINE



Pavle Jovanov

**OPTIMIZACIJA METODA EKSTRAKCIJE I ODREĐIVANJA
NEONIKOTINOIDA TEČNOM HROMATOGRAFIJOM
U ODABRANIM UZORCIMA**

-doktorska disertacija-

Novi Sad, 2014

ZAHVALNICA

Ovom prilikom želim da se zahvalim svima koji su svojim zalaganjem, posredno ili neposredno, doprineli kvalitetu ove doktorske disertacije.

Želeo bih da se zahvalim svom mentoru, prof. dr Valeriji Gužvanj, na ukazanom poverenju, znanju koje mi je prenela, korisnim savetima, primedbama tokom izrade i pisanja ove disertacije koje mi je nesebično pružala.

Veliku zahvalnost dugujem i dr Marijani Sakač na stručnim i prijateljskim savetima, kao i na svesrdnoj podršci tokom svih godina naše saradnje.

Prof. dr Mladenu Franku, prof. dr Sanji Lazić, prof. dr Biljani Abramović i doc. dr Dejanu Orčiću upućujem reči hvale na znanju, iskustvu, interesovanju i zalaganju koju su mi pružili pri izradi ove disertacije.

Želeo bih da se zahvalim projektima OI172012 i TR31029, koji su doprineli da se ovo istraživanje realizuje.

Pomoć u realizaciji dela eksperimentalnog rada pružili su mi prof. dr Goran Bošković i Sanja Ratković, kojima se zahvaljujem na ustupljenim nanomaterijalima, kao i Vladimiru Višackom, koji mi je pomogao u prikupljanju uzoraka meda.

Mojim prijateljima i kolegama, Bojani, Nataši, Ljubiši, Ivanu, Voji, Jovani, Jaci, Tamari i Miroslavu, veliko hvala na podršci i bezrezervnoj pomoći koju su mi poklanjali tokom svih godina rada u FINS-u.

Želeo bih, takođe, da se zahvalim i svojim drugovima, Gradimiru i Darku na grafičkoj podršci.

Svojoj porodici dugujem neizmernu zahvalnost na ljubavi, podršci i razumevanju.

Paule



SADRŽAJ

1.	UVOD	1
2.	TEORIJSKI DEO	5
2.1	Pesticidi i njihova klasifikacija	7
2.2	Neonikotinoidi	9
2.2.1	Imidakloprid	13
2.2.2	Tiakloprid	16
2.2.3	Nitenpiram	18
2.2.4	Tiametoksam	19
2.2.5	Klotianidin	21
2.2.6	Acetamiprid	23
2.2.7	Dinotefuran	26
2.3	Uloga i značaj pčela	27
2.4	Ispitivani uzorci	29
2.5	Metode pripreme uzoraka	32
2.5.1	Tečno-tečna ekstrakcija	33
2.5.1.1	Disperzna tečno-tečna mikroekstrakcija	33
2.5.2	Ekstrakcija na čvrstoj fazi	34
2.5.2.1	QuEChERS ekstrakcija	35
2.5.3	Ostale odabrane tehnike ekstrakcije neonikotinoida	36
2.5.4	Nanomaterijali kao mogući adsorbensi	37
2.6	Određivanje neonikotinoida	38
2.6.1	Spektrofotometrijske metode	38
2.6.2	Nuklearna magnetna rezonanca i infracrvena spektrometrija	38
2.6.3	Fluorimetrijske metode	39
2.6.4	Voltametrijske metode	39
2.6.5	Imunohemijske metode	40
2.6.6	Hromatografske metode	41
2.6.6.1	Gasna hromatografija	41

2.6.6.2	Tečna hromatografija	42
2.7	Tečna hromatografija visoke efikasnosti (HPLC).	46
2.7.1	Hromatografske karakteristike.	53
2.8	Masena spektrometrija	55
2.8.1	Metode jonizacije	56
2.8.2	Razdvajanje jona	59
2.8.3	Maseni analizatori	60
2.8.4	Maseni detektori	63
2.8.5	Maseni spektri	63
2.9	Primena hemometrije u razvoju analitičkih metoda.	64
2.9.1	Eksperimentalni dizajn	65
2.9.2	Funkcija poželjnog odziva	68
3.	EKSPERIMENTALNI DEO	69
3.1	Hemikalije i reagensi.	71
3.2	Oprema	72
3.3	Ispitivani uzorci.	73
3.4	Procedure za pripremu uzoraka	76
3.4.1	Tečno-tečna i ekstrakcija na čvrstoj fazi.	76
3.4.2	QuEChERS ekstrakcija	77
3.4.3	DLLME protokol za pripremu uzoraka meda	78
3.4.4	Procedura ispitivanja mogućnosti uklanjanja odabranih neonikotinoida iz vode	78
3.5	Metodologija površine odziva	79
3.5.1	Optimizacija DLLME procedure	79
3.5.2	Optimizacija hromatografskih uslova	79
3.6	HPLC-DAD/MS/MS uslovi rada	80
3.7	Validacija metode	81
4.	REZULTATI I DISKUSIJA	83
4.1	Razvoj metode za određivanje klotianidina u medu primenom tečno-tečne i ekstrakcije na čvrstoj fazi i HPLC-DAD analize	85
4.2	Razvoj metode za određivanje klotianidina u medu primenom DLLME tehnike i HPLC-DAD analize	89

4.2.1	Početni DLLME postupak	91
4.2.2	Ispitivanje efikasnosti DLLME tehnike korišćenjem standardnih rastvora klotianidina . .	92
4.2.3	Utvrđivanje značajnih faktora DLLME tehnike - odabir i zapremine ekstrakcionog sredstva .	94
4.2.4	Utvrđivanje značajnih faktora DLLME tehnike - zapremina disperznog sredstva	95
4.2.5	Osetljivost i efikasnost DLLME tehnike	96
4.3	Optimizacija metode za određivanje odabranih neonikotinoida u medu primenom DLLME i HPLC-MS/MS analize.	98
4.3.1	Optimizacija odvage uzoraka meda	98
4.3.2	Optimizacija DLLME	98
4.3.2.1	Zapremina alikvota uzorka	98
4.3.2.2	Odabir ekstrakcionog i disperznog sredstva	98
4.3.2.3	Optimizacija zapremine ekstrakcionog i disperznog sredstva	99
4.3.2.4	Optimizacija vremena ekstrakcije i brzine centrifugiranja.	99
4.3.3	Matematički model sistem za DLLME.	100
4.3.4	Optimizacija DLLME upotrebom funkcije poželjnog odziva	102
4.3.5	Optimizacija MS/MS parametara	102
4.3.6	Ispitivanje uticaja matriksa	105
4.3.7	Validacija metode.	106
4.3.8	Primena HPLC-MS/MS metode na realne uzorke	108
4.4	Razvoj HPLC-DAD metode za određivanje neonikotinoida u medu primenom DLLME i QuEChERS tehnika	110
4.4.1	Optimizacija hromatografskih uslova	110
4.4.2	Ispitivanje uticaja matriksa	115
4.4.3	Validacija metode.	117
4.4.4	Primena metode na realne uzorke	119
4.5	Razvoj HPLC-MS/MS metode korišćenjem DLLME i QuEChERS tehnika za određivanje odabranih neonikotinoida u liker od meda	120
4.5.1	Ispitivanje uticaja matriksa	122
4.5.2	Validacija metode.	124
4.5.3	Primena metode na realne uzorke	127
4.6	Ispitivanje mogućnosti uklanjanja odabranih neonikotinoida iz vodene sredine.	128

4.6.1	Ispitivanje razgradnje neonikotinoida u laboratorijskim uslovima	130
4.6.2	Ispitivanje razgradnje neonikotinoida pod uticajem H_2O_2	131
4.6.3	Ispitivanje uklanjanja neonikotinoida upotrebom MWCNT.	133
4.6.4	Mogući intermedijeri	139
5.	ZAKLJUČAK	141
6.	CONCLUSION	147
7.	LITERATURA	153
8.	BIOGRAFIJA	175
9.	KLJUČNA DOKUMENTACIJA	179
10.	KEY WORD DOCUMENTATION	185

LISTA SKRAĆENICA

ACN – Acetonitril	ESI – Elektrosprej jonizacija
ANOVA – Analiza varijanse	EU – Evropska unija
APCI – Hemijska jonizacija pri atmosferskom pritisku	FAB – Jonizacija bombardovanjem brzim atomima/jonima
APPI – Fotojonizacija pri atmosferskom pritisku	FAO – Organizacija za hranu i poljoprivredu Ujedinjenih nacija
c – Koncentracija	Fe-MWCNT – Gvoždem dekorisane višezidne ugljenične nanocevi
c_0 – Početna koncentracija	FIA – Protočna injekciona analiza
CHCl₃ – Hloroform	FTIR – Infracrvena spektrometrija sa Fourierovom transformacijom
CNT – Ugljenične nanocevi	GCB – Grafitizirani ugljenični sorbent
D – Ukupna funkcija poželjnog odziva	GC-MS – Gasna hromatografija sa masenom spektrometrijom
DAD – Detektor na bazi niza dioda	GD – Granica detekcije
DC – Jednosmerna struja	GO – Granica određivanja
DDT – Dihlor-difenil-trihloretan	H – Ekvivalent visine teoretskog poda
DHM – Dihlormetan	H₂O₂ – Vodonik-peroksid
d_i – Pojedinačan odziv sistema	HED – Dinoda visoke energije
DLLME – Disperzna tečno-tečna mikroekstrakcija	HMDE – Adsorpciona striping voltametrijom sa pravougaonim talasom na visećoj kapi žive
DPP – Diferencijalna pulsna polarografija	HPLC – Tečna hromatografija visoke efikasnosti
DPV – Diferencijalna pulsna voltametrijom	HPLC-MS – Tečna hromatografija sa masenom spektrometrijom
DSPE – Disperzivna ekstrakcija na čvrstoj fazi	k' – Faktor kapaciteta
ECD – Elektrohemijski detektor	L – Dužina hromatografske kolone
EDS – Mikroanaliza X-zracima	LD₅₀ – Količina koja izaziva uginuće 50% ispitivanih jedinki
EFSA – Agencija za bezbednost hrane EU	
EI – Jonizacija elektronima	
EPA – Agencija za zaštitu životne sredine	

LOD – Limit detekcije

LOQ – Limit kvantifikacije

m/z – Odnos mase i naelektrisanja

MALDI – Matriksom potpomognuta laserska desorpcija i jonizacija

MDK – Maksimalno dozvoljene količine ostataka pesticida u namirnicama

MgSO₄ – Magnezijum-sulfat

MMC rastvor – Standardni rastvor koji kompenzuje uticaj matriksa

MRM – Režim rada sa praćenjem višestruke reakcije

MS/MS – Tandemska masena detekcija

MWCNT – Višezidne ugljenične nanocevi

N – Broj teoretskih podova

NaCl – Natrijum-hlorid

NMR – Nuklearna magnetna rezonanca

PAD – Fotodiodni detektor

PIF – Fotohemijski indukovana fluorimetrija

PSA – Primarno-sekundarni amin

QqQ – Trostruki kvadrupol

QuEChERS – Brza, laka, jeftina, efikasna, robustna i bezbedna metoda ekstrakcije

R – Prinos

r^2 – Kvadrat koeficijenta korelacije

RF – Radiofrekventna struja

RID – Refraktometrijski detektor

RS – Republika Srbija

RSD – Relativna standardna devijacija

RSM – Metodologija površine odziva

S/N – Odnos signal/šum

SAD – Sjedinjene Američke Države

SEM – Skenirajući elektronski mikroskop

SIM – Režim rada sa praćenjem odabranog jona

SPE – Ekstrakcija na čvrstoj fazi

SPME – Mikroekstrakcija na čvrstoj fazi

SWCNT – Jednoslojne ugljenične nanocevi

t – Vreme

TLS – Optotermički detektor

TOF – Maseni analizator sa vremenom preleta

t_r – Retenciono vreme

uHPLC – Ultratečna hromatografija visoke efikasnosti

UV – Ultraljubičasta oblast spektra

w – Širina pika

wt_i – Relativni značaj koji je dodeljen odzivu sistema

Y_i – Odziv sistema

α – Faktor selektivnosti

Poglavlje 1

UVOD

Pesticidi su hemijska sredstva koja se koriste za zaštitu biljaka i životinja od raznih štetočina. Svako korišćenje pesticida nosi rizik narušavanja ravnoteže ekosistema, pogotovo ukoliko se koriste nestručno u pogledu načina upotrebe i vremena primene. Smanjena upotreba pesticida, jedan je od temelja održive poljoprivrede i ideja održivog razvoja. Međutim, bez pesticida se ne može, jer gotovo da nema biljne kulture u primarnoj poljoprivrednoj proizvodnji koja može da opstane bez zaštite. Upotreba pesticida pomaže u povećanju proizvodnje hrane bilo uništavanjem štetočina i korova ili produžavanjem roka trajanja hrane.

Noviji insekticidi, neonikotinoidi, odlikuju se specifičnim načinom delovanja na nervni sistem insekata. U određenim uslovima neonikotinoidi mogu da predstavljaju i prekursore za nastajanje jedinjenja sa još izraženijom biološkom aktivnošću. Komercijalni preparati koji sadrže neonikotinoide kao aktivne supstance koriste se za tretiranje različitih useva kukuruza, suncokreta, pirinča, uljane repice, šećerne repe, povrća i voća. Međutim, korisni organizmi koji nisu predmet delovanja neonikotinoidea, kao što su medonosne pčele, mogu biti izložene štetnom dejstvu ovih insekticida.

Zavisno od načina upotrebe neonikotinoidea, postoje različite mogućnosti da medonosne pčele dođu u kontakt sa njima. Jedna od mogućnosti delovanja neonikotinoidea jeste njihovo usvajanje preko korena biljke i prenošenje u neke biljne organe: cvet (gde se akumuliraju u nektaru i polenu), plod, listove i seme. Iako većina ovih neurotoksina ne izaziva direktnu smrt pčela, zajedno sa ostalim nepovoljnim činiocima, kao što su virusi, neminovno dovodi do uginuća pčela. Nakon što medonosne pčele dođu u kontakt sa neonikotinooidima, ostaci neonikotinoidea mogu se pojaviti u košnicama i u pčelinjim proizvodima poput meda. Med kontaminiran na takav način odlikuje narušen kvalitet i zdravstvena bezbednost, pogotovo ako se ima u vidu činjenica da je med jedan od retkih prirodnih proizvoda koji se koristi u tehnološki neprerađenom stanju.

Radi dobijanja što brže i kvalitetnije informacije o izloženosti životne sredine ovim insekticidima i količinama njihovih ostataka u hrani, potrebno je raspolagati odgovarajućim instrumentalnim metodama za njihovo određivanje.

Predmet istraživanja ove doktorske disertacije jeste optimizacija analitičke metode zasnovane na tačnoj hromatografiji sa različitim detektorima, tj. detektorom na bazi niza dioda (DAD) i masenim detektorom (kvadrupol MS/MS) za određivanje sedam insekticida iz grupe neonikotinoidea (imidakloprida, tiametoksama, acetamiprida, tiakloprida, klotianidina, nitenpirama i dinotefurana) u odabranim uzorcima.

Optimizacija metoda sastojala se prvo u odabiru najpogodnije ekstrakcione tehnike za ekstrakciju neonikotinoidea iz uzoraka meda i likera medice, koji su odabrani kao matriksi od interesa prilikom ispitivanja. Korišćenjem eksperimentalnih podataka dobijenih variranjem ekstrakcionih parametara i primenom odgovarajućih model sistema, došlo se do optimalnih parametara ekstrakcione tehnike. Korišćenjem metodologije površine odziva, definisani su i optimalni hromatografski uslovi, radi dobijanja najvećih odziva signala detektora, sa ciljem određivanja niskih koncentracija neonikotinoidea.

S obzirom na atraktivnost i aktuelnost gorenavedene grupe jedinjenja, u istraživanje je uključeno i testiranje primenljivosti višezidnih ugljeničnih nanocevi za uklanjanje odabranih insekticida neonikotinoida iz vodenih rastvora.

Rad se sastoji iz sledećih delova: *Teorijski deo, Eksperimentalni deo, Rezultati i diskusija, Zaključak, Conclusion, Literatura i Biografija kandidata*. Teorijski deo obuhvata kratak pregled iz literature o ulozi i primeni pesticida, njihovoj klasifikaciji, neonikotinoidima kao posebnoj grupi insekticida, koja je detaljnije proučavana u ovoj disertaciji, osobinama odabranih neonikotinoida, njihovom načinu delovanja i primeni. Opisana je uloga i značaj pčela za životnu sredinu i okarakterisani su ispitivani pčelinji proizvodi – med i proizvod na bazi meda – liker medica. U nastavku je dat literaturni prikaz nekih primenjivanih tehnika za ekstrakciju neonikotinoida, poput tečno-tečne ekstrakcije, disperzivne tečno-tečne mikroekstrakcije (eng. *dispersive liquid - liquid microextraction* - DLLME), ekstrakcije na čvrstoj fazi primenom kolona za razdvajanje (Discovery) i QuEChERS tehnike za prečišćavanje i ekstrakciju pesticida, zatim prikaz instrumentalnih analitičkih tehnika za određivanje neonikotinoida, koji obuhvata molekulsku spektroskopiju, elektroanalitičke metode, imunohemijske metode i hromatografske metode. Tečna hromatografija sa masenom spektrometrijom (eng. *high performance liquid chromatography -mass spectrometry* - HPLC-MS) detaljnije je opisana, jer je taj sistem odabran kao najpodesniji za određivanje neonikotinoida u odabranim uzorcima u ovoj disertaciji.

U *Eksperimentalnom delu* su opisani: *Hemikalije i rastvori, Pribor i aparature, Ispitivani uzorci, Procedure za pripremu uzoraka, Metodologija površine odziva, HPLC-DAD/MS/MS uslovi rada, i Validacija metoda* za ispitivanje odabranih neonikotinoida.

Deo *Rezultati i diskusija* sastoji se iz 6 celina u kojima su predstavljene i prodiskutovane dobijene rezultate optimizacije metoda ekstrakcije i određivanja neonikotinoida. Predstavljene su rezultate dobijene primenom procedure za pripremu uzoraka, koja obuhvata tečno-tečnu ekstrakciju u kombinaciji sa ekstrakcijom na čvrstoj fazi za određivanje odabranih neonikotinoida korišćenjem detektora na bazi niza dioda (eng. *diode array detector* - DAD). Potom je predstavljena optimizacija disperzivne tečno-tečne mikroekstrakcije variranjem ekstrakcionih parametara i primenom model sistema korišćenjem metodologije površine odziva. Variranjem hromatografskih uslova dobijena je optimalna metoda za određivanje odabranih neonikotinoida zasnovana na DAD i tandemskoj masenoj (MS/MS) detekciji. Pored DLLME ekstrakcione tehnike ispitivana je i primena ekstrakcionog seta QuEChERS. Prikazani su parametri validacije optimizovane metode i njena primena na realnim uzorcima meda i likera od meda. Pored određivanja odabranih neonikotinoida iz uzoraka meda i likera od meda, ispitivana je i mogućnost uklanjanja neonikotinoida iz vodene sredine upotrebom višezidnih ugljeničnih nanocevi (eng. *multiwalled carbon nanotube* - MWCNT). Predstavljene su rezultate razgradnje i/ili adsorpcije odabranih neonikotinoida primenom sistema koji su sadržali pored neonikotinoida i MWCNT i/ili hemijski reagens (H_2O_2). Radi ispitivanja pogodnijeg načina uklanjanja nanomaterijala iz ispitivanih uzoraka, testirana je i primena gvožđem dekorisanih nanomaterijala (Fe-MWCNT), kao potencijalnih adsorbenasa.

U delovima *Zaključak* i *Conclusion* predstavljena su najznačajnija saznanja koja su proistekla iz rezultata ispitivanja neonikotinoida u odabranim uzorcima na srpskom i engleskom jeziku. Spisak korišćene literature, kratka biografija kandidata i ključna dokumentacija čine poslednje delove ove doktorske disertacije.

Poglavlje 2

**TEORIJSKI
DEO**

2.1 Pesticidi i njihova klasifikacija

Još u antičkom dobu ljudi su poznavali i koristili sredstva kojima su štitili useve od štetočina. To potvrđuju zapisi o duvanu koji je korišćen da bi se njime oterali štetni insekti. Međutim, tek u 19. veku dolazi do prvih pokušaja proizvodnje sredstava za zaštitu bilja od štetočina. Postoje podaci koji govore da su tada bili u upotrebi nikotin, piretrin, rotenoidi, a primenjivan je i petrolej, pa čak i arsenovi preparati i cijanovodična kiselina. Prvi nemetalni, organski insekticid, antinonin, upotrebljen je u Nemačkoj 1892. godine protiv omorikovog prelca. Ovaj insekticid je zbog izrazite toksičnosti bio u upotrebi kratko vreme.

Početak 20. veka, u upotrebi su fenotiazin, nitrokarbazoli i tiocijanati. Švajcarac Müller otkrio je dihlor-difenil-trihloretan (DDT), zbog čega je 1948. godine dobio Nobelovu nagradu. Usledila je masovna upotreba ovog hemijskog jedinjenja u celom svetu u poljoprivredi, ali i u borbi protiv tifusa, malarije itd.

Pesticidi (latinski pestis-kuga, pošast, štetnik; occidere-ubiti) predstavljaju sredstva namenjena za sprečavanje, suzbijanje ili kontrolu štetočina zoogenog porekla (insekti, pregljevi, puževi, nematode, glodari), uključujući i vektore humanih i animalnih bolesti, prouzrokovaoče biljnih bolesti gljivičnog, bakterijskog i virusnog porekla, kao i neželjene vrste biljaka (korova), koji izazivaju štete u vreme vegetacije, proizvodnje, prerade, skladištenja ili transporta poljoprivrednih kultura i životnih namirnica. Za pesticide koji se koriste u poljoprivrednoj proizvodnji koristi se naziv sredstvo za zaštitu bilja, čija su registracija, kontrola, promet, uvoz i primena u poljoprivredi i šumarstvu, kao i poslovi od javnog interesa u ovoj oblasti u Republici Srbiji (RS) regulisani Zakonom o sredstvima za zaštitu bilja objavljen pod brojem 41 u službenom glasniku RS 2009. godine.

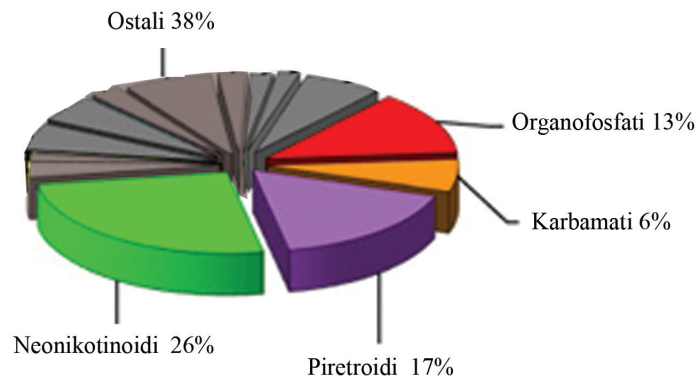
Primena pesticida je najznačajnija u poljoprivredi i obuhvata preko 95% ukupnog prometa ovih hemijskih proizvoda. Osnovna klasifikacija pesticida se najčešće zasniva na njihovoj nameni (tabela 2.1). Na tržištu Evropske unije (EU) u ovom trenutku registrovano je više od 1300 pesticida [1], dok je prema izveštaju Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede RS iz 2013. godine u našoj zemlji u prometu 377 pesticidnih aktivnih materija, sadržanih u 924 preparata. Pesticidi i njihovi metaboliti ulaze u ljudski organizam preko lanca ishrane i vode. Negativan uticaj sredstva za zaštitu bilja na ljudsko zdravlje uključuje mnoge efekte: akutnu neurološku toksičnost, hronično oštećenje nervnog sistema, disfunkciju imunog, reproduktivnog i endokrinog sistema ili pojavu raka.

Tabela 2.1. Podela pesticida prema nameni

GRUPA PESTICIDA	NAMENA
Akaricidi	suzbijaju grinje
Algicidi	suzbijaju alge
Arboricidi	uništavaju drvenaste biljke
Atraktanti	privlače štetočine
Baktericidi	suzbijaju bakterijska oboljenja
Biološki agensi	živi organizmi koji se gaje i koriste za suzbijanje štetnih organizama
Desikanti	izazivaju sušenje biljaka pre berbe
Defolijanti	prvenstveno izazivaju opadanje lišća
Fumiganti	deluju u gasovitom stanju
Feromoni	remete normalno ponašanje insekata
Fungicidi	suzbijaju patogene gljive
Hemosterilizanti	suzbijaju štetočine izazivanjem sterilnosti
Herbicidi	suzbijaju korovske biljke
Insekticidi	suzbijaju insekte
Moluskocidi (Limacidi)	suzbijaju štetne puževe
Regulatori rasta biljaka	utiču na rast i razvoj biljaka na drugačiji način od đubriva
Regulatori rasta insekata	remete normalan rast insekata
Repelenti	odbijaju štetočine

Rastuća zabrinutost javnosti za zdravlje ljudi, a u vezi je sa ostacima pesticida u hrani, uveliko je promenila strategiju zaštite useva, sa posebnim naglaskom na kvalitet i bezbednost hrane. Zabrinutost za opšte zdravlje populacije dovela je do pooštavanja regulative koja se bavi maksimalno dozvoljenim količinama (MDK) ostataka pesticida u namirnicama. Više od 17000 MDK vrednosti propisane su u raznim namirnicama za 526 pesticida [1]. Republika Srbija je 2010. godine donela Pravilnik kojim su vrednosti MDK usklađene sa vrednostima u Evropskoj uniji [2]. Danas u životnu sredinu dospevaju ogromne količine različitih hemijskih jedinjenja. Mnoga od njih se ne razlažu na prostija, manje opasna jedinjenja, već se nagomilavaju u atmosferi, vodi ili zemljištu i transformišu se u još opasnije oblike. Zbog rasprostranjene upotrebe brojnih hemikalija u procesima proizvodnje i prerade namirnica, kao i sve veće zagađenosti životne sredine, dolazi do ulaska velikog broja nenutritivnih komponenata u lanac ishrane čoveka. Iako se ova jedinjenja u namirnicama najčešće nalaze u malim, tzv. rezidualnim količinama, posledice njihovog delovanja nisu zanemarljive. Mnogi sastojci namirnica su hemijski stabilna jedinjenja, dok su druga veoma nestabilna. U postupcima proizvodnje namirnica, njihove prerade, prometa i čuvanja mogu se pronaći neželjene strane supstance, kao što su toksični elementi, hormoni i ostaci pesticida. Za razliku od većine zagađujućih supstanci koje se u životnu sredinu unose bez određenog cilja, pesticidi se unose sa namerom da pomognu čoveku – povećanjem prinosa u poljoprivredi i suzbijanjem štetnih organizama.

Udeo insekticida na tržištu pesticida je predstavljen na slici 2.1. Insekticidi su raspoloživi u sva tri agregatna stanja, a ubijaju insekte delujući na njihov centralni nervni sistem. Jedna od savremenijih grupa insekticida, koja je po hemijskoj strukturi slična nikotinu, jeste grupa neonikotinoida, koja se odlikuje velikom efikasnošću u borbi protiv štetnih insekata, a malom toksičnošću za ljude i životnu sredinu.



Slika 2.1. Udeo insekticida na tržištu na osnovu ostvarene prodaje [3]

2.2 Neonikotinoidi

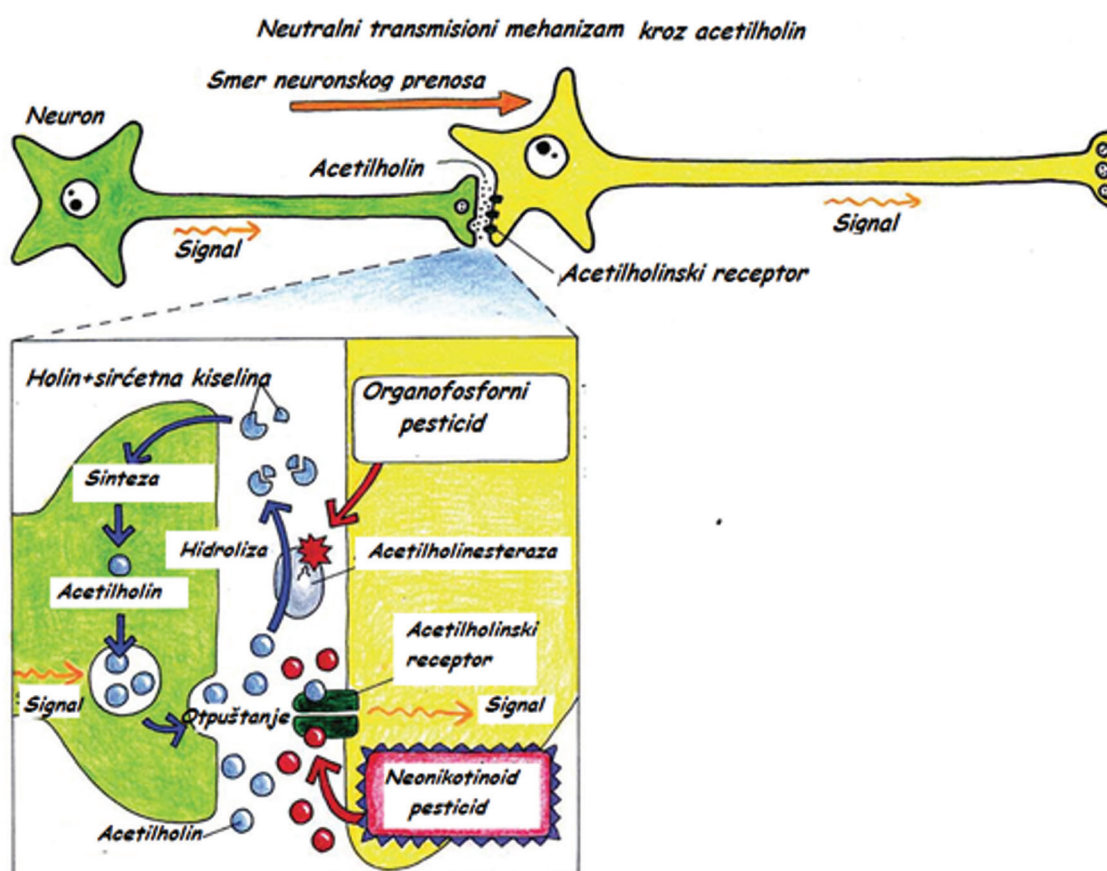
Naziv neonikotinoidi za grupu insekticida izabran je na osnovu načina njihovog delovanja i strukturnih sličnosti sa nikotinoidima. U poslednjih 20 godina, neonikotinoidi su postali najzastupljenija grupa insekticida na svetu. Njihovo prisustvo predstavlja četvrtinu od ukupnog prisustva pesticida na svetskom tržištu [3, 4]. Otkriće nitrometilenskih neonikotinoida tokom sedamdesetih godina proteklog veka, stvorilo je bazu za dugoročno razvijanje insekticida neonikotinoida sa niti-azinom kao polaznim jedinjenjem. Uspešna istorija neonikotinoida počinje 1991. godine sa pojavom imidakloprida, koji je proizveo *Bayer* [5]. Prvu generaciju neonikotinoida, pored imidakloprida, čine još tri supstance – nitenpiram, koji je 1995. godine proizveo *Takeda*, acetamiprid, proizveden 1996. godine od strane *Nipon Sode* i tiakloprid, koji je 2000. godine proizveo *Bayer*. Drugu generaciju čine tiametoksam (*Syngenta*), proizveden 1998. godine, i klotianidin razvijen od strane konzorcijuma *Takeda* i *Bayer* 2002. godine. Treću generaciju predstavlja dinotefuran proizvođača *Mitsui Chemicals* iz 2002. godine. Insekticid flonikamid je razvijen od strane *ISK* u kasnim devedesetim godinama proteklog veka i samo se zavisno od individualnih istraživanja i registrovanja svrstava u neonikotinoide ili u piridinkarboksiamide. Najnovija jedinjenja iz grupe neonikotinoida jesu *paichongding* i *cycloxa-brid* [6, 7].

Na osnovu hemijskih struktura neonikotinoidi se dele u sledeće grupe: nitroguanidinski insekticidi (imidakloprid, tiametoksam, klotianidin i dinotefuran), nitrometilenski insekticidi (nitenpiram i nitiazin) i piridilmetilaminski insekticidi (acetamiprid, imidakloprid, nitenpiram i tiakloprid). Neonikotinoidi se, takođe, mogu podeliti i na osnovu funkcionalnih grupa na neonikotinoide sa nitro grupom (dinotefuran, nitenpiram, tiametoksam, imidakloprid, klotianidin i *paichongding*) i cijano grupom (acetamiprid, flonikamid i tiakloprid) [8].

Prva generacija neonikotinoida sadrži heterocikličnu 6-hlor-3-piridil-grupu, drugu generaciju odlikuje 2-hlor-5-tiazolil-grupa, dok treću generaciju karakteriše 3-tetrahidrofuranil-grupa. Flonikamid odlikuje heterociklična 4-trifluor-metil-3-piridil-grupa. Neonikotinoide odlikuje polarni karakter i različita rastvorljivost u vodi, od 185 g L^{-1} do 840 g L^{-1} .

Neonikotinoidi deluju kao agonisti (lažni transmiteri) postsinaptičkih nikotinskih acetilholin-receptora centralnog nervnog sistema insekata [9-13]. Postsinaptičkih nikotinskih acetilholin-receptori su receptori koji se nalaze na sinaptičnoj membrani i koji pri vezivanju molekula acetilholina propuštaju jone Na^+ , K^+ i Ca^{2+} i tako dovode do stvaranja električnog impulsa. Način na koji se acetilholin vezuje za receptore identičan je načinu vezivanja neonikotinoida. Suštinska razlika između vezivanja acetilholina i neonikotinoida za receptor jeste da acetilholin napušta receptor, dok neonikotinoidi ostaju vezani. Na taj način, neonikotinoidi u velikim dozama izazivaju konstantnu depolarizaciju, što dovodi do prekida u prenosu signala.

Delovanje neonikotinoida na insekte dovodi do ekscitacije nerava i krajnje paralize, koja vodi u uginuće [9, 14-16]. Nikotinski acetilholinski receptori postoje i kod sisara, ali je pripadajuća neuronska mreža zastupljenija kod insekata [17]. Mehanizam sinaptičke transmisije kod holinergičnih neurona, i mete delovanja insekticida prikazani su na slici 2.2.



Slika 2.2. Mehanizam sinaptičke transmisije kod holinergičnih neurona, i mete delovanja insekticida [18]

Neonikotinoidi pokazuju veliku selektivnost ka podtipovima receptora. Upravo ta jedinstvena selektivnost [19] može da predstavlja i potencijalnu opasnost za korisne insekte [20, 21]. Specifičan

način delovanja neonikotinoidea rezultira odsustvom unakrsne otpornosti na neonikotinoide u odnosu na druge insekticide poput karbamata, organofosfornih pesticida ili piretroida [22-24]. Mnoge štetočine su tokom godina razvile otpornost ka ovim grupama insekticida, dok neonikotinoide uspešno štite poljoprivredne useve od ovakvih štetočina [23, 25]. Pored suzbijanja štetočina, tretman neonikotinooidima može da ima i dodatni koristan uticaj na biljke. Naime, oni mogu da pospešuju rast biljaka i čuvaju biljke od različitih vrsta stresa [26, 27].

Danas su u upotrebi u više od 120 zemalja za preko 1000 različitih namena radi tretmana širokog spektra biljaka, uključujući suncokret, kukuruz, pamuk, krompir, pirinač, šećernu trsku i repu, uljanu repicu, soju, ukrasno bilje, voće i druge biljne kulture [28].

Glavni razlog uspeha neonikotinoidea na tržištu leži upravo u njihovoj efikasnosti, selektivnosti, dugotrajnom dejstvu i raznolikoj nameni [29, 30]. U EU acetamiprid, klotianidin, imidakloprid, tiakloprid, flonikamid i tiametoksam su registrovani i uključeni u Aneks I Direktive 91/414/EEC [31], dok dinotefuran i nitenpiram nisu registrovani do danas [1]. Situacija je ista i u Republici Srbiji što se tiče registrovanih aktivnih supstanci u sredstvima za zaštitu bilja u prometu [32].

Klotianidin, imidakloprid i tiametoksam koriste se kao aktivne materije u sredstvima za tretiranje semena. Oni deluju na seme poput zaštitnog omotača oko semena odbijajući insekte, dok je seme u zemlji. Neonikotinoide putem korenskog sistema dospevaju u celu biljku, štiteći je od ugriza, sisanja i žvakanja insekata tokom njenog rasta. Nasuprot tome, tiakloprid i acetamiprid se najčešće primenjuju u vidu sprejeva i omogućavaju direktnu, ali kratkotrajnu zaštitu biljaka [30].

Visoka uspešnost neonikotinoidea u zaštiti poljoprivrednih useva od štetnih insekata odražava se i na korisne insekte poput pčela [33]. One mogu doći u kontakt sa neonikotinooidima na različite načine. Zavisno od toksičnosti i dužine izloženosti moguće su sledeće posledice po pčele: oštećenja legla, kontaminacija pčelinjih proizvoda ostacima pesticida, gubici pčela ili bez vidljivih uticaja. Jedan od glavnih razloga izloženosti pčela neonikotinooidima je blizina košnica i obradivih oranica koje se tretiraju pesticidima. S obzirom na veliku površinu koju zauzimaju poljoprivredni usevi, pčele su primorane da tragaju za hranom u njihovoj neposrednoj blizini, pa im se i košnice najčešće nalaze veoma blizu [34]. Izloženost neonikotinooidima moguća je i kao posledica neadekvatnog delovanja ljudskog faktora, koje dovodi do kontaminacije voda i flore [35].

Zavisno od načina korišćenja neonikotinoidea, različiti su i mogući putevi kontaminacije ljudi, pčela i pčelinjih proizvoda [36]. Ako se neonikotinoide koriste u vidu spreja, može doći do kontaminacije pčela preko cvetova tokom sakupljanja nektara ili polena ili do direktnog kontakta sa neonikotinooidima ukoliko se tretiranje dešava dok su pčele u blizini. Korišćenje neonikotinoidea u tretiranju semena značajno smanjuje mogućnost zagađivanja vazduha ovim insekticidima [37]. Bez obzira na navedeno, kontakt sa pčelama je moguć iz razloga što novonastala biljka iz tretiranog semena resorbuje i deo neonikotinoidea. Ukoliko tokom sejanja dođe do abrazije semena, nastala prašina koja sadrži neonikotinoide može da kontaminira biljke i prirodu u okolini [38]. Korišćenje sejalice koje izbacuju vazduh nagore dovodi do intenzivnijeg stvaranja prašine i veće mogućnosti od zagađivanja životne sredine i pčela.

Neonikotinoidi koji se koriste u zaštiti semena su sistemski insekticidi [39] i dospevaju u celu biljku putem ksilemskih i floemskih transportnih tkiva [40], pa biljne tečnosti i cvetni polen mogu predstavljati potencijalne izvore kontaminacije neonikotinoidima za pčele. Pored nektara i polena, potencijalni izvor kontaminacije neonikotinoidima predstavlja i eksudacija kapi.

Ovaj botanički fenomen je aktivno ili pasivno izbacivanje ksilemske tečnosti u formi kapljica na određenim delovima biljke. Izraz eksudacija kapi potiče od latinske reči *gutta*, što znači kap. Najčešće se pojavljuju na ivicama lišća biljaka. Pojava ove tečnosti je karakteristična za mnoge vaskularne biljke, poput kukuruza, ječma i pšenice, usled određenih klimatskih pojava, kao što je visoka vlažnost vazduha. Klimatski uslov poput ovog, sprečava uobičajen način oslobađanja od viška vode za biljku, pa je jedini način oslobađanja vode putem eksudacije kapi. S obzirom na to da smanjenje temperature vazduha povećava relativnu vlažnost vazduha, eksudacija kapi se najčešće dešava noću ili ranom zorom.

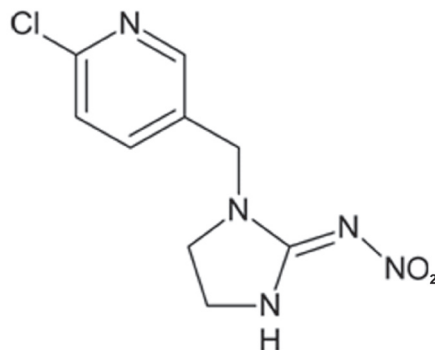
Eksudaciona kap je vodeni rastvor koji sadrži soli, amino kiseline, šećere, vitamine i hormone. Ukoliko se aktivne supstance sredstava za zaštitu semena nalaze u delu korena biljke, one mogu biti transportovane sa vodom kroz celu biljku do eksudacione kapi, i na taj način predstavljati potencijalni izvor kontaminacije pčela neonikotinoidima. Ispitivanju sadržaja neonikotinoida u eksudacionoj kapi posvećuje se sve više pažnje [41-43]. *Girolami et al.* [42] je utvrdio prisustvo klotianidina, imidakloprida i tiametoksama u eksudacionoj kapi kukuruza, čije je seme bilo tretirano neonikotinoidima. Koncentracije nađenih neonikotinoida su se kretale i do 200 mg L⁻¹. Slične rezultate za sadržaj klotianidina (do 133 mg L⁻¹) ustanovio je *Nikolakis et al.* [43], čime je dokazana mogućnost prolaska neonikotinoida iz semena do eksudacione kapi biljaka. Pošto pčele mogu da koriste eksudaciju kapi kao izvor vode, moguća je i njihova izloženost neonikotinoidima.

Dalja ispitivanja sprovedena su radi utvrđivanja mogućnosti akumuliranja letalnih doza ovih insekticida u košnicama i izloženosti mladih pčela istim [44]. Takođe, postoji opasnost od kontaminiranog polena, koji je jedini izvor proteina za mlade pčele u košnici, pa, stoga, utiče na razvitak cele kolonije [45]. Vršena su i istraživanja vezana za utvrđivanje nivoa opasnosti korišćenjem nitro- i cijanosupstituisanih neonikotinoida, u kojima je utvrđeno da su nitrosupstituisani neonikotinoidi znatno otrovniji za pčele [20]. Klotianidin, imidakloprid, tiametoksam, dinotefuran i nitenpiram predstavljaju najveću opasnost za pčele sa LD₅₀ (količina koja izaziva uginuće 50% ispitivanih jedinki) vrednostima manjim od 1 µg po pčeli.

2.2.1 Imidaklopid

Imidaklopid je prvi sintetski proizveden neonikotinoid. Prisutan je u asortimanu preparata za zaštitu biljaka namenjen tretiranju semena kao zaštita od štetočina.

Sintetizovan je 1984. godine u kompaniji *Bayer* (Leverkuzen, Nemačka). Primenjuje se u granicama 5,6-14,0 mg m⁻², što je mnogo manje u odnosu na tradicionalne insekticide. Hemijska struktura imidakloprida prikazana je na slici 2.3, dok se neki fizičko-hemijski parametri nalaze u tabeli 2.2.



Slika 2.3. Strukturna formula imidakloprida

Tabela 2.2. Fizičko-hemijske osobine imidakloprida

Naziv po IUPAC-u	1-(6-hlor-3-piridilmetil)-2-nitroiminoimidazolidin	
Molekulska formula	C ₉ H ₁₀ ClN ₅ O ₂	
Molekulska masa	255,7 g mol ⁻¹	
Izgled	bezbojni kristali	
Gustina	1,50–1,70 g mL ⁻¹ na 20 °C	
Tačka topljenja	modifikacija 1: 143,8 °C	
	modifikacija 2: 136,8 °C	
Napon pare	2·10 ⁻⁷ Pa na 20 °C	
Rastvorljivost na 20 °C	voda	0,61 g L ⁻¹
	acetone	55 g L ⁻¹
	metanol	1,2 g L ⁻¹
	dihlormetan	0,68 g L ⁻¹
	n-heksan	< 0,1 g L ⁻¹
Rastvorljivost u mastima	0,55 g kg ⁻¹	
Koeficijent raspodele oktanol-voda (K _{ow})	3,7	

Imidakloprid je veoma slabo isparljivo jedinjenje, što potvrđuje njegov nizak napon pare. Shodno tome, mala je i verovatnoća disperzije imidakloprida u vazduhu na većoj površini. S druge strane, postoji mogućnost da imidakloprid dospe u površinske i podzemne vode. Hemijski gledano, najefikasniji put degradacije imidakloprida je fotodegradacija [46, 47]. Zahvaljujući reakcijama fotodegradacije, prema dosadašnjim podacima, imidakloprid se razlaže do 6-hloronikotinske kiseline, imidakloprid uree, 6-hlor-nikotinaldehida, 6-hlor-*N*-metilnikotinamida, 6-hlor-3-piridil-metiletilendiamina i drugih jedinjenja. Nadalje, imidakloprid ima nisku tendenciju vezivanja za zemljište [48, 49]. Imidakloprid je hidrolitički relativno stabilan i postojan u zemljištu [50]. Dug period polurazgradnje imidakloprida u zemljištu ukazuje na rizik od bioakumulacije, ali zahvaljujući fotodegradaciji i do broj rastvorljivosti u vodi, do njegove bioakumulacije ne dolazi. Pored sunčeve svetlosti, mikroorganizmi vode i zemljišta igraju važnu ulogu u degradaciji imidakloprida [49, 51].

Imidakloprid se koristi kao aktivna komponenta u mnogim komercijalnim preparatima za zaštitu bilja. Registrovani preparati za zaštitu bilja u prometu u RS u 2013. godini sa imidaklopridom kao aktivnom supstancom su prikazani u tabeli 2.3 [32].

Agencija za zaštitu životne sredine (eng. *Environmental Protection Agency* - EPA) svrstava ga u E grupu kancerogena, tj. u supstance koje nisu kancerogene za ljudski organizam [48, 52, 53]. Ekotoksičnost imidakloprida za vodene organizme je niska, ali postoje podaci da je otrovan za ptice [54].

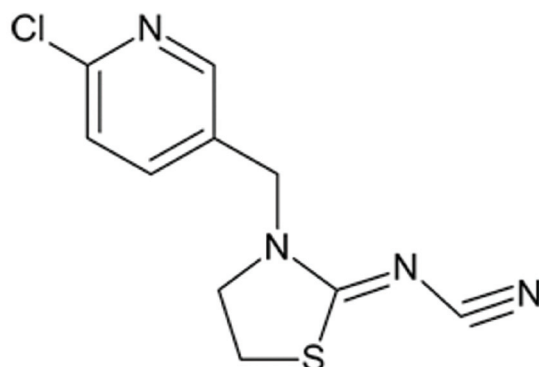
Studije ispitivanja akutne toksičnosti imidakloprida za medonosne pčele su pokazale da je LD_{50} oko 60 ng po pčeli ($600 \mu\text{g kg}^{-1}$) u 48 sati i 40 ng po pčeli ($400 \mu\text{g kg}^{-1}$) u 72 sata i 96 sati. Međutim, Bajerove studije došle su do nivoa LD_{50} između 0,14 i 1,57 mg kg^{-1} . Dalja proučavanja utvrdila su da su mnogo niži nivoi LD_{50} izrazito otrovni za pčele, odnosno da su otrovni nivoi od 3,7-20,6 ng po pčeli [55].

Tabela 2.3. Sredstva za zaštitu bilja u RS u prometu 2013. godine sa imidaklopridom kao aktivnom supstancom

PREPARAT	PROIZVOĐAČ	BILJNA VRSTA	ŠTETOČINA
Gaucho 600	<i>Bayer</i>	ječam	lisne vaši
		suncokret	žičnjaci
		kukuruz	siva kukuruzova pipa
			kukuruzna zlatica
		šećerna repa	repin buvač
Macho 600	<i>Hemovet</i>	kukuruz	siva kukuruzova pipa
Imidor 600	<i>Stockton</i>		
Pozitron	<i>Galenika</i>		šećerna repa
Seedoprid 600	<i>Celsius Property</i>		kukuruz
Tabu	<i>August</i>		
Tamaris	<i>Agro-Care</i>		
Nuprid 600	<i>Nufarm</i>	uljana repica	repičina osa
Confidor 200	<i>Bayer</i>	krompir	krompirova zlatica
		paprika	lisne vaši
		jabuka	
		šljiva	
		breskva	
		duvan	tripisi
Savador 200	<i>Agrosava</i>	krompir	krompirova zlatica
		paprika	lisne vaši
Kohinor 200	<i>Celsius Property</i>	krompir	krompirova zlatica
		jabuka	lisne vaši
		šljiva	
		breskva	
Warrant 200	<i>Cheminova</i>	krompir	krompirova zlatica
		jabuka	lisne vaši
		šljiva	
		breskva	
Macho 200	<i>Hemovet</i>	krompir	krompirova zlatica
		paprika	lisne vaši
		jabuka	
		šljiva	
		breskva	
		duvan	tripisi
Nuprid 200	<i>Nufarm</i>	krompir	krompirova zlatica

2.2.2 Tiakloprid

Tiakloprid ((*Z*)-3-hlor-3-piridilmetil)-1,3-tiazolidin-2-ilidencijanamid (slika 2.4) pripada prvoj generaciji neonikotinoidnih insekticida. Prva ga je sintetizovala kompanija *Bayer* i drugi je u nizu njihovih proizvoda iz grupe neonikotinoida.



Slika 2.4. Strukturna formula tiakloprida

Tiakloprid je prvi put registrovan u Brazilu 1999. godine. Uglavnom se koristi za zaštitu voća, ribizli, pamuka, šećerne repe i pirinča u količinama od 48-216 g ha⁻¹. Koristi se i kao sredstvo za kontrolu insekata, kao što su moljci, bube i leptiri (tabela 2.4) [56]. Odlikuje ga sličan način delovanja kao i ostalih insekticida iz grupe neonikotinoida.

U proizvodnji tiakloprida najzastupljenija na tržištu je kompanija *Bayer* [57]. U tabeli 2.5 prikazane su neke fizičko-hemijske osobine tiakloprida.

Pri pH 5-9 tiakloprid je stabilan, ne hidrolizuje i ne razgrađuje se fotohemijski. Tiakloprid se u vodi primarno razgrađuje pod dejstvom mikroorganizama sa vremenom poluraspada od 12 do 20 dana. Metaboliti koji nastaju u vodenoj sredini se ne akumuliraju, jer kada dostignu maksimalnu koncentraciju (između 25-62 dana nakon upotrebe insekticida), njihova koncentracija počinje da opada. Pri njegovoj razgradnji nastaje ugljen-dioksid, što ukazuje na mogućnost potpune mineralizacije nastalih metabolita [58].

Tiakloprid ima nisku toksičnost za sisare. EPA ga svrstava u E grupu kancerogena. Toksičnost tiakloprida za vodene organizme je niska. Međutim, otrovan je za ptice. Smatra se veoma otrovnim za kišne gliste i pčele [59]. Poluvreme raspada u zemljištu pri aerobnim uslovima na 20 °C kreće se u intervalu 12-78 dana [58].

Tabela 2.4. Sredstva za zaštitu bilja u RS u prometu 2013. godine sa tiaklopidom kao aktivnom supstancom

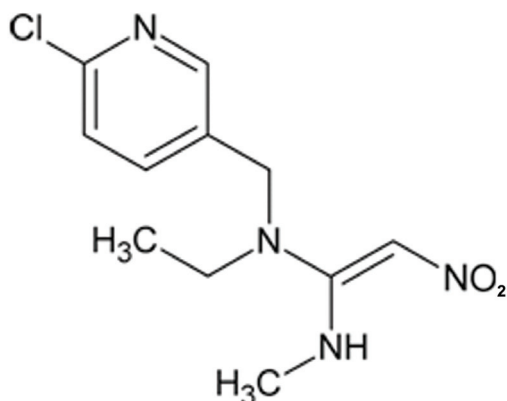
PREPARAT	PROIZVOĐAČ	BILJNA VRSTA	ŠTETOČINA
Calypso 480	<i>Bayer</i>	suncokret	lisne vaši
		krompir	krompirova zlatica
paprika		lisne vaši	
kupus			
Proteus 110 (tiaklopid+deltametrin)		krompir	krompirova zlatica

Tabela 2.5. Fizičko-hemijske osobine tiakloprida

Naziv po IUPAC-u	N-{{(2Z)-3-[(6-hlor-3-piridinil)metil]-1,3-tiazolan-2-iliden} cijanamid	
Molekulska formula	C ₁₀ H ₉ ClN ₄ S	
Molekulska masa	252,7 g mol ⁻¹	
Izgled	beli kristali	
Gustina	1,46 g mL ⁻¹ na 20 °C	
Tačka topljenja	136 °C	
Napon pare	3 · 10 ⁻⁸ Pa na 20 °C	
Rastvorljivost na 20 °C	n-heptan	< 0,1 g L ⁻¹
	ksilen	0,30 g L ⁻¹
	1-oktanol	1,4 g L ⁻¹
	2-propanol	3,0 g L ⁻¹
	etilacetat	9,4 g L ⁻¹
	voda	0,18 g L ⁻¹
	acetonitril	52 g L ⁻¹
	aceton	64 g L ⁻¹
	dihlormetan	160 g L ⁻¹
dimetilsulfoksid	150 g L ⁻¹	
Koeficijent raspodele oktanol-voda (K _{ow})	18,2	

2.2.3 Nitenpiram

Nitenpiram je sintetisan 1988. godine. Pripada prvoj generaciji neonikotinoida. Svrstava se u grupu nitrometilenskih, a takođe i u grupu piridil-metilaminskih neonikotinoida. Njegova strukturna formula prikazana je na slici 2.5, a neke fizičko-hemijske osobine u tabeli 2.6.



Slika 2.5. Strukturna formula nitenpirama

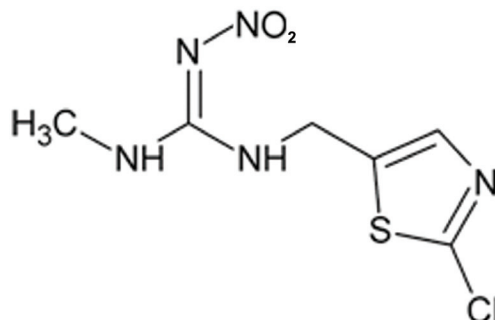
Tabela 2.6. Fizičko-hemijske osobine nitenpirama

Naziv po IUPAC-u	<i>(E)</i> - <i>N</i> -(6-hlor-3-piridimetil)- <i>N</i> -etil- <i>N'</i> -metil-2-nitrovinilidenediamin	
Molekulska formula	$C_{11}H_{15}ClN_4O_2$	
Molekulska masa	270,72 g mol ⁻¹	
Izgled	bledi žućkasti kristali	
Gustina	1,40 g mL ⁻¹ na 26 °C	
Tačka topljenja	72 °C	
Rastvorljivost na 20 °C	voda	840 g L ⁻¹
	hlороform	700 g L ⁻¹
	acetон	290 g L ⁻¹
	ksilen	4,5 g L ⁻¹
	metanol	670 g L ⁻¹
	etanol	89 g L ⁻¹
Koeficijent raspodele oktanol-voda (K_{ow})	0,22	

Veoma se dobro rastvara u vodi (840 g L⁻¹), dobar je sistemik i nije fitotoksičan. Koristi se za kontrolu lisnih vaši, belih muva i drugih štetočina u pirinču i biljkama u staklenicima. Relativno je slabo postojan u zemljištu sa vremenom poluraspada od 1-15 dana. Koristi se i za otklanjanje buva kod mačaka i pasa. Nakon oralne upotrebe, veoma brzo i potpuno se apsorbuje iz gastrointestinalnog trakta u roku od 90 minuta [60].

2.2.4 Tiametoksam

Tiametoksam pripada drugoj generaciji neonikotinoida. Tiametoksam i njegov metabolit klotianidin, takođe predstavnik neonikotinoida, dele zajednički katabolički put [61]. Strukturna formula tiametoksama je prikazana na slici 2.6, a neke njegove fizičko-hemijske osobine prikazane su u tabeli 2.7.



Slika 2.6. Strukturna formula tiametoksama

Tiametoksam je hemijski nestojan u zemljištu, a vreme poluraspada mu je 11 dana. U vodi je, takođe, nestojan sa vremenom poluraspada od 51 dan. Tiametoksam ima nizak potencijal bioakumulacije i srednju mobilnost u zemljištu. Registrovani preparati za zaštitu bilja u prometu u RS u 2013. godini sa tiametoksamom kao aktivnom supstancom, prikazani su u tabeli 2.8 [32]. Studije ispitivanja akutne toksičnosti tiametoksama za medonosne pčele su pokazale da je oralna LD_{50} 0,024 μg po pčeli, a kontaktna 0,005 μg po pčeli [62].

Tabela 2.7. Fizičko-hemijske osobine tiametoksama

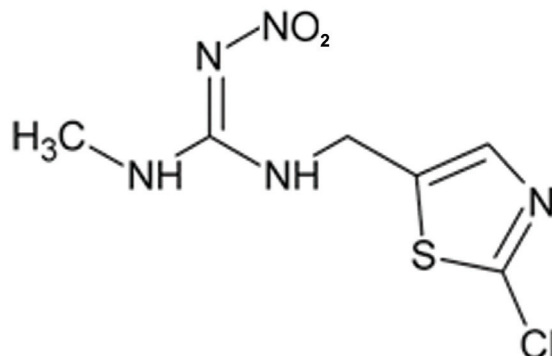
Naziv po IUPAC-u	3-(2-hlor-1,3-tiazol-5-ilmetil)-5-metil-1,3,5-oksadiazinan-4-iliden(nitro)amin	
Molekulska formula	$\text{C}_8\text{H}_{10}\text{ClN}_5\text{O}_3\text{S}$	
Molekulska masa	291,71 g mol^{-1}	
Izgled	beli kristalni prah	
Gustina	1,57 g mL^{-1} na 20 °C	
Tačka topljenja	139,1 °C	
Temperatura raspadanja	147 °C	
Napon pare	$6,6 \cdot 10^{-9}$ Pa na 25 °C	
Rastvorljivost na 25 °C	voda	4,1 g L^{-1}
	aceton	48,0 g L^{-1}
	toluen	68,0 g L^{-1}
	n-heksan	0,001 g L^{-1}
	etilacetat	7,0 g L^{-1}
Koeficijent raspodele oktanol-voda (K_{ow})	0,74	

Tabela 2.8. Sredstva za zaštitu bilja u RS u prometu 2013. godine sa tiametoksamom kao aktivnom supstancom

PREPARAT	PROIZVOĐAČ	BILJNA VRSTA	ŠTETOČINA
Cruiser 600	<i>Syngenta</i>	suncokret	žičnjaci
			grčice
		kukuruz	žičnjaci
			grčice
		šećerna repa	žičnjaci
			grčice
repin buvač			
Cruiser 350		suncokret	žičnjaci
			šljivina vaš
			siva kukuruzna pipa
		šećerna repa	repin buvač
			žičnjaci
	siva kukuruzna pipa		
	uljana repica	žičnjaci	
		buvač	
		lisna osa	
	kukuruz	žičnjaci	
		siva kukuruzna pipa	
	Celest Top 312,5 (tiametoksam+difenokonazol+fludioksonil)	ječam	lisne vaši
Force ZEA 280	pšenica	glavnice	
Cruiser OSR (tiametoksam+metalaksil-M+fludioksonil)	kukuruz	žičnjaci	
		grčice	
Actara 240	uljana repica	trulež	
		bela trulež	
	krompir	krompirova zlatica	
	kupus	lisne vaši	
	paprika		
	grašak		
jabuka			
duvan			

2.2.5 Klotianidin

Klotianidin je neonikotinoid koji je razvijen u saradnji japanske kompanije *Sumitomo Chemical Takeda Agro* i nemačke kompanije *Bayer Crop Science* u periodu od 2000-2003. godine [7]. Njegova strukturna formula prikazana je na slici 2.7.



Slika 2.7. Strukturna formula klotianidina

Klotianidin ima specifičan mehanizam delovanja, odlične sistemske osobine, relativno nisku toksičnost za toplokrvne organizme i dug period delovanja. Važniji fizičko-hemijski parametri klotianidina prikazani su u tabeli 2.9 [57].

Kod ljudi, klotianidin deluje kao potencijalni neurotoksin, izaziva blagu iritaciju očiju, a kod životinja može dovesti do endokrinih poremećaja. EPA ga svrstava u III grupu kancerogena, odnosno u supstance koje su bezbedne za ljudski organizam [57]. On je visokotoksičan za medonosne pčele. Za pčele oralna LD_{50} je od 3,7-102 ng po pčeli, a kontaktna LD_{50} je 24 ng po pčeli. Klotianidin ima nisku toksičnost za sisare.

U svetu, a i kod nas, sve je veća upotreba preparata *Poncho*, koji kao aktivnu materiju sadrži klotianidin. Najčešće se koristi za tretiranje semena kukuruza, uljane repice i suncokreta (tabela 2.10). Namenjen je za suzbijanje zemljišnih štetočina i štetočina u prvim fazama vegetacije. Nanesen na seme stvara zaštitni „film“ oko njega, delujući kontaktno na podzemne štetne insekte, a istovremeno, ulazeći u sprovodni sistem novonastale biljke – klijanca, štiti je od nadzemnih štetočina. Kod kukuruza, koristi se za suzbijanje larvi kukuruzne zlatice i za suzbijanje lisne vaši. U zemljištu ostaje veoma dugo, vreme poluraspadanja mu je 830 dana i prilično je mobilan, pa se može pojaviti u podzemnim ili površinskim vodama [63].

Klotianidin i tiametoksam dele zajednički katabolički put, jer se smatra da se tiametoksam konvertuje u klotianidin u biljkama i životinjama [64].

Tabela 2.9. Fizičko-hemijske karakteristike klotianidina

Naziv po IUPAC-u	<i>(E)</i> -1-(2-hlor-1,3-tiazol-5-ilmetil)-3-metil-2-nitrogvanidin	
Molekulska formula	C ₆ H ₈ ClN ₅ O ₂ S	
Molekulska masa	249,68 g mol ⁻¹	
Izgled	bezbojni kristali bez mirisa	
Gustina	1,61 g mL ⁻¹ na 20 °C	
Tačka topljenja	179 °C	
Perzistentnost	6 meseci na 40 °C	
	1 godinu na 25 °C	
Rastvorljivost na 25 °C	voda	0,327 g L ⁻¹
	aceton	15,22 g L ⁻¹
	metanol	6,62 g L ⁻¹
	dihlormetan	1,32 g L ⁻¹
Koeficijent raspodele oktanol-voda (K_{ow})	7,94	

Tabela 2.10. Sredstva za zaštitu bilja u RS u prometu 2013. godine sa klotianidinom kao aktivnom supstancom

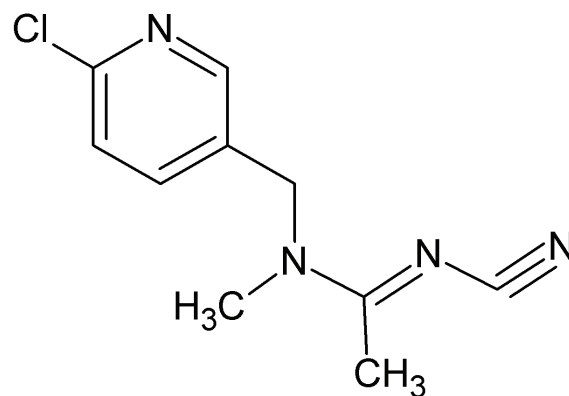
PREPARAT	PROIZVOĐAČ	BILJNA VRSTA	ŠTETOČINA
Poncho 600	<i>Bayer</i>	kukuruz	larve kukuruzove zlatice
		suncokret	žičnjaci
šććerna repa		repin buvać	
		crna repina vaš	
Modesto (klotianidin+beta ciflutrin)		uljana repica	repićina osa
Apache		<i>Sumitomo</i>	kruška

2.2.6 Acetamiprid

Acetamiprid je insekticid sa sistemичnim delovanjem koji se primenjuje zalivanjem, pa ga biljka usvaja korenovim sistemom iz zemljišta, ili folijalno, odnosno preko lišća. Koristi se za kontrolu štetočina na različitim usevima (tabela 2.12). Relativno je stabilan pri hidrolizi i fotodegradaciji na sunčevoj svetlosti. Rastvorljiv je u vodi, umereno se vezuje za organske materije u zemljištu, ali se brzo raspada (1-8 dana) [65, 66].

Prvi put je registrovan 1995. godine u Japanu, gde se do danas najintenzivnije primenjuje. Na tržište ga je uvela firma *Nippon Soda Co.* (Japan) 1995. godine [57].

Acetamiprid izaziva štetne posledice za pčele u visokim koncentracijama od nekoliko mg po pčeli. Letalna doza za acetamiprid je 7,1 mg po pčeli (24 sata nakon primene insekticida), što znači da je letalna doza acetamiprida oko 400 puta veća nego za imidaklopid. Glavni degradacioni proizvodi acetamiprida u biljkama (*N*-dimetilacetamiprid, 6-hloropiridilmetil-alkohol i 6-hlornikotinska kiselina) su veoma otrovni za pčele [59]. Acetamiprid ima nisku toksičnost za sisare. Toksičnost acetamiprida za vodene organizme je niska, ali je otrovan za ptice. EPA ga svrstava u E grupu kancerogena, tj. u supstance koje nisu kancerogene za ljudski organizam. Strukturna formula acetamiprida je prikazana na slici 2.8, a neke fizičko-hemijske osobine date su u tabeli 2.11.



Slika 2.8. Strukturna formula acetamiprida

Tabela 2.11. Fizičko-hemijske osobine acetamiprida

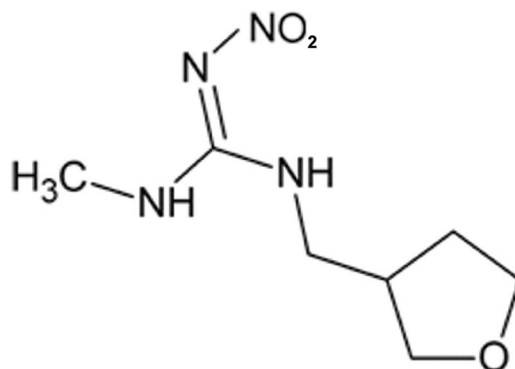
Naziv po IUPAC-u	<i>N</i> ¹ -((6-hlor-3-piridil)metil)- <i>N</i> ² -cijano- <i>N</i> ¹ -metil-acetamidin	
Molekulska formula	C ₁₀ H ₁₁ ClN ₄	
Molekulska masa	222,68 g mol ⁻¹	
Izgled	čvrst beli prah	
Gustina	1,33 g mL ⁻¹	
Tačka topljenja	98,9 °C	
Napon pare	1 · 10 ⁻⁶ Pa na 25 °C	
Rastvorljivost na 25 °C	voda	4,25 g L ⁻¹
	heksan	6,54 mg L ⁻¹
	ksilen	40,1 g L ⁻¹
	benzen	24,4 g L ⁻¹
	dihlorometan	>200 g L ⁻¹
	hlороform	>200 g L ⁻¹
	metanol	>200 g L ⁻¹
	etanol	>200 g L ⁻¹
	aceton	>200 g L ⁻¹
	acetonitril	>200 g L ⁻¹
	tetrahidrofuran	>200 g L ⁻¹
etilacetat	37,8 g L ⁻¹	
Koeficijent raspodele oktanol-voda (<i>K</i> _{ow})	6,27	

Tabela 2.12. Sredstva za zaštitu bilja u RS u prometu 2013. godine sa acetamipridom kao aktivnom supstancom

PREPARAT	PROIZVOĐAČ	BILJNA VRSTA	ŠTETOČINA
Tonus	<i>Galenika</i>	kruška	kruškine buve
		jabuka	lisne vaši
		breskva	
		nektarina	
		šljiva	
		kupus	
		duvan	
		paprika	
		krompir	krompirova zlatica
		grašak	graškov žižak
Evespilan	<i>CNCCJC</i>	duvan	lisne vaši
		krompir	krompirova zlatica
Mospilan 20	<i>Nippon Soda</i>	duvan	tripsi
			lisne vaši
		krompir	krompirova zlatica
		paradajz	leptirasta bela vaš
		kupus	lisne vaši
		jabuka	mineri
			jabukin smotavac
vinova loza	žuti i pepeljasti grozdov moljac		
Afinex	<i>Sinochem</i>	krompir	krompirova zlatica
		jabuka	lisne vaši
Volley 20	<i>Willowood</i>	paradajz	leptirasta bela vaš
			lisne vaši
Kestrel	<i>Makhteshim Chemical</i>	jabuka	mineri
			jabukin smotavac
		višnja	trešnjina muva
Gilan 20	<i>Luxemburg</i>	jabuka	lisne vaši
Wizzzaard	<i>Stockton</i>	jabuka	lisne vaši
			jabukin smotavac

2.2.7 Dinotefuran

Dinotefuran (slika 2.9) je insekticid sistemičnog delovanja iz grupe neonikotinoida, koji se koristi za kontrolu širokog spektra štetočina, kao što su lisne vaši, mravi, bubašvabe, buve, muve, zrikavci i druge štetočine [67]. Može se primeniti na lišće, zemljište, kutije rasadnika i pirinčanu vodu prskanjem, kvašenjem, emitovanjem i bockanjem u rupa-tretmanima [68].



Slika 2.9. Strukturna formula dinotefurana

Dinotefuran je pod patentom u mnogim zemljama, uključujući SAD, Australiju, Kinu, Švajcarsku, EU, Indoneziju i Japan. Dobro se rastvara u vodi, a rastvara se i u organskim rastvaračima kao što su: dihlormetan, aceton, metanol i etilacetat. Stabilan je u vodenim sistemima na svim pH vrednostima [67]. U tabeli 2.13 prikazane su neke fizičko-hemijske osobine dinotefurana [68].

Tabela 2.13. Fizičko - hemijske osobine dinotefurana

IUPAC-ov naziv	1-metil-2-nitro-3-[(tetrahidro-3-furanil) metil] guanidin	
Molekulska formula	$C_7H_{14}N_4O_3$	
Molekulska masa	202,21 g mol ⁻¹	
Izgled	čvrst beli prah	
Gustina	1,33 g mL ⁻¹ na 20 °C	
Tačka topljenja	107,5 °C	
Temperatura raspadanja	208 °C	
Napon pare	< 1,7·10 ⁻⁶ Pa na 30 °C	
Rastvorljivost na 25 °C	voda:	39,8 g L ⁻¹
	heksan:	9,0·10 ⁻⁶ g L ⁻¹
	heptan:	10,5·10 ⁻⁶ g L ⁻¹
	ksilen:	0,072 g L ⁻¹
	toluen:	0,148 g L ⁻¹
	dihlormetan:	60,9 g L ⁻¹
	acetone:	57,8 g L ⁻¹
	metanol:	57,2 g L ⁻¹
	etanol:	19,4 g L ⁻¹
	etilacetat:	5,17 g L ⁻¹
Koeficijent raspodele oktanol-voda (K_{ow})	0,28	

2.3 Uloga i značaj pčela

Organizacija za hranu i poljoprivredu Ujedinjenih nacija (eng. *Food and Agriculture Organization* – FAO) procenila je da od useva koji obezbeđuju 90% hrane na svetu 70% oprašuju pčele. Većina useva u Evropi zavisi od oprašivanja insekata, te se, stoga, i finansijska dobrobit od oprašivanja useva insektima procenjuje na više hiljada milijardi evra. Imajući u vidu ekonomski i ekološki značaj pčela, razvila se i potreba za praćenjem i održavanjem zdravlja pčelinjih kolonija, ne samo na lokalnom, već i na globalnom nivou. Poslednjih 10 do 15 godina pčelari su počeli da prijavljuju masovna uginuća pčela i pčelinjih kolonija, naročito u zemljama Evrope, uključujući Francusku, Belgiju, Švajcarsku, Nemačku, Veliku Britaniju, Holandiju, Italiju, Austriju, Sloveniju i Španiju [69]. U Severnoj Americi, gubici pčelinjih kolonija su primećeni od 2005. godine. Američki stručnjaci su ovaj fenomen nazvali CCD sindrom (eng. *Colony Collapse Disorder*). Pored mnogih različitih faktora koji mogu da doprinesu nastanku ovog fenomena, poput intenzivne poljoprivrede, upotrebe pesticida, gladovanja, virusa i klimatskih promena, trovanje pčela pesticidima korišćenim na poljoprivrednim usevima, smatra se jednim od glavnih faktora odgovornim za stradanje 60% pčela u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) pre nekoliko godina [70].

U maju 2012. godine, kao deo strategije za otkrivanje uzroka smanjenja broja pčelinjih kolonija, Evropska komisija je odvojila 3,3 miliona evra. Studije ispitivanja su sprovedene u 17 država članica Evropske unije i finalni izveštaj, pod nazivom “Stopa smrtnosti pčela i praćenje pčela u Evropi” [71], pokazao je da je sistem praćenja u EU slab, kao i da nema dovoljno podataka kako bi se rezultati na državnim nivoima mogli uporediti.

