

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ  
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ

Бојана Д. Шпировић Трифуновић

**ИСТОВРЕМЕНО ОДРЕЂИВАЊЕ  
ОХРАТОКСИНА А И ОСТАКА  
ПЕСТИЦИДА У ГРОЖЂУ И ВИНУ  
LC-MS/MS ТЕХНИКОМ**

Докторска дисертација

Београд, 2019. године

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF AGRICULTURE

Bojana D. Špirović Trifunović

**SIMULTANEOUS DETERMINATION OF  
OCHRATOXIN A AND PESTICIDE  
RESIDUES IN GRAPES AND WINE BY  
LC-MS/MS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019

Пољопривредни факултет - Београд

Ментор први:                    др Драгица Бркић, ванредни професор  
Универзитет у Београду - Пољопривредни факултет

Ментор други:                    др Горица Вуковић, научни сарадник  
Градски завод за јавно здравље, Београд

Чланови комисије:            др Сања Лазић, редовни професор  
Универзитет у Новом Саду - Пољопривредни факултет

др Љиља Торовић, ванредни професор  
Универзитет у Новом Саду - Медицински факултет

др Драгослав Иванишевић, ванредни професор  
Универзитет у Новом Саду - Пољопривредни факултет

**Датум одбране:**

*Неизмерну захвалност дугујем менторима проф. др Драгици Бркић и др Горици Вуковић на несебичној помоћи, подршци, разумевању, стрпљењу и усмеравању у свим фазама израде дисертације, и знању које су ми преносиле свих ових година.*

*Веома сам захвална проф. др Сањи Лазић за ангажовање, стручну помоћ и сугестије током израде и писања дисертације.*

*Најсрдачније захваљујем проф. др Љиљи Торовић на корисним саветима, примедбама и стручној помоћи приликом израде и писања дисертације.*

*Захвална сам проф. др Драгославу Иванишевићу за помоћ око узорковања грозђа и вина са огледног добра Пољопривредног факултета, УН у Новом Саду, Сремски Карловци.*

*Захвалност дугујем и проф. др Војислави Бурсић за помоћ приликом планирања дисертације.*

*Велику захвалност дугујем колегама са Катедре за пестициде и хербологију, посебно шефу катедре проф. др Сави Врбничанин за несебичну помоћ и подршку у току израде докторске дисертације. Такође, захвална сам и колегама са Института за фитомедицину, посебно директору проф. др Оливери Петровић-Обрадовић и проф. др Алекси Обрадовићу за материјалну помоћ, стрпљење и разумевање. Хвала колегама из Хемијске лабораторије за пестициде и студенту Алекси Јовановићу за помоћ приликом припреме узорака. Захвална сам Младену Калајцићу, докторанду, за помоћ приликом узорковања грозђа и вина у Сремским Карловцима.*

*Захваљујем се др Бранислави Сивчев, проф. у пензији на помоћи приликом проналажења локалитета за узорковање грозђа и вина и на корисним сугестијама приликом писања дисертације.*

*Захвална сам Владимиру Зечевићу, заменику директора огледног добра Пољопривредног факултета, БУ, Радмиловац, Милану Митровићу из Мале Сугубине, Верку Качаревићу из Тополе, Кости Ботуњцу из Доњег Злегиња, Браниславу Анђелићу из Заклопаче, винарији Пантић из Младеновца и Снежги Ивовић из Копљара на сарадњи и на обезбеђивању узорака грозђа и вина који су анализирани током израде ове докторске дисертације.*

*Неизмерну захвалност дугујем мојој породици и пријатељима за љубав, подршку и стрпљење које су ми несебично пружали свих ових година.*

# ИСТОВРЕМЕНО ОДРЕЂИВАЊЕ ОХРАТОКСИНА А И ОСТАКА ПЕСТИЦИДА У ГРОЖЉУ И ВИНУ LC-MS/MS ТЕХНИКОМ

## РЕЗИМЕ

Развијена је брза, селективна и осетљива течна-хроматографска метода са масеном спектрометријом (LC-MS/MS) за истовремено квантитативно одређивање остатака 41 активне супстанце пестицида и охратоксина А (ОТА) у грожљу и вину. Због повећања осетљивости масеног спектрометра за испитиване анализе постављена мултирезидуална метода (MRM) је пребачена у временски сегментисану методу, тзв. методу у динамичком моду (dMRM). Екстракција и пречишћавање анализата из узорака грожђа и вина су рађене модификованом Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) методом. За анализу ОТА ацетонитрилни екстракт је директно анализиран LC-MS/MS техником, док је пречишћавање екстракта за анализу остатака рађено помоћу колоне за дисперзију на чврстој фази за пигментисане узорке (црно грожђе и црвено вино) и за воће и поврће (бело грожђе и бело вино).

За детекцију ОТА услови масеног спектрометра су оптимизовани у циљу повећања селективности избором јона са најосетљивијим одговором ( $m/z$  404  $\rightarrow$  239 и  $m/z$  404  $\rightarrow$  221) за квантификацију и идентификацију. За детекцију активних супстанци пестицида аквизициони параметри масеног спектрометра, SRM прелази, фрагментационе енергије и колизионе енергије су преузете из базе података.

У циљу развоја методе испитани су параметри линеарност одговора детектора, граница детекције (LOD), граница мерења (LOQ), матрикс ефекат, тачност, прецизност и поузданост, а добијене вредности су упоређене са критеријумима Уредбе 401/2006 за ОТА и SANTE/11813/2017 документа за активне супстанце пестицида. Линеарност методе за остатаке у грожљу и вину је испитивана у мобилној фази и матриксима узорака (0,005 до 0,500 mg/kg) и методом стандардног додатка (0,010 - 0,200 mg/kg). Коефицијенти корелације, за већину активних супстанци пестицида у сва четири матрикса, били су већи од 0,99.

Провера линеарности одговора детектора за ОТА је испитивана у ацетонитрилу и матриксима грозђа (0,001 - 0,050 µg/ml) и у ацетонитрилу и матриксима вина (0,0005 - 0,010 µg/ml). Такође, и за ОТА је одређивана линеарност методом стандардног додатка у грозђу (2 - 20 µg/kg) и вину (1,00 - 10,00 µg/kg). Коефицијенти корелације су за све калибрационе криве били већи од 0,99. Утврђено је да матрикси грозђа и вина имају велики утицај на већину испитиваних анализа, те су за њихову квантификацију коришћене калибрационе криве добијене методом стандардног додатка. Границе мерења за активне супстанце пестицида у матриксима грозђа и вина су постављене на најнижем калибрационом нивоу 0,010 mg/kg, док је та вредност за ОТА у грозђу износила 2 µg/kg, а у вину 1 µg/kg. Границе детекције у свим матриксима, за активне супстанце пестицида су биле у опсегу од 0,01 до 8,99 µg/kg, а за ОТА од 0,33 - 0,5 µg/kg. Тачност методе за одређивање активних супстанци пестицида је испитивана обогаћивањем узорака на нивоима 0,01; 0,025; 0,05 и 0,10 mg/kg у три понављања, при чему је за већину пестицида задовољен критеријум SANTE/11813/2017 документа (70 - 120%) са релативном стандардном девијацијом мањом од 20%. Принос екстракције за ОТА у грозђу је испитивана на концентрационим нивоима 2, 5, 10 и 20 µg/kg, а у вину на концентрационим нивоима 1, 2, 5 и 10 µg/kg, у три понављања, а добијене вредности су биле у сагласности са захтевима Уредбе 401/2006 (тачност 70 - 110%; поновљивост  $RSDr \leq 20\%$ ).

Узорци винског грозђа и вина за анализу на остатке и присуство ОТА су узорковани са 11 локалитета који се налазе у осам различитих виногорја у Републици Србији. Анализирано је укупно 250 узорака црног и белог винског грозђа у којима је детектовано 20 активних супстанци пестицида (азоксистробин, боскалид, бупрофезин, цимоксанил, ципродинил, дифеноконазол, диметоморф, фенхексамид, флудиоксонил, флутриафол, ипродион, крезоксим метил, металаксил, миклобутанил, пропиконазол, пиракlostробин, приметанил, квиноксифен, спироксамин, тебуконазол). Добијене вредности су биле веће од законски дефинисаних максимално дозвољених количина (МДК) за винско грозђе за следеће активне супстанце: дифеноконазол, пропиконазол и тебуконазол. У 160 анализираних узорака црвеног и белог вина детектовано је 13

активних супстанци пестицида (азоксистробин, боскалид, ципродинил, дифенокназол, диметоморф, фенхексамид, крезоксим метил, металаксил, миклобутанил, пропиконазол, пиракlostробин, пириметанил, тебуконазол). Пропиконазол и тебуконазол су детектовани у количинама које су веће од МДК вредности за вино. Охратоксин А је детектован само у једном узорку црвеног вина и то испод МДК вредности од 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

На основу добијених резултата урађена је процена изложености популације остацима пестицида, односно охратоксину А из грозђа и вина. Присуство остатака и ОТА у грозђу у концентрацијама утврђеним у овом раду представља прихватљив ризик за популацију у Републици Србији, осим у случају грозђа са остацима дифенокназола и тебуконазола у концентрацијама које су веће од МДК вредности, чији унос представља неприхватљив ризик за одојчад, адолесценте и одрасле. Присуство остатака пестицида и ОТА у вину у концентрацијама утврђеним у овом раду представља прихватљив ризик за одраслу популацију.

**Кључне речи:** остаци пестицида, охратоксин А, QuEChERS, LC-MS/MS, грожђе, вино, процена ризика

**Научна област:** Биотехничке науке

**Ужа научна област:** Пестициди

**УДК:**



## **SIMULTANEOUS DETERMINATION OF OCHRATOXIN A AND PESTICIDE RESIDUES IN GRAPES AND WINE BY LC-MS/MS**

### **ABSTRACT**

A fast, selective and sensitive reversed-phased liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) method was developed and validated for simultaneous quantification of 41 pesticide residues and ochratoxin A (OTA) in grapes and wine. For increasing sensitivity of mass spectrometer multiple reaction monitoring (MRM) was transferred into time segmented method, dynamic multiple reaction monitoring (dMRM). Grape and wine extraction and purification for both, pesticide residues and OTA, were performed with a modified Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) method. For OTA LC-MS/MS analysis acetonitrile extract was directly injected into system, and for pesticide analysis extracts were purified with dispersive solid phase extraction for pigmented samples (black grapes and red wine) and for fruits and vegetables (white grapes and wine).

MS/MS conditions were optimized in order to increase selectivity, selecting the corresponding product ions (precursor-to-fragment  $m/z$  404  $\rightarrow$  239 and  $m/z$  404  $\rightarrow$   $m/z$  221) for quantification and identification. For pesticide residues, MS/MS acquisition parameters, SRM transitions, fragment and collision energies, from database were used.

For method validation, the performance of the method was assessed and compared with the European Commission (EC) Regulations 401/2006 for OTA and with the SANTE/11813/2017 document for pesticide residues, by studying the linearity, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), matrix effect, accuracy and precision. Linearity for quantification pesticide residues in grapes and wine was performed in mobile phase and in sample matrixes (0.005 – 0.500 mg/kg) and by standard addition (0.010 – 0.200 mg/kg). Correlation coefficients for most pesticides, in all four matrixes, were over 0.99. Linearity for OTA quantification in grapes was performed in acetonitrile and in the sample matrixes (0.001 – 0.050  $\mu\text{g/ml}$ ) and in acetonitrile and in wine matrixes (0.0005 – 0.010  $\mu\text{g/ml}$ ). Also for OTA, linearity was performed by standard addition method in grapes (2 - 20  $\mu\text{g/kg}$ ) and in wine (1.00 – 10.00  $\mu\text{g/kg}$ ). All

correlation coefficients were over 0,99. Grapes and wine matrix effects were significant for nearly all pesticides and OTA; so quantification was done using standard addition calibration curves. Limit of quantification for pesticide residues in grapes and wine was set at lowest calibration level of 0.010 mg/kg; LOQ for OTA in grapes was 2 µg/kg, and in wine 1 µg/kg. Limits of detection in all matrixes for pesticide residues were in range from 0.01 – 8.99 µg/kg, and for OTA 0.33 – 0.5 µg/kg. Accuracy for pesticide residues was obtained via the recovery determinations at four different spiked concentrations 0.01; 0.025; 0.05 and 0.10 mg/kg, with three replicates at each concentration, and for most pesticides recoveries were in accordance with SANTE/11813/2017 document (70 - 120%), with relative standard deviations below 20%. Recovery experiments for OTA in grapes were carried out by spiking blank grape samples with OTA, at concentrations of 2, 5, 10 and 20 µg/kg, and blank wine samples, at concentrations of 1, 2, 5 and 10 µg/kg, in three replicates. Results were in accordance with the target values established by Commission Regulation (EC) No. 401/2006 (accuracy 70 - 110%; repeatability  $RSDr \leq 20\%$ ).

Wine grapes and wine, for pesticide residue analysis and occurrence of OTA, were sampled from eleven different localities, from eight different vineyard areas in Republic of Serbia. Totally, 250 black and white wine grape samples were analyzed, and 20 different pesticide residues were detected and quantified (azoxystrobin, boscalid, buprofezin, cymoxanil, cyprodinil, difenconazole, dimethomorph, fenhexamid, fludioxonil, flutriafol, iprodione, kresoxim-methyl, metalaxyl, myclobutanil, propiconazole, pyraclostrobin, pyrimethanil, quinoxyfen, spiroxamine, tebuconazole). Above the maximum residue levels detected pesticide residues were difenconazole, propiconazole and tebuconazole. In 160 analyzed red and white wine samples 13 pesticide residues were detected (azoxystrobin, boscalid, cyprodinil, difenconazole, dimethomorph, fenhexamid, kresoxim-methyl, metalaxyl, myclobutanil, propiconazole, pyraclostrobin, pyrimethanil, tebuconazole). Propiconazole and tebuconazole were detected over the maximum residue levels. Ochratoxin A was detected in only one red wine variety below maximum allowable concentration limit of 2 µg/kg.

Risk assessment for the consumer health, from pesticide residues and OTA, through grape and wine consumption was calculated based on the data obtained in present dissertation. Based on pesticide residues concentrations, the risk was considered

acceptable for consumers in Republic of Serbia; except in case of grapes with difenoconazole and tebuconazole residues in concentrations over MRLs, where the risk was not acceptable for infants, children and adults. The risk for adults from the pesticide residues and OTA through wine consumption is acceptable.

**Keywords:** pesticide residues, ochratoxin A, QuEChERS, LC-MS/MS, grapes, wine, risk assessment

**Area of science:** Agricultural sciences

**Specific field:** Pesticide science

**UDC:**

## Садржај

1. Увод.....	1
2. Преглед литературе.....	5
2.1. Виноградарство.....	5
2.2. Охратоксин А.....	6
2.2.1. Појава охратоксина А у грозђу и вину.....	9
2.2.2. Анализа охратоксина А у намирницама.....	16
2.3. Остаци пестицида.....	20
2.3.1. Присуство остатака активних супстанци пестицида у грозђу и вину.....	21
2.3.2. Анализа остатака активних супстанци пестицида у грозђу и вину.....	24
3. Циљеви истраживања.....	28
4. Материјал и методе.....	30
4.1. Коришћене хемикалије.....	30
4.2. Коришћена опрема.....	32
4.3. Узорковање.....	33
4.4. Припрема основних и радних раствора.....	38
4.5. Припрема узорака.....	38
4.6. Хроматографска метода.....	39
4.7. Параметри валидације.....	40
4.8. Процена изложености популација.....	44
4.8.1. Методологија за процену изложености.....	44
4.8.2. Улазни елементи.....	44
4.8.3. Процена изложености популација активним супстанцама пестицида и охратоксину А преко грозђа и вина.....	45
4.8.4. Процена ризика.....	47
5. Резултати рада.....	49
5.1. Оптимизација услова за одређивање охратоксина А.....	49
5.1.1. Линеарност одзива детектора за охратоксин А.....	51
5.1.2. Границе детекције и мерења за охратоксин А.....	53
5.1.3. Тачност и прецизност за охратоксин А.....	54
5.1.4. Анализа узорака винског грозђа и сортних вина на присуство охратоксина А.....	56

5.2. Оптимизација услова за одређивање остатака активних супстанци пестицида.....	60
5.2.1. Линеарност одзива детектора за активне супстанце.....	66
5.2.2. Границе детекције и мерења за испитиване активне супстанце пестицида у грозђу и вину.....	72
5.2.3. Тачност и прецизност за активне супстанце пестицида.....	74
5.2.4. Анализа узорака на остатке активних супстанци пестицида.....	81
6. Дискусија .....	98
6.1. Анализа охратоксина А .....	98
6.1.1. Оптимизација услова масеног спектрометра за детекцију охратоксина А.....	98
6.1.2. Валидациони параметри одређивања охратоксина А у грозђу и вину.....	99
6.1.3. Анализа узорака винског грозђа и сортног вина.....	105
6.1.4. Процена изложености популација охратоксину А преко грозђа.....	108
6.1.5. Процена изложености популација охратоксину А преко вина.....	110
6.1.6. Могућности уклањања охратоксина А из вина.....	111
6.2. Анализа остатака активних супстанци пестицида.....	113
6.2.1. Одабир пестицида и оптимизација услова за одређивање остатака пестицида.....	113
6.2.2. Остаци активних супстанци пестицида у узорцима винског грозђа и сортних вина.....	126
6.2.3. Процена изложености популација активним супстанцама пестицида преко грозђа.....	145
6.2.4. Процена изложености популација активним супстанцама пестицида преко вина.....	148
7. Закључак .....	152
8. Литература .....	157
ПРИЛОЗИ.....	181
БИОГРАФИЈА .....	196
ИЗЈАВЕ.....	198

## 1. Увод

Пестициди су, у највећем броју случајева, синтетичке биолошки активне супстанце, намењене да спрече или ограниче штетне ефекте макро и микроорганизама и нежељених биљних врста у заштити биља. Савремена пољопривреда подразумева употребу велике количине пестицида који, након примене, доспевају у животну средину (Corsini, 2013; US EPA, 2013). Према подацима Организације за храну и пољопривреду (ФАО - Food and Agriculture Organization) годишња потрошња пестицида у 2016. години, на светском нивоу, износила је више од четири милиона тона (ФАО, 2018), а код нас, исте године, више од 12 хиљада тона. У Републици Србији је одобрено 250 активних супстанци пестицида, које су формулисане у 1256 различитих средстава за заштиту биља, док је у земљама Европске уније (ЕУ) за примену одобрено 487 активних супстанци и неколико хиљада препарата (ЕЦ, 2018; Друштво за заштиту биља, 2018).