Sredinom 2013. godine EU je na osnovu izveštaja Agencije za bezbednost hrane EU (eng. *European Food Safety Authority* - EFSA) zabranila upotrebu tri pesticida iz grupe neonikotinoida (klotianidin, imidakloprid i tiametoksam) u naredne dve godine zbog sumnje da su štetni po pčele [72-74]. Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede RS je, takođe, prihvatilo odluku o zabrani. Istraživanja o pesticidima iz grupe neonikotinoida kojima je EU ograničila upotrebu ponudila su raznovrsne dokaze, od kojih mnogi ukazuju na štetan efekat na zajednice pčela. Pravila EU su da se supstanca za koju postoje dokazi u prilog njene škodljivosti, makar i ne bili potpuno pouzdani, suspenduje ili da joj se ograniči upotreba, dok se ne prikupi dovoljno dokaza za donošenje trajne odluke. Za privremenu zabranu imidakloprida, klotianidina i tiametoksama glasalo je 15 članica EU, 8 je bilo protiv, a 4 su ostale uzdržane. Trajne zabrane još nema, što međunarodne ekološke organizacije poput *Greenpeace* kritikuju, smatrajući da bi samo takav potez istinski pomogao u obnavljanju populacije pčela, posebno, ukoliko se zna da neonikotinoid imidakloprid spada u prvih sedam od ukupno petnaest uzročnika smrti pčela.

Medonosna pčela je jedan od najpoznatijih insekata i ima značajnu ulogu u prirodi. Pripada familiji *Apidae* reda *Hymenoptera*, koju karakteriše mali broj vrsta. Najpoznatija od 25 vrsta je *Apis mellifera Carnica*. Ovu podvrstu karakteriše smirenost i velika produkcija meda.

Jednom prilikom Ajnštajn je rekao: "Ako pčela nestane sa površine Zemlje, čoveku ostaje još četiri godine života. Ako nema pčela, nema oprašivanja, nema više biljaka, nema više životinja, nema više ljudi" [75]. Ovom rečenicom Ajnštajn je naglasio značaj pčela za život ljudi. Neke od uloga pčela uključuju oprašivanje velikog broja biljaka, stvaranje velikog spektra pčelinjih proizvoda, kao i funkciju bioindikatora. U potrazi za hranom pčele skupljaju nektar i polen, pri tom oprašujući značajan broj različitih biljaka, zbog čega se mogu smatrati značajnim faktorom u reproduktivnosti, raznošenju semena i ukrštanju biljaka. Pored meda, pčele su zaslužne za postojanje i drugih proizvoda od značaja za čoveka, poput polena, voska, propolisa i matičnog mleča. Prema podacima Republičkog zavoda za statistiku iz 2011. godine, u RS godišnje se proizvede 4283 t meda u 306000 košnica (u Autonomnoj Pokrajini Vojvodini 59000 košnica) [76]. Međutim, vrednost proizvodnje meda je zanemarljiva u odnosu na vrednost kojoj pčele doprinose pri oprašivanju biljaka. Ukupna ekonomska vrednost od oprašivanja je najmanje 10 do 20 puta veća u odnosu na proizvodnju meda.

Pčele imaju i ulogu bioindikatora. S obzirom na njihovu osetljivost na promene koje se događaju u životnoj sredini, njihov izostanak u istoj najčešće predstavlja i dokaz zagađenja životne sredine [77].

Pitanje gubitka pčelinjih kolonija je i dalje otvoreno. CCD sindrom prvi put je opisan od strane pčelara kao novi fenomen vezan za gubitak pčelinjih kolonija 2006. godine. Jedna od odlika ovog sindroma jeste smanjenje pčelinjih kolonija, što je naročito izraženo tokom zime. Smatra se da dolazi do smrti odraslih pčela radilica, koje postaju dezorijentisane i ne vraćaju se u košnice. Između 2006. i 2011. godine, uobičajan gubitak kolonija od 15% tokom zimskih meseci se udvostručio. Mnoga istraživanja u SAD i EU su sprovedena kako bi se otkrio uzrok nastanka ovog fenomena. Teorije oko uzroka nastanka ovog sindroma uključuju nove patogene, parazite, stres usled organizacija samih kolonija, klimatske promene, nedostatak izvora hrane, bolesti, trovanja, lokalna zagađenja okoline i korišćenje insekticida u poljoprivredi.

Na osnovu istraživanja koje je sprovedla EFSA, EU je odredila dvogodišnju zabranu korišćenja određenih pesticida [72-74], jer se njihova upotreba dovodi u vezu sa nastankom CCD sindroma. Nasuprot tome, EPA je došla do zaključka da su uzroci pojave CCD sindroma pojava parazita, slaba prehrana, pojava bolesti i iscrpljene pčele radilice [78]. EPA je, takođe, pooštrila kriterijume pri označavanju toksičnosti pesticida na ambalaži.

Pitanje pravog uzročnika CCD sindroma i upotreba pesticida neonikotinoida, kao mogućeg uzročnika nastanka ovog fenomena ostaje otvoreno do nekih novih saznanja u vezi sa izloženosti pčela ovim pesticidima. Različita istraživanja u SAD i EU su pokazala da određene količine neonikotinoida, kada se koriste sami ili u kombinaciji sa drugim pesticidima, nekim fungicidima [59], uzrokuju dezorijentisanost, smanjenu komunikaciju, smanjenu sposobnost pamćenja i smanjenje životnog veka pčela [79]. Jedno od otvorenih pitanja jeste i pravilna upotreba neonikotinoida, naročito u tretiranju korova ili ukrasnih biljaka u toku cvetanja kada se oni ne bi smeli koristiti [80].

Pored mogućeg uticaja neonikotinoida na CCD sindrom, pesticidi mogu da otruju veliki broj pčela usled slučajnih incidenata tokom postupaka zaštite bilja ili upotrebe pesticida koji su toksični za pčele. Tipični znaci trovanja pesticidima su pčele na samrti ili uginule pčele ispred košnica.

2.4 Ispitivani uzorci

U ovoj disertaciji ispitivani su uzorci meda, likera od meda-medice i dunavska voda. Najpoznatiji i najviše korišćeni primarni pčelinji proizvod je **med**. Pored njega, primarne pčelinje proizvode predstavljaju i vosak, polen, propolis, matični mleč i drugi. Većina ovih proizvoda se konzumira ili koristi u neobrađenom obliku. Med je slatka, aromatična, gusta materija, koju proizvode medonosne pčele iz cvetnog nektara, medne rose sa lišća četinara i listopadnog drveća ili od slatkog soka plodova nekih biljaka [81].

Medonosne pčele proizvode prirodni pčelinji med pretežno iz cvetnog nektara. Nektar je slatka tečnost koju izlučuju nektarije, posebne žlezde smeštene u cvetu. Pčele otkrivaju nektar jezikom, uvlače ga u usta, pa u medni želudac. One nektar donose u košnicu i predaju ga drugim pčelama, koje ga prerađuju i odlažu u ćelije saća. U toku narednih nekoliko dana nektar se oslobađa viška vode, a saharoza se, pod uticajem enzima invertaze, razlaže na proste šećere glukozu i fruktozu. Konačno, prerađen nektar pčele pokrivaju belim voštanim poklopcima ćelija saća u kojima se on skladišti [82, 83].

Medonosna pčela je ekonomski važan insekt za proizvodnju polena, meda, matičnog mleča, voska i propolisa i može da opraiši veliki broj useva. Proučavanje uticaja pesticida na medonosne pčele je od velikog značaja [84], s obzirom na to da pčele mogu da intoksiciraju celu koloniju, donoseći u košnicu kontaminirani polen i nektar. Takvi uticaji mogu da remete njihove sposobnosti, kao što su pamćenje, orijentacija i prikupljanje hrane. U takvim uslovima, pčela ne može da se vrati u koloniju koja je potrebna za njen opstanak, pa može da umre u roku od nekoliko sati. Neke od najvažnijih osobina meda opisane su u daljem tekstu [81-90]:

Higroskopnost – visoka koncentracija šećera uslovljava da je med izuzetno higroskopan. On upija vlagu iz vazduha pod određenim uslovima i postaje razblažen i podložniji fermentaciji. Promena sadržaja vode u medu koji je izložen vazduhu zavisi od temperature i relativne vlažnosti vazduha. Visok viskozitet meda uslovljava da se vlaga adsorbovana na njegovoj površini sporo prenosi u masu proizvoda, tako da na površini meda može doći do relativno brzog razvodnjavanja.

Kristalizacija – je prirodni proces promene agregatnog stanja meda, kada on prelazi iz tečnog stanja u kristalnu masu. Do kristalizacije dolazi jer je med prezasićen rastvor glukoze, pa spontano očvršćava kristalizacijom suviše glukoze. Med brže prelazi u čvrsto stanje ukoliko je sadržaj vode manji, a količina glukoze veća.

Boja meda – se kreće u kontinuiranom rasponu od bleđožute do tamnocrvene, pa čak i do skoro crne. Zelenkasti odlivci su prilično česti. Med poprima svetliju boju u čvrstom stanju u odnosu kada je tečan. Veličina kristala utiče na intenzitet boje meda, odnosno najfiniji kristali meda daju mu najsvetliju nijansu [85, 86].

Miris i ukus – zavise od porekla i sastava meda. Intenzitet mirisa zavisi od vrste i količine isparljivih materija iz cvetnog nektara. Najsladji je med u kome od šećera preovladava fruktoza.

Antibakterijska aktivnost – uslovljena je prisustvom vodonik-peroksida nastalog delovanjem enzima koji pčele dodaju putem nektara. Neki cvetni izvori daju dodatne komponente, kao što su flavonoidi i aromatične kiseline, što delimično objašnjava postojanje velikih razlika u antibakterijskoj aktivnosti meda. Međutim, razlike se uglavnom mogu pripisati razlikama u količini H_2O_2 u medu, jer nektar iz različitih cvetnih izvora sadrži komponente koje razlažu vodonik-peroksid i destabilizuju enzim koji ga proizvodi. Zagrevanje meda iznad $37\text{ }^\circ\text{C}$ treba izbegavati, jer vodi denaturaciji enzima koji katalizuje proizvodnju vodonik-peroksida, što se negativno odražava u primeni meda u svrhe lečenja pacijenata.

Anti-inflamatorno delovanje – histološke studije izvedene na eksperimentalnim životinjama pokazale su da med poseduje antiinflamatorno dejstvo, čak i kada infekcija nije prisutna. Navedeni učinak se sagledava kroz smanjenje broja inflamatornih ćelija, što potvrđuje klinička zapažanja o smanjenju edema i umirujući efekat kada se med primenjuje na rane. Antiinflamatorno dejstvo meda povezuje se sa sadržajem antioksidanata u medu.

Podsticanje rasta tkiva – pored velike količine šećera, med sadrži širok spektar aminokiselina, vitamina i elemenata u tragovima. Studije na životinjama i ljudima pokazale su da primena hranljivih materija dovodi do povećanog rasta granulacionog tkiva. Pored toga, med, nanesen na ranu, povlači tečnost iz rane, pa odliv limfe sa rastvorenim hranljivim materijama obezbeđuje regeneraciju tkiva.

Klinička iskustva – med se koristi u lečenju različitih vrsta rana, uključujući i hirurške rane, ali je najznačajniji u lečenju rana od opekotina [87]. Istraživanja su pokazala da je med efikasniji od ostalih proizvoda u oporavku od opekotina, jer omogućava ublažavanje akutnog zapaljenja i brže zarastanja rana, bolju kontrolu infekcije, bolje ublažavanja bola i manju iritacija rana [88, 89].

Sastav meda – med je najvećim delom smeša ugljenih hidrata i vode. U manjim količinama sadrži organske kiseline, minerale, vitamine, enzime, antioksidanse i druge materije.

Šećeri – u medu su zastupljeni u proseku od 75% do 80% i čine smesu glukoze i fruktoze kao monosaharida i drugih složenih šećera (disaharida i oligosaharida). Glukoza ima sposobnost da lako kristalizuje i nije higroskopna, dok je fruktoza monosaharid koji ne kristalizuje, veoma je higroskopna i u medu zastupljenija od glukoze. Saharoza i maltoza su najzastupljeniji složeni šećeri u medu.

Voda – u medu varira u opsegu od 15% do 23%, što zavisi od izloženosti meda vazduhu, klimatskih uslova, relativne vlažnosti vazduha, temperature u košnici, kao i biljnog porekla nektara.

Minerali – kreću se od 0,1% do 0,2%. Preovladavaju kalijum, natrijum, kalcijum, fosfor, hlor, mangan, gvožđe i aluminijum. Ispitivanjem različitih vrsta meda nigerijskog porekla otkriveno je dvanaest elemenata (K, Ca, Ti, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Se, Br i Rb), pri čemu su najzastupljeniji elementi kalijum ($1100\text{-}2700\text{ mg kg}^{-1}$), kalcijum ($152\text{-}362\text{ mg kg}^{-1}$) i gvožđe ($136\text{-}407\text{ mg kg}^{-1}$) [90].

Enzimi – Najznačajniji je enzim invertaza, koja razlaže saharozu na glukozu i fruktozu. Enzimi meda aktiviraju probavne procese u organizmu, stimulišu aktivnost želuca i creva i olakšavaju unos hranljivih materija.

Vitamini – med sadrži tiamin (B1), riboflavin (B2), nikotinamid (B3), pantotensku kiselinu (B5), piridoksin (B6), tokoferole (E), naftohinon (K), askorbinsku kiselinu (C) i karoten (A), ali u veoma malim količinama.

Organske kiseline – najzastupljenije u medu su limunska, vinska, mlečna, mravlja, oksalna, ćilibarna, jabučna, ali i druge kiseline, koje medu daju kiselost sa pH vrednostima od 3,2 do 6,5. Sadržaj ovih kiselina se kreće od 1% do 4% [82].

U medu se mogu, takođe, naći i ostaci pesticida [91], teških metala (npr. Pb, Cd i Cr) [92], nitrobenzena i petroleuma [93], antibiotika (sulfonamida) [94] i drugih štetnih materija.

Medica- sagledavajući široku paletu proizvoda od meda, na domaćem tržištu jedan od zanimljivijih je tradicionalni proizvod tipa likera, medica, posebno sa stanovišta načina na koji se proizvodi i koji, ukoliko postoji kontaminacija meda neonikotinoidima, stvara prostor za kontaminaciju i same medice. Naime, medica se proizvodi mešanjem određene količine meda (5-30%) sa rakijom određenog voćnog sadržaja (kajsija, sljiva, grožđe, itd.), nakon čega se blago zagreva radi boljeg mešanja i ostavlja da stoji određeni period pre konzumiranja. Ona je slična ostalim alkoholnim pićima na bazi meda poput *Drambuie*-a iz Škotske, nastalog mešanjem viskija i meda i *Barenfag*-a iz Nemačke, koji predstavlja medeni liker na bazi votke. Medica se razlikuje od drugih alkoholnih pića na bazi meda, jer ne fermentiše tokom procesa dobijanja (medovina), niti se destiliše nakon fermentacije (medovača). Povoljno deluje na cirkulaciju, protiv bakterija i virusa, poboljšava apetit i varenje. Idealna je za aperitiv i konzumira se rashlađena [95, 96]. S obzrom na način dobijanja medice, neophodno je, pored kvaliteta meda, pratiti i zdravstvenu bezbednost, fokusiranu na određivanje ostataka pesticida u medu, odnosno i proveravati zdravstvenu bezbednost finalnog proizvoda, medice.

Dunavska voda je odabrana kao matriks za ispitivanje mogućnosti uklanjanja neonikotinoida iz vodene sredine. Dunav je druga po dužini reka u Evropi posle Volge. Izvire u Švarcvald u i na putu od oko 2850 km do ulivanja u Crno more kroz deltu Dunava u Rumuniji i Ukrajini protiče kroz desetak zemalja. Za Dunav, glavni zagađivači su hemijska, prehrambena i industrija celuloze i papira. Ispuštanja otpadnog ili drugog materijala iz tih industrija podižu nivo neorganskih (Al, As, B, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Li, Mn, Mo, Ni, Pb, Se, Sr, V, Zn, TiO₂, Fe₂O₃, MnO i CaCO₃) [97, 98] i organskih zagađujućih materija poput policikličnih aromatičnih ugljovodonika, polihlorovanih bifenila [99] i steroida [100] u rečnoj mreži. Količina nutritijenata, poreklom od đubriva, iz domaćinstava i kanalizacionih sistema, koji svakodnevno ispuštaju vodu u Dunav i dalje je previsoka. Osim direktnog uticaja na količinu raspoloživog vodenog resursa i potrošnje u svrhu navodnjavanja, poljoprivredna delatnost znatno utiče i na kvalitet površinskih i podzemnih voda, imajući u vidu dejstvo đubriva i pesticida [101] koji su rastvoreni u njima. Iz tog razloga odabrano je da se sadržaj odabranih neonikotinoida ispita u model uzorcima vode Dunava zajedno sa odabranim mogućnostima njihovog uklanjanja.

2.5 Metode pripreme uzoraka

Priprema uzoraka za analizu ključni je korak u utvrđivanju identiteta i određivanju koncentracije nepoznatog uzorka. Analit i interferirajuća supstanca se mogu razdvojiti, ukoliko među njima postoji najmanje jedna hemijska ili fizička razlika. Najvažnija tehnika izdvajanja koja se zasniva na selektivnoj podeli analita i interferirajuće supstance između dve faze koje se ne mešaju naziva se ekstrakcija [102, 103]. Med i proizvodi na bazi meda spadaju u složene matrikse zbog svog sastava, pa je pogodna ekstrakcija odabranih neonikotinoida iz ovakvog matriksa najvažniji korak u određivanju neonikotinoida [104-106].

Postoji više tipova ekstrakcija kao što su: tečno-tečna, tečno-čvrsta, čvrsto-tečna i gasno-čvrsta ekstrakcija [107].

Izbor rastvarača u procesu ekstrakcije je veoma bitan i potrebno je da ispunjava sledeće kriterijume: mora da ima nisku tačku ključanja, kako bi se lako odstranio iz ekstrakta i tako sprečili značajni gubici isparljivih komponenata uzorka ili maskiranje komponenata tokom daljeg ispitivanja. Takođe, rastvarač mora biti što selektivniji prema analitu. Neki od najčešće korišćenih rastvarača su: dihlormetan, pentan, dietil-etar, heksan, etanol, aceton i slični. Osim pomenutih, sve više se koristi i nova klasa rastvarača, kao što su superkritični fluidi (ugljen-dioksid i azot). Ponekad je materijal iz koga se vrši ekstrakcija potrebno prethodno pripremiti homogenizacijom, mlevenjem, degazacijom, inaktivacijom enzima, itd. [103, 108].

Nedostaci metoda ekstrakcije organskim rastvaračima su sledeći: pri uklanjanju rastvarača može doći do gubitaka komponenti; toksičnost ili zapaljivost rastvarača i mogućnost kontaminacije analita; formiranje emulzija; prekrivanje pikova rano eluirajućih komponenata pikom rastvarača pri hromatografskoj analizi [108, 109].

Jedan od načina redukcije sadržaja neželjenih komponenata u ekstraktu (kao što su masti, konzervansi) je pažljivo koncentrovanje ekstrakta, zamrzavanje i filtriranje. U cilju sprečavanja stvaranja emulzije tokom ekstrakcije, koja utiče na otežano razdvajanje faza, umesto destilovane vode koristi se zasićen rastvor soli (natrijum-hlorid) za razblaživanje uzorka [110]. Za razbijanje emulzija, može se koristiti i centrifugiranje. Upotrebom kolonske ili disk ekstrakcije na čvrstoj fazi može se, takođe, sprečiti formiranje emulzija. Ove dve tehnike korisne su i za pre-koncentrovanje i prečišćavanje uzorka [111].

Dok se za ekstrakciju analita iz tečnih uzoraka, pored klasične ekstrakcije organskim rastvaračem, koriste i kolonske ili disk ekstrakcije na čvrstoj fazi, za ekstrakciju iz čvrstih uzoraka koriste se Soxhlet-ova ekstrakcija [112-114], ekstrakcija organskim rastvaračem potpomognuta mikrotalasima [115, 116], ekstrakcija superkritičnim fluidima [117, 118], kao i ekstrakcija korišćenjem jon-skih tečnosti [119]. Različite tehnike pripreme se koriste u ekstrakciji pesticida iz meda, uključujući klasičnu tečno-tečnu [120] i ekstrakciju na čvrstoj fazi [121], ekstrakciju superkritičnim tečnostima [122, 123], čvrsto-faznu mikroekstrakciju [124] i QuEChERS ekstrakciju [125]. U pripremi uzoraka meda su korišćenje različite tehnike poput modifikovane QuEChERS metode ekstrakcije [126, 127] i drugih tehnika koje obuhvataju ekstrakciju sa dihlormetanom [128] ili cikloheksanom [129]. Mali je broj istraživanja koja se bave ekstrakcijom neonikotinoida iz meda i vode [126, 128, 130].

2.5.1 Tečno-tečna ekstrakcija

Princip tečno-tečne ekstrakcije se bazira na razdvajanju komponenti zasnovane na različitoj rastvorljivosti komponenti u dve tečnosti koje se ne mešaju, najčešće vode i nekog organskog rastvarača. Po ovom principu dolazi do ekstrakcije analita iz jedne tečne faze u drugu. Razdvajanje supstanci iz smese počinje rastvaranjem supstance u pogodnom rastvaraču, nakon čega dolazi do izdvajanja onih komponenti smese koje su rastvorljive u odabranom rastvaraču od onih nerastvorljivih u istom [131, 132]. U analizi neonikotinoidea, tečno-tečna ekstrakcija se koristi za pripremu mnogih uzoraka poput mleka, povrća, meda itd. [133-135].

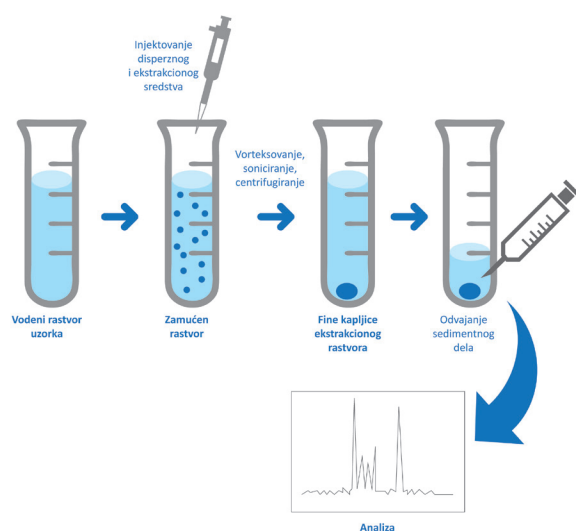
2.5.1.1 Disperzna tečno-tečna mikroekstrakcija

U poslednjoj deceniji razvila se nova tečno-tečna ekstrakcija [136] pod nazivom disperzna tečno-tečna mikroekstrakcija [137-139]. DLLME se zasniva na trokomponentnoj smeši rastvarača, a postupak podrazumeva brzo ubrizgavanje mešavine ekstrakcionog (najčešće sa vodom nemešivi organski rastvarač [140]) i disperznog sredstva (sa vodom mešljivi organski rastvarač poput metanola, acetona i acetonitrila) u vodeni rastvor ispitivanog uzorka, nakon čega se stvara zamućena smesa (mikrokapi). Zbog velike dodirne površine između nemešljivih rastvarača, stanje ravnoteže postiže se veoma brzo, a samim tim i ekstrakcija (slika 2.10). Ovo je ujedno i glavna prednost DLLME ekstrakcije. Nakon ekstrakcije i razdvajanja faza [141, 142], organski sloj se dalje odvaja i analizira. Prednosti DLLME su lako rukovanje, brzina ekstrakcije, niska cena, visok nivo koncentrovanja analita i dovoljna selektivnost. Faktori koji utiču na efikasnost DLLME ekstrakcije su [139, 143]:

- **Odabir odgovarajućeg ekstrakcionog sredstva** - organski rastvarači koji se odabiraju kao ekstrakciona sredstva moraju imati veću gustinu od vode i mogućnost ekstrakcije ciljanih analita. Halogeni ugljovodonici poput hlora-benzena, hlороформа, ugljen-tetrahlοirida i tetra-hlοroetilena, najčešće se koriste kao ekstrakciona sredstva zbog njihove velike gustine.
- **Odgovarajuće disperzno sredstvo** - rastvorljivost disperznog sredstva u ekstrakcionom sredstvu i vodenom rastvoru uzorka je ono što ga čini pogodnim izvorom. Aceton, metanol i acetonitril su najčešće korišćena disperzna sredstva.
- **Zapremina ekstrakcionog sredstva** - povećanjem zapremine ekstrakcionog sredstva povećava se i zapremina sedimentacionog ostatka koji nastaje nakon centrifugiranja radi odvajanja faza. Sa porastom sedimentacione zapremine smanjuje se mogućnost koncentrovanja analita. Stoga, optimalna zapremina ekstrakcionog sredstva treba da obezbedi mogućnost koncentrovanja analita i u isto vreme dovoljnu zapreminu sedimentacionog ostatka za dalju analizu. Takođe, manja zapremina ekstrakcionog sredstva može dovesti do nepotpune ekstrakcije, zbog nepovoljnog položaja ravnoteže i zbog zasićenja rastvora.
- **Zapremina disperznog sredstva** - ova zapremina direktno deluje na formiranje zamućenog rastvora (voda/disperzno sredstvo/ekstrakcioni sredstvo), na disperziju ekstrakcionog sredstva u vodenu fazu i na efikasnost same ekstrakcije. Variranjem zapremine disperznog sredstva menja se i zapremina sedimentacionog ostatka, pa je, stoga, neophodno istovremeno menjati zapreminu ekstrakcionog sredstva, kako bi se obezbedila konstantna zapremina sedimentacionog dela.

Nedostaci DLLME se ogledaju u nepostojanju dovoljnog broja ekstrakcionih sredstava koja zadovoljavaju gorenavedene uslove. Upotreba disperznog sredstva može da komplikuje proces razdvajanja faza, pa se, samim tim, centrifugiranje smatra obaveznim delom ove ekstrakcije. Takođe, centrifugiranje velikih zapremina može biti teško. Rukovodeći se potrebom da se nedostaci prevaziđu, istraživači modifikuju prvobitni princip DLLME, uključujući ekstrakciona sredstva koja su lakša od vode kao na primer jonske tečnosti [144], kao i izostavljanje disperznih sredstava, odnosno potrebe za centrifugiranjem [145, 146].

Od svog nastanka DLLME se koristi u analizi mnogih jedinjenja poput fenola [147], trihalometana [148], karbamata [149, 150], organohlorinih [104] i organofosforinih pesticida [151, 152], neonikotinoida [153-156] i antibiotika [157]. Postoji relativno mali broj literaturnih podataka o korišćenju DLLME za pripremu uzoraka meda [104, 123, 140, 151, 158].



Slika 2.10. Shematski prikaz DLLME

2.5.2 Ekstrakcija na čvrstoj fazi

Primena ekstrakcije na čvrstoj fazi (eng. *solid phase extraction* - SPE) je višestruka. Koristi se u analizi hrane, vode, zemljišta i vazduha [159]. Uzorci pripremljeni SPE dalje se mogu analizirati hromatografskim i mnogim drugim tehnikama. U ovoj ekstrakciji uzorak prolazi kroz kolonu koja sadrži čvrstu supstancu koja ima sposobnost da adsorbuje analit [160]. Za tačne uzorke čvrsti nosač adsorbensa se nalazi ili u koloni ili na disku. Izbor adsorbensa je određen vrstom analita i matriksa. Kod ove vrste ekstrakcija koristi se manja zapremina uzorka i rastvarača (potrebne samo za eluiranje), manji su i gubici jer je analit sve vreme fiksiran na čvrstoj fazi u koloni, lakše je izvođenje paralelne i automatske ekstrakcije, što sve zajedno i čini prednost ove vrste ekstrakcije nad tečno-tečnom ekstrakcijom. Adsorbens je smešten u polietilensku cev sa polietilenskim ili čeličnim krajevima, tako da čitava kolona podseća na špric u čijem se donjem delu nalazi određena količina adsorbensa. Postoje kolone različitih zapremina i kapaciteta, koji se mogu primenjivati u zavisnosti od količine uzorka koji se analizira. Veća količina adsorbenta omogućava veći kapacitet, definisan kao količina supstance koja može biti adsorbovana na koloni. Veća masa adsorbensa zahteva i veću zapreminu

rastvarača za eluiranje analita sa kolone. Maksimalni kapacitet za polarne i nepolarne adsorbense je oko 5% od mase sorbensa. Na primer, 5 mg supstance može se adsorbovati na 100 mg punjenja kolone. Međutim, u ukupnu masu supstance ulaze i komponente matriksa, što znači da je efektivni kapacitet za ispitivanu supstancu mnogo manji za datu kolonu. Minimalna zapremina za eluiranje treba da bude najmanje dva puta veća od zapremine punjenja kolone [161, 162].

Ekstrakcija na čvrstoj fazi skraćuje vreme trajanja analize, a poseduje i veliki potencijal za automatizaciju čitavog procesa ekstrakcije. SPE pruža veliki dijapazon adsorbenasa za polarne, nepolarne i jonske interakcije. Postoji više opštih mehanizma retencije koji se primenjuju u čvrsto-faznoj ekstrakciji: hidrofobni, polarni, jonoizmenjivački, ekskluzioni i afinitetni. Izbor mehanizma ekstrakcije prvenstveno je zasnovan na prisutnim funkcionalnim grupama u odnosu na analit i sastav matriksa. Vezivanje analita za adsorbens može biti slabim Van der Waalsovima silama, interakcijama jon-jon, dipol-dipol, jon-dipol i dipolarnim privlačenjem preko vodoničnih veza. Upotreba SPE omogućava osetljiviju detekciju analita u odnosu na ostale tipove ekstrakcije. Ekstrakcija na čvrstoj fazi se izvodi u četiri osnovna koraka [159, 163, 164]:

Kondicioniranje je proces pripreme kolone za ekstrakciju uzorka. Ovim procesom se aktivira sloj sorbensa u koloni propuštanjem određene zapremine rastvarača. Ukoliko je uzorak vodeni rastvor, onda se aktivacija vrši najpre organskim rastvaračem, na primer metanolom.

Nanošenje uzorka se vrši neposredno posle aktivacije kolone. Propuštanjem uzorka kroz kolonu dolazi do vezivanja analita za sloj adsorbensa, dok većina supstanci iz matriksa prolazi bez zadržavanja. Drugi način je vezivanje interferirajućih supstanci za sloj adsorbensa, dok i analit prolazi bez zadržavanja.

Ispiranje se vrši da bi se dodatno odstranile interferirajuće komponente matriksa, ostavljajući analit na adsorbensu.

Eluiranje se vrši specifičnim organskim rastvaračem da bi se desorbovao analit. Rastvarač raskida veze analit/sorbent i na taj način analit ostaje slobodan u organskom rastvaraču.

Za ispitivanje neonicotinoida u različitim uzorcima, poput povrća, meda i mleka, za pripremu uzoraka najčešće se koriste ekstrakcija na čvrstoj fazi [165-167] ili kombinacija ekstrakcije na čvrstoj fazi i tečno-tečne ekstrakcije [129, 165, 168, 169].

2.5.2.1 QuEChERS ekstrakcija

Anastassiades et al. [127] publikovali su veoma efikasan način upotrebe SPE sorbenata za uklanjanje koekstrahovanih supstanci iz matriksa - QuEChERS (akronim koji označava brzu-laku-jeftinu-efikasnu-robustnu-bezbednu metodu, eng. *Quick-Easy-Cheap-Effective-Rugged-Safe*). Nakon tečno-tečne ekstrakcije, različiti sorbenti se izmućkaju sa jednim delom sirovog ekstrakta. Ovaj postupak se naziva disperzivna ekstrakcija na čvrstoj fazi (eng. *dispersive solid phase extraction* - DSPE). Za određivanje sadržaja koekstrahovanih supstanci korišćena je gravimetrija, a gasna hromatografija sa masenom spektrometrijom (GC-MS) za određivanje supstanci u ekstraktu koje su zadržali

različiti sorbenti- grafitizirani ugljenični sorbent (GCB), primarnosekundarni amin (PSA), aminopropil (-NH₂) i alumina- N sorbenti. Gravimetrijska analiza je pokazala da PSA u većoj meri uklanja koekstrahovane supstance nego aminopropil i alumina-N, jer PSA ima znatno veći kapacitet zahvaljujući prisustvu primarnih i sekundarnih amino funkcionalnih grupa. PSA je slab anjonski izmenjivač, sposoban da ukloni masne kiseline, šećere, kao i druge koekstrahovane supstance, koje su sposobne da grade vodonične veze. Za uzorke sa visokim sadržajem karotenoida (spanać, zelena salata i dr.) DSPE se izvodi u kombinaciji sa PSA i GCB. Grafitizirani ugljenični sorbent zadržava pesticide planarne strukture, kao što su tiabendazol, ciprodinil i hlorotalonil, što dovodi do sniženja analitičkog prinosa. Prinos zavisi i od tipa matriksa i od količine dodatog GCB. QuEChERS multi-rezidualna metoda u kombinaciji sa C18 i PSA sorbentima je uspešno primenjena za određivanje mnogih ostataka pesticida u različitim matriksima. Mnoge laboratorije i danas modifikuju QuEChERS metodu u cilju prilagođavanja sopstvenim specifičnim potrebama. Među njima je i holandski inspektorat za zdravstvenu zaštitu u Amsterdamu, koji koristi QuEChERS za određivanje preko 400 pesticida u hrani [170]. QuEChERS ekstrakcija ima široku primenu u određivanju pesticida [171-173], između ostalih i neonikotinoida [174-177].

2.5.3 Ostale odabrane tehnike ekstrakcije neonikotinoida

Mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (eng. *solid phase microextraction* - SPME) je tehnika koja je našla primenu i u pripremi uzoraka meda za ispitivanje pesticida [124]. U ovoj tehnici, za prikupljanje isparljivih jedinjenja iz uzorka koristi se vlakno od kvarcnog stakla (1 ili 2 cm dužine) obloženo polimernim filmom. Vlakno je smešteno unutar igle. Postupak podrazumeva ubrizgavanje vlakna pomoću igle u prostor iznad čvrstog uzorka ili potapanje direktno u tečni uzorak koji je smešten u SPME bočici i zatvoren septumom. Nakon tačno određenog vremena, potrebnog da se ciljne komponente apsorbuju na vlakno, vlakno se izvlači i komponente se desorbuju direktno u GC-MS. SPME vlakno se rekondicionira zagrevanjem u injekcionom delu GC u trajanju od 5-15 min. Prednosti SPME tehnike: brza i laka za izvođenje, izvodi se bez upotrebe rastvarača, pogodna je za brzo poređenje uzoraka ili identifikaciju određene komponente u uzorku. Nedostaci ove tehnike su: profil sakupljenih isparljivih jedinjenja zavisi od tipa, debljine i dužine upotrebljenog vlakna, kao i od vremena uzorkovanja i temperature, pa je u slučaju kada se želi vršiti poređenje najbolje koristiti isto vlakno za sve uzorke koji se porede [118, 178].

Jedna od najnovijih metoda ekstrakcije je ekstrakcija superkričnim fluidima (eng. *super-critical fluid extraction* - SFE) [179]. Promenom pritiska tokom ekstrakcije, modifikuje se ekstrakciona moć superkričnog fluida (npr. ugljen-dioksid) i na taj način postiže željeni profil ekstrakta. SFE se primenjuje na čvrstim ili viskoznim matriksima. Selektivnost se može postići podešavanjem uslova ekstrakcije: pritiska (povećanjem pritiska povećava se gustina CO₂, a time i njegoa ekstrakciona moć), temperature (povećanjem temperature povećava se isparljivost najisparljivijih komponenata, ali i smanjuje gustina CO₂), kao i dodatkom modifikatora, kao što su metanol i etanol (poboljšava se ekstrakcija polarnih komponenata). Prednosti SFE su: upotreba netoksičnog rastvarača koji ne zaostaje u ekstraktu, veća selektivnost ekstrakcije, kraće vreme ekstrakcije, sprečene nega-

tivne degradacione reakcije termolabilnih komponenti i komponenti osetljivih na prisustvo kiseonika. Nedostatak ove tehnike je u tome što je potrebno odrediti optimalne uslove temperature, pritiska i protoka za svaki pojedinačni uzorak, što čini razvoj metode vremenski zahtevnim. Ova tehnika je našla svoju primenu i u pripremi uzoraka meda za određivanje pesticida [122, 123].

2.5.4 Nanomaterijali kao mogući adsorbensi

Nanotehnologija se može definisati kao nauka i inženjering uključeni u projektovanje, sintezu, karakterizaciju i primenu materijala i uređaja, čija najmanja funkcionalna organizacija u bar jednoj dimenziji je nanometarska skala. Reč nano potiče od grčke reči *nanos*, što znači patuljak. Radi se o vrlo malim veličinama. Raspon u nanosvetu beleži se na skali od 1 nm do 100 nm [180]. Materijali nanometarskih dimenzija mogu se naći u prirodi, atmosferi, proteinima, enzimima i DNK. Široke oblasti primene nanotehnologije obuhvataju osnovne fenomene i procese nanoskale, nanomaterijale, nanouređaje i sisteme, instrumentaciju, meteorologiju, standarde za nanotehnologiju, nanomanufakturu i društvene studije prednosti i rizika nanotehnologije [181, 182].

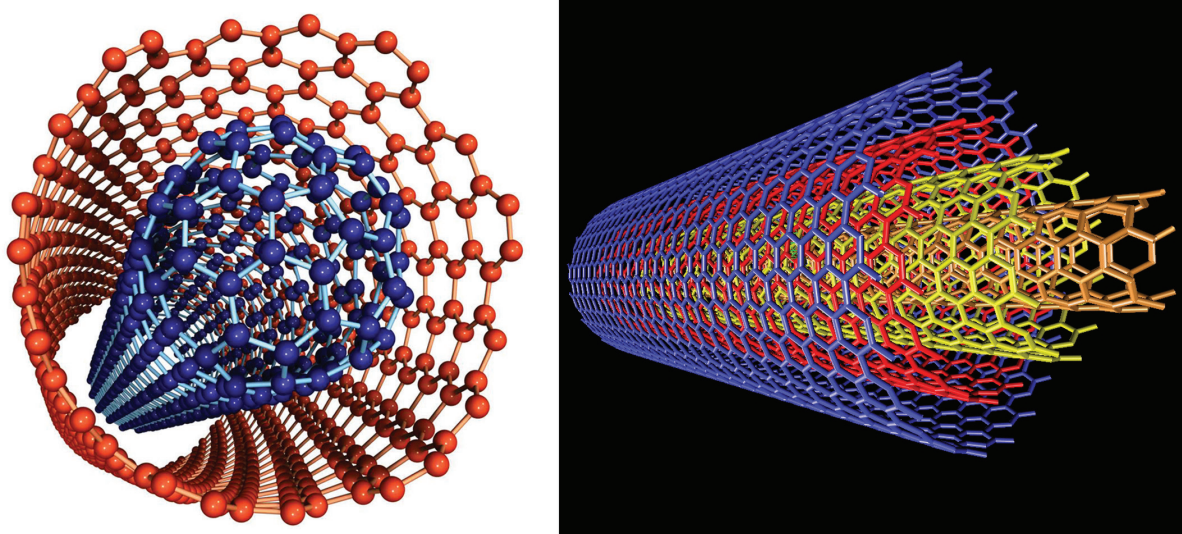
Cilj nanotehnologije jeste da se iskoriste osobine nanostrukture na atomskom i molekularnom nivou, kako bi se sa njima stvarali novi materijali i nove strukture koje bi se mogle koristiti u raznim oblastima nauke i tehnologije kao što su: medicina, hemija, fizika, biologija, mašinstvo i elektronika [183-185].

Materijali u nanoskali zadržavaju sve fizičko-hemijske karakteristike materijala na makro nivou. Prednosti nanomaterijala ogledaju se u boljoj otpornosti na hemikalije, poboljšanoj čvrstoći, boljoj biokompatibilnosti, boljoj otpornosti na smicanje i većoj hidrofobnosti [186].

Postoji više podela nanomaterijala, a neke od njih su prema poreklu (prirodni i antropogeni), hemijskom sastavu (organski i neorganski) i veličini (nulto-, jedno-, dvo- i trodimenzionalne). U jednodimenzionalne nanomaterijale spadaju: nanovlakna (eng. *nanofibers*), nanožice (eng. *nanowires*), nanotrake (eng. *nanobelts*), nanošipke (eng. *nanorods*) i nanocevi (eng. *nanotubes*).

Najpoznatija struktura nanocevi izgrađena je od atoma ugljenika. Ugljenične nanocevi (eng. *carbon nanotube* – CNT) su dugi, tanki cilindri ugljenika, koji se mogu posmatrati kao list grafita koji se naziva grafen (šestougona rešetka ugljenika) savijen u cilindar [187]. U zavisnosti od ose po kojoj je savijena mreža, razlikujemo dva tipa nanocevi: jednoslojne ugljenične nanocevi (eng. *single wall carbon nanotube* – SWCNT) i višezidne ugljeničke nanocevi (slika 2.11) [188-190].

SWCNT predstavljaju cilindrične strukture koje se sastoje od jednog uvijenog grafitnog lista čiji način uvijanja određuje i osnovne karakteristike te cevi. MWCNT predstavljaju cilindrične ugljeničke strukture koje se sastoje od više slojeva uvijenih grafitnih listova. Ove cevi imaju različite osobine, jer njihov prečnik i dužina nisu isti kao kod SWCNT [192-196].



Slika 2.11. Izgled višezidnih ugljeničnih nanocevi - MWCNT [191]

Imajući u vidu aktuelnost razvoja i primene nanomaterijala, s jedne strane, kao i značaj određivanja sadržaja neonikotionida s druge, došlo se na ideju da se ispita mogućnost primene MWCNT kao mogućeg adsorbensa pri uklanjanju odabranih neonikotinoidea iz matriksa vode koji je veštački kontaminiran odabranim neonikotinoidima.

2.6 Određivanje neonikotinoidea

Za određivanje neonikotinoidea, pored odgovarajuće tehnike za pripremu uzoraka, neophodno je odabrati i odgovarajuću tehniku ispitivanja, kako bi se primenom odgovarajuće metode mogli odrediti njihovi ostaci u različitim uzorcima. U narednom delu dat je literaturni prikaz nekih odabranih metoda za ispitivanje neonikotinoidea.

2.6.1 Spektrofotometrijske metode

Guzsvány et al. [197] razvili su spektrofotometrijsku metodu za istovremeno određivanje imidakloprida i 6-hloronikotinske kiseline. Imidakloprid je određen na 249 nm, a 6-hloronikotinska kiselina na 236 nm, sa granicama detekcije (GD) $0,32 \mu\text{g mL}^{-1}$ i $0,17 \mu\text{g mL}^{-1}$, respektivno i sa preciznošću iskazanom kroz relativnu standardnu devijaciju (RSD) manjom od 1,2%. Metoda je razvijena radi ispitivanja komercijalnih formulacija na bazi imidakloprida.

2.6.2 Nuklearna magnetna rezonanca i infracrvena spektrometrija

Guillermo et al. [198] su primenili infracrvenu spektrometriju sa Fourierovom transformacijom (FTIR) za određivanja imidakloprida iz njegovih komercijalnih formulacija. Metoda se zasniva na merenju površine pika između 1577 i 1567 cm^{-1} ili merenju visine pika na 1572 cm^{-1} . Dobijena GD iznosila je $9 \mu\text{g g}^{-1}$ za komercijalne formulacije imidakloprida.

Guzsvány et al. [199] razvili su dve spektroskopske metode ^1H (nuklearna magnetna rezonanca) NMR i FTIR za praćenje degradacije acetamiprida. ^1H NMR metoda je omogućila identifikaciju intermedijera 6-hlornikotinske kiseline i mravlje kiseline. FTIR procedura omogućila je praćenje kinetike degradacije cijano grupe jedinjenja. Dobijeni rezultati su pokazali dobro slaganje sa komparativnim HPLC-MS/MS i HPLC-DAD metodama.

2.6.3 Fluorimetrijske metode

Fluorimetrijske metode su veoma selektivne i osetljive zbog visokog signal/šum (eng. *signal to noise* - S/N) odnosa same tehnike.

Vilchez et al. [200] predlažu fotohemijski indukovanu fluorimetrijsku (PIF) metodu za osetljivo i brzo određivanje imidakloprida u uzorcima vode, baziranu na hemijskoj modifikaciji imidakloprida (u baznoj sredini pod dejstvom UV zračenja živine lampe) u fluoroforu, jedinjenju koje u vodenoj sredini pokazuje fluorescenciju sa ekscitacionim maksimumom na 334 nm i emisionim maksimumom na 337 nm.

Vilchez et al. [201] su za određivanje imidakloprida razvili i protočnu injekcionu analizu (eng. *flow injection analysis* – FIA) sa PIF-om, pri čemu su postigli linearni koncentracioni opseg od 1,0–60,0 ng mL⁻¹ imidakloprida, sa RSD od 2,1% i GD od 0,3 ng mL⁻¹.

2.6.4 Voltametrijske metode

Elektroanalitičke metode se sve češće koriste u analizi tragova zbog visoke osetljivosti i selektivnosti same tehnike. Impulsne tehnike, pre svega, diferencijalna pulsna polarografija (DPP), diferencijalna pulsna voltametrija (DPV) i pravougaona voltametrija, koja se može kombinovati i sa stripping analizom, daju niske granice detekcije, širok dinamički opseg, dobru preciznost, uz niže troškove same analize. Njihova osetljivost i selektivnost se mogu poboljšati primenom protočnih sistema ili uključivanjem fotoreaktora.

Navalón et al. [202] ispituju uticaj pH vrednosti na polarografsko ponašanje imidakloprida primenjujući DPP metodu, koju koriste za određivanje sadržaja imidakloprida u komercijalnom proizvodu *Gaúcho*. Granica detekcije metode iznosi 4 ng mL⁻¹ pri pH 8,0.

Blanc et al. [203] opisuju DPV metodu za određivanje imidakloprida. Granica detekcije metode iznosi $4,54 \cdot 10^{-10}$ mol L⁻¹.

Guiberteau et al. [204] su razradili elektroanalitičku metodu za detekciju i određivanje imidakloprida u rečnoj vodi pomoću adsorpcione stripping voltametrije sa pravougaonim talasom na visećoj kapi žive (eng. *hanging mercury drop electrode* – HMDE) u vodenom rastvoru Britton-Robinson pufera kao pomoćnog elektrolita. Granica detekcije iznosi $1,6 \cdot 10^{-8}$ mol L⁻¹, a granica određivanja (GO) $4,1 \cdot 10^{-8}$ mol L⁻¹.

Guzsvány et al. [205] razvili su brzu i osetljivu voltametrijsku metodu za karakterizaciju i određivanje imidakloprida upotrebom voltametrije sa pravougaonim talasom sa bizmutovom film elektrodom u vodenom rastvoru Britton-Robinson pufera kao pomoćnog elektrolita. Imidaklopid je određen u koncentracijskom opsegu od 0,91–47,48 $\mu\text{g mL}^{-1}$, sa GD 0,27 $\mu\text{g mL}^{-1}$ i GO 0,91 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Razvijena metoda je testirana tokom solarne fotolitičke i fotokatalitičke degradacije imidakloprida u prisustvu heterogenih katalizatora na bazi TiO_2 . Svi dobijeni rezultati su bili komparativni sa HPLC-DAD metodom.

2.6.5 Imunohemijske metode

Imunoadsorpcioni testovi sa vezanim enzimom (ELISA test) koriste se za određivanje neoni-kotinoida u različitim uzorcima. ELISA test je osetljiva i specifična tehnika, jednostavna za izvođenje i pogodna za brza terenska određivanja. Zasniva se na mikrotitracijama, pri čemu se prati obojenost test-rastvora, usled prisustva ciljnog jedinjenja. Zahvaljujući specifičnosti i osetljivosti same tehnike, velika pažnja se posvećuje razradi imunohemijskih metoda analize.

Wanatabe et al. [206] razvijaju ELISA metodu baziranu na monoklonalnim antitelima (MoAbS) za određivanje imidakloprida. Direktni kompetitivni ELISA (dc-ELISA) testovi sa pogodnim MoAbS su ispitivani prilikom određivanja imidakloprida u uzorcima voća i povrća bez prečišćavanja.

Kim et al. [207] razvijaju ELISA test za određivanje tiametoksama u vodi. Tri antiseruma su izolovana iz zečeva imunizovanih haptent-KLH konjugatom. Antiserumi su karakterisani indirektnom kompetitivnom ELISA metodom. Ispitani su unakrsna reaktivnost, efekti organskih rastvarača, pH i uticaj jonske jačine. Antiserum je bio specifičan za tiametoksam. Granica detekcije je 0,1 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Kim et al. [208] razvijaju ELISA metodu baziranu na monoklonalnim antitelima (MoAbS) za određivanje imidakloprida. Indirektni kompetitivni ELISA (ic-ELISA) testovi sa pogodnim antitelima su primenjeni za određivanje imidakloprida u uzorcima vode i krastavaca. Efektivnost metode je bila od 70 do 120%. Razvijenim icELISA testa sa anti-imidaklopid-MoAbS (E6F3) može se detektovati imidaklopid u koncentraciji od 0,1 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Wanatabe et al. [209] razvijaju ELISA metodu baziranu na MoAbS za određivanje imidakloprida i acetamiprida, primenom 3-[5-(nitroiminoimidazolidin-1-ilmetil)-2-piridiltio] propion kiselinskog i 3-[5-(*N*-1-cianoiminoetil)-*N*-metilaminoetil-2-piridiltio] propion kiselinskog haptena konjugovanog sa goveđim serumskim albuminom. Direktni kompetitivni ELISA testovi sa pogodnim odgovarajućim MoAbS-ima su primenjeni za određivanje imidakloprida i acetamiprida u voću i povrću bez prečišćavanja uzoraka, pri čemu je postignuta GD vrednost za imidaklopid i acetamiprid od 3,3 ng mL^{-1} , odnosno 1,0 ng mL^{-1} .

Watanabe et al. [134] razvijaju ELISA metodu baziranu na MoAbS za određivanje imidakloprida u uzorcima jabuke. Prinosi (eng. *recovery* - R) su se kretali između 87,7–112%. Utvrđeno je dobro slaganje rezultata ELISA testa sa konfirmativnom HPLC metodom.

Wanatabe et al. [210] su koristili ELISA tehniku za određivanje ostataka imidakloprida u

voćnim sokovima, bez prethodne pripreme uzoraka. Ovaj metod je omogućio određivanje $5 \mu\text{g L}^{-1}$ u soku od jabuke i $20 \mu\text{g L}^{-1}$ imidakloprida u soku od pomorandže. RSD metode bila je ispod 20%, sa prinosima između 94,2–104,2%. Lažno pozitivni rezultati nisu pronađeni, a dobijeni rezultati su u korelaciji sa rezultatima dobijenim upotrebom HPLC.

Wanatabe et al. [211] prikazuju potencijal komercijalno dostupnih ELISA kitova za određivanje acetamiprida u voću i povrću sa velikom osetljivošću i GD od $0,053 \text{ ng g}^{-1}$. Autori su odabrali metanol kao ekstrakciono sredstvo za pripremu uzoraka. Prinosi dobijeni ovom metodom su bili iznad 95%, a rezultati su upoređeni sa rezultatima dobijenim HPLC tehnikom.

2.6.6 Hromatografske metode

Najčešće primenjivana analitička tehnika za određivanje neonikotinoida, prema raspoloživoj literaturi, jeste hromatografija, pre svega hromatografija kombinovana sa drugim tehnikama.

2.6.6.1 Gasna hromatografija

Razvijene su brojne metode određivanja pesticida koje se zasnivaju na gasnoj hromatografiji (GC). Ipak, veliki je broj i onih jedinjenja koja se ne mogu direktno pratiti GC tehnikom, jer su nedovoljno isparljiva ili termolabilna. Ovakva jedinjenja se prethodno moraju prevesti u isparljiv oblik. Ovoj grupi pripada i većina neonikotinoida, mada postoje istraživanja koja obuhvataju analizu neonikotinoida gasnom hromatografijom.

Vilchez et al. [212] određuju imidaklopid u uzorcima vode i zemljišta primenom GC-MS. Metoda obuhvata ekstrakciju imidakloprida hloroformom, hidrolizu imidakloprida u baznoj sredini i merenja u SIM režimu rada (eng. *selected ion mode* – SIM, praćenje odabranog jona). Pri SIM merenjima, signali matriksa nisu uticali na rezultat. GD je za uzorke vode bio $0,16 \mu\text{g L}^{-1}$, a za uzorke zemljišta $1 \mu\text{g kg}^{-1}$ sa RSD od 0,3–1%, uz prinos od 100%. Metoda je primenjena za kontrolu kvaliteta voda i zemljišta Granade.

Navalón et al. [213] su razradili metodu određivanja imidakloprida u povrću (paradajz, krastavac, paprika i zeleni biber) primenom GC-MS tehnike. Metoda se zasniva na ekstrakciji imidakloprida dihlormetanom i hidrolizi imidakloprida u baznoj sredini. Postignuta GO je bila $12,5 \mu\text{g L}^{-1}$, a RSD na nivou $125,0 \mu\text{g L}^{-1}$ je bila 0,7%. Prinos metode bio je između 94,3–105,8%.

Zheng i Liu [47] ispituju stabilnosti imidakloprida koristeći GC-MS tehniku za proučavanje njegove hidrolize i identifikaciju degradacionih proizvoda. Hidroliza imidakloprida je najbrža u baznoj sredini, pri čemu je glavni degradacioni proizvod 1-[(6-hlor-3-piridinil) metil]-2-imidazolidon.

Mateu-Sánchez et al. [214] razvijaju brzu i jednostavnu GC metodu za određivanje acetamiprida u voću i povrću. U svom radu koriste MS i kombinovani MS/MS detektor. Ekstrakciju su vršili etil-acetatom, a sistemom GC-MS/MS su postigli GO od $0,001 \text{ mg L}^{-1}$. Prinos acetamiprida je bio 82,4–85,7%, a RSD manja od 12,2%.

Ko et al. [215] određivali su ostatke imidakloprida i njegovih metabolita u zelenoj salati gasnom hromatografijom sa detektorom sa zahvatom elektrona (eng. *electron-capture detector* - ECD). Granice detekcije i određivanja bile su $0,015 \text{ mg L}^{-1}$, odnosno $0,05 \text{ mg L}^{-1}$. Prinosi na dva nivoa obogaćivanja su se kretali između 72,8–108,3% sa RSD < 8,0%. Rezultati su potvrđeni primenom GC-MS/MS.

Li et al. [216] su pratili smanjenje sadržaja klotianidina u paradajzu i zemljištu na otvorenom polju gasnom hromatografijom sa prinosima između 92 i 102% i RSD od 3–5%. Rezultati ispitivanja su ukazali na veće količine klotianidina na pokožici paradajza u odnosu na jezgro na dan branja.

Lozowicka [217] je razvila multirezidualnu metodu za određivanje 153 pesticida, među kojima i acetamiprida, u medonosnim pčelama za koje se sumnjalo da su otrovane tokom aplikacije pesticida na poljima. Metoda za određivanje bila je gasna hromatografija sa dualnim selektivnim detektorima sa zahvatom elektrona. Niske GD ($0,003\text{--}0,04 \mu\text{g g}^{-1}$) i GO ($0,005\text{--}0,05 \mu\text{g g}^{-1}$) sa proširenom mernom nesigurnošću od 28% učinili su ovu metodu pogodnom za ispitivanje ostataka različitih pesticida kod pčela u Poljskoj. Primenom razvijene metode u 33 uzorka pčela pronađeno je prisustvo 14 insekticida i 3 fungicida.

Rossi et al. [218] su određivali sadržaj imidakloprida u medonosnim pčelama, polenu, travi i cveću, koji su bili u neposrednoj okolini tokom setve semena koje je bilo tretirano imidaklopridom. Razvijene su dve metode određivanja, HPLC-UV i GC-MS. GC-MS je omogućila praćenje degradacionih proizvoda imidakloprida u zemljištu.

2.6.6.2 Tečna hromatografija

Za direktno određivanje teškoisparljivih pesticida i njihovih metabolita i degradacionih proizvoda koriste se analitičke metode bazirane na tečnoj hromatografiji sa odgovarajućim detektorima. Najveći broj ispitivanja neonikotinoida upravo se bazira na tečnoj hromatografiji.

Fernández-Alba et al. [219] opisuju HPLC-DAD metodu za određivanje ostataka imidakloprida u povrću u opsegu od $0,01\text{--}0,60 \text{ mg L}^{-1}$. Prinos metode iznosi 95%, a RSD je 4,7%. Dinamički opseg se kreće između 2,0–120,0 ng ($0,01\text{--}0,60 \text{ mg L}^{-1}$), dok GD imidakloprida iznosi $0,01 \text{ ng L}^{-1}$.

Martinez-Galera et al. [220] vrše analizu imidakloprida i njegovog glavnog degradacionog proizvoda, 6-hlornikotinske kiseline (dva jedinjenja veoma slične polarnosti), u vodi pomoću HPLC-DAD tehnike, kombinujući i elemente hemometrike. Koristeći grafičku tehniku i računarski algoritam zasnovan na trodimenzionalnim matriksima, poboljšali su selektivnost metode. Metoda se pokazala zadovoljavajućom za određivanje insekticida sa prinosom od 90–114%. Granice detekcije iznose $0,25 \mu\text{g L}^{-1}$ za 6-hlornikotinsku kiselinu i $0,30 \mu\text{g L}^{-1}$ za imidaklopid.

Mandić et al. [221] određuju imidaklopid tehnikom HPLC-DAD u uzorcima krompira i luka. Uzorci krompira su ekstrahovani samo dihlormetanom, dok su ekstrakti uzoraka luka dodatno prečišćeni na LC-Florisil koloni. Postignute su vrednosti GO za krompir od $0,015 \text{ mg L}^{-1}$, a za luk $0,012 \text{ mg L}^{-1}$, sa prinosom od 94–99% i RSD 5%.

Obana et al. [222] su odredili tri insekticida, acetamiprid, imidakloprid i nitenpiram primenom HPLC-DAD nakon ekstrakcije acetonitrilom u krompiru, paradajzu i patlidžanu. Ekstrakt je filtriran preko anjonsko-izmjenjivačkog filtra, a potom preko silikagelskog sistema za filtriranje. Pesticidi su određeni sa prinosom od 90% u slučaju acetamiprida i imidakloprida i 64–84% u slučaju nitenpirama. RSD je u svakom slučaju bila manja od 10%, sa GO od 0,08–0,14 mg L⁻¹.

Sing et al. [223] su primenili ekstrakciju potpomognutu mikrotalasima (eng. *microwave-supported extraction*) kombinovanu sa čvrsto-faznom ekstrakcijom za simultano određivanje tiametoksama, imidakloprida i karbendazima u svežem i kuvanom povrću (paprika, krompir, bundeva, paradajz i čili) primenom HPLC-DAD i HPLC-MS, sa GO u opsegu od 0,030–0,048 µg g⁻¹. Zahvaljujući primeni mikrotalasnog ekstraktora prinos metode je povećan sa 37,2–61,4% na 68,1–106%, uz RSD < 7%. Autori su ustanovili da se kuvanjem povrća redukuje sadržaj ispitivanih neonikotinoidea, pri čemu je najizraženiji stepen smanjenja sadržaja zabeležen u slučaju karbendazima u kuvanim uzorcima bundeve i paradajza. U kuvanim matriksima nisu nađeni degradacioni proizvodi.

Blasco et al. [224] opisuju metodu određivanja imidakloprida i još tri pesticida u uzorcima breskve i nektarine kombinacijom tačne hromatografije sa hemijskom jonizacijom pri atmosferskom pritisku (eng. *atmospheric pressure chemical ionization* - APCI) i masenim spektrometrijskim detektorom, koji prevazilazi većinu nedostataka drugih detektora. Razrađena metoda ima dinamički opseg od 0,02–2,00 mg L⁻¹, RSD 14% i prinos od 108%.

Hernández et al. [225] predlažu vrlo brzu, osetljivu, specifičnu i automatizovanu metodu za određivanje 35 pesticida (među njima i imidakloprida) u uzorcima zemljišta i površinskih voda. Metoda je bazirana na upotrebi kolone za ekstrakciju na čvrstoj fazi spregnute *on-line* sa LC-ESI (elektrosprej jonizacija, eng. *electrospray ionization* - ESI)-MS/MS tehnikom. Koristeći samo 1,3 mL profiltrirane vode za analizu, najveći deo pesticida se može odrediti i na nivou koncentracije od 25 ng L⁻¹ pri ukupnom vremenu analize od 18 min. Ova metoda, zahvaljujući njenoj brzini, osetljivosti, automatizaciji i odsustvu kompleksnih tretiranja primarnih uzoraka, smatra se delotvornom analitičkom metodom za određivanje pesticida u vodi.

Obana et al. [226] razvili su brzu i jednostavnu metodu za simultano određivanje neonikotinoidea u 12 različitih uzoraka voća i povrća. Priprema uzoraka sastojala se u ekstrakciji metanolom i prečišćavanju ekstrakta uz pomoć ekstrakcionog filtera od grafitizovanog ugljenika ispunjenog metanolom rastvorom (20%, v/v). Koncentrovani rastvor, nakon daljeg rastvaranja metanolom, analiziran je na ostatke pesticida pomoću LC-MS u APCI-pozitivnom modu. RSD su bile niže od 10% za sve ponovljene testove. Predložena metoda je brza, lakoizvodljiva i prema autorima mogla bi biti uvrštena u metode redovnog monitoringa ostataka pesticida.

Ferrer et al. [227] opisuju LC-TOF/MS metodu za identifikaciju i određivanje acetamiprida, imidakloprida i tiakloprida u biljnim uzorcima. Primenjena metoda ima GD od 0,002–0,010 mg L⁻¹, a nađene GO su bile u opsegu 0,02–0,17 mg L⁻¹. RSD je iznosila 2–3% tokom jednog dana i 5% u toku većeg broja dana.

Martín et al. [228] primenjuju LC-MS/MS kombinovanu tehniku za određivanje sadržaja acetamiprida u atmosferi staklenika i plastenika. Adsorpcija pesticida vršena je na Chromosorb-102 koloni vezanoj za personalni uzorkivač vazduha. Primenjena metoda pokazuje tačnost od 72–92%, RSD 2–13% i nisku vrednost GD od nekoliko $\mu\text{g L}^{-1}$.

Seccia et al. [229] razvili su LC-MS metodu za određivanje četiri neonikotinoidea (imidakloprida, tiametoksama, acetamiprida i tiakloprida) u smesi u uzorcima pijaće vode. Za prečišćavanje uzoraka korišćena je ekstrakcija na čvrstoj fazi sa LiChrolut EN kolonom. Ovom metodom postignuta GO neonikotinoidea iznosila je $0,03 \mu\text{g L}^{-1}$, sa RSD < 20%. Isti autori ispitivali su i sadržaj pomenuta četiri neonikotinoidea u mleku goveda [167]. Ekstrakcija uzoraka podrazumevala je prečišćavanje primenom Chem Elut ketridža, a određivanje je vršeno primenom HPLC-DAD. Prinosi neonikotinoidea su se kretali od 85,1–99,7% sa RSD < 10%. Određene GO su se kretale između $0,01\text{--}0,04 \text{ mg L}^{-1}$, podudarajući se sa MDK za neonikotinoide u EU ($0,01\text{--}0,05 \text{ mg L}^{-1}$).

Fidente et al. [128] primenjuju već navedenu metodu *Seccia et al.* [229] za određivanje pomenuta četiri neonikotinoidea u uzorcima meda, pri čemu za prečišćavanje koriste Extrelut NT20 kolonu. Ovom metodom GD neonikotinoidea su bile između $0,01\text{--}0,1 \text{ mg L}^{-1}$ sa RSD < 10%.

Muccio et al. [165] primenjuju već navedene metode *Fidente et al.* [128] i *Seccia et al.* [229] za određivanje pomenuta četiri neonikotinoidea u uzorcima povrća, pri čemu za prečišćavanje koriste, takođe, Extrelut NT20 kolonu. Primarnu ekstrakciju neonikotinoidea vrše acetonom, a ponovnu ekstrakciju dihlormetanom. Kao i u slučaju meda, ovom metodom se neonikotinoide određuju u opsegu $0,1\text{--}0,5 \text{ mg L}^{-1}$ sa RSD < 10% i prinosom od 74,5% do 105,0%, na koncentracijskim nivoima od $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ i $1,0 \text{ mg L}^{-1}$.

Ruíz de Erenchun et al. [230] razvijaju HPLC metodu, sa pulsnom reduktivnom amperometrijskom detekcijom, za određivanje imidakloprida i njegovog glavnog degradacionog proizvoda, 6-hloronikotinske kiseline, u zemljištu. Granica detekcije ove metode iznosi $4,56 \text{ ng mL}^{-1}$, dok je RSD 3,25%.

Rancan et al. [231] razrađuju hromatografsku metodu sa postkolonskim fotohemijским reaktorom i elektrohemijским detekcijom za određivanje imidakloprida i njegovih glavnih degradacionih proizvoda (olefinskih i hidroksilnih proizvoda) u spajkovanim uzorcima polena, cvetnih uzoraka i pčela. Postignute vrednosti GO iznosile su $0,053\text{--}0,904 \mu\text{g g}^{-1}$, uz uspešno razdvajanje degradacionih proizvoda, što nije slučaj kod uporedne GC-MS tehnike.

Wang et al. [153] ispitivali su prisustvo 7 neonikotinoidea u braon pirinču, kukuruzu, ovsu i sirku upotrebom DSPE-DLLME-HPLC-DAD. Svi prinosi iznosili su između 76–123% sa RSD od 0,9–12,6%. GD bila je između $0,002\text{--}0,005 \text{ mg L}^{-1}$, a GO $0,007\text{--}0,018 \text{ mg L}^{-1}$.

Rahman et al. [177] razvili su metodu zasnovanu na modifikovanoj QuEChERS ekstrakciji i tačnoj hromatografiji sa UV detektorom u ultraljubičastoj oblasti spektra (HPLC-UV) za određivanje dinateturana i njegovih metabolita u uzorcima dinje. Dobijen je dobar prinos 70,6–93,5% sa RSD < 10%. GD se kretala u opsegu $0,02\text{--}0,05 \text{ mg L}^{-1}$, dok je GO bila u opsegu $0,06\text{--}0,16 \text{ mg L}^{-1}$.

Mohan et al. [232] su ispitivali sadržaj tri neonikotinoida (imidakloprida, acetamiprida i tiakloprida) u semenu pamuka metodom HPLC-UV, koristeći SPE ekstrakcionu tehniku. GD za ispitivane neonikotinoide bile su između 5–20 mg L⁻¹.

De Oliveira et al. [233] su ispitivali efekat koji imaju različite koncentracije tiametoksama i klotianidina na dopaminergični sistem pacova upotrebom tečne hromatografije sa elektrohemijским detektorom (HPLC-EC). Ustanovljeno je da različite koncentracije ovih neonikotinoida utiču na postsinaptički nikotinski acetilholin-receptor.

Vichapong et al. [154] razvili su metodu za određivanje 5 neonikotinoida (acetamiprida, klotianidina, nitenpirama, imidakloprida i tiametoksama) u uzorcima površinskih voda i voćnih sokova upotrebom vorteksom potpomognute tečno-tečne mikroekstrakcije sa dodatkom emulgujućeg rastvora i HPLC sistema sa fotodiodnim detektorom (eng. *photodiode array detector* - PAD). Nađeni su optimalni uslovi ekstrakcije i postignut je nizak nivo detekcije (GD, 0,1–0,5 µg L⁻¹).

Wu et al. [156] su ispitivali sadržaj 4 neonikotinoida (acetamiprida, imidakloprida, tiakloprida i tiametoksama) u uzorcima paradajza i krastavaca upotrebom DSPE i DLLME sa HPLC-DAD. Metoda je omogućila GD neonikotinoida u rasponu 0,5–0,1 ng g⁻¹.

Wu et al. [234] pratili su ostatke imidakloprida u kupusu i zemljištu uz pomoć HPLC-UV. Metoda je omogućila GD od 0,0075 mg L⁻¹ za kupus i 0,003 mg L⁻¹ za zemljište, sa vremenom poluraspada imidakloprida od 3,1 dan u zemljištu i 2,2 dana u kupusu.

Guzsvány et al. [235] su razvili metodu zasnovanu na tečnoj hromatografiji kuplovanoj sa optotermičkim detektorom (eng. *thermal lens spectroscopy* - TLS) i detektorom od niza dioda za određivanje tiametoksama (GO, 50 µg L⁻¹), imidakloprida (GO, 89 µg L⁻¹), acetamiprida (GO, 10 µg L⁻¹) i tiakloprida (GO, 25 µg L⁻¹). Konfirmativni rezultati su dobijeni i na HPLC-DAD.

Abramović et al. [236] su ispitivali fotodegradaciju tiakloprida pod dejstvom UV i UV/H₂O₂. Fotodegradacija tiakloprida je praćena pomoću HPLC-DAD sistema. Ispitivanje uklanjanja tiakloprida iz voda je pokazalo da na njegovo uklanjanje najviše utiče prisustvo HCO₃⁻.

Tanner et al. [174] su razvili analitičku metodu za simultano određivanje ostataka osam neonikotinoida (acetamiprida, klotianidina, dinotefurana, flonikamida, imidakloprida, nitenpirama, tiakloprida i tiametoksama) i 2 metabolita (acetamiprida IM 2-1 i flonikamida TFNA-AM) u medu, koristeći LC-MS/MS. Autori su imali dva pristupa pripremi uzoraka (QuEChERS i ekstrakcija na čvrstoj fazi upotrebom ChemElut ketridža), koje su istraživali. Finalna metoda je obuhvatala ekstrakciju acetonitriлом i kasnije prečišćavanje disperzionom čvrsto-faznom ekstrakcijom – QuEChERS. Prinosi određivanja su iznosili od 60–114%, sa RSD između 2,7–12,8%. GD i GO su bile u opsezima od 0,6–5,0 µg L⁻¹ i 2,0–10,0 µg L⁻¹. Metoda je primenjena na ispitivanje sadržaja odabranih neonikotinoida u medu sa područja Austrije, što je rezultiralo otkrivanjem acetamiprida, tiakloprida i tiametoksama u medu, ali u koncentracijama ispod MDK u EU.

Xie et al. [237] su detektovali i kvantifikovali 6 neonikotinoida (dinotefuran, tiametoksam, klotianidin, imidakloprid, acetamiprid i tiakloprid) u kestenu, đumbiru i čaju korišćenjem čvrsto-

fazne ekstrakcije sa LC-MS/MS sa praćenje višestruke reakcije (eng. *multiple reaction monitoring* - MRM) režimu rada. Prinosi su se kretali u opsegu 82,1–108,5%, a GO u opsegu 0,01–0,02 mg L⁻¹. Prisustvo imidakloprida i acetamiprida detektovano je u preko 150 ispitanih uzoraka u koncentracijama 0,05–3,6 mg L⁻¹.

Lacina et al. [173] su koristili ultratečnu hromatografiju visoke efikasnosti kuplovanu sa vremenom preleta masenim detektorom (uHPLC-TOF MS) za ispitivanje 2012 pesticida u biljnom materijalu. Za 96% uzoraka GO bila je $\leq 10 \mu\text{g L}^{-1}$, a analiza je sprovedena za manje od 24 min.

Xiao et al. [166] razvili su metodu za istovremeno određivanje 7 neonikotinoida u mišićima i jetri goveda. Priprema uzoraka se sastojala u korišćenju automatizovane ekstrakcije rastvaračima pod pritiskom u kombinaciji sa čvrsto-faznom ekstrakcijom. Određivanje je sprovedeno korišćenjem LC-MS/MS u MRM režimu rada. Prinosi odabranih neonikotinoida su se kretali u opsegu 83,2–101,9% sa RSD <10,8%. GD i GO iznosile su 0,8–1,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ i 2,5–5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Xiao et al. [238] su razvili brzu, osetljivu i ekološki prihvatljivu metodu za istovremeno određivanje 7 neonikotinoida (dinotefurana, nitenpirama, tiametoksama, imidakloprida, klotianidina, acetamiprida i tiakloprida) u uzorcima jegulja. Za ekstrakciju je korišćena subkritična ekstrakcija vodom. Određivanje odabranih neonikotinoida je izvršeno sa uHPLC-MS/MS u MRM režimu rada sa prinosima u opsegu 84,6–102,0% sa RSD <10,8%. GD i GO iznosile su 0,12–0,36 $\mu\text{g L}^{-1}$ i 0,42–1,12 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Arienzo et al. [175] su razvili metodu za određivanje 14 pesticida, uključujući i imidakloprid, zasnovan na QuEChERS ekstrakcionoj tehnici i LC-MS/MS u 145 uzoraka povrća u Italiji. Imidakloprid nije pronađen u količina iznad MDK u EU.

Dujaković et al. [239] su razvili osetljivu metodu za određivanje 14 najzastupljenijih pesticida u RS uključujući insekticide, fungicide i herbicide. Između ostalih, ispitivan je i sadržaj acetamiprida i imidakloprida u površinskim i podzemnim vodama upotrebom LC-MS/MS. Prinosi od 72–129% sa GD u opsegu 0,4–5,5 ng L⁻¹ i GO u opsegu 1,1–18,2 ng L⁻¹ su postignuti za sve ispitivane pesticide.

Yanez et al. [240] razvili su novi metod zasnovan na LC-MS određivanju 7 neonikotinoida (acetamiprida, klotianidina, dinotefurana, imidakloprida, nitenpirama, tiakloprida i tiametoksama) u uzorcima pčelinjeg voska. Odabrani neonikotinoidi su ekstrahovani tečno-tečnom ekstrakcijom sa vodom, a prethodno topljeni u *n*-heksan/2-propanol smesi. Metoda je rezultirala postizanjem GD 0,4–2,3 $\mu\text{g L}^{-1}$ i GO 1,5–7,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ odabranih neonikotinoida.

2.7 Tečna hromatografija visoke efikasnosti (HPLC)

Imajući u vidu činjenicu da je najveći broj istraživanja neonikotinoida sproveden upravo primenom tečne hromatografije sa masenom spektrometrijom kao detektorom, ove dve tehnike određivanja su detaljnije opisane.

Hromatografski sistem se može podeliti na četiri dela: deo za unos uzorka, mobilnu fazu, stacionarnu fazu i detektor. Zavisno od hromatografske tehnike koja se primenjuje i ova četiri dela se

razlikuju po svojoj važnosti i karakteristikama. Na primer, u gasnoj hromatografiji, injektor je možda i najbitniji deo, jer mora biti prilagođen karakteristikama ispitivanih supstanci i od njega zavisi dalji tok analize. U HPLC tehnici, injektor je neophodan samo za unos tačne zapremine.

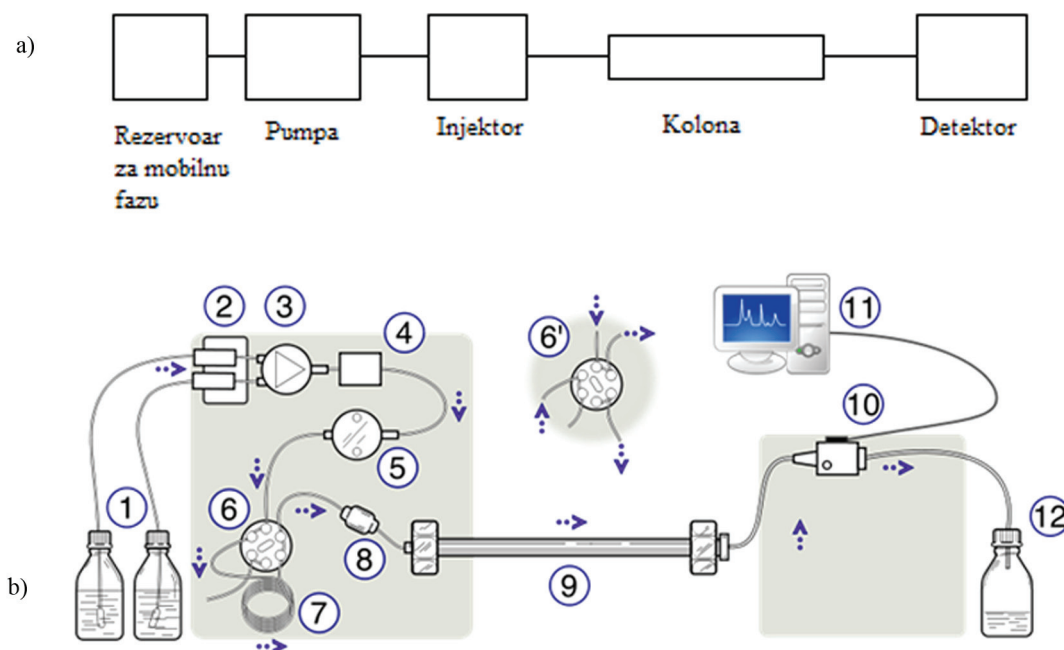
Dva neophodna dela koja su zadužena za odvajanje supstanci su mobilna i stacionarna faza. U HPLC tehnici, mobilna faza je rastvarač koji protiče pod dejstvom visokog pritiska (čak do 1300 bara) kako bi osigurao konstantan protok i reproduktivno ispitivanje, dok je stacionarna faza upakovana u kolonu koja može da podnese visoki pritisak. Princip razdvajanja supstanci u tečnoj hromatografiji odvija se procesom adsorpcije, raspodele između dva rastvarača, jonske izmene ili raspodele prema veličini molekula, pa tako razlikujemo adsorpcionu, afinitetnu, podeonu, jonoizmenjivačku hromatografiju i ekskluzionu hromatografiju.

Tečna hromatografija se može podeliti prema mehanizmu retencije, na normalno-faznu hromatografiju (i podvrsta: hromatografija sa hidrofilnim interakcijama), reverzno-faznu hromatografiju (i podvrste: hromatografija sa građenjem jonskih parova, micelarna hromatografija, hromatografija sa hidrofobnim interakcijama), jonoizmenjivačku hromatografiju i afinitetnu hromatografiju. Kod normalno-fazne hromatografije stacionarna faza je polarna (npr. sadrži vezane amino-, cijano- ili hidroksilne grupe), dok je mobilna faza nepolarna, pa se koristi za ispitivanje polarnih supstanci i za mnoge nepolarne supstance, koje bi se na reverzno-faznoj koloni prejako vezale ili loše razdvojile. Razdvajanje se zasniva na stvaranju vodoničnih veza ili na polarnim interakcijama između ispitivanih supstanci i stacionarne faze, pa će polarnije supstance eluirati kasnije sa kolone. Sa druge strane, kod reverzno-fazne hromatografije stacionarna faza je nepolarna (npr. sadrži vezane ugljovodonične lance), dok je mobilna faza polarna, pa se koristi u većini slučajeva za ispitivanje nepolarnih supstanci. Razdvajanje se zasniva na hidrofobnim interakcijama između ispitivanih supstanci i stacionarne faze, te će nepolarnije supstance eluirati kasnije sa kolone.

Postoji više tipova detektora koji se mogu naći u sprezi sa HPLC, zavisno od tipa uzorka koji se ispituje. Kvalitativna identifikacija se zasniva na poređenju retencionih karakteristika, vremena i zapremine, nepoznate supstance sa nekom referentnom supstancom. Kod HPLC se situacija komplikuje, jer postoje mnoge varijacije mobilne i stacionarne faze, shodno tome, i veći broj retencionih karakteristika jednog jedinjenja, što predstavlja teškoću prilikom identifikacije, jer retencionna vremena ne nose sa sobom nikakve strukturne informacije. Kako je HPLC manje efikasna tehnika za samo razdvajanje supstanci u odnosu na GC, dobijeni pikovi su širi, a izmerena retencionna vremena manje precizna. Precizno i tačno kvantitativno određivanje u najvećoj meri zavisi od selektivnosti datog detektora zbog mogućeg pozadinskog šuma usled detektovanih nečistoća. Najveću primenu u HPLC tehnici imaju UV detektori, koji često nisu dovoljno selektivni, pa dolazi do preklapanja pikova pri analizi smesa. Fluorescentni detektori su osetljiviji i selektivniji, pošto je kombinacija emisije i apsorpcione talasne dužine karakteristična za dati analit, ali im je nedostatak taj što su primenjivi samo na ograničeni broj analita. U masenoj spektrometriji idealne karakteristike i kvantitativnog i kvalitativnog detektora se svode na pružanje podataka o molekulskoj masi i strukturi ispitivanih jedinjenja [244].

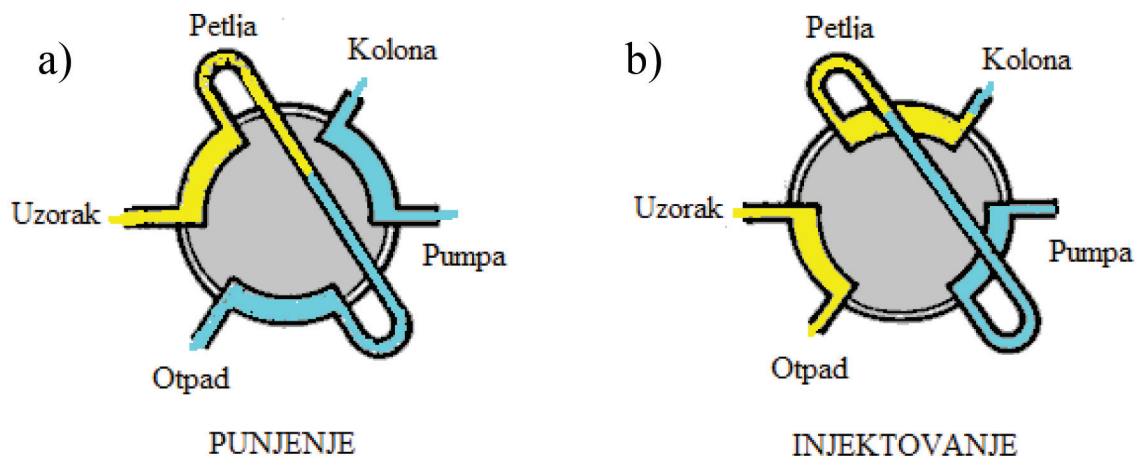
Na slici 2.12 prikazan je blok dijagram i sastavne jedinice tipičnog HPLC sistema, čije će komponente biti opisane u narednom delu, pošto su važne za uspešno povezivanje i rad HPLC-MS sistema.

Osnovni zadatak pumpe u uređaju za HPLC jeste da obezbedi protoke mobilne faze u rasponu od $10 \mu\text{L min}^{-1}$ do 2 mL min^{-1} zavisno od korišćenog interfejsa za HPLC-MS, dužine, prečnika kolone i dimenzija čestica čvrste faze HPLC kolone. Na primer, ukoliko se koristi elektrosprej interfejs i 2,1 mm HPLC kolona, pumpa treba da obezbedi protoke sa donje lestvice raspona, dok se prilikom korišćenja standardne 4,6 mm kolone zahtevaju veći protoci, što je, takođe, slučaj ukoliko se koristi hemijska jonizacija pod atmosferskim pritiskom kao interfejs. Postoji više tipova komercijalno dostupnih pumpi, ali je najpopularnija klipna pumpa. Sa gledišta MS, pumpa ne sme da pulsira i mora da održava konstantan protok, jer pulsiranje može da prouzrokuje oscilacije ukupne jonske struje, koje mogu da navedu na pogrešnu interpretaciju masenih signala [244].



Slika 2.12. a) Blok dijagram i b) sastavne jedinice tipičnog HPLC sistema: 1. posude za rastvarače, mobilne faze, 2. degazer, 3. gradijent ventil, 4. mešać mobilnih faza, 5. visoko-pritisna pumpa, 6. switch ventil, pozicija injektovanja, 6'. switch ventil, pozicija ubrizgavanja, 7. petlja (loop) injektovanja uzorka, 8. pred-kolona (zaštitna), 9. kolona, 10. detektor, 11. kompjuter, 12. sakupljač otpada ili frakcija [241]









Za razliku od gasne hromatografije u kojoj se koristi više tipova injektora, u tečnoj hromatografiji se skoro uvek koristi samo jedan tip injektora, injektor sa petljom. Injektor sa petljom, ili, kako ga neki nazivaju, ventil-injektor (slika 2.13), predstavlja pogodan način da se tečni uzorak unese u mobilnu fazu i sadrži tzv. petlju nominalne zapremine, u koju se unosi uzorak korišćenjem šprica za uzorkovanje. Dok se petlja puni uzorkom, mobilna faza se pumpa preko ventila u kolonu, kako bi se održao neometan protok mobilne faze kroz sistem i time omogućili optimalni uslovi hromatografisanja. Kada je vreme za injektovanje, rotirajući prekidač se pomera, omogućavajući mobilnoj fazi da prodre u petlju i odnese uzorak na vrh hromatografske kolone. Kvantitativna preciznost celog hromatografisanja zavisice i od toga koliko i sa kojom reproduktivnošću se petlja može iznova i iznova puniti.



Slika 2.13. a) Punjenje injektora uzorkom, b) injektovanje uzorka u hromatografsku kolonu [242]

Gledajući iz ugla masene spektrometrije, injektor nije od suštinskog značaja za ispitivanje, izuzev činjenice da eventualni mehuri uneti u injektor mogu poremetiti protok mobilne faze i time destabilizovati odgovor masenog detektora.

Mobilna faza ili gas nosač u gasnoj hromatografiji ne učestvuje u mehanizmu preraspodele čestica između dve faze, dok u tečnoj hromatografiji interakcija analita sa mobilnom i stacionarnom fazom određuje retencione karakteristike samog analita, pa, stoga, različite interakcije sa ovim fazama uslovljavaju uspešnost razdvajanja. Za HPLC tehniku, mobilna faza mora da bude rastvarač u kojoj će se analit rastvarati. Odabir mobilne faze vrši se na osnovu hemijske prirode komponenata (polarnosti, hidrofobnosti, mogućnosti građenja vodoničnih veza, naelektrisanja i dr.) iz uzorka koje je potrebno razdvojiti i identifikovati. Takođe, bitna je i kompatibilnost mobilne faze sa detektorom, na primer, rastvarači nemešljivi sa vodom, neisparljive supstance i supstance koje grade adukte ili jonske parove nisu kompatibilne sa elektrosprej MS detektorom, rastvarači koji apsorbuju u UV sa UV detektorom, rastvarači koji se lako oksiduju ili redukuju sa elektrohemijским, teško isparljivi sa ELSD detektorom. Na slici 2.14 prikazani su rastvarači, kao i njihova polarnost, koji se najčešće koriste kao mobilne faze pri izvođenju HPLC analize [244].

RASTVARAČI	POLARNO	MEŠANJE SA VODOM
Sirćetna kiselina		da
Metanol		da
Acetonitril		da
Aceton		da
Dietil-etar		slabo
Hloroform		ne
Petrol-etar		ne
Heksan		ne

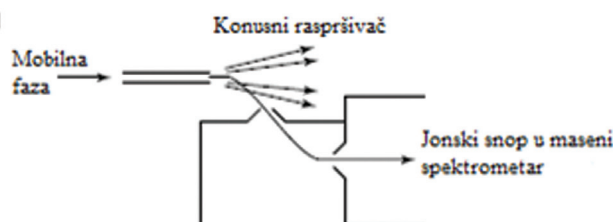
NEPOLARNO

Slika 2.14. Shematski prikaz polarnosti nekih rastvarača

Većina HPLC analiza koriste reverzno-faznu hromatografiju, tj. uslove pri kojima je mobilna faza polarnija od stacionarne, pri čemu se duže zadržavaju jedinjenja koja ispoljavaju izrazitiji hidrofobni karakter. Nasuprot tome, kod normalno-fazne hromatografije uspostavljaju se polarne interakcije (vodonične veze, jon-dipol, dipol-dipol, dipol-indukovani dipol) i molekuli sposobni za ove interakcije jače će se vezivati. Često nije moguće postići zadovoljavajuće razdvajanje korišćenjem jednog rastvarača kao mobilne faze, pa se, stoga, često koriste smese rastvarača. Ukoliko se sastav mobilne faze ne menja sa vremenom, nezavisno od toga koliko komponenata je ona sadržala, režim rada mobilne faze se naziva *izokratskim*, dok je *gradijentni* onaj u kome se sastav mobilne faze menja sa vremenom trajanja analize. Ako data mobilna faza dobro razdvaja polarne komponente, znači da se one (dovoljno) dugo zadržavaju na koloni. A to, opet, znači da će se nepolarnije verovatno vrlo kratko zadržavati i eluirati sa niskim *faktorom kapaciteta* (k'). Gradijentna analiza se koristi da bi se k' svih komponenti smese svede na prihvatljiv opseg (1–10, idealno 2–5), odnosno da obezbedi da se i jedinjenja koja se slabo vezuju dovoljno dugo zadrže na koloni i da se postigne zadovoljavajuće razdvajanje. Sa druge strane, da jedinjenja koja se jako vezuju eluiraju dovoljno brzo (a tako da se izbegnu preduga vremena analize, širenje pikova i loša osetljivost) [243, 244]. Za mešanje rastvarača u određenom odnosu odgovoran je gradijentno-proporcionišući ventil (kod sistema sa mešanjem pri niskom pritisku) ili same pumpe (kod mešanja pri visokom pritisku). Rastvarači koji se koriste kao mobilne faze za HPLC moraju biti odgovarajućeg kvaliteta (HPLC grade). Ukoliko se mobilne faze pripremaju, moraju se pripremati od bidestilovane vode i nakon dodatka odgovarajuće komponente, obavezno moraju biti profiltrirane kroz specijalne filtre, kako bi se sprečio ulazak i najsitnijih nečistoća u sistem. U HPLC tehnici, neorganski puferi, poput natrijum ili kalijum-fosfata, dodaju se mobilnoj fazi, kako bi se obezbedila zadovoljavajuća retencija jonizabilnih jedinjenja, reproduktivna

retenciona vremena i zadovoljavajući oblik pikova. Najefikasnije je koristiti puferne čija je pKa vrednost bliska pH vrednosti na kojoj će se vršiti ispitivanje. Fosfatni puferi se najčešće koriste, jer imaju tri pH regiona gde su efikasni (pH 2, 7 ili 12). Acetatni pufer je efikasan oko pH 4, a amonijačni oko pH 9.

Kako je jedna od uloga HPLC-MS interfejsa odstranjivanje mobilne faze, bilo kakvo zadržavanje molekula pufera u njemu može ometati rad detektora, tako da HPLC-MS metode zahtevaju korišćenje isparljivih aditiva poput amonijum-acetata. Uticaj koji sastav mobilne faze ima na rad interfejsa zavisi od samih parametara mobilne faze, kao što su tačka ključanja, provodljivost, stepen degaziranosti (kako bi se sprečila pojava mehura u interfejsu) i drugi. Dizajn nekih interfejsa je takav da struja efluenta ne ulazi direktno, pravom putanjom dublje u jonski izvor i analizator. Umesto toga, joni se električnim poljem usmeravaju izlomljenom ili krivolinijskom putanjom dublje u sistem, dok se nenaelektrisane komponente (rastvarač) kreću po inerciji i bivaju odstranjene. Jedan takav primer je „Z-sprej“ interfejs, prikazan na slici 2.15, kod koga je mobilna faza raspršena iznad konusnog dela za sakupljanje jona pod naponom, koji privlači odgovarajući naelektrisane jone, terajući ih da prođu kroz njega u maseni spektrometar, dok molekuli rastvarača i pufera samo prolaze iznad i bivaju ispumpani dalje u otpad.



Slika 2.15. Z-sprej interfejs [244]

Mobilna faza igra bitnu ulogu pri radu detektora, jer ukoliko se koristi mobilna faza sa nečistoćama makar i na nivou od 0,000001%, pri protoku od 1 mL min^{-1} , dovodi otprilike 1 ng s^{-1} supstance do detektora, što može da prouzrokuje stalnu pojavu pozadinskog šuma pri analizi, pa je neophodno koristiti maksimalno čiste rastvarače za mobilnu fazu. Ovaj mogući problem se prevazilazi i upotrebom odgovarajuće jonizacione tehnike koja je najčešće takva da stvara jone većih vrednosti masa/naelektrisanje odnosa (m/z) nego što su dobijene vrednosti eventualnih nečistoća mobilne faze, kao i modifikovanjem opsega skeniranja, kako bi bile prikazane samo veće vrednosti m/z . Većina analiza koje se sprovode korišćenjem HPLC tehnike, najčešće se izvode na reverzno-faznim sistemima. Najviše korišćene kolone sadrže stacionarnu fazu od hemijski modifikovanog silicijum-dioksida, čija modifikacija određuje interakcije koje se mogu uspostaviti između stacionarne faze i analita [245]. Jedna od modifikacija ogleda se u vezivanju C_{18} alkil-grupe za površinu silike. Za razliku od gasne hromatografije, u kojoj pri visokim temperaturama stacionarna faza može uticati na pojavu velikog šuma u detektoru, u HPLC tehnici to nije slučaj, sem ukoliko je pH mobilne faze takav da uzrokuje raspadanje stacionarne faze.

Odabir pogodnog detektora je od suštinske važnosti u tečnoj hromatografiji visokih performansi. Detektori koji su pronašli najveću primenu su UV/DAD, fluorescentni, elektrohemijski, refraktometrijski (eng. *refractive index detector* - RID), radiohemijski, maseno-spektrometrijski, NMR, konduktometrijski, detektor rasipanja svetlosti na isparenom uzorku (eng. *evaporative light scattering detector* - ELSD) i detektori za blisku infracrvenu oblast [244, 246, 247].

Klasifikacija detektora se može izvršiti na:

- Selektivne i opšte detektore;
- Detektore osetljive na promenu koncentracije ili mase.

Selektivni detektori prate određeno svojstvo karakteristično za analit (apsorpcija u UV ili VIS području, m/z jona, struja usled elektrohemijske reakcije, fluorescencija i sl.). Univerzalni (opšti) prate svojstva rastvora kao celine, npr. indeks prelamanja, sadržaj neisparljivih materija, elektroprovodljivost itd.

U HPLC tehnici UV apsorpcija je način detektovanja koji se najviše primenjuje sa osobinama i selektivnog i opšteg detektora. Detekcija se zasniva na merenju apsorpcije ispitivane supstance na određenoj talasnoj dužini, a prema *Lambert-Beer*-ovom zakonu apsorpcija je direktno proporcionalna koncentraciji ispitivane supstance u rastvoru. Ukoliko je poznat maksimum apsorpcije ispitivane supstance (λ_{\max}), može se primeniti UV detektor kao specifičan za datu ispitivanu supstancu.

Međutim, UV apsorpcija ne predstavlja dovoljno selektivan način detektovanja, zbog šireg opsega supstanci koje mogu imati sličan ili približno isti maksimum apsorpcije i veoma široke spektralne trake - čak i ako se apsorpcioni maksimumi razlikuju za par desetina nm, trake će se i dalje preklapati. U tu svrhu se koristi DAD, koji omogućava praćenje više odnosa talasnih dužina i apsorpciji. Slaganje takvih odnosa između referentne supstance i ispitivane, omogućava pouzdaniji rezultat slaganja, s tim što se i tada ne može postići maksimalna pouzdanost u dobijeni rezultat. Mnogi organski molekuli koji imaju aromatičnu strukturu ili konjugovane dvostruke veze apsorbuju zračenje u UV delu zračenja na 254 nm i ukoliko se koristi ova talasna dužina, takav detektor se može smatrati opštim za organska jedinjenja. Postoji mogućnost korišćenja i indirektno UV detekcije u kojoj se mobilnoj fazi dodaje supstanca koja apsorbuje u UV delu spektra. Praćenjem menjanja pozadinskog signala koji se smanjuje, kada se detektuje ispitivana supstanca, koja ne apsorbuje u UV oblasti, moguće je apsorbovati takve supstance. Na principu ekscitacije uzorka UV zračenjem radi fluorescentni detektor. Nakon ekscitacije uzorak emituje zračenje najčešće veće talasne dužine, odnosno fluorescira. Određivanje se vrši preko retencionog vremena i talasnih dužina ekscitacije i emisije, čime se ujedno postiže i veća selektivnost. Ovome ide u prilog i činjenica da samo oko 10% organskih jedinjenja može da fluorescira a, takođe, je mnogo bolji odnos S/N.

Jedan od opštih detektora koji ima veliku primenu je RID detektor, koji prati promene u refrakcionom indeksu efluenta, dok se ispitivana supstanca eluira kroz kolonu. Intenzitet struje koja nastaje kao posledica elektrolitičke oksidacije ili redukcije ispitivane supstance na površini elektrode meri elektrohemijski detektor. Ovi detektori su jako osetljivi i selektivni.

Poput UV detektora, maseni spektrometar se može koristiti i kao opšti i kao specifični detektor. Skeniranjem celog masenog spektra postiže se detekcija svih jonizabilnih komponenata pri datim uslovima, dok se snimanjem odabranih jona ili tandemskom masenom spektrometrijom (MS^n) postiže specifično detektovanje ispitivanih supstanci.

Poslednja klasifikacija se odnosi na proporcionalnost detektovanog signala sa koncentracijom ili ukupnom količinom ispitivane supstance koja prođe kroz detektor. Ova klasifikacija je od posebne važnosti za kvantitativno određivanje. Ako se protok mobilne faze poveća, koncentracija ispitivane supstance koja dolazi do koncentracijski osetljivog detektora ostaje ista, ali se količina pristigle supstance u jedinici vremena menja, prouzrokujući dobijanje užeg pika sa manjom površinom, a istom visinom [248].

Sa stanovišta maseno-osetljivog detektora, povećanje protoka će, takođe, prouzrokovati sužavanje pikova, ali će intenzitet naglo porasti. Pod ovakvim uslovima, MS se može primeniti kao maseno-osetljivi detektor. Prednosti korišćenja MS kao detektora, ogledaju se u mogućnostima detektovanja supstanci sa sličnim retencionim karakteristikama, kao i detektovanja supstanci koje se nisu u potpunosti razdvojile tokom hromatografisanja. Upotreba MS kao detektora omogućila je mnoge prednosti prilikom korišćenja HPLC tehnike. Naime, upotrebom komercijalno dostupnih HPLC-MS interfejsa moguće je izučavati široki spektar supstanci, od niskomolekularnih metabolita do visokomolekularnih biopolimera. MS omogućava identifikaciju pružanjem masenih i strukturnih informacija o željenom analitu. Visoka selektivnost MS omogućava identifikaciju komponenata koje su delimično razdvojene HPLC. Visoka selektivnost, omogućava i upotrebu izotopno označenih analita, kao internih standarda, koji zajedno sa visokom osetljivošću detektora obezbeđuju veoma tačnu i preciznu kvantitativnu analizu [248].

2.7.1 Hromatografske karakteristike

Mogućnosti hromatografskog sistema da uspešno razdvoji komponente ispitivanog uzorka zavisiće od performansi samog sistema, koje se mogu opisati sledećim teoretskim parametrima [244]. Vreme potrebno da se analit eluira kroz hromatografsku kolonu naziva se *retenciono vreme*, t_r . Kako će ovo vreme zavisiti od dužine kolone i protoka mobilne faze, korisnije je da se koristi *faktor kapaciteta*, k' , koji povezuje retenciono vreme sa vremenom eluiranja mobilne faze, tj. supstanci koje se ne zadržavaju u koloni, jer nemaju interakcije sa stacionarnom fazom, t_0 . Matematička zavisnost je prikazana sledećom jednačinom:

$$k' = \frac{t_r - t_0}{t_0}$$

Poželjno je da se vrednosti k' kreću između 1 i 10. Efikasnost razdvajanja dve komponente, na primer, A i B, izražava se *faktorom selektivnosti*, α , koji predstavlja odnos faktora kapaciteta.

$$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A} = \frac{t_{r_b} - t_0}{t_{r_a} - t_0}$$

Još jedna mera uspešnosti koja, za razliku od selektivnosti, uzima u obzir i širenje pikova hromatografskog razdvajanja jeste *rezolucija*, koja se matematički može opisati sledećom jednačinom:

$$\text{Rezolucija} = \frac{t_{r_b} - t_{r_a}}{0,5 (w_a + w_b)}$$

u kojoj su w_a i w_b širine pikova pri baznoj liniji nastalih odgovorom detektora dveju komponenti. Efikasnost kolone se može prikazati brojem teoretskih podova, N , koji zavisi od dužine kolone, L , ili ekvivalentom visine teoretskog poda, H , koji ne zavisi od L . Matematička zavisnost N , t_r i w se može prikazati sledećom jednačinom:

$$N = 16 \left(\frac{t_{r_a}}{w_a} \right)^2 = 5,54 \left(\frac{t_{r_a}}{w_{0,5}} \right)^2$$

Ekvivalent visine teoretskog poda, H , i rezolucija, R , mogu se predstaviti sada kao:

$$H = \frac{L}{N}$$

$$\text{Rezolucija} = 0,25 \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k'_B}{1 + k'_B} \right)$$

u kojoj je k'_B faktor kapaciteta druge od dve komponente, a N broj teoretskih podova meren za tu komponentu [249]. Ukoliko primenjeni detektor nije dovoljno selektivan, tj. ne može se izolovati signal koji potiče samo od analizirane supstance iz ispitivanog uzorka, uspešnost detektovanja zavisice od hromatografske rezolucije, koja mora da omogući signal, koji se može izmeriti sa dovoljno pouzdanosti i preciznosti. Velika prednost MS-a je njegova sposobnost da koristi nastale jone supstanci kao identifikacioni faktor svake supstance, za razliku od, na primer, UV detektora [244, 247, 250, 251].

Kao i drugim hromatografskim tehnikama, identifikacija komponenata HPLC-om se izvodi upoređivanjem retencionih karakteristika traženih nepoznatih supstanci sa retencionim karakteristikama referentnih materijala pod istim eksperimentalnim uslovima. Vrlo često se upoređuje retenciono vreme, ali ovaj parametar se može promeniti sa dužinom kolone ili protokom mobilne faze, pa je preporučljivije da se upoređuju faktori kapaciteta koji isključuju moguće opisane promene. Ukoliko se koristi samo ovaj parametar prilikom identifikacije, identifikacija može biti otežana, jer mnoge supstance poseduju približno iste vrednosti k' . Način da se prevaziđe ovakav problem leži u promeni hromatografskog sistema, što u slučaju HPLC tehnike znači promenu mobilne faze i ponovno određivanje vrednosti k' , prilikom čega supstance koje su imale približno iste vrednosti faktora kapaciteta u drugom sistemu rastvarača mogu imati veoma različite te faktore, pa ih je tada moguće lakše identifikovati. Potpunija i pouzdanija identifikacija se postiže kombinovanjem retencionih karakteristika sa informacijama dobijenih od spektrometrijskih detektora.

Detektori koji pružaju najviše informacija su DAD detektor, koji omogućava snimanje celog UV spektra analita dok izlazi sa kolone i MS detektor. UV spektar omogućava određivanje klase jedinjenja, pri čemu MS pruža podatke o molekulskim masama, kao i strukturnih podataka [252].

Kvantifikacija u HPLC tehnici, svodi se na upoređivanje intenziteta signala analita (visine ili površine pika) sa intenzitetom signala nekog referentnog materijala pod istim eksperimentalnim uslovima. Performanse kvantitativne analize mogu se opisati nizom parametara; uključujući šum, granicu detekcije, linearni i dinamički opseg. Šum se može definisati kao promena signala detektora bez prisustva analita u toku vremena. U praksi odsustvo šuma u odsustvu analita je neuobičajeno, jer komponente mobilne faze, varijacije u temperaturi, oscilacije struje mogu uzrokovati električne ili hemijske promene u odgovoru detektora, što može prouzrokovati pomeranje bazne linije koju čini idealni odgovor detektora na sistem bez analita. Intenzitet signala analita u odnosu na šum označava se kao signal-šum odnos [253]. *Linearni opseg* predstavlja opseg u kome je signal analita linearno proporcionalan količini analita. Iznad ovog opsega, unos većih količina analita prouzrokuje povećanje signala, ali ono više nije u direktno proporcionalnom odnosu sa količinom analita. Taj deo se naziva *dinamičkim opsegom* i prilikom dostizanja limita dinamičkog opsega, detektor ne daje veći odziv signala na sve veći unos količine analita, odnosno smatra se da je detektor zasićen.

Preciznost i tačnost HPLC tehnike su parametri od najvećeg značaja prilikom tumačenja dobijenih rezultata. O ovim parametrima biće više reči u delu *Rezultati i diskusija*.

2.8 Masena spektrometrija

Princip rada masenog spektrometra zasniva se na razdvajanju jonizovanih atoma ili molekula na osnovu razlike u odnosu njihove mase prema naelektrisanju, m/z . Joni se stvaraju iz neutralnih vrsta koje dobijaju pozitivno ili negativno naelektrisanje. Kada se formiraju, joni se elektrostatički usmeravaju u maseni analizator, gde se razdvajaju po m/z i na kraju detektuju. Masena spektrometrija, stoga, služi za kvantifikaciju atoma ili molekula, kao i za dobijanje hemijskih i strukturnih informacija o određenom molekulu. S obzirom na to da molekuli imaju različite fragmentacione profile, na ovaj način može se doći do informacija o strukturi jedinjenja, odnosno tako izvršiti njihova identifikacija.

Četiri osnovne komponente masenog spektrometra su: sistem za unošenje uzorka, jonski izvor, maseni analizator i jonski detektor. Kod nekih instrumenata su sistem za unošenje uzorka i jonski izvor kombinovani, dok su kod nekih kombinovani maseni analizator i detektor. U svakom slučaju, uzorak prolazi kroz isti proces. Uzorak se unosi u instrument kroz sistem za unošenje uzorka, molekuli se u jonskom izvoru pretvaraju u jone, pre nego što se elektrostatički ubrzavaju prema masenom analizatoru. Joni se tada razdvajaju prema njihovom m/z odnosu u masenom analizatoru, nakon čega detektor generiše električni signal, koji se prenosi na računar [244].

U sistemu za unošenje uzorka vrši se isparavanje, kako bi se prisutni molekuli preveli u gasovito stanje. Ne prelaze nužno svi molekuli u gasnu fazu (naročito kod ESI pri višim protocima), niti oni nužno prelaze u gasnu fazu pre jonizacije (kod ESI, dolazi do isparavanja jona). Kod nekih vrsta jonizacije gasoviti molekuli izlažu se bombardovanju elektronima u jonskom izvoru, a kao rezultat stvaraju se jednostruko ili višestruko naelektrisani joni. U masenom analizatoru kvadrupolu ili jonskoj zamci ovi joni se razdvajaju pod dejstvom promenljivog magnetnog polja, tako da svakoj vrednosti magnetnog polja odgovara određena jonska vrsta okarakterisana svojim odnosom m/z .

Ovako razdvojene jonske vrste stižu do detektora koji registruje njihovo prisustvo i relativnu koncentraciju. U masenom spektrometru idealne konstrukcije, jon na putu od jonskog izvora do detektora ne bi smeo da se sudari sa drugim jonom ili molekulom, sem namerno, kao npr. u kolizionoj ćeliji. U praksi, ovo je moguće samo približno postići održavanjem visokog vakuuma, ispod 10^{-5} torr (mm Hg) u celom instrumentu, pri čemu je srednja dužina slobodnog puta jona znatno veća od puta koji bi jon prevalio od trenutka stvaranja pri atmosferskom pritisku. Jedno od neslaganja HPLC i MS ogleda se u činjenici da HPLC koristi tečnu mobilnu fazu, najčešće sa određenom količinom vode, sa protokom od 1 mL min^{-1} , dok maseni spektrometar mora da radi pod uslovima visokog vakuuma. Postojanje interfejsa koji povezuje dva uređaja, pre svega, obezbeđuje uklanjanje neželjene mobilne faze, održavajući konstantan protok maksimalne količine analita u MS. Ovo se mora postići ne ometajući rad MS-a [244, 254, 255].

2.8.1 Metode jonizacije

Metoda jonizacije podrazumeva mehanizam po kome se odigrava jonizacija, dok je jonski izvor uređaj koji omogućava da se jonizacija odigra. Metode jonizacije su: jonizacija neutralnog molekula izbacivanjem elektrona, apsorpcijom elektrona, protonacijom, katjonizacijom, anjonizacijom, deprotonizacijom ili prevođenjem naelektrisanog molekula iz kondenzovane faze u gasnu fazu.

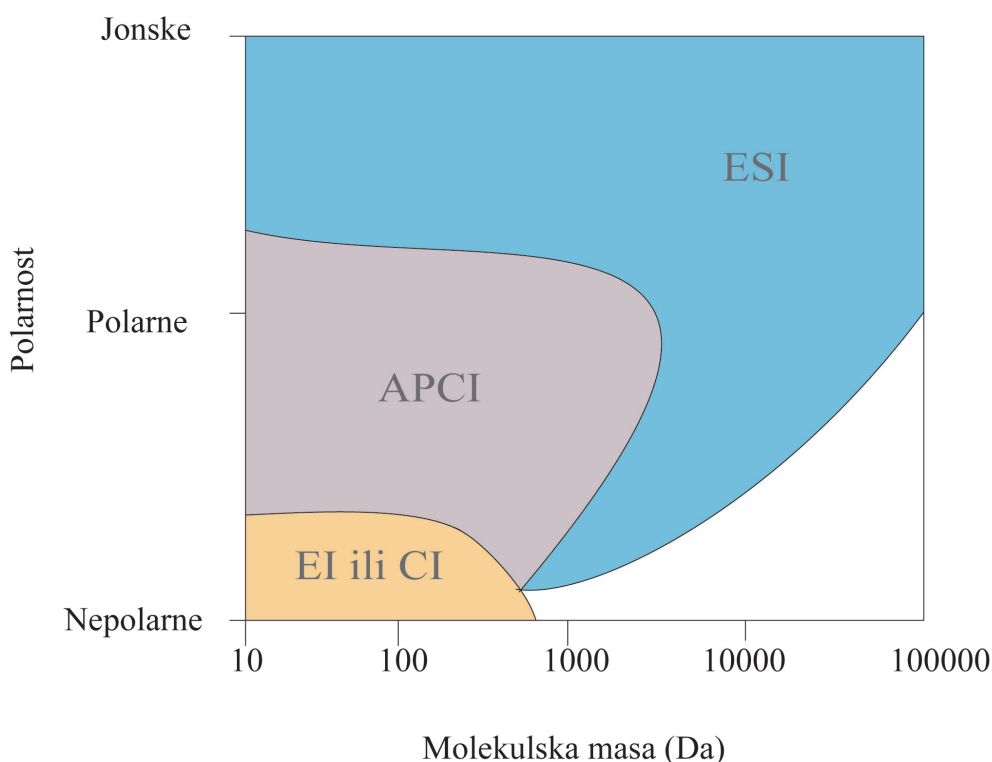
Metoda jonizacije **izbacivanjem elektrona** postiže se izbacivanjem elektrona iz spoljašnjeg elektronskog omotača da bi se dobilo +1 pozitivno naelektrisanje. Javlja se najčešće kod elektronjonizacionih (EI) jonskih izvora i obično se vrši na relativno nepolarnim jedinjenjima sa malim molekulskim masama, a kao njen proizvod nastaje veliki broj fragmentnih jona.

Protonizacija je metoda jonizacije u kojoj se proton dodaje molekulu, čime se dobija neto pozitivno naelektrisanje od +1 po svakom dodatom protonu. Peptidi se često jonizuju metodom protonizacije.

Deprotonacija je jonizaciona metoda kod koje se neto negativno naelektrisanje od -1 postiže uklanjanjem protona iz molekula. Ovaj mehanizam jonizacije veoma je koristan za jonizaciju kiselih molekula, kao što su fenoli, karboksilne kiseline i sulfonske kiseline.

Katjonizacija je metoda jonizacije koji stvara naelektrisani kompleks nekovalentnom adicijom pozitivno naelektrisanih jona na neutralan molekul. Korisna je za molekule koji se teško protonuju. Vezivanje katjona koji nije proton je manje kovalentno, tako da naelektrisanje ostaje lokalizovano na katjonu. Ovo minimalizuje delokalizaciju naelektrisanja i fragmentaciju molekula. Postiže se pomoću matriksom potpomognute laserske desorpcije i jonizacije (eng. *matrix-assisted laser desorption/ionization* – MALDI), elektrosprej jonizacijom i hemijskom jonizacijom pri atmosferskom pritisku. Ugljeni hidrati su odlični kandidati za katjonizaciju, a Na^+ je uobičajeni katjon.

Prenos već naelektrisanih jedinjenja obično se dešava desorpcijom ili izbacivanjem naelektrisane vrste iz kondenzovane faze u gasnu fazu kod MALDI i ESI izvora. Metoda apsorpcije elektrona obuhvata neto negativno naelektrisanje od -1, koje se postiže apsorpcijom ili hvatanjem elektrona. Ovaj mehanizam je karakterističan za molekule sa visokim afinitetom prema elektronima, poput halogenih jedinjenja [244, 256]. Izbor jonskog izvora zavisi od polarnosti i molekulske mase ispitivane supstance, kao što je prikazano na slici 2.16.

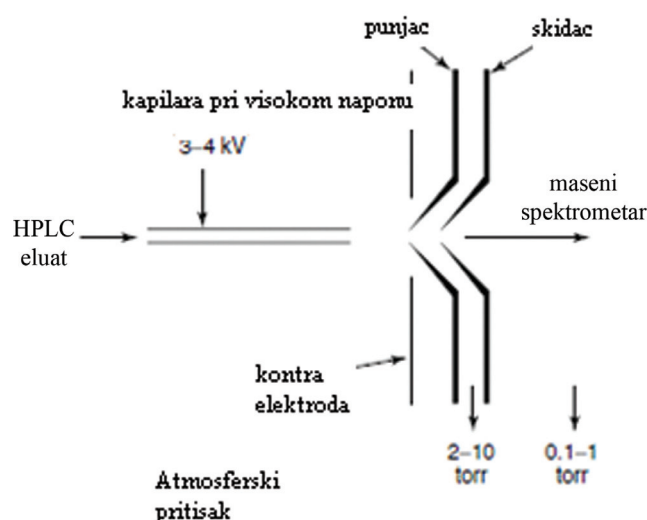


Slika 2.16. Izbor jonskog izvora u zavisnosti od polarnosti i molekulske mase ispitivane supstance [258]

Problem jonizacije termolabilnih komponenti je delimično prevaziđen bombardovanjem brzim atomima/jonima (eng. *fast atom/ion bombardment* - FAB), koje se temelji na činjenici da je obezbeđivanje energije molekulu brže nego njegova dekompozicija. Upotreba FAB-a limitirana je u slučaju analize jedinjenja većih molekulskih masa, pa je neophodno primeniti hemijske metode, poput enzimatske hidrolize, koja omogućava dobijanje manjih molekulskih masa pogodnih za jonizaciju. Neohodni uslovi za korišćenje FAB jonizacije obuhvataju i korišćenje odgovarajućih detektora koji su u stanju da detektuju velike molekulske mase, pošto detektori poput elektronskog multiplikatora ne poseduju dovoljnu efikasnost, što se odražava na nabavnu cenu uređaja, čineći je veoma skupom.

Elektrosprej jonizacija je jonizaciona metoda koja prevazilazi ovakve probleme. Tečnost u kojoj je rastvoren analit se propušta kroz metalnu kapilaru (nebulajzer) na atmosferskom pritisku pod visokim naponom. Napon na kapilari proizvodi električni gradijent na fluidu, koji razdvaja tečnost na visokonaelektrisane kapljice, koje nailaze na struju azota, koja omogućava njihovu desolvataciju

na putu ka masenom analizatoru [257]. Veličina kapljica se smanjuje do momenta kada kulonovsko odbijanje na površini premašuje površinski napon i kapljice eksplodiraju u manje kapljice, ispuštajući jone. Kako se jonizacija izvodi direktno iz rastvora, termolabilne komponente mogu se jonizovati bez njihove degradacije. Za razliku od drugih jonizacionih izvora, većina proizvedenih jona su visoko naelektrisani, što je od velikog značaja, zbog činjenice da maseni spektrometar meri m/z odnos, pa se maseni opseg instrumenta ovim bitno može povećati. Shema elektrosprej HPLC-MS interfejsa prikazana je na slici 2.17.



Slika 2.17. Shema elektrosprej HPLC-MS interfejsa [254]

ESI predstavlja takozvanu “najmekšu” tehniku jonizacije, jer joni poprimaju niske energije pa ne dolazi do fragmentacije u značajnoj meri, stoga je pri manjim energijama jonizacije na masenom spektru dominantan protonovani jon $[M+H]^+$. Generalno, supstance koje se ovim jonskim izvorom mogu analizirati su neutralna ili polarna jedinjenja, koja se mogu protonovati, deprotonovati, graditi adukte sa katjonima ili anjonima, ili poseduju permanentnu šaržu i nepolarna jedinjenja, koja podležu oksidaciji na vrhu elektrosprej kapilare. Vrsta mobilne faze, pH, viskozitet, provodljivost, površinski napon i polarnost, značajno utiču na elektrosprej proces. ESI je metoda koja se rutinski koristi kod analize peptida, proteina, ugljenih hidrata, manjih oligonukleotida, veštačkih polimera i lipida. Elektrosprej niskog protoka naziva se još i nanoelektrosprej, nanosprej i mikroelektrosprej jonizacija. Jonski izvor je varijanta ESI, gde je sprej kapilara veoma mala i pozicionirana blizu ulaza u maseni analizator. Rezultat ovih promena je povećana efikasnost i smanjenje potrebne količine uzorka [244].

Hemijska jonizacija pri atmosferskom pritisku je važna metoda jonizacije, jer generiše jone direktno iz rastvora i omogućava analizu relativno nepolarnih jedinjenja. Ovaj jonski izvor se napaja tečnim uzorkom. APCI sadrži zagrejani isparivač, koji pomaže brzu desolvataciju i isparavanje kapljica, nakon čega se ispareni molekuli provode dalje kroz ovaj uređaj pri atmosferskom pritisku. Jonizacija se javlja, jer je rastvarač ekscitovan i jonizovan zbog pražnjenja u koroni. Hemijska jonizacija analita je veoma efikasna, jer se analit često sudara sa jonima reagensa, pošto su joni izloženi atmosferskom pritisku.

Fotojonizacija pri atmosferskom pritisku postala je važan jonizacioni izvor, jer može da generiše jone direktno iz rastvora, sa malo pozadinske jonizacije, i može da analizira relativno nepopularna jedinjenja. Često je APPI mnogo osetljivija od ESI i APCI i ima veći odnos signala i šuma zbog niže pozadinske jonizacije, što je prouzrokovano visokim jonizacionim potencijalom standardnih rastvarača, koje ne jonizuje kriptomna lampa.

Matriksom potpomognuta laserska desorpcija i jonizacija je jonski izvor koji je našao najveću primenu u analizi peptida, proteina i većine biomolekula. Upotreba MALDI-ja za analizu heterogenih uzoraka čini ga veoma atraktivnim za masenu analizu kompleksnih bioloških uzoraka. Iako je tačan mehanizam MALDI-ja nepoznat, veruje se da MALDI uzrokuje jonizaciju i prenos uzorka u gasnu fazu laserskom ekscitacijom.

Bombardovanje brzim atomima/jonima je jonizacija slična MALDI-ju po tome što koristi matriks i visokoenergetski zrak čestica za desorpciju jona sa površine. Razlike između MALDI-ja i FAB-a su sledeće: kod MALDI-ja energetski zrak je pulsno lasersko svetlo, dok je kod FAB-a kontinualni jonski zrak; kod MALDI-ja matriks je čvrsti kristal, a kod FAB matriks je tečan. FAB je oko 1000 puta manje osetljiv od MALDI-ja.

Jonizacija elektronima (eng. *electron ionization* - EI) je jedan od najvažnijih jonskih izvora za rutinske analize malih, hidrofobnih, termostabilnih molekula i ima široku upotrebu. Pošto EI obično proizvodi veliki broj fragmentnih jona, spada u "tvrde" jonske izvore. Međutim, informacije o fragmentima mogu biti veoma korisne. Korišćenjem baze podataka koja sadrži preko 400000 masenih spektara dobijenih jonizacijom elektronima moguće je identifikovati nepoznato jedinjenje u nekoliko sekundi (pod uslovom da postoji u bazi). Ove baze, kombinovane sa računarskim memorijskim kapacitetima i pretraživačkim algoritmima, omogućavaju brzo upoređivanje sa ovim bazama, što uveliko olakšava identifikaciju malih molekula.

Hemijska jonizacija (CI) se primenjuje na slične uzorke kao i EI i prvenstveno se koristi za povećanje obilnosti molekularnog jona. CI koristi gasno-faznu jon-molekulsku reakciju u vakuumu da proizvede jone analita. Proces inicira reagens-gas koji se jonizuje sudarom sa elektronima. Dolazi do jon-molekulске reakcije između jona reagens-gasa i neutralnih molekula gasa. Neki proizvodi reakcije mogu da reaguju sa analitom i proizvode jone. Takođe, kao kod EI, uzorak mora da bude stabilan na povišenoj temperaturi, jer se isparavanje vrši zagrevanjem [244, 258].

2.8.2 Razdvajanje jona

Nakon proizvodnje jona korišćenjem odgovarajuće jonizacione metode, neophodno je razdvojiti jone po m/z odnosu, odrediti taj odnos i nakon toga izmeriti relativni intenzitet svake grupe jona. Sa razvojem metoda jonizacije usledio je i razvoj masenih analizatora, kako bi se zadovoljili zahtevi analize širokog spektra biomolekula sa ppm tačnošću merenja mase i sa osetljivošću manjom od femtomola (10^{-15} mola).

Najveća prepreka u razvoju masenih analizatora, bilo je spajanje jonskog izvora sa atmosfers-

kim pritiskom (760 Torr) sa analizatorom u kome se održava pritisak od 10^{-5} do 10^{-11} Torr.

Postoji više masenih analizatora od kojih svaki ima svoje prednosti i nedostatke. Performanse masenih analizatora mogu se predstaviti parametrima koji uključuju rezoluciju, brzinu skeniranja i raspon masa.

Rezolucija je moć analizatora da razlikuje 2 jona različitih odnosa m/z . Veća rezolucija znači povećanu mogućnost razlikovanja jona. Najčešća definicija rezolucije, R , data je sledećom jednačinom:

$$\text{Rezolucija} = M / \Delta M$$

gde je M odnos m/z , a ΔM predstavlja širinu pika na polovini njegove maksimalne visine. Rezolucija instrumenta određuje, do neke mere, tačnost instrumenta. Prosečna molekulska masa se računa korišćenjem izmerene prosečne mase svih izotopa svakog elementa od kojih se molekul sastoji. Monoizotopska masa se računa korišćenjem mase izotopa koji je najprisutniji u molekulu. Ako instrument ne može da razdvaja izotope, proizvešće širok pik čiji će centar predstavljati prosečnu masu. Veća rezolucija može da doprinese razdvajanju izotopa elemenata.

Brzina skeniranja se odnosi na brzinu kojom analizator skenira određeni raspon masa. Većini instrumenata su potrebne sekunde da izvrši celo skeniranje, ali ovo može drastično da varira u zavisnosti od analizatora. Na primer, TOF analizator završi analizu u nekoliko milisekundi ili manje.

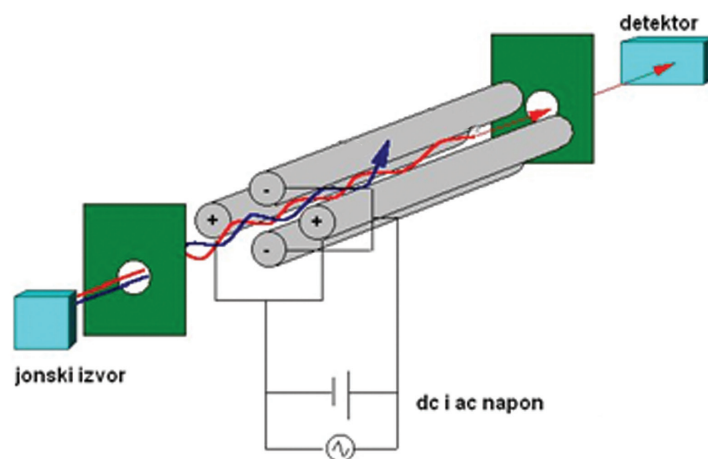
Raspon masa se odnosi na raspon m/z masenog analizatora. Na primer, kvadrupolni analizator može da skenira m/z do 3000, analizator sa magnetnim sektorom do 10000, a analizator sa vremenom preleta, TOF, ima skoro neograničen domet [244].

2.8.3 Maseni analizatori

Utvrđeno je da su izvori jona međusobno različiti po načinu dobijanja jona. ESI proizvodi jone u kontinualnoj struji i stoga kvadrupol predstavlja odgovarajući analizator za ESI. MALDI, na primer, generiše jone kratkim, nanosekundskim laserskim pulsevima i kompatibilan je sa TOF analizatorom, koji precizno meri tajmirane jonske pakete.

Kvadrupolni maseni analizatori se koriste sa EI veoma dugo, kao najčešće korišćeni maseni analizatori, ali su našli novu primenu u kombinaciji sa ESI i APCI. Kvadrupoli imaju 3 prednosti. Tolerantni su na relativno visoke pritiske, mere priličan raspon masa (m/z do 4000), što je korisno pri ESI analizi proteina i ostalih biomolekula (uobičajene m/z su 1000-3500) i relativno su jeftini. Šipke analizatora (slika 2.18) su spojene paralelno na izvor radiofrekventne (RF) i jednosmerne struje (DC). Suprotne šipke su povezane električnim putem kao par. Dve šipke jednog para u bilo koje vreme imaju potencijal istog intenziteta, ali suprotnog znaka. RF polje omogućava transmisiju jona, a DC (jednosmerni) napon filtrira određenu m/z . Joni koji nemaju stabilnu putanju se sudaraju sa šipkama i nikada ne stižu do detektora. Teži (tromiji) joni uglavnom reaguju na DC komponentu polja, dok lakši (brži) joni takođe reaguju i na naizmeničnu RF komponentu. Jedan par šipki igra ulogu filtera gornje

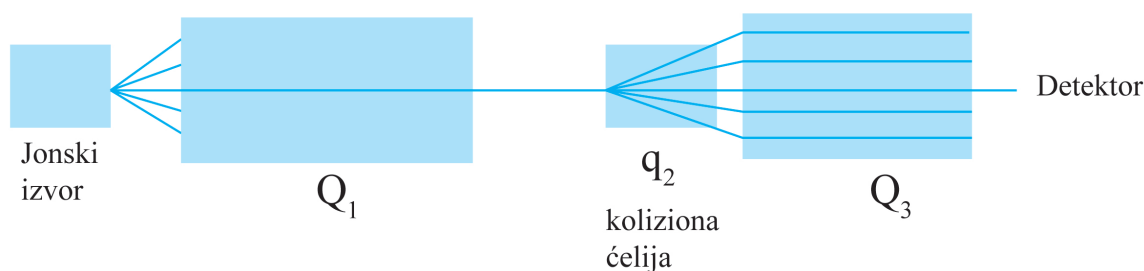
granice i tera teže jone u sredinu između elektroda. Joni manje mase reaguju brzo, jednom u svakom ciklusu, dok je neto sila DC i RF komponenti privlačna kratko vreme. Ukoliko je masa jona dovoljno mala, joni se ubrzavaju prema jednoj od elektroda i udaraju u nju pre nego što sila ponovo promeni smer. Drugi par šipki igra ulogu filtera donje granice. Joni veće mase će reagovati na privlačnu silu i udariće jednu od elektroda. Joni male mase će, takođe, osetiti privlačnu silu tokom većine vremena, ali će jednom u ciklusu, reagovati na silu odbijanja i odbiti se prema sredini između elektroda. Joni koji imaju stabilnu putanju i kroz filter gornje granice i kroz filter donje granice proći će kroz uski otvor i biti detektovani. Maseni spektar se dobija skeniranjem odnosa DC i RF potencijala i snimanjem obilnosti detektovanih jona. Kada se radi samo sa RF (bez saopštavanja DC voltaže), joni širokog opsega m/z prolaze kroz analizator [244].



Slika 2.18. Kvadrupolni maseni analizator [259]

Tandemska masena analiza (MS^n) je tehnika koja pruža mogućnost da maseni analizator razdvaja molekulske jone, proizvodeći iz njih fragmentne jone, čiju masu potom meri. Fragmentni joni služe za strukturna određivanja izvornih molekulskih jona. Mala je verovatnoća da sama molekulska masa bude dovoljna za određivanje strukture jedinjenja, pa se taj problem prevazilazi upotrebom tandemske masene analize, MS^n . Spregnuta masena analiza je termin koji pokriva veliki broj tehnika u kojima se jedan stupanj masene spektrometrije, ne mora biti prvi, koristi za izolovanje jona od interesa, dok druga faza služi za određivanje zavisnosti tog jona sa ostalim u sistemu [260, 261]. Trostruki kvadrupol (QqQ ili MS/MS) je najzastupljeniji uređaj za MS^n tehniku. Hardver se sastoji od tri kvadrupola u seriji (slika 2.19). U kolizionu ćeliju (drugi kvadrupol, Q2) ulazi jon prekursor iz Q1 (MS1) i u njoj se vrši njegova fragmentacija. Q3 (MS2) dalje razdvaja dobijene fragmente (u scan ili SIM modu). Obično se tandem MS eksperimenti izvode sudarom odabranog jona atomima inertnih gasova (Ar, He) i filtriranjem i merenjem (u scan ili SIM modu) prekursora i produkata. MS^n se koristi za određivanje sekvence amino kiselina, strukturnih karakteristika ugljenih hidrata, manjih oligonukleotida, lipida, fenolnih jedinjenja, pesticida, mikotoksina, itd. [244].

Termin “spregnuta” ili “tandem masena analiza” potiče od činjenice da su spregnuti u prostoru ili vremenu. Spregnuta masena analiza u prostoru se vrši uzastopnom analizom, dok se spregnuta masena analiza u vremenu vrši u istom analizatoru koji izoluje interesne jone, fragmentira ih i analizira.



Slika 2.19. Shema trostrukog kvadrupolnog masenog spektrometra, QqQ

Kvadrupolni maseni analizator sa jonskom zamkom razvijen je u isto vreme kao i kvadrupolni maseni analizator, i zbog toga su oba analizatora slična. Međutim, u masenom analizatoru sa jonskom zamkom, joni, umesto da prođu kroz kvadrupolni analizator pri odgovarajućoj elektromagnetnoj frekvenciji polja, bivaju zarobljeni u kvadrupolnom polju. Uređaj se sastoji od jedne prstenaste elektrode i dve tanjiraste, koje zatvaraju prsten sa donje i gornje strane, stvarajući tako komoru u kojoj su „zarobljeni“ joni različitih masa. Već generisani joni uvode se u zamku. Variranjem polja joni se ili skeniraju (izbacuju redom, prema m/z , u detektor) ili filtriraju (odbacuju se svi joni sem željene m/z). Zatim se podešavanjem polja može inicirati kolizija ovih jona sa gasom za “hlađenje”, što dovodi do fragmentacije. Dalje se dobijeni produkti ponovo skeniraju ili filtriraju. Veoma korisna osobina jonskih zamki je mogućnost da se izoluje jedna jonska vrsta izbacivanjem svih ostalih iz zamke. Izolovani joni se dalje mogu fragmentovati kolizijom aktivacijom i zatim detektovati. Glavna prednost kvadrupolnih jonskih zamki je brzina kojom se mogu izvoditi eksperimenti disocijacije izazvane sudarima bez prisustva drugih analizatora. Ostale bitne prednosti kvadrupolnih analizatora sa jonskom zamkom su njihova kompaktnost i sposobnost da zarobe i akumuliraju jone, kako bi se dobio bolji jonski signal [244, 263].

Najstariji maseni analizatori, **analizatori sa magnetnim sektorom**, su razdvajali jone u magnetnom polju. U magnetnoj analizi, joni se ubrzavaju u magnetno polje koristeći električno polje. Naelektrisana čestica putuje kroz magnetno polje po kružnoj putanji čiji prečnik zavisi od brzine jona, jačine magnetnog polja i m/z odnosa jona. Maseni spektar se dobija skeniranjem magnetnog polja i praćenjem jona kako udaraju o fiksiranu tačku detektora. U cilju povećanja rezolucije, magnetni instrumenti su modifikovani dodavanjem elektrostatičkog analizatora koji fokusira jone. Oni se nazivaju instrumentima sa duplim sektorom ili sa dva sektora [262]. Ovi analizatori sa dvostrukim fokusiranjem se koriste sa ESI, FAB i EI jonizacijom, ali nemaju široku primenu, prvenstveno zbog velikih dimenzija i uspeha TOF, kvadrupolnih analizatora sa ESI i MALDI jonizacijama [263].

Maseni analizatori sa vremenom preleta su najjednostavniji maseni analizatori. Oni su doživeli procvat sa pronalaskom MALDI-ja, a u poslednje vreme primenjuju se sa elektrosprej i elektronskom jonizacijom. TOF analiza je bazirana na ubrzanju grupe jona ka detektoru, gde se svim jonima saopštava ista količina energije pomoću razlike potencijala. Pošto svi joni imaju istu energiju, ali različitu masu, lakši joni prvi stižu do detektora zbog njihove veće brzine, dok težim jonima treba više vremena zbog njihove veće mase i sporije brzine. Otuda se ovi analizatori i zovu “masenim analizatorima sa vremenom preleta”, što znači da se masa određuje na osnovu vremena stizanja jona. Masa, naelektrisanje i kinetička energija jona, igraju ulogu u vremenu stizanja do detektora. Kom-

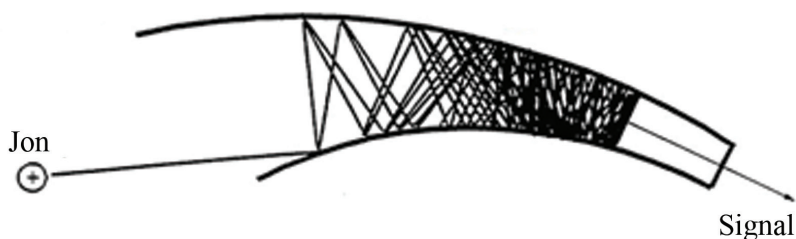
pletni maseni spektar se dobija nakon dovoljnog vremena da svi joni pristignu do detektora. Prednosti TOF uređaja jesu njegova visoka rezolucija i brzina skeniranja, što ga čini veoma pogodnim za analize HPLC-MS tehnikom [263].

2.8.4 Maseni detektori

Nakon što su joni razdvojeni u masenom analizatoru, oni stižu do jonskog detektora, koji proizvodi električni signal na osnovu upadnih jona. Najčešće korišćen detektor je elektronski multiplikator, koji prenosi kinetičku energiju upadnih jona na površinu koja proizvodi sekundarne elektrone (slika 2.20).

Elektronski multiplikator je sastavljen od dinode od aluminijum-oksida (Al_2O_3). Joni udaraju o površinu dinode, što prouzrokuje emisiju elektrona. Ovi elektroni se zatim kaskadno umnožavaju u cevi multiplikatora. Formira se kaskada elektrona, kao rezultat celokupnog rasta potencijala na nivou od jednog miliona ili više elektrona [244].

Dinoda visoke energije (eng. *high energy dinode* - HED) koristi ubrzavajuće elektrostatičko polje da bi se generisali elektroni. Time se obezbeđuje da u multiplikator ne dospeju joni, koji bi ga brzo zagadili, nego elektroni. Pošto signal elektronskog multiplikatora umnogome zavisi od brzine jona, HED služi da uveća signal, a time i osetljivost.



Slika 2.20. Shema elektronskog multiplikatora [264]

Primenu kao detektor ima i **Faradejeva šolja**, koja je bazirana na udarima jona o površinu diode, koji prouzrokuju emisiju sekundarnih elektrona, koji, dalje, indukuju pozitivno naelektrisanje na detektoru. Ostali detektori koji se koriste su: diodni konverzioni fotomultiplikatori, redni detektor, naelektrisani (induktivni) detektor i drugi [263-265].

2.8.5 Maseni spektri

Za potrebe identifikacije jedinjenja najčešće se vrši akvizicija u *scan* režimu, koja podrazumeva praćenje obilnosti jona u funkciji m/z . Tumačenje masenih spektara podrazumeva praćenje toka fragmentacije, na osnovu m/z i obilnosti dobijenih fragmenata, često uz korišćenje tandemskih eksperimenata [265].

Kvantitativna analiza se sastoji, kao i kod drugih tehnika, u upoređivanju intenziteta signala analita sa intenzitetima signala poznatih količina referentnih materijala. Neki od načina za dobijanje kvalitativnih podataka su *product ion scan*, *precursor ion scan*, *neutral loss*, *neutral gain*, ali za kvantitativne podatke koristi se samo praćenje odabranog jona i praćenje višestruke reakcije. Poznavajući m/z analita, korišćenjem SIM tehnike se povećava osetljivost i selektivnost uređaja, kao i brzina skeniranja jona. Poželjno je da joni budu većeg m/z odnosa, kako bi se sprečile eventualne interference uzrokovane jonima iz mobilne faze ili ostalih nekarakterističnih jona matriksa. Praćenjem višestruke

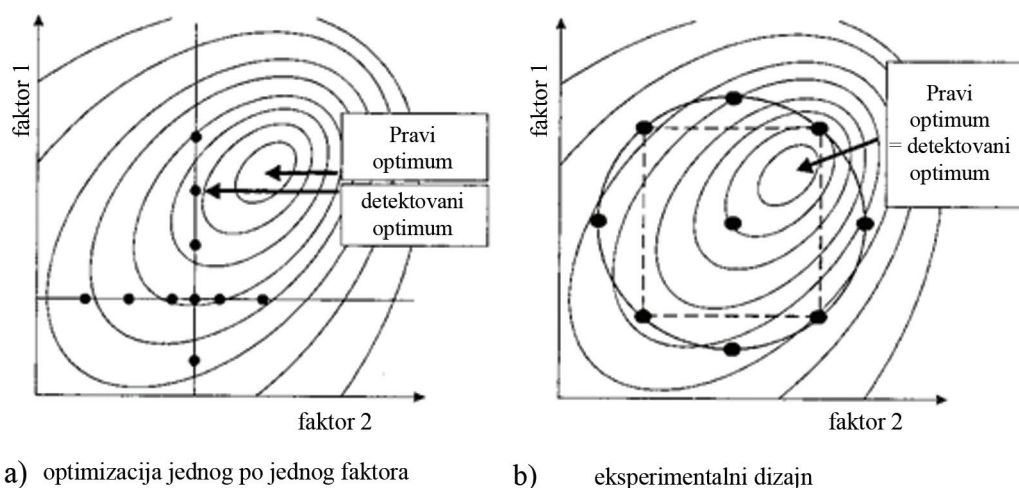
reakcije, prati se nastajanje dva fragmentna jona, jednog koji služi za kvantifikaciju, a drugog za kvalitativnu potvrdu ispitivanog jedinjenja. Joni koji nastaju fragmentacijom ili produkt joni koji se biraju za MRM su joni najjačeg inteziteta i određene specifičnosti.

O velikoj primeni HPLC-MS tehnike svedoče i mnoge naučne publikacije objavljene tokom poslednje decenije [262, 266-268].

2.9 Primena hemometrije u razvoju analitičkih metoda

Hemijska disciplina koja koristi matematičke, statističke i druge logičke metode za dizajniranje i odabir optimalnih eksperimenata i procesa merenja, kako da bi se dobio maksimum relevantnih informacija analiziranjem dostupnih hemijskih podataka naziva se hemometrija [269, 270].

Zbog svog sistematičnog pristupa hemometrija je našla primenu i u razvoju i optimizaciji analitičkih metoda. Klasičan pristup optimizaciji metode podrazumeva optimizovanje jednog po jednog faktora, dok se ostali faktori održavaju na konstantnom nivou. Takav način optimizacije ima mnoge nedostatke kao što su nemogućnost detektovanja interakcije različitih faktora i neuzimanje u razmatranje uzak opseg vrednosti faktora, kao i detektovanje vrednosti faktora koje često nisu i prave optimalne vrednosti ispitivanih faktora (slika 2.21a).



Slika 2.21. Poređenje dobijene i stvarne optimalne vrednosti faktora kod (a) klasičnog pristupa optimizaciji metode i (b) primenom eksperimentalnog dizajna [271]

S druge strane, primenom eksperimentalnog dizajna, svaki faktor se može ispitati i optimizovati u unapred definisanom opsegu izvođenjem relativno malog broja eksperimenata u kojima se vrednosti više faktora istovremeno menjaju. Ovim se postiže istovremena optimizacija celog sistema i otkrivanje njihove prave optimalne vrednosti, jer se uzima u obzir međusobni uticaj faktora na posmatrani sistem (slika 2.21b) [271].

2.9.1 Eksperimentalni dizajn

Metodologija planiranja i izvođenja eksperimenata u cilju dobijanja maksimalne količine informacija iz što manjeg broja eksperimenata naziva se eksperimentalni dizajn [272]. Poznavanje teorijske osnove ovakvog dizajna je bitno za njegovo dobro sprovođenje.

Smisao eksperimentalnog dizajna se zasniva na opštoj teoriji sistema, po kojoj je sistem ograničena celina koja se sastoji od ulaza, izlaza i transformacija koje se među njima dešavaju. Intenzitet ulaza i izlaza naziva se nivo.

Ulazi su veličine koje mogu, ali i ne moraju, imati uticaja na sistem i mogu biti označeni kao faktori. Faktori definišu kao promenljive koje utiču na određeni rezultat ili proces, odnosno imaju uticaja na sistem. Izlazi su veličine na koje može, ali i ne mora, da utiče sistem. Izlazi na koje sistem ima uticaja nazivaju se odzivi sistema. Vezu između faktora i odziva sistema predstavlja transformacija. Funkcija odziva ili matematički model je matematička funkcija koja opisuje ponašanje sistema i povezuje nivoe faktora i nivoe odziva sistema [273, 274].

Najjednostavniji matematički model koji povezuje faktore (nezavisno promenljive, označene sa x_1, x_2, \dots, x_n) i odziv sistema (zavisno promenljivu, označenu sa y) jeste linearni model ili polinom prvog reda:

$$y = b_0 + b_1 x_1 + b_2 x_2 + b_3 x_3 + \dots + b_n x_n + \varepsilon$$

gde je n ukupan broj faktora, ε greška, b_0 odsečak, a $b_1 x_1, b_2 x_2, \dots$, su linearni članovi.

Složeniji model predstavlja se polinomom drugog reda i naziva se interakcioni model. Interakcioni model sadrži odsečak, linearne članove i članove interakcija.

$$y = b_0 + b_1 x_1 + b_2 x_2 + b_3 x_3 + \dots + b_n x_n + b_{12} x_1 x_2 + b_{13} x_1 x_3 + \dots + b_{(n-1)n} x_{1n-1} x_n + \varepsilon$$

gde su $b_{12} x_1 x_2, b_{13} x_1 x_3, \dots, b_{(n-1)n} x_{1n-1} x_n$ članovi interakcija. Nelinearne veze između faktora i odziva sistema opisuje kvadratni model koji, za razliku od interakcionog modela, sadrži još i kvadratne članove:

$$y = b_0 + b_1 x_1 + b_2 x_2 + b_3 x_3 + \dots + b_n x_n + b_{12} x_1 x_2 + b_{13} x_1 x_3 + \dots + b_{(n-1)n} x_{1n-1} x_n + b_{11} x_1^2 + b_{22} x_2^2 + \dots + b_{nn} x_n^2 + \varepsilon$$

gde su $b_{11} x_1^2, b_{22} x_2^2, \dots, b_{nn} x_n^2$, kvadratni članovi [275, 276].

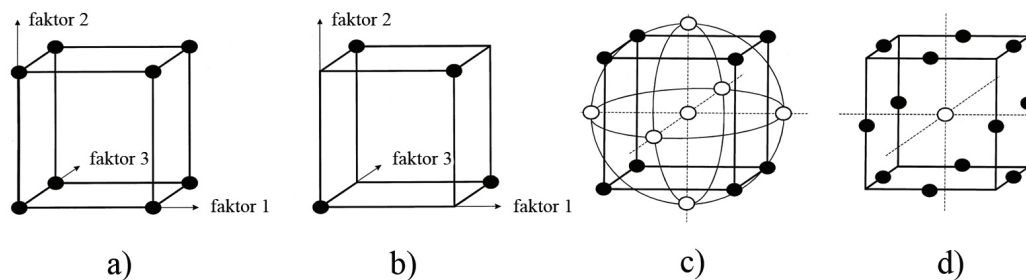
Pozitivni ili negativni koeficijenti u polinomima ($b_1, b_2, \dots, b_n, b_{12}, b_{13}, \dots$) ukazuju da li su faktor i odziv sistema u direktnoj ili obrnutoj srazmeri. Pozitivan koeficijent znači da se sa povećanjem vrednosti ispitivanog faktora, povećava i vrednost odziva sistema. U slučaju negativne vrednosti koeficijenta modela situacija je obrnuta. Najčešće postoji neslaganje eksperimentalno dobijene vrednosti odziva sistema, koje se označavaju sa y , i odzivima sistema koji su dobijeni računski iz polinoma koji opisuje model, a koji se označavaju sa \hat{y} [273, 277, 278].