За пестициде се, као групу добро проучених и строго законски регулисаних хемикалија, примењује превентивни приступ процене ризика. То практично значи да се за њих ради врло велики број испитивања која морају, на научној основи, да потврде да испитивана активна супстанца или средство за заштиту биља не штети здрављу људи и животиња и не представља неприхватљив ризик за животну средину. У оквиру бројних испитивања, која се раде пре стављања у промет, налазе се и испитивања везана за остатке пестицида (Регулатива 283/2013), у којима се, између осталог, врши и одређивање максимално дозвољених количина (МДК) остатака активних супстанци пестицида, које представљају максималне законски дозвољене количине остатака у пољопривредним производима, у/на храни и храни за животиње. На нивоу Европске уније МДК су дефинисане Уредбом 396/2005 Европског парламента и Савета, а у нашој земљи Правилником о максимално дозвољеним количинама остатака средстава за заштиту биља у храни и храни за животиње и Правилником о храни и храни за животиње за коју се утврђују максималне количине остатака средстава за заштиту биља („Сл. гласник РС“ 22/18). У Републици Србији се не врши одређивање МДК остатака, већ се ове вредности преузимају из регулативе ЕУ, при чему се усаглашавање углавном врши једном годишње.

У циљу провере МДК, односно остатака пестицида, велика пажња се посвећује развоју метода за њихово брзо и што једноставније одређивање. Како пестициди чине веома хетерогену групу једињења, са различитим хемијским и физичким својствима, и различитом судбином и понашањем у биљкама, не постоји јединствена метода, односно техника њиховог одређивања. Најефикаснији начин анализе остатака пестицида је употреба мултирезидуалних метода (MRM), а најзаступљеније технике су течна и гасна хроматографија са масеним анализаторима (MS/MS, TOF, qTOF, Orbitrap и др). Захваљујући високој селективности и осетљивости детектора, коришћењем ових инструменталних техника, могућа је контрола остатака пестицида у земљишту, води, биљкама, животињама и њиховим производима, без дуготрајног и скупог поступка припреме и пречишћавања узорака.

Због забринутости од присуства остатака пестицида у храни произведеној на конвенционалан начин, последњих година се све већа пажња посвећује органској пољопривредној производњи, која готово потпуно искључује употребу пестицида. Међутим, на нетретираним биљкама, могу да се развијају гљиве и бактерије, повећавајући тако ризик од контаминације плодова токсинима, производима њиховог секундарног метаболизма. Као резултат оба концепта имамо, у првом случају, већу вероватноћу да се у храни произведеној на конвенционалан начин нађу остаци пестицида, а у другом да се у храни произведеној по принципима органске пољопривреде утврди присуство токсина.

Виноградарство је веома значајна пољопривредна грана у Републици Србији, а око 25000 ha у нашој земљи је под виновом лозом, од чега се на 75,7% површина гаје винске сорте, док се стоне гаје на преосталих 24,3% (Иванишевић и сар., 2015). Ако се винова лоза гаји на конвенционалан начин у грожђу и вину могу да се нађу остаци коришћених пестицида (Cabras i Conte, 2001; Ćuš et al., 2010a,b; Savocchia et al., 2004 цит. по Provost i Pedneault, 2016), док се у грожђу и вину гајеном по принципима органске производње могу наћи токсини, пре свега микотоксини (Elmholt i Rasmussen, 2005; Jorgensen, 2005; Juan et al., 2008; Battilani i Samardo, 2015). Најзначајнији микотоксин, који је детектован у грожђу и вину, који изазива највећу забринутост, је охратоксин А (ОТА), токсични метаболит који продукују гљиве из родова *Aspergillus* (као што су *A. ochraceus*, *A.*



*carbonarius*, *A. niger* или *A. flavus*) и *Penicillium* (*P. verrucosum*). По класификацији међународне агенције за испитивање карцинома, класификован је у групу 2Б могућих карциногена за људе, јер постоји довољно података који потврђују његову карциногеност за експерименталне животиње (IARC - International Agency for Research on Cancer, 2017). Поред карциногеног деловања има и нефротоксично, имуносупресивно, репротоксично, хепатотоксично, генотоксично и токсично деловање на раст и развој (Varga et al., 2015). Токсичност ОТА зависи од дозе, а за процену ризика је врло важно знати која се количина овог микотоксина може наћи у грожђу и вину, јер је њихова конзумација, значајан пут изложености људи. Експерти Европске агенције за безбедност хране (EFSA - European Food Safety Authority) су 2006. године израчунали да је *толериснући недељни унос* (Tolerable weekly intake - TWI) ОТА 120 ng/kg телесне масе, а максимална дозвољена количина у грожђу и вину је прописана Регулатором Европске уније Com. Reg. 1881/2006, а у нашој земљи Правилником о максимално дозвољеним количинама остатака средстава за заштиту биља у храни и храни за животиње („Сл. гласник РС“ 22/18).

За екстракцију ОТА из различитих намирница, међу којима су грожђе и вино, постоји неколико метода, а оне укључују екстракцију растварачима, као што су смесе дихлорметана са натријум бикарбонатним пуфером, ацетонитрил - вода, метанол - фосфорна и метанол - мравља киселина, хлороформ и раствор фосфатног пуфера (PBS). За пречишћавање се користи екстракција на чврстој фази преко анјон-измењивачких колона (SAX), силика гела, C<sub>8</sub>, C<sub>18</sub> и имуноафинитетних колона. Детекција и одређивање количине ОТА врши се најчешће помоћу течне хроматографије са флуоресцентним детектором (LC-FLD), течне хроматографије са масеним спектрометром (са једним квадруполом „Single Quadrupole“ LC-MS, или троструким квадруполом, „Triple Quad“ LC-MS/MS), итд. Да би били сигурни да присутна количина остатака пестицида не представља ризик по здравље људи, као и да нема појаве микотоксина, односно да су производи здравствено безбедни, неопходно је спроводити сталну контролу њиховог присуства у биљкама и производима биљног порекла, због чега је потребно развијати поуздане, осетљиве, брзе и селективне методе за њихово одређивање.

Имајући све речено у виду, у овој дисертацији је предвиђен развој и оптимизација методе за истовремену екстракцију и детекцију остатака пестицида и ОТА из истог узорка грожђа, односно вина. Испитивањима су обухваћени фунгициди и инсектициди који су регистровани за примену у виновој лози и који се могу анализирати LC-MS/MS техником. Прегледом литературе утврђено је да нема објављених података о остацима активних супстанци пестицида и ОТА у грожђу и вину, из конвенционалне и органске производње у Републици Србији.

## 2. Преглед литературе

### 2.1. Виноградарство

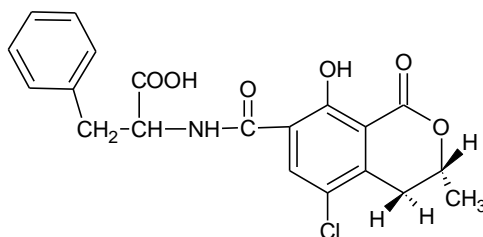
Виноградарство, као пољопривредна грана која се последњих неколико деценија интензивно развија у Републици Србији, веома је значајно са становишта високог приноса по јединици површине, економије, развоја и промоције руралних подручја, посебно брдовитих са песковитим, каменитим и шљунковитим земљиштима, на којима се друге пољопривредне културе не могу успешно гајити, али и запошљавања људи у областима у којима се производе грожђе и вино. Око 22150 ха у нашој земљи је под виновом лозом. У региону Централне Србије највише винограда се налази у реону Три Мораве, а на општинском нивоу на територији општине Трстеник. На 17483 ха, односно 75,7% површина под виноградима, се гаје винске сорте, док се стоне сорте гаје на 4667 ха, односно 24,3% укупних површина (Иванишевић и сар., 2015; Кораћ и сар., 2016).

Винова лоза се пре свега гаји због производње грожђа које садржи велики број значајних састојака: шећера (фруктоза и глукоза), органских киселина (винска, јабучна, лимунска, ћилибарна, оксална, глукуронска и др), минералних материја (К, Са, На, Р, Mg, Fe, S, Cu и др), витамина (А, В, С, Е и др), ароматичних и бојених материја, танина, полифенола, антиоксиданаса (нпр. резерватрол), влакана и др. Преко 80% укупне производње грожђа се прерађује у вино и алкохолна пића, а значајно мање количине се користе као стоно грожђе, за сушење и остале производе (Ostry et al., 2002; Кораћ и сар., 2016).

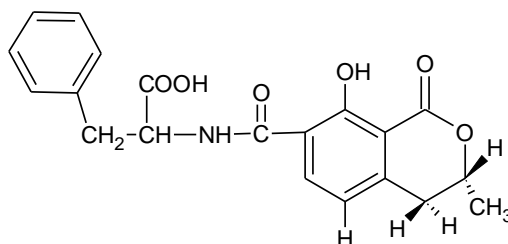
Савремени концепт виноградарске производње, поред правилног избора сортимента и локалитета, као и увођења нових технологија, подразумева и употребу пестицида за заштиту лозе и грожђа од штетних организама и коровских биљака. То практично значи да се у грожђу, али и у вину, могу наћи остаци примењених пестицида, чије су МДК дефинисане важећом законском регулативом („Сл. гласник РС“ 22/18). За контролу остатака пестицида веома је важан развој брзих, поузданих и јефтиних метода одређивања како у грожђу тако и у вину.

## 2.2. Охратоксин А

Микотоксини су секундарни метаболити гљива, који могу контаминирати различите намирнице, и могу деловати токсично на здравље људи и животиња. Прво су откривени афлатоксини, почетком шездесетих година прошлог века, а затим и други микотоксини. Охратоксин А (ОТА) је откривен половином 60-тих година у житарицама. Секундарни је метаболит гљива из рода *Aspergillus* и *Penicillium* као што су *A. ochraceus*, *A. carbonarius*, *A. niger*, *A. welwitschiae*, *P. verrucosum*, *P. nordicum* и др. (Perrone et al., 2006; Frisvad et al., 2007; Cabañes i Bragulat, 2018; Geisen et al., 2018). Охратоксин А или N-[(3R)-(5-хлор-8-хидрокси-3-метил-1-оксо-7-изохроманил)карбонил]-L-фенилаланин) (Слика 1) садржи 7-карбокси-5-хлор-8-хидрокси-3,4-дихидро-(3R)-метилизокумарин (охратоксин α) везан преко карбоксилне групе за L-β-фенилаланин (Тао et al., 2018). Изоловани су и аналози охратоксина А, који такође представљају метаболите гљива, као што су охратоксин Б (дехлоровани аналог охратоксина А, ОТБ) (Слика 2), охратоксин Ц (ОТЦ), охратоксин β (ОТβ), (4-R)- и (4-S)-хидрокси-охратоксин А (4R-ОН ОТА и 4S-ОН ОТА), 4-хидроксиохратоксин Б (4-ОН ОТБ) и 10-хидрокси охратоксин А (10-ОН ОТА). Међутим, ОТА преовлађује у пољопривредним производима и најзначајнији је за безбедност хране (Abrunhosa et al., 2010).



Слика 1. Хемијска структура охратоксина А (C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>O<sub>6</sub>NC<sub>1</sub>, M.W. 403,0823)



Слика 2. Хемијска структура охратоксина Б (C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>O<sub>6</sub>N, M.W. 369,1212)

Њихову структуру чине једињења супституисаног дихидроизокумарина и S-фенилаланина повезаних амидном везом. Охратоксин А је оптички активан молекул са два хирална угљеникова атома. Без обзира што има два диастереоизомерна облика утврђено је да само (S,R) изомер постоји у природи. Такође, велика киселост фенолног протона се објашњава налажењем фенолне групе између две карбонилне групе (pK<sub>a</sub> 7,5) (Varelis et al., 2006; Sorrenti et al., 2013).

Охратоксин А, са CAS бројем 303-47-9, је безбојна кристална супстанца, са две тачке топљења 94 - 96 °C и 169 °C (кристализација из бензена и ксилена, редом). Када се ексцитује ултраљубичастом светлошћу (366 nm) производи зелено-плаву флуоресценцију, што и омогућава његову детекцију и идентификацију танкослојном и течном хроматографијом. Растворљив је у већини органских растварача и воденом раствору натријум бикарбоната, а слабо је растворљив у води. Стабилан је у киселој средини и на високим температурама, а не може се потпуно уклонити из контаминиране хране, чак ни стерилизацијом на високим температурама и при високом притиску. Припада групи складишних микотоксина (Abrunhosa et al., 2010; Durguti et al., 2014).

Инхибитор је ензима, а његов утицај на липидну пероксидацију, преко оксидативног стреса и формирања реактивних врста кисеоника, установљен је као највероватнији узрочник Балканске нефропатије, хроничног и прогресивног обољења бубрега чија етиологија још увек није са сигурношћу расветљена. Ова болест је откривена, педесетих година прошлог века, у селима која се налазе уз притоке реке Дунав у Румунији, Бугарској, Босни и Херцеговини, Србији и Хрватској и може довести и до смрти, а испитивања показују да су незнатно осетљивије жене (Pfohl-Leszkowicz i Manderville, 2007; Stoev, 2017; Tao et al., 2018). По расположивим подацима више од 25 хиљада људи болује од Балканске нефропатије, а процењује се да их је у ризичној групи око 100 хиљада (Stiborová et al., 2016). Утврђено је да ОТА делује тератогено на пацове, мишеве, заморце, пилиће, а хистопатолошким претрагама утврђено је да делује хепато- и нефротоксично (Sorrenti et al., 2013; Durguti et al., 2014). Такође, регистрован је и његов карциногени, имуноксични/имуносупресивни, хепатоксични и генотоксични потенцијал. Такође, ОТА се доводи у везу са хроничном

интерстицијалном нефропатијом и појавом карцинома тестиса и мокраћне бешике (Soufleros et al., 2003; Varga et al., 2015; Paterson et al., 2018). Међународна организација за истраживање канцера (IARC), 1993. године га је сврстала у 2Б групу могућих карциногена за људе, јер постоји довољно података који потврђују његову карциногеност за експерименталне животиње (IARC, 2017). Има могућност инхибиције синтезе протеина, због могућности конкуренције са фенилаланином у реакцији катализованој фенилаланин-tRNA-синтетазом (Fernandes et al., 2013; Tao et al., 2018). Генотоксично деловање потврђено је детекцијом ДНК адукта (Sorrenti et al., 2013; Varga et al., 2015).

Изложеност охратоксину А путем исхране може се пратити анализом његовог присуства у намирницама или индиректно анализом његових маркера у биолошком материјалу (урин, крв и др), али је други начин бољи јер исхрана варира по данима, а самим тим и унос ОТА. Ови подаци су важни за епидемиолошке студије. Након уношења у људски организам може бити дуго постојан, а подаци показују да време полураспада у крви износи 35 дана (Codex Alimentarius Commission, 1998; Sáez et al., 2004).

Препоруку за *привремену толеришућу недељну унос* (Provisional tolerable weekly intake - PTWI) ОТА од 100 ng/kg телесне масе, што одговара количини од 14 ng/kg телесне масе дневно, дали су FAO/WHO, 2004. и JECFA, 2001. године, док је ова вредност у скандинавским земљама знатно нижа и износи 5 ng/kg телесне масе (Codex Alimentarius Commission, 1998). Канадско регулаторно тело је предложило да PTWI износи 1,2 - 5,7 ng/kg телесне масе, узимајући у обзир карциногена, генотоксична и друга токсична својства. Експерти EFSA су 2006. године предложили да *толеришућу недељну унос* (TWI) износи 120 ng/kg телесне масе (EFSA, 2006; Hacz et al., 2007).

Доступно је пуно литературних података о присуству охратоксина А у храни за људе и животиње, као што су житарице и храна на бази житарица, пиво, кафа, пасуљ, какао, суво винско воће (рибизле, суво грожђе и султана - суво азијско грожђе без коштица), суве смокве, вино, сок од грожђа, маслине, ораси, зачини, млеко, свињско месо (посебно јетра и бубрези), јаја, али и у крви људи и мајчином млеку (Czerwiecki et al., 2002a; Blesa et al., 2004b; Elmholt i Rasmussen, 2005; Medina et al., 2006; Bascarán et al., 2007; Toscani et al., 2007; Ghali et al., 2008;

Hernández Hierro et al., 2008; Juan et al., 2008; Shundo et al., 2009; Tam et al., 2011; Soto et al., 2016; Paoloni et al., 2018). Велики допринос изложености људи охратоксину А потиче од конзумације вина, нарочито црвеног (Zimmerli i Dick, 1996; Domijan i Peraica, 2005; Mateo et al., 2007; Paterson et al., 2018). За процену безбедности хране неопходно је пратити његово присуство и количине у намирницама из године у годину јер они варирају, пре свега, у зависности од временских услова.

### 2.2.1. Појава охратоксина А у грозђу и вину

Охратоксин А је микотоксин који се најчешће јавља у грозђу, вину и другим производима од грозђа, као што су сок од грозђа и суво грозђе. До развоја ОТА долази пре свега када су зрна грозђа заражена гљивама *Aspergillus carbonarius* и *Aspergillus niger* пре бербе (Battilani et al., 2006), а оне се могу изоловати из сувих опалих бобица, увенулих изданака, коре и лишћа винове лозе, као и из сасушеног корена. У истраживањима у Аустралији, утврђено је присуство *Aspergillus carbonarius* у површинском слоју земљишта (0 - 10 cm), који потиче са опалих сасушених бобица. Споре се са површине могу пренети ваздухом на гроздове, посебно на оне који су ближи површини земљишта.

Период од зрења до бербе је најкритичнији за контаминацију грозђа овим токсином, а абиотичка или биотичка оштећења бобица омогућавају развој охратоксигених гљива. Абиотичка оштећења укључују претерано наводњавање, оштећења од кише или града, а биотичка могу настати од инсеката и фитопатогених гљива (Hocking et al., 2007), при чему је јасно да је вероватноћа њихове појаве, као последица биотичких оштећења, мала у воћњацима који су правилно и правовремено заштићени одговарајућим инсектицидима и фунгицидима.