O direktnoj vezi između ispitivanih faktora i odziva sistema govore koeficijenti linearnih članova. Koeficijenti kvadratnih članova su zaslužni za zakrivljenost površine odziva, a samim tim i pojavu minimuma i maksimuma. Zahvaljujući tome mogu se odrediti optimalni nivou

ispitivanih faktora. Prisutne interakcije između faktora opisuju koeficijenti članova interakcija. Značaj ovih koeficijenata se može proceniti preko površine odziva sistema. Na primer, ukoliko je površina odziva planarna, može se zaključiti da nema statistički značajnih interakcija. Ukoliko ima interakcija između dva faktora, intenzitet uticaja jednog faktora na odziv sistema zavisi od intenziteta drugog faktora [278, 279].

Izračunavanje koeficijenata modela se postiže uz pomoć statističkih programa koji koriste višestruku linearnu regresionu analizu (eng. *multiple linear regression*), regresionu analizu glavnih komponenata (eng. *principal components regression*) ili metodu parcijalno najmanjih kvadrata (eng. *partial least squares*). Kako su faktori i eksperimentalni opsezi, u kojima se oni ispituju različiti neophodno je kodirati nivoe da bi koeficijenti modela bili uporedivi, i da bi se mogli lakše tumačiti. Najučestaliji način kodiranja je matematički, pri čemu se niži, viši i srednji nivo kodiraju oznakama -1, +1 i 0. Veličina koeficijenata faktora određuje njihov značaj. Veći koeficijent znači i veći uticaj tog faktora na sistem. Statistička procena značaja se procenjuje najčešće uz pomoć Studentovog t -testa, F -testa ili grafika verovatnoće normalne raspodele (eng. *normal probability plots*). U slučaju Studentovog t -testa izračunata t -vrednost se upoređuje sa tabelarnom t -vrednošću za odgovarajući broj stepeni slobode i odabranu verovatnoću, pri čemu faktore čija je izračunata t -vrednost veća od tabelarne, smatramo značajnim [280]. Osim procene značaja faktora, neophodna je i procena postojanja neslaganje izabranog matematičkog modela i dobijenih eksperimentalnih podataka (eng. *lack of fit*) primenom analize varijanse (eng. *analysis of variance* - ANOVA) [273, 298].

Početna faza svakog istraživanja obično podrazumeva *screening* fazu, čiji je zadatak smanjenje broja eksperimenata na taj način što se procenjuje koji faktori imaju značajan uticaj na ponašanje sistema, kako bi se samo oni detaljnije ispitivali u sledećim fazama. Kao modeli najčešće se koriste linearni i interakcioni model, pa se kao *screening* dizajn najviše koriste pun faktorski i frakcioni faktorski dizajn [272, 277]. U *screening* dizajnu cilj je smanjenje broja eksperimenata, pa se najčešće faktori ispituju na dva nivoa (viši i niži nivo), a nivoi određuju na osnovu rezultata preliminarnih ispitivanja. Pun faktorski dizajn podrazumeva da se svi faktori ispituju na svim nivoima, a ukupan broj eksperimenata se računa kao 2^n ako se koriste dva nivoa, gde je n broj ispitivanih faktora. Ukoliko se ispituju tri faktora na dva nivoa ukupan broj eksperimenata je $2^3=8$ i eksperimenti se mogu prikazati kao uglovi kocke (slika 2.22a). Kako raste broj faktora, raste i broj eksperimenata koje je potrebno izvršiti, pa se vrši frakcionisanje faktorskog dizajna, odnosno izbacivanje određenih eksperimenata iz samog dizajna na osnovu pretpostavke da su interakcije između tri i više faktora zanemarljive u poređenju sa glavnim uticajem faktora i interakcijom između dva faktora [272]. Broj eksperimenata u takvom frakcionom faktorskom dizajnu je $2^{n-m}+C$, gde je n broj ispitivanih faktora, C je broj ponavljanja u centralnoj tački i m je ceo broj koji pokazuje kako je frakcionisan faktorski dizajn. Na slici 2.22b je predstavljen prostorni raspored eksperimenata 2^{3-1} frakcionog faktorskog dizajna, pri čemu eksperimenti imaju formu geometrijske figure tetraedara. To je najveća moguća zapremina koju mogu da ograniče četiri tačke u trodimenzionalnom prostoru uz izvođenje ograničenog broja eksperimenata.



Slika 2.22. Plan eksperimenata pri ispitivanju tri promenljive na dva nivoa u slučaju a) punog faktorskog dizajna, b) 2^{3-1} frakcionog faktorskog dizajna i c) centralnog kompozitnog dizajna d) *Box-Behnken-ov* dizajna [277]

Detaljnija analiza sistema postiže se upotrebom optimizacionih vrsta dizajna kod kojih se izabrani faktori ispituju na više nivoa. Njihov zadatak je optimizacija faktora koji imaju značajan uticaj na ponašanje sistema. U tu svrhu se najčešće koriste pun faktorski, centralno kompozitni ili *Box-Behnken-ov* dizajn [273, 278, 281-285]. Centralno kompozitni dizajn nastaje nadogradnjom punog ili frakcionog faktorskog dizajna aksijalnim dizajnom (slika 2.22c). Ukupan broj eksperimenata sa n faktora je $2^n + 2n + C$. Prvi deo jednačine se odnosi na faktorski dizajn, drugi deo na aksijalni dizajn, a treći je broj ponavljanja u centralnoj tački. Eksperimentalnu grešku određuje ponavljanje ispitivanja u centralnoj tački. Dužina grana u aksijalnom dizajnu (α) igra najznačajniju ulogu u izgledu centralnog kompozicionog dizajna. Ukoliko je $\alpha \neq 1$, svaka promenljiva će se ispitivati na pet nivoa ($-\alpha, -1, 0, +1, +\alpha$) [279, 281, 284, 285]. Vrednost α zavisi od broja faktora i može se izračunati kao $\alpha = 2^{n/4}$ [286]. Za određivanje optimalnih vrednosti ispitivanih faktora ova vrsta dizajna koristi kvadratni model i metodologiju površine odziva (eng. *response surface methodology* - RSM), koja predstavlja geometrijsku sliku odziva sistema u okviru eksperimentalnog regiona u funkciji jednog ili više faktora. Dobijeni odziv može biti prikazan kao linija u dvodimenzionalnom prostoru (ispituje se jedan faktor), površina u trodimenzionalnom prostoru (dva faktora se ispituju) ili hiperpovršina u višedimenzionalnom prostoru (ispituje se veći broj faktora). Na ovaj način je jednostavno utvrditi optimalnu vrednost za određeni faktor, jer ona predstavlja minimum ili maksimum na dobijenoj površini odziva. *Box-Behnken-ov* dizajn ima prednost nad ostalim u pogledu efikasnosti, odnosno odnosa između broja koeficijenata koji se javljaju u odabranom modelu i broja eksperimenata koje potrebno izvesti [172, 285, 298].

2.9.2 Funkcija poželjnog odziva

Korišćenjem metodologije površine odziva relativno je jednostavno utvrditi optimalnu vrednost za jedan faktor. Međutim, problem nastaje ako je potrebno optimizovati više faktora istovremeno. Ako se optimalne vrednosti ispitivanih faktora nalaze u različitim delovima eksperimentalne oblasti i pritom se ne preklapaju, problem je pronaći uslove koji istovremeno zadovoljavaju više postavljenih ciljeva, odnosno odziva sistema. U takvim slučajevima se koristi metodologija višekriterijumskog odlučivanja (eng. *multicriteria methodology* ili *multiple response methodology*) [280].

Kada je u pitanju optimizacija analitičkih metoda Deringerova funkcija poželjnog odziva (eng. *Derringer desirability function*) je najznačajnija i najčešće korišćena metodologija multi-kriterijumskog odlučivanja. Ona je primenljiva i na linearne i nelinearne matematičke modele. Ova metodologija se bazira na konstruisanju funkcije poželjnog odgovora za svaki pojedinačan odziv sistema (d_i) u koju se unose ciljevi, i njihov relativni značaj, koje svaki odziv sistema treba da zadovolji. Vrednosti pojedinačnih funkcija poželjnog odziva za potpuno nepoželjan nivo odziva je 0, dok je za savršeno poželjan odgovor $d = 1$.

Na primer, ukoliko je cilj dobijanje maksimalnog odziva sistema, pojedinačna funkcija poželjnog odziva se računa prema jednačini:

$$d_i = \left[\frac{Y_i - Max_i}{Max_i - Min_i} \right]^{wt_i}$$

gde je Y_i odziv sistema, Max_i i Min_i su najviša i najniža dobijena vrednost odziva sistema, a wt_i je relativni značaj koji je dodeljen odzivu sistema. Pri čemu je $Min_i < Y_i < Max_i$.

Uz pomoć pojedinačnih funkcija poželjnih odziva računa se ukupna funkcija poželjnog odziva (D) preko formule:

$$D = (d_1^{wt_1} \times d_2^{wt_2} \times \dots \times d_i^{wt_i})^{\frac{1}{\sum wt_i}}$$

gde je i broj posmatranih odziva sistema. Ukupna funkcija poželjnog odziva predstavlja težinsku geometrijsku sredinu pojedinačnih funkcija poželjnih odziva. Ukupna funkcija poželjnog odziva, poput pojedinačnih, može da ima vrednosti $D = 0$ do 1. Što je D vrednost bliža jedinici, to je sistem bliži celokupnoj optimalnoj vrednosti, odnosno svi odzivi sistema su bliži poželjenoj vrednosti. Ukupna funkcija poželjnog odziva se može prikazati u vidu trodimenzionalnog prostora radi lakšeg uočavanja celokupne optimalne vrednosti sistema [285, 287-290, 298].

Poglavlje 3

EKSPERIMENTALNI DEO

Eksperimentalni deo ove disertacije urađen je u Naučnom institutu za prehrambene tehnologije u Novom Sadu (FINS) i u laboratoriji za instrumentalnu analizu Departmana za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu, Univerziteta u Novom Sadu.

3.1 Hemikalije i reagensi

Spisak hemikalija i rastvora koji su korišćeni tokom izvođenja eksperimentalnog dela istraživanja dati su u nastavku.

Standardi neonicotinoida:

Dinotefuran (čistoće > 99,9%), (*Sigma-Aldrich*, Nemačka);

Nitenpiram (čistoće > 99,9%), (*Sigma-Aldrich*, Nemačka);

Tiametoksam (čistoće > 99,9%), (*Sigma-Aldrich*, Nemačka);

Klotianidin (čistoće > 99,9%), (*Sigma-Aldrich*, Nemačka);

Imidakloprid (čistoće > 99,9%), (*Sigma-Aldrich*, Nemačka);

Acetamiprid (čistoće > 99,9%), (*Sigma-Aldrich*, Nemačka);

Tiakloprid (čistoće > 99,9%), (*Sigma-Aldrich*, Nemačka);

Acetonitril (ACN, HPLC čistoće), (*Merck*, Nemačka);

Dihlormetan (DHM, HPLC čistoće), (*Merck*, Nemačka);

Hloroform (CHCl₃, HPLC čistoće), (*Merck*, Nemačka);

Metanol (HPLC čistoće), (*J.T.Backer*, SAD);

Mravlja kiselina (čistoće > 98%), (*Sigma-Aldrich*, Nemačka);

Ultračista voda, (FINS, Republika Srbija);

Aceton, (*J.T.Backer*, SAD);

Natrijum-hlorid (NaCl, p.a. čistoće), (*Carlo Erba Reagents*, Francuska);

Dinatrijum-hidrogen-citrat-seskvihidrat, (*Supelco*, SAD);

Trinatrijum-citrat-dihidrat, (Euro Hemija, Republika Srbija);

Magnezijum-sulfat (MgSO₄ anhidrovani, čistoće 98%), (Hemrad, Republika Srbija);

Vodonik-peroksid (H₂O₂, p.a. čistoće), (LG Hemija, Republika Srbija);

Višezidne ugljenične nanocevi i gvoždem dekorisane višezidne ugljenične nanocevi (MWCNT i Fe-MWCNT) (sintetisane u laboratoriji prof. dr Gorana Boškovića, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu) [291-293].

Standardni rastvori neonikotinoidea: Pripremljeni su standardni rastvori pojedinačnih neonikotinoidea koncentracije $100,0 \text{ mg L}^{-1}$. Odmereno je oko $0,01 \text{ g}$ standarda odgovarajućeg neonikotinoidea, preneseno u odmerni sud od 100 mL i dopunjeno do crte vodom i čuvano na -10 °C u mraku. Na ovaj način standardi su bili stabilni tokom 3 meseca.

Standardni zbirni rastvor neonikotinoidea: Pripremljen je standardni rastvor ispitivanih neonikotinoidea koncentracije $100,0 \text{ µg L}^{-1}$ mešanjem odgovarajuće zapremine standardnog rastvora pojedinog neonikotinoidea sa vodom u odgovarajućem odmernom sudu. Ovaj rastvor je korišćen za obogaćivanje (spajkovanje) uzoraka, ispitivanje uticaja matriksa i ispitivanje linearnosti. Rastvor je čuvan na 4 °C u mraku i bio je stabilan tokom mesec dana.

MMC rastvori: Radi ispitivanja uticaja matriksa na rezultate određivanja sadržaja neonikotinoidea korišćeni su MMC (eng. *matrix-matched standards*) rastvori koji su pripremani tako što se određena količina standardnog rastvora ili standardnog zbirnog rastvora neonikotinoidea doda u poslednjem delu procedure pripreme uzoraka, tj. nakon uparavanja, a pre rekonstituisanja uzorka.

QuEChERS kitovi za ekstrakciju: Korišćeni su komercijalno dostupni QuEChERS kitovi (EN 15662 2008 standard, 2008; [175]) nabavljeni od *United Chemical Technologies* (UCT, SAD). Upotrebljeni su ekstrakcioni kitovi sa odgovarajućim puferom (deo broj ECQUEU750CT) i opšti tip ekstrakcionog kita za prečišćavanje voća i povrća (deo broj ECMPS15CT).

3.2 Oprema

Spisak korišćene opreme:

Vorteks uređaj, (*BOECO*, Nemačka);

Ultrazvučno kupatilo, (*L&R ultrasonics LTD*, Engleska) (37 kHz , 400 W);

Centrifuga, (Tehtnica, SFR Jugoslavija);

Tečni hromatograf Agilent 1200, (*Agilent Technologies*, SAD) sa DAD detektorom i maseni detektor: Agilent 6410B Triple Quad, (*Agilent Technologies*, SAD) (slika 3.1);

Kolone: Zorbax Eclipse XDB C18 ($50 \times 4,6 \text{ mm}$; $1,8 \text{ µm}$); ZORBAX Eclipse Plus C8 ($100 \times 2,1 \text{ mm}$; $1,8 \text{ µm}$), (*Agilent Technologies*, SAD);

Sistem za uparavanje u struji azota ili vazduha: Reacti-Therm modul, (*Thermo-Scientific*, SAD);

Simplicity UV sistem za prečišćavanje vode, (*Millipore*, SAD);

Strata Discovery DSC-18 SPE kolone, 3 mL , (*Supelco*, SAD);

Vakuum manifold za SPE, (*Phenomex*, SAD);

Automatske pipete: Eppendorf 10-10 000 µL , (*Hamburg*, Nemačka);

Tehnička vaga, (*Mettler Toledo*, SAD);

Analitička vaga, (*Mettler Toledo*, SAD);

Membranski filteri: regenerisana celuloza, veličina pora: 0,45 i 0,22 μm ; prečnik: 25 mm, (*Agilent Technologies*, SAD);

Bočice za autosampler, 2 mL vijalice, (*Agilent Technologies*, SAD);

Plastični špricevi, 2 mL, (*Nipro-Romed*, Republika Srbija);

JSM 6460 LV skenirajući elektronski mikroskop sa EDS uređajem Oxford INCA (*JEOL*, Japan) (uz zahvalnost Dipl. biologu Milošu T. Bokorovu, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu)

Softver za prikupljanje i obradu podataka: Agilent MassHunter Workstation, verzija B.03.01, (*Agilent Technologies*, SAD); Design-Expert 7.0.0., (*Stat-Ease*, SAD).



Slika 3.1. Izgled HPLC-DAD/MS/MS instrumenta (Naučni institut za prehrambene tehnologije u Novom Sadu)

3.3 Ispitivani uzorci

Određivanje neonikotinoide tečnom hromatografijom sprovedeno je u sledećim odabranim uzorcima: medu, liker u od meda-medici i u dunavskoj vodi.

Med kao glavni pčelinji proizvod ispitan je na prisustvo odabranih neonikotinoide. Tokom prve serije ispitivanja uzoraka meda, koja su uključivala razvoj metoda za pripremu uzoraka, uzorci (15) su nabavljeni u prodavnicama u Novom Sadu. Nakon optimizovanja metoda za pripremu uzoraka i hromatografskih uslova, 104 uzorka meda su nabavljena iz 7 okruga na teritoriji Autonomne

Pokrajine Vojvodine. Mesta i cvetno poreklo meda (suncokretov, livadski, bagremov i lipin med) su označeni na slici 3.2. Svi uzorci su čuvani na sobnoj temperaturi, kao što bi se čuvali tokom upotrebe u domaćinstvima (slika 3.3). Slepa proba je dobijena mešanjem 5 uzoraka meda različitog cvetnog porekla (10,0 g) sa poznatih lokaliteta na kojima nije bila moguća izloženost meda uticaju neonikotinoida. Za ispitivanje meda primenom DLLME tehnike pripreme uzoraka, pripremljen je vodeni rastvor meda koncentracije $50,0 \text{ g L}^{-1}$, koji je služio i za određivanje performansi razvijenih metoda određivanja neonikotinoida.



Slika 3.2. Lokaliteti uzetih uzoraka meda i njihovo cvetno poreklo (51 uzorak suncokretovog, 26 uzoraka livadskog, 22 uzorka bagremovog i 5 uzoraka lipovog meda)



Slika 3.3. Uzorci meda u laboratoriji

Uzorci likera od meda-medice nabavljeni su u prodavnicama u Novom Sadu ili od pojedinih proizvođača ovog likera na teritoriji Autonomne Pokrajine Vojvodine. Slepa proba je načinjena na isti način kao i u slučaju uzoraka meda, mešanjem 5 medica za koje se verovalo da ne sadrže ostatke neonikotinoida. Slepa proba medice korišćena je i za ispitivanje performansi razvijene metode.

Dunavska voda je odabrana kao matriks za ispitivanje mogućnosti upotrebe MWCNT i Fe-MWCNT za uklanjanje neonikotinoida iz vodene sredine. Uzorak rečne vode uzet na obali reke Dunav u Novom Sadu tokom maja 2013. godine, što je prikazano na slici 3.4.



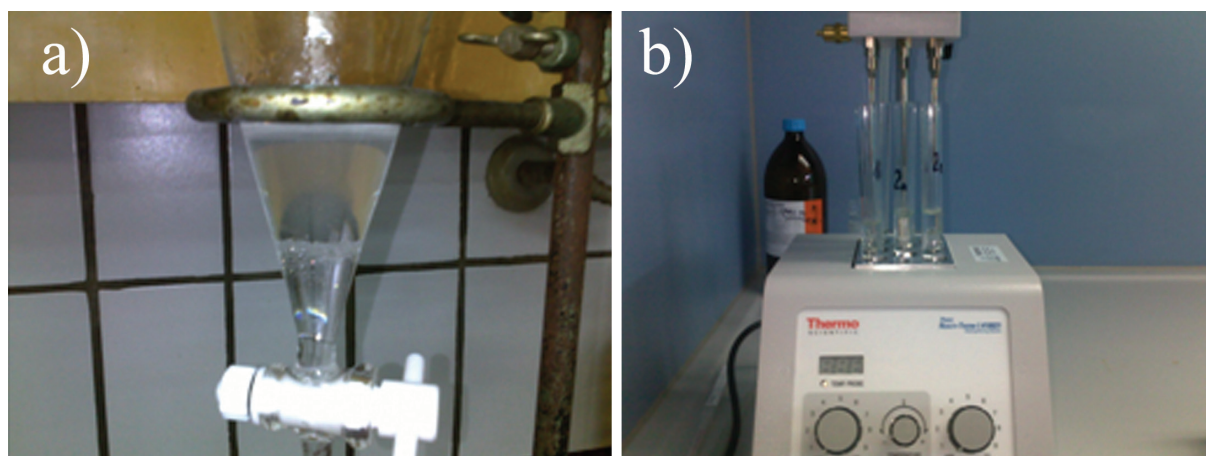
Slika 3.4. Mesto uzorkovanja vode reke Dunav, Novi Sad, Republika Srbija

3.4 Procedure za pripremu uzoraka

Ispitivanje kompleksnih uzoraka tečnom hromatografijom nije moguće direktno bez prethodne odgovarajuće pripreme uzoraka. Procedure pripreme i određivanja uzoraka opisane su u narednom tekstu.

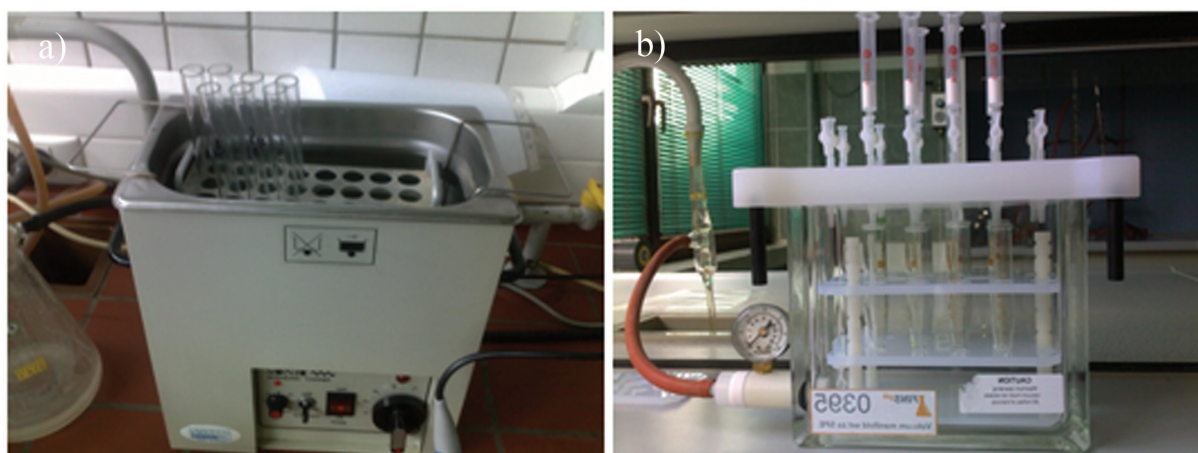
3.4.1 Tečno-tečna i ekstrakcija na čvrstoj fazi

Odmerene su odvage od 2,5 g meda koje su rastvorene u 10,0 mL vode. Nakon toga, rastvoreni uzorci meda su kvantitativno preneti u levke za odvajanje (slika 3.5a) u koje je dodata određena količina NaCl radi boljeg raslojavanja. U levcima je vršena ekstrakcija sa 5,0 mL dihlormetana. Ekstrakcija je ponovljena tri puta i sve organske frakcije su sjedinjene u epruveti. Sadržaj u epruveti je uparen do suva u struji azota uz pomoć uređaja prikazanog na slici 3.5b.



Slika 3.5. a) Ekstrakcija sa dihlormetanom i b) uparavanje do suva u struji azota

Uzorci su zatim rekonstruisani sa 2,0 mL vode na ultrazvučnom kupatilu tokom 5 min (slika 3.6a). Usledilo je prečišćavanje uzoraka upotrebom ekstrakcije na čvrstoj fazi. Kolone za SPE su kondicionirane sa 4,0 mL metanola, pa sa 4,0 mL vode da bi, nakon toga, bili naneti uzorci, a zatim kolone isprane sa 2,0 mL vode i na kraju analit eluiran sa SPE kolone metanolom. Uređaj pomoću koga je vršena SPE je prikazan na slici 3.6b.

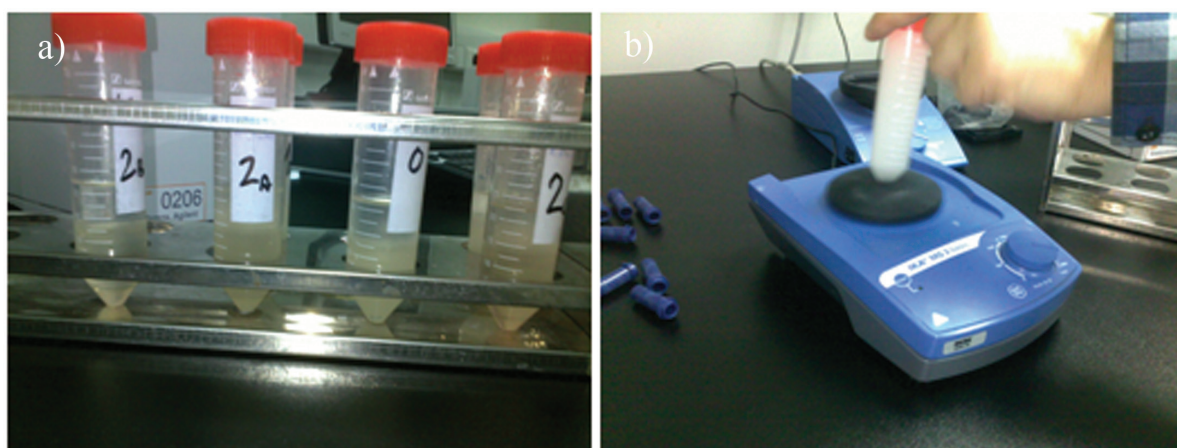


Slika 3.6. a) Rekonstruisanje uzoraka u ultrazvučnom kupatilu i b) vakuum manifold set za SPE

Nakon eluiranja kroz SPE kolone, uzorci su upareni do suva u struji azota, nakon čega su rastvoreni u 1,0 mL mobilne faze, koja se sastojala iz 70% vode (0,1% HCOOH) i 30% acetonitrila. Uzorci su, posle toga, kroz filtre, čije su pore dimenzija 0,45 μm , uz pomoć šprica i igle preneseni u vijalice radi dalje HPLC-DAD analize.

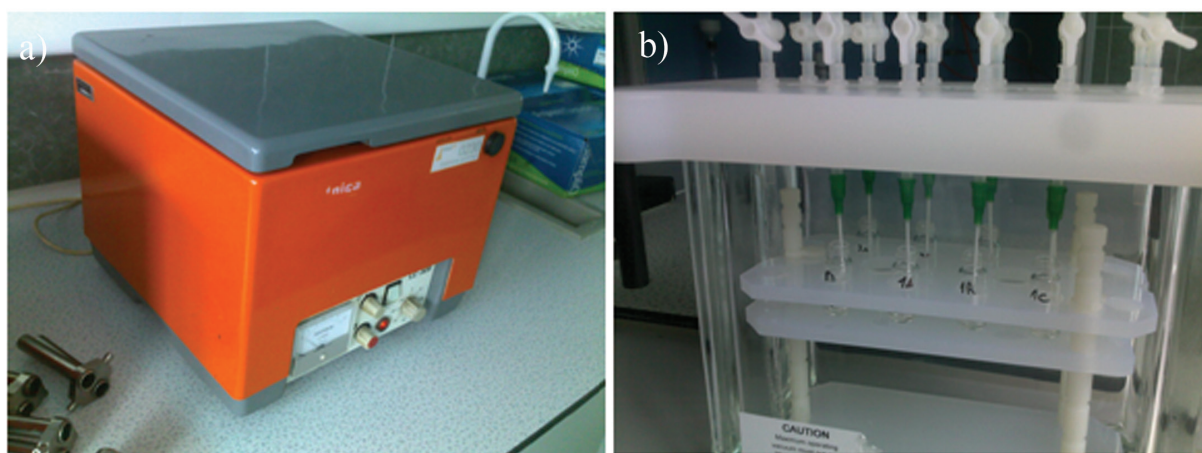
3.4.2 QuEChERS ekstrakcija

Ekstrakcija odabranih neonikotinoida iz uzorka meda ili likera od meda vršena je po sledećoj proceduri: Odmereno je 10,0 g meda (15,0 mL likera medicine ili 15,0 mL 50,0 g L⁻¹ spajkovanog rastvora meda) dodato je po 10,0 mL acetonitrila (slika 3.7a) i pripremljena puferska smesa soli (4,0 g magnezijum-sulfata, 1,0 g natrijum-hlorida, 1,0 g natrijum-citrata-dihidrata i 0,5 g dinatrijum-citrata-seskvihidrata), nakon čega je usledilo mućkanje 1 min, vorteksovanje (slika 3.7b) i centrifugiranje 5 min (slika 3.8a) na 3000 o min⁻¹.



Slika 3.7. a) QuEChERS-ove ekstrakcione epruvete i b) vorteks sistem za mešanje

Od gornjeg sloja (acetonitrilskog) preneto je 6 mL ekstrakta u kivetu koja sadrži smesu 150 mg PSA i 900 mg MgSO₄ i snažno mućkano 30 sekundi, a zatim centrifugirano 5 min na 3000 o min⁻¹. Nakon ponovnog mućkanja i centrifugiranja uzeto je 1,5 mL tečnog sloja, koji je uparen do suva uz pomoć modifikovanog manifolda za SPE (slika 3.8b). Nakon uparavanja, uzorak je rekonstruisan sa 1,0 mL (1,5 mL za medicu ili spajkovan med) mobilne faze i prenet u 2 mL vijalice za dalja hromatografska ispitivanja [176].



Slika 3.8. a) Centrifuga i b) modifikovani manifold za uparavanje

3.4.3 DLLME protokol za pripremu uzoraka meda

Alikvot od 5,0 ml uzorka meda ($50,0 \text{ g L}^{-1}$) ili likera medice, 0,5 mL ACN kao disperzionog rastvarača i 2,0 mL DHM kao ekstrakcionog sredstva se dodaju u kivetu sa okruglim dnom od 10 mL. Kiveta se zatim vorteksuje 1 min, a zatim ostavi tokom 10 min na ultrazvučnom kupatilu nakon čega se još 1 min ponovo vorteksuje. Sledi centrifugiranje 5 min na 2500 o min^{-1} . Nakon razdvajanja faza (slika 3.9) donja faza se uklanja pomoću šprica i igle i prenosi u drugu epruvetu. Preneta donja faza (dihlormetanska frakcija) se zatim uparava pomoću struje vazduha, kako bi sav dihlormetan ispario. Krajnji suvi ostatak se rekonstruiše sa 0,2 mL (0,5 mL za medicu) mobilne faze (90% voda (0,1% HCOOH):10% ACN, v:v), filtrira i prenosi u vijalice za dalje hromatografsko ispitivanje.



Slika 3.9. Razdvajanje faza nakon centrifugiranja primenom DLLME tehnike

3.4.4 Procedura ispitivanja mogućnosti uklanjanja odabranih neonikotinoida iz vode

Alikvot od 25,0 mL uzet je iz uzorka dunavske vode u koju je dodat ispitivani neonikotinoid (dinotefuran, klotianidin ili tiakloprid), tako da njegova koncentracija iznosi približno 1 mg L^{-1} . Nakon prenošenja tako pripremljenih rastvora u čaše od 100 mL sa magnetnim jezgrom, dodata je određena zapremina H_2O_2 koncentracije $125,00 \text{ mmol L}^{-1}$ i/ili 0,01 g nanomaterijala (mikroskopska snimanja nanomaterijala vršena su pri različitim uvećanjima, bez njihove prethodne pripreme), nakon čega su čaše sa ispitivanim sistemima postavljene na magnetnu mešalicu. Sprovedeni su eksperimenti ispitivanja mogućnosti uklanjanja neonikotinoida iz uzorka vode sa i bez dodatka H_2O_2 , sa i bez dodatka MWCNT, sa i bez dodatka H_2O_2 i MWCNT, kao i sa i bez dodatka Fe-MWCNT u prisustvu i odsustvu H_2O_2 . Alikvoti su uzimani špricom iz čaše na 0 min, 1 min, 5 min, 10 min, 20 min, 30 min i 60 min, te posle filtriranja pomoću filtera od $0,22 \text{ }\mu\text{m}$ preneti direktno u vialice za hromatografsku analizu. Uzimanje alikvota je vršeno u tri ponavljanja i nakon 1 dan, 7 dana, 10 dana i 14 dana.

3.5 Metodologija površine odziva

3.5.1 Optimizacija DLLME procedure

Optimizacija eksperimentalnih uslova DLLME vršena je kako bi se uverili da su izabrani eksperimentalni uslovi DLLME ujedno i optimalni, pri čemu je korišćena metodologija površine odziva, RSM. Ispitivan je centralno kompozitni dizajn drugog reda sa dva faktora (zapreminama ekstrakcionog sredstva DHM i disperznog sredstva ACN) na 3 nivoa. Eksperimentalni dizajn uključivao je 13 eksperimenata sa 5 ponavljanja centralne tačke. Prinos svakog neonikotinoidea (eng. *recovery* - R, %) predstavljao je odziv sistema. Opsezi ispitivanih faktora su prikazani u tabeli 3.1.

Statistička analiza i optimizacija su urađene primenom softvera Design-Expert 7.0.0. (Stat-Ease, Minneapolis, USA).

Tabela 3.1. Faktori i testirani opsezi prilikom optimizacije pripreme uzoraka DLLME procedurom

FAKTOR	NAZIV FAKTORA	MIN	MAX	JEDINICE
A	ACN	0,0	1,0	mL
B	DHM	1,0	3,0	mL

3.5.2 Optimizacija hromatografskih uslova

Eksperimentalni dizajn, ANOVA analiza dobijenih podataka i funkcija poželjnih odgovora su izvedene upotrebom softvera Design-Expert 7.0.0. (Stat-Ease, Minneapolis, USA). Ispitivani faktori su odabrani na osnovu preliminarnih ispitivanja. Izabran je kvadratni model sa *Box-Behnken*-ovim dizajnom. Izvršeno je 17 eksperimenata sa 3 ponavljanja u centralnoj tački. Odgovori sistema su odabrani kako bi se postigli najbolji prinosi neonikotinoidea primenom tačne hromatografije. Optimizacija osam odziva sistema (retenciona vremena prvog i poslednjeg analita i rezolucija između svaka dva pika neonikotinoidea) je zasnovana na modifikovanoj metodi razvijenoj od strane *Derringer* i *Suich* [295]. Metoda optimizacije se sastojala od odabira kriterijuma optimizacije i prevođenja odziva sistema u bezdimenzione pojedinačne funkcije poželjnih odziva, koje su nakon toga kombinovane u jedan odziv sistema koji čini konačnu funkciju poželjnosti procesa. Faktori i testirani intervali hromatografskih uslova su prikazani u tabeli 3.2.

Tabela 3.2. Faktori i testirani intervali hromatografskih uslova

FAKTOR	NAZIV FAKTORA	MIN	MAX	JEDINICE
A	ACN	10,0	40,0	%
B	vreme	0,0	6,0	min
C	protok	0,50	0,80	mL min ⁻¹

3.6 HPLC-DAD/MS/MS uslovi rada

HPLC sistem Agilent 1200 serije (*Agilent Technologies*, USA) se sastojao od degazera, binarne pumpe sa mešanjem pri visokom pritisku, autosamplera i termostatiranog dela za hromatografsku kolonu.

Za ispitivanje uzoraka meda (pripremljenih DLLME postupkom) (MS/MS detekcija), pre optimizacije hromatografskih uslova primenom RSM, razdvajanje neonikotinoidea postignuto je korišćenjem ZORBAX Eclipse XDB-C18 kolone na temperaturi od 30 °C. Mobilna faza se sastojala od ultračiste vode sa 0,1% mravlje kiseline i ACN, pri protoku od 0,5 mL min⁻¹. Izokratski režim eluiranja je primenjen pri odnosu ACN / voda (0,1% mravlja kiselina) 20:80, v/v. Zapremina injektovanja je bila 20 µL, a vreme analize 15 min.

Za ispitivanje uzoraka meda nakon optimizacije hromatografskih uslova (DAD i MS/MS detekcija) upotrebom DLLME i QuEChERS procedura pripreme uzoraka i RSM, razdvajanje odabranih neonikotinoidea postignuto je korišćenjem ZORBAX Eclipse XDB-C18 kolone na temperaturi od 30 °C. Mobilna faza se sastojala od ACN (A) i ultračiste vode sa 0,1% mravlje kiseline (B), pri protoku od 0,7 mL min⁻¹. Gradijentni program: 90% B na početku analize sa linearnim gradijentom do 60% B nakon 6 min i zatim nazad do 90% B do završetka analize (10 min). DAD radne talasne dužine su bile 244 nm i 266 nm. Takođe, testirana je i mogućnost razdvajanja odabranih neonikotinoidea korišćenjem ZORBAX Eclipse Plus C8 kolone pri protoku 0,2 mL min⁻¹ i linearnim gradijentnim programom za B: 0,0–1,8 min 90%; 1,8–5,0 min 80%; 5,0–7,0 min 60%; 7,0–19,0 min 90%. Zapremina injektovanja je bila 20 µL.

Za ispitivanje uzoraka medice (pripremljenih korišćenjem DLLME i QuEChERS) i analize uklanjanja neonikotinoidea iz vode (MS/MS detekcija) razdvajanje odabranih neonikotinoidea postignuto je korišćenjem ZORBAX Eclipse XDB-C18 kolone na temperaturi od 30 °C. Mobilna faza se sastojala od ACN (A) i ultračiste vode sa 0,1% mravlje kiseline (B), pri protoku od 0,7 mL min⁻¹. Gradijentni program: 90% B na početku analize sa linearnim gradijentom do 60% B nakon 6 min i zatim nazad do 90% B do završetka analize (10 min). Zapremina injektovanja je bila 20 µL.

Za ispitivanje uzoraka meda (DAD detekcija) prilikom preliminarnih ispitivanja parametara DLLME tehnike pripreme uzoraka korišćena je ZORBAX Eclipse XDB-C18 kolona na temperaturi od 30 °C. Primenjen je izokratski režim eluiranja sa mobilnom fazom od 30% ACN i 70% vode sa 0,1% mravlje kiseline. Zapremina injektovanja je bila 10 µL. Protok mobilne faze 0,6 mL min⁻¹. Talasna dužina na kojoj su praćeni signali bila je 266 nm i referentni signal praćen je na 500 nm. Analiza je trajala 5 minuta.

Za ispitivanje uzoraka meda (DAD detekcija) primenom kombinacije tečno-tečne i čvrsto-fazne ekstrakcije primenjena je ZORBAX Eclipse XDB-C18 kolona na temperaturi od 25 °C. Primenjen je izokratski režim eluiranja sa mobilnom fazom od 30% ACN i 70% vode sa 0,1% mravlje kiseline. Zapremina injektovanja je bila 20 µL, a protok mobilne faze 0,5 mL min⁻¹. Talasna dužina na kojoj su praćeni signali bila je 266 nm i referentni signal praćen je na 500 nm. Analiza je trajala 5 minuta.

Agilent 6410 Triple Quad LC/MS maseni spektrometar (Agilent Technologies Inc., USA) je korišćen sa multimod-jonskim izvorom sa ESI pozitivnom jonizacijom. *MassHunter Workstation Data Acquisition i MassHunter Workstation Qualitative Data Analysis* softver izdanje B.03.01 korišćen je za kontrolu uređaja, prikupljanje i analiziranje podataka. Operativni parametri instrumenta su bili sledeći: temperatura gasa za sušenje 325 °C, a temperatura isparivača 200 °C. Azot je korišćen kao gas za raspršivanje sa pritiskom na raspršivaču od 50 psi, protokom gasa od 5 L min⁻¹, naponom kapilare od 2500 V i naponom punjenja 2000 V. MRM i/ili SIM režimi rada su odabrani za ispitivanja neonikotinoidea u zavisnosti od postavljenih ciljeva. Najintenzivnije MRM tranzicije su odabrane za svaki neonikotinoid. Optimizovani naponi fragmentora i kolizione energije ispitivanih neonikotinoidea su prikazani u tabeli 3.3.

Tabela 3.3. Odgovarajući m/z prekursor-jona (Q1), m/z praćenih produkt-jona (Q3), naponi fragmentora (FV) i kolizione energije (CE) za svaki ispitivani neonikotinoid

Neonikotinoid	Q1	Q3	FV (V)	CE (V)
Dinotefuran	203,1	129,1	82	8
		113,1	82	8
Nitenpiram	271,2	225,1	102	8
		56,1	102	30
Tiametoksam	292,2	211,1	82	8
		181,1	82	20
Klotianidin	250,0	169,1	92	8
		131,9	92	16
Imidaklopid	256,1	209,0	92	12
		175,1	92	16
Acetamiprid	223,1	126,0	124	12
		56,1	124	20
Tiaklopid	253,1	126,0	102	20
		90,0	102	30

3.7 Validacija metode

Razvijene i optimizovane metode su validovane radi ispunjavanja zahteva standarda *SANCO/12495/2011– Validacija metoda i procedure za kontrolu kvaliteta analiza ostataka pesticida u hrani i hrani za životinje* [296]. Kalibracione krive ispitivanih neonikotinoidea u čistom rastvaraču ili u matriksu su konstruisane crtanjem zavisnosti koncentracija neonikotinoidea i površina njihovih pikova sa dobijenih hromatograma. Kalibracione krive su konstruisane na osnovu najmanje 4 tačke u tri ponavljanja, tj. četiri koncentracije neonikotinoidea u rasponu od GO do 100,0 µg L⁻¹. Linearni dinamički opseg metode jeste njena sposobnost da generiše odgovor koji je linearno proporcionalan koncentraciji analita u uzorcima u datom opsegu. Linearnost se utvrđuje kroz opseg analitičkog postupka i predstavlja se regresionom jednačinom. Linearnost kalibracionih krivih je iskazana kroz

kvadrat koeficijenta korelacije (r^2). Granica detekcije i određivanja su procenjene na osnovu merenja opadajućih koncentracija MMC rastvora i merenja odgovora signala pri odnosu S/N od ≥ 3 za GD i S/N ≥ 10 za GO. Specifičnost metode podrazumeva odgovor za samo jedan analit. Metoda je selektivna kada se njome može odrediti analit u prisustvu ometajućih supstanci koji mogu biti prisutni u matriksu uzorka. Da bi se dokazala selektivnost metode, potrebno je dobiti hromatogram sa jasno označenim standardima na najnižem kalibracionom nivou, zatim hromatograme slepe probe i uzorka obogaćenog na nivou kvantifikacije i to za svaki analit i svaki matriks. Uzorak koji se koristi kao slepa proba ne sme imati prisutne analite u koncentracijama većim od 30% od GO. Kako bi se okarakterisale specifičnost i selektivnost ispitivanih metoda, proučavan je uticaj ostalih komponenta odabranih matriksa ispitivanjem MMC rastvora pripremljenih korišćenjem slepe probe. Specifičnost HPLC-MS/MS metode je dodatno ispitivana korišćenjem spajkovanih uzoraka u kojima su praćena po dva produkt jona (*target* i *qualifier*) za svaki ispitivani neonikotinoide, i merenjem odnosa između produkt jona, sa prihvatljivom tolerancijom opsega od $\pm 10\%$ u odnosu na njihov odnos u kalibracionim standardima. Za konstrukciju kalibracionih krivih koje obuhvataju i uticaj samog ispitivanog matriksa (MMC krive), slepa proba je nakon procedure pripreme uzoraka u poslednjem rekonstrukcionom koraku rastvorena uz dodatak određenih standarda neonikotinoide u ispitivanom linearnom opsegu od GO do $100,0 \mu\text{g kg}^{-1}$. Ispitivani opseg je obuhvatao najmanje 5 različitih koncentracija neonikotinoide. Za određivanje tačnosti metode, ispitivani su prinosi neonikotinoide i preciznost kroz relativnu standardnu devijaciju prinosa metoda (RSD, %) obogaćivanjem slepih proba uzoraka poznatim koncentracijama neonikotinoide pre analize i upoređivanjem sa srednjim vrednostima dobijenih koncentracija korišćenjem MMC kalibracionih krivi. Preciznost analitičke metode izražava blizinu slaganja (stepen rasipanja) između vrednosti niza merenja dobijenih iz višestrukih uzorkovanja istog homogenog uzorka. Preciznost analitičkog postupka se izražava kao varijacija, relativno standardno odstupanje ili koeficijent varijacije iz niza merenja. Preciznost može da se razmatra na više nivoa: ponovljivost (eng. *repeatability*), reproduktivnost (eng. *reproducibility*), intermedijerna reproduktivnost, robusnost itd. Preciznost metoda iskazana je putem RSD ispitujući ponovljivost i intermedijernu reproduktivnost metoda. Metode su razvijane sa ciljem da RSD bude $\leq 20\%$. Ponovljivost metoda je ispitivana spajkovanjem uzoraka neonikotinoide na tri koncentraciona nivoa, pri čemu su uzorci analizirani pet puta tokom istog dana od strane istog operatera na istom uređaju. Intermedijerna reproduktivnost metoda je ispitivana spajkovanjem uzoraka neonikotinoide na tri koncentraciona nivoa, pri čemu su uzorci analizirani tokom tri različita dana od strane istog analitičara i na istom uređaju [296].

Poglavlje 4

REZULTATI I DISKUSIJA

4.1 Razvoj metode za određivanje klotianidina u medu primenom tečno-tečne i ekstrakcije na čvrstoj fazi i HPLC-DAD analize

Ispitana je mogućnost određivanja klotianidina pomoću HPLC-DAD po opisanom postupku pripreme uzoraka primenom kombinacije tečno-tečne i ekstrakcije na čvrstoj fazi. Kao što se sa slike 4.1 može uočiti, klotianidin se elura sa kolone na retencionom vremenu od 1,70 min, pri čemu relativna standardna devijacija izračunata na osnovu osam merenja ne prelazi 0,9%. Linearni opseg merenja testiran je u užem intervalu koncentracija od 1,0–7,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, jer se u toj oblasti nalaze očekivani signali klotianidina u spajkovanim uzorcima meda.

U slučaju model rastvora klotianidina, na osnovu analiziranih signala (slika 4.1, tabela 4.1) može se zaključiti da koncentracije koreliraju sa odgovarajućim površinama pikova hromatograma, pri čemu koeficijet korelacije iznosi 0,999. Ova zavisnost je prikazana na slici 4.2.

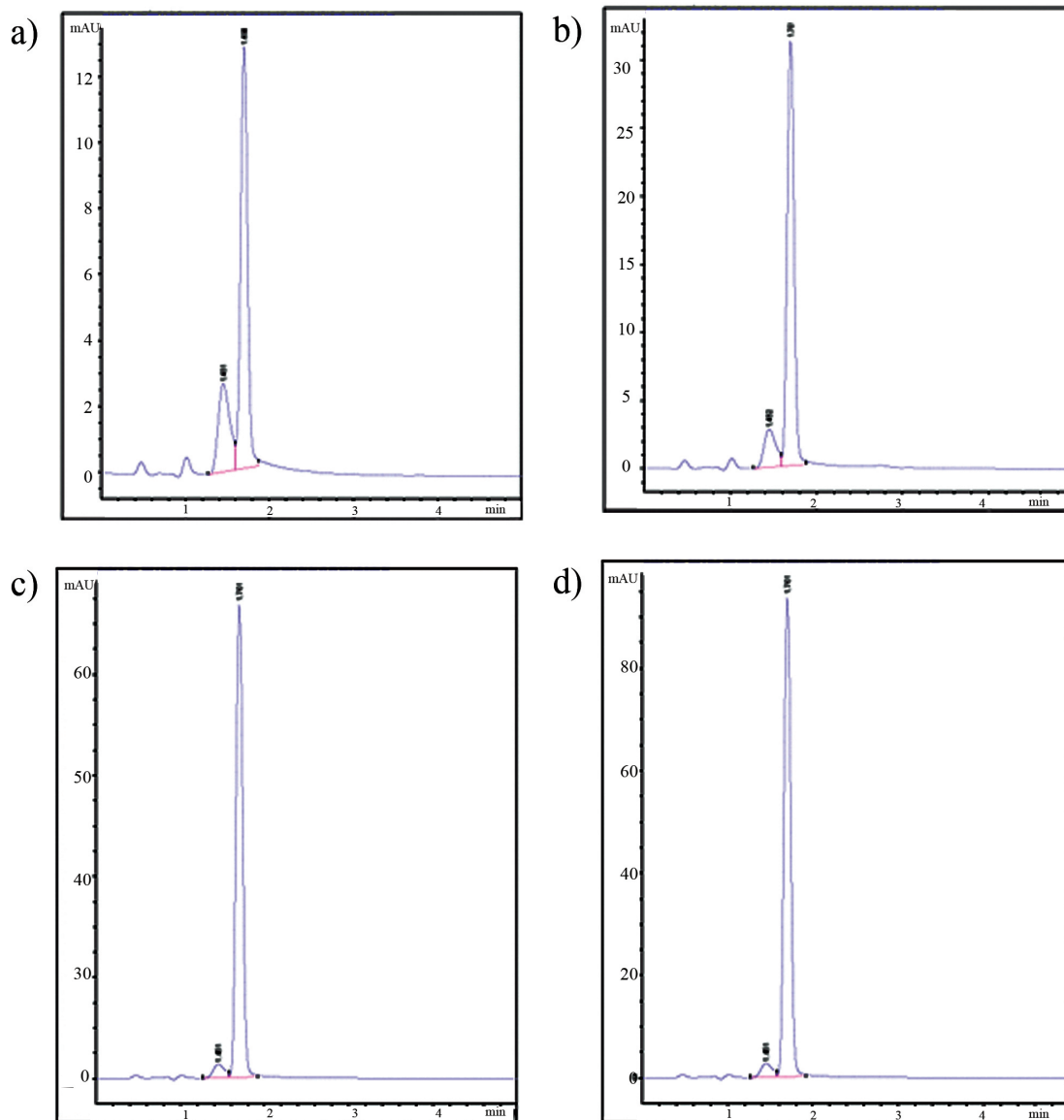
Tabela 4.1. Proučavane koncentracije klotianidina i odgovarajuće površine pika hromatograma

Koncentracija, x ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Površina, y (mAU min)
1,0	73,7
2,5	174,7
5,0	343,3
7,5	514,2

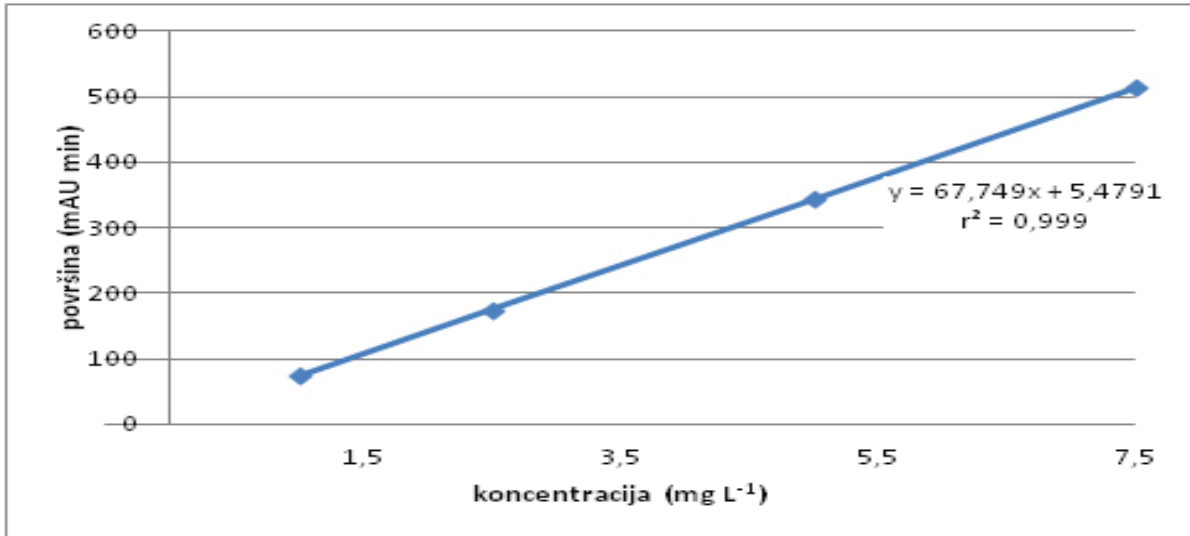
Postoji realna mogućnost da je linerni opseg širi od ispitivanog, ali imajući u vidu činjenicu da su model-uzorci meda obogaćeni klotianidinom upravo u ovom intervalu koncentracija, može se smatrati da model-sistemi obuhvataju istraživani opseg koncentracija.

Nakon proučavanja prirode analitičkog signala standarda klotianidina, proučavani su dobijeni hromatogrami matriksa meda nakon njegovog prečišćavanja. Nakon prečišćavanja meda, dobijen je ekstrakt jednostavnijeg sastava, sa uklonjenim komponentama koje bi koeluirale sa ciljanim analitom. Na osnovu dobijenih hromatograma uočeno je da uzorci meda ne mogu biti direktno nanoseni na SPE kolonu u obliku vodenih rastvora, jer oni vrlo brzo zasite tj. blokiraju sorbens. Stoga je kao prva faza pripreme sirovog uzorka meda primenjena tečno-tečna ekstrakcija, kao tehnika većeg kapaciteta, a zatim je primenjena druga faza koja je obuhvatala prečišćavanje pomoću SPE. Dobijeni hromatogram prečišćenog matriksa meda bez dodatka klotianidina prikazan je na slici 4.3.

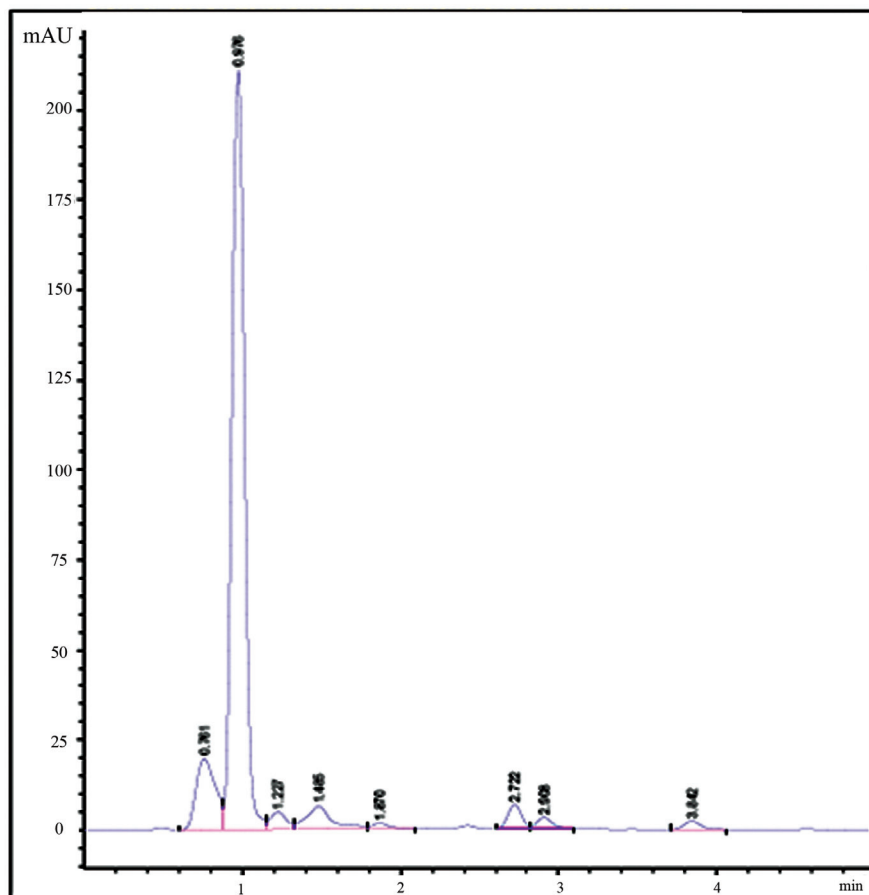
Posle proučavanja model-rastvora ciljnog analita i prirode prečišćenog ekstrakta matriksa, klotianidin je dodat u približno iste odvage meda (na dva koncentracijska nivoa) i tako obogaćeni uzorci su podvrgnuti proceduri pripreme/prečišćavanja uzoraka za hromatografska merenja. Odvage, zapremine obogaćivanja i odgovarajuće površine očitanih pikova sa hromatograma prikazani su u tabeli 4.2.



Slika 4.1. Hromatogrami klotianidina ($t_r=1,70$ min) snimljeni pri istim uslovima hromatografisanja i pri različitim koncentracijama klotianidina a) $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$; b) $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$; c) $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ i d) $7,5 \mu\text{g mL}^{-1}$



Slika 4.2. Kalibraciona kriva za klotianidin

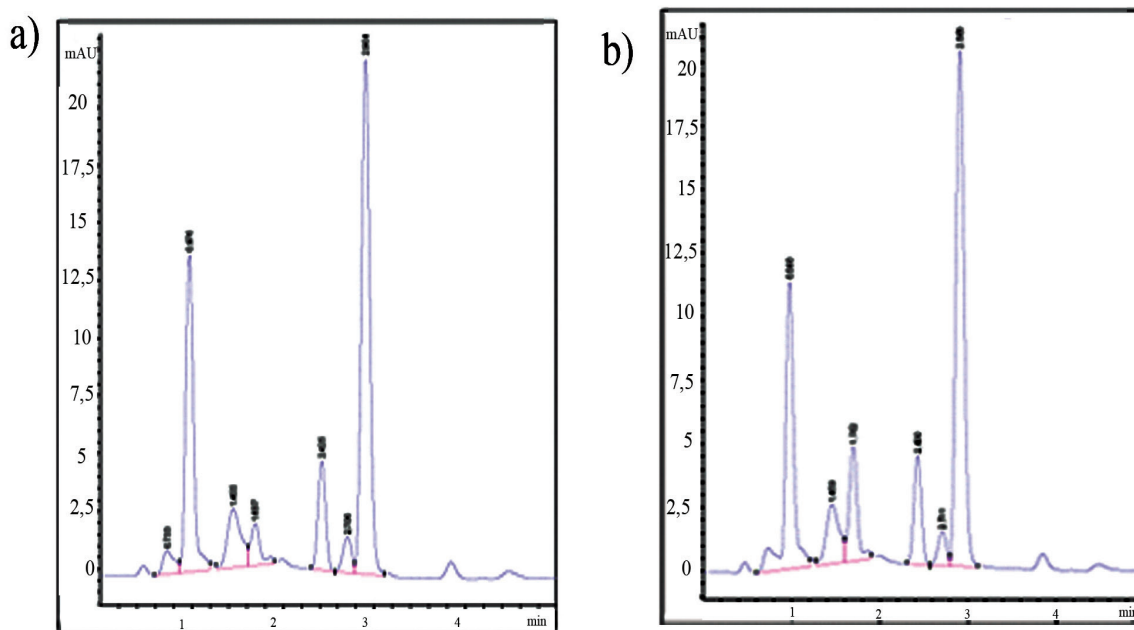


Slika 4.3. Hromatogram ekstrakta matriksa meda prečišćenog pomoću tečno-tečne ekstrakcije kombinovane sa SPE bez dodatka klotianidina

Tabela 4.2. Odvage meda, spajkovani nivoi klotianidina i odgovarajući dobijeni hromatografski podaci

Odvaga meda (g)	Spajkovana zapremina klotianidina (μL)	Koncentracija osnovnog standarda ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Koncentracija klotianidina u medu ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Očekivana koncentracija u pripremljenom uzorku ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Površina pika	Očitana koncentracija u pripremljenom uzorku ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Prinos (%)
2,7752	12,5	99,87	0,450	1,248	63,21	0,852	68,3
2,4992	12,5	99,87	0,500	1,248	56,69	0,755	60,5
2,5216	12,5	99,87	0,495	1,248	60,61	0,813	65,2
2,5611	50,0	99,87	1,950	4,994	161,2	2,298	46,0
2,5461	50,0	99,87	1,961	4,994	159,7	2,276	45,6
2,5846	50,0	99,87	1,932	4,994	167,7	2,394	47,9

Iz dobijenih rezultata se može zaključiti da je ovaj tip prečišćavanja uzoraka delotvorniji za male koncentracije rezidua klotianidina u medu ($0,5 \mu\text{g g}^{-1}$, prinos $\approx 70\%$), što je ilustrovano slikom hromatograma (slika 4.4). Nasuprot tome, za veće koncentracije klotianidina neophodno je modifikovati proceduru pripreme zbog manjeg prinosa metode (prinos $\approx 46\%$), što se može pripisati mogućem zasićenju kolone za ekstrakciju na čvrstoj fazi ili nekom drugom razlogu.



Slika 4.4. Hromatogrami meda spajkovanog sa dve različite količine klotianidina ($t_r = 1,70 \text{ min}$), prečišćeni pomoću tečno-tečne ekstrakcije kombinovane sa ekstrakcijom na čvrstoj fazi i snimljeni pri istim uslovima hromatografisanja. Spajkovani uzorci sadrže a) $2,0 \mu\text{g g}^{-1}$ i b) $0,5 \mu\text{g g}^{-1}$ klotianidina

Na osnovu istraživanja koja se odnose na tečno-tečnu ekstrakciju (primenom DHM), može se zaključiti da zbog kompleksne prirode meda opisana metoda pripreme nije pogodna za direktna određivanja klotianidina pomoću HPLC-DAD. Naime, pri tečno-tečnoj ekstrakciji vodena faza i dihlormetan mogu se primeniti samo uz veoma pažljivo mućkanje (čak i u prisustvu natrijum-hlorida)

inače dolazi do većih gubitaka analita. Ovako pripremljeni uzorci/ekstrakti meda i dalje nisu dovoljno čisti za HPLC-DAD merenja klotianidina, jer oni još sadrže komponente koje se koeluiraju sa klotianidinom, a absorbuju svetlost na 266 nm, tj. na radnoj talasnoj dužini detektora, kao i sam klotianidin. Zbog toga je neophodno dalje prečišćavanje uzoraka na odabranim SPE kolonama. Ova metoda prečišćavanja zahteva dobro poznavanje metodologije rada i uvežbanost analitičara. Na osnovu prvih rezultata može se konstatovati da korišćenje Strata Discovery SPE kolona u kombinaciji sa tečno-tečnom ekstrakcijom DHM pokazuje prinos klotianidina do 70% u uzorcima meda pri koncentraciji od oko $0,5 \mu\text{g g}^{-1}$ klotianidina.

Shodno navedenom, dalja istraživanja bila su usmerena ka razvitku drugih ekstrakcionih tehnika koje bi obezbedile viši prinos neonikotinoidea u širem koncentracijskom opsegu.

4.2 Razvoj metode za određivanje klotianidina u medu primenom DLLME tehnike i HPLC-DAD analize

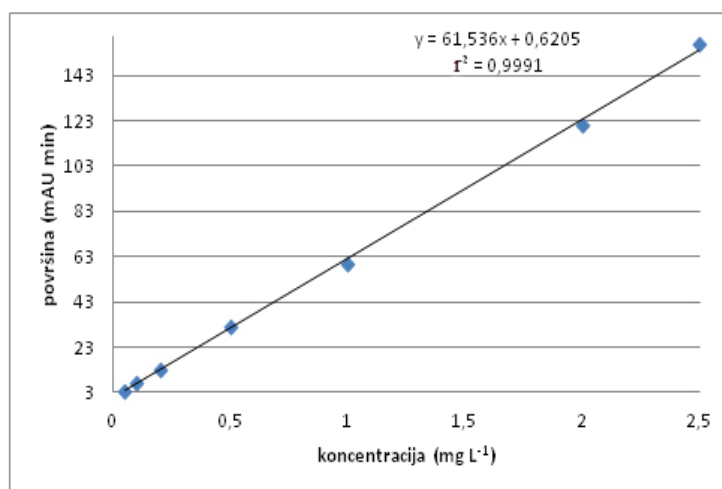
Nakon određivanja neonikotinoidea klotianidina primenom kombinovane tečno-tečne ekstrakcije i ekstrakcije na čvrstoj fazi za pripremu uzoraka meda, dobijeni relativno niski prinosi neonikotinoidea ($R \leq 70\%$) ukazuju na neophodnost pronalaženja odgovarajuće strategije pripreme uzoraka meda. Naredna odabrana tehnika pripreme uzoraka meda je disperzna tečno-tečna mikroekstrakcija. Radi optimizacije DLLME tehnike neophodno je bilo ispitati ključne parametre koji utiču na efikasnost ove ekstrakcione tehnike, kao što su: zapremina i vrsta disperznih i ekstrakcionih sredstava, načini njihovog uvođenja/disperzije u ekstrakcione sisteme, brzina i vreme centrifugiranja itd.

Preduslov za proučavanje mogućnosti primene, a potom i efikasnosti DLLME tehnike je postojanje pouzdane HPLC-DAD metode za određivanje klotianidina. Mobilna faza koja se koristi u ovoj metodi sastoji se od 30% ACN i 70% vode (0,1% HCOOH). Pripremljena je serija standardnih rastvora klotianidina koncentracije $0,05\text{--}2,5 \text{ mg L}^{-1}$ ili, u kasnijim ispitivanjima osetljivosti i efikasnosti DLLME procedure, od $0,001\text{--}0,05 \text{ mg L}^{-1}$.

Kalibraciona kriva je konstruisana na osnovu dobijenih površina pikova ispitivanih standardnih rastvora klotianidina prikazanih u tabeli 4.3. Izračunata je jednačina prave i koeficijent korelacije (slika 4.5).

Tabela 4.3. Proučavani standardni rastvori klotianidina i odgovarajuće površine pikova

Koncentracija, x (mg L ⁻¹)	Površina, y (mAU min)
0,05	3,60
0,10	7,60
0,20	13,5
0,50	32,0
1,00	60,2
2,00	121,0
2,50	157,2

**Slika 4.5.** Kalibraciona kriva klotianidina za koncentracijski interval 0,05–2,5 mg L⁻¹

Radi ispitivanja mogućnosti primene DLLME tehnike pripremani su uzorci meda sa i bez dodatka klotianidina. Med u količini od 100 g rastvoren je u 1 L vode i na taj način dobijen je rastvor meda koncentracije 100 g L⁻¹, koji je dalje podvrgnut DLLME proceduri za pripremu uzoraka ili je obogaćen (spajkovan) na četiri koncentraciona nivoa: 0,1, 0,2, 0,5 i 1,0 mg kg⁻¹ meda, a zatim podvrgnut istom postupku mikroekstrakcije. Spajkovanje uzoraka izvršeno je tako što su prvo dodate izračunate zapremine standardnog rastvora klotianidina od 100 mg L⁻¹ u odmerne sudove od 100 mL, a zatim su sudovi dopunjeni do crte sa napravljenim rastvorom meda koncentracije 100 g L⁻¹. Radi razvijanja metode za ekstrakciju, korišćen je med u čijem hromatogramu je uočen manji broj supstanci koje mogu da interferiraju sa klotianidinom, a u cilju ispitivanja operacionih koraka i ključnih parametara DLLME procedure. U narednim poglavljima i oblastima, razmatrani su različiti matriksi meda i odgovarajuće ekstrakcione tehnike, uključujući i DLLME.

4.2.1 Početni DLLME postupak

Prva DLLME procedura je vršena tako što je u epruvetu sa okruglim dnom mikropipetom dato 1,5 mL acetonitrila, a zatim 0,5 mL hloroforma. Iz ove epruvete je izvučena celokupna zapremina primenom šprica zapremine 2 mL i igle prečnika 0,8 mm, a zatim je ovaj sadržaj naglo ubrizgan u drugu epruvetu u koju je prethodno trbušastom pipetom preneto 10,0 mL rastvora meda obogaćenog klotianidinom. Ova procedura je sprovedena za sva 4 spajkovana koncentracijska nivoa klotianidina u tri ponavljanja. Nakon ubrizgavanja organske faze dobijena je emulzija sa jasnim, krupnim dispergovanim kapljicama hloroforma u kojima se očekivalo koncentrisanje tj. ekstrakcija klotianidina.

Ovako pripremljene epruvete sa uzorcima centrifugirane su na 3000 o min^{-1} tokom 5 minuta. Nakon centrifugiranja u epruvetama su uočeni jasno razdvojeni slojevi, gornji sloj smese ACN i vode i donji sloj hloroforma. Glavni deo gornjeg sloja uklonjen je pomoću pipete zapremine 5 mL. Čistim špicem i iglom pažljivo je izdvojen donji sloj i prenesen u čistu i suhu epruvetu, a zatim je uparen u vakuum manifoldu u struji vazduha. Uzorci su nakon uparavanja rekonstruisani u 0,5 mL mobilne faze i profilirani pre prenošenja u hromatografske vijale. Nakon ovakve pripreme i HPLC-DAD analize očekivane koncentracije klotianidina i dobijeni prinosi klotianidina prikazani su u tabeli 4.4.

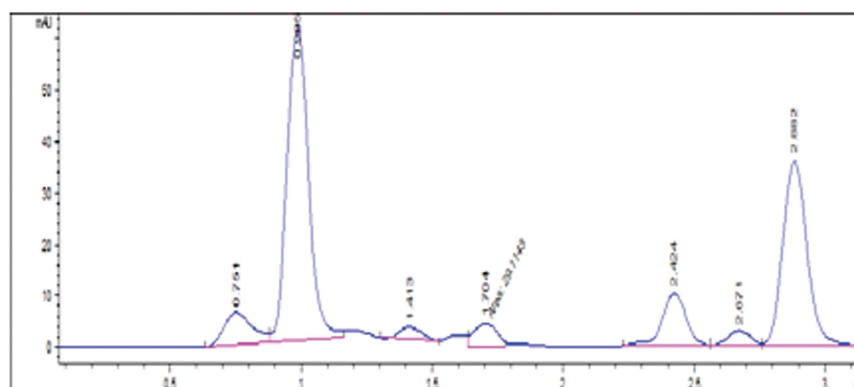
Tabela 4.4. Očekivane koncentracije i dobijeni prinosi klotianidina posle HPLC-DAD analize

Spajkovan uzorak meda (mg kg^{-1})	0,1	0,2	0,5	1,0
Očekivana koncentracija (mg L^{-1})	0,2	0,4	1,0	2,0
Prinos (%)	45,2	50,0	48,3	47,6

Nakon analize hromatograma standarda klotianidina jasno su se videli pikovi klotianidina sa linearnim porastom visine pika sa povećanjem koncentracije, čija je kalibraciona kriva prikazana na slici 4.5. Međutim, prinosi spajkovanih rastvora meda posle opisane DLLME procedure su bili daleko ispod očekivanih, što znači da se ubrizgavanjem acetonitrila i hloroforma pomoću šprica ne postiže formiranje zadovoljavajućeg disperznog sistema, pa je, shodno tome, prinos ekstrakcije bio neadekvatan.

Radi poboljšanja disperzije organskog ekstragensa u vodenoj fazi, u narednom eksperimentu nakon dodavanja disperznog i ekstrakcionog sredstva primenjen je i proučavan uticaj vorteks uređaja i ultrazvučnog kupatila na efikasnost DLLME tehnike. Treba napomenuti da ubrizgavanje acetonitrila i pogodnog ekstrakcionog sredstva koristeći špic i iglu ne doprinosi značajnom formiranju disperzionog sistema kada su u analizu uključeni vorteks uređaj i ultrazvučno kupatilo. Shodno tome, u daljim eksperimentima smesa disperznog i ekstrakcionog sredstva dodavana je primenom odgovarajuće pipete.

Na slici 4.6 prikazan je hromatogram uzorka spajkovanog meda sa $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$ standardnim rastvorom klotianidina na način gde je u 100 mL rastvora 100 g L^{-1} meda dodato $50 \mu\text{L}$ 100 mg L^{-1} rastvora klotianidina, čime je koncentracija klotianidina u tom rastvoru $0,05 \text{ mg L}^{-1}$, tj. preračunato na med $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$. Zatim je uzet alikvot od 10 mL, dodato je 1,5 mL ACN i 0,5 mL hloroforma, 1 min vorteks, 10 min ultrazvuk, 1 min vorteks, centrifugirano, izdvojen je donji sloj, uparen do suva i rekonstituisan u 0,5 mL mobilne faze. Na hromatogramu se očekivao pik čija površina odgovara površini standarda klotianidina od $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ ($t_r=1,7 \text{ min}$, površina 60,2), međutim, dobijen je pik čija je površina skoro duplo manja, pri čemu se dobija neadekvatan prinos od svega 48,3%.



Slika 4.6. Hromatogram ekstrakta meda spajkovanog klotianidinom u koncentraciji $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$ ($t_r=1,7 \text{ min}$)

Imajući u vidu dobijanje niskog prinosa primenom početne DLLME procedure, neophodno je bilo ispitati samu DLLME tehniku za ekstrakciju klotianidina, kao i identifikovati sve ključne parametre koji utiču na prinos ove mikroekstrakcije.

4.2.2 Ispitivanje efikasnosti DLLME tehnike korišćenjem standardnih rastvora klotianidina

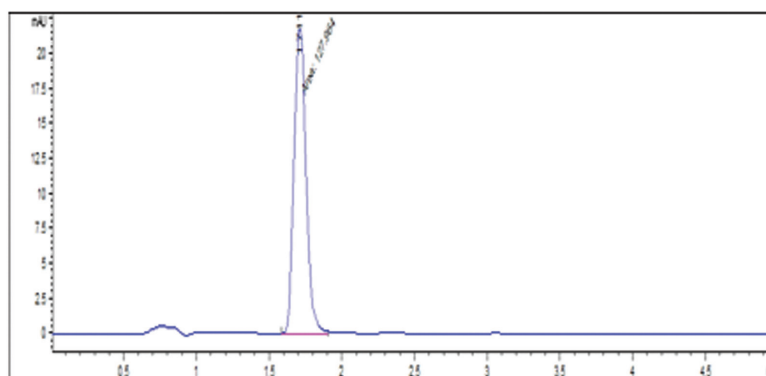
Zbog niskog prinosa klotianidina, u sledećem setu eksperimenata ispitivan je uticaj uslova na efikasnost DLLME ekstrakcije iz standardnih rastvora klotianidina.

Kako bi se uticaj matriksa meda isključio kao mogući uzrok niskog prinosa ekstrakcije klotianidina, ova faza ispitivanja izvedena je na rastvorima klotianidina, bez prisustva meda. Pripremljen je standardni rastvor klotianidina od $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ koji je primenjen za ispitivanje efikasnosti ekstrakcije. Pored hloroforma testiran je i dihlormetan kao potencijalno ekstrakciono sredstvo. Plan i rezultati eksperimenata predstavljeni su u tabeli 4.5.

Tabela 4.5. Plan eksperimenta i odgovarajući prinosi određivanja klotianidina HPLC-DAD metodom upotrebom DLLME tehnike pripreme uzoraka

Oznaka Uzorka	Zapremina standardnog (1 mg L ⁻¹) rastvora klotianidina (mL)	Zapremina ACN (mL)	Sredstvo za ekstrakciju (1 mL)	Prinos (%)
1	5	1	Dihlormetan	81,5
2	5	1	Hloroform	88,6
3	5	-	Dihlormetan	75,6
4	5	-	Hloroform	86,0
5	10	-	Dihlormetan	68,3
6	10	-	Hloroform	69,7

U svaku probu rastvora klotianidina od 1,0 mg L⁻¹ prvo je špricom ubrizgano sredstvo za ekstrakciju sa ili bez acetonitrila. Svaka proba je rađena u tri ponavljanja. Epruvete su najpre vorteksovane 1 min, a zatim sonicirane 3 min. Dobijena je mutna, beličasta emulzija, sa slabo uočljivim kapljicama dihlormetana, odnosno hloroforma, što je značajno drugačije u odnosu na prve DLLME eksperimente. Naime, primenom dodatnih koraka vorteksovanja i ultrazvučnog tretmana, dobija se bolja disperzija dve faze. Uzorci 1, 2, 3 i 4 su centrifugirani na 3000 o min⁻¹ u trajanju od 10 minuta. Uzorci 5 i 6 su centrifugovani 5 minuta na 4000 o min⁻¹. Donji sloj svih 6 proba je prenet u čistu i suhu epruvetu, primenom čistog šprica i igle za svaki uzorak. Ove epruvete su zatim postavljene na uparavanje u struji vazduha. Nakon uparavanja uzorci 1, 2, 3 i 4 su rekonstruisani u 2 mL, a uzorci 5 i 6 u 4 mL mobilne faze, čime se za svih šest uzoraka očekivao pik u hromatogramu koji odgovara 2,5 mg L⁻¹ klotianidina. Ustanovljeno je da korišćenje smese disperzionog i ekstrakcionog sredstva vodi poboljšanju prinosa u odnosu na korišćenje samog ekstrakcionog rastvora. Na primer, primenom smese DHM sa ACN dobijen je prinos od 81,5% (slika 4.7 i tabela 4.5), u odnosu na korišćenje samo DHM za ekstrakciju sa prinosom 75,6%, dok u slučaju upotrebe hloroforma, ova razlika nije bila toliko izražena (tabela 4.5).



Slika 4.7. Hromatogram ekstrakta uzorka 1 koji je prošao proceduru koja obuhvata smesu disperzionog sredstva i ekstrakcionog sredstva (1 mL ACN i 1 mL DHM) (pik klotianidina na $t_r = 1,7$ min)

Zadatak ovog eksperimenta bila je i optimizacija odnosa količine uzorka i potrebne količine rastvora za ekstrakciju. U prva četiri uzorka zapremina odmerenih uzoraka iznosila je 5,0 mL, dok je u uzorcima 5 i 6 ona bila 10,0 mL. Zapremine rastvora za ekstrakciju se nisu menjale, a iznosile su 1 mL. Zabeleženi su prinosi klotianidina od 69,7 i 68,3%, u zavisnosti da li je korišćen CHCl_3 , odnosno DHM kao rastvor za ekstrakciju (tabela 4.5). Povećanje odnosa zapremina ekstragenta i uzorka nije doprinelo boljoj ekstrakciji, što ukazuje na potrebu korišćenja odnosa uzorak:ekstrakciona smesa 5:1. Korišćenjem 5,0 mL uzorka se, takođe, omogućava lakše manipulisanje uzorkom tokom eksperimenta, naročito prilikom vorteksovanja i centrifugiranja.

4.2.3 Utvrđivanje značajnih faktora DLLME tehnike - odabir i zapremine ekstrakcionog sredstva

Nakon ispitivanja efikasnosti DLLME tehnike na standardnim rastvorima klotianidina, rađeni su eksperimenti koji su obuhvatali spajkovani med ($1,0 \text{ mg kg}^{-1}$). Radi ispitivanja uticaja zapremine ekstrakcionog sredstva na rezultate analize (prinos) rađeni su eksperimenti u tri ponavljanja sa DHM i CHCl_3 , gde su dodate zapremine ekstrakcionog sredstva iznosile 1 mL ili 2 mL (tabela 4.6).

Uzorci su vorteksovani 1 min, u ultrazvučnom kupatilu su tretirani 3 min, nakon čega su centrifugirani na 3000 o min^{-1} u trajanju od 5 min. Dve faze su se razdvojile, ali su na površini donjeg sloja uočeni ostaci nekih komponenti meda, najverovatnije nekih ugljenih hidrata, proteina ili fenola, koje su otežavale odvajanje donjeg sloja. Radi uklanjanja zapaženog nepovoljnog efekta uzorci su još jednom centrifugirani 5 min, ali ovaj put na 4000 o min^{-1} . Međutim, i nakon ponovnog centrifugiranja stanje donjeg sloja je ostalo nepromenjeno. Zatim je donji sloj prenet špricom u čistu epruvetu, te je uparavan u struji vazduha. Nakon uparavanja uzorci su rekonstruisani u 0,5 mL mobilne faze, vorteksovani i sonicirani radi boljeg rastvaranja. Dobijeni rastvori su propušteni kroz filtre i preneti u hromatografske vijale, pri čemu je očekivana koncentracija klotianidina u svim uzorcima bila $1,0 \text{ mg L}^{-1}$.

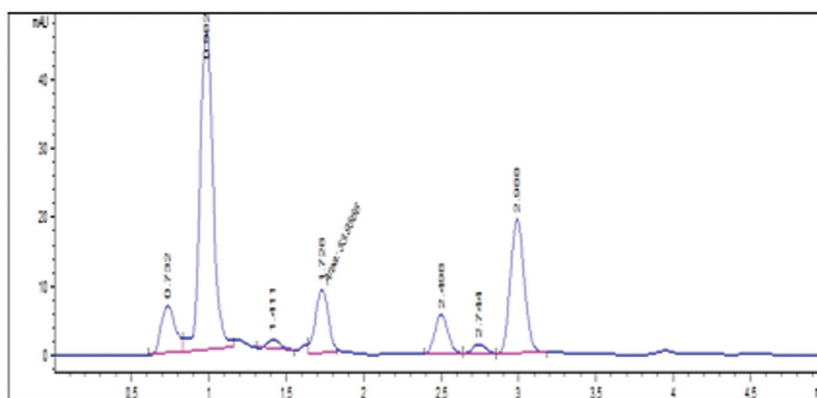
HPLC-DAD analizom dobijeni hromatogrami ukazuju da su u uzorcima 1 i 2 prinosi ekstrakcije ispod 60%, dok su u uzorcima 3 i 4 prinosi iznosili 98,5%, odnosno 89,7% (tabela 4.6)

Tabela 4.6. Plan eksperimenta i odgovarajući prinosi određivanja klotianidina HPLC-DAD metodom upotrebom DLLME tehnike pripreme uzoraka

Oznaka uzorka	Zapremina obogaćenog ($1,0 \text{ mg kg}^{-1}$) meda (mL)	Zapremina ACN (mL)	Sredstvo za ekstrakciju i korišćena zapremina	Prinos (%)
1	5	1	Dihlormetan, 1 mL	54,5
2	5	1	Hloroform, 1 mL	59,3
3	5	1	Dihlormetan, 2 mL	98,5
4	5	1	Hloroform, 2 mL	89,7

Imajući u vidu da je dihlormetan manje opasan po zdravlje i čovekovu okolinu u odnosu na hloroform i da je u prethodnim eksperimenta utvrđeno da postoje razlike u kvalitetu ekstrakcije između ova dva reagensa, dihlormetan je odabran kao ekstrakciono sredstvo.

Ispitivan je uticaj zapremine DHM kao ekstrakcionog sredstva, pri čemu su proučavani alikvoti bili 1 mL i 2 mL, a zapremina disperznog sredstva se nije menjala i iznosila je 1 mL. Nakon uparavanja donjeg sloja, uzorci su rekonstituisani sa 1,0 mL mobilne faze. Dobijeni pikovi na hromatogramu treba da budu ekvivalentni pikovima standardnog rastvora klotianidina od 0,5 mg L⁻¹. Dobijeni su prinosi od 84,10% za 1 mL DHM, i 99,3% za 2 mL DHM, što pokazuje da je primena veće zapremine DHM povoljnija. Ovo ukazuje da je prilikom analize uzoraka meda spajkovanih sa standardom klotianidina bolji odnos zapremina uzorka i ekstrakcionog rastvora 5:2. Na slici 4.8 prikazan je hromatogram uzoraka, koji je ekstrahovan korišćenjem 2,0 mL DHM kao ekstrakcionog sredstva.



Slika 4.8. Hromatogram klotianidina ($t_r = 1,7$ min) uzorka meda ekstrahovanog sa 2,0 mL DHM i 1,0 mL ACN

4.2.4 Utvrđivanje značajnih faktora DLLME tehnike - zapremina disperznog sredstva

Efikasnost ekstrakcije ispitivana je i na nižim koncentracijama klotianidina (0,1 mg kg⁻¹, 0,25 mg kg⁻¹ i 0,5 mg kg⁻¹) u rastvoru meda koncentracije 500 g L⁻¹. Ispitan je uticaj zapremine disperznog sredstva primenom dve zapremine acetonitrila od 1,0 mL i 0,5 mL, pri zapremini DHM od 2 mL, u tri ponavljanja shodno dizajnu eksperimenta prikazanom u tabeli 4.7.

Zapremina uzoraka u svakoj probi iznosila je 5,0 mL. Koraci DLLME procedure su bili sledeći: sadržaj epruvete je vorteksovao 1 min i ultrasonifikovan 10 min uz povremeno vorteksovanje. Centrifugiranje je vršeno na 3500 o min⁻¹ u trajanju od 10 min. Nakon centrifugiranja, gornji sloj je pažljivo uklonjen pipetom od 5 mL, a ostatak je uparavan u struji vazduha. Na ovaj način pokušao se izbeći eventualni gubitak analita usled prenošenja DHM sloja u drugu epruvetu, kao i skraćenje vremena analize. Međutim, posledica ovakvog postupka je duže uparavanje, jer je u epruvetama zaostajala voda gornjeg sloja, koji, ipak, nije u potpunosti mogao biti uklonjen.

Tabela 4.7. Plan eksperimenta i odgovarajući prinosi klotianidina dobijeni HPLC-DAD metodom upotrebom DLLME tehnike pripreme uzoraka

Oznaka uzorka	Koncentracija klotianidina u medu (mg kg ⁻¹)	Zapremina ACN (mL)	Rekonstrukcija u mobilnoj fazi (mL)	Očekivana koncentracija klotianidina na hromatogramu (mg L ⁻¹)	Prinos (%)
1	0,5	1,0	1,25	1,0	/
2	0,5	0,5	1,25	1,0	89,2
3	0,25	1,0	1,25	0,5	/
4	0,25	0,5	1,25	0,5	/
5	0,1	1,0	1,25	0,2	70,3
6	0,1	0,5	1,25	0,2	/

Filtriranje ovih uzoraka u vijale bilo je otežano, verovatno zbog veće koncentracije ugljenih hidrata iz meda. HPLC-DAD signali klotianidina ukazuju na to da je prinos u uzorcima oznake 2 i 5 bio redom 89,2% i 70,3%, dok u ostalim probama na hromatogramu nije zapažen očekivani pik klotianidina. Razlog tome može biti veliki uticaj matriksa i/ili nedovoljno dobro izvedena filtracija pre same analize. Na osnovu rezultata ispitivanja, može se zaključiti da se zadovoljavajući prinos ekstrakcije ostvaruje pri korišćenju 0,5 mL ACN kao disperznog sredstva.

4.2.5 Osetljivost i efikasnost DLLME tehnike

Radi proučavanja osetljivosti i efikasnosti DLLME eksperimenti su postavljeni, u tri ponavljanja, kako je prikazano u tabeli 4.8, pri čemu je varirana koncentracija klotianidina, zapremina uzorka, zapremina mobilne faze za rekonstruisanje uzoraka i zapremina ACN, dok je zapremina DHM iznosila 2 mL.

Tabela 4.8. Plan eksperimenta i odgovarajući prinosi klotianidina dobijeni HPLC-DAD metodom korišćenjem DLLME tehnike pripreme uzoraka

Oznaka uzorka	Koncentracija klotianidina u medu (mg kg ⁻¹)	Zapremina uzorka (mL)	Zapremina ACN (mL)	Rekonstrukcija u mobilnoj fazi (mL)	Očekivana koncentracija klotianidina na hromatogramu (mg L ⁻¹)	Prinos (%)
1	0,05	5,0	1,0	0,6	0,2	/
2	0,05	4,0	1,0	0,5	0,2	/
3	0,05	3,0	1,0	0,4	0,2	/
4	0,05	5,0	0,5	0,6	0,2	93,1
5	0,05	5,0	1,0	0,6	0,2	66,6
6	0,1	5,0	1,0	0,5	0,5	87,4
7	0,1	4,0	1,0	0,4	0,5	/
8	0,1	5,0	1,0	0,5	0,5	/

Shodno koracima DLLME procedure uzorci su sonicirani 15 minuta. Centrifugiranje se odvijalo na 3000 o min^{-1} u trajanju od 5 minuta, a donji sloj je prenošen u čiste epruvete korišćenjem šprica i igle, čime je vreme uparavanja koje je usledilo bilo znatno kraće u odnosu na slučaj kada je uparavan sadržaj epruvete nakon uklanjanja gornjeg sloja.

Na osnovu dobijenih rezultata, može se uočiti da je i zapremina mobilne faze u kojoj je uzorak rekonstituisan značajan faktor, jer autosampler HPLC uređaja nije bio u mogućnosti da povuče dovoljnu količinu uzorka, i zbog toga uzorci koji su rekonstruisani sa manje od 0,5 mL mobilne faze su ostali bez mogućnosti očitavanja rezultata.

Klotianidin je očitavan samo na hromatogramima uzoraka oznake 4, 5 i 6 u očekivanim koncentracijama čiji su prinosi iznosili 93,1%, 66,6% i 87,4% redom (tabela 4.8). Može se zaključiti da je najbolji prinos ekstrakcije dobijen pri korišćenju 0,5 mL ACN i 2,0 mL DHM. Zapremine uzorka manje od 5,0 mL su se pokazale kao nezadovoljavajuće za optimalno izvođenje eksperimenta.

Postavka daljeg eksperimenta prikazana je u tabeli 4.9, sa korišćenom zapreminom alikvota od 5 mL, DHM od 2 mL i ACN od 0,5 mL. Uzorci su nakon vorteksovanja sonicirani na ultrazvuku 20 minuta. Centrifugirani su na 3500 o min^{-1} u trajanju od 10 minuta. Prenosjenje donjeg sloja u čiste epruvete obavljano je špricom i iglom. Uparavanje do suva rađeno je u struji vazduha, a rekonstrukcija u mobilnoj fazi. Kako se u prethodnom eksperimentu pokazalo da mala količina rekonstituisanog uzorka nije dovoljna da bi se HPLC-DAD analiza sproveda, ovoga puta je kao dodatak korišćen dodatak vijalici *Agilent vial insert 100 mL pulled glass*, kako bi se zapremina vijalica smanjila i podigla površina sa koje igla injektora usisava uzorak. Prinosi su se kretali od 68,4% do 92,1%, što je zabeleženo kod uzorka 5 (tabela 4.9), čime su se dati paramteri DLLME ekstrakcije pokazali kao optimalni.

Tabela 4.9. Plan eksperimenta i odgovarajući prinosi klotianidina dobijeni HPLC-DAD metodom upotrebom DLLME tehnike pripreme uzoraka

Oznaka uzorka	Koncentracija klotianidina u uzorku meda	Rekonstrukcija u mobilnoj fazi (mL)	Očekivana koncentracija klotianidina na hromatogramu	Prinos (%)
1	0,05 mg kg ⁻¹	1,25	0,1 mg L ⁻¹	76,3
2	0,05 mg kg ⁻¹	0,60	0,2 mg L ⁻¹	71,8
3	0,025 mg kg ⁻¹	0,60	0,1 mg L ⁻¹	90,8
4	0,025 mg kg ⁻¹	0,30	0,2 mg L ⁻¹	72,3
5	0,01 mg kg ⁻¹	0,25	0,1 mg L ⁻¹	92,1
6	0,01 mg kg ⁻¹	0,125	0,2 mg L ⁻¹	83,0
7	0,005 mg kg ⁻¹	0,125	0,1 mg L ⁻¹	68,4

4.3 Optimizacija metode za određivanje odabranih neonikotinoida u medu primenom DLLME i HPLC-MS/MS analize [294]

Nakon preliminarnih ispitivanja optimalnih parametara DLLME tehnike pripreme uzoraka meda za ekstrakciju odabranog neonikotinoida klotianidina, neophodno je bilo izvršiti optimizaciju DLLME na način da prinosi ekstrakcija budu iznad 70% za sve ispitivane neonikotinoide. Kako bi se detaljnije ispitali ključni parametri DLLME tehnike, korišćena je metodologija površina odziva, kao i detekcija na osetljivijem kuplovanom masenom detektoru. Preliminarna ispitivanja osobina DLLME tehnike dovela su do nekih zaključaka o najbitnijim faktorima koji utiču na prinose ove tehnike ekstrakcije u slučaju uzoraka meda koji sadrže neonikotinoide.

4.3.1 Optimizacija odvage uzoraka meda

Složenost sastava meda (ugljeni hidrati, organske kiseline, enzimi i dr.) zavisi od vrste i geografskog porekla meda. Preliminarna ispitivanja već su pokazala da koncentracija vodenog rastvora meda viša od $50,0 \text{ g L}^{-1}$ nakon primene DLLME tehnike rezultira prinosima koji su neadekvatni za precizno i tačno određivanje neonikotinoida ($R < 60\%$, $RSD > 20\%$). Ovo je verovatno posledica većeg viskoziteta rastvora sa višim koncentracijama meda, koji utiče na formiranje sedimentacionog ostatka organske faze nakon centrifugiranja. Zbog toga, nadalje je odabrana koncentracija meda za ekstrakciju neonikotinoida DLLME tehnikom iznosila $50,0 \text{ g L}^{-1}$.

4.3.2 Optimizacija DLLME

Preliminarna ispitivanja optimalnih uslova ekstrakcije klotianidina upotrebom DLLME tehnike pripreme uzoraka dala su odgovor na najznačajnije faktore koji utiču na efikasnost ekstrakcije. Ovi faktori su istovremeno testirani na svih 7 neonikotinoida.

4.3.2.1 Zapremina alikvota uzorka

U procesu optimizacije korišćeni su spajkovani uzorci meda pri čemu je finalna koncentracija svih odabranih neonikotinoida iznosila $100,00 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$. Varirana je zapremina alikvota za DLLME proceduru u opsegu od 5,0 do 10,0 mL u koracima od 1,0 mL. Nakon sagledavanja prinosa ekstrakcija koji je predstavljao odziv sistema, došlo se do zaključka da nema statistički značajne razlike između postignutih prinosa ($p < 0,05$). Zapremina alikvota od 5,0 mL je odabrana za dalja ispitivanja zbog lakoće manipulacije sa tom zapreminom tokom sprovođenja eksperimenata.

4.3.2.2 Odabir ekstrakcionog i disperznog sredstva

Odabir odgovarajućeg ekstrakcionog i disperznog sredstva predstavlja jedan od najbitnijih faktora DLLME tehnike. Preliminarna ispitivanja pokazala su da nema značajnih razlika između DHM i hloroforma (odabranih i testiranih na osnovu njihove veće gustine od vode) kao ekstrakcionih sredstava u ekstrakciji klotianidina. Međutim, ekstrakcioni prinosi svih 7 neonikotinoida su potvrdili odabir DHM kao ekstrakcionog sredstva, s obzirom na to da su prinosi svih neonikotinoida bili veći (najniži prinos $R=74,3\%$) u odnosu na one dobijene upotrebom hloroforma ($R < 70,0\%$ za tiaklopid i acetamidrid).

Dobro mešanje disperznog sredstva sa vodenom fazom i ekstrakcionim sredstvom jeste glavni uslov koji mora biti ispunjen prilikom odabira disperznog sredstva za DLLME. Tip disperznog sredstva utiče na površinski napon ekstrakcionog sredstva, određuje veličinu mikrokapljica koje se stvaraju prilikom mešanja i samim time i na efikasnost same ekstrakcije. Tokom ispitivanja ACN je korišćen kao disperzno sredstvo na osnovu ispitivanja koje su sprovedi *Zacharis et al.* [297].

4.3.2.3 Optimizacija zapremine ekstrakcionog i disperznog sredstva

Zapremina ekstrakcionog sredstva ima veliki uticaj na prinos ekstrakcije. Sa povećanjem zapremine ekstrakcionog sredstva povećava se i zapremina sedimentacionog dela. Zapremina ekstrakcionog sredstva time utiče i na prinos ekstrakcije. Ona mora obezbediti dovoljnu količinu sedimentacionog ostatka nakon centrifugiranja. Takođe, odnos zapremina ekstragensa i uzorka utiče na ravnotežu raspodele. Raspon testiranih zapremina ekstrakcionog sredstva kretao se od 1,0 do 3,0 mL (1,0 mL, 2,0 mL, 3,0 mL). Za sve ispitivane neonikotinoide prinos ekstrakcije se povećavao sa povećanjem zapremine ekstrakcionog sredstva do 2,0 mL ($R > 70\%$), dok dalje povećanje zapremine ekstrakcionog sredstva do 3,0 mL nije statistički značajno uticalo na povećanje prinosa ekstrakcije ($p < 0,05$). Upotreba 2,0 mL zapremine ekstrakcionog sredstva zadovoljava, takođe, zahteve očuvanja životne sredine upotrebom malih količina rastvarača.

Radi optimizacije zapremine disperznog sredstva testirane su različite zapremine ACN (bez dodatka, 0,5 mL, 1,0 mL). Ispitivanja su pokazala da se bez upotrebe disperznog sredstva nije ostvarilo neophodno razdvajanje komponenta DLLME sistema, što je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim tokom preliminarnih ispitivanja DLLME na klotianidinu, a takođe i sa problemom koji se javlja tokom upotrebe klasične tečno-tečne ekstrakcije. Sa povećanjem zapremine disperznog sredstva do 0,5 mL, prinosi ekstrakcije svih neonikotinoida su bili veći od 70%, dok su sa daljim povećavanjem zapremine ACN, oni padali ispod 65%. Moguće objašnjenje leži u činjenici da se sa povećanjem zapremine ACN povećava i rastvorljivost neonikotinoida u vodi, a samim time smanjuje koeficijent distribucije i efikasnost ekstrakcije.

4.3.2.4 Optimizacija vremena ekstrakcije i brzine centrifugiranja

Glavna karakteristika DLLME ekstrakcione tehnike jeste formiranje mikrokapljica ekstrakcionog rastvarača dispergovanog u vodenoj fazi. Velika kontaktna površina između njih rezultira u brzom prenosu masa, a time i brzom ekstrakciji.

Performanse DLLME tehnike sagledavane su i upotrebom vorteks mešanja u intervalima 1–5 min. Kao što je i očekivano, kod ovakvih brzih ekstrakcionih prenosa masa, vreme vorteksovanja nije imalo značajan uticaj na prinos ekstrakcija. Odlučeno je da se upotreba vorteksa od 1 min koristi pre i nakon tretmana u ultrazvučnom kupatilu.

Uticaj tretmana u ultrazvučnom kupatilu testiran je u vremenskom intervalu od 5–15 min (u rasponima od 1 min). Porast prinosa ekstrakcija je primećen do 10 min upotrebe ultrazvučnog kupatila ($R 76,1–114,0\%$), nakon čega vreme tretiranja u ultrazvučnom kupatilu nije imalo značajnijeg uticaja na prinos ekstrakcija.

Uticaj brzine centrifugiranja testiran je u rasponu od 2000–4000 o min⁻¹. Povećanje broja obrtaja po minuti centrifugiranja do 2500 o min⁻¹ povoljno je uticalo na prinose ekstrakcija, dok dalje povećanje nije imalo efekta na prinose, pa je brzina centrifugiranja od 2500 o min⁻¹ odabrana za dalja ispitivanja.

4.3.3 Matematički model sistem za DLLME

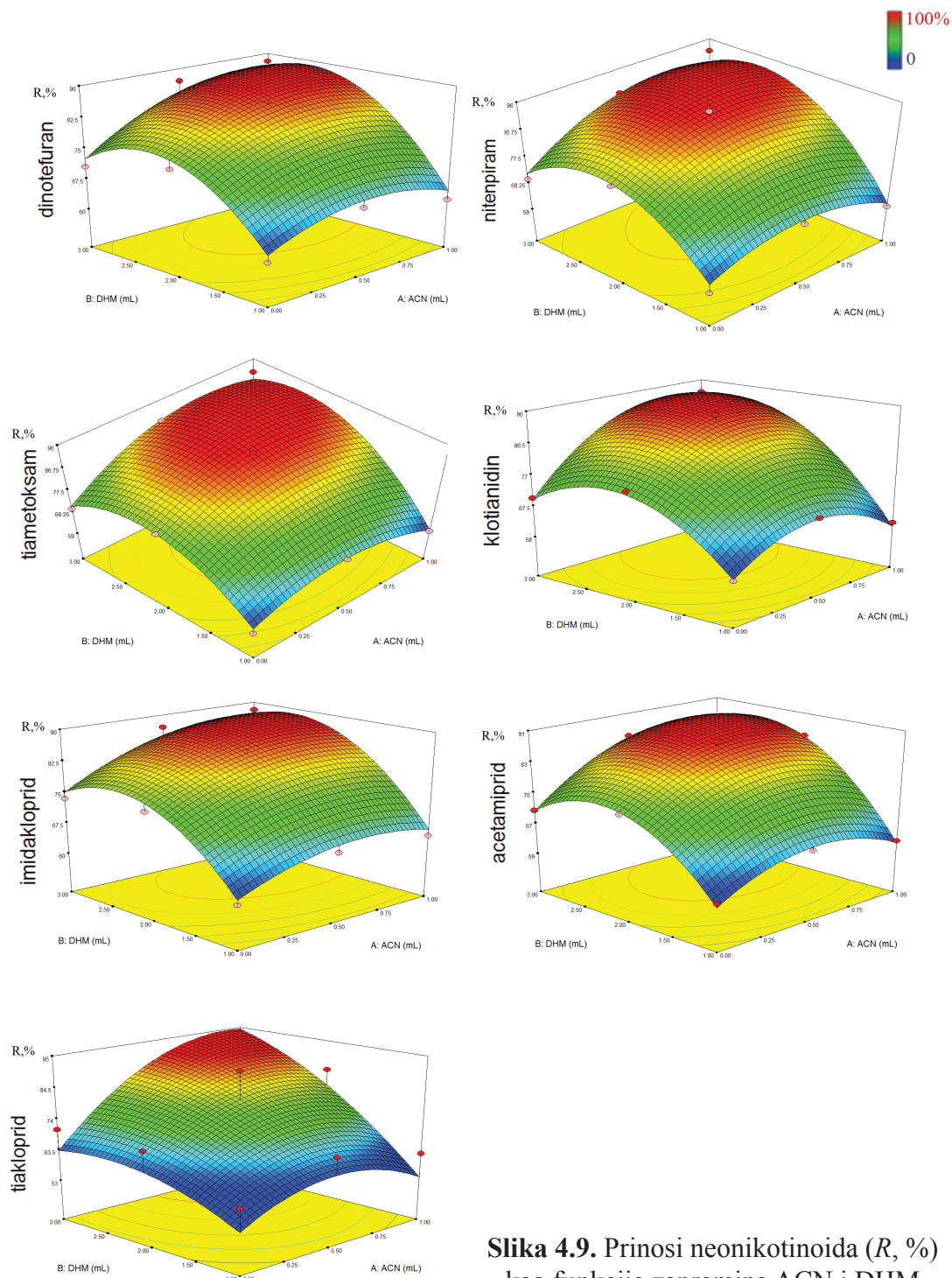
Da bi se odredili optimalni parametri za DLLME tehniku pripreme uzoraka, korišćen je matematički model zasnovan na statističkoj obradi dobijenih eksperimentalnih podataka. Metodologija površina odziva je korisna metodologija za primenu ovakvih modela, jer omogućava istovremeno ispitivanje više faktora, kao i njihovu međusobnu zavisnost na minimalnom broju ponovljenih eksperimenata. Dobijeni parametri predloženih kvadratnih modela na osnovu eksperimentalnih procedura, prikazani su u tabeli 4.10.

Tabela 4.10. Centralno kompozitni dizajn, ANOVA rezultati, značajni faktori modela (A: *V*(ACN), mL; B: *V*(DHM), mL) i kriterijumi funkcije poželjnih odgovora

Neonikotinoid	F-vrednost	p- vrednost	Značajni faktori modela	r ²	Adekvatna preciznost	Kriterijumi funkcije poželjnih odgovora
Dinotefuran	94,12	0,0105	A, B, A ² , B ²	0,9958	28,80	maksimalan
Nitenpiram	21,05	0,0460	B ²	0,9814	11,92	maksimalan
Tiametoksam	27,52	0,0354	B ²	0,9857	13,85	maksimalan
Klotianidin	23,60	0,0411	/	0,9833	12,96	maksimalan
Imidakloprid	201,34	0,0049	A, B, A ² , B ²	0,9980	44,17	maksimalan
Acetamiprid	89,58	0,0111	A, B, A ² , B ²	0,9956	25,22	maksimalan
Tiakloprid	25,34	0,0384	A, B, A ²	0,9845	12,88	maksimalan

Relativno visoka vrednost koeficijenta korelacije r^2 označava dobro slaganje dobijenih eksperimentalnih podataka sa predloženim modelima. Značajnost svakog koeficijenta je određena Studentovim t-testom i sa dobijenom p -vrednošću. Veća t -vrednost i manja p -vrednost određuju veći značaj ispitivanog koeficijenta u predloženom model sistemu. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je za prinos ekstrakcija neonikotinoida veći značaj imala zapremina DHM nego ACN. Kvadratni uticaj zapremine DHM bio je najznačajniji, dok je značaj interakcije zapremine ACN i DHM takođe prisutan. U ovom istraživanju svi koeficijenti korelacije r^2 bili su u dozvoljenim granicama $r^2 \geq 0,80$, označavajući dobro slaganje eksperimentalnih podataka sa jednačinama polinoma drugog reda. Svi modeli bili su značajni sa vrednostima $p < 0,05$. Adekvatna preciznost označava odnos signal/šum, pri čemu je odnos > 4 poželjno ostvariti. Odnosi adekvatne preciznosti kretali su

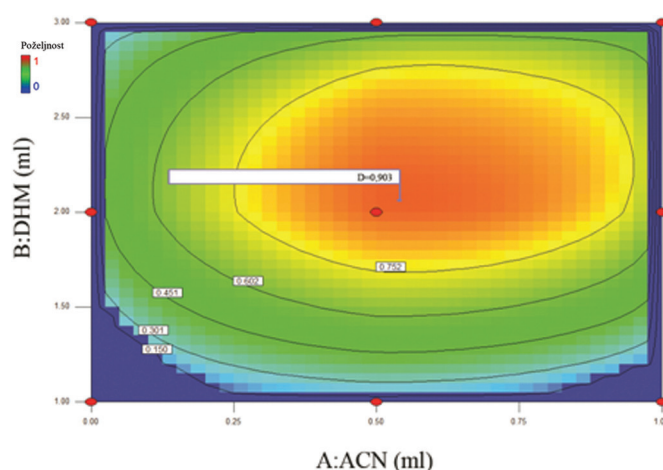
se 11,92–44,17 (tabela 4.10), označavajući adekvatne signale, a samim tim i značajne modele datog procesa. Relativna standardna devijacija je mera reproduktivnosti modela, sa prihvatljivim vrednostima $RSD < 10\%$, što je i postignuto za sve modele. Uticaj variranja zapremina ACN i DHM na prinos ekstrakcije ispitivanih neonicotinoida prikazan je na slici 4.9. Kao što se može primetiti, postoji pik maksimum prinosa neonicotinoida za ispitivani opseg zapremina ACN i DHM. Stoga, bilo je neophodno optimizovati ekstrakcioni proces u smislu korišćenih zapremina ACN i DHM. Svi ispitivani neonicotinoidi pokazali su slična svojstva u pogledu uticaja zapremina ACN i DHM.



Slika 4.9. Prinosi neonicotinoida ($R, \%$) kao funkcije zapremina ACN i DHM

4.3.4 Optimizacija DLLME upotrebom funkcije poželjnog odziva

Rezultati optimizacije ekstrakcione DLLME procedure korišćenjem Deringerove funkcije poželjnog odziva za maksimizaciju prinosa ispitivanih neonikotinoida predstavljeni su na slici 4.10. Kriterijumi za optimizaciju procesa su tako odabrani da zapremine ACN i DHM ostanu u testiranim granicama, a da se prinosi neonikotinoida kreću ka 100% (funkcija poželjnosti 1). Kao što se na slici 4.10 može videti, najviša vrednost funkcije poželjnog odziva ($D=0,903$) dobijena je u delu oko centralne tačke, pri čemu optimalne vrednosti zapremina ACN i DHM iznose 0,54 mL za ACN i 2,06 mL za DHM. Radi lakšeg izvođenja DLLME procedure vrednosti disperznog sredstva (ACN) od 0,5 mL i ekstrakcionog sredstva (DHM) od 2,0 mL usvojene su kao optimalne za dalja određivanja odabranih neonikotinoida.



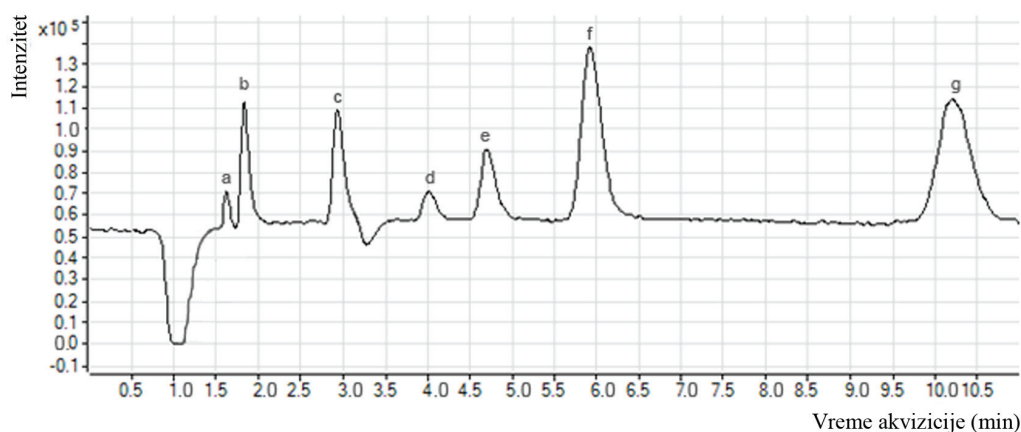
Slika 4.10. Grafik površine odziva koji odgovara maksimumu optimalnih vrednosti zapremina ACN i DHM u postupku optimizacije DLLME tehnike

4.3.5 Optimizacija MS/MS parametara

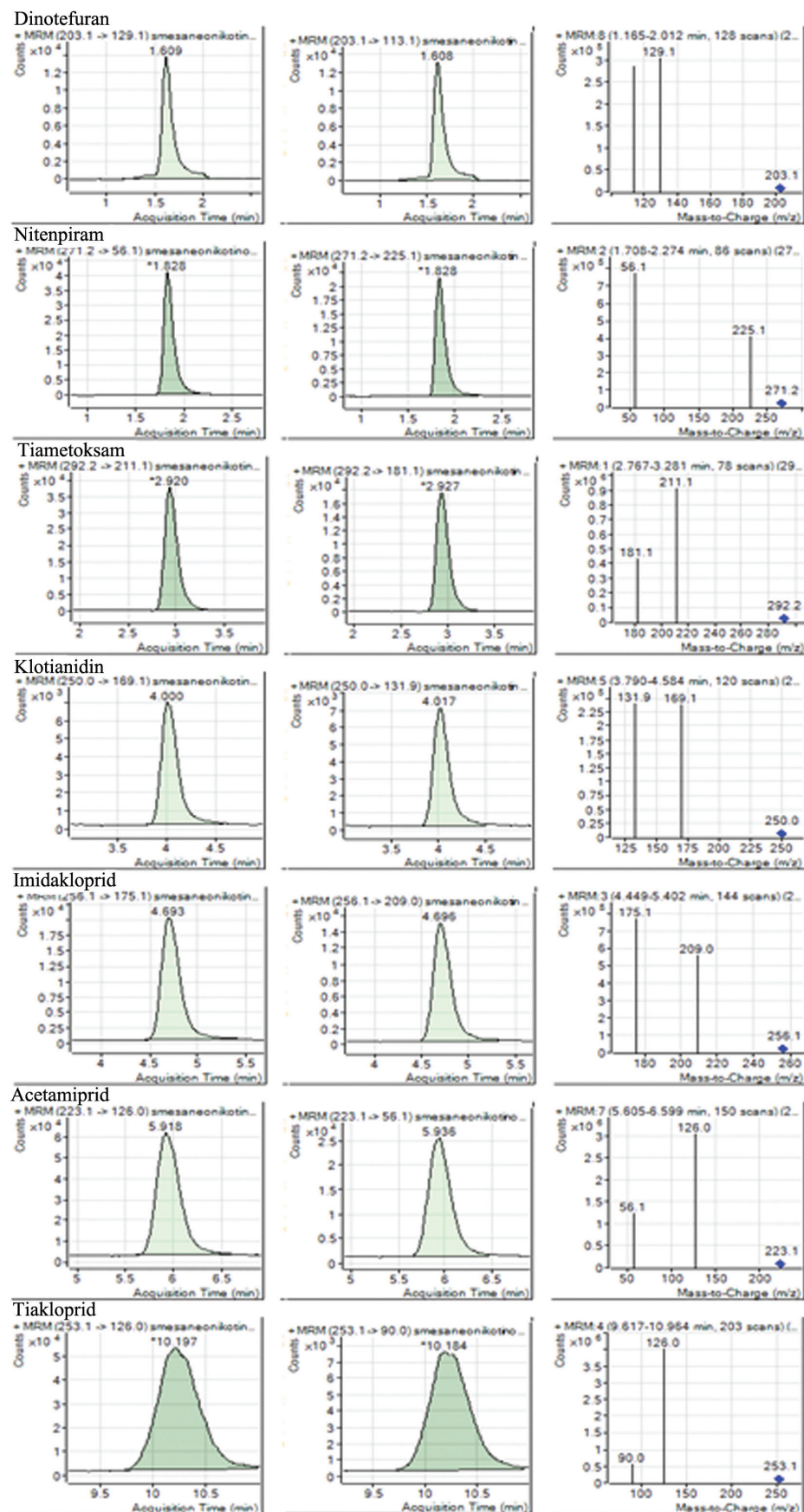
Kako bi se postiglo dobro razdvajanje sa visokom osetljivošću i nedvosmislenom identifikacijom svih sedam neonikotinoida, uzorci meda podvrgnuti su različitim eksperimentima koji su kao rezultat omogućili dobijanje optimalnih uslova rada uređaja za njihovo određivanje. Istraživane su optimalne tranzicije jona neonikotinoida i njihovi pripisani akvizicioni parametri u MRM režimu rada. Eksperimenti su automatski izvođeni pomoću MassHunter Workstation Optimizer softvera.

Početno ispitivanje optimalnih uslova MS/MS sistema se sastojalo iz dva dela. U prvom delu vršena je optimizacija napona na fragmentoru za svih 7 neonikotinoida, kako bi se obezbedio najjači signal prekursor jona. Pri pozitivnoj elektrosprej jonizaciji mravlja kiselina utiče na formiranje $[M+H]^+$

prekursor jona, utičući na bolju osetljivost, rezoluciju i oblik pikova. Svi neonikotinoidi su analizirani pri naponu fragmentora u rasponu od 80–150 V (u koracima od po 10 V). Odabran je optimalan napon na fragmentoru za svaki neonikotinoid upoređujući i birajući najveću površinu pika prekursor jona. Analizirajući odabrane neonikotinoide u koncentraciji $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ izabrane su kolizione energije (testirane kolizione energije 5 V, 10 V, 15 V, 20 V, 25 V i 30 V) za kvantifikacione i jone za potvrdu. Odabrani naponi na fragmentoru, kao i odgovarajuće kolizione energije za ispitivane neonikotinoide, prikazani su u tabeli 3.3. Nakon optimizacije MS/MS parametara, uzorci meda spajkovani su na koncentracijskom nivou GO– $100,0 \mu\text{g kg}^{-1}$, nakon čega su prošli proceduru pripreme uzoraka zasnovanu na DLLME. Snimljeni ukupni jonski hromatogram (TIC) HPLC-MS/MS metodom spajkovane koncentracije odabranih neonikotinoida od $75,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ je prikazan na slici 4.11, demonstrirajući dobro hromatografsko razdvajanje ispitivanih neonikotinoida. MRM hromatogram na istom koncentracijskom nivou je prikazan na slici 4.12, ističući kvantifikacione i potvrdne tranzicije i pripadajuće masene spektre.



Slika 4.11. Ukupni jonski hromatogram (TIC): (a) dinotefuran, (b) nitenpiram, (c) tiametoksam, (d) klotianidin, (e) imidaklopid, (f) acetamiprid i (g) tiaklopid u $75,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ spajkovanom uzorku meda



Slika 4.12. MRM hromatogrami jona za potvrdu i kvantifikacionog jona i odgovarajući maseni spektri dinotefurana, nitenpirama, tiametoksama, klotianidina, imidakloprida, acetamidiprida i tiakloprida u 75,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ spajkovanom uzorku meda

4.3.6 Ispitivanje uticaja matriksa

Povećanje ili smanjenje intenziteta signala analita, kao posledica uticaja matriksa, predstavlja glavni problem u tačnoj hromatografiji kuplovanoj sa masenom spektrometrijom i još uvek predstavlja otvoreno pitanje za dalja istraživanja. Iako tačan mehanizam povećanja/smanjenja signala pod uticajem matriksa nije poznat, pretpostavlja se da komponente matriksa utiču na efektivnost jonizacionog procesa, uzrokujući pozitivne ili negativne efekte na količinu formiranih jona analita. Korišćenje kolone, koja ne omogućava zadovoljavajuće razdvajanje analita od komponenata uzorka ili količina komponenata matriksa u injektovanom uzorku su neki od negativnih faktora koji utiču na jonizaciju analita. Efikasnost izdvajanja analita iz uzorka se meri prinosom neonikotinoidea. Jedan od načina provere uticaja matriksa jeste upoređivanjem R dobijenih korišćenjem kalibracione krive konstruisane upotrebom standarda rastvorenih u čistom rastvaraču ili mobilnoj fazi (eng. *solvent calibration curve*, SC) i MMC kalibracione krive. Ukoliko se dobiju veće R vrednosti upotrebom SC u odnosu na MMC, komponente matriksa su uticale na povećanje signala, dok obrnut slučaj označava smanjenje signala pod uticajem matriksa. Drugi način provere uticaja matriksa koji je korišćen jeste upoređivanjem nagiba SC i MMC krivih, čija razlika ukazuje na postojanje povećanja/smanjenja signala pod uticajem matriksa. Na osnovu pregledane regulative, trenutno ne postoji ona koja propisuje dozvoljen uticaj matriksa na analitički signal. Tokom razvijanja HPLC-MS/MS metode za određivanje odabranih neonikotinoidea iz uzoraka meda korišćeni su MMC rastvori, kako bi se uticaj matriksa na analitički prinos kompenzovao. Uticaj matriksa, koji se može proceniti poređenjem signala koji potiče od neonikotinoidea u matriksu u odnosu na isti signal u čistom rastvaraču, testiran je na dva koncentraciona nivoa neonikotinoidea (50,0 i 75,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$). Dobijeni prinosi izračunati na osnovu kalibracionih krivih standarda neonikotinoidea rastvorenih u čistom rastvaraču (SC) ili matriksu (MMC), prikazani su u tabeli 4.11.

Tabela 4.11. Prinosi neonikotinoidea na osnovu SC (R_s) i MMC (R) krivih

Neonikotinoid	Nivo spajkovanja ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	R_s (%)	R (%)
Acetamiprid	75,0	77,8	88,8
	50,0	81,1	92,2
Klotianidin	75,0	53,1	78,4
	50,0	56,8	85,9
Dinotefuran	75,0	67,0	98,8
	50,0	63,3	100,0
Imidakloprid	75,0	77,4	76,1
	50,0	80,3	80,0
Nitenpiram	75,0	30,9	98,0
	50,0	33,9	90,0
Tiakloprid	75,0	131,0	114,0
	50,0	131,0	100,0
Tiametoksam	75,0	71,9	84,0
	50,0	76,9	90,0

Interakcije komponenti ispitivanog matriksa meda uticale su na povećanje analitičkih signala imidakloprida i tiakloprida, dok su iste interakcije prouzrokovale smanjenje analitičkih signala tiame-toksama, klotianidina, acetamiprida, dinotefurana i nitenpirama. Supstance matriksa koje se eluiraju zajedno sa neonikotinoidima sa hromatografske kolone mogu uzrokovati problem pri kvantifikaciji istih, zbog interakcija koje uzrokuju povećanje ili smanjivanje signala, s tim što smanjenju signala najviše podležu supstance koje prve izlaze sa hromatografske kolone. Analizirajući ostvarene prinose, može se primetiti da je na nitenpiram, dinotefuran i klotianidin najizraženiji uticaj matriksa ($R \leq 70\%$). Međutim, prinosi računati upotrebom MMC kalibracione krive bili su u zadovoljavajućem opsegu (76,1–114,0%). Ovaj rezultat ujedno i ukazuje na neophodnost upotrebe MMC krive u daljem ispitivanju ostataka neonikotinoida u uzorcima meda.

4.3.7 Validacija metode

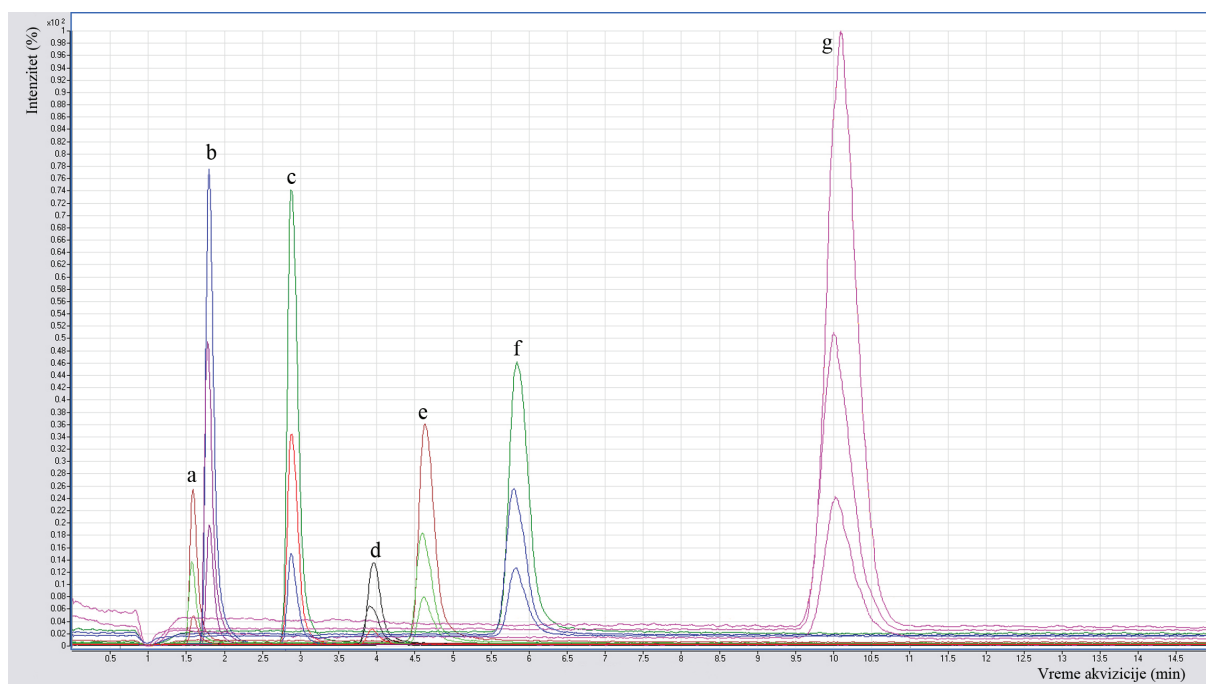
Linearnost MMC krivih ispitivanih neonikotinoida je testirana u koncentracijskom opsegu od GO–100,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Linearnost izražena kao koeficijent korelacije (r^2) je bila iznad 0,9906 za linearni opseg svih ispitivanih neonikotinoida (tabela 4.12).

Tabela 4.12. Retenciona vremena (t_r), RSD od t_r i MMC krive sa pripadajućim r^2 ispitivanih neonikotinoida

Neonikotinoid	Srednja vrednost t_r (n=15) (min)	RSD t_r (%)	Linearni opseg ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Linearne jednačine	Koeficijent korelacije (r^2)
Dinotefuran	1,58	2,20	2,0 -100,0	$y=91,9x-146,4$	0,9993
Nitenpiram	1,79	3,80	1,5-100,0	$y=241,9x+1250,1$	0,9956
Tiametoksam	2,84	3,70	1,0-100,0	$y=420,1x-30,9$	0,9968
Klotianidin	3,89	2,50	2,5-100,0	$y=100,1x-322,3$	0,9967
Imidakloprid	4,59	0,60	1,0-100,0	$y=352,4x-1271,1$	0,9915
Acetamiprid	5,76	1,26	1,0-100,0	$y=1259,3x+3675,4$	0,9906
Tiakloprid	9,94	1,20	1,0-100,0	$y=1147,7x+2150,1$	0,9980

Selektivnost metode je ispitivana analizom 5 slepih uzoraka meda i konstatovano je da nema pikova na retencionim vremenima neonikotinoida koji pripadaju drugim supstancama iz meda.

MRM hromatogrami spajkovanih uzoraka meda sa neonikotinoidima na tri koncentracijska nivoa (10,0, 25,0 i 50,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$) su prikazani na slici 4.13, demonstrirajući dobre hromatografske karakteristike razvijene metode sa prinosima prikazanim u tabeli 4.13.



Slika 4.13. Ekstrahovani MRM jonski hromatogrami spajkovanih uzoraka meda sa smesom neonikotinoida a) dinotefuran, b) nitenpiram, c) tiametoksam, d) klotianidin, e) imidakloprid, f) acetamiprid i g) tiakloprid na $10,0 \mu\text{g kg}^{-1}$, $25,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ i $50,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ koncentracijskim nivoima

Tabela 4.13. Parametri tačnosti i preciznosti metode određivanja neonikotinoida primenom DLLME i HPLC-MS/MS metode

Neonikotinoid	Nivo spajkovanja ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Tačnost	Ponovljivost (n=5)	Intermedijerna reproduktivnost (n=3x5)
		Srednja vrednost R (%)	RSD (%)	RSDs (%)
Acetamiprid	100,0	90,7	4,26	15,30
	10,0	82,4	4,16	14,70
Klotianidin	100,0	96,1	8,16	13,02
	10,0	74,3	5,12	8,87
Dinotefuran	100,0	95,4	9,58	11,70
	10,0	96,2	8,09	16,20
Imidakloprid	100,0	90,6	4,07	6,70
	10,0	97,5	10,80	13,98
Nitenpiram	100,0	89,2	11,00	15,70
	10,0	104,4	6,66	13,00
Tiakloprid	100,0	99,4	2,74	6,64
	10,0	113,9	10,30	15,60
Tiametoksam	100,0	88,2	11,80	13,10
	10,0	92,1	7,23	12,20

Tačnost metode procenjena je na osnovu ispitivanja prinosa neonikotinoida i preciznosti sagledavanjem relativne standardne devijacije za 15 ponavljanja analize na dva koncentracijska nivoa ($10,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ i $100,0 \mu\text{g kg}^{-1}$) korišćenjem spajkovanih uzoraka meda i MMC krivih. Na osnovu Uputstva EU za validaciju metoda za određivanje pesticida, srednja vrednost prinosa metode bi trebalo da se kreće između 70% i 120% za svaki ispitivani koncentracijski nivo sa $\text{RSD} \leq 20\%$ [296]. Rezultati prinosa ispitivanih neonikotinoida prezentovani u tabeli 4.13, zadovoljavaju gorepomenuti uslov validacije. Preciznost u uslovima ponovljivosti je ispitana analizom istog uzorka u 5 ponavljanja na 2 koncentracijska nivoa u toku istog dana. Dobijene RSD vrednosti su se kretale između 2,74–11,8%, ispunjavajući neophodan uslov $\text{RSD} \leq 20\%$. Preciznost u uslovima intermedijerne reproduktivnosti je određena analizom spajkovanih uzoraka meda na istim koncentracijskim nivoima, kao i za ispitivanje prinosa i ponovljivosti, tokom 3 dana na istom uređaju od strane različitih operatera. Dobijene RSD vrednosti prikazane su u tabeli 4.13 i kretale su se između 6,64–16,2%, ukazujući na dobru preciznost razvijene metode.

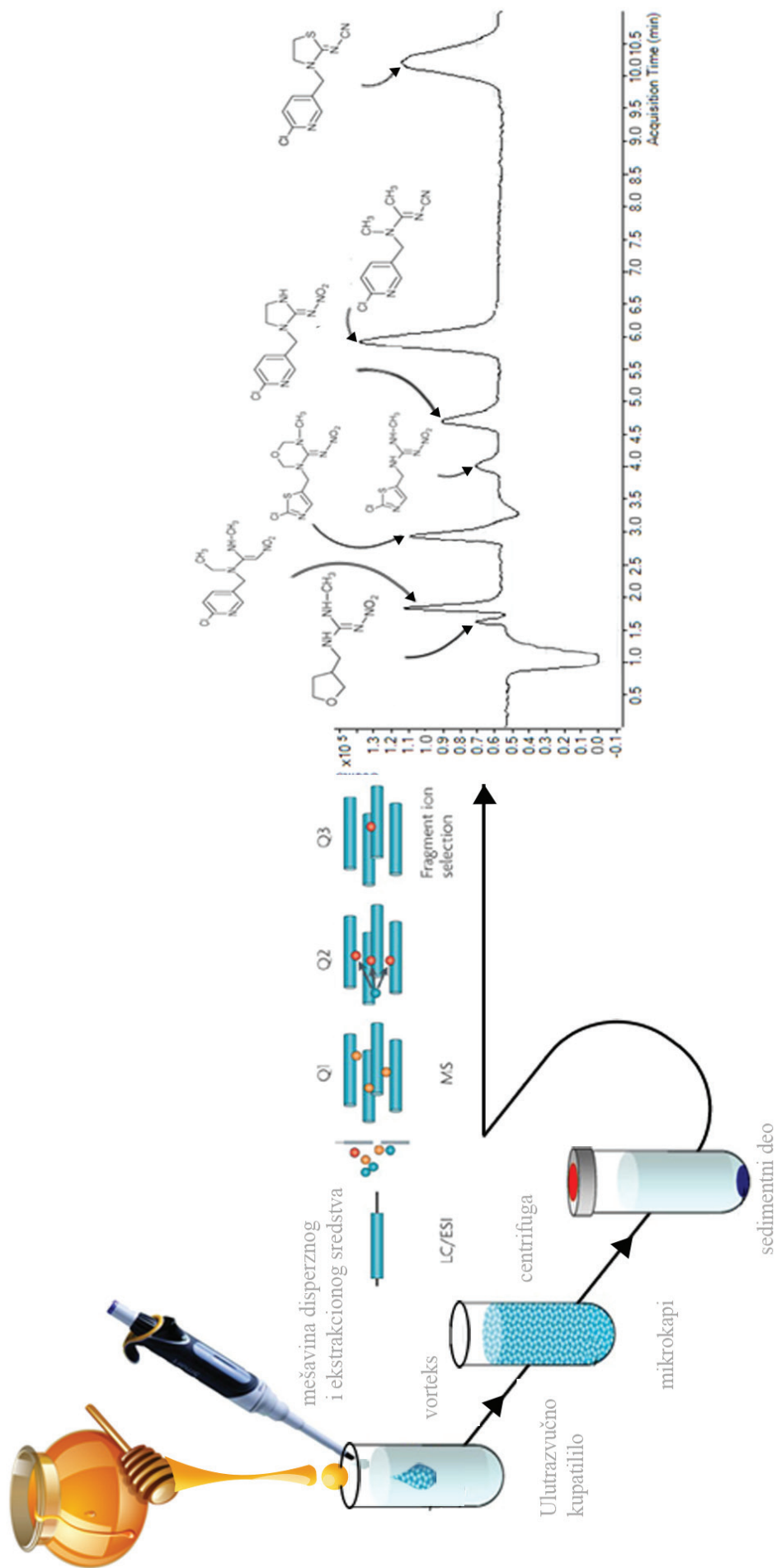
Za identifikaciju i potvrdu prisustva ispitanih neonikotinoida neophodno je da barem 2 tranziciona jona ispitivanog analita daju značajno različit signal u odnosu na pozadinski šum tokom MS/MS detekcije. Granice detekcije i određivanja određene su na osnovu praćenja S/N odnosa koristeći MMC krivu. Za GD odnos S/N je iznosio 3, a za GO 10 i dobijene vrednosti su prezentovane u tabeli 4.14. Ovi parametri su određeni analizom serije MMC rastvora sa opadajućim koncentracijama. Dobijene vrednosti GO bile su manje u odnosu na MDK EU za neonikotinoide u medu [1]. Za neke neonikotinoide MDK obuhvataju zbir ostataka datog neonikotinoida i njegovih metabolite, pa će se u budućem radu pažnja usmeriti i na ispitivanje ovih metabolita.

Tabela 4.14. Granice detekcije i određivanja odabranih neonikotinoida sa maksimalno dozvoljenim količinama ostataka neonikotinoida u medu po regulativi Evropske unije [1]

Neonikotinoid	GD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	GO ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	MDK EU ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Acetamiprid	0,5	1,5	50
Klotianidin	1,0	2,5	10
Dinotefuran	0,9	2,5	10
Imidakloprid	0,5	1,5	50
Nitenpiram	0,8	1,8	10
Tiakloprid	0,5	1,5	200
Tiametoksam	0,7	1,5	10

4.3.8 Primena HPLC-MS/MS metode na realne uzorke

Razvijena HPLC-MS/MS metoda primenjena je za analizu 15 komercijalnih uzoraka meda cvetnog porekla. Rezultati su pokazali da ispitivani uzorci meda nisu sadržali ostatke ispitivanih neonikotinoida. Primenjivost razvijene metode na uzorke meda pokazana je spajkovanjem ovih uzoraka različitim koncentracijama neonikotinoida ($10,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ i $100,0 \mu\text{g kg}^{-1}$), nakon čega su dobijeni rezultati korišćeni tokom validacije metoda (tabela 4.13), gde su pokazali da ispunjavaju sve uslove propisane standardom *SANCO/12495/2011* [296]. Shematski prikaz razvijene, optimizovane i validovane metode za određivanje neonikotinoida u medu primenom HPLC-MS/MS metode prikazan je na slici 4.14.



Slika 4.14. Shematski prikaz određivanja neonikotinoida u medu upotrebom DLLME i HPLC-MS/MS

4.4 Razvoj HPLC-DAD metode za određivanje neonikotinoida u medu primenom DLLME i QuEChERS tehnika

Nakon optimizacije i razvoja brze, osetljive i pouzdane ekstrakcione metode, pri kojoj se koriste male zapremine rastvarača za ekstrakciju neonikotinoida iz uzoraka meda koji su bili određivani korišćenjem HPLC-MS/MS sistema, dalja istraživanja su se bazirala na dodatnoj optimizaciji hromatografskih uslova. Upotrebljena je RSM, kako bi određeni optimalni hromatografski uslovi obezbedili osetljivo i selektivno određivanje odabranih neonikotinoida upotrebom DAD. Na taj način bi se omogućilo njihovo određivanje u kontrolnim laboratorijama, koje, zbog još uvek visoke cene MS/MS detektora, imaju mogućnost samo HPLC-DAD određivanja.

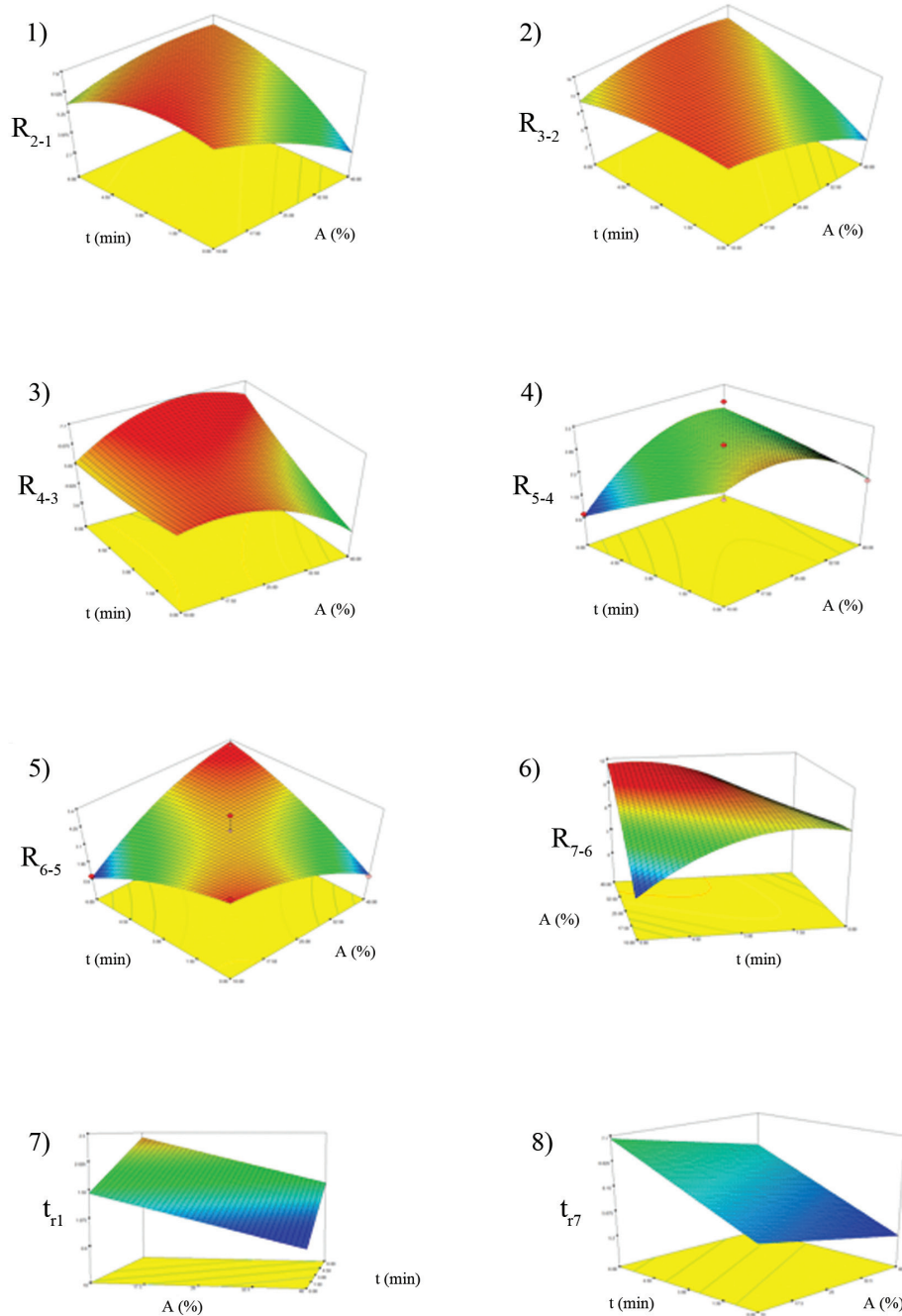
4.4.1 Optimizacija hromatografskih uslova

Neonikotinoidi su polarna jedinjenja sa apsorpcionim maksimumom u UV oblasti spektra. Iz tog razloga HPLC-DAD je jedna od najzastupljenijih metoda određivanja neonikotinoida. Korišćenjem uređaja koji ima mogućnost istovremene detekcije upotrebom DAD i MS/MS detektora pruža se prilika nedvosmislenog određivanja neonikotinoida iz različitih uzoraka. Preliminarna ispitivanja su izvedena radi pronalaženja optimalnih hromatografskih uslova u cilju zadovoljavajućeg hromatografskog razdvajanja određivanih neonikotinoida sa dovoljnom osetljivošću.

Smesa standardnih rastvora neonikotinoida ($100,0 \mu\text{g L}^{-1}$) je upotrebljena za ispitivanje optimalnih hromatografskih parametara. Različite brzine protoka mobilne faze, temperature kolone i talasne dužine testirane su kako bi se odredili najuticajni parametri radi najboljeg razdvajanja komponenata za što kraće vreme trajanja analize. Na osnovu dobijenih rezultata testiranog temperaturnog intervala od 20–40 °C, odabrana je temperatura kolone od 30 °C. Apsorpcioni maksimumi ispitivanih neonikotinoida bili su na 266 nm za klotianidin, dinotefuran i imidakloprid i na 244 nm za nitenpiram, tiametoksam, acetamiprid i tiakloprid.

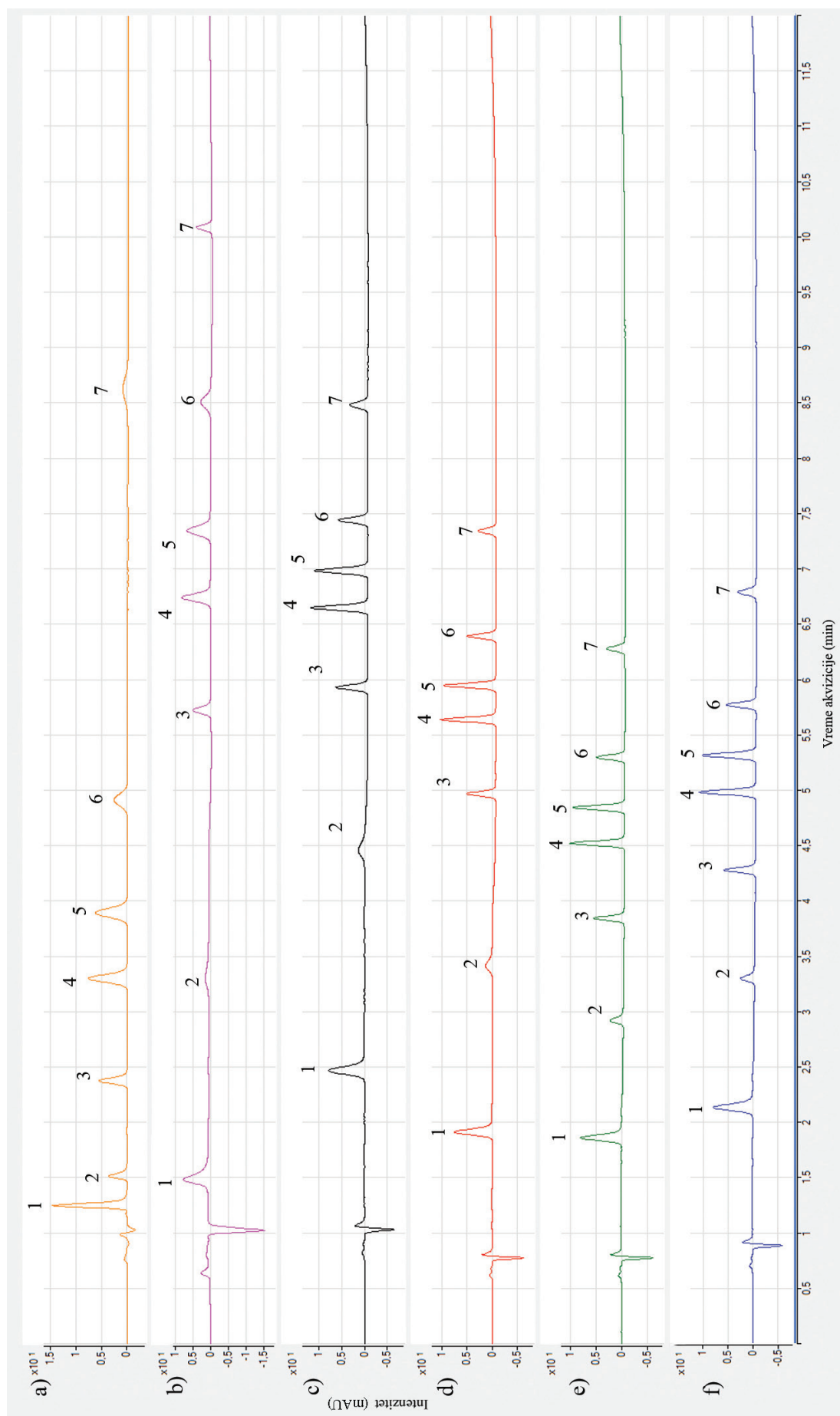
Odnos rastvarača mobilne faze tokom analize, kao i brzina protoka mobilne faze su optimizovani korišćenjem RSM upotrebom *Box-Behnken* dizajna procedurom opisanom u eksperimentalnom delu disertacije.

Ispitivanjem dodeljenih verovatnoća, odgovori sistema za rezoluciju su pokazali optimalne vrednosti korišćenjem kvadratnih modela, dok su odgovori sistema za retencionna vremena korišćenjem linearnih modela dali optimalne vrednosti. Krive površine odziva linearnih i kvadratnih modela koji utiču na kompoziciju rastvarača mobilne faze i brzine protoka mobilne faze su prikazane na slici 4.15.



Slika 4.15. Površine odgovora kvadratnih modela 1-6) rezolucije između odgovarajućih pikova R_{2-1} – R_{7-6} i 7, 8) linearnih modela retencionih vremena prvog i poslednjeg pika t_{r1} i t_{r7} u funkciji odnosa sastava mobilne faze pri protoku mobilne faze od $0,7 \text{ mL min}^{-1}$

Hromatogrami na slici 4.16 ilustruju različita razdvajanja neonikotinoidea primenom različitih opsega faktora ispitivanih pomoću metodologije površine odziva. Kao što se može primetiti sa prikazanih hromatograma, različite brzine protoka mobilne faze i različit sastav mobilne faze uzrokovao je pojavu različitog razdvajanja neonikotinoidea. Optimizacijom procesa upotrebom metodologije površine odziva postignuto je optimalno razdvajanje neonikotinoidea (slike 4.18, 4.20a i 4.21).