Појава ОТА регистрована је широм света о чему сведоче бројни објављени радови. Приликом испитивања микрофлоре у узорцима Chardonnay и Malbec, од гљива које производе ОТА, изоловани су *A. niger* из узорака у Аргентини и *A. niger*, *A. carbonarius* и *A. ochraceus* из узорака у Бразилу. У другом истраживању, које је спроведено 2001. године на пет сорти грозђа у Аргентини, у 70% узорака

су изоловане врсте рода *Aspergillus* и то *A. niger* и *A. flavus*, а ове гљиве су изоловане и из узорака вина. У истраживању које је спроведено у Уругвају од врста рода *Aspergillus* доминантна је била *A. alternaria*, а регистроване су и *Cladosporium clarosporioides* и *Epicoccum purpurascens*. Од *Penicillium* врста најзаступљеније су биле *P. chrysogenum*, *P. minoluteum* и *P. decumbens*, а фитопатогена врста *Botrytis cinerea* је изолована је у време бербе грожђа. Анализирањем 106 узорака из Бразила, Чилеа и Аргентине ОТА је детектован у 29% узорака сока од грожђа у опсегу концентрација од 21 - 100 ng/l, 12,5% узорака пулпе, 24% узорака вина у концентрацијама од 28,3 - 70,7 ng/l, при чему су црвена вина била више контаминирана од розеа и белих вина (Rosa et al, 2002, 2004 цит. по Chulze et al., 2006).

На повећање појаве спора гљива рода *Aspergillus* на грожђу утичу суво и топло време, посебно у јужним деловима Европе и на северу Африке, као и другачији начин узгајања грожђа у односу на север Европе. Грожђе као сиров материјал представља главни извор контаминације за вино и друге производе. Развој спора врсте *Aspergillus carbonarius* се повећава у периоду од појаве бобица до зрења, чему погодује и изложеност UV зрачењу, повећање сочности бобица и количине шећера, као и одлагање бербе зрелих гроздова. Оптимална температура за производњу ОТА је 30 - 35 °C, а оптимална активност воде 0,97 - 0,99. За разлику од спора гљива из рода *Aspergillus* споре врсте *Penicillium verrucosum* се највише развијају у зонама са умереном климом (Ottender i Majerus, 2000; Pietri et al., 2001; Czerwiecki et al., 2002a; Chulze et al., 2006; Hocking et al., 2007). Међутим, споре гљива из рода *Aspergillus* могу и да разграде ОТА до изокумарина, охратоксина  $\alpha$  и фенилаланина (Fernandes et al., 2013). Врсте гљива из рода *Penicillium* утичу на повећање садржаја фенолних једињења у грожђу, док *A. carbonarius* утиче на хидролизу полисахарида (скроб и пектин) (Freire et al., 2017). Постојећи подаци показују да црвена вина садрже више охратоксина А него розе и бела вина, што је последица различитих начина производње (Domijan i Peraica, 2005; Battilani et al., 2006; Mateo et al., 2007). На повећање количине охратоксина А у току процеса прављења вина може утицати натапање покожице грожђа широм, при чему је могућа екстракција ОТА са покожице грожђа, док на смањење количине може утицати ферментација. Развој гљива које производе охратоксин А, највећим делом



почиње после бербе, било због присуства заражених зрна грожђа или због неадекватних услова током складиштења и ферментације (Valero et al., 2008; Fernández-Cruz et al., 2010).

Многа истраживања показују утицај региона на појаву одређених популација гљива којима је грожђе изложено. Главне разлике се односе на појаву и однос између *A. niger*, *Botrytis cinerea* и *Penicillium* врста. У регијама са влажном климом *Botrytis* је главни патоген док је појава *Aspergillus* врста минимална. Главна гљива за појаву трулежи грожђа је *Botrytis cinerea*, а њена појава има утицај на органолептичка својства грожђа. Такође и гљиве из родова *Aspergillus* и *Penicillium* изазивају трулеж и производе микотоксин, а идентификацијом гљива може се предвидети ризик од појаве микотоксина. У свим винским регионима у Португалу најзаступљеније врсте гљива су из родова *Alternaria*, *Botrytis* и *Cladosporium*, а важан удео у микрофлори имају и врсте родова *Aspergillus* и *Penicillium* са 15 и 24% заступљености. Најчесталија врста је *A. niger*, а затим и *A. carbonarius*. *A. niger* је у негативној корелацији са гљивама *B. cinerea* и *A. flavus*, као и са гљивама из родова *Alternaria* и *Cladosporium*. Најјача позитивна корелација је између врста *A. niger* и *A. carbonarius*, а обе врсте се јављају у регијама са топлим и сувом климом, а присуство меланина чини их отпорним на сунчеву светлост (Hocking et al., 2007). Врсте рода *Penicillium* су заступљене у земљишту и у регионима са умерено топлим климом а могу произвести ОТА и на температурама од 5 °C (Serra et al., 2006).

За грожђе од ког се производе слатка вина је битно да презри у винограду, или да се суши изложено сунцу да би се повећао ниво шећера. У неким Медитеранским земљама се праве специјална слатка вина од грожђа сушеног на овај начин. Концентрација глукозе и фруктозе се повећава и до 300 g/l приликом оваквог начина сушења. Међутим, овај поступак погодује развоју гљива из родова *Botrytis*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Eurotium* и *Rhizopus*, што је у вези са повећаном учесталости и већим концентрацијама ОТА у слатким винима него у сувим (Soufleros et al., 2003; Hernández et al., 2006). Сазревањем бобица грожђа количина спора гљива из родова *Penicillium* и *Cladosporium* остаје слична, док се број спора гљива из рода *Aspergillus* повећава са 78 на 90,3%, а опада контаминација грожђа спорама гљива из рода *Alternaria* од 24,7 до 5,3%. У току

зрења повећава се контаминација грозђа врстама *A. niger* и *A. carbonarius*; њихова заступљеност на сувом грозђу је између 33 и 100%. У време бербе и после презревања највише бобица заражено је врстом *A. carbonarius*, која је главни извор ОТА у слатким винима (Valero et al., 2005; Gómez et al., 2006).

Valero et al. (2005) су такође испитивали присуство гљива које производе ОТА у процесу зрења грозђа и сушења на сунцу кроз екофизиолошки аспект. Узорке свежег зрелог грозђа и грозђа сушеног на сунцу су прикупили из винарија са југа Шпаније током процеса зрења грозђа, у време бербе, после сушења као и из супермаркета. Изоване су гљиве из седам главних родова (*Aspergillus*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Epiccoccum*, *Eurotium*, *Rhizopus* и *Penicillium*) у свим периодима зрења и сушења. У јуну су најзаступљеније врсте рода *Alternaria* (80%), а у септембру на зромом и на сувом грозђу су најзаступљеније врсте рода *Aspergillus*. Температура, активност воде и интеракција између врста имају утицај на развој колонија гљива. Најоптималнија активност воде, за све врсте, износи 0,97, а најактивнија врста која најбрже расте је *A. niger*, која се и на температурама од 40 °C развија брже од осталих. Резултати истраживања, такође, показују позитиван утицај медитеранске климе на развој гљива. И у овом испитивању је потврђено да се у грозђу за слатка вина, које је након бербе изложено сунцу, повећава садржај шећера, а смањује активност воде. Аутори су, у грозђу сушеном на сунцу, детектовали врсте из родова *Aspergillus* и *Penicillium* и нагласили да период сушења траје од 5 дана до 2 недеље. Нагласили су да је од свих детектованих врста само врста *Aspergillus niger* отпорна на UV светлост и високе температуре, али и да је развој гљива које производе ОТА инхибиран када активност воде падне испод 0,93. Закључили су да се убрзавањем процеса сушења грозђа може смањити концентрација ОТА и у сувом грозђу и у слатким винима.

Приликом производње вина треба испитати које су критичне тачке које треба контролисати да би се смањила/спречила могућност контаминације финалног производа према HACCP систему (Hazard Analysis and Critical Control Point). Вино је ферментисани сок добијен од грозђа са 10 - 15% алкохола по јединици запремине. Производња вина се састоји од гњечења грозђа, мацерације, одвајања течне и чврсте фазе, алкохолне ферментације, мало-лактисне ферментације (Grazioli et al., 2006). Након сваке од ових фаза Grazioli et al. (2006) су узимали

узорке у циљу постављања критичних тачака и одређивања концентрације ОТА. Испитивања су обухватала испитивање процеса винификације две сорте црвеног грожђа у три различите године (2001 - 2003). Такође, су испитивали и утицај старења флашираног вина на концентрацију ОТА после 3, 6 и 12 месеци. Узорци су прво центрифугирани и филтрирани, а затим разблаживани воденим растворима полиетилен гликола и натријум бикарбоната пре пречишћавања преко имуноафинитетних колоне. За детекцију је коришћен течни хроматограф са флуоресцентним детектором. Резултати показују да се ОТА налази у свим узорцима шире и да долази до његовог ослобађања у процесу гњечења грожђа. У току процеса мацерације је такође нађена висока концентрација ОТА (концентрација се повећава и до 45%), док се после алкохолног врења та концентрација смањује. Тако присутан у грожђу ОТА се преноси у ширу приликом гњечења и мацерације, али уколико се винификација врши алкохолном и мало-лактичком ферментацијом његова концентрација се може смањити и до 57% од почетне концентрације. Статистичком обрадом резултата аутори су показали да процес прављења вина утиче на варијацију садржаја ОТА. Међутим, винификација представља само 25% укупне варијације. Највећи део варијације зависи од године бербе грожђа и то до 75%. Старењем вина, за око 12 месеци, концентрација ОТА се смањује и до 17% (Ratola et al., 2005).

У Португалу су Ratola et al. (2005) испитивали промену концентрације ОТА од шире до вина приликом прављења вина Porto (дезертно вино које је добило име по истоименом граду Порто). Сакупљено је пет репрезентативних сорти грожђа које се користе у производњи овог вина, а истраживање се одвијало кроз три експеримента. Први експеримент је био бланк узорак, у другом је у ширу додат ОТА у концентрацији од 4  $\mu\text{g/kg}$ , а у трећем експерименту је у ширу додат раствор гљива ( $10^3$  спора/ml) које производе ОТА и раствор је остављен да се инкубира до појаве првих знакова заразе. У узорцима на почетку експеримента није детектован ОТА. Сваки експеримент се састојао из два дела: са и без додатка сумпор диоксида, као агенса који се користи у производњи. Узорци за испитивање ОТА су узимани на почетку процеса винификације после гњечења грожђа, на почетку ферментације, и два пута после завршене ферментације. У првом бланк експерименту ОТА није детектован ни у једном узорку. У другом експерименту у

делу без SO<sub>2</sub> средња вредност концентрације ОТА је била 4,70 µg/l, а у делу са SO<sub>2</sub> 5,44 µg/l. Разлика у концентрацијама није статистички значајна и последица је немогућности да се предвиди удео шире и чврсте фазе после гњечења грожђа, што је последица неадекватног узорковања. Исти проблем се јавља и у трећем експерименту, с тим што су нађене концентрације ОТА мање и износе 0,23 µg/l у првом делу и 0,06 µg/l у другом делу. Резултати трећег експеримента показују да је концентрација ОТА и пре процеса винификације мања од 2 µg/l. Почетна концентрација ОТА се смањила до узорковања на почетку ферментације и то за 77% у другом експерименту, а за 56% у трећем експерименту. Од почетка до краја ферментације концентрација ОТА се смањила за 90% у другом и 87% у трећем експерименту. Укупно смањење почетне концентрације ОТА у процесу винификације износило је 92%.

Због све веће заинтересованости потрошача за органском храном, истраживачи почињу да испитију да ли постоји разлика у садржају микотоксина у храни из конвенционалне и органске производње. Органска производња подразумева значајно смањење употребе пестицида, што може довести до повећања контаминације микотоксинима. Поред тога, и услови животне средине, као што су неадекватно складиштење у влажним условима и на високим температурама, могу узроковати развој гљива и производњу њихових метаболита. То потврђује мишљење неких аутора да је органска храна богата токсинима, а конвенционална синтетичким супстанцама - пестицидима (Elmholt i Rasmussen, 2005; Jorgensen, 2005; Juan et al., 2008; Plagge, 2018; Solecki, 2018; von Kietzell, 2018). С друге стране, постоје и аутори који тврде да не постоји јасна веза између органске производње и присуства микотоксина (Czerwiecki et al., 2002a,b; Chiodini et al., 2006; Pussemier et al., 2006). Са аспекта безбедности хране и интереса потрошача, најбитније је упознати јавност са ризицима по здравље који могу бити последица и једног и другог начина производње (Biffi et al., 2004; Juan et al., 2008).

Средином прошлог века је сматрано да уносу охратоксина А највише доприносе производи од меса, међутим средином 80-тих година у Данској је утврђено да највећа количина ОТА у људској исхрани потиче од уноса житарица, нарочито ражи. На крају је откривено присуство ОТА у вину и другим производима од грожђа. Први извештај о присуству ОТА и његовог етил естра, охратоксина Ц

(ОТЦ) у вину и соку од грожђа дали су Zimmerli i Dick (1996). Просечна нађена вредност у белим винима је била  $< 3$  pg/ml (опсег од  $< 3$  - 178 pg/ml), у розеу 19 pg/ml (опсег од  $< 3$  - 123 pg/ml) и у црвеним винима 13 pg/ml (опсег од  $< 3$  - 388 pg/ml). У дезертним винима просечна нађена количина ОТА је била 377 pg/ml (опсег од 44 - 451 pg/ml). Први пут је ОТА детектован и у соку од црвеног грожђа у опсегу концентрација од 3 - 311 pg/ml (средња вредност 235 pg/ml), док у узорцима сока од белог грожђа није утврђено присуство ОТА. У овим испитивањима утврђена количина ОТЦ је била око 10% од нађене количине ОТА. Аутори су закључили да ОТА настаје у процесу ферментације, као и да се јавља у црвеном вину и соку од црвеног грожђа који потичу из Европе. Аутори су указали на повећан ризик код одраслих услед конзумације вина.

Према извештају Европске комисије из 2002. године средња нађена вредност концентрације ОТА у узорцима вина је износила 0,36  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ( $n=1470$ ). У узорцима вина из јужног дела Европе су нађене веће количине ОТА, него у узорцима из северног дела. Такође, подаци из извештаја указују на веће количине ОТА у црвеним винима, него у розеу и у белим винима (Domijan i Peraica, 2005). Истраживања показују и мањи садржај ОТА у винима из Северне Америке, него у винима из Европе. Од укупног броја анализираних вина 2 - 4% је садржало ОТА преко МДК од 2  $\mu\text{g}/\text{l}$ . У сувом грожђу средња нађена вредност ОТА је износила 3,1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ( $n=593$ ), док је 7% узорака садржало ОТА преко 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Reg. EC 1881/2006). Просечна вредност ОТА у соку од грожђа је била 0,56  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ( $n=146$ ), од чега је у око 5% узорака вредност била изнад МДК од 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Посебну пажњу треба обратити на контролу и унос ОТА преко сока од грожђа и сувог грожђа, имајући у виду да су деца најчешће изложена овим производима (Jorgensen, 2005; Battilani et al., 2006; Varga i Kozakiewicz, 2006; Mateo et al., 2007).

Сем у намирницама биљног порекла (житарице и производи од житарица, грожђе, све врсте сувог грожђа, зачини, вино, пиво и др.) ОТА је детектован у мајчином и крављем млеку (Basarán et al., 2007).

### 2.2.2. Анализа охратоксина А у намирницама

За одређивање ОТА у свим врстама намирница највише коришћена и званична метода је течна хроматографија са флуоресцентним детектором (HPLC-FLD) (MacDonald et al., 1999; Ottender i Majerus, 2000; Pietri et al., 2001; Czerwiecki et al., 2002b; Soufleros et al., 2003; Belli et al., 2004; Blesa et al., 2004a; Chiodini et al., 2006; Hernández et al., 2006; Juan et al., 2007; Juan et al., 2008; Hernández Hierro et al., 2008; Milićević et al., 2008; Valero et al., 2008; Shundo et al., 2009; Durguti et al., 2014; Gentile et al., 2016; Sun et al., 2017; De Jesus et al., 2018). Међународна организација за винову лозу и вино (International organization of vine and wine - OIV, 2012) је, такође, поставила званичну методу одређивања ОТА у вину. Узорци вина се разблажују смесом полиетилен гликола и натријум хидрогенкарбоната, затим пречишћавају преко имуноафинитетних колона, а ОТА се квантификује HPLC-FLD методом. Количина ОТА у вину се може одредити и помоћу ензимско-имунских тестова - ELISA (Flajs et al., 2009). У новије време се примењује течна хроматографија са масеном спектрометријом за квантификовање ОТА (Lau et al., 2000; Tam et al., 2011; Fernandes et al., 2013; Andrade i Lanças, 2017; Camprone et al., 2018) и као конфирмативна техника (MacDonald et al., 1999; Chiodini et al., 2006; Hernández Hierro et al., 2008; De Jesus et al., 2018). Такође, за потврду присуства ОТА у различитим производима користи се и превођење ОТА у охратоксин метил естар (MacDonald et al., 1999; Pietri et al., 2001; Blesa et al., 2004b; Sáez et al., 2004; Berente et al., 2005; Anselme et al., 2006; Juan et al., 2007).