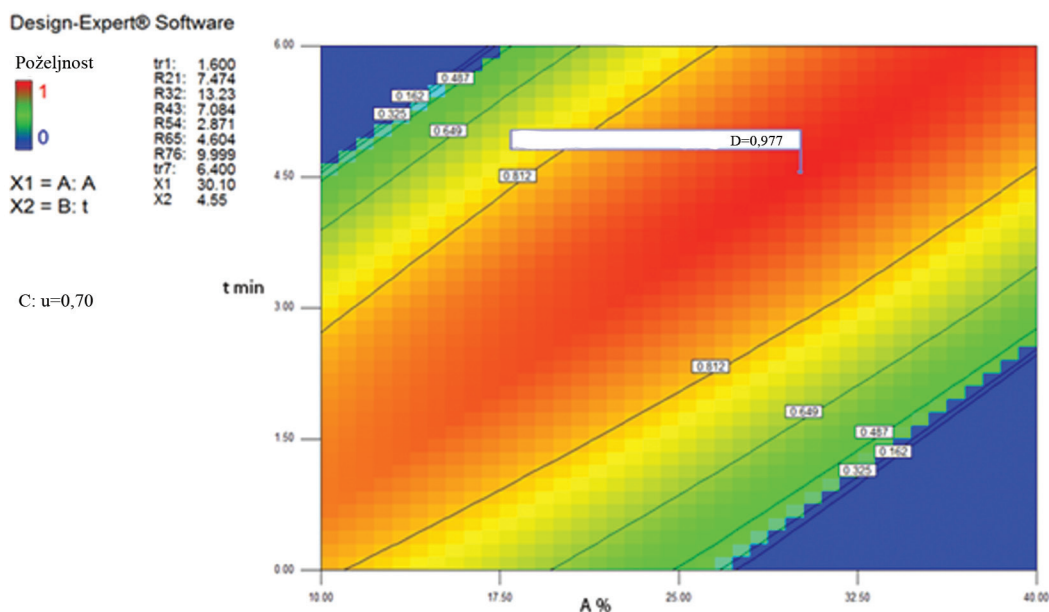


Slika 4.16. Hromatogrami (266 nm) odabranih neonicotinoida pri različitim uslovima: a) izokratski režim: B-80%, protok 0,6 mL min⁻¹ b) gradijentni režim: (0 min B 90%-6 min B 90%), protok 0,65 mL min⁻¹ c) gradijentni režim: (0 min B 90%-6 min B 60%-10 min B 90%), protok 0,65 mL min⁻¹ d) gradijentni režim: (0 min B 90%-6 min B 75%-10 min B 90%), protok 0,8 mL min⁻¹ e) gradijentni režim: (0 min B 90%-6 min B 60%-10 min B 90%), protok 0,8 mL min⁻¹ f) gradijentni režim: (0 min B 90%-6 min B 80%-10 min B 90%), protok 0,7 mL min⁻¹; 1) dinotefuran, 2) nitenpiram, 3) tiametoksam, 4) klotianidin, 5) imidakloprid, 6) acetamiprid i 7) tiakloprid

Podaci dobijeni statističkom obradom korišćenjem ANOVA analize za sve modele prikazani su u tabeli 4.15. U ovom istraživanju svi koeficijenti korelacije bili su u dozvoljenim granicama $r^2 \geq 0,80$, označavajući dobro slaganje eksperimentalnih podataka sa jednačinama polinoma drugog reda. Svi modeli bili su značajni sa vrednostima $p < 0,05$. Adekvatna preciznost označava odnos signal/šum, pri čemu je poželjno ostvariti odnos > 4 . Odnosi adekvatne preciznosti kretali su se od 5,61–25,99, označavajući adekvatne signale, a samim tim, i značajne modele datog procesa. Relativna standardna devijacija je mera reproduktivnosti modela, sa prihvatljivim vrednostima $RSD < 10\%$, što je i postignuto za sve modele. Sagledavanjem uslova i kriterijuma funkcije poželjnih odziva, sprovedena je procedura optimizacije. Optimalni uslovi su postignuti sa maksimalnom ukupnom funkcijom poželjnih odziva $D=0,977$. Grafik odziva površina koji odgovara maksimumu optimalnih vrednosti prikazan je na slici 4.17. Koordinate na grafiku predstavljaju optimalne hromatografske uslove, pri kojim se udeo komponente A (ACN) u mobilnoj fazi povećava linearno od 10 do 40% tokom 6 min, sa konstantnom brzinom protoka od $0,7 \text{ mL min}^{-1}$.

Tabela 4.15. *Box-Behnken* dizajn, odabrani modeli, ANOVA rezultati, faktori (A-udeo ACN u mobilnoj fazi, %; B- trajanje gradijenta, min; C- protok mobilne faze, mL min^{-1}) i kriterijumi funkcije poželjnih odziva

Odziv sistema	Model	F- vrednost	P- vrednost	Značajni faktori modela	Koeficijent korelacije, r^2	Adekvatna preciznost	Kriterijumi funkcije poželjnih odgovora
t_{r1} (dinotefuran)	linearni	7,96	0,0029	A, B	0,8474	9,84	$\geq 1 \text{ min}$
R_{2-1} (nitenpiram-dinotefuran)	kvadratan	15,33	0,0008	A, AB, C^2	0,9517	9,45	≥ 2
R_{3-2} (tiametoksam-nitenpiram)	kvadratan	98,81	$< 0,0001$	A, B, AB, A^2 , B^2 , C^2	0,9922	25,99	≥ 2
R_{4-3} (klotianidin-tiametoksam)	kvadratan	13,21	0,0013	A, AB, AC, A^2 , C^2	0,9444	11,46	≥ 2
R_{5-4} (imidaklopid-klotianidin)	kvadratan	6,64	0,0103	B, AB, BC, A^2 , C^2	0,8951	9,35	≥ 2
R_{6-5} (acetamiprid-imidaklopid)	kvadratan	3,68	0,0408	AB, C^2	0,8256	5,61	≥ 2
R_{7-6} (tiaklopid-acetamiprid)	kvadratan	17,03	0,0006	A, AB, AC, B^2 , C^2	0,9563	11,66	≥ 2
t_{r7} (tiaklopid)	linearni	23,80	$< 0,0001$	B, C	0,8460	16,03	minimalan



4.4.2 Ispitivanje uticaja matriksa

Ispitivanje uticaja matriksa na prinose (HPLC-DAD) ispitivanih neonikotinoida sprovedeno je upotrebom MMC rastvora. U ovom delu istraživanja uticaj matriksa (SSE, supresija/povećanje signala, eng. *signal suppression / enhancement*) je određivan za ceo linearni opseg merenja, upoređivanjem odnosa nagiba MMC i SC kalibracionih krivih za svaki neonikotinoid. Dobijene vrednosti koje karakterišu uticaj matriksa u slučaju korišćenja DLLME i QuEChERS tehnika za pripremu uzoraka su prikazane u tabeli 4.17. Uticaj matriksa koji se manifestuje povećanjem ili smanjenjem analitičkog signala je primećen kod svih ispitivanih neonikotinoida. Uzorci koji su bili pripremljeni QuEChERS procedurom su ispoljili veći uticaj matriksa na analitički signal većine neonikotinoida u odnosu na uzorke pripremljene DLLME procedurom. Moguće objašnjenje postojanja razlike u uticaju matriksa u slučaju dve primenjene procedure pripreme leži u većoj polarnosti ekstrakcionog sredstva korišćenog u QuEChERS proceduri. Veća polarnost ekstrakcionog sredstva (ACN) može da uzrokuje bolju ekstrakciju polarnih jedinjenja iz meda, koja se, zajedno sa neonikotinoidima ekstrahuju, što se odražava na prinos koji potiče od njihovog analitičkog signala, što je u skladu sa ranijim literaturnim zapažanjima [174].

Od ispitivanih neonikotinoida dinotefuran i imidakloprid su bili najviše podložni uticajima matriksa bez obzira na proceduru pripreme uzoraka. Uticaj matriksa ispitivan je i analiziranjem prinosa analitičkog signala ispitivanih neonikotinoida primenom DLLME tehnike pripreme uzoraka na istim koncentracijskim opsezima i HPLC-MS/MS sistema. Dobijene vrednosti koje karakterišu uticaj matriksa u slučaju korišćenja DLLME tehnike za pripremu uzoraka, prikazane su u tabeli 4.18, a u tabeli 4.19 upoređeni su uticaji matriksa pri primeni MS/MS i DAD detektora. Može se zapaziti da je uticaj matriksa na analitički signal dinotefurana bio izraženiji u slučaju MS/MS, apostrofirajući manju robusnost ove metode određivanja.

Ispitivanje uticaja matriksa je još jednom ukazalo na neophodnost korišćenja MMC kalibracionih krivih za određivanje neonikotinoida.

Tabela 4.17. Uticaj matriksa – SSE, korišćenjem DLLME i QuEChERS procedura računat kao odnos nagiba MMC i SC krivih ispitivanih neonikotinoida upotrebom HPLC-DAD sistema

	MMC-DLLME		MMC-QuEChERS		SC		SSE (%)	
	Jednačina prave za opseg GO–100,0 µg kg ⁻¹	Koeficijent korelacije (r ²)	Jednačina prave za opseg GO–100,0 µg kg ⁻¹	Koeficijent korelacije (r ²)	Jednačina prave za opseg 1,5–100,0 µg L ⁻¹	Koeficijent korelacije (r ²)	DLLME	QuEChERS
Neonikotinoid								
Dinotefuran	y=0,072x+0,3558	0,9978	y=0,0645x+0,5262	0,9967	y=0,1025x-0,1079	0,9989	70,2	62,9
Nitenpiram	y=0,1413x+0,2528	0,9978	y=0,1217x+0,5614	0,9981	y=0,1044x+0,3504	0,9987	135,3	116,5
Tiametoksam	y=0,0843x-0,1814	0,9958	y=0,0686x-0,0345	0,9956	y=0,0898x-0,1527	0,9981	93,8	76,4
Klotianidin	y=0,1238x-0,4552	0,9946	y=0,097x+0,3541	0,9985	y=0,1168x-0,2302	0,9995	105,9	83,0
Imidakloprid	y=0,1157x+0,0314	0,9954	y=0,1253x+0,1978	0,9994	y=0,1736x-0,0653	0,9973	66,6	72,2
Acetamiprid	y=0,1785x+0,4996	0,9966	y=0,1544x+1,3129	0,9988	y=0,1811x+0,2967	0,9982	98,5	85,2
Tiaktoprid	y=0,097x+0,3541	0,9985	y=0,1112x+0,0327	0,9983	y=0,1409x+0,2324	0,9986	68,8	78,9

Tabela 4.18. Uticaj matriksa – SSE, korišćenjem DLLME procedure računat kao odnos nagiba MMC i SC krivih ispitivanih neonikotinoida upotrebom HPLC-MS/MS sistema

Neonikotinoid	MMC-DLLME		SC		SSE (%)
	Jednačina prave za opseg GO–100,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$	Koeficijent korelacije (r^2)	Jednačina prave za opseg 1,5–100,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	Koeficijent korelacije (r^2)	
Dinotefuran	$y=334,51x+1319$	0,9890	$y=1119x-5132,1$	0,9988	29,9
Nitenpiram	$y=645,54x+1472,1$	0,9958	$y=728,03x+1125,9$	0,9933	88,6
Tiametoksam	$y=552,46x-178,3$	0,9981	$y=593,92x+479,85$	0,9983	93,0
Klotianidin	$y=41,673-16,939$	0,9999	$y=41,808x+180,67$	0,9953	99,7
Imidaklopid	$y=338,76x-106,7$	0,9980	$y=334,38x+968,73$	0,9909	101,3
Acetamiprid	$y=472,31x+866,59$	0,9946	$y=525,98x-332,6$	0,9995	89,8
Tiaklopid	$y=252,16x+550,63$	0,9920	$y=306,67x-153,36$	0,9995	82,2

Tabela 4.19. Uticaj matriksa na analitičke signale MS/MS i DAD detektora upotrebom DLLME tehnike pripreme uzoraka meda

Neonikotinoid	SSE (%)	
	MS/MS	DAD
Dinotefuran	29,9	70,2
Nitenpiram	88,6	135,3
Tiametoksam	93,0	93,8
Klotianidin	99,7	105,9
Imidaklopid	101,3	66,6
Acetamiprid	89,8	98,5
Tiaklopid	82,2	68,8

4.4.3 Validacija metode

Nakon optimizacije hromatografskih uslova razvijena metoda (HPLC-DAD) za određivanje neonikotinoida upotrebom DLLME i QuEChERS procedura za pripremu uzoraka je validovan. Testirani linearni opseg (GO–100,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$) je rezultirao dobijanjem koeficijenata korelacije iznad 0,9946, kao što je prikazano u tabeli 4.18. Specifičnost metode utvrđena je identifikacijom analita na osnovu upoređivanja njegovog UV apsorpcionog spektra i retencionog vremena sa istim identifikacionim karakteristikama odgovarajućeg standardnog rastvora analita. Odgovarajući hromatografski pikovi, koji odgovaraju analitičkim signalima koji potiču od ispitivanih neonikotinoida, identifikovani su sa zadovoljavajućim S/N odnosom, bez ometajućih pikova na istim retencionim vremenima slepe probe, čime je potvrđena dobra selektivnost razvijene metode. Hromatogrami smese standarda (50,0 $\mu\text{g L}^{-1}$), MMC rastvora, spajkovanih uzoraka meda i slepe probe prikazani su na slici 4.18.

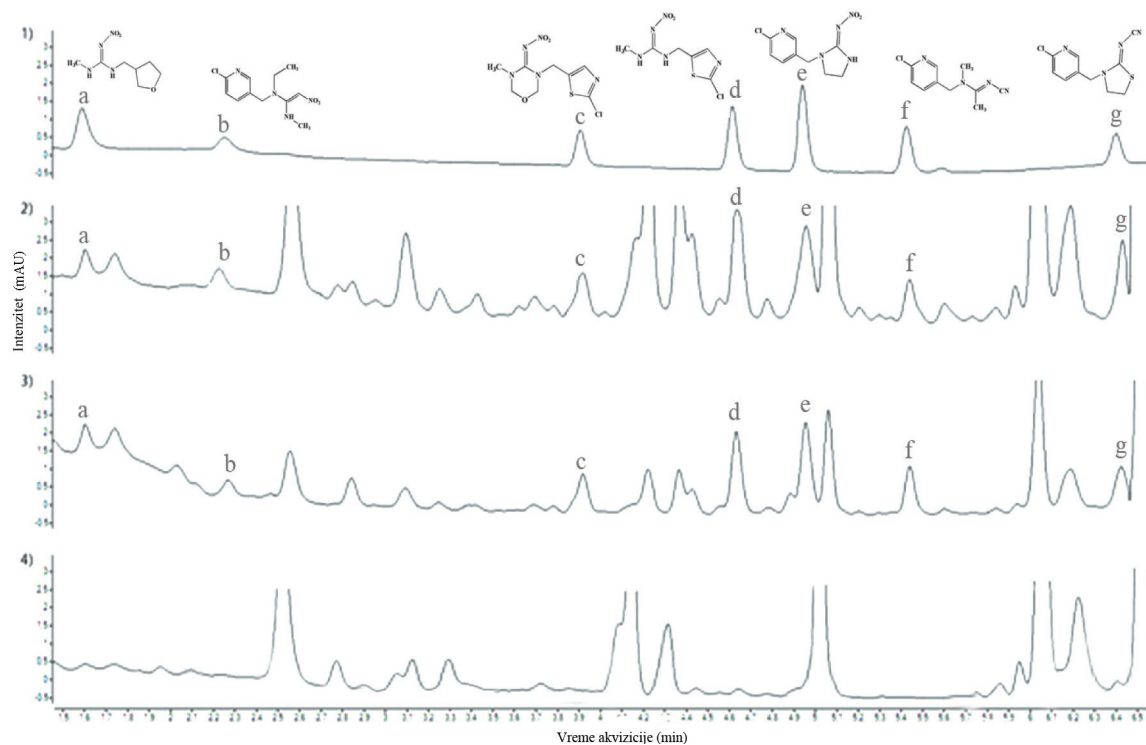
Tačnost metode procenjena je na osnovu ispitivanja prinosa neonikotinoida, a preciznost metode sagledavanjem relativne standardne devijacije za 5 ponavljanja na tri koncentracijska nivoa (10,0, 50,0 i 100,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$) korišćenjem spajkovanih uzoraka meda, pripremljenih DLLME procedurom i MMC kalibracionih krivih.

Rezultati prinosa u tabeli 4.20 su potvrdili zadovoljavajuću tačnost metode (optimalan prinos 70–120% na ispitanim koncentracijskim nivoima sa $RSD \leq 20\%$). Uglavnom niži prinosi nitenpirama i dinotefurana korišćenjem DLLME procedure u odnosu na QuEChERS proceduru mogu se objasniti njihovom većom polarnošću u odnosu na ostale neonikotinoide.

Prinosi ostalih neonikotinoida bili su veći pri korišćenju DLLME tehnike za pripremu uzoraka. Preciznost metode u uslovima ponovljivosti i intermedijerne reproduktivnosti korišćenjem DLLME tehnike pripreme uzoraka iskazana je vrednostima RSD od 3,28–10,40% za ponovljivost i 6,45–14,24% za intermedijernu reproduktivnost. Preciznost metode u uslovima ponovljivosti i intermedijerne reproduktivnosti korišćenjem QuEChERS tehnike pripreme uzoraka iskazana je vrednostima RSD 3,99–10,22% za ponovljivost i 9,12–17,70% za intermedijernu reproduktivnost. Izračunate vrednosti RSD ukazuju na dobru preciznost razvijene metode. Dobijene vrednosti za GD i GO su prikazane u tabeli 4.16. Priprema uzoraka korišćenjem DLLME je omogućila dostizanje nižih vrednosti za GD i GO u odnosu na pripremu uzoraka upotrebom QuEChERS procedure. Dobijene vrednosti za GO su bile niže u odnosu na EU MDK za neonikotinoide u medu. Može se primetiti da su vrednosti GO dobijene HPLC-MS/MS metodom niže u odnosu na HPLC-DAD metodu.

Tabela 4.20. Parametri validacije metode određivanja neonikotinoida primenom HPLC-DAD sistema

Neonikotinoid	Nivo spajkovanja ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Tačnost, srednja vrednost prinosa, R (%)		Ponovljivost (n=5), RSD (%)		Intermedijerna reproduktivnost (n=3x5), RSD (%)	
		DLLME	QuEChERS	DLLME	QuEChERS	DLLME	QuEChERS
Dinotefuran	100,0	88,4	89,2	4,37	7,04	8,12	9,48
	50,0	78,5	83,6	4,36	7,83	11,30	12,63
	10,0	106,1	95,3	6,32	8,65	7,54	12,05
Nitenpiram	100,0	116,1	97,3	3,50	7,88	12,14	11,41
	50,0	84,5	88,5	5,25	10,22	6,45	9,81
	10,0	107,4	96,1	6,73	8,85	8,87	16,40
Tiametoksam	100,0	77,6	73,8	10,40	4,87	8,98	12,50
	50,0	94,5	85,7	7,48	9,45	7,57	14,65
	10,0	112,9	81,9	8,22	7,42	13,56	14,87
Klotianidin	100,0	105,4	85,2	5,40	7,24	10,24	12,31
	50,0	99,3	81,3	4,12	7,23	14,32	16,87
	10,0	118,3	88,4	5,46	6,35	14,24	13,80
Imidaklopid	100,0	94,6	89,9	4,32	6,58	8,74	17,70
	50,0	108,5	80,8	3,75	3,99	10,45	14,18
	10,0	73,4	79,9	7,63	4,78	12,21	15,02
Acetamiprid	100,0	92,5	89,5	8,23	9,14	8,74	11,80
	50,0	104,6	88,2	4,54	10,20	8,58	10,45
	10,0	84,1	77,6	4,62	9,87	11,47	16,13
Tiaklopid	100,0	104,4	88,0	3,28	6,51	8,88	9,12
	50,0	97,3	84,5	5,68	5,74	14,10	10,07
	10,0	89,3	83,6	5,22	6,37	7,71	12,08

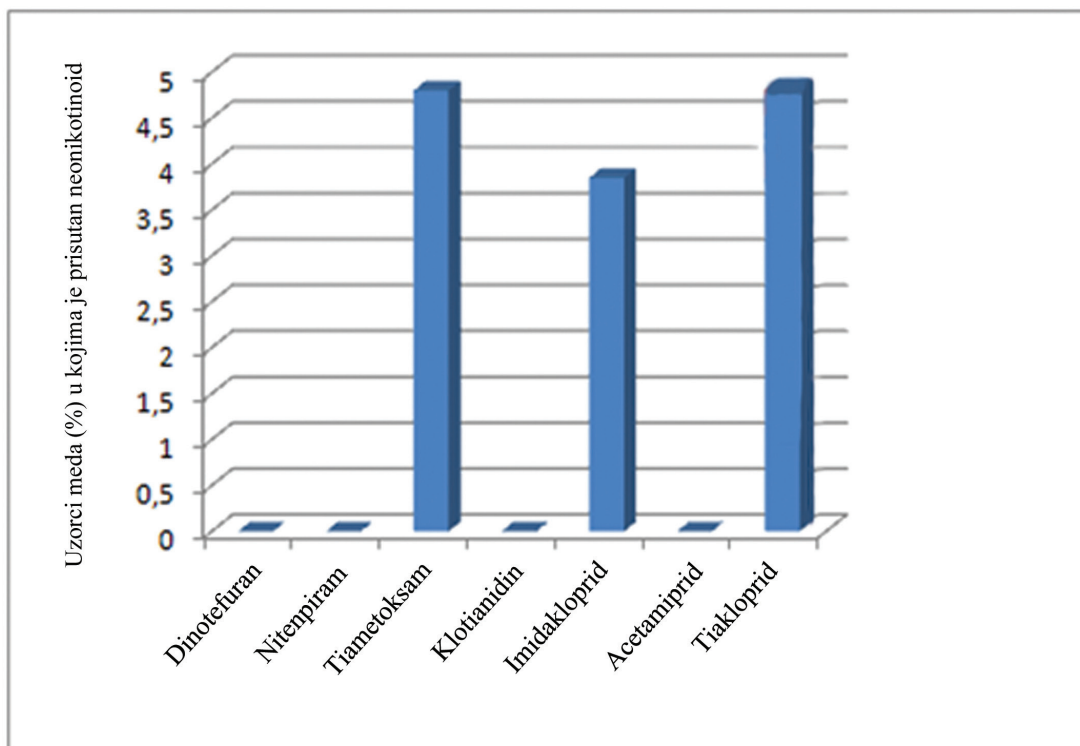


Slika 4.18. HPLC-DAD hromatogrami na 266 nm standarda neonikotinoidea koncentracije $50,0 \mu\text{g L}^{-1}$ 1), MMC rastvora $50,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ 2), spajkovanih uzoraka meda $50,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ 3) i slepe probe 4). Oznake: a) dinotefuran; b) nitenpiram; c) tiametoksam; d) klotianidin; e) imidakloprid; f) acetamiprid; g) tiakloprid

4.4.4 Primena metode na realne uzorke

Nakon optimizacija ekstrakcionog postupka i hromatografskih uslova za ispitivanje odabranih neonikotinoidea u uzorcima meda, validovana metoda primenjena je za analizu uzoraka meda prikupljenih sa teritorije Autonomne Pokrajine Vojvodine tokom 2013. godine (slika 3.2). Nakon ispitivanja malog broja uzoraka radi razvijanja metoda, opseg ispitivanja je proširen na 104 uzorka meda i to: 51 uzorak suncokretovog meda, 26 uzoraka livadskog meda, 22 uzorka bagremovog meda i 5 uzoraka lipovog meda. Kako su karakteristike obe metode za pripremu uzoraka (DLLME i QuEChERS) bile zadovoljavajuće, uzorci su pripremani korišćenjem QuEChERS procedure.

Rezultati ispitivanja pokazali su da je tiakloprid određen u 5 uzoraka (u jednom u koncentraciji $29,12 \mu\text{g kg}^{-1}$, koja je daleko ispod MDK i u 4 uzorka u nivou GO); imidakloprid u 4 uzorka u koncentracijama na nivou GO; tiametoksam je detektovan u 5 uzoraka ($\text{GD} < \text{detektovana vrednost} < \text{GO}$) (slika 4.19). Konfirmacija rezultata dobijenih primenom HPLC-DAD sistema je izvedena na HPLC-MS/MS uređaju, pri čemu je postignuto slaganje rezultata za dva sistema detekcije neonikotinoidea.



Slika 4.19. Udeo uzoraka meda koji su sadržavali neonikotinoid iznad GD od ispitanih 104 uzorka

4.5 Razvoj HPLC-MS/MS metode korišćenjem DLLME i QuEChERS tehnika za određivanje odabranih neonikotinoidea u liker u od meda [176]

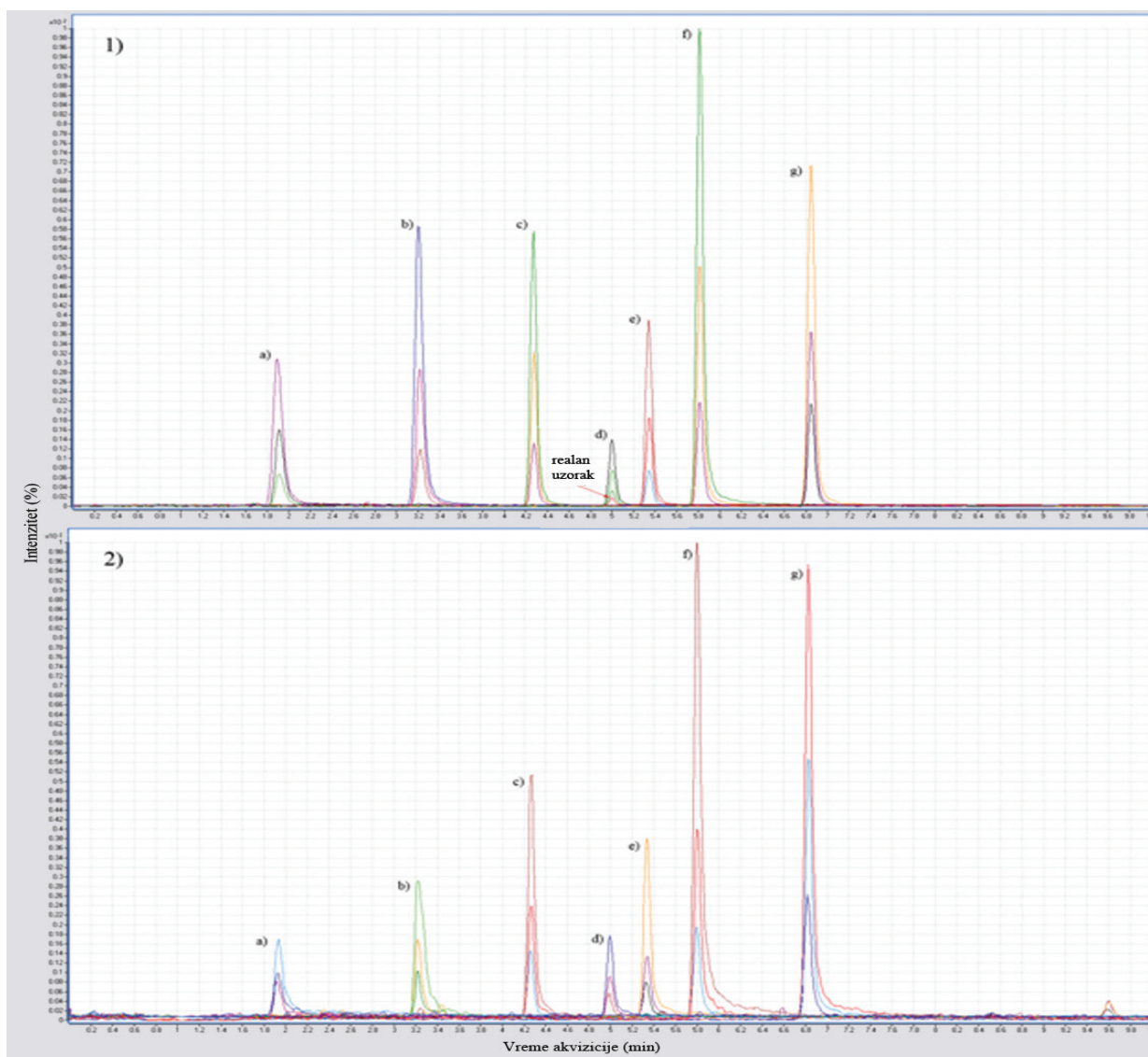
Razvijena, optimizovana i validovana metoda određivanja neonikotinoidea u medu primenom HPLC-MS/MS sistema primenjena je za analiziranje uzoraka likera od meda - medice. S obzirom na to da se ovaj liker pravi mešanjem meda i određene voćne rakije, postoji opasnost da se ostaci neonikotinoidea u medu nađu i u ovom tradicionalnom alkoholnom napitku. Upoređivane su dve tehnike pripreme uzoraka, DLLME i QuEChERS, čije procedure su opisane u Eksperimentalnom delu disertacije.

Testirana je mogućnost razdvajanja i određivanja neonikotinoidea upotrebom različitih hromatografskih kolona. Ispitane su dve hromatografske kolone (1) Kolona #1, ZORBAX Eclipse XDB-C18, i (2) Kolona #2, ZORBAX Eclipse Plus C8 na kojima su analizirani standardni rastvori odabranih neonikotinoidea, koncentracije $75,0 \mu\text{g L}^{-1}$. Komponente su eluirane u gradijentnom režimu opisanog u eksperimentalnom delu disertacije (3.6. HPLC-DAD/MS/MS uslovi rada) i detektovane MS/MS tehnikom. Na osnovu retencionih vremena, kao i veće rezolucije razdvajanja izabrana je C18 kolona za dalja ispitivanja. Na slici 4.20 prikazani su ekstrahovani MRM jonski hromatogrami smese standarda neonikotinoidea razdvojenih upotrebom opisanih hromatografskih kolona.

Primenjeni su optimizovani hromatografski uslovi i MS/MS parametri prikazani u Eksperimentalnom delu disertacije (3.6. HPLC-DAD/MS/MS uslovi rada). Ispitivani neonikotinoidi su ovom metodom ispoljili stabilna retenciona vremena sa RSD < 2,1% (tabela 4.21).

Tabela 4.21. Retenciona vremena i standardna devijacija retencionih vremena ispitivanih neonikotinoida

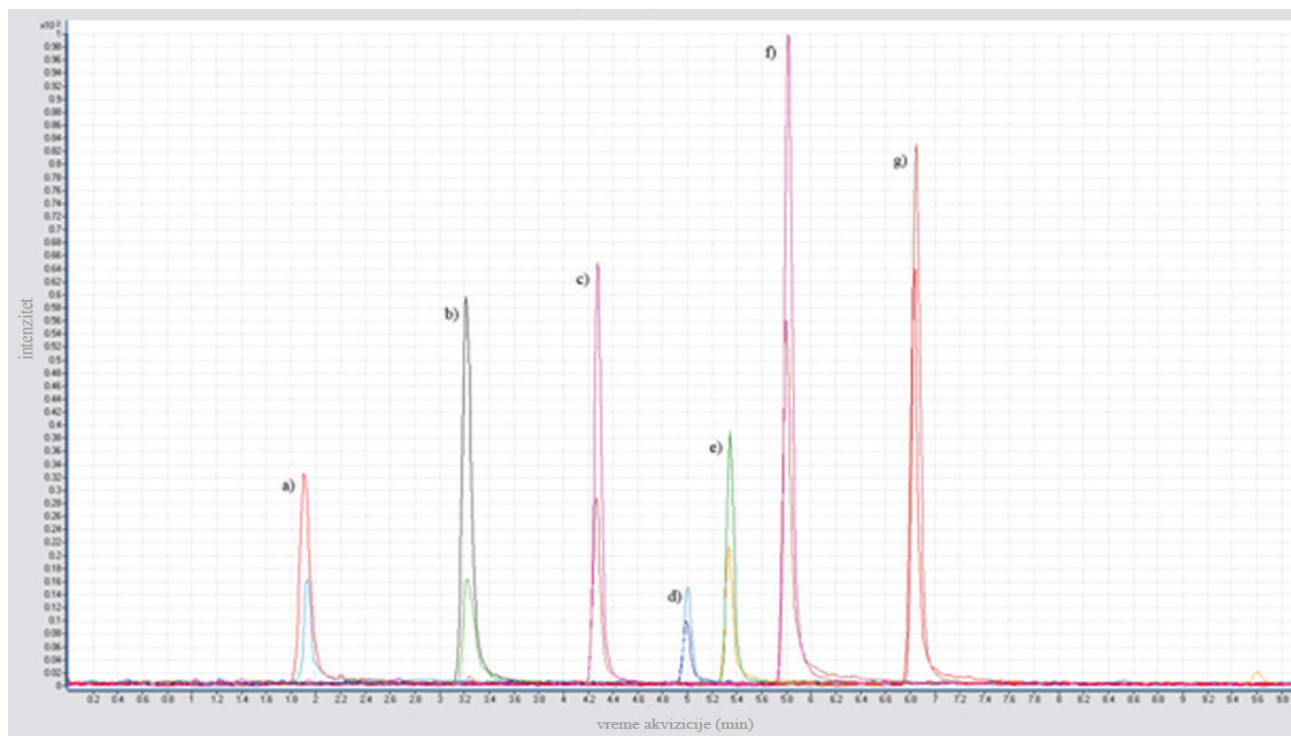
Neonikotinoid	Srednja vrednost t_r (n=15) (min)	RSD t_r (%)
Dinotefuran	2,22	1,20
Nitenpiram	3,37	1,20
Tiametoksam	4,35	2,10
Klotianidin	5,05	1,50
Imidakloprid	5,38	0,80
Acetamiprid	5,84	1,46
Tiakloprid	6,86	0,90



Slika 4.20. Ekstrahovani MRM hromatogrami standardne smese neonikotinoida ($75,0 \mu\text{g L}^{-1}$) a) dinotefuran; b) nitenpiram; c) tiametoksam; d) klotianidin; e) imidakloprid; f) acetamiprid; g) tiakloprid; 1) ZORBAX Eclipse XDB-C18 kolona; 2) ZORBAX Eclipse Plus C8 kolona

4.5.1 Ispitivanje uticaja matriksa

Jedan od glavnih nedostataka koji se pripisuje HPLC-MS/MS određivanju jesu problemi u određivanju koji mogu nastati usled uticaja matriksa. U ispitivanju likera od meda, korišćenje MMC rastvora je kompenzovalo ovaj uticaj, koji se ogleda u smanjenju ili povećanju analitičkog signala analita, usled uticaja ostalih komponenata matriksa. Kao primer, na slici 4.21 prikazan je preklopljen MRM hromatogram smese standarda ispitivanih neonikotinoida koncentracije $50,0 \mu\text{g L}^{-1}$ i MMC rastvor na istom koncentracijskom nivou. Korišćena je QuEChERS tehnika prečišćavanja uzoraka za pripremu MMC rastvora.



Slika 4.21. Ekstrahovani i preklopljeni MRM hromatogrami $50,0 \mu\text{g L}^{-1}$ standardnog i MMC rastvora neonikotinoida (a) dinotefuran; b) nitenpiram; c) tiametoksam; d) klotianidin; e) imidakloprid; f) acetamiprid; g) tiakloprid). Veće površine pikova neonikotinoida odgovaraju neonikotinoidima u standardnom rastvoru

Uticaj matriksa likera od meda na odziv analitičkog signala neonikotinoida ispitivan je na isti način kao i u slučaju matriksa meda, upoređivanjem nagiba SC i MMC krivih. Nadalje, uticaj matriksa ispitivan je i u zavisnosti od načina pripreme uzoraka (DLLME i QuEChERS), kao što je i prikazano u tabeli 4.22. Komponente matriksa su uticale na smanjenje analitičkog signala svih neonikotinoida nezavisno od načina pripreme uzoraka. Veliko smanjenje signala primećeno je korišćenjem QuEChERS procedure, što se može objasniti, kao i u slučaju matriksa meda, upotrebom polarnijeg ekstrakcionog sredstva (ACN) koje je moglo ekstrahovati i druge polarne komponente iz matriksa pored neonikotinoida. Uticaj matriksa bio je najizraženiji u slučaju nitenpirama, dinotefurana i tiametoksama. Kao i u prethodnim slučajevima ispitivanja uticaja matriksa, odnosno upotreba MMC krivih je ustanovljena kao neophodna za tačno određivanje neonikotinoida u uzorcima likera od meda.

Tabela 4.22. Uticaj matriksa – SSE korišćenjem DLLME i QuEChERS procedura za pripremu uzoraka izračunat kao ugao odnosa MMC i SC krivih ispitivanih neonicotinoida upotrebom HPLC-MS/MS sistema

	MMC-DLLME		MMC-QuEChERS		SC		SSE (%)	
	Linearna jednačina za opseg 100,0 µg L ⁻¹	Koeficijent korelacije (r ²)	Linearna jednačina za opseg 100,0 µg L ⁻¹	Koeficijent korelacije (r ²)	Linearna jednačina za opseg 1,0–100,0 µg L ⁻¹	Koeficijent korelacije (r ²)	DLLME	QuEChERS
Neonicotinoid								
Dinotefuran	y=93,5x+3818,1	0,9981	y=80,0x-791,5	0,9973	y=127,7x-1957,3	0,9979	73,2	62,6
Nitenpiram	y=123,4x+11130,0	0,9978	y=73,0x-1113,9	0,9951	y=202,8x-2083,3	0,9985	60,8	36,0
Tiametoksam	y=103,5x+15012,0	0,9985	y=78,4x-557,5	0,9970	y=152,7x-1752,0	0,9988	67,8	51,3
Klotianidin	y=34,4x-506,8	0,9987	y=35,6x-464,8	0,9982	y=37,1x+344,3	0,9991	93,0	96,2
Imidakloprid	y=87,5x-930,3	0,9990	y=73,1x-856,5	0,9984	y=109,1x-1993,1	0,9990	80,2	66,9
Acetamiprid	y=258,1x-2003,0	0,9974	y=210,7x-2285,7	0,9989	y=296,0x-1847,4	0,9991	87,3	71,2
Tiakloprid	y=186,3x+12379,0	0,9980	y=181,6x-1815,4	0,9981	y=196,1x-7992,5	0,9993	95,0	92,6

4.5.2 Validacija metode

Razvijena i optimizovana metoda za određivanje neonikotinoida u uzorcima likera od meda upotrebom DLLME i QuEChERS procedura za pripremu uzoraka je validovana. Analiziran opseg ($GO-100,0 \mu\text{g kg}^{-1}$) je bio linearan i imao je koeficijente korelacije iznad 0,9970, kao što je prikazano u tabeli 4.22.

Specifičnost metode utvrđena je identifikacijom analita na osnovu jona prekursora i produkata kao i relativnog retencionog vremena sa istim identifikacionim karakteristikama odgovarajućeg standardnog rastvora analita. Odnosi jona ispitivanih analita su pokazali uglavnom slaganje $\pm 10\%$ sa istim odnosom jona u rastvorima standarda. Odgovarajući hromatografski pikovi koji odgovaraju analitičkim signalima koji potiču od ispitivanih neonikotinoida su identifikovani sa zadovoljavajućim S/N odnosom bez ometajućih pikova na istim retencionim vremenima slepe probe, pa je tako potvrđena dobra selektivnost razvijene metode. Hromatogrami spajkovanih uzoraka likera od meda neonikotinoidima na 3 koncentracijska nivoa ($10,0 \mu\text{g kg}^{-1}$, $25,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ i $50,0 \mu\text{g kg}^{-1}$) zavisno od procedura priprema uzoraka prikazani su na slici 4.22, sa prinosima prikazanim u tabeli 4.23.

Tačnost metode procenjena je na osnovu ispitivanja sistematske greške, iskazane presečnim prinosom neonikotinoida, a preciznost je izražena relativnom standardnom devijacijom za 8 ponavljanja na tri koncentracijska nivoa ($10,0 \mu\text{g kg}^{-1}$, $25,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ i $100,0 \mu\text{g kg}^{-1}$), određenih analizom spajkovanih uzoraka likera od meda i MMC krivih.

Rezultati prinosa, dati u tabeli 4.23 su potvrdili optimalan prinos (prihvatljiv opseg 70–120% na ispitanim koncentracijskim nivoima sa $RSD \leq 20\%$). Niži prinosi nitempirama i dinotefurana korišćenjem DLLME procedure u odnosu na QuEChERS proceduru se mogu objasniti njihovom većom polarnošću u odnosu na ostale neonikotinoide.

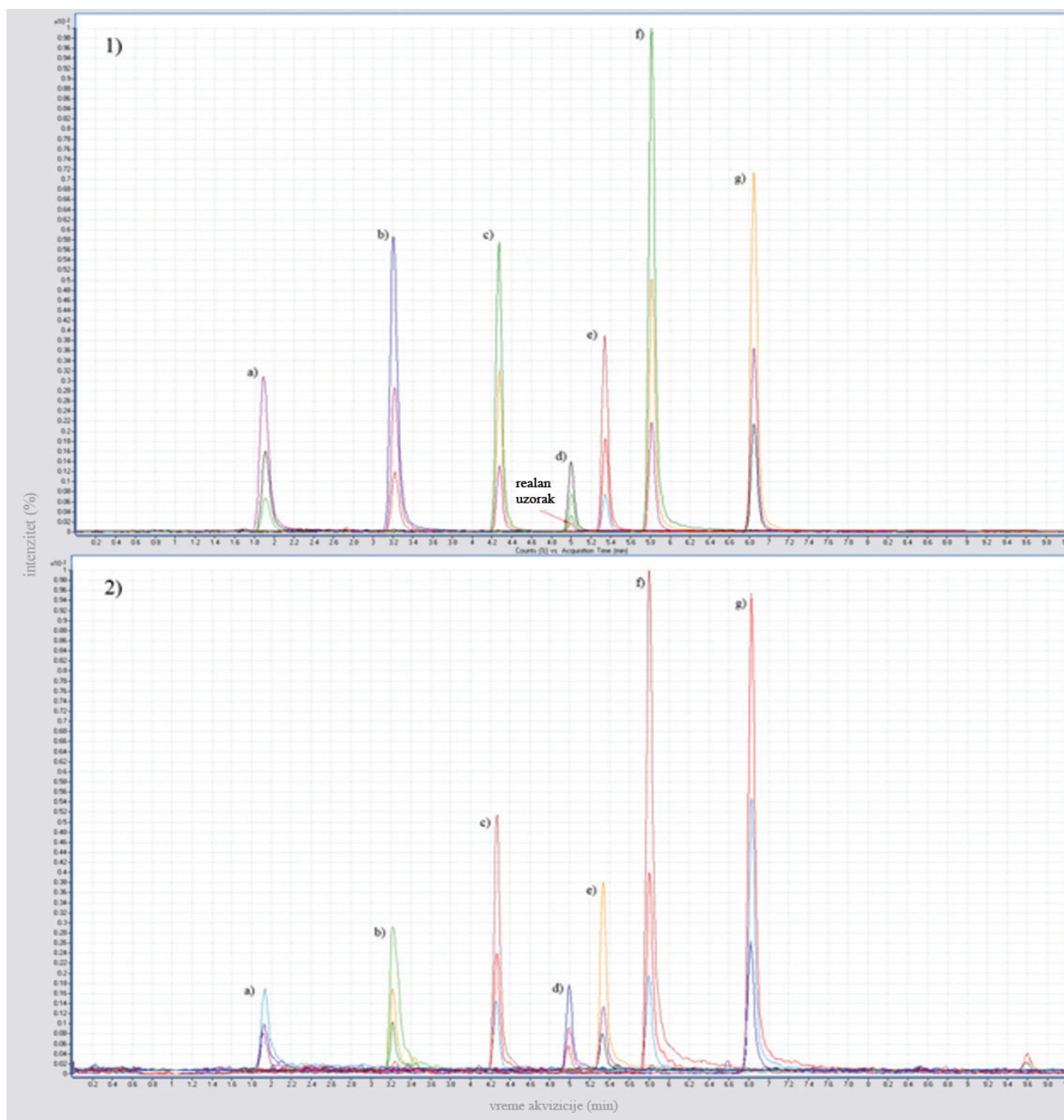
Njihove $\log P$ vrednosti za tečno-tečnu oktanol-voda raspodelu su bile -0,66 za nitempiram i -0,55 za dinotefuran, dok su se $\log P$ vrednosti za ostale neonikotinoide kretale između -0,24 i 1,26 [174]. S obzirom na to da se u DLLME tehnici koristi dihlormetan kao ekstrakciono sredstvo, a u QuEChERS acetonitril, očekivana je bolja ekstrakcija ovih polarnijih komponenti QuEChERS procedurom. Prinosi ostalih neonikotinoida su bili veći korišćenjem DLLME tehnike.

Preciznost metode izražena u uslovima ponovljivosti i intermedijerne reproduktivnosti korišćenjem DLLME tehnike pripreme uzoraka ima vrednosti za RSD u opsegu od 3,21–10,20% za ponovljivost i 9,11–16,62% za intermedijernu reproduktivnost. U slučaju korišćenja QuEChERS tehnike za pripremu uzoraka i RSD je u intervalu od 4,19–12,81% za ponovljivost i 11,32–16,40% za intermedijernu reproduktivnost. Izračunate vrednosti RSD upućuju na dobru preciznost razvijene metode. Dobijene GD i GO vrednosti su prikazane u tabeli 4.24. Priprema uzoraka korišćenjem

DLLME tehnike omogućila je dostizanje nižih GD i GO vrednosti u odnosu na pripremu uzoraka upotrebom QuEChERS procedure. Izuzetak je bio u slučaju tiametoksama, koji je imao iste vrednosti za GD i GO u slučaju primene obe procedure za pripremu uzoraka. Imidaklopid i acetamiprid pokazali su niže vrednosti GD i GO u slučaju primene QuEChERS procedure. Dobijene vrednosti za GO su bile niže ili iste u odnosu na EU MDK za neonicotinoide u medu

Tabela 4.23. Parametri validacije metode određivanja neonicotinoide u liker od meda primenom HPLC-MS/MS sistema

Neonicotinoid	Nivo spajkovanja ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Tačnost, srednja vrednost prinosa, R (%)		Ponovljivost (n=5), RSD (%)		Intermedijerna reproduktivnost (n=3x5), RSD (%)	
		DLLME	QuEChERS	DLLME	QuEChERS	DLLME	QuEChERS
Dinotefuran	50,0	73,6	79,2	3,27	4,19	13,30	13,55
	25,0	71,8	88,6	4,16	5,77	14,70	13,70
	10,0	73,5	80,3	5,32	8,65	14,68	14,05
Nitenpiram	50,0	74,3	77,8	6,50	7,88	10,32	13,21
	25,0	72,2	88,4	7,20	12,32	11,52	15,34
	10,0	69,2	76,6	8,13	12,81	11,80	16,40
Tiametoksam	50,0	80,4	83,1	9,30	9,87	12,45	12,80
	25,0	78,3	85,3	9,45	8,45	16,63	13,65
	10,0	85,2	80,2	10,2	9,32	15,32	14,87
Klotianidin	50,0	88,3	80,7	5,60	6,84	9,48	12,31
	25,0	80,2	71,8	7,08	8,26	12,63	12,87
	10,0	83,7	78,9	8,46	9,00	13,05	14,92
Imidaklopid	50,0	92,1	86,8	4,32	7,33	9,12	13,61
	25,0	90,1	80,3	5,68	6,89	13,00	14,52
	10,0	85,9	78,2	6,02	7,87	12,88	14,02
Acetamiprid	50,0	103,9	88,7	3,75	6,36	9,35	11,32
	25,0	83,3	78,0	4,63	7,04	9,66	11,60
	10,0	89,9	77,4	5,66	7,83	11,41	14,06
Tiaklopid	50,0	89,5	78,7	3,21	6,72	9,11	12,70
	25,0	113,4	94,9	3,88	9,28	9,67	11,98
	10,0	90,3	73,2	4,07	8,93	12,04	12,84



Slika 4.22. MRM hromatogrami spajkovanih uzoraka likera od meda sa smešom neonikotinoida a) dinotefuran; b) nitenpiram; c) tiametoksam; d) klotianidin; e) imidaklopid; f) acetamiprid; g) tiaklopid na nivou od 10,0, 25,0 i 50,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ korišćenjem 1) DLLME, realni uzorak likera od meda sa pikom klotianidina je označen i 2) QuEChERS procedure za pripremu uzoraka

Tabela 4.24. Granice detekcije i granice određivanja odabranih neonikotinoidea u likerima od meda sa maksimalno dozvoljenim količinama ostataka neonikotinoidea u medu po regulativi Evropske unije [1]

Neonikotinoid	MDK EU za med ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	DLLME		QuEChERS	
		GD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	GO ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	GD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	GO ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Dinotefuran	10,0	1,5	5,0	2,5	10,0
Nitenpiram	10,0	1,5	5,0	2,5	10,0
Tiametoksam	10,0	1,0	2,5	1,0	2,5
Klotianidin	10,0	1,0	2,5	1,5	5,0
Imidakloprid	50,0	1,5	5,0	1,0	2,5
Acetamiprid	50,0	1,5	5,0	1,0	2,5
Tiakloprid	200,0	0,5	1,0	1,0	2,5

4.5.3 Primena metode na realne uzorke

Razvijena metoda primenjen je za ispitivanje 10 uzoraka likera od meda. Svi uzorci su pripremljeni korišćenjem DLLME procedure. Od ispitivanih neonikotinoidea (tabela 4.25) u uzorcima likera od meda nađen je klotianidin (u jednom uzorku u koncentraciji od $2,7 \mu\text{g kg}^{-1}$), a tiakloprid je detektovan u dva uzorka u koncentracijskom nivou ispod GO. Na osnovu rezultata ispitivanja može se zaključiti da je razvijena HPLC-MS/MS metoda pokazala odličnu selektivnost i osetljivost za određivanje neonikotinoidea u uzorcima likera od meda.

Tabela 4.25. Rezultati analize neonikotinoida u uzorcima likera od meda, (GD < detektovano < GO)

Oznake uzoraka	DINOTEFURAN	NITENPIRAM	TIAMETOKSAM	KLOTIANIDIN	IMIDAKLOPRID	ACETAMIPRID	TIAKLOPRID
1	< GD	< GD	< GD	< GD	< GD	< GD	< GD
2	< GD	< GD	< GD	< GD	< GD	< GD	detektovano
3	< GD	< GD	< GD	< GD	< GD	< GD	< GD
4	< GD	< GD	< GD	2,7 $\mu\text{g kg}^{-1}$	< GD	< GD	< GD
5	< GD	< GD	< GD	< GD	< GD	< GD	< GD
6	< GD	< GD	< GD	< GD	< GD	< GD	< GD
7	< GD	< GD	< GD	detektovano	< GD	< GD	< GD
8	< GD	< GD	< GD	< GD	< GD	< GD	< GD
9	< GD	< GD	< GD	< GD	< GD	< GD	detektovano
10	< GD	< GD	< GD	< GD	< GD	< GD	< GD

4.6 Ispitivanje mogućnosti uklanjanja odabranih neonikotinoida iz vodene sredine

Ova serija ispitivanja sprovedena je sa ciljem utvrđivanja mogućnosti uklanjanja odabranih neonikotinoida (dinotefurana, klotianidina, tiakloprida) iz vodene sredine (reke Dunav). Eksperimenti koji su obuhvatali ispitivanja 6 različitih vrsta uklanjanja odabranih neonikotinoida (u prisustvu prirodne insolacije pri laboratorijskim uslovima, sa dodatkom H_2O_2 , sa dodatkom MWCNT, sa dodatkom MWCN+ H_2O_2 , sa dodatkom Fe-MWCNT, sa dodatkom Fe-MWCNT+ H_2O_2), podrazumevali su upotrebu prethodno razvijene HPLC-MS/MS metode za ispitivanje efikasnosti primenjenog postupka. Nakon sprovedenih eksperimenata opisanih u eksperimentalnom delu disertacije (3.4.4. Procedura ispitivanja mogućnosti uklanjanja odabranih neonikotinoida iz vode), rezultati ispitivanja ostataka odabranih neonikotinoida u uzorcima dunavske vode prikazani su i prodiskutovani u ovom poglavlju (tabela 4.26).

Vreme tretiranja dan	Bez dodataka		Dodatak H ₂ O ₂		Dodatak MWCNT		Dodatak MWCNT+H ₂ O ₂		Dodatak Fe-MWCNT		Dodatak Fe-MWCNT+H ₂ O ₂	
	konc. (µg mL ⁻¹)	uklonjeno (%)	konc. (µg mL ⁻¹)	uklonjeno (%)	konc. (µg mL ⁻¹)	uklonjeno (%)	konc. (µg mL ⁻¹)	uklonjeno (%)	konc. (µg mL ⁻¹)	uklonjeno (%)	konc. (µg mL ⁻¹)	uklonjeno (%)
1	0,99	0,00	0,99	0,00	0,99	0,00	0,99	0,00	0,99	0,00	0,99	0,00
1	0,99	0,00	0,93	6,06	0,92	7,07	0,95	4,04	0,99	0,00	0,99	0,00
5	0,99	0,00	0,91	8,08	0,85	14,14	0,82	17,17	0,95	4,04	0,88	11,11
10	0,90	9,09	0,91	8,08	0,84	15,15	0,77	22,22	0,91	8,08	0,79	20,20
20	0,87	12,12	0,79	20,20	0,73	26,26	0,74	25,25	0,84	15,15	0,77	22,22
30	0,80	19,19	0,64	35,35	0,72	27,27	0,50	49,49	0,78	21,21	0,66	33,33
60	0,75	24,24	0,57	42,42	0,71	28,28	0,48	51,52	0,58	41,41	0,63	36,36
7	0,65	34,34	0,20	79,80	0,67	32,32	0,46	53,54	0,48	51,52	0,55	44,44
10	0,50	49,49	0,10	89,90	0,32	67,68	0,34	65,66	0,48	51,52	0,31	68,69
14	0,49	50,50	0,04	95,96	0,29	70,71	0,26	73,74	0,40	59,60	0,18	81,82
1	1,19	0,00	1,19	0,00	1,19	0,00	1,19	0,00	1,19	0,00	1,19	0,00
1	1,19	0,00	0,73	39,66	0,97	18,49	0,82	31,09	1,13	5,04	0,88	26,05
5	1,16	2,52	0,24	79,83	0,76	36,13	0,74	37,82	1,11	6,72	0,88	26,05
10	1,15	3,36	0,07	94,12	0,72	39,50	0,62	47,90	1,05	11,76	0,78	34,45
20	1,11	6,72	0,04	96,63	0,70	41,18	0,53	55,46	1,02	14,29	0,71	40,34
30	0,98	17,64	0,00	100,00	0,70	41,18	0,54	54,62	0,88	26,05	0,68	42,86
60	0,90	24,37	0,00	100,00	0,62	47,90	0,53	55,46	0,87	26,89	0,60	49,58
7	0,79	33,61	0,00	100,00	0,61	48,74	0,46	61,34	0,78	34,45	0,38	68,07
10	0,64	46,21	0,00	100,00	0,35	70,59	0,36	69,75	0,58	51,26	0,07	94,12
14	0,57	52,10	0,00	100,00	0,18	84,87	0,20	83,19	0,52	56,30	0,02	98,32
1	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00
1	1,00	0,00	0,77	23,00	0,61	39,00	0,63	37,00	0,63	37,00	0,63	37,00
5	0,98	2,00	0,72	28,00	0,40	60,00	0,31	69,00	0,31	69,00	0,31	69,00
10	0,86	14,00	0,68	32,00	0,35	65,00	0,24	76,00	0,24	76,00	0,24	76,00
20	0,86	14,00	0,65	35,00	0,32	68,00	0,19	81,00	0,19	81,00	0,19	81,00
30	0,79	21,00	0,46	44,00	0,31	69,00	0,17	83,00	0,17	83,00	0,17	83,00
60	0,73	27,00	0,29	71,00	0,28	72,00	0,16	84,00	0,16	84,00	0,16	84,00
7	0,71	29,00	0,07	93,00	0,23	77,00	0,12	88,00	0,12	88,00	0,12	88,00
10	0,61	39,00	0,03	97,00	0,15	85,00	0,05	95,00	0,05	95,00	0,05	95,00
14	0,52	48,00	0,00	100,00	0,10	90,00	0,03	97,00	0,03	97,00	0,03	97,00

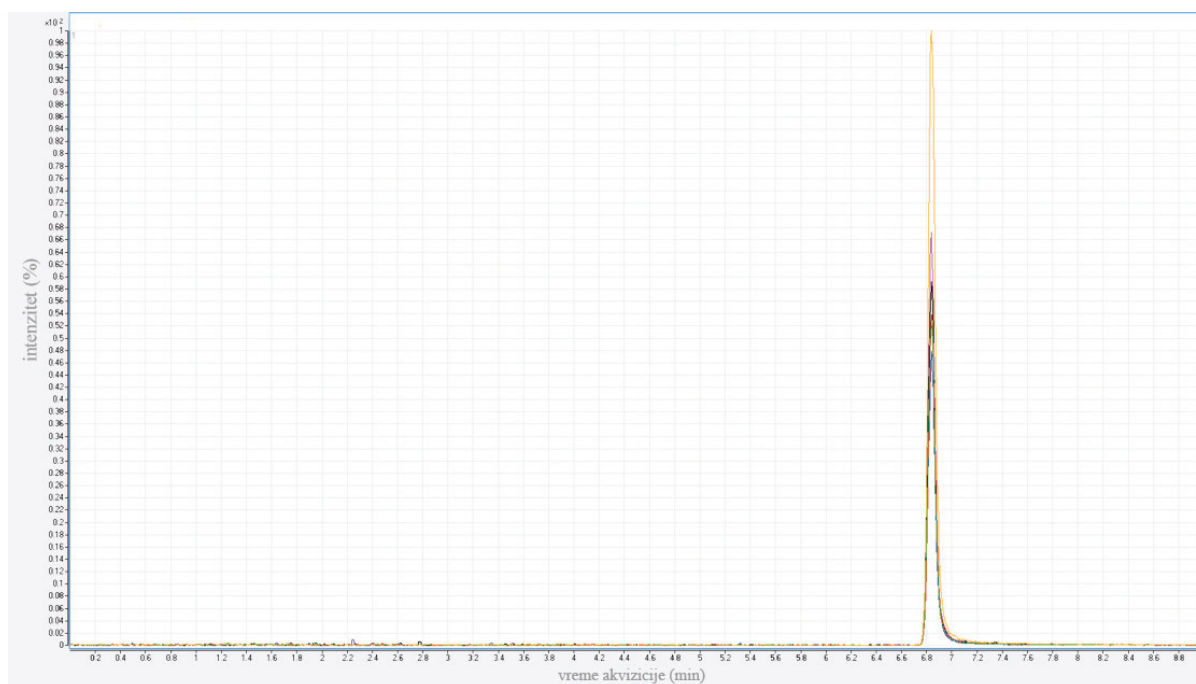
Tabela 4.26. Rezultati ispitivanja mogućnosti uklanjanja odabranih neonikotinoida

4.6.1 Ispitivanje razgradnje neonikotinoida u laboratorijskim uslovima

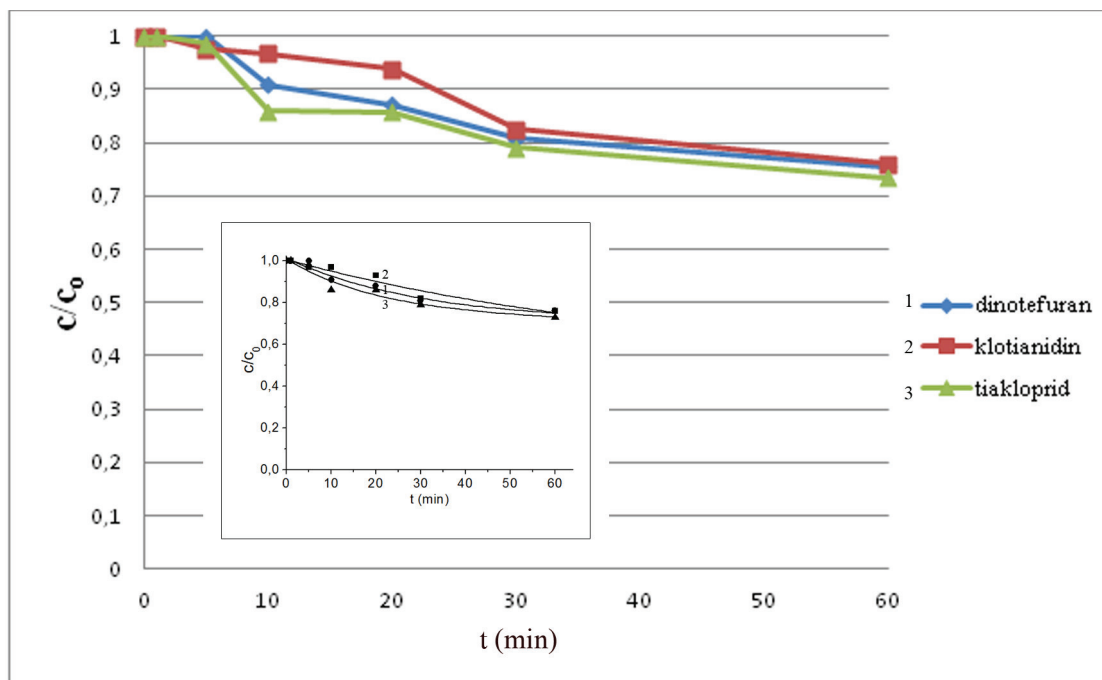
Koreliranjem vremena tokom koga je uzorak držan pod prirodnom insolacijom u laboratoriji sa odnosom početne (c_0) i aktuelne koncentracije (c) odabranih neonikotinoida (tabela 4.26) može se zaključiti da u navedenom sistemu dolazi samo do blage promene koncentracije ciljnih analita. Naime, tokom 60 minuta tretmana ukupno smanjenje koncentracije dinotefurana, klotianidina i tiakloprida (slika 4.23) u odnosu na početne koncentracije iznosi oko 25%.

Na osnovu koreliranja c/c_0 sa vremenom (t) može se uočiti da u periodu između 10 i 30 min, dolazi do bržeg opadanja koncentracije dinotefurana (tabela 4.26 i slika 4.24), a zatim između 30 i 60 min, proces uklanjanja se usporava. Proces uklanjanja klotianidina pri prirodnoj insolaciji u laboratorijskim uslovima može se okarakterisati umereno efikasnim uklanjanjem klotianidina do 20 min, zatim u periodu do 30. min efikasnijim i u poslednjoj etapi uklanjanja do 60. min se ponovo odvija umereno. Proces uklanjanja tiakloprida može se okarakterisati dvema etapama, prvom do 10. min, kada je proces ubrzan i drugom etapom od 10. do 60. min, kada proces teče umerenim intenzitetom.

Ovi rezultati potvrđuju da za brzo i efikasno uklanjanje odabranih neonikotinoida iz vode Dunava nije dovoljna sama energija sunca, nego je potrebno obezbediti i hemijski reagens pogodan za oksidaciju ciljnih analita (npr. vodonik-peroksid) ili adsorbens koji može da ukloni ciljnih analit na osnovu fizisorpcije (npr. ugljenične nanocevi).



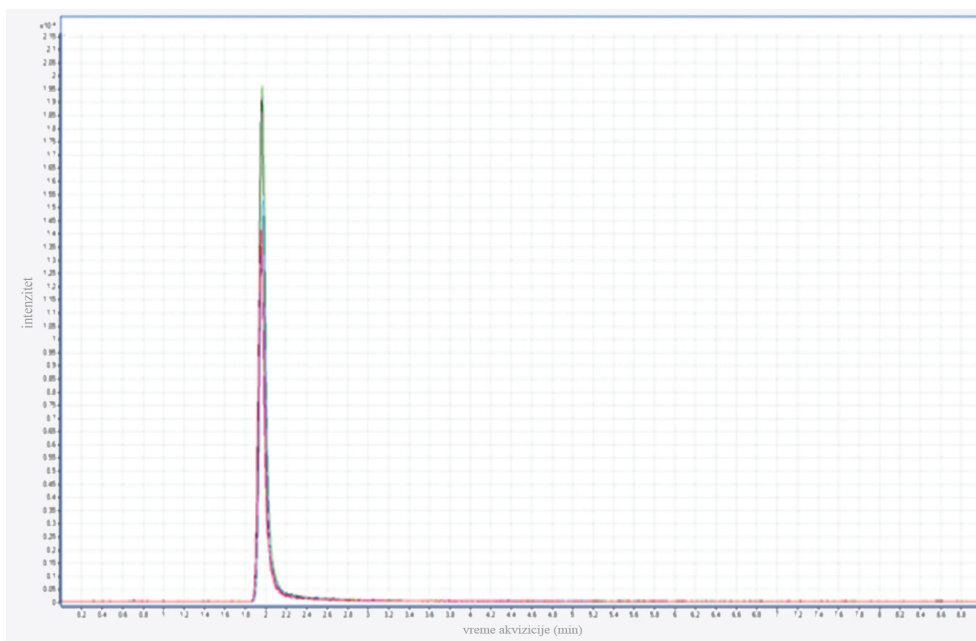
Slika 4.23. MRM hromatogram tranzicije (m/z 253 \rightarrow 126,0) snimljen tokom ispitivanja razgradnje tiakloprida u uzorku vode Dunava pod uticajem prirodne svetlosti tokom 60 min



Slika 4.24. Krive uklanjanja klotianidina, dinotefurana i tiakloprida pri laboratorijskim uslovima u periodu od 60 min sa mogućim matematičkim koreliranjem tačaka

4.6.2 Ispitivanje razgradnje neonikotinoidea pod uticajem H_2O_2

U slučaju uklanjanja odabranih neonikotinoidea u prisustvu H_2O_2 , koji predstavlja izvor hidrok-sil-radikala ($\cdot OH$) pod uticajem sunčeve svetlosti (koja može da prouzrokuje fotohemijsko razlaganje H_2O_2 , zbog UVB zračenja pri $\lambda < 310$ nm) [299] može se zapaziti umerena promena intenziteta signala na retencionom vremenu dinotefurana, dok se u slučaju klotianidina i tiakloprida situacija značajno razlikuje. Analitički signal dinotefurana (slika 4.25), dobijen u prisustvu H_2O_2 i pod prirodnom insolacijom u laboratorijskim uslovima u trajanju od 60 min, ukazuje na uklanjanje ciljnog analita od oko 40%, dok je pod istim uslovima H_2O_2 uzrokovao gubitak tiakloprida od oko 70%, a klotianidina u potpunosti.

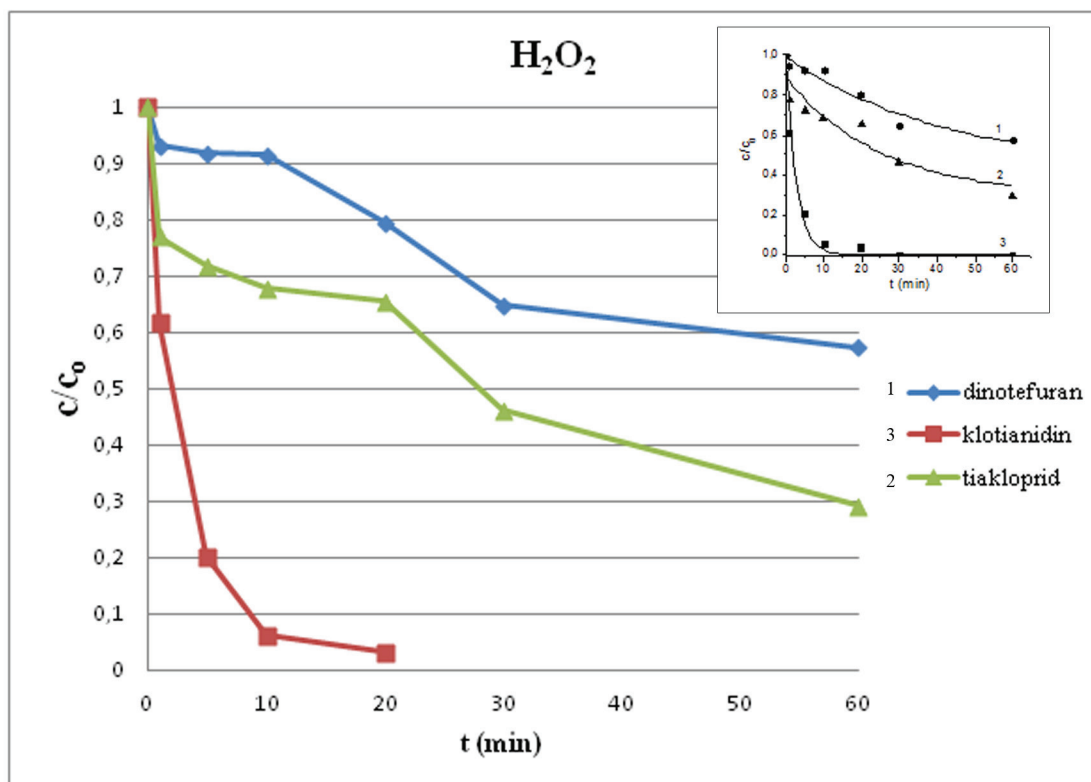


Slika 4.25. MRM hromatogram tranzicije (m/z 203 \rightarrow 129,1) snimljen tokom ispitivanja razgradnje dinotefurna u uzorku vode Dunava pri laboratorijskim uslovima i u prisustvu H_2O_2 u trajanju od 60 minuta

Dobra strana ovakvog tipa uklanjanja neonikotinoida jeste činjenica da je vodonik-peroksid jeftin agens i da se posle izvesnog vremena i sam razlaže na proizvode bezbedne po životnu sredinu - H_2O i O_2 . Važno je voditi računa o pogodnoj koncentraciji vodonik-peroksida u takvim sistemima, a važno je pratiti i eventualne degradacione intremedijere nastale tokom oksidativne degradacije neonikotinoida.

Tokom prvih deset minuta uklanjanja dinotefurana dolazi do promene koncentracije dinotefurana, pri čemu se uklanja oko 10% ciljnog analita, dok je u istom periodu uklonjeno oko 30% tiakloprida, a klotianidina čak preko 90% (slika 4.26).

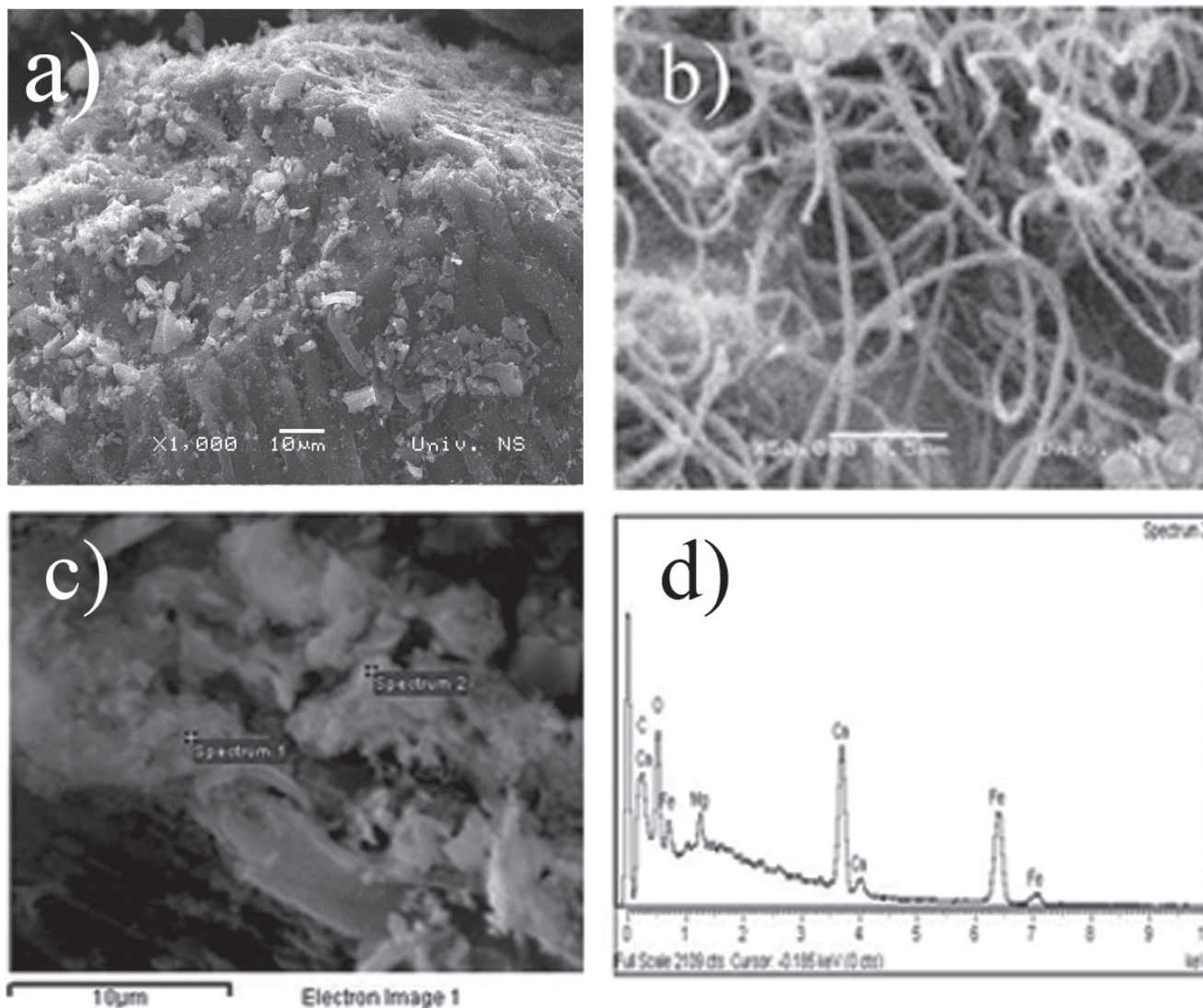
U slučaju dinotefurana ovaj vremenski interval od 10 min se poklapa sa inicijacionim periodom kod eksperimenta bez H_2O_2 . U slučaju tretmana uzorka između 10. minuta i 30. minuta uz stalno mešanje, i u prisustvu H_2O_2 , može se smatrati da je degradacija dinotefurana pseudo-prvog reda. Upoređujući konstante brzine uklanjanja dinotefurana u laboratorijskim uslovima i u prisustvu vodonik-peroksida uz prirodnu insolaciju, može se zaključiti da se pri početnoj koncentraciji vodonik-peroksida od 125 mmol L^{-1} i ciljnog analita od $0,99 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ proces razgradnje ubrzava za oko 3 puta. Prisustvo H_2O_2 prouzrokovalo je brzu i potpunu razgradnju klotianidina za 20 min, svrstavši ovaj hemijski agens u pogodna sredstva za potpuno razlaganje klotianidina. Proces uklanjanja tiakloprida se može okarakterisati u dve etape, od kojih je jedna do 20. min, a druga od 20. min do 60. min.



Slika 4.26. Krive uklanjanja dinotefurana, klotianidina i tiakloprida pri uslovima prirodne insolacije u prisustvu H_2O_2 u periodu od 60 min sa mogućim matematičkim koreliranjem tačaka

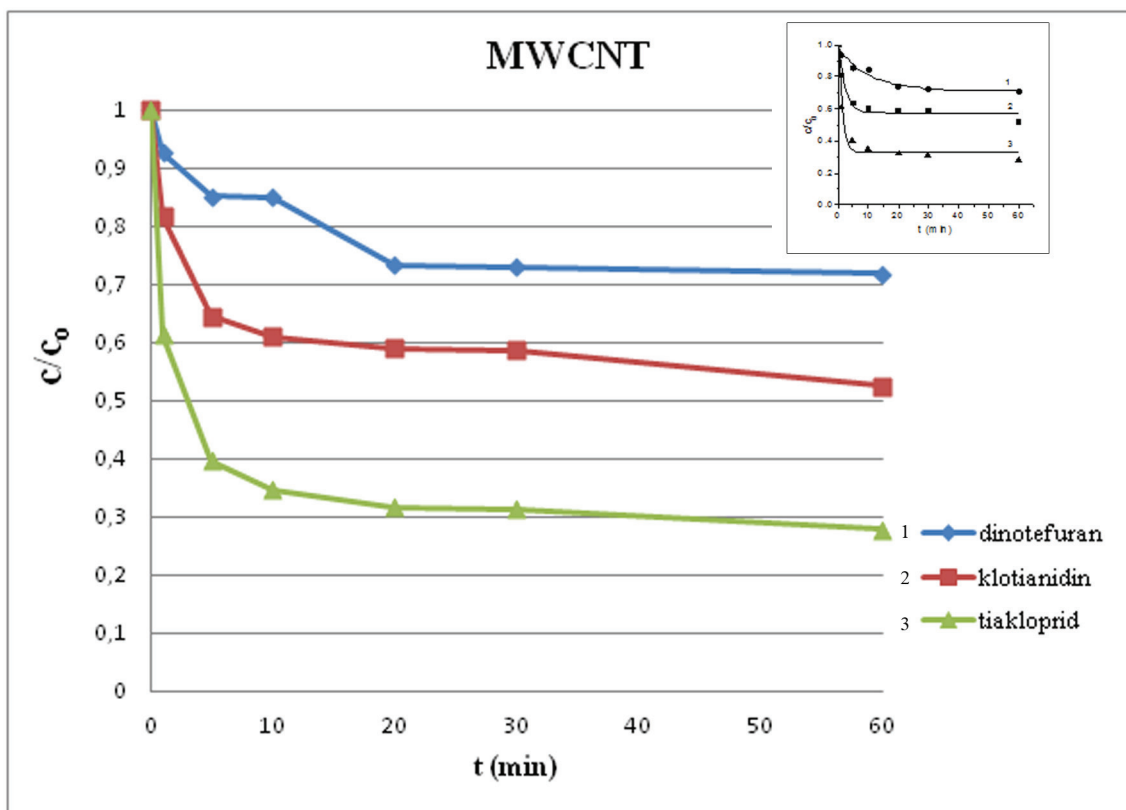
4.6.3 Ispitivanje uklanjanja neonikotinoidea upotrebom MWCNT

Pored pomenutih sistema koji uključuju prirodnu svetlost i/ili hemijski agens, treći razmatrani način uklanjanja odabranih neonikotinoidea uključuje adsorpciju ciljnog analita na višezidnim ugljeničnim nanocevima (MWCNT). Na slici 4.27 prikazane su MWCNT i gvoždem dekorisane višezidne ugljenične nanocevi (Fe-MWCNT) snimljene skenirajućim elektronskim mikroskopom (eng. *scanning electron microscope* - SEM) i rezultati mikroanalize X-zracima (eng. *energy dispersive x-ray spectrometry* - EDS). Može se primetiti da MWCNT obrazuju spiralne isprepletane površine sa jasno izraženom velikom dodirnom površinom (slika 4.27b). Takođe, EDS spektar gvoždem dekorisanih MWCNT nedvosmisleno ukazuje na postojanje Fe u strukturi MWCNT.



Slika 4.27. a) SEM izgled MWCNT pri uvećanju od 1000 puta, b) SEM izgled MWCNT pri uvećanju od 50000 puta, c) SEM izgled Fe-MWCNT, d) EDS spektar Fe-MWCNT (slika b uz dozvolu prof. dr Gorana Boškovića i njegovih saradnika)

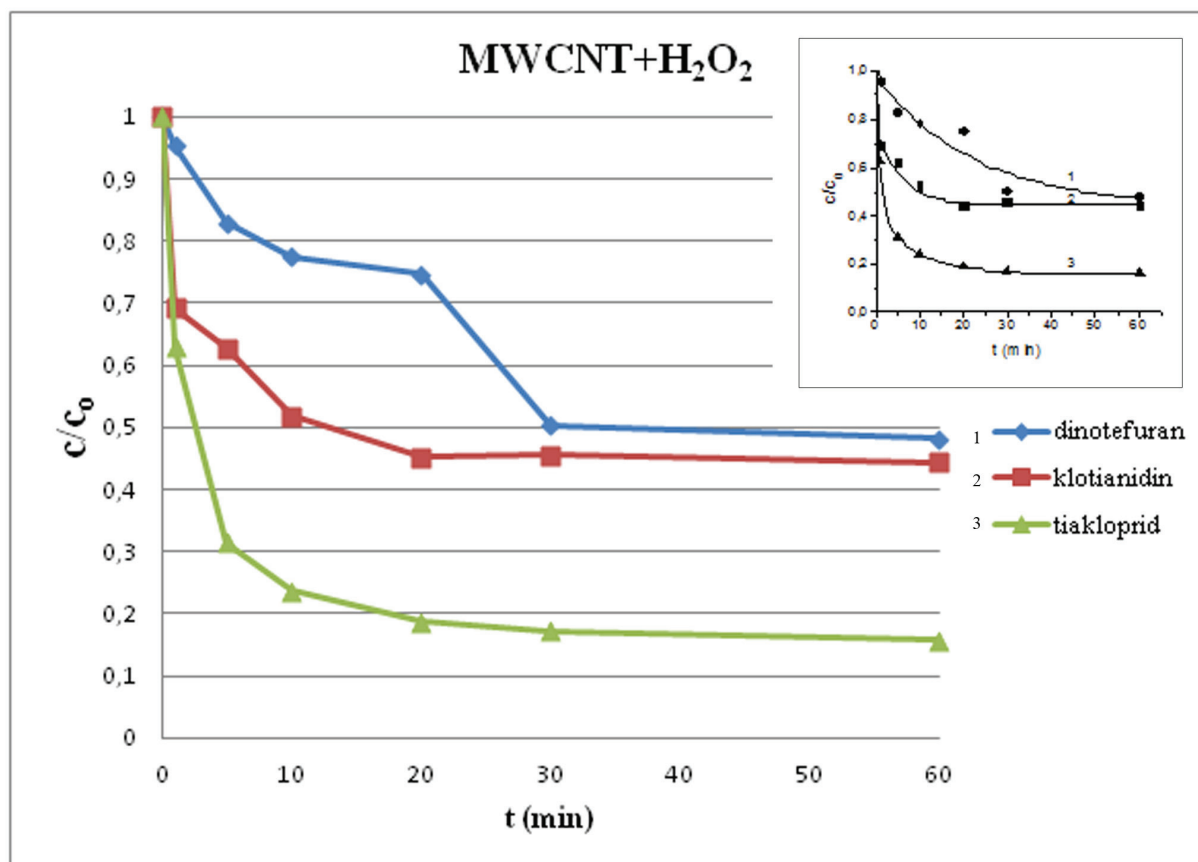
Na osnovu koreliranja c/c_0 i odgovarajućih t vrednosti (slika 4.28) može se uočiti da se dobijaju krive saturacije za sva tri ispitivana neonikotinoidea. Do potpunog iskorišćenja kapaciteta dolazi između 10 i 20 minuta tretmana pri koncentraciji dinotefurana od $0,99 \mu\text{g mL}^{-1}$ i koncentraciji suspendovanih nanočestica od $0,4 \text{ mg mL}^{-1}$. Ovim postupkom može da se ukloni oko 30% dinotefurana iz vodenog matriksa, dakle nanocevi vežu samo malu količinu ukupnog dinotefurana. U slučaju adsorpcije klotianidina tokom vremenskog perioda od 60 min adsorbuje se oko 50%, s tim da se saturacija nanocevi dešava veoma brzo, nakon 5 min. Može se zapaziti da MWCNT najviše adsorbuju tiakloprid, jer se nakon 5 min adsorbuje preko 60% tiakloprida. Na osnovu postignutih rezultata se može zaključiti da se afinitet neonikotinoidea prema MWCNT povećava sa smanjenjem polarnosti ispitivanih neonikotinoidea.



Slika 4.28. Krive uklanjanja dinotefurana, klotianidina i tiakloprida pri uslovima prirodne insolacije u prisustvu MWCNT u periodu od 60 min sa mogućim matematičkim koreliranjem tačaka

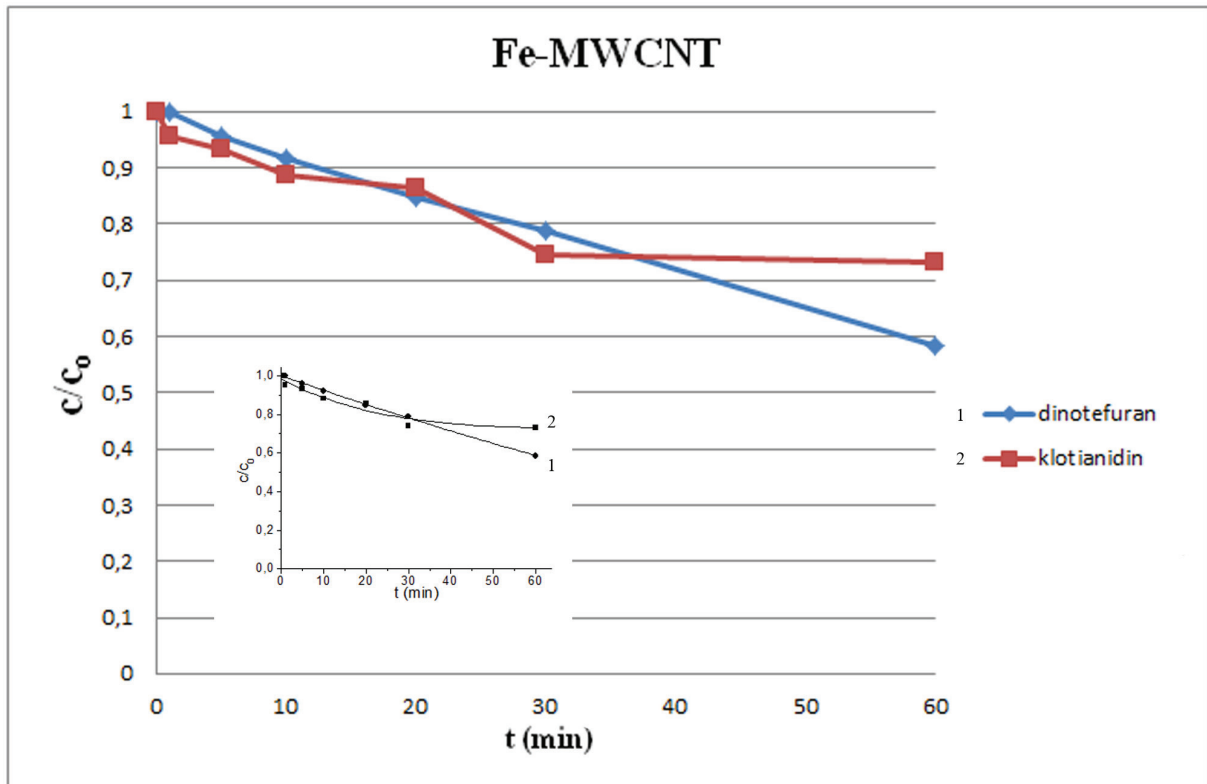
Pošto ovaj tip nanocevi i testirana količina MWCNT pokazuje umerenu efikasnost pri uklanjanju ciljnog analita, modifikovani oblici adsorbensa ili kombinacija MWCNT sa pogodnim hemijskim agensom su razmatrani kao potencijalni sistemi za poboljšanje efikasnosti uklanjanja ovih jedinjenja.

U kombinaciji sa H_2O_2 , MWCNT pokazuju bolju sposobnost uklanjanja odabranih neonikotinoida iz sistema. Sposobnost uklanjanja poboljšana je od 15–50%, u zavisnosti od ispitivanog neonikotinoida (slika 4.29). Sličan trend uočen pri uklanjanju neonikotinoida u prisustvu H_2O_2 (slika 4.29), kao i pri dodatku samo MWCNT, ukazuje na vezu između polarosti neonikotinoida i afiniteta MWCNT za adsorpciju.

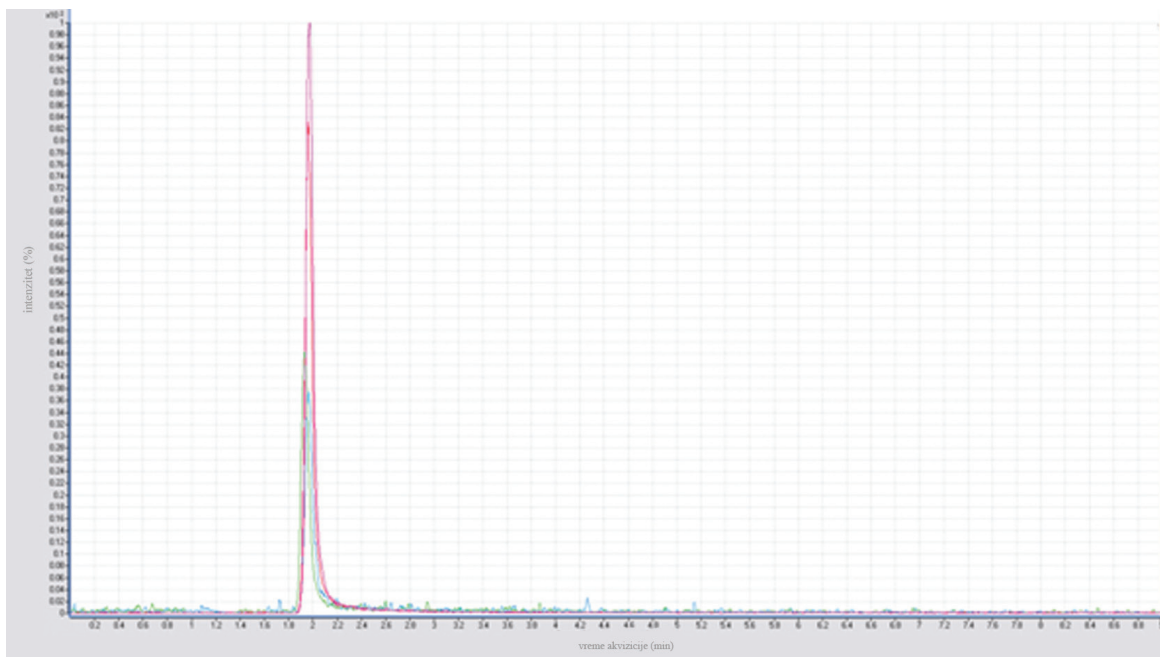


Slika 4.29. Krive uklanjanja dinotefurana, klotianidina i tiakloprida pri uslovima prirodne insolacije u prisustvu MWCNT i H_2O_2 u periodu od 60 min sa mogućim matematičkim koreliranjem tačaka

Druga ispitivana mogućnost poboljšanja efikasnosti MWCNT jeste modifikovanje njihove površine sa gvožđem. Ispitivani neonikotinoidi dinotefuran i klotianidin ispoljili su različita ponašanja prilikom dodatka Fe-MWCNT (slika 4.30). Primećeno je smanjenje koncentracije dinotefurana od oko 40% u vremenskom periodu od 60 min (slike 4.30 i 4.31), koje je veće u odnosu na smanjenje u prisustvu MWCNT, dok je u slučaju klotianidina modifikovanje površine MWCNT sa gvožđem dovelo do smanjenja mogućnosti adsorpcije u odnosu na MWCNT. Ako 50% klotianidina je uklonjeno na ovaj način.

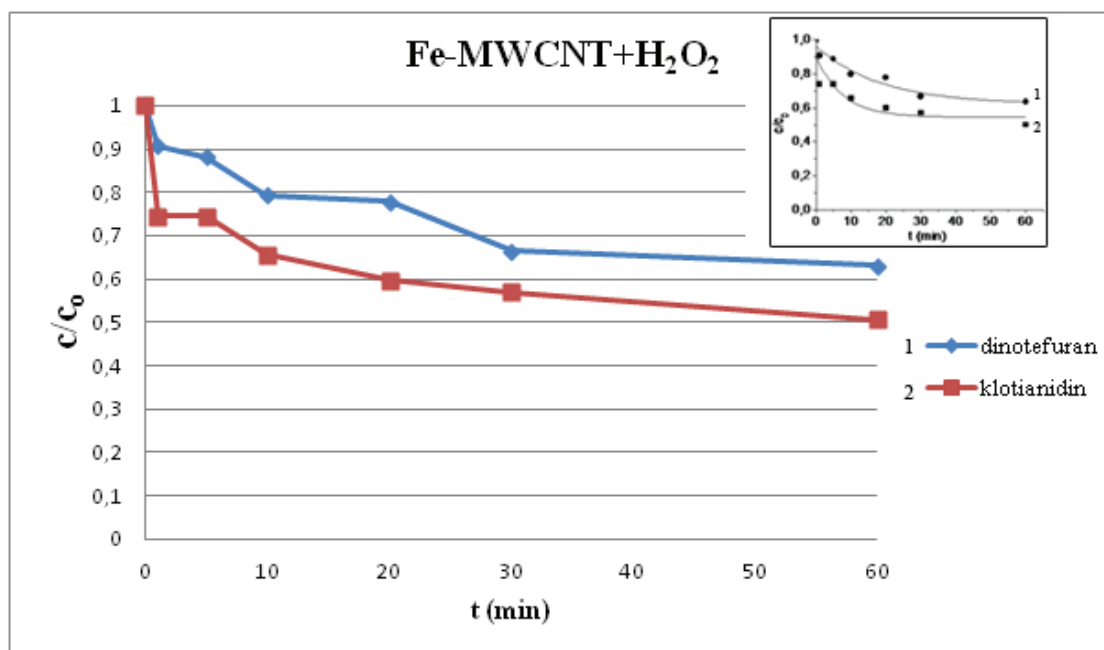


Slika 4.30. Krive uklonjanja dinotefurana i klotianidina pri uslovima prirodne insolacije u prisustvu Fe-MWCNT u periodu od 60 min sa mogućim matematičkim koreliranjem tačaka



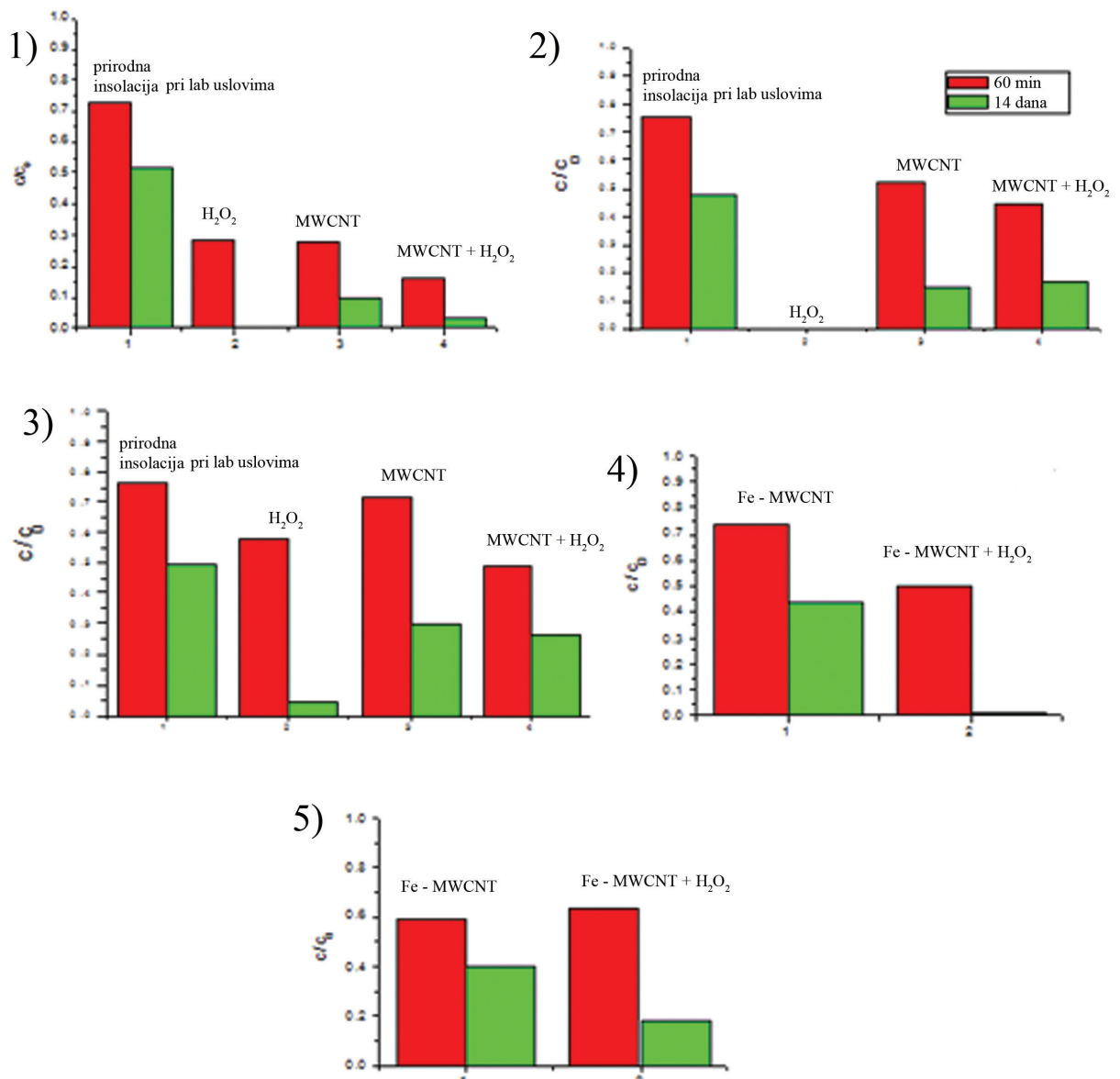
Slika 4.31. MRM hromatogram tranzicije (m/z 203 \rightarrow 129,1) snimljen tokom ispitivanja razgradnje dinotefurna u uzorku vode Dunava pri laboratorijskim uslovima i u prisustvu Fe-MWCNT u trajanju od 60 minuta

Poslednja ispitivana mogućnost uklanjanja odabranih neonikotinoida iz vodene sredine obuhvatila je dodatak H_2O_2 u sistem pri prirodnoj insolaciji sa dodatkom Fe-MWCNT (slika 4.32). U slučaju dinotefurana dodatak H_2O_2 je usporio njegovo uklanjanje iz sistema u odnosu na sistem koji je sadržao samo Fe-MWCNT u posmatranom intervalu od 60 min, dok je H_2O_2 najverovatnije uslovio brže smanjenje koncentracije dinotefurana u odnosu na sistem sa Fe-MWCNT, posmatrajući period od dve nedelje. Uklanjanje klotianidina je efikasnije sa dodatkom H_2O_2 u odnosu na sistem sa Fe-MWCNT u periodu od 60 min. Na osnovu svega uočenog, može se zaključiti da je uklanjanje odabranih neonikotinoida u slučaju Fe-MWCNT drugačije u odnosu na MWCNT.



Slika 4.32. Krive uklanjanja dinotefurana i klotianidina pri uslovima prirodne insolacije u prisustvu Fe-MWCNT i H_2O_2 u periodu od 60 min sa mogućim matematičkim koreliranjem tačaka

Važno je istaći i pitanje eventualnih nepoželjnih posledica nanomaterijala po životnu sredinu i zdravlje. Jedna od prednosti njihovog korišćenja bi bila ta da kada se nađe modus za uklanjanje organskih zagađujućih materija sa ugljeničnih nosača, one posluže kao gorivni izvori zbog visokog energetskeg sadržaja. Posmatrajući ispitivane sisteme u kojima je analizirana mogućnost uklanjanja odabranih neonikotinoida može se konstatovati da je za uklanjanje dinotefurana najpovoljniji bio sistem sa dodatkom MWCNT i H_2O_2 posmatrajući period od 60 min, dok je u periodu od dve nedelje najpovoljniji bio sistem sa dodatkom samo H_2O_2 pri prirodnoj insolaciji u laboratorijskim uslovima (slika 4.33-3). Za uklanjanje klotianidina najviše je doprineo dodatak H_2O_2 , pri čemu je sav klotianidin uklonjen u periodu od 30 min. Na uklanjanje tiakloprida iz vodene sredine najveći uticaj imao je dodatak kombinacije MWCNT i H_2O_2 u sistem pri uslovima prirodne insolacije.



Slika 4.33. Efikasnost različitih sistema na uklanjanje odabranih neonikotinoida 1) tiakloprida, 2 i 4) klotianidina, 3 i 5) dinotefurana iz dunavske vode

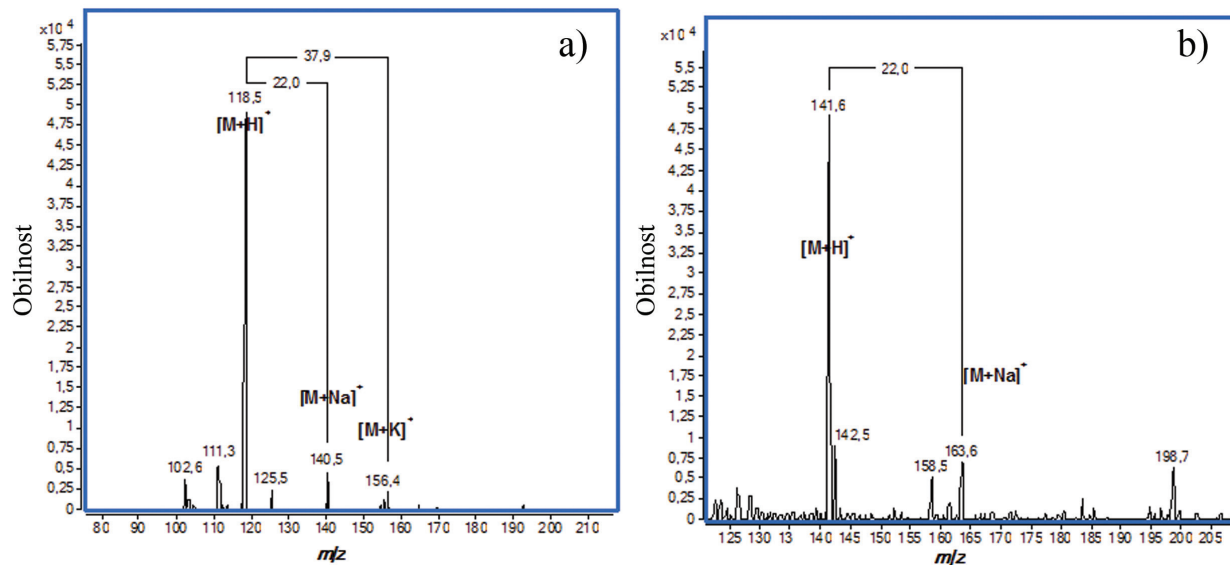
4.6.4 Mogući intermedijeri

Tokom procesa uklanjanja odabranih neonikotinoida iz vodene sredine [300], organske komponente se mogu potpuno mineralizovati do ugljen-dioksida i vode. Međutim, ponekad polazna jedinjenja ne podležu potpunoj mineralizaciji, pa se može očekivati pojava novih jedinjenja nastalih iz polaznih komponenti, koja veoma često mogu biti sa još izraženijim štetnim svojstvima.

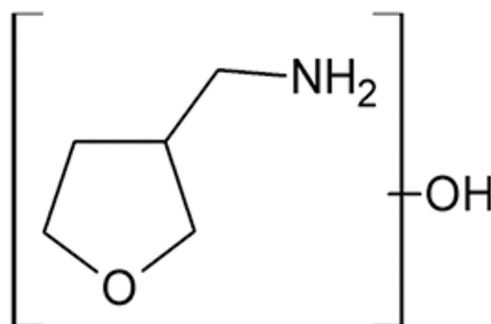
Analiziranjem masenih spektara proizvoda degradacije odabranih neonikotinoida, prilikom njihovog uklanjanja iz vodene sredine u različitim goreopisanim sistemima, došlo se do saznanja o mogućim nastalim intermedijerima. Snimanjem HPLC-MS hromatograma u *scan* režimu rada i analiziranjem masenih spektara uočeni su intermedijeri na retencionom vremenu 1,70 min sa odgovarajućim m/z od 117,5 i 140,6 u slučaju dinotefurana u sistemima sa H_2O_2 , MWCNT+ H_2O_2 , Fe-MWCNT+ H_2O_2 , klotianidina u sistemu Fe-MWCNT+ H_2O_2 , dok u slučaju tiakloprida nisu detektovani intermedijeri. Moguće objašnjenje leži u činjenici da je u ovim eksperimentima rađena analiza

tragova odabranih neonikotinoida, pa je stoga za detaljniju analizu intermedijera potrebno uključiti širi opseg koncentracija neonikotinoida, što će biti predmet nekih daljih istraživanja.

Maseni spektri detektovanih intermedijera prikazani su na slici 4.34. Analiziranjem polaznih struktura pretpostavlja se da nastali intermedijer sa molekulskom masom od 117 može da bude hidroksi-3-(aminometil)-tetrahidrofuran, prikazan na slici 4.35.



Slika 4.34. Maseni spektri mogućih intermedijera A) m/z 117,5; B) m/z 140,6



Slika 4.35. Moguća hemijska struktura nađenog intermedijera sa m/z 117,5 (hidroksi-3-(aminometil)-tetrahidrofuran)

Poglavlje 5

ZAKLJUČAK

Insekticidi novije generacije, neonikotinoidi, odlikuju se specifičnim načinom delovanja na nervni sistem insekata. U određenim uslovima neonikotinoidi mogu da predstavljaju opasnost po medonosne pčele, a njihovi ostaci mogu se pojaviti u košnicama i u pčelinjim proizvodima poput meda. Med karakterišu strogi zahtevi kvaliteta i zdravstvene bezbednosti propisani za ovaj proizvod i proizvode na bazi meda.

Radi dobijanja što brže i kvalitetnije informacije o izloženosti životne sredine ovim insekticidima i količinama njihovih ostataka u hrani potrebno je raspolagati odgovarajućim instrumentalnim metodama za njihovo određivanje. Razvijene su i optimizovane analitičke metode zasnovane na tačnoj hromatografiji za određivanje sedam odabranih neonikotinoida (dinotefurana, nitenpirama, tiametoksama, klotianidina, imidakloprida, acetamiprida i tiakloprida) u medu i likeru od meda. Pored optimizacije procesa ekstrakcije odabranih neonikotinoida iz ovih uzoraka i optimizacije HPLC-DAD-MS/MS uslova, testirana je i mogućnost uklanjanja odabranih neonikotinoida iz vodene sredine upotrebom hemijskih agenasa i višezidnih ugljeničnih nanocevi. Na osnovu svih sprovedenih ispitivanja i dobijenih rezultata mogu se definisati sledeći zaključci:

- **Razvoj metode za određivanje klotianidina u medu primenom tečno-tečne i ekstrakcije na čvrstoj fazi i HPLC-DAD analize**

Ispitivana je mogućnost određivanja klotianidina pomoću tečne hromatografije visoke efikasnosti sa detektorom od niza dioda (HPLC-DAD) primenom kombinacije tečno-tečne i ekstrakcije na čvrstoj fazi iz uzoraka meda. Linearna oblast merenja testirana je u užem intervalu koncentracija od $1,0\text{--}7,5\ \mu\text{g mL}^{-1}$. Kao prva faza primenjena je tečno-tečna ekstrakcija, a zatim prečišćavanje pomoću čvrsto-fazne ekstrakcije. Može se zaključiti da je prečišćavanje uzoraka meda sa poznatom koncentracijom klotianidina primenom kombinacije tečno-tečne ekstrakcije i čvrsto-fazne ekstrakcije efikasnije za male koncentracije rezidua u medu ($0,5\ \mu\text{g g}^{-1}$) (prinos $\approx 70\%$), dok je za veće koncentracije neophodno modifikovati proceduru pripreme zbog mogućeg prezasićenja čvrsto-fazne kolone za prečišćavanje ili nekog dela procedure pripreme koji prouzrokuje gubitak klotianidina (prinos $\approx 46\%$). Na osnovu preliminarnih rezultata može se zaključiti da korišćenje čvrsto-faznih kolona u kombinaciji sa tečno-tečnom ekstrakcijom dihlormetanom rezultira prihvatljivim prinosom klotianidina u uzorcima meda pri koncentraciji od oko $0,5\ \mu\text{g g}^{-1}$ klotianidina. Dalja istraživanja bila su usmerena na razvoj drugih ekstrakcionih tehnika koje bi obezbedile viši prinos neonikotinoida.

- **Razvoj metode za određivanje klotianidina u medu primenom DLLME tehnike i HPLC-DAD analize**

Nakon dobijanja malih prinosa klotianidina primenom kombinacije tečno-tečne i čvrsto-fazne ekstrakcije odabrana je disperzna tečno-tečna mikroekstrakcija (DLLME) kao tehnika pripreme uzoraka meda. Radi optimizacije DLLME tehnike neophodno je bilo ispitati parametre koji utiču na efikasnost odabrane tehnike. Testirana je upotreba acetonitrila i hloroforma kao disperznog i ekstrakcionog sredstva. Rezultati prinosa klotianidina pokazali su da se ubrizgavanjem acetonitrila i hloroforma pomoću šprica ne postiže formiranje dobrog disperznog sistema, pa je i ekstrakcija nezadovoljavajuća sa neadekvatnim prinosom od svega 48,35%. Pored hloroforma, korišćen je i dihlormetan kao drugo

ekstrakciono sredstvo, kako bi se uporedila efikasnost ekstrakcije u odnosu na hloroform. Zabeleženi su prinosi klotianidina od 69,7 i 68,3% u zavisnosti da li je korišćen hloroform, odnosno DHM kao rastvor za ekstrakciju. Prilikom razvijanja što pogodnije metode ekstrakcije ustanovljeno je da je prinos veći sa smesom disperzionog sredstva i ekstrakcionog rastvora u odnosu na korišćenje samog ekstrakcionog rastvora bez disperznog sredstva. Sa hromatograma se uočava da je prinos ekstrakcije manji prilikom korišćenja 1,0 mL DHM u odnosu na korišćenje 2,0 mL DHM, što ukazuje da je prilikom analize uzoraka meda spajkovanih sa standardom klotianidina optimalan odnos zapremine uzorka i ekstrakcionog rastvora 5:2. Ovaj odnos, takođe, implicira da je bolja upotreba veće količine ekstrakcionog rastvora kada se klotianidin ekstrahuje iz kompleksnih matriksa, poput meda, u odnosu na čist standardni rastvor, koji je imao visoki prinos i sa odnosom 5:1. Dalje ispitivanje obuhvatilo je testiranje zapremine uzorka koja je potrebna za uspešno ekstrahovanje, kao i zapremine ACN i DHM. Može se zaključiti da je prinos ekstrakcije bio povoljniji pri odnosu 0,5 mL ACN i 2,0 mL DHM. Količine uzorka manje od 5 mL su se pokazale nezadovoljavajućim za optimalno izvođenje eksperimenta. Prinosi su se kretali od 68,4% do 92,1%, što je ukazalo da su parametri DLLME ekstrakcije optimalni.

- **Optimizacija metode za određivanje odabranih neonikotinoida u medu primenom DLLME i HPLC-MS/MS analize**

Nakon ispitivanja optimalnih parametara DLLME tehnike za klotianidin, izvršena je optimizacija DLLME na način da prinosi ekstrakcija budu iznad 70% za sve ispitivane neonikotinoide. Kako bi se detaljnije ispitali ključni parametri DLLME tehnike, korišćena je metodologija površine odziva (RSM), kao i detekcija na osetljivijem kuplovanom masenom detektoru (MS/MS). Preliminarna ispitivanja osobina DLLME tehnike dovela su do zaključaka o najbitnijim faktorima (zapremeni disperznog i ekstrakcionog sredstva) koji utiču na prinose ove tehnike ekstrakcije u slučaju uzoraka meda koji sadrži neonikotinoide. Optimizovani su HPLC-MS/MS parametri kako bi se obezbedilo zadovoljavajuće hromatografsko razdvajanje i niske granice detekcije (GD, 0,5–1,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$) i određivanja (GO, 1,0–2,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$) ispitivanih neonikotinoida u medu. Upotrebom centralno kompozitnog dizajna konstruisani su kvadratni modeli ispitivanih faktora: zapremine ekstrakcionog (DHM, 1,0–3,0 mL) i disperznog (ACN, 0,0–1,0 mL) sredstva, izračunati statistički parametri i optimizovan proces DLLME upotrebom *Derringer*-ove funkcije poželjnih odgovora. Upotrebom MMC i SC krivih u opsegu GO–100,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ ispitan je uticaj matriksa pri čemu zaključeno je da je najveći uticaj matriksa bio na odziv analitičkog signala nitenpirama, dinotefurana i klotianidina. Razvijena i optimizovana metoda određivanja 7 neonikotinoida je validovana, kako bi se ispunili neophodni kriterijumi za validnost analitičkih metoda u EU. Ispitani su prinosi odabranih neonikotinoida (R, 74,3–113,9%), kao i preciznost metode u uslovima ponovljivosti (RSD, 2,74–11,8%) i intermedijerne reproduktivnosti (RSD, 6,64–16,2%). Brza (retenciona vremena 1,5–9,9 min) i osetljiva metoda, koja troši malu količinu rastvarača, primenjena je za ispitivanje 15 realnih uzoraka meda različitog cvetnog porekla. Rezultati su pokazali da ispitivani med nije sadržao ostatke ispitivanih neonikotinoida u koncentracijama iznad GD.

- **Razvoj HPLC-DAD metode za određivanje neonikotinoidea u medu primenom DLLME i QuEChERS tehnika**

Cilj ovog istraživanja bio je i razvijanje i optimizacija HPLC-DAD analitičke metode upotrebom DLLME i QuEChERS tehnika za pripremu uzoraka za određivanje 7 neonikotinoidea u uzorcima meda. Nakon optimizacije DLLME parametara u ovom delu istraživanja optimizovani su i hromatografski parametri, upotrebom RSM sa *Box-Behnken*-ovim dizajnom i *Derringer*-ovom funkcijom poželjnih odgovora. Postavljen je gradijentni sistem eluiranja analita pri protoku od 0,7 mL min⁻¹. Određene su talasne dužine pri kojima su određivani neonikotinoidei (266 nm za klotianidin, dinotefuran, imidakloprid i 244 nm za nitenpiram, tiametoksam, acetamiprid i tiakloprid). Uticaj matriksa na celom linearnom opsegu merenja LOQ–100,0 µg kg⁻¹ ispitivan je korišćenjem SC i MMC kalibracionih krivih računanjem odnosa njihovih nagiba. Od ispitivanih neonikotinoidea dinotefuran i imidakloprid su bili u najvećoj meri izloženi uticaju matriksa, bez obzira na proceduru pripreme uzoraka. Analizirana je i osetljivost metode merenjem odziva analitičkih signala neonikotinoidea upotrebom MMC kalibracionih krivih i detekcijom sa DAD i MS/MS detektorima. Može se istaći da je uticaj matriksa na analitički signal dinotefurana bio izraženiji u slučaju MS/MS, apostrofirajući manju robusnost ove metode određivanja. Ispitivanje uticaja matriksa je još jednom ukazalo na neophodnost korišćenja MMC kalibracionih krivih za određivanje neonikotinoidea. Optimizovana metoda je validovana. Prinosi neonikotinoidea su (R, 73,1–118,3%), preciznost u uslovima ponovljivosti (RSD, 3,28–10,40%) i intermedijerne reproduktivnosti (RSD, 6,45–17,70%), a granice detekcije (GD, 1,5–2,5 µg kg⁻¹) i određivanja (GO, 5,0–10,0 µg kg⁻¹). Razvijena, optimizovana i validovana metoda primenjena je za ispitivanje 7 neonikotinoidea u 104 uzorka meda različitog cvetnog porekla sa teritorije Autonomne Pokrajine Vojvodine. Detektovano je prisustvo tiakloprida, imidakloprida i tiametoksama u količinama koje su bile ispod MDK RS i EU, ali je njihovo prisustvo potvrdilo neophodnost kontrolisanja ovakve vrste proizvoda.

- **Razvoj HPLC-MS/MS metode korišćenjem DLLME i QuEChERS tehnika za određivanje odabranih neonikotinoidea u liker od meda**

Liker od meda - medica spada u tradicionalna alkoholna pića sa ovih prostora, a proizvodi se mešanjem meda sa određenom voćnom rakijom, što nosi opasnost da se ostaci neonikotinoidea u medu nađu i u ovom tradicionalnom alkoholnom napitku. Razvijena, optimizovana i validovana metoda određivanja neonikotinoidea u medu primenom HPLC-MS/MS sistema primenjena je za analiziranje uzoraka likera od meda - medice. Upoređivane su dve tehnike pripreme uzoraka, DLLME i QuEChERS i primenjeni optimizovani hromatografski uslovi i MS/MS parametri. Testirana je i upotreba različitih hromatografskih kolona, pri čemu je za dalja ispitivanja odabrana ona koja je omogućila kraća retencionna vremena ispitivanih neonikotinoidea uz zadovoljavajuće razdvajanje (XDB-C18: 50 mm × 4,6 mm, 1,8 µm). Komponente matriksa su uticale na smanjenje analitičkog signala svih neonikotinoidea nezavisno od načina pripreme uzoraka. U slučaju nitenpirama, dinotefurana i tiametoksama uticaj matriksa bio je najizraženiji. U ispitivanju likera od meda, korišćenje MMC rastvora je kompenzovalo uticaj matriksa. Metoda je validovana određivanjem prinosa neonikotinoidea (R, 69,2–113,4%), preciznosti u uslovima ponovljivosti (RSD, 3,21–12,81%) i intermedijerne reproduktivnosti (RSD,

9,11–16,63%), kao i granice detekcije (GD, 0,5–2,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$) i određivanja (GO, 1,0–10,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$). Analizom 10 komercijalno dostupnih likera od meda otkriveno je prisustvo klotianidina i tiakloprida, što ukazuje na neophodnost daljeg kontrolisanja ovog proizvoda na prisustvo neonikotinoida.

- **Ispitivanje mogućnosti uklanjanja odabranih neonikotinoida iz vodene sredine**

Ispitana je mogućnost uklanjanja odabranih neonikotinoida (dinotefurana, klotianidina i tiakloprida) iz vodene sredine (reke Dunav) obogaćene ciljnim analitima. Ispitivanje efikasnosti 6 različitih vrsta uklanjanja odabranih neonikotinoida (u prisustvu prirodne insolacije, sa dodatkom H_2O_2 , sa dodatkom MWCNT, sa dodatkom $\text{MWCNT}+\text{H}_2\text{O}_2$, sa dodatkom Fe-MWCNT, sa dodatkom $\text{Fe-MWCNT}+\text{H}_2\text{O}_2$) vršeno je upotrebom prethodno razvijene HPLC-MS/MS metode za određivanje neonikotinoida u uzorcima meda i likera od meda. Krive uklanjanja odabranih neonikotinoida, koje su konstruisane na osnovu koreliranja vremena pri kojem je uzorak držan pod prirodnom insolacijom u laboratorijskim uslovima, pokazale su da tokom 60 minuta tretmana ukupno smanjenje koncentracije dinotefurana, klotianidina i tiakloprida u odnosu na početne koncentracije iznosi oko 25%, što se može smatrati umerenom brzinom degradacije. Ovi rezultati potvrđuju da za brzo i efikasno uklanjanje odabranih neonikotinoida iz uzoraka vode Dunava nije dovoljna sama direktna fotoliza pod uticajem insolacije. Analitički signal dinotefurana dobijen u prisustvu H_2O_2 i pod prirodnom insolacijom u trajanju od 60 min ukazuje na umereno uklanjanje ciljnog analita od oko 40%, dok je pod istim uslovima H_2O_2 uzrokovao uklanjanje tiakloprida od oko 70%, a klotianidina u potpunosti. Testirana je adsorpcija ciljnog analita na višezidnim ugljeničnim nanocevima (MWCNT). Ovim postupkom može da se ukloni oko 30% dinotefurana, oko 50% klotianidina i 60% tiakloprida, s tim da se saturacija nanocevi dešava veoma brzo, nakon 5 min. Afinitet neonikotinoida prema MWCNT se povećava sa smanjenjem polarnosti ispitivanih neonikotinoida. Modifikovani oblici adsorbensa ili kombinacija MWCNT sa pogodnim hemijskim agensom razmatrani su kao potencijalni sistemi koji poboljšavaju efikasnost uklanjanja ovog jedinjenja. U kombinaciji sa H_2O_2 , MWCNT pokazuju bolju sposobnost uklanjanja odabranih neonikotinoida. Sposobnost uklanjanja poboljšana je 15–50% u zavisnosti od ispitivanog neonikotinoida. Upotreba Fe-MWCNT i njihova kombinacija sa H_2O_2 otvorila je mogućnost za dalja ispitivanja mehanizma uklanjanja. Ustanovljeno je nastajanje intermedijera kojima odgovaraju m/z od 117,5 i 140,6 u slučaju razgradnje dinotefurana u sistemima sa H_2O_2 , $\text{MWCNT}+\text{H}_2\text{O}_2$, $\text{Fe-MWCNT}+\text{H}_2\text{O}_2$ i klotianidina u sistemu $\text{Fe-MWCNT}+\text{H}_2\text{O}_2$, a čija bi identifikacija bila predmet nekih daljih ispitivanja koja nisu obuhvaćena ovom disertacijom.

Chapter 6

Poglavlje 6

CONCLUSION

Neonicotinoid insecticides, as one of the fastest growing new generation of insecticides, have contributed to a significant reduction of toxicity for the environment; however, there is a concern that upon their use, as a measure of pest management, beneficial insects such as honeybees may also be affected. Moreover, residues of these insecticides may finally be found in bee product such as honey, pollen, beeswax, propolis etc. Therefore, monitoring and determination of trace levels of the neonicotinoids in honey are necessary and demands highly efficient, selective and sensitive analytical techniques. The objective of the present work was to develop a rapid, sensitive, optimized and accurate analytical method based on liquid chromatography for determining seven neonicotinoid insecticides, dinotefuran, nitenpyram, thiamethoxam, clothianidin, imidacloprid, acetamiprid and thiacloprid in honey and honey liqueur samples. Besides the optimization of extraction processes of selected neonicotinoids, studies were conducted towards the investigation of multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) as promising materials for neonicotinoid removal/adsorption from aqueous systems, due to their stability and adsorption properties. Based on the results the following conclusions were made:

- **Development of method for determination of clothianidin in honey using liquid-liquid and solid-phase extraction combined with HPLC-DAD analysis**

The possibility for determination of clothianidin in honey samples by HPLC with a diode array detector (HPLC-DAD) using a combination of liquid-liquid and solid phase extraction for sample preparation was investigated. The linear range was tested in a narrow concentration range of from 1.0–7.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A liquid-liquid extraction, followed by solid-phase extraction, was used as a sample preparation procedure. It can be concluded that for the treatment of the samples with a known concentration of clothianidin, a combination of liquid-liquid extraction and solid phase extraction was effective for small concentrations of residues (0.5 $\mu\text{g g}^{-1}$) in honey (recovery $\approx 70\%$), while for the higher concentration of clothianidin it was necessary to modify the procedure due to the possible saturation of a solid-phase column, which causes losses of clothianidin (recovery $\approx 46\%$). Based on preliminary results, it can be concluded that the use of a solid-phase column in combination with a liquid-liquid extraction with dichloromethane results in an acceptable recovery of clothianidin in the samples with a clothianidin concentration of about 0.5 $\mu\text{g g}^{-1}$. Further studies will be focused on the development of other extraction techniques that will ensure higher recovery of neonicotinoids.

- **Development of method for determination of clothianidin in honey using DLLME and HPLC-DAD method**

After obtaining low recovery of clothianidin using a combination of liquid-liquid and solid-phase extraction, dispersed liquid-liquid microextraction (DLLME) was selected as a technique for the preparation of honey samples. To optimize DLLME, it was necessary to examine which parameters influence the effectiveness of the selected optimization procedure. The adequacy of acetonitrile as a dispersing agent and chloroform as a dispersing solvent was investigated. The results showed that injection of acetonitrile and chloroform by syringe does not achieve the formation of a good dispersion system hence the recovery of clothianidin were not satisfactory (48.35 %). Besides the chloroform, a dichloromethane was used as a second extracting agent, in order to compare the rela-

tive efficiency of the extraction solvents. Obtained clothianidin recovery ranged from 69.7 to 68.3 %, depending on whether it is used CHCl_3 , or DHM as the extraction solvent. During the development of the most suitable methods for the extraction it was discovered that the mixture of dispersing agent and the extractant solution provides better extraction recoveries in comparison to the use of the extracting solution without the dispersing agent. It was observed that the extraction yield is less with 1.0 mL DHM compared to 2.0 mL DHM, indicating the optimal ratio of sample and extraction solution of 5:2. Further testing included the testing of the sample volume that is required for successful extraction, as well as the volume of ACN and DHM. Sample amounts less than 5 mL have been shown to be unsatisfactory for the optimum performance of the experiment. It can be concluded that the extraction recovery (68.4–92.1%) was more favorable with the use of 0.5 mL ACN and 2.0 mL DHM.

- **Multi-residue method for determination of selected neonicotinoid insecticides in honey using optimized dispersive liquid–liquid microextraction combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry**

The objective of this study was to develop analytical method based on optimized dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) as a pretreatment procedure combined with reversed phase liquid chromatographic separation on C18 column and isocratic elution for simultaneous MS/MS determination of selected neonicotinoid insecticides in honey. The LC-MS/MS parameters were optimized to unequivocally provide good chromatographic separation, low detection (LOD, 0.5–1.0 $\mu\text{g L}^{-1}$) and quantification (LOQ, 1.0–2.5 $\mu\text{g L}^{-1}$) limits for acetamiprid, clothianidin, thiamethoxam, imidacloprid, dinotefuran, thiacloprid and nitenpyram in honey samples. Using different types (chloroform, dichloromethane) and volumes of extraction (1.0–3.0 mL) and dispersive (acetonitrile; 0.0–1.0 mL) solvent and by mathematical modeling it was possible to establish the optimal sample preparation procedure. Matrix-matched calibration and blank honey sample spiked in the concentration range of LOQ–100.0 $\mu\text{g L}^{-1}$ were used to compensate the matrix effect and to fulfill the requirements of SANCO/12495/2011 for the accuracy (R 74.3–113.9%) and precision (expressed in terms of repeatability (RSD 2.74–11.8%) and within-laboratory reproducibility (RSDs 6.64–16.2%)) of the proposed method. The rapid (retention times 1.5–9.9 min), sensitive and low solvent consumption procedure described in this work provides reliable, simultaneous, and quantitative method applicable for the routine laboratory analysis of seven neonicotinoid residues in 15 real honey samples. Neonicotinoid residues were not detected in any of the investigated samples.

- **Development of HPLC-DAD method for determination of neonicotinoids in honey based on DLLME and QuEChERS extraction procedures**

The objective of this study was to develop and optimize HPLC-DAD analytical method with dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) and QuEChERS sample preparation procedures for the simultaneous analysis of seven neonicotinoids (dinotefuran, nitenpyram, thiamethoxam, clothianidin, imidacloprid, acetamiprid and thiacloprid) in honey samples. The liquid chromatographic conditions were optimized by response surface methodology with Box-Behnken design and the global Derringer's desirability. The optimized method was validated to fulfill the requirements of SANCO/12495/2011 standard for both sample pretreatment procedures providing results for accuracy (R, 73.1–118.3%), repeatability (RSD, 3.28–10.40%) and within-laboratory reproducibility (RSD,

6.45–17.70%), limits of detection (LOD, 1.5–2.5 $\mu\text{g kg}^{-1}$) and quantification (LOQ, 5.0–10.0 $\mu\text{g kg}^{-1}$). Matrix effects were compensated by the use of matrix-matched calibration. For the first time, more than 100 honey samples collected from all 7 counties of Autonomous Province of Vojvodina were analyzed. The presence of thiacloprid, imidacloprid and thiametoxam was discovered in a small number of samples, therefore implicating a potential usefulness of ongoing control of this type of food. All the residues were confirmed via LC-MS/MS.

- **Development of multiresidue DLLME and QuEChERS based LC-MS/MS method for the determination of selected neonicotinoid insecticides in honey liqueur**

Honey liqueur is an alcoholic drink derived from honey and strong fruit brandy of suitable type, traditionally made in Serbia and other Balkan countries. Although European Union has regulated the levels of neonicotinoid insecticides in honey and pollen, there is an increased risk of the presence of these compounds in traditional products made from honey. The objective of this study was to develop an optimized LC-MS/MS analytical method with dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) and QuEChERS sample preparation procedures for analysis of seven neonicotinoids (dinotefuran, nitenpyram, thiametoxam, clothianidin, imidacloprid, acetamiprid and thiacloprid) in honey liqueur. The LC-MS/MS conditions were optimized to unequivocally provide good chromatographic separation, selectivity and specificity of developed method. The method was validated to fulfill the requirements of SANCO/12495/2011 for both sample pretreatment procedures providing results for accuracy (R, 69.2–113.4% for DLLME; 71.8–94.9% for QuEChERS), precision (RSD expressed in terms of repeatability (3.21–10.20% for DLLME; 4.19–12.81% for QuEChERS) and within-laboratory reproducibility (9.11–16.63% for DLLME; 11.32–16.40% for QuEChERS)), limits of detection (LOD, 0.5–1.5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for DLLME; 1.0–2.5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for QuEChERS) and quantification (LOQ, 1.0–5.0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for DLLME; 2.5–10.0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for QuEChERS). Matrix effects were compensated by the use of matrix-matched calibration. Analysis of real honey liqueur samples obtained from local markets showed the presence of clothianidin or thiacloprid in four of the analyzed samples, therefore implicating the necessity of ongoing control of this type of traditional product.

- **Removal of selected neonicotinoid insecticides from water matrix**

Removal of selected neonicotinoid insecticides - dinotefuran, clothianidin and thiacloprid using MWCNT and H_2O_2 from Danube spiked water matrix was investigated. Efficiency of different systems for neonicotinoids removal (under natural insolation, with H_2O_2 , with MWCNT, with MWCNT+ H_2O_2 , with Fe-MWCNT, with Fe-MWCNT+ H_2O_2) was evaluated with developed LC-MS/MS method. Analysis of degradation rates revealed loss of 25% of the initial neonicotinoid concentration under natural insolation in the laboratory conditions during 60 min. Addition of chemical agent H_2O_2 promoted loss of 40% of the initial dinotefuran, 70% of thiacloprid concentration and total removal of clothianidin under same conditions. With the addition of MWCNT concentration of dinotefuran, clothianidin and thiacloprid decayed for 30, 50 and 60%, respectively. Iron modification of MWCNT in combination with H_2O_2 increased the removal rate of selected neonicotinoid for 15–50%. Presence of intermediates was discovered in systems of dinotefuran with H_2O_2 , MWCNT+ H_2O_2 , Fe-MWCNT+ H_2O_2 and of clothianidin in systems with Fe-MWCNT+ H_2O_2 with m/z of 117,5 and 140,6.

Poglavlje 7

LITERATURA

1. *EU Pesticides database*. 2013, [pristupljeno 06.10.2013.]; Dostupno: http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm
2. *Pravilnik o maksimalno dozvoljenim količinama ostataka sredstava za zaštitu bilja u hrani i hrani za životinje i o hrani i hrani za životinje za koju se utvrđuju maksimalno dozvoljene količine ostataka sredstava za zaštitu bilja*. Službeni glasnik RS, 2010, **25**.
3. T.C. Sparks, *Insecticide discovery: An evaluation and analysis*. Pestic Biochem Phys, 2013. **107**(1): p. 8-17.
4. *Agropages*.2013, [pristupljeno 06.10.2013.]; Dostupno: <http://agropages.com/buyersguide/category/neonicotinoid-insecticide-insight.html>.
5. S.H. Thany, *Neonicotinoid insecticides: historical evolution and resistance mechanisms*. Adv Exp Med Biol, 2010. **683**: p. 75-83.
6. X. Shao, Z. Ye, H. Bao, Z. Liu, X. Xu, Z. Li, X. Qian, *Advanced research on cis-neonicotinoids*. Chimia (Aarau), 2011. **65**(12): p. 957-960.
7. *Compendium of Pesticide Common Names*. 2013, [pristupljeno 06.10.2013.]; Dostupno: http://www.alanwood.net/pesticides/class_insecticides.html.
8. P. Jeschke, R. Nauen, *Neonicotinoids-from zero to hero in insecticide chemistry*. Pest Manag Sci, 2008. **64**(11): p. 1084-1098.
9. L.A. Brown, M. Ihara, S.D. Buckingham, K. Matsuda, D.B. Sattelle, *Neonicotinoid insecticides display partial and super agonist actions on native insect nicotinic acetylcholine receptors*. J Neurochem, 2006. **99**(2): p. 608-615.
10. A.K. Jones, L.A. Brown, D.B. Sattelle, *Insect nicotinic acetylcholine receptor gene families: from genetic model organism to vector, pest and beneficial species*. Invert Neurosci, 2007. **7**(1): p. 67-73.
11. H. Duan, W. Zhang, J. Zhao, D. Liang, X. Yang, S. Jin, *A novel halogen bond and a better-known hydrogen bond cooperation of neonicotinoid and insect nicotinic acetylcholine receptor recognition*. J Mol Model, 2012. **18**(8): p. 3867-3875.
12. P. Jeschke, R. Nauen, M. Schindler, A. Elbert, *Overview of the status and global strategy for neonicotinoids*. J Agric Food Chem, 2011. **59**(7): p. 2897-2908.
13. P. Jeschke, R. Nauen, M.E. Beck, *Nicotinic acetylcholine receptor agonists: a milestone for modern crop protection*. Angew Chem Int Ed Engl, 2013. **52**(36): p. 9464-9485.
14. A. Zhang, H. Kayser, P. Maienfisch, J.E. Casida, *Insect nicotinic acetylcholine receptor: conserved neonicotinoid specificity of [(3)H]imidacloprid binding site*. J Neurochem, 2000. **75**(3): p. 1294-1303.
15. S.H. Thany, G. Lenaers, V. Raymond-Delpech, D.B. Sattelle, B. Lapied, *Exploring the pharmacological properties of insect nicotinic acetylcholine receptors*. Trends Pharmacol Sci, 2007. **28**(1): p. 14-22.
16. K. Matsuda, M. Shimomura, M. Ihara, M. Akamatsu, D.B. Sattelle, *Neonicotinoids show selective and diverse actions on their nicotinic receptor targets: electrophysiology, molecular biology, and receptor modeling studies*. Biosci Biotechnol Biochem, 2005. **69**(8): p. 1442-1452.
17. M. Tomizawa, *Chemical Biology of the Nicotinic Insecticide Receptor*, in *Advances in Insect*

- Physiology*, C. Ephraim, Editor. 2013, Academic Press, p. 63-99.
18. *Insect Nicotinic Acetylcholine Receptors*, in *Advances in Experimental Medicine and Biology*, S.H. Thany, Editor. 2010, Springer, New York, **683**: p. 1-118.
 19. M. Ihara, M. Shimomura, C. Ishida, H. Nishiwaki, M. Akamatsu, D.B. Sattelle, K. Matsuda, *A hypothesis to account for the selective and diverse actions of neonicotinoid insecticides at their molecular targets, nicotinic acetylcholine receptors: catch and release in hydrogen bond networks*. *Invert Neurosci*, 2007. **7**(1): p. 47-51.
 20. A. Decourtye, J. Devillers, *Ecotoxicity of neonicotinoid insecticides to bees*. *Adv Exp Med Biol*, 2010. **683**: p. 85-95.
 21. M. Tomizawa, J.E. Casida, *Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2005. **45**(1): p. 247-268.
 22. T. Perry, P. Batterham, P.J. Daborn, *The biology of insecticidal activity and resistance*. *Insect Biochem Mol Biol*, 2011. **41**(7): p. 411-422.
 23. R. Nauen, I. Denholm, *Resistance of insect pests to neonicotinoid insecticides: current status and future prospects*. *Arch Insect Biochem Physiol*, 2005. **58**(4): p. 200-215.
 24. K. Matsuda, S. Kanaoka, M. Akamatsu, D.B. Sattelle, *Diverse actions and target-site selectivity of neonicotinoids: structural insights*. *Mol Pharmacol*, 2009. **76**(1): p. 1-10.
 25. D.T. Vo, W.H. Hsu, E.A. Abu-Basha, R.J. Martin, *Insect nicotinic acetylcholine receptor agonists as flea adulticides in small animals*. *J Vet Pharmacol Ther*, 2010. **33**(4): p. 315-322.
 26. K.A. Ford, A.G. Gulevich, T.L. Swenson, J.E. Casida, *Neonicotinoid insecticides: oxidative stress in planta and metallo-oxidase inhibition*. *J Agric Food Chem*, 2011. **59**(9): p. 4860-4867.
 27. *In focus: neonicotinoid insecticides. Proceedings of the XVI International Plant Protection Congress. October 15-18, 2007. Glasgow, United Kingdom*. *Pest Manag Sci*, 2008. **64**(11): p. 1084-1125.
 28. R.C. Biever, J.R. Hoberg, B. Jacobson, E. Dionne, M. Sulaiman, P. McCahon, *ICON rice seed treatment toxicity to crayfish (*Procambarus clarkii*) in experimental rice paddies*. *Environ Toxicol Chem*, 2003. **22**(1): p. 167-174.
 29. M. Tomizawa, J.E. Casida, *Molecular recognition of neonicotinoid insecticides: the determinants of life or death*. *Acc Chem Res*, 2009. **42**(2): p. 260-269.
 30. A. Elbert, M. Haas, B. Springer, W. Thielert, R. Nauen, *Applied aspects of neonicotinoid uses in crop protection*. *Pest Manag Sci*, 2008. **64**(0): p. 1099-1105.
 31. Commission, E., *Council Directive 91/414/EEC concerning the placing of plant protection products on the market*. 1991.
 32. Društvo za zaštitu bilja Srbije, *Sredstva za zaštitu bilja u prometu u Srbiji 2013*. *Biljni lekar*, 2013. **41**(1-2).
 33. R. Charvet, M. Katouzian-Safadi, M.E. Colin, P.A. Marchand, J.M. Bonmatin, *Systemic insecticides: new risk for pollinator insects*. *Ann Pharm Fr*, 2004. **62**(1): p. 29-35.
 34. T. Blacquiere, G. Smagghe, C.A. van Gestel, V. Mommaerts, *Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment*. *Ecotoxicology*, 2012. **21**(4): p. 973-992.

35. T.C. Van Dijk, M.A. Van Staalduinen, J.P. Van der Sluijs, *Macro-invertebrate decline in surface water polluted with imidacloprid*. PLoS ONE, 2013. **8**(5): p. e62374.
36. P.C. Lin, H.J. Lin, Y.Y. Liao, H.R. Guo, K.T. Chen, *Acute poisoning with neonicotinoid insecticides: a case report and literature review*. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2013. **112**(4): p. 282-286.
37. S. Van Timmeren, J.C. Wise, R. Isaacs, *Soil application of neonicotinoid insecticides for control of insect pests in wine grape vineyards*. Pest Manag Sci, 2012. **68**(4): p. 537-542.
38. V. Girolami, M. Marzaro, L. Vivian, L. Mazzon, M. Greatti, C. Giorio, D. Marton, A. Tapparo, *Fatal powdering of bees in flight with particulates of neonicotinoids seed coating and humidity implication*. J Appl Entomol, 2012. **136**(1-2): p. 17-26.
39. X. Shi, L. Jiang, H. Wang, K. Qiao, D. Wang, K. Wang, *Toxicities and sublethal effects of seven neonicotinoid insecticides on survival, growth and reproduction of imidacloprid-resistant cotton aphid, Aphis gossypii*. Pest Manag Sci, 2011. **67**(12): p. 1528-1533.
40. J.P. Van der Sluijs, N. Simon-Delso, D. Goulson, L. Maxim, J.-M. Bonmatin, L.P. Belzunces, *Neonicotinoids, bee disorders and the sustainability of pollinator services*. Curr Opin Environ Sust, 2013. **5**(3-4): p. 293-305.
41. A. Tapparo, C. Giorio, M. Marzaro, D. Marton, L. Solda, V. Girolami, *Rapid analysis of neonicotinoid insecticides in guttation drops of corn seedlings obtained from coated seeds*. J Environ Monit, 2011. **13**(6): p. 1564-1568.
42. V. Girolami, L. Mazzon, A. Squartini, N. Mori, M. Marzaro, A. Di Bernardo, M. Greatti, C. Giorio, A. Tapparo, *Translocation of neonicotinoid insecticides from coated seeds to seedling guttation drops: a novel way of intoxication for bees*. J Econ Entomol, 2009. **102**(5): p. 1808-1815.
43. A. Nikolakis, A. Chapple, R. Friessleben, P. Neumann, T. Schad, R. Schmuck, H.F. Schnier, H. Schnorbach, R. Schöning, C. Maus, *Risk mitigation measures for seed treatments using neonicotinoids*, Julius Kühn Arch, 2009. **423**: p. 132.
44. Y. Aliouane, A.K. El Hassani, V. Gary, C. Armengaud, M. Lambin, M. Gauthier, *Subchronic exposure of honeybees to sublethal doses of pesticides: effects on behavior*. Environ Toxicol Chem, 2009. **28**(1): p. 113-122.
45. J.M. Bonmatin, I. Moineau, R. Charvet, M.E. Colin, C. Fleche, E.R. Bengsch, *Behaviour of Imidacloprid in Fields. Toxicity for Honey Bees*, in *Environmental Chemistry*, E. Lichtfouse, J. Schwarzbauer, and D. Robert, Editors. 2005. Springer, Berlin Heidelberg, p. 483-494.
46. P.N. Moza, K. Hustert, E. Feicht, A. Kettrup, *Photolysis of imidacloprid in aqueous solution*. Chemosphere, 1998. **36**(3): p. 497-502.
47. W. Zheng, W. Liu, *Kinetics and mechanism of the hydrolysis of imidacloprid*. Pest Sci, 1999. **55**(4): p. 482-485.
48. *Environmental Fate of Imidacloprid*. M. Fossen, Editor. 2006, Department of Pesticide Regulation, Sacramento, CA.
49. F.J. Placke, E. Weber, *Method of determining imidacloprid residues in plant materials*. Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer, 1993. **46**(2): 109-182.
50. J.M. Bonmatin, I. Moineau, R. Charvet, C. Fleche, M.E. Colin, E.R. Bengsch, *A LC/APCI-MS/MS method for analysis of imidacloprid in soils, in plants, and in pollens*. Anal Chem,

2003. **75**(9): p. 2027-2033.
51. R. Solecki, *Toxicological evaluations-imidacloprid*. Pesticide residues in food 2001, [pristupljeno 30.11.2013.]; Dostupno: <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/2001pr07.htm>.
 52. *Material Safety Data Sheet*. Bayer Crop Science, 2013.
 53. United States Environmental Protection Agency, U.E.P. *Imidacloprid*. 2013, [pristupljeno 30.11.2013.]; Dostupno: http://www.epa.gov/pesticides/chem_search/ppls/042750-00140-20090204.pdf.
 54. K. Matsuda, S.D. Buckingham, D. Kleier, J.J. Rauh, M. Grauso, D.B. Sattelle, *Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors*. Trends Pharmacol Sci, 2001. **22**(11): p. 573-580.
 55. V. Kindemba, *The impact of neonicotinoid insecticides on bumblebees, honey bees and other non-target in vertebrates*. 2009, [pristupljeno 30.11.2013.]; Dostupno: <http://www.buglife.org.uk/Resources/Buglife/Neonicotinoid%20insecticides%20report.pdf>
 56. C. Tomlin, *The Pesticide Manual: a World Compendium*. 2000. Farnham, United Kingdom, British Crop Protection Council.
 57. N.V. Mitić, S. Savčić-Petrić, *Pesticidi u poljoprivredi i šumarstvu u Jugoslaviji 2002*. 2002, Društvo za zaštitu bilja Srbije, p. 950.
 58. L.I. Gilbert, S.S. Gill, *Insect Control: Biological and Synthetic Agents*. 2010. Academic Press, London.
 59. T. Iwasa, N. Motoyama, J.T. Ambrose, R.M. Roe, *Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, Apis mellifera*. Crop Prot, 2004. **23**(5): p. 371-378.
 60. V. Guzsvány, *Prilog karakterizaciji i određivanju neki neonikotinoidea*. 2006, Prirodno-matematički fakultet, Departman za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine. Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad, p. 1-161.
 61. P. Maienfisch, H. Huerlimann, A. Rindlisbacher, L. Gsell, H. Dettwiler, J. Haettenschwiler, E. Sieger, M. Walti, *The discovery of thiamethoxam: a second-generation neonicotinoid*. Pest Manag Sci, 2001. **57**(2): p. 165-176.
 62. D. Indić, Z. Klokočar-Šmit, *Insekticidi za suzbijanje krompirove zlatice u Jugoslaviji*. Biljni lekar, 2002. **30**(3): p. 5.
 63. J. Tan, J.J. Galligan, R.M. Hollingworth, *Agonist actions of neonicotinoids on nicotinic acetylcholine receptors expressed by cockroach neurons*. Neurotoxicology, 2007. **28**(4): p. 829-842.
 64. K.A. Ford, J.E. Casida, *Comparative metabolism and pharmacokinetics of seven neonicotinoid insecticides in spinach*, J Agric Food Chem, 2008. **56**(21): p. 10168.10175.
 65. T.R. Roberts, D.H. Hutson, P.J. Jewess, P.W. Lee, P. H. Nicholls, J.R. Plimmer, *Part 2: Insecticides and Fungicides*, in *Metabolic Pathways of Agrochemicals*, R Soc Chem, T.R. Roberts, D.H. Hutson, P.J. Jewess, P.W. Lee, P. H. Nicholls, J.R. Plimmer, Editors. 1999. The Royal Society of Chemistry, UK.
 66. F.G. Zalom, N.C.T., F.J. Byrne, *Managing resistance is critical to future use of pyrethroids*

- and neonicotinoids. Calif Agric, 2005. **59**: p. 5.
67. M. Irie, *Dinotefuran* 2000, [pristupljeno 04.10.2013.]; Dostupno: http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Evaluation12/Dinotefuran.pdf.
 68. P. Mistretta, *Dinotefuran*. 2009, USDA/Forest Service., Atlanta, Georgia, p. 225.
 69. J. Pistorius, G. Bischoff, U. Heimbach, M. Stähler, *Bee poisoning incidents in Germany in spring 2008 caused by abrasion of active substance from treated seeds during sowing of maize*, Julius Kühn Arch., 2009. **423**: p. 118.
 70. M. Gross, *EU ban puts spotlight on complex effects of neonicotinoids*. Curr Biol, 2013. **23**(11): p. R462-R464.
 71. P. Hendriks, M. Debin, P. Neuman, I. Fries, W. Ritter, M. Brown, F. Mutinelli, Y. Le Conte, A. Gregorc, *Bee mortality and bee surveillance in Europe*. EFSA Journal, 2009.
 72. EFSA, *European Food Safety Authority. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment for bees for the active substance clothianidin*. EFSA J 2013. **11**(1):3066. [p. 58].
 73. EFSA, *European Food Safety Authority. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment for bees for the active substance imidacloprid*. EFSA J 2013. **11**(1):3068. [p. 55].
 74. EFSA, *European Food Safety Authority. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment for bees for the active substance thiamethoxam*. EFSA J 2013. **11**(1):3067. [p. 68].
 75. *The Daily Green* 2011, [pristupljeno 30.11.2013.]; Dostupno: <http://www.thedailygreen.com/environmental-news/latest/einstein-bees>.
 76. *Statistički godišnjak Republike Srbije 2012*. Republički zavod za statistiku Republike Srbije, 2012.
 77. G. Celli, B. Maccagnani, *Honey bees as bioindicators of environmental pollution*. B Insectol, 2003. **56**(1): p. 137-139.
 78. M. Merchant, *Honey bees versus neonicotinoid insecticides. The issues and challenges*. 2013, United States Environmental Protection Agency, USA.
 79. T. Farooqui, *A potential link among biogenic amines-based pesticides, learning and memory, and colony collapse disorder: A unique hypothesis*. Neurochem Int, 2013. **62**(1): p. 122-136.
 80. J.E. Cresswell, N. Desneux, D. van Engelsdorp, *Dietary traces of neonicotinoid pesticides as a cause of population declines in honey bees: an evaluation by Hill's epidemiological criteria*. Pest Manag Sci, 2012. **68**(6): p. 819-827.
 81. J.W. White, *Composition of American honeys*. 1962. U.S. Department of Agriculture, USA.
 82. T. Eteraf-Oskouei, M. Najafi, *Traditional and modern uses of natural honey in human diseases: a review*. Iran J Basic Med Sci, 2013. **16**(6): p. 731-742.
 83. P. Stanway, *The Miracle of Honey: Practical Tips for Health, Home & Beauty*. 2013, Watkins Pub, UK.
 84. N. Al-Waili, K. Salom, A. Al-Ghamdi, M.J. Ansari, *Antibiotic, pesticide, and microbial contaminants of honey: human health hazards*. Sci World J, **2012**: p. 930849.
 85. M. Moniruzzaman, M.I. Khalil, S.A. Sulaiman, S.H. Gan, *Physicochemical and antioxidant properties of Malaysian honeys produced by Apis cerana, Apis dorsata and Apis mellifera*.