Припрема узорака је такође важан корак у анализи ОТА у узорцима хране у циљу добијања тачних и поузданих резултата. Вино и грожђе су комплексни матрикси са великим садржајем шећера, полифенолних једињења, масних киселина и њихових естара, алкохола, соли и адитива који могу утицати на анализу микотоксина. За екстракцију ОТА из вина и шире може се користити хлороформ (Pietri et al., 2001) после додатка натријум хлорида у киселој средини (de Cerain et al., 2002), дихлорметан са натријум бикарбонатним пуфером (Ghali et al., 2008; Ghafari et al., 2011), разблаживање полиетилен гликолом (Sáez et al., 2004) или смеса полиетилен гликола и натријум хидрогенкарбоната (Durguti et al., 2014; Durguti et al., 2015; Gentile et al., 2016), ацетонитрил/вода (Biffi et al., 2004),

метанол/фосфорна киселина (Czerwiecki et al., 2002a), метанол/вода (Вуковић и сар., 2009), метанол/мравља киселина (Blesa et al., 2004b; Juan et al., 2008), и др. Већина аутора после екстракције или разблаживања узорака пуферским раствором фосфатних соли (PBS) (MacDonald et al., 1999; Ottender i Majerus, 2000; Pietri et al., 2001; Soufleros et al., 2003; Domijan i Peraica, 2005; Anselme et al., 2006; Shundo et al., 2009; Tam et al., 2011; Remiro et al., 2012) или смесом PBS пуфер/метнол (de Cerain et al., 2002) врши пречишћавање узорака преко имуноафинитетних колона (Ottender i Majerus, 2000; Pietri et al., 2001; de Cerain et al., 2002; Ostry et al., 2002; Soufleros et al., 2003; Bellí et al., 2004; Biffi et al., 2004; Blesa et al., 2004a; Domijan i Peraica, 2005; Anselme et al., 2006; Valero et al., 2008; Tam et al., 2011; Durguti et al., 2015; Gentile et al., 2016). Добри резултати пречишћавања могу се добити и са C<sub>18</sub>, C<sub>8</sub>, HLB колонама или другим колонама за екстракцију на чврстој фази које су знатно јефтиније (Lau et al., 2000; Blesa et al., 2004b; Berente et al., 2005; Chiodini et al., 2006; Hernández et al., 2006; Medina et al., 2006; Varelis et al., 2006; Juan et al., 2008; Вуковић и сар., 2009; Mariño-Repizo et al., 2015; Rodríguez-Cabo et al., 2016; Sun et al., 2017), као и пречишћавањем преко јоно-измењивачких колона нпр. Oasis MAX (анјонска измењивачка фаза) (Pelegri et al., 1997; Campone et al., 2018). Када се за припрему узорака користе неселективне екстракционе фазе као што су C<sub>8</sub> или C<sub>18</sub>, пожељно је користити масену спектрометрију за детекцију, јер је селективнија и осетљивија за поуздану идентификацију и квантификацију анализата. Fernandes et al. (2013) су користили Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) методу екстракције ОТА из узорака вина, а затим пречишћавање преко колона за дисперзију на чврстој фази са силика гелом. За екстракцију ОТА из узорака грозђа, сока од грозђа, вина и сувог грозђа, примењена је QuEChERS метода са ацетонитрилом, а са закишељеним раствором ацетонитрила за екстракцију ОТА из узорака животињског порекла (свињско месо, јетра, бубрези, маст, јаја, млеко). За пречишћавање добијених екстраката коришћен је C<sub>18</sub> сорбент (Wei et al., 2018). Pizzutti et al. (2014) су применили QuEChERS методу за екстракцију 36 микотоксина, укључујући и ОТА, из узорака вина. Екстракција је рађена са закишељеним раствором ацетонитрила уз додатак соли анхидрованог магнезијум сулфата (2 пута), а пречишћавање преко хлорофилтера (CF). Узорци су затим

анализирани на LC-MS/MS систему. Andrade i Lanças (2017) су за екстракцију ОТА из узорака вина, и његову идентификацију и квантификацију, користили микро-екстракцију на чврстој фази повезану преко аутосамплера за течни хроматограф са масеним спектрометром. За наношење узорака на колоне за SPME користили су 1% водени раствор сирћетне киселине и ацетонитрил. Ацетонитрил/тетрахидрофуран (90/10 v/v) је коришћен за чишћење колоне, а мобилна фаза (вода/ацетонитрил/сирћетна киселина) за елуирање анализата са SPME колоне на хроматографску колону. За припрему узорака вина се може користити и дисперзиона течна екстракција (DLLME) помоћу хлороформа као екстракционог растварача и ацетона као дисперзионог растварача (Camprone et al., 2011) или ацетонитрила као дисперзионог растварача и хлороформа као екстракционог растварача (Arroyo-Manzanares et al., 2012) или течна екстракција (LLE) помоћу хлороформа (De Jesus et al., 2018), без даљег пречишћавања узорака. Al-Taher et al. (2013) су развили методу разблаживања и снимања („dilute and shoot“) тако што су користили обележене  $^{13}\text{C}$ -интерне стандарде да би смањили матрикс ефекат на испитиване микотоксине. Метода је примењена на узорке пива и вина у којима су одређивани афлатоксини, фумонизини, ОТА, зеараленон, деоксиниваленол, Т-2 и НТ-2 токсини (метаболити из групе трихотецена). Додавањем стабилних изотопски обележених стандарда који показују слична хемијска и физичка својства као и аналити који се испитују, могућа је веома поздана квантификација ниских концентрација микотоксина. Ова метода је позната у аналитици као метода стабилног изотопског разблажења (stable isotope dilution assay - SIDA) (Roland et al., 2014). За екстракцију ОТА из узорака вина може се применити и микроекстракција помоћу пакованих сорбента (microextraction by packed sorbent - MEPS), која представља екстракцију на чврстој фази. Користе се мање количине узорака и растварача и лако су прилагодљиве течной и гасној хроматографији чиме је омогућена потпуно аутоматизована метода припреме и анализирања узорака (време потребно за анализу је смањено на свега неколико минута). Savastano et al. (2016) су применили MEPS методу припреме узорака вина за одређивање садржаја ОТА. Неколико  $\mu\text{l}$  вина се нанесе на паковане сорбенте са  $\text{C}_{18}$  чврстом фазом након чега



се ОТА елуира закишељеним ацетонитрилом и анализира течном хроматографијом са FL детектором.

Sáez et al. (2004) су поредили пет начина припреме узорака за одређивање концентрације ОТА у вину, шири и пиву:

1. Разблаживање раствором натријум бикарбоната и полиетилен гликола и филтрирање узорака због уклањања талога,
2. Закишељавање фосфорном киселином, а затим додавање натријум хлорида и екстракција ОТА хлороформом. Екстракти су после упаравања хлороформа разблаживани PBS пуфером и пречишћавани преко имуноафинитетних колона,
3. Екстракција на чврстој фази преко  $C_{18}$  колона,
4. Екстракција на чврстој фази преко реверзно-фазних фенилсиланских колона и
5. Екстракција на чврстој фази преко модификованих стирен-дивинилбензен (Oasis HLB) колона.

Најбољи хроматограми са најмање коелуирајућих компоненти добијени су за узорке припремљене на први и други начин, док хроматограми добијени после пречишћавања узорака преко SPE колона имају пикове на почетку хроматограма, који потичу од нечистоћа. За црвено вино добијени просечни приноси екстракције за сва три концентрациона нивоа првим поступком су од 75,4 - 107% уз RSD 0,9 - 3,0%. Припремом црвеног вина на други начин добијене су ниже вредности приноса екстракције 65,9 - 73,4% такође уз низак RSD 0,15 - 3,1%. Коришћењем SPE колона у трећој и четвртој методи добијају се такође добри приноси екстракције (78 - 99,2%) али је прецизност за најнижи концентрациони ниво од 0,1 ng/ml износила 13%. Екстракцијом на чврстој фази преко Oasis HLB колона добијени су најнижи приноси екстракције од 41,1 - 51,1%. Разблаживањем узорака црвеног вина раствором натријум бикарбоната и полиетилен гликола, а затим пречишћавањем преко  $C_{18}$  колона, повећава се принос екстракције за сва три концентрациона нивоа 95,0 - 101,0% са добром прецизношћу од 0,3 - 4,1%.

### 2.3. Остаци пестицида

Квалитет хране је битан аспект живота људи који се мења и унапређује свакодневно. Последњих година све већа пажња се посвећује остацима пестицида, као и доброј пољопривредној пракси, транспарентности и следивости у производњи и трговини храном произведеном на конвенционалан начин. Коришћење пестицида, као незаобилазне мере савремене пољопривреде, строго је законски регулисано, због чињенице да могу да изазову нежељене ефекте. Сходно томе, активне супстанце пестицида могу бити одобрене за коришћење само ако је научно доказано да не штете здрављу људи и животиња, не изазивају неприхватљиве ефекте у животној средини и ако су ефикасне за намену за коју се стављају у промет (Уредба 283/2013). У оквиру бројних испитивања, која се раде пре стављања у промет, налазе се и испитивања везана за остатке пестицида и одређивање МДК које представљају максималне законски дозвољене количине остатака активних супстанци у пољопривредним производима, у/на храни и храни за животиње. На нивоу ЕУ МДК су дефинисане Уредбом 396/2005, а у нашој земљи Правилником о максимално дозвољеним количинама остатака средстава за заштиту биља у храни и храни за животиње и Правилником о храни и храни за животиње за коју се утврђују максималне количине остатака средстава за заштиту биља („Сл. гласник РС“ 22/18). Код нас се, на националном нивоу, не врши одређивање МДК, већ се ове вредности преузимају из регулативе ЕУ. Прве хармонизоване МДК вредности дефинисане су 2010. године, а затим, у складу са изменама и допунама Уредбе (ЕУ) број 396/2005 Европског парламента и Савета од 23. фебруара 2005. године о МДК у или на храни и храни за животиње биљног и животињског порекла, односно Анекса ове Уредбе завршених до септембра 2013. године, донет је нови пропис, који обухвата хармонизоване ЕУ вредности МДК, а који је објављен у „Службеном гласнику РС“ (број 29 од 13. марта и број 39 од 9. априла 2014. године). Усаглашавање и објављивање се врши једном годишње, или ређе, а тренутно важећи Правилник о МДК је објављен у „Службеном гласнику РС“ број 22 од 20. марта 2018. године.

Унапређивањем техника за анализу остатака пестицида могуће је утврдити присуство остатака пестицида преко МДК, као и коришћење пестицида за

заштиту усева/засада у којима њихова примена није дозвољена. Због постављања ниских МДК вредности за храну за бебе и нерегистрованих пестицида за поједине врсте производа, хемијске лабораторије морају развијати методе, које су довољно осетљиве и специфичне, да мере веома ниске концентрације остатака пестицида (mg/kg или µg/kg).

Најефикаснији начин анализе остатака пестицида је употребом мултирезидуалних метода (MRM) (Economidou et al., 2009). Захтеве које мора испунити MRM метода, у смислу селективности, осетљивости, тачности као и конфирмације, успешно се постижу течном (LC) и/или гасном (GC) хроматографијом са масеним спектрометром (MS или MS/MS) (Alder et al., 2006). Међутим, одређивање остатака пестицида, који имају различиту хемијску структуру и различита физичко-хемијска својства, захтева припрему узорка која није једноставна и подједнако успешно примењива на различита једињења. За издвајање супстанци од интереса користе се различити поступци екстракције, као што су течна-течна екстракција (LLP), дисперзиона екстракција на чврстој фази (dSPE), течна микроекстракција на влакну (LPME), микроекстракција на чврстој фази (SPME) или QuEChERS метода (Anastassiades et al., 2003; Payá et al., 2007).

QuEChERS метода је нашла велику примену у припреми различитих намирница за анализу остатака пестицида, нарочито у комбинацији са гасном (GC) и течном хроматографијом (LC) повезаним са различитим масеним анализаторима (MS). Заснива се на екстракцији анализата ацетонитрилом, затим екстракцији и раздвајању помоћу смесе соли и на крају се врши пречишћавање дисперзијом на чврстој фази (dSPE). Метода је примењива за велики број анализата, као што су јако поларни пестициди, кисели и базни, и захтева малу количину узорка и растварача (Anastassiades et al., 2003).

### **2.3.1. Присуство остатака активних супстанци пестицида у грозђу и вину**

Ефикасна борба против корова, фитопатогених гљива и инсеката, правилна обрада земљишта, ђубрење, резидба и др. неходне су мере за одржавање винограда. Употреба пестицида приликом гајења грозђа је значајна за његову

заштиту од штетних микро и макро организама, повећање приноса, али и квалитета грожђа и вина. Највећи утицај на квалитет грожђа имају фитопатогене гљиве које се хране и развијају на бобицама грозда. Поред гроздова и других надземних органа гљиве могу да се развијају и на подземним деловима винове лозе. Економски најзначајније болести винове лозе проузроковане гљивама су пламењача (*Plasmopara viticola*), пепелница (*Uncinula necator*), сива трулеж винове лозе (*Botrytis cinerea*) и црна трулеж винове лозе (*Guignardia bidwellii*) (Cabras i Angioni, 2000; Ивановић и Ивановић, 2017). Од инсеката најзначајније штеточине винове лозе су сиви гроздов смотавац (*Lobesia botrana*), ериофидне гриње (гриње шишкарнице) (*Calepitrimerus vitis* и *Eriophyes vitis*) и цикада винове лозе (*Scaphoideus titanus*) (Chuche i Thiéry, 2014). За ефикасну заштиту од ових болести и штеточина користе се различити фунгициди, инсектициди и акарициди. Употреба средстава за заштиту биља у виноградима, али и у другим засадама и усевима, у складу са *добром пољопривредном праксом* не представља ризик по здравље људи и животну средину. Уколико се пестициди не користе правовремено, у препорученим количинама примене и у складу са осталим препорукама, њихови остаци могу премашити МДК у грожђу после бербе, као и у вину (Cabras i Angioni, 2000; Millán et al., 2003; Fernández et al., 2005; Martins et al., 2011). За примену фунгицида је веома битно да имају широк спектар деловања и дугу постојаност, чиме се обезбеђује боља ефикасност и мања учесталост примене. Ова средства хемијског или биолошког порекла сузбијају или инхибирају развој фитопатогених гљива и спречавају развој обољења које оне проузрокују. Према месту деловања могу бити превентивни, протективни или контактни, који се примењују фолијарно и не продиру унутар биљке (несистемици), већ штите да не дође до остварења заразе. Са друге стране, системични које биљка усваја кореном, стаблом, лишћем, транслоцирају се унутар биљке, заустављају ширење постојеће инфекције, односно делују куративно (од инфекције до фруктификације) и ерадикативно (спречавају фруктификацију). Помоћне супстанце у формулацијама пестицида, такође, имају значајну улогу у омогућавању лакшег продирања пестицида у пулпу грозда (Teixeira et al., 2004; Шовљански и Лазић, 2007; González-Rodríguez et al., 2009b). Због различитих механизма деловања, пестициди се везују за различите делове грозда, па се за

контактне пестициде очекује већа количина остатака на покожици, док се већа количина остатака у пулпи очекује за системичне. Због процеса винификације количина остатака пестицида у вино је мања него у грозђу, а остаци пестицида, као и њихови метаболити у процесу винификације, прелазе из грозђа у ширу, а самим тим и у вино (Cabras et al., 1997; Cabras i Angioni, 2000; Garau et al., 2009). Међутим, да би били сигурни да присутна количина остатака пестицида не представља ризик по здравље људи, односно да су производи здравствено безбедни, неопходно је вршити сталну контролу њиховог присуства у грозђу и вино. За примену у виновој лози, у Републици Србији, у периоду планирања ове дисертације, било је регистровано 50 активних супстанци фунгицида и зооцида, формулисаних у 203 различита средства за заштиту биља (Спасић, 2016). Вредности МДК за остатке пестицида у винском и стоном грозђу су преузете из ЕУ регулативе, док за вино не постоје званичне МДК вредности, али постоји препорука *Међународне организације за винову лозу и вино* (International organization of vine and wine - OIV, 2012) да МДК остатака пестицида износе 10% од МДК вредности које су декларисане за грозђе (Correia et al., 2000; Castro et al., 2018).

Остаци пестицида који су најчешће детектовани у грозђу су азоксистробин, боскалид, ципродинил, карбендазим, металаксил, триадименол, фамоксадон, фенхексамид, пенконазол, дифенокназол, хлорпирифос, циперметрин, крезоксим метил, имидаклоприд, имазалил, трифлористробин (Čuš et al., 2010b; Golge i Kabak, 2018). Cabras et al. (1995) су у винима из Италије детектовали беномил, диметоат, ипродион, металаксил и винклозолин. Анализом 190 узорак вина у Италији 2001. године ниједан узорак није садржао остатке пестицида (Cabras i Conte, 2001). У узорцима вина из Португалије најчешће су детектовани остаци дихлофлуанида, беномила, ипродиона, просимидона и винклозолина (Calhella et al., 2006). У другим истраживањима узорака вина из Италије и Словеније најчешће су детектовани остаци ципродинила, фенхексамида, металаксила, просимидона, азоксистробина, тебуконазола и ипродиона (Otero et al., 2002; Trösken et al., 2005; Čuš et al., 2010a,b). И у истраживањима Vitali et al. (1998) цит. по Čuš et al. (2010a) у 57% од 21 анализираног италијанског вина нађени су остаци једног или више пестицида. Chen et al. (2016) су у супермаркетима у Шенцену

(Кина) узорковали пет црвених и пет белих увозних вина. У девет вина су детектовали молинат, дифениламин, металаксил, миклобутанил и тебуконазол у концентрацијама од 0,56 до 18,6  $\mu\text{g/l}$ , при чему је металаксил детектован у највећој концентрацији - 18,6  $\mu\text{g/l}$ . Avramides et al. (2003) су испитивали остатке пестицида у винима из Грчке и са територије бивше Југославије и детектовали присуство ипродиона у шест југословенских вина.

### **2.3.2. Анализа остатака активних супстанци пестицида у грожђу и вину**

Остаци пестицида у грожђу, вину и њиховим производима одређују се применом хроматографских метода. Захтеви које мора испунити хроматографска метода у смислу селективности, осетљивости, тачности и робусности успешно се постижу течноом хроматографијом са масеним спектрометром (LC-MS), тандем масеним спектрометром (LC-MS/MS) (Venkateswarlu et al., 2007; González-Rodríguez et al., 2009b; Rose et al., 2009; Zhang et al., 2009; Čuš et al., 2010a,b; Franc i de Revel, 2018), гасном хроматографијом са масеним спектрометром (GC-MSD) (Oliva et al., 1999; Navarro et al., 2000; Soleas et al., 2000; Jiménez et al., 2007; Likas et al., 2007; González-Rodríguez et al., 2009b; Čuš et al., 2010a,b; Yang et al., 2011) или тандем масеном спектрометријом (GC-MS/MS) (Martins et al., 2011; Chu et al., 2015; Chen et al., 2016). Одређивање остатака пестицида из грожђа и производа од грожђа се може радити и гасном хроматографијом са азот-фосфорним детектором (nitrogen-phosphorus detector - NPD), детектором са захватом електрона (electron capture detector - ECD) (Oliva et al., 1999; Correia et al., 2000; Navarro et al., 2000; Avramides et al., 2003; Calhelha et al., 2006; Likas et al., 2007; Rose et al., 2009), течноом хроматографијом са детектором са низом диода (diode-array detector - DAD) (López et al., 1989; Miliadis et al., 1999; Otero et al., 2003; Likas et al., 2007; González-Rodríguez et al., 2011), дводимензионалном гасном хроматографијом (GCxGC) са ECD или пламено јонизујућим детектором (flame photometric detector - FID) (Pizzutti et al., 2009).

Да би утврдили да ли постоји разлика у количини остатака пестицида приликом анализе целих гроздова са петелком и целих гроздова без петелке, као и да ли се прањем грожђа смањује концентрација остатака пестицида Teixeira et al. (2004) су

користили метанол за екстракцију пестицида. Пречишћавање екстраката су вршили преко C<sub>8</sub> колона, а анализу остатака пестицида на HPLC-DAD. Аутори нису нашли статистички значајну разлику између концентрација пестицида у целом грозду (покожица и пулпа) и само на покожици грозда. Пириметанил су детектовали само у пулпи, а металаксил на покожици, али не и у целом грозду. Истраживања су указала да се праћем уклања 70% контактнoг фунгицида просимидона. De Melo Abreu et al. (2006) су после екстракције остатака фунгицида смесом етил-ацетат - хексан из грозђа и вина вршили детекцију на HPLC-DAD, а потврду присуства фунгицида су радили помоћу GC-MS.

Раније коришћене методе за екстракцију пестицида из узорака воћа и поврћа, а самим тим и из грозђа, вина и шире су се заснивале на екстракцији анализата ацетоном, смесом ацетон - дихлорметан, хексаном или етил-ацетатом у присуству анхидрованог натријум сулфата (Miliadis et al., 1999; Otero et al., 2003; Pizzutti et al., 2009; Rose et al., 2009) или натријум хлорида (Oliva et al., 1999; Navarro et al., 2000). Likas et al. (2007) су за екстракцију фамоксадона, фенхексамида и трифлуксистробина из узорака грозђа и вина успешно применили смесу циклохексан - дихлорметан. Пре детекције остатака пестицида HPLC-DAD-ом екстракте су пречишћавали преко силика колона за екстракцију на чврстој фази. González-Rodríguez et al. (2009a) су за екстракцију тебуконазола из узорака грозђа, шире и вина користили смесу дихлорметан - ацетон уз додатак натријум хлорида и анхидрованог натријум сулфата, а за пречишћавање Envi Carb-II/PSA колоне. У другом експерименту, приликом испитивања деградације више фунгицида од грозђа до вина, за екстракцију су користили смесу етил-ацетат/хексан, а за пречишћавање такође Envi Carb-II/PSA колоне (González-Rodríguez et al., 2011). Čuš et al. (2010a,b) су користили смесу ацетона, петрол-етра и дихлорметана за екстракцију пестицида из узорака вина, пречишћавање су вршили помоћу гел перманентне хроматографије. Остаци пестицида из узорака грозђа и вина се могу екстраховати и течно-течном екстракцијом (LLP), дисперзионом течно-течном микроекстракцијом (DLLME) (Chen et al., 2016), екстракцијом на чврстој фази (SPE) преко HLB или C<sub>18</sub> колона (Miliadis et al., 1999; Soleas et al., 2000; Otero et al., 2003; Flores et al., 2007; Jiménez et al., 2007, Franc i de Revel, 2018), дисперзијом матрикса на чврстој фази (MSPD),

микроекстракцијом на чврстој фази (SPME) или QuEChERS методом (Franc i de Revel, 2018). Метода екстракције, такође, мора да задовољи захтеве у смислу брзине, ефикасности, смањења количине узорка, једноставности, примењивости за рутинску анализу, смањења употребе токсичних растварача, као и прихватљиве цене.

SPME метода омогућава једноставну и аутоматизовану екстракцију остатака пестицида из вина без употребе растварача и примењена је за одређивање 24 пестицида у истраживањима Martins et al. (2011) и за екстракцију органохлорних и органофосфорних пестицида у истраживањима Correia et al. (2000).

Поред DLLME за екстракцију остатака пестицида из узорака вина може се користити и мешањем потпомогнута дисперзивна течно-течна екстракција (up-and-down-shaker-assisted dispersive liquid-liquid microextraction - UDSA-DLLME) са 1-октанолом као екстракционим растварачем (Chu et al., 2015).

OASIS HLB колоне се могу користити за екстракцију остатака пестицида из узорака вина пре GC-MS/MS (Pelajić et al., 2016) или LC-MS/MS детекције (Castro et al., 2018).

Zhang et al. (2009) су користили модификовану QuEChERS методу за екстракцију и пречишћавање 72 остатка пестицида из узорака вина. Аутори су користили толуен за десорпцију планарних и ароматичних пестицида после пречишћавања узорака преко dSPE са примарним-секундарним аминима и активним угљем (Zhang et al., 2009). За екстракцију и одређивање 172 пестицида LC-MS/MS техником у стоном грожђу Golge i Kabak (2018) су применили модификовану QuEChERS методу. Уместо ацетонитрила аутори су користили закишељен метанол као екстракционо средство.

Yang et al. (2011) су за екстракцију 88 остатака пестицида из бобичастог воћа (грожђа, купина, боровница и јагода) користили модификовану QuEChERS методу, а затим су екстракте пречишћавали преко Envi-Carb/NH<sub>2</sub> колоне.

Одређивање остатака пестицида из вина се може вршити припремом узорака QuEChERS методом, а затим директном анализом DART-MS/MS-ом без хроматографисања (Guo et al., 2016) или без претходне екстракције, пречишћавања и хроматографисања узорака амбијентном масеном спектрометријом (DART-QqQ) (Yong et al., 2017).



Иако су LC-MS и GC-MS софистициране технике, добијени резултати су подложни утицају матрикса. У зависности од сложености матрикса може доћи до повећања или смањења сигнала/одговора испитиваног анализата. Код LC-MS технике компоненте матрикса утичу на ефикасност јонизације анализата, или на особине капљица (нпр. промену вискозитета). Приликом анализе остатака пестицида утврђено је да чешће долази до смањења сигнала анализата. Код гасне хроматографије честице матрикса се могу везати за активна места гасно-хроматографског система (ињектор, колона, детектор) чиме могу утицати на задржавање или деградацију анализата. Утицај матрикса се може смањити додатним пречишћавањем узорака, што одузима додатно време и повећава цену анализе, коришћење интерних (Navarro et al., 2000) или обележених интерних стандарда (González-Rodríguez et al., 2009a). Код MRM метода понекад није могуће наћи обележен стандард за сваки испитивани аналит, што би и економски било неисплативо те се може користити по један представник за једну класу пестицида. Најчешће коришћене методе смањења матрикс ефекта су калибрација у матриксу узорка (matrix-matched calibration) (Avramides et al., 2003; Likas et al., 2007; Pizzutti et al., 2009; Čuš et al., 2010b; Martins et al., 2011; González-Rodríguez et al., 2011; Castro et al., 2018; Golge i Kabak, 2018) и метода стандардног додатка (Otero et al., 2003; Jiménez et al., 2007; González-Rodríguez et al., 2009b; Yang et al., 2011; Pelajić et al., 2016; Nawaz et al., 2018). Ове методе су релативно једноставне и јефтине. Приликом њихове примене потребни су узорци за које је потврђено да не садрже испитиване анализате (тзв. бланк узорци). Уколико су анализирани анализати стабилни овако припремљени калибрациони раствори се могу користити за више анализа истог матрикса (Kruve et al., 2008; Kwon et al., 2012).

### 3. Циљеви истраживања

Циљ истраживања у оквиру ове докторске дисертације је развој и оптимизација мултирезидуалне инструменталне методе која је осетљива и селективна за истовремено испитивање остатака активних супстанци пестицида и ОТА у грожђу и вину.

Такође, циљ рада је и избор методе за истовремену екстракцију остатака пестицида и ОТА из истог узорка грожђа, односно вина. Истраживање обухвата поређење QuEChERS методе и припрему узорка помоћу BondElut Micotoxin китова за ОТА, као и пречишћавање ацетонитрилног екстракта различитим dSPE китовима (китови за воће и поврће са великим садржајем воде, пигмената и масти) за одређивање пестицида. Циљ је, такође, и брза и ефикасна припрема узорка, која мора да задовољи параметре неопходне за оптимизацију аналитичке методе дефинисане у европском законодавству [SANTE/11813/2017 и Уредба (ЕЦ) број 401/2006]. Пажња је посвећена прилагођавању примене QuEChERS методе за екстракцију ОТА, чиме би се избегла употреба имуноафинитетних колоне и знатно смањила цена анализе, а да се при том не изгуби на осетљивости методе. Поред побројаног, циљ је и да принос екстракције, за што већи број анализата, буде близу 100%, а и да се припремом узорка у задовољавајућој мери уклоне нечистоће, како би се повећала селективност и избегао нежељени утицај матрикса.

Осим тога, циљ рада је и валидована MRM метода која би била погодна за одређивање остатака пестицида и ОТА у узорцима грожђа и вина, из конвенционалне и органске производње, чиме би се у узорцима из конвенционалне производње проверило да ли су средства за заштиту биља примењена у складу са добром пољопривредном праксом, односно да ли су њихови остаци у складу са прописаним МДК вредностима. У исто време, у узорцима из органске производње, биће проверено да ли је било примене пестицида који нису одобрени за примену у овом начину производње, или је дошло до контаминације засада услед дрифта са околних засада.

Поређењем добијених резултата присуства ОТА у грожђу и вину из конвенционалне и органске производње утврдиће се да ли примена пестицида има

утицаја на његово настајање. Развијена и оптимизована MRM метода, допринеће рутинској контроли узорака на тржишту, ради праћења изложености потрошача како остацима пестицида, тако и охратоксину А. Истовременом припремом узорака за анализу и остатака пестицида и ОТА цена испитивања ће се, такође, значајно смањити.

На крају, циљ је и да се изврши процена изложености, на основу концентрација детектованих активних супстанци пестицида и ОТА, добијених у овом истраживању, преко грозђа и вина.

## 4. Материјал и методе

У раду су коришћене лабораторијске хемикалије уобичајене за ову врсту испитивања, аналитички стандарди 41 активне супстанце пестицида, као и охратоксина А и интерни стандард карбофуран-d3.

### 4.1. Коришћене хемикалије

- Ацетонитрил, HPLC grade, Chem-Lab NV, Belgium
- Метанол, HPLC gradient grade, HiPerSolv Chromanorm, France
- Вода, HPLC чистоће, by Purelab<sup>®</sup> ELGA, Vivendi Water Systems Ltd UK
- Ацетон, Baker ultra resi-analyzed, Holland
- Толуен, Baker ultra resi-analyzed, Holland
- Етил-ацетат, Baker ultra resi-analyzed, Holland
- Мравља киселина, ACS reagent, reagent Ph. Eur. >98, Sigma Aldrich, USA
- QuEChERS Extract Tubes kits, EN Method, 5982-5650, USA (Agilent Technologies)
- Dispersive SPE, 2 ml, Pigment Samples, 5982-5221, USA (Agilent Technologies)
- Dispersive SPE, 2 ml, Fruits and Veg, EN, 5982-5021, USA (Agilent Technologies)
- Dispersive SPE, 2 ml, Fatty samples, EN, 5982-5021, USA (Agilent Technologies)
- BondElut Micotoxin китови, 12102167, USA (Agilent Technologies)
- Карбофуран-d3, Pestanal, Fluka C/N 34019, 99,7%
- Азоксистробин, Syngenta, min 99,7%
- Беналаксил, Pest Pan 99,01 ± 0,19%
- Бифентрин, Pestanal, Sigma-Aldrich, 98,8%
- Боскалид, BASF, min 99,0%
- Бупрофезин, Pestanal, 98,8%
- Хлорантранилипрол, Dr Ehrenstorfer GmbH, 99,5%

- Цимоксанил, Dr Ehrenstorfer Gmbh, 97,5%
- Ципродинил, Syngenta, min 99,9%
- Дифенокназол, Dr Ehrenstorfer Gmbh, 99%
- Диметоморф, BASF, min 99,6%
- Дитианон, BASF, min 99,9%
- Фамоксадон, DuPont, min 99,4%
- Фенамидон, Bayer Cropscience AE, min 99,5%
- Фенхексамид, Bayer Cropscience AE, min 99%
- Фенпироксимат, Nihon-Nohyaku, min 99,7%
- Фипронил, Dr.Ehrenstorfer, 97,5%
- Флуазинам, Adama, min 99,1 %
- Флудиоксонил, Syngenta, min 99,9%
- Флуопирам, Bayer Cropscience AE, 99,4%
- Флуквинконазол, Bayer Cropscience AE, 99,4%
- Флутриафол, Cheminova A/S, min 92,8%
- Хекситиазокс, Nippon-soda, min 99,9%
- Ипродион, Pestanal, Sigma-Aldrich, 99,5%
- Ипроваликарб, Pestanal, min 98,66%
- Крезоксим метил, BASF, min 99,9%
- Мандипропамид, Pestanal, 99,2%
- Металаксил, Syngenta, min 99,1%
- Метоксифенозид, Pestanal, Sigma-Aldrich, 99,8%
- Миклобутанил, Rohm and Hass, 99,8%
- Пенконазол, Syngenta, 97,7%
- Пропиконазол, Adama, 99,4%
- Пиракlostробин, BASF, min 99,9%
- Пиридабен, Nissan, min 99,9%
- Пириметанил, Pestanal, 100%
- Квиноксифен, Dow Agrosience, 100%
- Спиродиклофен, Sigma-Aldrich, 99,2%
- Спироксамин, Bayer Cropscience AE, min 98,3%

- Тебуконазол, Adama, min 99,2%
- Тебуфенпирад, Pestanal, Sigma-Aldrich, 46438, 99,9%
- Толифлуанид, Bayer Cropscience AE, min 99,9%
- Триадименол, Baytan KWG, min 99,9%
- Трифлумизол, Nipon-soda, min 99,99%
- Зоксамид, Dow Agrosience, 100%
- Охратоксин А, Romer 10,13 µg/ml у ацетонитрилу

#### **4.2. Коришћена опрема**

- Течни хроматограф 1260 серије, Agilent Technologies, Inc. Santa Clara, USA са бинарном пумпом, аутосамплером, DAD детектором и масеним спектрометром 6460 Triple Quad, Agilent Technologies
- Хроматографска колона - Agilent InfinityLab Poroshell 120EC-C18, 3,0x50 mm; 2,7 micron
- Претколона - UPLC Guard Agilent InfinityLab Poroshell 120EC-C18, 3,0x5 mm; 2,7 micron
- Центрифуга - Eppendorf Centrifuge 5804
- Центрифуга - Centurion 2000 Series
- Ултразвучно купатило - Vabsonic SB-8L T, Србија
- Вортекс - Bibby Scientific™ Stuart™ Variable Speed SA8 Vortex Mixer
- Систем за добијање чисте воде - Purelab® ELGA, Vivendi Water Systems Ltd UK
- Систем за упаравање у струји азота - Techne, Dry-block, DB-3D
- Аутоматска пипета - Thermo Labsystems Finnpiptette, 5 µl
- Аутоматска пипета - Thermo Labsystems Finnpiptette, 10-100 µl
- Аутоматска пипета - Thermo Labsystems Finnpiptette, 20-200 µl
- Аутоматска пипета - Thermo Labsystems Finnpiptette, 200-1000 µl
- Аутоматска пипета - Thermo Labsystems Finnpiptette, 500 µl
- Аутоматска пипета - Thermo Labsystems Finnpiptette 1 - 5 ml
- Клипна стаклена пипета, 1 - 10 ml

- Техничка вага - Chyo МК-500С
- Аналитичка вага - Denver instrument, USA
- KX Syringe Filter: Nylon 25mm 0,45µm, 500/pk, Kinesis ESF-NY-25-045-D
- Бочице за аутосемплер, Certified 2 ml screw cap glass vial, 100/pk, Agilent Part No.5182-0714
- Пластични шприцеви, Chirana T. Injecta, 5 ml Luer-Lock, Slovak Republic
- РТ конусне кивете за центрифугирање, 50 ml

### 4.3. Узорковање

Узорци винског грожђа, који су испитивани на присуство охратоксина А и остатака пестицида, су узорковани са 11 локалитета који се налазе у осам различитих виногорја у Србији, а узорци вина са осам локалитета, из седам виногорја (Иванишевић и сар., 2015). Локалитети на којима су прикупљани узорци грожђа су: Радмиловац, Заклопача и Умчари (Грочанско виногорје), Сремски Карловци (Фрушкогорско виногорје), Доње Злегиње (Жупско виногорје), Мала Сугубина (Трстеничко виногорје), Голобок (Крњевачко виногорје), Младеновац (Авалско-космајско виногорје), Топола и Копљари (Опленачко виногорје) и Страгари (Крагујевачко виногорје). Вино је узорковано са локалитета: Радмиловац, Заклопача, Умчари, Сремски Карловци, Доње Злегиње, Мала Сугубина, Голобок, Топола и Страгари. Током 2016. године су прикупљани узорци грожђа и то 14 црних винских сорти (Табела 1) и 17 белих винских сорти (Табела 2). Прикупљено је 25 узорака црних сорти и 25 узорака белих сорти. Сви узорци грожђа су узорковани у по пет понављања, што је представљало 250 узорака грожђа за анализу.