- BMC Complement Altern Med, 2013. **13**: 43.
86. R.H. Anderson, *Some chemical and physical properties of South African honeys*. 1958, University of Stellenbosch, Stellenbosch, South Africa.
87. A. Simon, K. Traynor, K. Santos, G. Blaser, U. Bode, P. Molan, *Medical honey for wound care - still the 'latest resort'?* Evid Based Complement Alternat Med, 2009. **6**(2): p. 165-173.
88. N. Altman, *The Honey Prescription: The Amazing Power of Honey as Medicine*. 2010. Inner Traditions/Bear & Company, Rochester, Vermont, USA.
89. O.O. Erejuwa, S.A. Sulaiman, M.S. Wahab, *Honey-a novel antidiabetic agent*. Int J Biol Sci, 2012. **8**(6): p. 913-934.
90. F.M. Adebisi, I. Akpan., E.I. Obiajunwa, H.B. Olaniyi, *Chemical/physical characterization of nigerian honey*. Pakistan J Nutr, 2004. **3**(5): p. 278-281.
91. S. Panseri, A. Catalano, A. Giorgi, F. Arioli, A. Procopio, D. Britti, L.M. Chiesa, *Occurrence of pesticide residues in Italian honey from different areas in relation to its potential contamination sources*. Food Control, 2014. **38**(0): p. 150-156.
92. C.K. de Andrade, V.E. dos Anjos, M.L. Felsner, Y.R. Torres, S.P. Quináia, *Direct determination of Cd, Pb and Cr in honey by slurry sampling electrothermal atomic absorption spectrometry*. Food Chem, 2014. **146**(0): p. 166-173.
93. L. Castle, M.R. Philo, M. Sharman, *The analysis of honey samples for residues of nitrobenzene and petroleum from the possible use of Frow mixture in hives*. Food Chem, 2004. **84**(4): p. 643-649.
94. T.A. Catelani, I.V. Tóth, J.L.F.C. Lima, L. Pezza, H.R. Pezza, *A simple and rapid screening method for sulfonamides in honey using a flow injection system coupled to a liquid waveguide capillary cell*. Talanta, 2014. **121**(0): p. 281-287.
95. *Pčelarstvo*. 2013, [pristupljeno 26.07.2013.]; Dostupno: <http://www.pcelarstvo.hr/>.
96. *Medovača*. 2013, [pristupljeno 26.07.2013.]; Dostupno: <http://www.medovaca.com/2009/07/medena-rakija/>.
97. D.A.L. Vignati, D. Secrieru, Y.I. Bogatova, J. Dominik, R. Céréghino, N.A. Berlinsky, G. Oaie, S. Szobotka, A. Stanica, *Trace element contamination in the arms of the Danube Delta (Romania/Ukraine): Current state of knowledge and future needs*. J Environ Manage, 2013. **125**(0): p. 169-178.
98. S. Subotić, S. Spasić, Ž. Višnjić-Jeftić, A. Hegediš, J. Krpo-Četković, B. Mićković, S. Skorić, M. Lenhardt, *Heavy metal and trace element bioaccumulation in target tissues of four edible fish species from the Danube River (Serbia)*. Ecotox Environ Safe, 2013. **98**(0): p. 196-202.
99. B. Vrana, V. Klučárová, E. Benická, N. Abou-Mrad, R. Amdany, S. Horáková, A. Draxler, F. Humer, O. Gans, *Passive sampling: An effective method for monitoring seasonal and spatial variability of dissolved hydrophobic organic contaminants and metals in the Danube river*. Environ Pollut, 2014. **184**(0): p. 101-112.
100. N. Andrási, B. Molnár, B. Dobos, A. Vasanits-Zsigrai, G. Záray, I. Molnár-Perl, *Determination of steroids in the dissolved and in the suspended phases of wastewater and Danube River samples by gas chromatography, tandem mass spectrometry*. Talanta, 2013. **115**(0): p. 367-373.

101. A. Covaci, A. Gheorghe, O. Hulea, P. Schepens, *Levels and distribution of organochlorine pesticides, polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in sediments and biota from the Danube Delta, Romania*. *Environ Pollut*, 2006. **140**(1): p. 136-149.
102. G. Johansson, *Extraction/Multistage Countercurrent Distribution*, in *Encyclopedia of Separation Science*, I.D. Wilson, Editor. 2000, Academic Press, Oxford. p. 1398-1405.
103. R.G. Harper, P.M. Harper, M. Hostrup, *Extraction/Solvent Based Separation*, in *Encyclopedia of Separation Science*, I.D. Wilson, Editor. 2000, Academic Press, Oxford, p. 1424-1434.
104. C.K. Zacharis, I. Rotsias, P.G. Zachariadis, A. Zotos, *Dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of organochlorine pesticides residues in honey by gas chromatography-electron capture and ion trap mass spectrometric detection*. *Food Chem*, 2012. **134**(3): p. 1665-1672.
105. R. Rial-Otero, E.M. Gaspar, I. Moura, J.L. Capelo, *Chromatographic-based methods for pesticide determination in honey: An overview*. *Talanta*, 2007. **71**(2): p. 503-514.
106. K. Zhang, J.W. Wong, *4.12 - Solvent-Based Extraction Techniques for the Determination of Pesticides in Food*, in *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*, J. Pawliszyn, Editor. 2011, Academic Press, Oxford, p. 245-261.
107. M.K.L. Bicking, *Extraction/Analytical Extractions*, in *Encyclopedia of Separation Science*, I.D. Wilson, Editor. 2000, Academic Press, Oxford, p. 1371-1382.
108. M. Herrero, A. Cifuentes, E. Ibáñez, *4.09 - Extraction Techniques for the Determination of Carotenoids and Vitamins in Food*, in *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*, J. Pawliszyn, Editor. 2012, Academic Press, Oxford, p. 181-201.
109. T.C. Lo, M.H.I. Baird, *Solvent Extraction*, in *Encyclopedia of Physical Science and Technology* (Third Edition), R.A. Meyers, Editor. 2003, Academic Press, New York, p. 341-362.
110. J. Pawliszyn, *Theory of Extraction*, in *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*, J. Pawliszyn, Editor. 2012, Academic Press, Oxford, p. 1-25.
111. C.F. Poole, *Solid-Phase Extraction with Discs*, in *Encyclopedia of Separation Science*, I.D. Wilson, Editor. 2000, Academic Press, Oxford, p. 4141-4148.
112. A. Zygler, M. Słomińska, J. Namieśnik, *Soxhlet Extraction and New Developments Such as Soxtec*, in *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*, J. Pawliszyn, Editor. 2012, Academic Press, Oxford, p. 65-82.
113. M.D. Luque de Castro, F. Priego-Capote, *Soxhlet Extraction Versus Accelerated Solvent Extraction*, in *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*, J. Pawliszyn, Editor. 2012, Academic Press: Oxford. p. 83-103.
114. M.D. Luque de Castro, J. Ruiz Jiménez, L.E. García Ayuso, *Environmental Applications/ Soxhlet Extraction*, in *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*. 2013, Elsevier, Oxford.
115. J.L. Luque-García, *Extraction/Microwave-Assisted Solvent Extraction*, in *Encyclopedia of Analytical Science* (Second Edition), P. Worsfold, A. Townshend, and C. Poole, Editors. 2005, Elsevier, Oxford, p. 584-591.
116. J.R. Dean, *Microwave Extraction*, in *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*, J. Pawliszyn, Editor. 2012, Academic Press, Oxford, p. 135-149.

117. J.L. Luque-García, *Extraction/Pressurized Fluid Extraction*, in *Encyclopedia of Analytical Science* (Second Edition), P. Worsfold, A. Townshend, and C. Poole, Editors. 2005, Elsevier, Oxford, p. 591-597.
118. D.J. Rowe, *Chemistry and Technology of Flavors and Fragrances*. 2005, Blackwell Publishing, Oxford.
119. L. Ruiz-Aceituno, M.L. Sanz, L. Ramos, *Use of ionic liquids in analytical sample preparation of organic compounds from food and environmental samples*. *TrAC Trend Anal Chem*, 2013. **43**(0): p. 121-145.
120. C. Blasco, C.M. Lino, Y. Picó, A. Pena, G. Font, M.I.N. Silveira, *Determination of organochlorine pesticide residues in honey from the central zone of Portugal and the Valencian community of Spain*. *J Chromatogr A*, 2004. **1049**(1-2): p. 155-160.
121. B. Albero, C. Sanchez-Brunete, J.L. Tadeo, *Analysis of pesticides in honey by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry*. *J Agric Food Chem*, 2004. **52**(19): p. 5828-5835.
122. S.R. Rissato, M.S. Galhiane, F.R.N. Knoll, B.M. Apon, *Supercritical fluid extraction for pesticide multiresidue analysis in honey: determination by gas chromatography with electron-capture and mass spectrometry detection*. *J Chromatogr A*, 2004. **1048**(2): p. 153-159.
123. Y. Wang, J. You, R. Ren, Y. Xiao, S. Gao, H. Zhang, A. Yu, *Determination of triazines in honey by dispersive liquid-liquid microextraction high-performance liquid chromatography*. *J Chromatogr A*, 2010. **1217**(26): p. 4241-4246.
124. N. Campillo, R. Peñalver, N. Aguinaga, M. Hernández-Córdoba, *Solid-phase microextraction and gas chromatography with atomic emission detection for multiresidue determination of pesticides in honey*. *Anal Chim Acta*, 2006. **562**(1): p. 9-15.
125. R.P.Z. Furlani, K.M. Marcilio, F.M. Leme, S.A.V. Tfouni, *Analysis of pesticide residues in sugarcane juice using QuEChERS sample preparation and gas chromatography with electron capture detection*. *Food Chem*, 2011. **126**(3): p. 1283-1287.
126. A. Kamel, *Refined methodology for the determination of neonicotinoid pesticides and their metabolites in honey bees and bee products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)*. *J Agric Food Chem*, 2010. **58**(10): p. 5926-5931.
127. M. Anastassiades, S.J. Lehotay, D. Stajnbaher, F.J. Schenck, *Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce*. *JAOAC Int*, 2003. **86**(2): p. 412-431.
128. P. Fidente, S. Seccia, F. Vanni, P. Morrica, *Analysis of nicotinoid insecticides residues in honey by solid matrix partition clean-up and liquid chromatography-electrospray mass spectrometry*. *J Chromatogr A*, 2005. **1094**(1-2): p. 175-178.
129. S. Liu, Z. Zheng, F. Wei, Y. Ren, W. Gui, H. Wu, G. Zhu, *Simultaneous determination of seven neonicotinoid pesticide residues in food by ultraperformance liquid chromatography tandem mass spectrometry*. *J Agric Food Chem*, 2010. **58**(6): p. 3271-3278.
130. R. Schoning, *Analytical method for the determination of residues of imidacloprid, NTN 33893-5-hydroxy and NTN 33893-olefin by HPLC with electrospray MS/MS-detection in plant and other materials: honey, nectar, bees, wax, corn (pollen, leaves), rape (pollen, flowers, leaves), sunflowers (pollen, flowers, leaves), tree (leaves, flowers), horse chestnuts*. *Pflanzenschutz-Nachr. Bayer (Ger. Ed.)*, 2001. **54**(3): p. 413-440.

131. R.E. Clement, C. Hao, *Liquid-Liquid Extraction: Basic Principles and Automation*, in *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*, J. Pawliszyn, Editor. 2012, Academic Press, Oxford, p. 51-63.
132. M.L.P. Reddy, T. Prasada Rao, A.D. Damodaran, *Liquid-Liquid Extraction Processes for the Separation and Purification of Rare Earths*. Miner Process Extract Metall Rev, 1993. **12**(2-4): p. 91-113.
133. K. Banerjee, D.P. Oulkar, S. Dasgupta, S.B. Patil, S.H. Patil, R. Savant, P.G. Adsule, *Validation and uncertainty analysis of a multi-residue method for pesticides in grapes using ethyl acetate extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. J Chromatogr A, 2007. **1173**(1-2): p. 98-109.
134. E. Watanabe, H. Eun, K. Baba, T. Arao, Y. Ishii, S. Endo, M. Ueji, *Rapid and simple screening analysis for residual imidacloprid in agricultural products with commercially available ELISA*. Anal Chim Acta, 2004. **521**(1): p. 45-51.
135. Y. He, *Liquid-Based Microextraction Techniques for Environmental Analysis*, in *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*, J. Pawliszyn, Editor. 2012, Academic Press, Oxford, p. 835-862.
136. J.M. Kokosa, *Advances in solvent-microextraction techniques*. TrAC Trend Anal Chem, 2013. **43**(0): p. 2-13.
137. Y. Assadi, M.A. Farajzadeh, A. Bidari, *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*, in *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*, J. Pawliszyn, Editor. 2012. Academic Press, Oxford, p. 181-212.
138. M. Rezaee, Y. Assadi, M.R. Milani Hosseini, E. Aghae, F. Ahmadi, S. Berijani, *Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction*. J Chromatogr A, 2006. **1116**(1-2): p. 1-9.
139. M. Rezaee, Y. Yamini, M. Faraji, *Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method*. J Chromatogr A, 2010. **1217**(16): p. 2342-2357.
140. H. Chen, H. Chen, J. Ying, J. Huang, L. Liao, *Dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography as an efficient and sensitive technique for simultaneous determination of chloramphenicol and thiamphenicol in honey*. Anal Chim Acta, 2009. **632**(1): p. 80-85.
141. C.K. Zacharis, P.D. Tzanavaras, K. Roubos, K. Dhima, *Solvent-based de-emulsification dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry for determination of trace organochlorine pesticides in environmental water samples*. J Chromatogr A, 2010. **1217**(38): p. 5896-5900.
142. M.I. Leong, S.D. Huang, *Dispersive liquid-liquid microextraction method based on solidification of floating organic drop for extraction of organochlorine pesticides in water samples*. J Chromatogr A, 2009. **1216**(45): p. 7645-7650.
143. M. Farajzadeh, S. Sorouraddin, M. Moghaddam, *Liquid phase microextraction of pesticides: a review on current methods*. Microchim Acta, 2014: p. 1-23.
144. M. Asensio-Ramos, J. Hernández-Borges, T.M. Borges-Miquel, M.Á. Rodríguez-Delgad, *Ionic liquid-dispersive liquid-liquid microextraction for the simultaneous determination of pesticides and metabolites in soils using high-performance liquid chromatography and fluorescence detection*. J Chromatogr A, 2011. **1218**(30): p. 4808-4816.

145. E. Yiantzi, E. Psillakis, K. Tyrovola, N. Kalogerakis, *Vortex-assisted liquid–liquid microextraction of octylphenol, nonylphenol and bisphenol-A*. *Talanta*, 2010. **80**(5): p. 2057-2062.
146. L. Kocúrová, I.S. Balogh, J. Šandrejová, V. Andruch, *Recent advances in dispersive liquid-liquid microextraction using organic solvents lighter than water. A review*. *Microchem J*, 2012. **102**(0): p. 11-17.
147. L. Farina, E. Boido, F. Carrau, E. Dellacassa, *Determination of volatile phenols in red wines by dispersive liquid-liquid microextraction and gas chromatography-mass spectrometry detection*. *J Chromatogr A*, 2007. **1157**(1-2): p. 46-50.
148. R.R. Kozani, Y. Assadi, F. Shemirani, M.R.M. Hosseini, M.R. Jamali, *Determination of trihalomethanes in drinking water by dispersive liquid-liquid microextraction then gas chromatography with electron-capture detection*. *Chromatographia*, 2007. **66**(1-2): p. 81-86.
149. Q. Wu, X. Zhou, Y. Li, X. Zang, C. Wang, Z. Wang, *Application of dispersive liquid-liquid microextraction combined with high-performance liquid chromatography to the determination of carbamate pesticides in water samples*. *Anal Bioanal Chem*, 2009. **393**(6-7): p. 1755-61.
150. D. Moreno-González, L. Gámiz-Gracia, J.M. Bosque-Sendra, A.M. García-Campaña, *Dispersive liquid–liquid microextraction using a low density extraction solvent for the determination of 17 N-methylcarbamates by micellar electrokinetic chromatography-electrospray-mass spectrometry employing a volatile surfactant*. *J Chromatogr A*, 2012. **1247**(0): p. 26-34.
151. Z.H. Yang, Y.L. Lu, Y. Liu, T. Wu, Z.Q. Zhou, D.H. Liu, *Vortex-assisted surfactant-enhanced-emulsification liquid-liquid microextraction*. *J Chromatogr A*, 2011. **1218**(40): p. 7071-7077.
152. M.A. Farajzadeh, M. Bahram, M.R. Vardast, M. Bamorowat, *Dispersive liquid-liquid microextraction for the analysis of three organophosphorus pesticides in real samples by high performance liquid chromatography-ultraviolet detection and its optimization by experimental design*. *Microchim Acta*, 2010. **172**(3-4): p. 465-470.
153. P. Wang, X. Yang, J. Wang, J. Cui, A.J. Dong, H.T. Zhao, L.W. Zhang, Z.Y. Wang, R.B. Xu, W.J. Li, Y.C. Zhang, H. Zhang, J. Jing, *Multi-residue method for determination of seven neonicotinoid insecticides in grains using dispersive solid-phase extraction and dispersive liquid-liquid micro-extraction by high performance liquid chromatography*. *Food Chem*, 2012. **134**(3): p. 1691-1698.
154. J. Vichapong, R. Burakham, S. Srijaranai, *Vortex-assisted surfactant-enhanced-emulsification liquid-liquid microextraction with solidification of floating organic droplet combined with HPLC for the determination of neonicotinoid pesticides*. *Talanta*, 2013. **117**(0): p. 221-228.
155. S. Zhang, X. Yang, X. Yin, C. Wang, Z. Wang, *Dispersive liquid-liquid microextraction combined with sweeping micellar electrokinetic chromatography for the determination of some neonicotinoid insecticides in cucumber samples*. *Food Chem*, 2012. **133**(2): p. 544-550.
156. Q. Wu, Z. Li, C. Wang, C. Wu, W. Wang, Z. Wang, *Dispersive solid-phase extraction clean-up combined with dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of neonicotinoid insecticides in vegetable samples by high-performance liquid chromatography*. *Food Anal Methods*, 2011. **4**(4): p. 559-566.
157. D. Moema, M.M. Nindi, S. Dube, *Development of a dispersive liquid–liquid microextraction method for the determination of fluoroquinolones in chicken liver by high performance liquid chromatography*. *Anal Chim Acta*, 2012. **730**(0): p. 80-86.
158. H. Chen, J. Ying, H. Chen, J. Huang, L. Liao, *LC determination of chloramphenicol in honey*

- using dispersive liquid-liquid microextraction. *Chromatographia*, 2008. **68**(7-8): p. 629-634.
159. G. Font, J. Manes, J.C. Molto, Y. Pico, *Solid-phase extraction in multi-residue pesticide analysis of water*. *J Chromatogr*, 1993. **642**(1-2): p. 135-161.
160. C.F. Poole, *Extraction/Solid-Phase Extraction*, in *Encyclopedia of Separation Science*, I.D. Wilson, Editor. 2000, Academic Press, Oxford, p. 1405-1416.
161. D.A. Wells, *Solid-Phase Extraction with Cartridges*, in *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*. 2013, Elsevier B.V., Amsterdam.
162. S.A. Barker, *Solid-phase matrix dispersion: extraction*, in *Encyclopedia of Separation Science*, I.D. Wilson, Editor. 2000, Academic Press, Oxford, p. 4148-4153.
163. C.F. Poole, S.K. Poole, *Principles and Practice of Solid-Phase Extraction*, in *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*, J. Pawliszyn, Editor. 2012, Academic Press, Oxford, p. 273-297.
164. J.S. Aulakh, A.K. Malik, V. Kaur, P. Schmitt-Kopplin, *A review on solid phase micro extraction - High performance liquid chromatography (SPME-HPLC) analysis of pesticides*. *Crit Rev Anal Chem*, 2005. **35**(1): p. 71-85.
165. A. Di Muccio, P. Fidente, D.A. Barbini, R. Dommarco, S. Seccia, P. Morrica, *Application of solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry to the determination of neonicotinoid pesticide residues in fruit and vegetables*. *J Chromatogr A*, 2006. **1108**(1): p. 1-6.
166. Z. Xiao, X. Li, X. Wang, J. Shen, S. Ding, *Determination of neonicotinoid insecticides residues in bovine tissues by pressurized solvent extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2011. **879**(1): p. 117-22.
167. S. Seccia, P. Fidente, D. Montesano, P. Morrica, *Determination of neonicotinoid insecticides residues in bovine milk samples by solid-phase extraction clean-up and liquid chromatography with diode-array detection*. *J Chromatogr A*, 2008. **1214**(1-2): p. 115-120.
168. J.J. Jiménez, J.L. Bernal, M.J.d. Nozal, C. Alonso, *Liquid-liquid extraction followed by solid-phase extraction for the determination of lipophilic pesticides in beeswax by gas chromatography-electron-capture detection and matrix-matched calibration*. *J Chromatogr A*, 2004. **1048**(1): p. 89-97.
169. R. Cazorla-Reyes, J.L. Fernandez-Moreno, R. Romero-Gonzalez, A.G. Frenich, J.L. Vidal, *Single solid phase extraction method for the simultaneous analysis of polar and non-polar pesticides in urine samples by gas chromatography and ultra high pressure liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry*. *Talanta*, 2011. **85**(1): p. 183-196.
170. C. Diez, W.A. Traag, P. Zommer, P. Marinero, J. Atienza, *Comparison of an acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" method with classical multi-residue methods for the extraction of herbicide residues in barley samples*. *J Chromatogr A*, 2006. **1131**(1-2): p. 11-23.
171. A. Przyjazny, *Insecticides/Solid-Phase Extraction*, in *Encyclopedia of Separation Science*, I.D. Wilson, Editor. 2000, Academic Press, Oxford, p. 3118-3128.
172. I.S. Jeong, B.M. Kwak, J.H. Ahn, S.H. Jeong, *Determination of pesticide residues in milk using a QuEChERS-based method developed by response surface methodology*. *Food Chem*, 2012. **133**(2): p. 473-481.

173. O. Lacina, J. Urbanova, J. Poustka, J. Hajslova, *Identification/quantification of multiple pesticide residues in food plants by ultra-high-performance liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry*. J Chromatogr A, 2010. **1217**(5): p. 648-659.
174. G. Tanner, C. Czerwenka, *LC-MS/MS analysis of neonicotinoid insecticides in honey: methodology and residue findings in Austrian honeys*. J Agric Food Chem, 2011. **59**(23): p. 12271-12277.
175. M. Arienzo, D. Cataldo, L. Ferrara, *Pesticide residues in fresh-cut vegetables from integrated pest management by ultra performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry*. Food Control, 2013. **31**(1): p. 108-115.
176. P. Jovanov, V. Guzsvány, M. Franko, S. Lazić, M. Sakač, I. Milovanović, N. Nedeljković, *Development of multiresidue DLLME and QuEChERS based LC-MS/MS method for determination of selected neonicotinoid insecticides in honey liqueur*. Food Res Int, 2014. **55**(0): p. 11-19.
177. M.M. Rahman, J.H. Park, A.M. Abd El-Aty, J.H. Choi, A. Yang, K.H. Park, M. Nashir Uddin Al Mahmud, G.J. Im, J.H. Shim, *Feasibility and application of an HPLC/UV-D to determine dinotefuran and its shorter wavelength metabolites residues in melon with tandem mass confirmation*. Food Chem, 2013. **136**(2): p. 1038-1046.
178. S. Risticovic, D. Vuckovic, H.L. Lord, J. Pawliszyn, *Solid-Phase Microextraction*, in *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*, J. Pawliszyn, Editor. 2012, Academic Press, Oxford, p. 419-460.
179. A.A. Clifford, *Extraction/Supercritical Fluid Extraction*, in *Encyclopedia of Separation Science*, I.D. Wilson, Editor. 2000, Academic Press, Oxford, p. 1442-1448.
180. J.J. Ramsden, *What is Nanotechnology?*, in *Applied Nanotechnology* (Second Edition), J.J. Ramsden, Editor. 2014, William Andrew Publishing, Oxford, p. 3-12.
181. V.J. Morris, *Food Technologies: Nanotechnology and Food Safety*, in *Encyclopedia of Food Safety*, Y. Motarjemi, Editor. 2014, Academic Press, Waltham, p. 208-210.
182. B.G. Priestly, A. Bartholomaeus, R. Drew, *Hazards of Food Contact Material: Nanotechnologies and Nanomaterials*, in *Encyclopedia of Food Safety*, Y. Motarjemi, Editor. 2014, Academic Press, Waltham, p. 444-448.
183. M. Keidar, I.I. Beilis, *Plasma Nanoscience and Nanotechnology*, in *Plasma Engineering*, M. Keidar and I.I. Beilis, Editors. 2013, Academic Press, Boston, p. 287-357.
184. F. Augusto, L.W. Hantao, N.G.S. Mogollón, S.C.G.N. Braga, *New materials and trends in sorbents for solid-phase extraction*. TrAC Trend Anal Chem, 2013. **43**(0): p. 14-23.
185. K. Pyrzynska, *Carbon nanotubes as sorbents in the analysis of pesticides*. Chemosphere, 2011. **83**(11): p. 1407-1413.
186. R. Malik, N. Alvarez, M. Haase, B. Ruff, Y. Song, B. Suberu, D. Shereen, D. Mast, A. Gilpin, M. Schulz, V. Shanov, *Carbon Nanotube Sheet: Processing, Characterization and Applications*, in *Nanotube Superfiber Materials*, M.J. Schulz, V.N. Shanov, and Z. Yin, Editors. 2014, William Andrew Publishing, Boston, p. 349-387.
187. N.T. Alvarez, V.N. Shanov, T. Ochmann, B. Ruff, *Carbon Nanotube Fiber Doping*, in *Nanotube Superfiber Materials*, M.J. Schulz, V.N. Shanov, and Z. Yin, Editors. 2014, William Andrew Publishing, Boston, p. 289-311.

188. R. Zhang, Y. Zhang, F. Wei, *Synthesis and Properties of Ultralong Carbon Nanotubes*, in *Nanotube Superfiber Materials*, M.J. Schulz, V.N. Shanov, and Z. Yin, Editors. 2014, William Andrew Publishing, Boston, p. 87-136.
189. C. Li, G. Shi, *Carbon nanotube-based fluorescence sensors*. *J Photoch Photobio C*, 2014. **19**(0): p. 20-34.
190. A. Demir, A. Baykal, H. Sözeri, R. Topkaya, *Low temperature magnetic investigation of Fe_3O_4 nanoparticles filled into multiwalled carbon nanotubes*. *Synthetic Met*, 2014. **187**(0): p. 75-80.
191. *Nanotechnology Now*. 2014, [pristupljeno 10.01.2014.]; Dostupno: <http://www.nanotechnology.com/nanotube-buckyball-sites.htm>.
192. M. Valcárcel, S. Cárdenas, B.M. Simonet, Y. Moliner-Martínez, R. Lucena, *Carbon nanostructures as sorbent materials in analytical processes*. *TrAC Trend Anal Chem*, 2008. **27**(1): p. 34-43.
193. B. Pan, B. Xing, *Adsorption mechanisms of organic chemicals on carbon nanotubes*. *Environ Sci Techn*, 2008. **42**(24): p. 9005-9013.
194. W. Chen, L. Duan, D. Zhu, *Adsorption of polar and nonpolar organic chemicals to carbon nanotubes*. *Environ Sci Techn*, 2007. **41**(24): p. 8295-8300.
195. B.T. Zhang, X. Zheng, H.F. Li, J.M. Lin, *Application of carbon-based nanomaterials in sample preparation: A review*. *Anal Chim Acta*, 2013. **784**(0): p. 1-17.
196. J. Tian, J. Xu, F. Zhu, T. Lu, C. Su, G. Ouyang, *Application of nanomaterials in sample preparation*. *J Chrom A*, 2013. **1300**(0): p. 2-16.
197. V. Guzsány, Z. Papp, S. Lazic, F. Gaál, L. Bjelica, B. Abramovic, *A rapid spectrophotometric determination of imidacloprid in selected commercial formulations in the presence of 6-chloronicotinic acid*. *J Serb Chem Soc*, 2009. **74**(12): p. 1455-1465.
198. Q. Guillermo, A. Sergio, G. Salvador, G. Miguel de la, *Fourier transform infrared determination of imidacloprid in pesticide formulations*. *J Braz Chem Soc*, 2004. **15**(2): p. 165-169.
199. V. Guzsány, L. Rajić, B. Jović, D. Orčić, J. Csanádi, S. Lazić, B. Abramović, *Spectroscopic monitoring of photocatalytic degradation of the insecticide acetamiprid and its degradation product 6-chloronicotinic acid on TiO_2 catalyst*. *J Environ Sci Health, Part A*, 2012. **47**(12): p. 1919-1929.
200. J. Luis Vilchez, R. El-Khattabi, R. Blanc, A. Navalón, *Photochemical-fluorimetric method for the determination of the insecticide imidacloprid in water samples*. *Anal Chim Acta*, 1998. **371**(2-3): p. 247-253.
201. J.L. Vilchez, M.C. Valencia, A. Navalón, B. Molinero-Morales, L.F. Capitán-Vallvey, *Flow injection analysis of the insecticide imidacloprid in water samples with photochemically induced fluorescence detection*. *Anal Chim Acta*, 2001. **439**(2): p. 299-305.
202. A. Navalón, R. El-Khattabi, A. González-Casado, J. Vilchez, *Differential-pulse polarographic determination of the insecticide imidacloprid in commercial formulations*. *Microchim Acta*, 1999. **130**(4): p. 261-265.
203. R. Blanc, A. González-Casado, A. Navalón, J.L. Vilchez, *On the estimate of blanks in differential pulse voltammetric techniques: application to detection limits evaluation as recommended by IUPAC*. *Anal Chim Acta*, 2000. **403**(1-2): p. 117-123.

204. A. Guiberteau, T. Galeano, N. Mora, P. Parrilla, F. Salinas, *Study and determination of the pesticide Imidacloprid by square wave adsorptive stripping voltammetry*. *Talanta*, 2001. **53**(5): p. 943-949.
205. V. Guzsvány, J. Petrović, J. Krstić, Z. Papp, M. Putek, L. Bjelica, A. Bobrowski, B. Abramović, *Renewable silver-amalgam film electrode for voltammetric monitoring of solar photodegradation of imidacloprid in the presence of Fe/TiO₂ and TiO₂ catalysts*. *J Electroanal Chem*, 2013. **699**(0): p. 33-39.
206. E. Watanabe, H. Eun, K. Baba, T. Arao, Y. Ishii, S. Endo, M. Ueji, *Evaluation and validation of a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay for the neonicotinoid insecticide imidacloprid in agricultural samples*. *J Agric Food Chem*, 2004. **52**(10): p. 2756-2762.
207. H.J. Kim, S. Liu, Y.S. Keum, Q.X. Li, *Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the insecticide thiamethoxam*. *J Agric Food Chem*, 2003. **51**(7): p. 1823-1830.
208. H.J. Kim, W.L. Shelver, Q.X. Li, *Monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for the insecticide imidacloprid*. *Anal Chim Acta*, 2004. **509**(1): p. 111-118.
209. S. Wanatabe, S. Ito, Y. Kamata, N. Omoda, T. Yamazaki, H. Munakata, T. Kaneko, Y. Yuasa, *Development of competitive enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) based on monoclonal antibodies for chloronicotinoid insecticides imidacloprid and acetamiprid*. *Anal Chim Acta*, 2001. **427**(2): p. 211-219.
210. E. Watanabe, K. Baba, H. Eun, S. Miyake, *Application of a commercial immunoassay to the direct determination of insecticide imidacloprid in fruit juices*. *Food Chem*, 2007. **102**(3): p. 745-750.
211. E. Watanabe, S. Miyake, K. Baba, H. Eun, S. Endo, *Immunoassay for acetamiprid detection: application to residue analysis and comparison with liquid chromatography*. *Anal Bioanal Chem*, 2006. **386**(5): p. 1441-1448.
212. J.L. Vilchez, R. El-Khattabi, J. Fernández, A. González-Casado, A. Navalón, *Determination of imidacloprid in water and soil samples by gas chromatography-mass spectrometry*. *J Chromatogr A*, 1996. **746**(2): p. 289-294.
213. A. Navalon, A. Gonzalez-Casado, R. El-Khattabi, J. Luis Vilchez, A.R. Fernandez-Alba, *Determination of imidacloprid in vegetable samples by gas chromatography-mass spectrometry*. *Analyst*, 1997. **122**(6): p. 579-581.
214. M. Mateu-Sanchez, M. Moreno, F.J. Arrebola, J.L. Martinez Vidal, *Analysis of acetamiprid in vegetables using gas chromatography-tandem mass spectrometry*. *Anal Sci*, 2003. **19**(5): p. 701-704.
215. A.Y. Ko, M.M. Rahman, A.M. Abd El-Aty, J. Jang, J.H. Park, S.K. Cho, J.H. Shim, *Development of a simple extraction and oxidation procedure for the residue analysis of imidacloprid and its metabolites in lettuce using gas chromatography*. *Food Chem*, 2014. **148**(0): p. 402-409.
216. L.L. Li, G. Jiang, C. Liu, H. Liang, D. Sun, W. Li, *Clothianidin dissipation in tomato and soil, and distribution in tomato peel and flesh*. *Food Control*, 2012. **25**(1): p. 265-269.
217. B. Łozowicka, *The development, validation and application of a GC-dual detector (NPD-ECD) multi-pesticide residue method for monitoring bee poisoning incidents*. *Ecotox Environ Safe*, 2013. **97**(0): p. 210-222.
218. S. Rossi, A.G. Sabatini, R. Cenciarini, S. Ghini, S. Girotti, *Use of high-performance liquid*

- chromatography, UV and gas chromatography, mass spectrometry for determination of the imidacloprid content of honeybees, pollen, paper filters, grass, and flowers. Chromatographia*, 2004. **61**(3-4): p. 189-195.
219. A.R. Fernandez-Alba, A. Valverde, A. Agüera, M. Contreras, S. Chiron, *Determination of imidacloprid in vegetables by high-performance liquid chromatography with diode-array detection. J Chromatogr A*, 1996. **721**(1): p. 97-105.
220. M. Martínez Galera, A. Garrido Frenich, J.L. Martínez Vidal, P. Parrilla Vázquez, *Resolution of imidacloprid pesticide and its metabolite 6-chloronicotinic acid using cross-sections of spectrochromatograms obtained by high-performance liquid chromatography with diode-array detection. J Chromatogr A*, 1998. **799**(1-2): p. 149-154.
221. A. Mandic, S. Lazic, S. Okresz, F. Gaal, *Determination of the insecticide imidacloprid in potato (Solanum tuberosum L.) and onion (Allium cepa) by high-performance liquid chromatography with diode-array detection. J Anal Chem*, 2005. **60**(12): p. 1134-1138.
222. H. Obana, M. Okihashi, K. Akutsu, Y. Kitagawa, S. Hori, *Determination of acetamiprid, imidacloprid, and nitenpyram residues in vegetables and fruits by high-performance liquid chromatography with diode-array detection. J Agric Food Chem*, 2002. **50**(16): p. 4464-4467.
223. S.B. Singh, G.D. Foster, S.U. Khan, *Microwave-assisted extraction for the simultaneous determination of thiamethoxam, imidacloprid, and carbendazim residues in fresh and cooked vegetable samples. J Agric Food Chem*, 2004. **52**(1): p. 105-109.
224. C. Blasco, M. Fernandez, Y. Pico, G. Font, J. Manes, *Simultaneous determination of imidacloprid, carbendazim, methiocarb and hexythiazox in peaches and nectarines by liquid chromatography-mass spectrometry. Anal Chim Acta*, 2002. **461**(1): p. 109-116.
225. F. Hernández, J.V. Sancho, O. Pozo, A. Lara, E. Pitarch, *Rapid direct determination of pesticides and metabolites in environmental water samples at sub- $\mu\text{g/l}$ level by on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. J Chromatogr A*, 2001. **939**(1-2): p. 1-11.
226. H. Obana, M. Okihashi, K. Akutsu, Y. Kitagawa, S. Hori, *Determination of neonicotinoid pesticide residues in vegetables and fruits with solid phase extraction and liquid chromatography mass spectrometry. J Agric Food Chem*, 2003. **51**(9): p. 2501-2505.
227. I. Ferrer, E.M. Thurman, A.R. Fernandez-Alba, *Quantitation and accurate mass analysis of pesticides in vegetables by LC/TOF-MS. Anal Chem*, 2005. **77**(9): p. 2818-2825.
228. A. Marín, J.L. Martínez Vidal, F.J. Egea Gonzalez, A. Garrido Frenich, C.R. Glass, M. Sykes, *Assessment of potential (inhalation and dermal) and actual exposure to acetamiprid by greenhouse applicators using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J Chromatogr B*, 2004. **804**(2): p. 269-275.
229. S. Seccia, P. Fidente, D.A. Barbini, P. Morrica, *Multiresidue determination of nicotinoid insecticide residues in drinking water by liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry. Anal Chim Acta*, 2005. **553**(1-2): p. 21-26.
230. N.R. de Erenchun, Z.G. de Balugera, M.A. Goicolea, R.J. Barrio, *Determination of imidacloprid and its major metabolite in soils by liquid chromatography with pulsed reductive amperometric detection. Anal Chim Acta*, 1997. **349**(1-3): p. 199-206.
231. M. Rancan, A.G. Sabatini, G. Achilli, G.C. Galletti, *Determination of imidacloprid and metabolites by liquid chromatography with an electrochemical detector and post column photo-*

- chemical reactor*. Anal Chim Acta, 2006. **555**(1): p. 20-24.
232. C. Mohan, Y. Kumar, J. Madan, N. Saxena, *Multiresidue analysis of neonicotinoids by solid-phase extraction technique using high-performance liquid chromatography*. Environ Monit Assess, 2010. **165**(1-4): p. 573-576.
233. I.M. de Oliveira, B.V.F. Nunes, D.R. Barbosa, A.M. Pallares, L.R.F. Faro, *Effects of the neonicotinoids thiametoxam and clothianidin on in vivo dopamine release in rat striatum*. Toxicol Lett, 2010. **192**(3): p. 294-297.
234. M. Wu, J. Cai, J. Yao, B. Dai, Y. Lu, *Study of imidaclothiz residues in cabbage and soil by HPLC with UV detection*. Bull Environ Contam Toxicol, 2010. **84**(3): p. 289-293.
235. V. Guzsány, A. Madžgalj, P. Trebše, F. Gaál, M. Franko, *Determination of selected neonicotinoid insecticides by liquid chromatography with thermal lens spectrometric detection*. Environ Chem Lett, 2007. **5**(4): p. 203-208.
236. B. Abramović, N. Banić, D. Šojić, *Degradation of thiacloprid in aqueous solution by UV and UV/H₂O₂ treatments*. Chemosphere, 2010. **81**(1): p. 114-119.
237. W. Xie, C. Han, Y. Qian, H. Ding, X. Chen, J. Xi, *Determination of neonicotinoid pesticides residues in agricultural samples by solid-phase extraction combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. J Chromatogr A, 2011. **1218**(28): p. 4426-4433.
238. Z. Xiao, Y. Yang, Y. Li, X. Fan, S. Ding, *Determination of neonicotinoid insecticides residues in eels using subcritical water extraction and ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Anal Chim Acta, 2013. **777**(0): p. 32-40.
239. 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*. Anal Chim Acta, 2010. **678**(1): p. 63-72.
240. K.P. Yáñez, J.L. Bernal, M.J. Nozal, M.T. Martín, J. Bernal, *Determination of seven neonicotinoid insecticides in beeswax by liquid chromatography coupled to electrospray-mass spectrometry using a fused-core column*. J Chromatogr A, 2013. **1285**(0): p. 110-117.
241. W. Commons, *HPLC apparatus*. 2014, [pristupljeno 10.01.2014.]; Dostupno: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:HPLC_apparatus.svg.
242. I. Sources, *Getting Started in HPLC*. 2014, [pristupljeno 10.01.2014.]; Dostupno: <http://www.lcresources.com/resources/getstart/2c01.htm>.
243. C.F. Poole, *Chromatography*, in *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*. 2013, Elsevier.
244. E. R. Ardrey, *Liquid Chromatography - Mass Spectrometry: An introduction*. 2003: Wiley.
245. A.E. Rodrigues, *Chromatography/Convective Transport in Chromatographic Media*, in *Encyclopedia of Separation Science*, I.D. Wilson, Editor. 2000, Academic Press, Oxford, p. 352-358.
246. Von K. Robards, P.R. Haddad, P.E. Jackson, *Principles and practice of modern chromatographic methods*. Academic Press, London, 1994.
247. V. Meyer, *Practical High-Performance Liquid Chromatography* (Fourth edition). 2004. John Wiley & Sons, p. 1-374.

248. E.R. Ardrey, *Liquid Chromatography – Mass Spectrometry: An Introduction*. 2003. John Wiley & Sons.
249. V.R. Meyer, *Chromatography/Principles*, in *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*. 2013, Elsevier.
250. M.C. McMaster, *HPLC A Practical User's Guide*. 2007, John Wiley & Sons.
251. L.M.L. Nollet, *Food Analysis by HPLC*. 2000. Marcel Dekker, Inc.
252. F.A. Settle, *Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry*. 1997. Prentice Hall.
253. D.C. Harris, *Quantitative Chemical Analysis*. 1995. W. H. Freeman.
254. J.S. Rolf Ekman, A. Westman-Brinkmalm, A. Kraj, *Mass Spectrometry - Instrumentation, Interpretation, and Applications*. 2009. John Wiley & Sons.
255. J.H. Gross, *Mass Spectroscopy*. 2004. Springer.
256. C. Lifshitz, T.D. Märk, *Mass Spectrometry, Ionization Theory*, in *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry (Second Edition)*, J.C. Lindon, Editor. 1999, Academic Press: Oxford. p. 1459-1469.
257. K. Tang, J.S. Page, R.T. Kelly, I. Marginean, *Electrospray Ionization in Mass Spectrometry*, in *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry (Second Edition)*, J.C. Lindon, Editor. 2010, Academic Press, Oxford, p. 467-474.
258. V.S. Edmond de Hoffmann, *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. 2007. John Wiley & Sons.
259. NASA. *Huygens Probe Gas Chromatograph Mass Spectrometer*. 2013 [pristupljeno 15.10.2013.]; Dostupno: http://huygensgcms.gsfc.nasa.gov/MS_Analyzer_1.htm.
260. F.W. McLafferty, *Tandem Mass Spectrometry*. 1983, John Wiley & Sons.
261. K.L. Busch, G. L. Glish, S. A. McLuckey, *Mass Spectrometry: Techniques and Applications of Tandem Mass Spectrometry*. 1988, VCH.
262. R. Bateman, *Sector Mass Spectrometers*, in *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry (Second Edition)*, J.C. Lindon, Editor. 1999, Academic Press, Oxford, p. 2511-2517.
263. S.E.V. Bramer, *An Introduction to Mass Spectrometry*. 1998, [pristupljeno 12.10.2013.] Dostupno: (<http://science.widener.edu/svb/massspec/massspec.pdf>).
264. Wikipedia. *Electron Multiplier*. 2013, [pristupljeno 12.10.2013.]; Dostupno: http://en.wikipedia.org/wiki/Electron_multiplier.
265. M. Smith, *Understanding Mass Spectra: A Basic Approach (Second Edition)*, 2004. John Wiley & Sons.
266. W.E.L. Andre, P. De Leenheer, Jan F. Van Bocxlaer, *Modern Chromatographic Analysis of Vitamins*. 2000, Marcel Dekker, Inc.
267. D. L. Bente Wetzel, G. Charalambous, *Instrumental Methods in Food and Beverage Analysis*. 1998, Elsevier.
268. J. Li, E. Altman, *Application of Mass Spectrometry to Rapid Analysis of Bacterial Polysac-*

- charides*, in *Comprehensive Natural Products II*, H.-W. Liu and L. Mander, Editors. 2010, Elsevier, Oxford, p. 497-511.
269. S.N. Deming, Y. Michotte, D.L. Massart, L. Kaufman, B.G.M. Vandeginste, *Chemometrics: A Textbook*. 1988, Elsevier Science.
270. M. Otto., *Chemometrics*. 2007, John Wiley & Sons.
271. M. Preu, D. Guyot, M. Petz, *Development of a gas chromatography-mass spectrometry method for the analysis of aminoglycoside antibiotics using experimental design for the optimisation of the derivatisation reactions*. *J Chromatogr A*, 1998. **818**(1): p. 95-108.
272. L. Mutihac, R. Mutihac, *Mining in chemometrics*. *Anal Chim Acta*, 2008. **612**(1): p. 1-18.
273. R.G. Brereton, *Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant*. 2003, John Wiley & Sons.
274. S.N. Deming, S.L. Morgan, *Experimental Design: A Chemometric Approach: A Chemometric Approach*. 1993, Elsevier Science.
275. J. Trygg, J. Gabrielsson, T. Lundstedt, *Background Estimation, Denoising, and Preprocessing*, in *Comprehensive Chemometrics*, S.D. Brown, R. Tauler, and B. Walczak, Editors. 2009, Elsevier, Oxford, p. 1-8.
276. J. Trygg, E. Holmes, T. Lundstedt, *Chemometrics in Metabonomics*. *J Proteome Res*, 2006. **6**(2): p. 469-479.
277. T. Lundstedt, E. Seifert, L. Abramo, B. Thelin, A. Nyström, J. Pettersen, R. Bergman, *Experimental Design and Optimization*. *Chemom Intell Lab Syst*, 1998. **42**(0): p. 3-40.
278. R.G. Brereton, *Chemometrics and Statistics: (h) Optimisation Strategies*, in *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*. 2013, Elsevier.
279. S.L. Ferreira, R.E. Bruns, E.G. da Silva, W.N. Dos Santos, C.M. Quintella, J.M. David, J.B. de Andrade, M.C. Breitreitz, I.C. Jardim, B.B. Neto, *Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems*. *J Chromatogr A*, 2007. **1158**(1-2): p. 2-14.
280. T.P. Ryan, *Introduction*, in *Modern Experimental Design*. 2006, John Wiley & Sons, p. 1-30.
281. M. Nowak, A. Seubert, *Application of experimental design for the characterisation of a novel elution system for high-capacity anion chromatography with suppressed conductivity detection*. *J Chromatogr A*, 1999. **855**(1): p. 91-109.
282. L.K. Skartland, S.A. Mjos, B. Grung, *Experimental designs for modeling retention patterns and separation efficiency in analysis of fatty acid methyl esters by gas chromatography-mass spectrometry*. *J Chromatogr A*, 2011. **1218**(38): p. 6823-6831.
283. S.L. Ferreira, W.N. Dos Santos, C.M. Quintella, B.B. Neto, J.M. Bosque-Sendra, *Doehlert matrix: a chemometric tool for analytical chemistry-review*. *Talanta*, 2004. **63**(4): p. 1061-1067.
284. S.L. Ferreira, R.E. Bruns, H.S. Ferreira, G.D. Matos, J.M. David, G.C. Brandao, E.G. da Silva, L.A. Portugal, P.S. dos Reis, A.S. Souza, W.N. dos Santos, *Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods*. *Anal Chim Acta*, 2007. **597**(2): p. 179-186.
285. M.A. Bezerra, R.E. Santelli, E.P. Oliveira, L.S. Villar, L.A. Escalera, *Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry*. *Talanta*, 2008. **76**(5): p. 965-977.

286. N.A. Armstrong, *Pharmaceutical Experimental Design and Interpretation* (Second Edition). 2006, Taylor & Francis.
287. A. Gonzalez, K.L. Foster, G. Hanrahan, *Method development and validation for optimized separation of benzo[a]pyrene-quinone isomers using liquid chromatography-mass spectrometry and chemometric response surface methodology*. J Chromatogr A, 2007. **1167**(2): p. 135-142.
288. L. Liu, Y.-B. Wen, K.-N. Liu, L. Sun, M. Wu, G.-F. Han, Y.-X. Lu, Q.-M. Wang, Z. Yin, *Optimization of on-line solid phase extraction and HPLC conditions using response surface methodology for determination of WM-5 in mouse plasma and its application to pharmacokinetic study*. J Chromatogr B, 2013. **923-924**(0): p. 8-15.
289. J. Z. Song, C. F. Qiao, S. L. Li, Y. Zhou, M.T. Hsieh, H. X. Xu, *Rapid optimization of dual-mode gradient high performance liquid chromatographic separation of Radix et Rhizoma Salviae Miltiorrhizae by response surface methodology*. J Chromatogr A, 2009. **1216**(42): p. 7007-7012.
290. Y. Zhou, J.Z. Song, F.F.K. Choi, H.F. Wu, C.F. Qiao, L.S. Ding, S.L. Gesang, H.X. Xu, *An experimental design approach using response surface techniques to obtain optimal liquid chromatography and mass spectrometry conditions to determine the alkaloids in Meconopsis species*. J Chromatogr A, 2009. **1216**(42): p. 7013-7023.
291. G. Bošković, S. Ratković, E. Kiss, O. Geszti, *Carbon nanotubes purification constrains due to large Fe-Ni/Al₂O₃ catalyst particles encapsulation*. Bull Mater Sci, 2013. **36**(1): p. 1-7.
292. S. Ratković, D. Vujičić, E. Kiss, G. Bošković, O. Geszti, *Different degrees of weak metal-support interaction in Fe-(Ni)/Al₂O₃ catalyst governing activity and selectivity in carbon nanotubes' production using ethylene*. Mater Chem and Phys, 2011. **129**(1-2): p. 398-405.
293. S. Ratković, E. Kiss, G. Bošković, *Synthesis of high-purity carbon nanotubes over alumina and silica supported bimetallic catalysts*. Chem Ind Chem Eng Q, 2009. **15**(4): p. 227-236.
294. P. Jovanov, V. Guzsvány, M. Franko, S. Lazić, M. Sakač, B. Šarić, V. Banjac, *Multi-residue method for determination of selected neonicotinoid insecticides in honey using optimized dispersive liquid-liquid microextraction combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Talanta, 2013. **111**(0): p. 125-133.
295. T. Sivakumar, R. Manavalan, K. Valliappan, *Computer-assisted optimization of liquid-liquid extraction for HPLC analysis of domperidone and pantoprazole in human plasma*. Acta Chromatogr, 2008. **20**(4): p. 549-562.
296. SANCO/12495/2011. *Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed*.
297. C.K. Zacharis, I. Rotsias, P.G. Zachariadis, A. Zotos, *Dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of organochlorine pesticides residues in honey by gas chromatography-electron capture and ion trap mass spectrometric detection*. Food Chem, 2012. **134**(3): p. 1665-1672.
298. M.P. Malešević, *Multikriterijumski pristup modelovanja HPLC metode za određivanje zolpidem-tartarata i degradacionih proizvoda*. 2013. Farmaceutski Fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, p. 1-132.
299. S. Parra, V. Sarria, S. Malato, P. Péringer, C. Pulgarin, *Photochemical versus coupled photochemical-biological flow system for the treatment of two biorecalcitrant herbicides: metobromuron and isoproturon*. Appl Cata B, 2000. **27**(3): p. 153-168.
300. S. Chiron, A. Fernandez-Alba, A. Rodriguez, E. Garcia-Calvo, *Pesticide chemical oxidation: state-of-the-art*. Water Res, 2000. **34**(2): p. 366-377.

Poglavlje 8

BIOGRAFIJA

Pavle Jovanov je rođen u Novom Kneževcu 17.05.1985. godine, gde je završio osnovnu školu i gimnaziju. Prvu godinu osnovnih studija na Prirodno-matematičkom fakultetu, Univerziteta u Novom Sadu, odsek za hemiju, smer-diplomirani hemičar (opšti smer) upisao je 2004. godine. Dva puta je predstavljao fakultet na "Primatijadi", 2006. i 2007. godine, gde je sa svojim naučnim radovima osvojio drugo i treće mesto iz oblasti hemije. Godine 2007. dobio je prvu nagradu Univerziteta u Novom Sadu za najbolji studentski temat iz hemije. Četvrtu godinu osnovnih studija je pohađao, kao student razmene, na University of Alabama in Huntsville, Alabama, SAD, školske 2007/08. godine, tokom koje je postao i počasni građanin grada Huntsville.

Master rad pod nazivom "Ispitivanje antioksidativnih osobina medenjaka obogaćenih heljdinim brašnom" odbranio je 2010. godine na Tehnološkom fakultetu Univerziteta u Novom Sadu.

Od 2009. godine zaposlen je u Naučnom institutu za prehrambene tehnologije u Novom Sadu, prvo u zvanju istraživač pripravnik, a zatim, od 2010. god., u zvanju istraživač saradnik. U okviru istraživačkog opusa osvojio je IUPAC nagradu za najbolji poster na 49. Savetovanju Srpskog hemijskog društva 2011. godine i prvo mesto za najbolje oralno izlaganje na YISAC konferenciji 2012. godine u Sloveniji.

Od 2010. godine obavlja poslove rukovodioca akreditovane Laboratorije za tehnologiju, kvalitet i bezbednost hrane-FINSLab.

Autor je i koautor mnogih radova i saopštenja prezentovanih na međunarodnom i nacionalnom nivou.

Pored bavljenja naučnoistraživačkim radom, Pavle Jovanov se dugi niz godina uspešno bavi veslanjem, predstavljajući našu zemlju i Univerzitet u Novom Sadu na mnogim domaćim i međunarodnim takmičenjima.



Poglavlje 9

KLJUČNA DOKUMENTACIJA

UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	M.Sc. Pavle Jovanov
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Dr Valerija Gužvanj (Valéria Guzsvány), vanredni profesor
Naslov rada: NR	Optimizacija metoda ekstrakcije i određivanja neonicotinoida tečnom hromatografijom u odabranim uzorcima
Jezik publikacije: JP	Srpski (latinica)
Jezik izvoda: JI	srp. / eng.
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Autonomna Pokrajina Vojvodine
Godina: GO	2014

Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Departman za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, Prirodno matematički fakultet, Trg D. Obradovića 3, Novi Sad

Fizički opis rada: FO	(broj poglavlja 10/ stranica 190/ slika 66/ tabela 42 / referenci 300)
Naučna oblast: NO	Hemija
Naučna disciplina: ND	Analitička hemija
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	tečna hromatografija visoke efikasnosti sa MS/MS i DAD, neonikotinoidi, analiza, ekstrakcija (DLLME i QuEChERS), RSM, med, liker od meda, višezidne ugljenične nanocevi, voda
UDK	
Čuva se: ČU	U biblioteci Departmana za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, PMF, Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 3
Važna napomena: VN	Nema

Izvod:

IZ

Insekticidi novije generacije, neonikotinoidi, odlikuju se specifičnim načinom delovanja na nervni sistem insekata. Radi dobijanja što brže i kvalitetnije informacije o izloženosti životne sredine ovim insekticidima i količinama njihovih ostataka u hrani potrebno je raspolagati odgovarajućim instrumentalnim metodama za njihovo određivanje. Razvijene su i optimizovane analitičke metode zasnovane na tačnoj hromatografiji za određivanje sedam odabranih neonikotinoidea (dinotefurana, nitenpirama, tiametoksama, klotianidina, imidakloprida, acetamiprida i tiakloprida) u medu i liker od meda. Ispitivana je mogućnost određivanja klotianidina pomoću tačne hromatografije visoke efikasnosti sa detektorom od niza dioda (HPLC-DAD) primenom kombinacije tačno-tečne i ekstrakcije na čvrstoj fazi iz uzoraka meda. Na osnovu preliminarnih rezultata može se zaključiti da korišćenje faznih-čvrsto kolona u kombinaciji sa tačno-tečnom ekstrakcijom dihlormetanom rezultira prihvatljivim prinosom klotianidina u uzorcima meda pri koncentraciji od oko 0,5 $\mu\text{g g}^{-1}$ klotianidina. Radi dobijanja većih prinosa odabrana je disperzna tačno-tečna mikroekstrakcija (DLLME) kao tehnika pripreme uzoraka meda. Testirana je upotreba acetonitrila kao disperznog sredstva. Pored hloroforma, korišćen je i dihlormetan kao drugo ekstrakciono sredstvo, kako bi se uporedila efikasnost ekstrakcije. Zabeleženi su prinosi klotianidina od 69,7 i 68,3% u zavisnosti da li je korišćen hloroform, odnosno DHM kao rastvor za ekstrakciju. Može se zaključiti da je prinos ekstrakcije bio povoljniji pri odnosu 0,5 mL ACN i 2,0 mL DHM. Prinosi su se kretali od 68,4% do 92,1%, što je ukazalo da su parametri DLLME ekstrakcije

optimalni. Kako bi se detaljnije ispitali ključni parametri DLLME tehnike, korišćena je metodologija površine odziva (RSM), kao i detekcija na osetljivijem kuplovanom masenom detektoru (MS/MS). Optimizovani su HPLC-MS/MS parametri kako bi se obezbedilo zadovoljavajuće hromatografsko razdvajanje i niske granice detekcije (GD, 0,5–1,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$) i određivanja (GO, 1,0–2,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$) ispitivanih neonikotinoidea u medu. Upotrebom centralno kompozitnog dizajna konstruisani su kvadratni modeli ispitivanih faktora: zapremine ekstrakcionog (DHM, 1,0–3,0 mL) i disperznog (ACN, 0,0–1,0 mL) sredstva, izračunati statistički parametri i optimizovan proces DLLME upotrebom *Derringer*-ove funkcije poželjnih odgovora. Upotrebom MMC i SC krivih u opsegu GO–100,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ ispitan je uticaj matriksa pri čemu zaključeno je da je najveći uticaj matriksa bio na odziv analitičkog signala nitenpirama, dinotefurana i klotianidina. Ispitani su prinosi odabranih neonikotinoidea (R, 74,3–113,9%), kao i preciznost metode u uslovima ponovljivosti (RSD, 2,74–11,8%) i intermedijerne reproduktivnosti (RSD, 6,64–16,2%). Brza (retenciona vremena 1,5–9,9 min) i osetljiva metoda, koja troši malu količinu rastvarača, primenjena je za ispitivanje 15 realnih uzoraka meda različitog cvetnog porekla. Rezultati su pokazali da ispitivani med nije sadržao ostatke ispitivanih neonikotinoidea u koncentracijama iznad GD. Dalje istraživanje je bilo usmereno ka razvijanju i optimizaciji HPLC-DAD analitičke metode upotrebom DLLME i QuEChERS tehnika za pripremu uzoraka za određivanje 7 neonikotinoidea u uzorcima meda. U ovom delu istraživanja optimizovani su i hromatografski parametri, upotrebom RSM sa *Box-Behnken*-ovim dizajnom i *Derringer*-ovom funkcijom poželjnih odgovora. Od ispitivanih neonikotinoidea dinotefuran i imidakloprid su bili u najvećoj meri izloženi uticaju matriksa, bez obzira na proceduru pripreme uzoraka. Može se istaći da je uticaj matriksa na analitički signal dinotefurana bio izraženiji u slučaju MS/MS, apostrofirajući manju robusnost ove metode određivanja. Prinosi neonikotinoidea su bili (R, 73,1–118,3%), preciznost u uslovima ponovljivosti (RSD, 3,28–10,40%) i intermedijerne reproduktivnosti (RSD, 6,45–17,70%), a granice detekcije (GD, 1,5–2,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$) i određivanja (GO, 5,0–10,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$). Metoda je primenjena za ispitivanje 7 neonikotinoidea u 104 uzorka meda različitog cvetnog porekla sa teritorije Autonomne Pokrajine Vojvodine. Detektovano je prisustvo tiakloprida, imidakloprida i tiametoksama u količinama koje su bile ispod MDK RS i EU. Analizirani su uzorci likera od meda - medice. Upoređivane su dve tehnike pripreme uzoraka, DLLME i QuEChERS i primenjeni optimizovani hromatografski uslovi i MS/MS parametri. U slučaju nitenpirama, dinotefurana i tiametoksama uticaj matriksa bio je najizraženiji. Metoda je validovana određivanjem prinosa neonikotinoidea (R, 69,2–113,4%), preciznosti u uslovima ponovljivosti (RSD, 3,21–12,81%) i intermedijerne reproduktivnosti (RSD, 9,11–16,63%), kao i granice detekcije (GD, 0,5–2,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$) i određivanja (GO, 1,0–10,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$). Analizom 10 komercijalno dostupnih likera od meda otkriveno je prisustvo klotianidina i tiakloprida, što ukazuje na neophodnost daljeg kontrolisanja ovog proizvoda na prisustvo neonikotinoidea. Ispitana je mogućnost uklanjanja odabranih neonikotinoidea (dinotefurana, klotianidina i tiakloprida) iz vodene sredine (reke Dunav). Ispitivanje efikasnosti 6 različitih vrsta uklanjanja odabranih neonikotinoidea (u prisustvu prirodne insolacije u laboratorijskim uslovima, sa dodatkom H_2O_2 , sa dodatkom MWCNT, sa dodatkom $\text{MWCN}+\text{H}_2\text{O}_2$, sa dodatkom Fe-MWCNT, sa

	<p>dodatkom Fe-MWCNT+H₂O₂) vršeno je upotrebom prethodno razvijene HPLC-MS/MS metode. Krive uklanjanja odabranih neonikotinoidea, pokazale su da tokom 60 minuta pri prirodnoj insolaciji u laboratorijskim uslovima koncentracija smanjenje oko 25%. Analitički signal dinotefurana dobijen u prisustvu H₂O₂ pod istim uslovima ukazuje na uklanjanje ciljnog analita od oko 40%, tiakloprida od oko 70%, a klotianidina u potpunosti. Testirana je adsorpcija ciljnog analita na višezidnim ugljeničnim nanocevima (MWCNT). Ovim postupkom može da se ukloni oko 30% dinotefurana, oko 50% klotianidina i 60% tiakloprida. U kombinaciji sa H₂O₂, MWCNT pokazuju bolju sposobnost uklanjanja za 15–50% u zavisnosti od ispitivanog neonikotinoidea. Upotreba Fe-MWCNT i njihova kombinacija sa H₂O₂ otvorila je mogućnost za dalja ispitivanja mehanizma uklanjanja. Ustanovljeno je nastajanje intermedijera kojima odgovaraju <i>m/z</i> od 117,5 i 140,6 u slučaju razgradnje dinotefurana u sistemima sa H₂O₂, MWCNT+H₂O₂, Fe-MWCNT+H₂O₂ i klotianidina u sistemu Fe-MWCNT+H₂O₂.</p>
Datum prihvatanja teme od strane NN veća: DP	22.05.2013.godine na 10. sednici NN veća PMF-a
Datum odbrane: DO	
Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO	<p>predsednik: dr Biljana Abramović, redovni profesor, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu;</p> <p>mentor: dr Valerija Gužvanj (Valéria Guzsvány), vanredni profesor, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu;</p> <p>član: dr Dejan Orčić, docent, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu;</p> <p>član: dr Sanja Lazić, redovni profesor, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu;</p> <p>član: dr Marijana Sakač, naučni savetnik, Naučni institut za prehrambene tehnologije, Univerzitet u Novom Sadu;</p> <p>član: dr Mladen Franko, redovni profesor, Univerzitet u Novoj Gorici, Slovenija.</p>

Chapter 10

Poglavlje 10

KEY WORD DOCUMENTATION

University of Novi Sad
Faculty of Science
Key word documentation

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	Doctoral Thesis
Author: AU	Pavle Jovanov, MSc
Mentor: MN	Dr. Valerija Gužvanj (Valéria Guzsvány), Associate Professor
Title: TI	Optimization of extraction and determination of neonicotinoids using liquid chromatography in selected samples
Language of text: LT	Serbian (Latin alphabet)
Language of abstract: LA	eng. / srp.
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	Autonomous Province of Vojvodina
Publication year: PY	2014
Publisher: PU	Author' reprints
Publication place: PP	Novi Sad, Department of Chemistry, Biochemistry and Environmental Protection, Faculty of Sciences, Trg Dositeja Obradovića 3
Physical description: PD	(chapters 10/ pages 190 2/ pictures 66/ tables 42 /literature 300)

Scientific field SF	Chemistry
Scientific discipline SD	Analytical chemistry
Subject, Key words SKW	High performance liquid chromatography with DAD and MS/MS, neonicotinoids, analysis, extraction (DLLME and QuEChERS), RSM, honey, honey liqueur, multiwalled carbon nanotubes, water
UC	
Holding data: HD	In the Library of Department of Chemistry, Biochemistry and Environmental Protection, Faculty of Sciences, Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 3
Note: N	No
Abstract/Summary AB	<p>Neonicotinoid insecticides, as one of the fastest growing new generation of insecticides, have contributed to a significant reduction of toxicity for the environment; therefore, monitoring and determination of trace levels of the neonicotinoids in honey are necessary and demands highly efficient, selective and sensitive analytical techniques. The objective of the present work was to develop a rapid, sensitive, optimized and accurate analytical method based on liquid chromatography for determining seven neonicotinoid insecticides, dinotefuran, nitenpyram, thiamethoxam, clothianidin, imidacloprid, acetamiprid and thiacloprid in honey and honey liqueur samples. The possibility for determination of clothianidin in honey samples was investigated by HPLC with a diode array detector (HPLC-DAD). Based on preliminary results, it can be concluded that the use of a solid-phase column in combination with a liquid-liquid extraction with dichloromethane results in an acceptable recovery of clothianidin in the samples with a clothianidin concentration of about $0.5 \mu\text{g g}^{-1}$. After obtaining low recovery of clothianidin, dispersed liquid-liquid microextraction (DLLME) was selected as a technique for the preparation of honey samples.. The adequacy of acetonitrile as a dispersing agent was investigated. Besides the chloroform, a dichloromethane was used as a second extracting agent, in order to compare the relative efficiency of the extraction solvents. It can be concluded that the extraction recovery (68.4–92.1%) was more favorable with the use of 0.5 mL ACN and 2.0 mL DHM. Furthermore, LC-MS/MS parameters were optimized to unequivocally provide good chromatographic separation, low detection (LOD, $0.5\text{--}1.0 \mu\text{g L}^{-1}$) and quantification (LOQ, $1.0\text{--}2.5 \mu\text{g L}^{-1}$) limits for acetamiprid, clothianidin, thiamethoxam, imidacloprid, dinotefuran, thiacloprid and nitenpyram in honey samples. Using different types (chloroform, dichloromethane) and volumes of extraction (1.0–3.0 mL) and dispersive (acetonitrile; 0.0–1.0 mL) solvent and by mathematical modeling it was possible to establish the optimal sample preparation procedure. Matrix-matched calibration and blank honey sample spiked in the</p>

concentration range of LOQ–100.0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ were used to compensate the matrix effect and to fulfill the requirements of SANCO/12495/2011 for the accuracy (R 74.3–113.9%) and precision (expressed in terms of repeatability (RSD 2.74–11.8%) and within-laboratory reproducibility (RSDs 6.64–16.2%)) of the proposed method. The rapid (retention times 1.5–9.9 min), sensitive and low solvent consumption procedure described in this work provides reliable, simultaneous, and quantitative method applicable for the routine laboratory analysis of seven neonicotinoid residues in 15 real honey samples. Neonicotinoid residues were not detected in any of the investigated samples. The objective of next study was to develop and optimize HPLC-DAD analytical method with dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) and QuEChERS sample preparation procedures for the simultaneously analysis of seven neonicotinoids in honey samples. The liquid chromatographic conditions were optimized by response surface methodology with *Box-Behnken* design and the global *Derringer's* desirability. The optimized method was validated to fulfill the requirements of SANCO/12495/2011 standard for both sample pretreatment procedures providing results for accuracy (R, 73.1–118.3%), repeatability (RSD, 3.28–10.40%) and within-laboratory reproducibility (RSD, 6.45–17.70%), limits of detection (LOD, 1.5–2.5 $\mu\text{g kg}^{-1}$) and quantification (LOQ, 5.0–10.0 $\mu\text{g kg}^{-1}$). For the first time, more than 100 honey samples collected from all 7 counties of Autonomous Province of Vojvodina were analyzed. The presence of thiacloprid, imidacloprid and thiametoxam was discovered in a small number of samples. The objective of next study was to develop an optimized LC-MS/MS analytical method with DLLME and QuEChERS procedures for analysis of 7 neonicotinoids in honey liqueur. The method was validated to fulfill the requirements of SANCO/12495/2011 for both sample pretreatment procedures providing results for accuracy (R, 69.2–113.4% for DLLME; 71.8–94.9% for QuEChERS), precision (RSD expressed in terms of repeatability (3.21–10.20% for DLLME; 4.19–12.81% for QuEChERS) and within-laboratory reproducibility (9.11–16.63% for DLLME; 11.32–16.40% for QuEChERS)), limits of detection (LOD, 0.5–1.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ for DLLME; 1.0–2.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ for QuEChERS) and quantification (LOQ, 1.0–5.0 $\mu\text{g L}^{-1}$ for DLLME; 2.5–10.0 $\mu\text{g L}^{-1}$ for QuEChERS). Analysis of real honey liqueur samples obtained from local markets showed the presence of clothianidin or thiacloprid in four of the analyzed samples, therefore implicating the necessity of ongoing control of this type of traditional product. Removal of selected neonicotinoid insecticides - dinotefuran, clothianidin and thiacloprid using MWCNT and H_2O_2 from Danube water matrix was investigated. Efficiency of different systems for neonicotinoids removal (under natural insolation in laboratory, with H_2O_2 , with MWCNT, with MWCNT+ H_2O_2 , with Fe-MWCNT, with Fe-MWCNT+ H_2O_2) was evaluated with developed LC-MS/MS method. Analysis of degradation rates revealed loss of 25% of the initial neonicotinoid concentration under natural insolation in the laboratory conditions during 60 min. Addition of chemical agent H_2O_2 promoted loss of 40% of the initial dinotefuran, 70% of thiacloprid concentration and total removal of clothianidin under same conditions. With the addition of MWCNT concentration of dinotefuran, clothianidin and thiacloprid decayed for 30, 50 and 60%, respectively. Iron modification of MWCNT in combination with H_2O_2 increased the removal rate of selected neonicotinoid for 15–50%. Presence of intermediates was

discovered in systems of dinotefuran with H ₂ O ₂ , MWCNT+H ₂ O ₂ , Fe-MWCNT+H ₂ O ₂ and of clothianidin in systems with Fe-MWCNT+H ₂ O ₂ with <i>m/z</i> of 117,5 and 140,6.	
Accepted on Scientific Board on: AS	22.05.2013.
Defended: DE	
Thesis Defend Board: DB	<p>president: dr Biljana Abramović, Full Professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad;</p> <p>mentor: dr Valerija Gužvanj (Valéria Guzsvány), Associate Professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad;</p> <p>member: dr Dejan Orčić, Assistant Professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad;</p> <p>member: dr Sanja Lazić, Full Professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad;</p> <p>member: dr Marijana Sakač, Principal research fellow, Institute of Food Technology, University of Novi Sad;</p> <p>member: dr Mladen Franko, Full Professor, University of Nova Gorica, Slovenia.</p>