Табела 1. Црне винске сорте и стоне\* сорте које су коришћене за производњу вина, локалитети и тип производње

Сорта	Локалитет	Тип производње
Cabernet franc	Младеновац, Радмиловац	конвенционална
Cabernet sauvignon	Радмиловац, Топола, Умчари,	конвенционална

Сорта	Локалитет	Тип производње
	Голобок	
Франковка	Сремски Карловци	конвенционална
Game bojadiser	Мала Сугубина, Сремски Карловци	конвенционална
Мерло	Младеновац, Голобок, Сремски Карловци, Радмиловац	конвенционална
Молдова* (I. C.) <sup>1</sup>	Мала Сугубина	конвенционална
Мускант хамбург*	Мала Сугубина	конвенционална
Бургундац црни	Доње Злегиње, Страгари, Сремски Карловци, Радмиловац	конвенционална
Пробус	Сремски Карловци	конвенционална
Прокупац	Умчари	конвенционална
Регент	Заклопача	органска
Страшенски* (I. C.) <sup>1</sup>	Копљари	конвенционална
Вранац	Мала Сугубина	конвенционална

Табела 2. Беле винске сорте које су коришћене за производњу вина, локалитети и тип производње

Сорта	Локалитет	Тип производње
Бачка (I. C.) <sup>1</sup>	Сремски Карловци	органска
Chardonnay	Младеновац, Радмиловац	конвенционална
Јагода	Доње Злегиње	конвенционална
Морава (I. C.) <sup>1</sup>	Сремски Карловци, Голобок	органска / конвенционална
Мускат отонел	Копљари	конвенционална
Неопланта	Сремски Карловци	конвенционална

<sup>1</sup>I.C. међународна ознака за интерспецис сорту



Сорта	Локалитет	Тип производње
Панониа (I. С.) <sup>1</sup>	Заклопача, Сремски Карловци	органска
Петка (I. С.) <sup>1</sup>	Сремски Карловци	органска
Петра (I. С.) <sup>1</sup>	Сремски Карловци	конвенционална
Ризлинг италијански	Сремски Карловци, Радмиловац, Доње Злегиње	конвенционална
Ризлинг рајнски	Радмиловац	конвенционална
Рубинка (I. С.) <sup>1</sup>	Сремски Карловци	органска
Sauvignon blanc	Страгари, Радмиловац, Сремски Карловци	конвенционална
Сила	Сремски Карловци	конвенционална
Смедеревка	Мала Сугубина	конвенционална
Тамјаника бела	Мала Сугубина	конвенционална
Жупљанка	Сремски Карловци	конвенционална

Узорковање, односно добијање репрезентативног узорка, је од велике важности за добијање поузданих резултата. Такође, након узорковања, неопходно је водити рачуна о даљем руковању, чувању, припреми и узимању узорака за анализу. Према Правилнику о методама узорковања и испитивања хране ради утврђивања остатака средстава за заштиту биља у храни („Сл. гласник РС“ 110/12), који је усаглашен са Уредбом 63/2002, приликом одређивања остатака пестицида и количине ОТА у грозђу, потребно је формирати репрезентативни почетни узорак од минимум 2 килограма (за анализу се користи цео плод). Узорак се, након

допремања у лабораторију, до момента анализе чува у полиетиленским кесама, у замрзивачу. Хомогенизовањем узорка, добија се смеша од које се узима лабораторијски узорак. Из њега се формира аналитички узорак чија је количина, која се користи за анализу (10 g), дефинисана методом Anastassiades et al. (2003). Узорци сортних белих вина (13) и локалитети са којих су узорковани су приказани у Табели 3, а узорци сортних црвених вина (19) и локалитети са којих су узорковани у Табели 4. Вино је такође узорковано у пет понављања, укупно 160 узорака за анализу. Према Уредби 63/2002 једна боца вина је репрезентативан узорак, а аналитички узорак је 10 ml.

Табела 3. Бела сортна вина и локалитет са ког је узорковано

Сортно вино	Локалитет
Chardonnay	Радмиловац
Ризлинг рајнски	
Ризлинг италијански	
Sauvignon blanc	
Панонија	Заклопача
Сила	Сремски Карловци
Ризлинг италијански	
Петра	
Бачка	
Морава	Голобок
Ризлинг италијански	Доње Злегиње
Јагода	
Тамјаника бела	Мала Сугубина

Табела 4. Црвена сортна вина и локалитет са ког је узорковано

Врста вина	Локалитет
Прокупац	Радмиловац
Гаме и Франковка	
Pinot noir	
Вранац	
Cabernet sauvignon	
Cabernet franc	
Мерло	Заклопача
Регент	Страгари
Пробус	Сремски Карловци
Cabernet sauvignon	
Cabernet sauvignon, Мерло, Пробус	
Мерло	Голобок
Cabernet sauvignon	Доње Злегиње
Pinot noir	
розе	Мала Сугубина
Cabernet sauvignon	Топола
Cabernet sauvignon	Умчари
Прокупац	

#### 4.4. Припрема основних и радних раствора

Основни раствори стандарда пестицида су припремани растварањем  $10 \pm 0,1$  mg основног стандарда у 10 ml одговарајућег растварача (метанол, ацетон, ацетонитрил, толуен). Основни микс раствора стандарда (конц. 10  $\mu\text{g/ml}$ ) је добијен одмеравањем прерачунатих запремина основних стандардних раствора у нормалном суду од 10 ml (Прилог 1). Разблаживањем основног микс раствора стандарда (10 пута) добијен је радни микс раствор стандарда (конц. 1  $\mu\text{g/ml}$ ), а као растварач коришћен је ацетонитрил. Ова два раствора стандарда су коришћена за обogaћивање узорака и за припрему калибрационих раствора. Припремљени основни стандарди су чувани у замрзивачу на  $-18$   $^{\circ}\text{C}$ , а радни и калибрациони раствори у фрижидеру на  $4$   $^{\circ}\text{C}$  (SANTE/11813/2017). Основни раствор интерног стандарда карбофурана d3 (конц. 1,00 mg/ml) је припремљен растварањем 10,0 mg основног стандарда у 10 ml ацетонитрила. Радни раствор интерног стандарда карбофурана d3 (10  $\mu\text{g/ml}$ ) је припремљен разблаживањем 100  $\mu\text{l}$  основног стандарда концентрације 1,00 mg/ml у 10 ml ацетонитрила.

Основни раствор ОТА је концентрације 10,13  $\mu\text{g/ml}$  у ацетонитрилу. Разблаживањем 987,2  $\mu\text{l}$  основног раствора у 10 ml ацетонитрила добијен је радни раствор ОТА концентрације 1  $\mu\text{g/ml}$ . Радни раствор ОТА је коришћен за прављење калибрационих раствора и за обogaћивање узорака.

#### 4.5. Припрема узорака

За припрему узорака грожђа и вина за анализу остатака пестицида и количине ОТА према QuEChERS методи (Anastassiades et al., 2003) измери се  $10 \text{ g} \pm 0,01 \text{ g}$  у кивети од 50 ml, дода се 100  $\mu\text{l}$  интерног стандарда карбофурана d3 (конц. 10  $\mu\text{g/ml}$ ) и 10 ml ацетонитрила. Кивета се меша на вортексу 1 минут. Ацетонитрил се користи као екстракциони растварач у присуству смесе соли (4 g магнезијум сулфата, 1 g натријум хлорида, 1 g натријум цитрата дихидрата и 0,5 g динатријум цитрата сесквихидрата). Да би екстракција била ефикасна одмах по додавању соли у кивету смеша се мућка интензивно да би се спречило згрушњавање соли, а повећала моћ екстракције. Након мућкања, узорак се центрифугира 5 минута на

4000 обртаја. Други корак је пречишћавање екстракта методом дисперзионе екстракције на чврстој фази помоћу магнезијум сулфата и примарних-секундарних амина (PSA). Узме се аликуот од 1 ml екстракта и пренесе у кивету од 2 ml у којој се налази смеша 25,0 mg PSA, 150,0 mg MgSO<sub>4</sub> и 2,5 mg активног угља за пигментисане узорке (црно грозђе и црвено вино), односно 150 mg PSA и 900 mg MgSO<sub>4</sub> за узорке воћа и поврћа који не садрже пигменте (бело грозђе и бело вино). Узорак се мућка на вортексу 30 секунди, а затим центрифугира 10 минута на 5000 обртаја. Након центрифугирања се узима аликуот од 0,5 ml и упарава у струји азота. Добијени екстракт се раствара у 0,5 ml мобилне фазе (50% (0,1% HCOOH) H<sub>2</sub>O:50% (0,1% HCOOH) MeOH, V/V) и анализира помоћу LC-MS/MS-а.

За одређивање ОТА се узима 1 ml ацетонитрилног екстракта из првог корака припреме узорака, филтрира и директно анализира помоћу LC-MS/MS-а.

#### 4.6. Хроматографска метода

Услови течне хроматографије са масеним спектрометром за одређивање остатака пестицида и ОТА су дати у Табели 5.

Табела 5. Услови за LC-MS/MS анализу

<b>Течни хроматограф</b>	
Инструмент	Agilent 1260 Infinity
Аутосамплер	1260 HiP ALS, модел G1367E
Запремина ињектованог узорка	V <sub>inj.pest</sub> =2 µl, V <sub>inj.ОТА</sub> =10 µl
Тип ињектовања	са испирањем
Бинарна пумпа	1260 BinPump, модел G1312B
Мобилна фаза	А: 0,1% мравља киселина у води В: 0,1% мравља киселина у метанолу
Проток	0,4 ml/min за остатке пестицида и 0,3 ml/min за ОТА
Градијент	0 мин - 10% В 2 мин - 10% В

	15 мин - 80% В 20 мин - 80% В 23 мин - 98% В 25 мин - 98% В
Време трајања анализе	25 мин
Време враћања на почетне услове	5 мин
Термостат колоне	1290 ТСС, модел G1316C
Температура колоне	30 °C
Детектор са низом диода	1260 DAD VL+, модел G1315C
<b>Масени спектрометар</b>	
Инструмент	Agilent 6460A Triple Quad LC/MS
Јонски извор	Agilent Jet Stream (AJS)
Тип јонизације	±ESI
Проток гаса за сушење (drying gas flow)	5 ml/min
Температура помоћног гаса за сушење (sheath gas temperature)	250 °C
Температура гаса (gas temperature)	300 °C
Притисак на распршивачу (nebulizer)	45 psi
Опсег мерења маса	m/z 5 - 3,000
Напон капиларе	positive 3500 V; negative 3500 V
Frag (V)	70 - 180 V
CE (V)	0 - 73 V

#### 4.7. Параметри валидације

##### а) Линеарност одзива детектора

Линеарност одзива детектора за остатке пестицида у грозђу и у вину је испитивана помоћу седам нивоа масених концентрација у опсегу од 0,005 - 0,500 µg/ml. Провера линеарности одговора детектора за ОТА је испитивана помоћу шест нивоа масених концентрација у грозђу у интервалу од 0,001 - 0,050 µg/ml и помоћу пет концентрација у вину у опсегу од 0,0005 - 0,010 µg/ml. Сва

одређивања су рађена у два понављања. Калибрација је рађена у мобилној фази и у матриксу узорка, због одређивања утицаја матрикса на испитиване пестициде. Калибрација у матриксу за пестициде је рађена тако што је 0,5 ml екстракта бланк узорка упарено у струји азота, а затим растворено у 0,5 ml калибрационих стандарда. Калибрациони стандарди су припремљени у мобилној фази (Табела 6).

Табела 6. Припрема калибрационих раствора пестицида

$C_{\text{кал.стд}} (\mu\text{g/ml})$	$C_{\text{рад.стд}} (\mu\text{g/ml})$	$V_{\text{рад.стд}} (\mu\text{l})$	$V_{\text{ISTD}} (\mu\text{l})$ (10 $\mu\text{g/ml}$ )	$V_{\text{норм.суд}} (\text{ml})$
<b>0,005</b>	1	50	100	10
<b>0,01</b>	1	100	100	10
<b>0,025</b>	10	25	100	10
<b>0,05</b>	10	50	100	10
<b>0,1</b>	10	100	100	10
<b>0,2</b>	10	200	100	10
<b>0,5</b>	10	500	100	10

За одређивање утицаја матрикса на охратоксин А 1 ml ацетонитрилног екстракта бланк узорка је упарен и растворен у 1 ml калибрационих раствора у ацетонитрилу. Калибрациони раствори за ОТА су прављени према Табели 7.

Табела 7. Припрема калибрационих раствора ОТА

$C_{\text{кал.стд}} (\mu\text{g/ml})$	$C_{\text{рад.стд}} (\mu\text{g/ml})$	$V_{\text{рад.стд}} (\mu\text{l})$	$V_{\text{норм.суда}} (\text{ml})$
<b>0,0005</b>	1	5	10
<b>0,001</b>	1	5	5
<b>0,002</b>	1	10	5
<b>0,005</b>	1	25	5
<b>0,01</b>	1	50	5
<b>0,02</b>	1	100	5
<b>0,05</b>	1	250	5

#### б) Границе детекције и мерења

Граница мерења (LOQ - **L**imit of **Q**uantification) је одређена експерименталним путем, обогаћивањем бланк узорка грозђа и вина, тако да финална

концентрација за пестициде буде 0,010 mg/kg, за ОТА у грожђу 0,002 mg/kg и у вину 0,001 mg/kg. Анализа узорака је рађена према описаној QuEChERS методи 4.5. Граница детекције (LOD - **L**imit of **D**etection) је одређена помоћу MassHunter softvera, на основу односа сигнал/шум  $\leq 5$ . Овај параметар је израчунат на основу стандардне девијације висине пика и висине шума у хроматограму за најнижу концентрацију калибрационог раствора у обе врсте грожђа и обе врсте вина.

### с) Одређивање приноса екстракције

Принос екстракције („*recovery*“) је испитан обогаћивањем узорака грожђа и вина за које је потврђено да не садрже остатке пестицида. Узорци су обогаћивани на четири концентрациона нивоа (0,010; 0,025; 0,050 и 0,100 mg/kg) додавањем основног и радног микс раствора пестицида, у по три понављања, како је приказано у Табели 8. Узорци су проведени кроз претходно описан поступак екстракције и пречишћавања (4.5).

Табела 8. Поступак обогаћивања бланк узорка за одређивања приноса екстракције пестицида за грожђе и вино

Ниво обогаћења (mg/kg)	$C_{\text{рад.стд}}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	$V_{\text{рад.стд}}$ ( $\mu\text{l}$ )	$V_{\text{ISTD}}$ ( $\mu\text{l}$ ) ( $C=10 \text{ g/ml}$ )	Маса узорка (g)	Очекиване концентрације анализата ( $\mu\text{g/kg}$ )
0,01	1	100	100	10	0,01
0,025	10	25	100	10	0,025
0,05	10	50	100	10	0,05
0,1	10	100	100	10	0,1

Принос екстракције ОТА у грожђу је испитиван обогаћивањем бланк узорка грожђа на четири концентрациона нивоа (2; 5; 10 и 20  $\mu\text{g/kg}$ ) у три понављања (Табела 9). Узорци су припремљени према поступку 4.5.



Табела 9. Поступак обогаћивања бланк узорка за одређивања приноса екстракције ОТА у грозђу

Ниво обогаћења ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	$C_{\text{рад.стд}}$ ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	$V_{\text{рад.стд}}$ ( $\mu\text{l}$ )	Маса узорка (g)	Очекиване концентрације ОТА ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
2	1	20	10	0,002
5	1	50	10	0,005
10	1	100	10	0,01
20	1	200	10	0,02

Принос екстракције за ОТА у вину је испитиван обогаћивањем бланк узорка вина на четири концентрациона нивоа (1; 2; 5 и 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) у три понављања (Табела 10). Узорци су припремљени према поступку 4.5.

Табела 10. Поступак обогаћивања бланк узорка за одређивања приноса екстракције за ОТА у вину

Ниво обогаћења ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	$C_{\text{рад.стд}}$ ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	$V_{\text{рад.стд}}$ ( $\mu\text{l}$ )	Маса узорка (g)	Очекиване концентрације ОТА ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
1	1	10	10	0,001
2	1	20	10	0,002
5	1	50	10	0,005
10	1	100	10	0,01

#### d) Поновљивост методе

Поновљивост методе је испитана припремањем једног узорка у шест понављања на истом концентрационом нивоу, за све матриксе (грозђе и вино) и за све анализе (пестициди и ОТА) на исти начин. Добијени резултати су статистички обрађени помоћу Microsoft Excel 2013 и добијена вредност %RSD је упоређена са критеријумом SANTE/11813/2017 документа ( $\%RSD \leq 20\%$ ) за пестициде и Уредбом 401/2006 за ОТА.

## **4.8. Процена изложености популација**

### **4.8.1. Методологија за процену изложености**

Улазни елементи потребни за процену изложености су следећи: популационе групе од интереса, подаци о просечној телесној маси за популационе групе, подаци о конзумираној количини грозђа/вина, подаци о садржају остатака активних супстанци пестицида, односно охратоксина А у грозђу/вину.

Унос остатака пестицида, односно охратоксина А, је процењен применом детерминистичког приступа. На основу процењеног уноса, поређењем са толеришућим уносом за остатке детектованих пестицида, односно охратоксин А, окарактерисан је следствени ризик.

### **4.8.2. Улазни елементи**

#### ***Популационе групе***

Карактеристично је да се грозђе конзумира у свим узрасним добима, изузимајући период искључивог дојења, док вино конзумира само одрасла популација. Потребно је нагласити да су одојчад и деца осетљивија на деловање токсина у односу на одрасле особе, због специфичних захтева у исхрани, мање телесне масе, интензитета метаболичких процеса, смањене могућности детоксификације и недовољне развијености појединих органа и ткива (Haughton et al., 2012; Mitchell et al., 2017).

Популација је посматрана кроз следеће популационе групе: мала деца, деца предшколског узраста, деца (7 - 10 година), адолесценти (11 - 14 година) и одрасли (преко 15 година).

#### ***Просечна телесна маса различитих популационих група***

У Републици Србији нису доступни званични национални подаци о просечној телесној маси одојчади, као ни деце предшколског узраста. Стога су у прорачуну уноса коришћене вредности засноване на подацима из литературе (10 и 20 kg, редом) (EFSA, 2012a). Просечне телесне масе осталих популационих група добијене су из извештаја о здравственом стању становништва Републике Србије,

спроведеног на националном нивоу 2013. године: 33,17 kg за децу (7 - 10 година), 51,78 kg за адолесценте (11 - 14 година) и 76,27 kg за одрасле (Ипсос, 2014).

### ***Конзумирање грожђа и вина***

С обзиром да за одојчад и малу децу нису доступни званични национални подаци о конзумирању грожђа, за израчунавање изложености узете су исте вредности као за остале популационе групе. За одређивање потрошње вина од стране одраслих особа (преко 15 година) искоришћени су подаци из националне годишње анкете о потрошњи домаћинства у Републици Србији за 2016. годину (Билтен 627. 2017).

### ***Садржај остатака пестицида, односно охратоксина А у грожђу и вину***

За израчунавање су коришћени подаци о садржају остатака активних супстанци пестицида, односно охратоксина А у грожђу и вину добијени у овом истраживању.

#### **4.8.3. Процена изложености популација активним супстанцама пестицида и охратоксину А преко грожђа и вина**

Детерминистичка процена изложености популације остацима активних супстанци пестицида, односно охратоксину А из грожђа и вина, спроведена је коришћењем Microsoft Excel 2010 софтвера (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA).

Формирана су четири сценарија за концентрацију охратоксина А: три заснована на различитом третману резултата за узорке у којима охратоксин А није детектован ( $<LOD$ ): нула (H1),  $1/2 LOD$  (H2) и  $LOD$  (H3), и један додатни сценарио у којем су посматрани само контаминирани узорци (H4). Специфично за процену уноса охратоксина А преко грожђа, од значаја су само сценарији H2 и H3, јер је концентрација охратоксина А у сценаријима H1 и H4 једнака нули. Додатно, у оквиру датог сценарија, за концентрацију охратоксина А коришћене су просечна вредност и различити перцентили (P50 и P95). При томе, у случају грожђа, просечна вредност је идентична са P50, док су код вина P50 и P95 међусобно идентичне и једнаке нули у H1, незнатно различите од просечне концентрације у H2 и H3, односно идентичне са просечном у H4 сценарију. Стога

је при процени уноса охратоксина А преко вина у обзир узета само просечна концентрација, у сва четири сценарија. Унос охратоксина А израчунат је на недељном нивоу, множењем концентрације охратоксина А у специфичном сценарију са конзумираном количином грозђа, односно вина, и затим изражен по килограму телесне масе.

Процена хроничне изложености остацима пестицида спроведена је за пестициде који су детектовани у узорцима грозђа, односно вина, и то коришћењем просечних концентрација за појединачне пестициде детектоване у грозђу, док је у случају вина поред наведеног разматран и сценарио са максималним утврђеним концентрацијама остатака пестицида. Хронични унос остатака пестицида израчунат је на дневном нивоу, множењем концентрације датог пестицида у специфичном сценарију са конзумираном количином грозђа, односно вина, и затим изражен по килограму телесне масе.

Вредности конзумиране количине грозђа и вина, као и вредности за телесну масу популационе групе, коришћене су као фиксне вредности.

У односу на присутне остатке пестицида разматрана је и изложеност при акутном уносу, и то за активне супстанце пестицида за које су дефинисане акутне референтне дозе. За израчунавање уноса коришћени су одговарајући подаци и IESTI (International Estimate of Short-Term Intake) једначина из EFSA Primo модела (EFSA и RIVM - the Dutch National Institute for Public Health and the Environment, 2015). Научни одбор EFSA, у сарадњи са FAO и WHO, је дао једначину за израчунавање акутне изложености остацима пестицида преко хране - IESTI једначина - Revisiting the International Estimate of Short-Term Intake used to estimate the acute exposure to pesticide residues via food (EFSA, 2012a,b; EFSA, 2015; Boon, 2018; Reich, 2018; Solecki, 2018):

$$IESTI = (LP \times HR \times v) / tm$$

Према подацима из EFSA Primo модела, за грозђе велика порција (LP) износи 1,80262 kg/особи за одрасле и адолесценте и 0,0676 kg/особи за децу, а фактор варијабилности (v) је 1. За вино велика порција за одраслу популацију је одређена на основу велике порције за грозђе, узимајући у обзир фактор приноса од 0,7 (Robinson, 2006). Највиша концентрација пестицида (HR) је максимална утврђена концентрација датог пестицида у овом раду, а за просечне телесне масе

популационих група коришћене су напред наведене вредности за популацију у Републици Србији. У случају када добијене вредности премашују 100% TDI ризик се сматра неприхватљивим.

#### **4.8.4. Процена ризика**

Ризик при хроничном уносу је окарактерисан односом између процењеног и толеришућег уноса и изражен као проценат толеришућег уноса. За охратоксин А толеришући недељни унос износи 120 ng/kg тм (EFSA, 2006). Вредности толеришућег дневног уноса (TDI - Tolerable Daily Intake) за активне супстанце пестицида, као и акутне референтне дозе, преузете су из базе података за пестициде EU

(<http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eupesticidesdatabase/public/?event=activesubstance.selection&language =EN>) и приказане у Табели 11. Ризик при акутном уносу је окарактерисан односом између процењеног акутног уноса и акутне референтне дозе (ARfD - Acute Reference Dose) и изражен као проценат акутне референтне дозе.

Табела 11. Акутне референтне дозе и толеришући дневни уноси одабраних активних супстанци пестицида

	<b>ARfD</b> <b>mg/kg тм</b>	<b>TDI</b> <b>mg/kg тм/дан</b>
азоксистробин	нп*	0,2
боскалид	нп	0,04
бупрофезин	0,5	0,01
цимоксанил	0,08	0.013
ципродинил	нп	0,03
диметоморф	0,6	0,05
дифеноконазол	0,16	0,01
фенхексамид	нп	0,2
флудиоксонил	нп	0,37
флутриафол	0,05	0,01
ипродион	0,06	0,02
квиноксифен	нп	0,2
крезоксим метил	нп	0,4
металаксил	0,5	0,08
миклобутанил	0,31	0.025
пираклостробин	0,03	0,03
пириметанил	нп	0,17
пропиконазол	0,3	0,04
спироксамин	0,1	0.025
тебуконазол	0,03	0,03

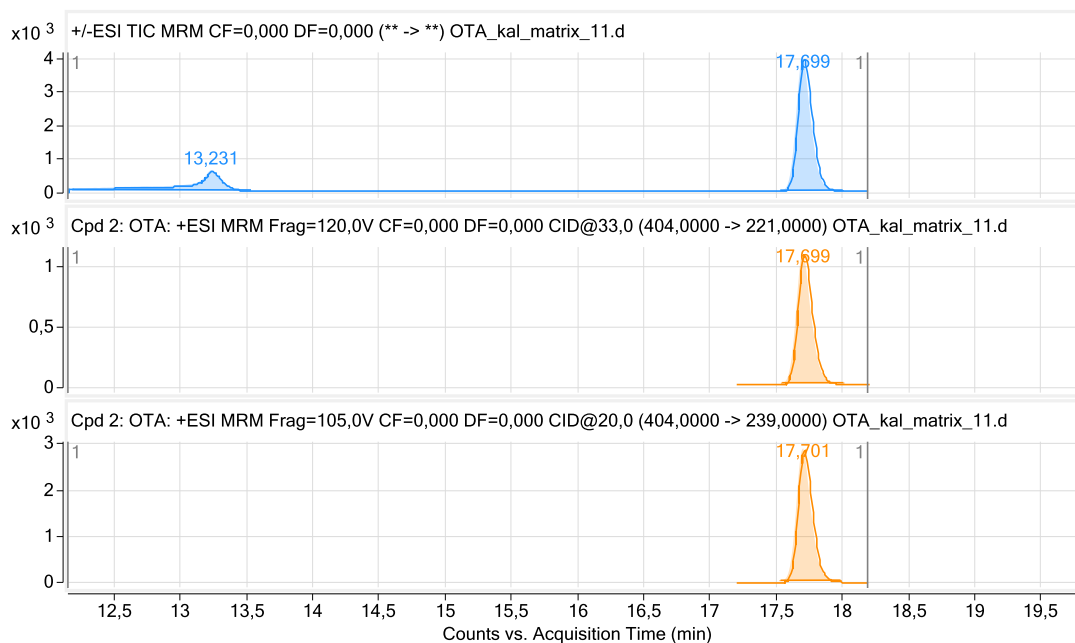
\* нп - није примењиво

## 5. Резултати рада

### 5.1. Оптимизација услова за одређивање охратоксина А

Развој хроматографске методе за охратоксин А је урађен према захтевима SANTE/12089/2016 који се односе на перформансе аналитичких метода и тумачење резултата. Захтеви за месену спектрометрију се односе на одговарајући одабир јонских прелаза, који треба да буду специфични и селективни. Идентификација је базирана на хроматографским пиковима који потичу од два или више специфичних јона, који по могућству треба да укључују молекулски јон као родитељ јон. Облик пика треба да је исти или сличан у узорку и у стандарду. Однос јона треба да се креће у опсегу  $\pm 30\%$  (релативно), поређењем површине пикова фрагментисаних јона у узорку и средње вредности односа јона калибрационих стандарда, који се израчунава као однос површине пикова два фрагментна јона, мањег у односу на већи помножен са 100. Такође, време задржавања ОТА у анализираном узорку мора одговарати времену задржавања средње вредности калибрационих стандарда и у истој секвенци не сме бити веће од  $\pm 0,2$  мин.

Пре развоја методе за екстракцију ОТА, потребно је наћи реакције за праћење јона (SRM), енергије фрагментације (Fr.) и енергије колизионе ћелије (CE) који ће дати најбољи одговор. За добијање најбољих SRM коришћен је Mass Hunter Optimizer Software Version B06.00 (Agilent Technologies 2011). Стандард ОТА концентрације 1  $\mu\text{g/ml}$  је директно убациван у јонски извор и тражене су најоптималније фрагментационе и колизионе енергије за SRM прелазе. Утврђено је да родитељ јон охратоксина А има  $m/z$  404, јон за квантификацију ( $Q$ )  $m/z$  239 се добија при енергији фрагментације од 105 V и колизионој енергији од 20 V и јон за квалитативну потврду ( $q$ )  $m/z$  221 при енергији фрагментације 120 V и CE 33 V. Време задржавања ОТА (ретенционо време,  $t_R$ ) на колони је 17,69 минута (Слика 3).



Слика 3. LC-MS/MS хроматограм ОТА (укупни јонски хроматограм ТИС и SRM хроматограми)

Развој методе детекције и квантификације ОТА подразумевао је прилагођавање QuEChERS методе за његово истовремено одређивање са остацима активних супстанци пестицида. Истовремена екстракција остатака активних супстанци пестицида и ОТА, штеди време потребно за анализу узорака, као и употребу хемикалија. Такође, на овај начин се избегава употреба имуноафинитетних колона за одређивање ОТА и знатно се смањује цена анализе узорака. Узорак црног грожђа, за који је потврђено да не садржи ОТА, је обогаћен стандардом охратоксина А на концентрационим нивоима 0,1 µg/ml и 1 µg/ml. За екстракцију су коришћени QuEChERS китови уз додатак 1) ацетонитрила и 2) 0,1% сирћетне киселине у ацетонитрилу. Добијени екстракти су пречишћавани помоћу три различита типа dSPE китова: 1) dSPE кит за воће и поврће тј. за матриксе са већим садржајем воде; 2) dSPE кит за пигментисане узорке и 3) dSPE кит за масне узорке. Такође, испитана је ефикасност пречишћавања преко BondElut Micotoxin китова. Истовремено су узети аликвоти од по 1 ml ацетонитрилног екстракта и закишељеног ацетонитрилног екстракта, профилтрирани и директно анализирани. Један аликвот ацетонитрилног екстракта је закишељен мрављом киселином и анализиран. Приноси екстракције, за сва три начина пречишћавања, за оба



концентрациона нивоа, су били 0%, док су за сва три непречишћена екстракта на концентрационом нивоу од 1 µg/ml били преко 86% (Табела 12). Ацетонитрилни и закишељени ацетонитрилни екстракти су остављени на собној температури и поново хроматографисани након 24 часа. Принос екстракције за ОТА у ацетонитрилном екстракту је био већи од 85 %, док се у закишељеним ацетонитрилним екстрактима смањио на 83 %.

Табела 12. Испитивање ефикасности различитих поступака пречишћавања ОТА

C <sub>ОТА</sub> (µg/kg)	Принос екстракције (recovery, %)						
	Пречишћавање преко dSPE за воће и поврће	Пречишћавање преко dSPE за пигментисане узорке	Пречишћавање преко dSPE за масне узорке	Пречишћавање преко Bond Elut Мусотохп китова	Екстракт у АсCN без пречишћавања	Екстракт у АсCN + 0.1% НСООН без пречишћавања	Екстракт у АсCN + 1% СНЗООН без пречишћавања
0,1	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	90,45	86,58	92,7

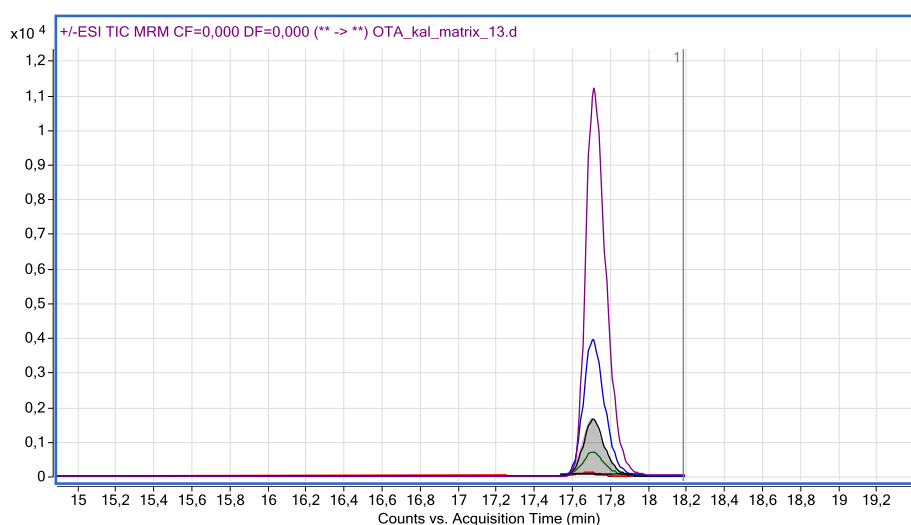
### 5.1.1. Линеарност одзива детектора за охратоксин А

#### Линеарност одзива детектора за охратоксин А у грожђу

Испитивање линеарности је рађено анализирањем стандарда ОТА у раствору ацетонитрила, матриксу црног и белог грожђа (matrix-match калибрација) у опсегу концентрација од 0,001 - 0,050 µg/ml, што одговара 1,00 - 50,00 µg/kg, и помоћу методе стандардног додатка (у опсегу концентрација од 0,002 - 0,020 µg/ml, или 2 - 20 µg/kg). Једначине калибрационих кривих у обе врсте грожђа, и за сва три начина одређивања линеарности, су дате у Табели 13. На Слици 4 су упоређени ТИС хроматограми ОТА за различите калибрационе нивое. Калибрације у ацетонитрилу и у матриксу узорка су рађене у по два понављања за сваки калибрациони ниво.

Табела 13. Једначине калибрационих кривих за ОТА у црном и белом винском грожђу

	ЦРНО ГРОЖЂЕ $y=a*x^2+b*x+c$	БЕЛО ГРОЖЂЕ $y=a*x^2+b*x+c$
Калибрација у растварачу	$y=3,38*x^2+1601,14*x-1667,82$ $R^2=0,998$	$y=1221920,27*x^2+1736748,65*x-117,90$ $R^2=0,996$
калибрација у матриксу (matrix-match cal.)	$y=2,07*x^2+1134,28*x-1350,56$ $R^2=0,999$	$y=-908894,47*x^2+1926852,04*x-703,72$ $R^2=0,998$
Калибрација методом стандардног додатка	$y=-2,64*x^2+840,78*x-60,94$ $R^2=0,999$	$y=-14273469,57*x^2+1511610,52*x+932,53$ $R^2=0,997$



Слика 4. ТИС хроматограми ОТА на различитим калибрационим нивоима у матриксу црног грожђа

Поређењем нагиба калибрационих кривих у растварачу и у матриксима израчунат је утицај матрикса (%) црног и белог грожђа на ОТА. Утицај матрикса црног грожђа износи 29,16%, а белог -10,95%. Црно грожђе има значајан утицај на одређивање концентрације ОТА (матрикс ефекат је већи од 15%), односно доводи до повећања сигнала и неопходна је калибрација у матриксу приликом анализе узорака на присуство ОТА. Матрикс белог грожђа има мали утицај на његову детекцију (< 15%), што доводи до незнатног смањења сигнала. Прикупљени узорци црног и белог винског грожђа су анализирани у односу на калибрацију методом стандардног додатка.

## Линеарност одзива детектора за охратоксин А у вину

Узимајући у обзир да је максимално дозвољена количина ОТА у вину 2 µg/kg, испитиван је опсег линеарности од 0,5 до 10 ng/ml (0,5 - 10,00 µg/kg), по два понављања за сваки калибрациони ниво за бело и црвено вино у раствору ацетонитрила и матриксу узорака, а методом стандардног додатка у опсегу концентрација од 1,00 - 10,00 ng/ml. Резултати су дати у Табели 14.

Табела 14. Једначине калибрационих кривих за ОТА у црвеном и белом вину

	ЦРВЕНО ВИНО $y=a*x^2+b*x+c$	БЕЛО ВИНО $y=a*x^2+b*x+c$
Калибрација у растварачу	$y=11129674,71*x^2+312011,36*x+48,63$ $R^2=0,993$	
калибрација у матриксу (matrix-match cal.)	$y=12672551,78*x^2+459401,93*x+95,06$ $R^2=0,998$	$y=-8787902,35*x^2+188798,87*x+5,82$ $R^2=0,995$
Калибрација методом стандардног додатка	$y=5606774,24*x^2+669564,72*x+150,60$ $R^2=0,990$	$y=279773,47*x+60,44$ $R^2=0,996$

Црвено вино има велики утицај матрикса и доводи до смањења сигнала ОТА и износи -47,24%, док у белом вину доводи до повећања сигнала и износи 39,49%. Да би се компензовао утицај матрикса и одредила количина ОТА у прикупљеним узорцима црвеног и белог вина коришћена је калибрација методом стандардног додатка.

### 5.1.2. Границе детекције и мерења за охратоксин А

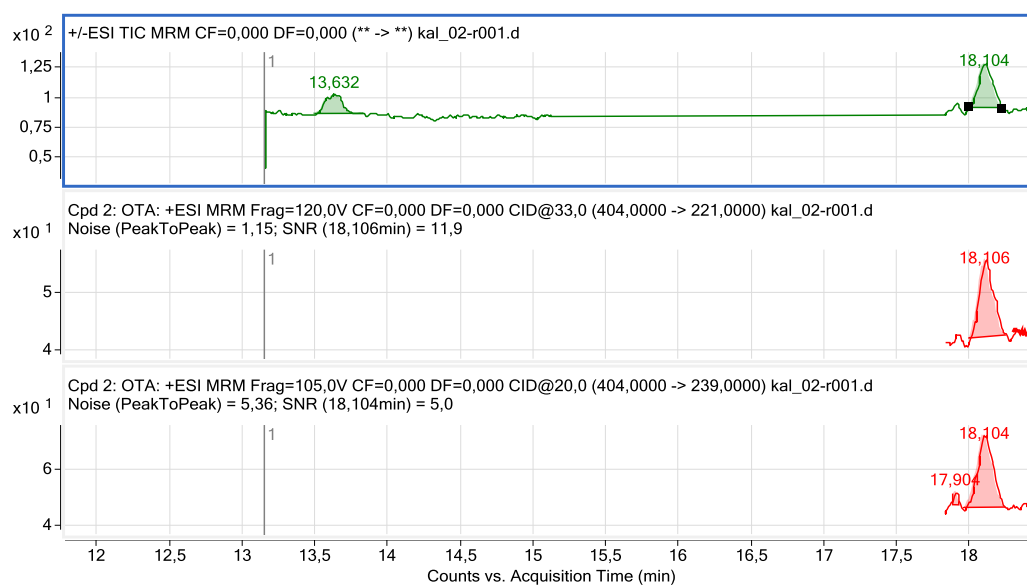
#### Границе детекције и мерења за охратоксин А у грозђу

Граница детекције LOD за ОТА и у црном и у белом грозђу је израчуната помоћу калкулатора „Calculate Signal-to-Noise“ који је део Qualitative Mass Hunter B.06.00 програма. За израчунавање LOD коришћен је хроматограм калибрационог узорка најниже концентрација 1 µg/kg. Израчуната вредност LOD у црном грозђу је 0,33 µg/kg, а у белом грозђу 0,5 µg/kg. Добијени резултати су у корелацији са резултатима за утицај матрикса. За границу мерења постављен је најнижи калибрациони ниво од 1 ng/ml (одговара 1 µg/kg), који је 10 пута мањи од максимално дозвољене количине ОТА у сувом винском воћу (10 µg/kg). Однос сигнал/шум за најнижи калибрациони ниво (40) је довољно велики за поуздану

интеграцију пика, и показује високу селективност и осетљивост методе за одређивање ОТА.

### Границе детекције и мерења за охратоксин А у вину

Граница детекције у вину је, такође, израчуната помоћу калкулатора „Calculate Signal-to-Noise“ (Qualitative Mass Hunter B.06.00). LOD је израчунат за најнижи калибрациони ниво у матриксу црвеног и белог вина од 0,5 µg/kg. Израчуната вредност LOD у црвеном и белом вину је 0,33 µg/kg, док је за LOQ усвојена вредност најниже тачке калибрације (0,5 µg/kg ) (Слика 5).



Слика 5. TIC и SRM хроматограми ОТА са израчунатим односом Signal-to-Noise

### 5.1.3. Тачност и прецизност за охратоксин А

#### Тачност и прецизност за охратоксин А у грозђу

Одређивањем приноса екстракције („recovery“) одређена је тачност методе. Принос екстракције је испитан обогаћивањем бланк узорак црног и белог грозђа на четири концентрациона нивоа у три понављања (Табела 15). Средња вредност приноса екстракције за црно грозђе се кретала од 81,2% на концентрационом нивоу од 10 µg/kg до 104,2% на концентрационом нивоу од 2 µg/kg. Коефицијент

варијације за црно грозђе је био од 1,03 - 16,1%, чиме су задовољени услови Уредбе 401/2006 (тачност 70 - 110%; поновљивост  $RSDr \leq 20\%$ ).

Средња вредност приноса екстракције за бело грозђе се кретала у распону од 93,7 (за ниво 10  $\mu\text{g/kg}$ ) до 117,2% (2  $\mu\text{g/kg}$ ), уз % RSD од 2,01% до 4,46%.

Табела 15. Принос екстракције за ОТА у црном и белом грозђу

Ниво	2 $\mu\text{g/kg}$ (n=3)		5 $\mu\text{g/kg}$ (n=3)		10 $\mu\text{g/kg}$ (n=3)		20 $\mu\text{g/kg}$ (n=3)		Sred. Rec (%)	%RSDr
	Rec (%)	%RSD	Rec (%)	%RSD	Rec (%)	%RSD	Rec (%)	%RSD		
Матрикс										
Црно грозђе	104,2	1,03	98	2,53	81,2	2,54	83,7	16,1	91,8	12,1
Бело грозђе	117,2	4,46	102,3	2,01	93,7	5,5	98,5	3,21	102,9	9,86

Спајковани узорци за одређивање приноса екстракције су коришћени за прављење калибрационих кривих (Табела 13) на основу којих је одређивана количина ОТА у узорцима грозђа.

Поновљивост методе је одређена испитивањем по шест обогаћених контролних узорака црног и белог грозђа на концентрационом нивоу од 2  $\mu\text{g/kg}$ . Резултати су приказани у Табели 16.

Табела 16. Поновљивост ОТА у шест понављања у црном и белом грозђу

	Поновљивост на концентрационом нивоу 2 $\mu\text{g/kg}$						% RSDr
	1	2	3	4	5	6	
Црно грозђе	1,81	1,88	1,78	1,82	1,74	1,77	2,7
Бело грозђе	2,15	2,25	2,15	2,11	2,24	2,21	2,58

Поновљивост изражена преко %RSDr је за црно грозђе износила 2,70%, а за бело грозђе 2,58% чиме су испуњени критеријуми Уредбе 401/2006 ( $RSDr \leq 20\%$ ).

#### Тачност и прецизност (поновљивост) за охратоксин А у вину

Одређивање тачности за ОТА у вину је рађено по истом поступку као и за грозђе. Концентрациони нивои помоћу којих је одређивана тачност методе су 1, 2, 5 и 10  $\mu\text{g/kg}$  (Табела 17).

Табела 17. Принос екстракције за ОТА у црвеном и белом вину

Ниво	1 µg/kg (n=3)		2 µg/kg (n=3)		5 µg/kg (n=3)		10 µg/kg (n=3)		Sred. Rec (%)	%RSDr
	Rec (%)	%RSD	Rec (%)	%RSD	Rec (%)	%RSD	Rec (%)	%RSD		
Матрикс										
Црвено вино	106,7	5,41	101,7	7,51	97,3	1,19	100,3	8,48	101,5	3,83
Бело вино	110,5	23,29	90,6	5,04	102,3	5,25	99,7	1,57	100,7	8,11

Средња вредност приноса екстракције за црвено вино се кретала од 97,3% на концентрационом нивоу од 5 µg/kg до 106,7% на концентрационом нивоу од 1 µg/kg. Коефицијент варијације за црвено вино је био од 1,19 - 8,48%, чиме су задовољени услови Уредбе 401/2006 за тачност (70 - 110%).

Средња вредност приноса екстракције за бело вино је била у распону од 90,6% (2 µg/kg) до 110,5% (1 µg/kg), уз %RSDr од 1,57 до 23,29%.

Анализом шест обogaћених узорака црвеног и белог вина за које се зна да не садрже ОТА на концентрационом нивоу од 1 µg/kg одређена је поновљивост (Табела 18).

Табела 18. Поновљивост ОТА у шест понављања у црвеном и белом вину

	Поновљивост на концентрационом нивоу 1 µg/kg						%RSDr
	1	2	3	4	5	6	
Црвено вино	1,16	1,19	1,2	0,96	0,93	0,99	11,71
Бело вино	0,76	0,98	0,77	0,78	0,78	0,89	10,76

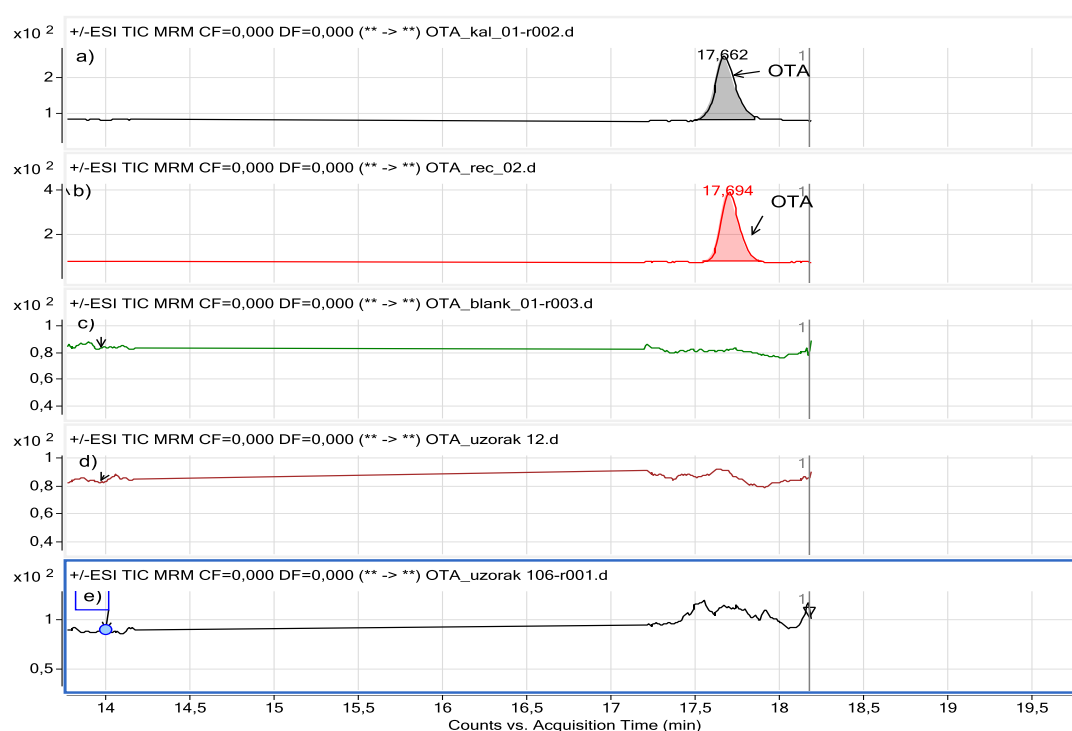
Поновљивост изражена преко %RSD за црвено вино је износила 11,71%, а за бело 10,76% чиме су испуњени критеријуми према Уредби 401/2006 (%RSDr ≤ 20%).

#### 5.1.4. Анализа узорака винског грожђа и сортних вина на присуство охратоксина А

##### Анализа узорака винског грожђа на присуство охратоксина А

Присуство охратоксина А је испитивано у 250 узорака зрелог винског грожђа које је прикупљано од августа до октобра 2016. године у време бербе. Од укупног броја анализираних узорака црног винског грожђа (n=125), 5 узорака је било из

органиске производње. Код анализираних узорака белог винског грожђа (n=125), из органиске производње је анализирано 25 узорака. *Botrytis cinerea* је регистрована у једној сорти црног винског грожђа из конвенционалне производње Бургундац црни са локалитета Страгари, и у једној сорти белог винског грожђа Ризлинг италијански са локалитета Радмиловац. Остали узорци винског грожђа нису били заражени гљивама. Сви испитивани узорци су припремани и анализирани према претходно описаним развијеним методама за црно, односно бело грожђе. Ни у једном анализираном узорку није детектовано присуство ОТА (Слика 6).

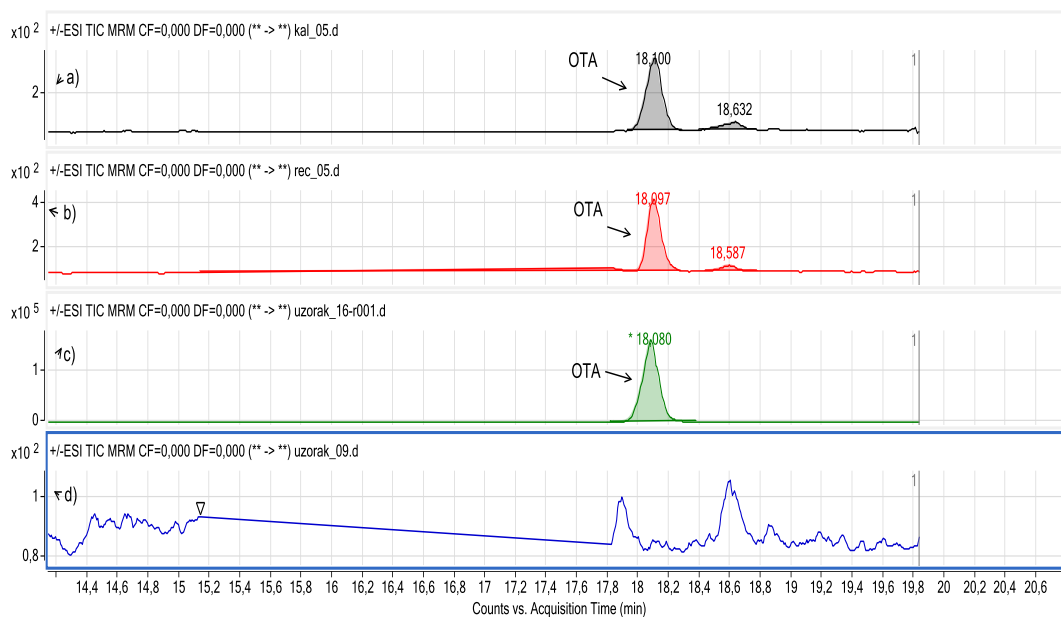


Слика 6. LC-MS/MS хроматограми: а) најнижег калибрационог нивоа за црно грожђе 1 ng/ml (matrix-match); б) обогаћен узорак црног грожђа на концентрационом нивоу 2 ng/ml; с) бланк узорак црног грожђа; д) узорак црног винског грожђа; е) узорак белог винског грожђа

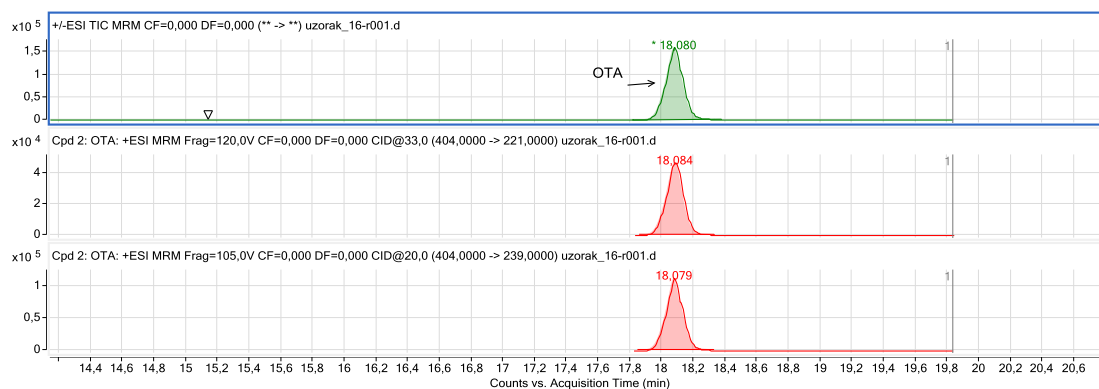
### Анализа узорака сортних вина на присуство охратоксина А

На присуство ОТА анализирано је 90 узорака сортних црвених вина, пет узорака розеа и 65 узорака сортних белих вина. Узорци вина су направљени од претходно узоркованог грожђа. Узорковање вина је рађено током јануара и фебруара 2017.

године после завршеног процеса винификације. Охратоксин А је детектован у једном узорку црвеног вина (1,17  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), испод максимално дозвољене количине у винима (2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Узорак у ком је детектован охратоксин А је Pinot noir са локалитета Страгари (Слика 7 и 8). Узорци грожђа од ког је направљено ово вино су били заражени гљивом *Botrytis cinerea*. Ни у једном узорку белог вина није детектовано присуство ОТА (Слика 7).



Слика 7. LC-MS/MS хроматограми: а) калибрациони ниво за црвено вино 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (matrix-match); б) обогаћен узорак црвеног вина на концентрационом нивоу 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; в) узорак црвеног вина у ком је детектован ОТА; д) анализиран узорак белог вина



Слика 8. Укупни јонски хроматограм (TIC) и SRM хроматограми ОТА у узорку Бургундац црни са локалитета Страгари



## Процена изложености популација охратоксину А преко грожђа

Резултати детерминистичке процене изложености охратоксином А преко грожђа за различите узрастне групе популације у Републици Србији приказани су у Табели 19 (сценарији Н2 и Н3).

Процењени унос охратоксина А (Табела 19) је испод TWI од 120 ng/kg тм/недељно у свим разматраним сценаријима.

Табела 19. Унос охратоксина А преко грожђа и карактеризација ризика

Популациона група (узраст)	Н2: < LOD = ½ LOD				Н3: < LOD = LOD			
	Концентрација ОТА: просек		Концентрација ОТА: P95		Концентрација ОТА: просек		Концентрација ОТА: P95	
	Унос ОТА	%TWI	Унос ОТА	%TWI	Унос ОТА	%TWI	Унос ОТА	%TWI
	(ng/kg тм/нед.)		(ng/kg тм/нед.)		(ng/kg тм/нед.)		(ng/kg тм/нед.)	
Одојчад (8-12 м.)	0,996	0,83	1,2	1	1,99	1,66	2,4	2
Предшколска деца	0,498	0,42	0,6	0,5	0,996	0,83	1,2	1
Деца (7-10 г.)	0,3	0,25	0,362	0,3	0,6	0,5	0,72	0,6
Адолесценти (11-14 г.)	0,192	0,16	0,232	0,19	0,39	0,32	0,46	0,39
Одрасли (15+ г.)	0,131	0,11	0,157	0,13	0,26	0,22	0,32	0,26
<i>Напомене</i> : телесна маса: одојчад = 10 кг; предшколска деца = 20 кг; деца = 33,17 кг; адолесценти = 51,78 кг; одрасли = 76,27 кг.								
Конзумирана количина грожђа: за све популационе групе 48 г/недељно								
%TWI су израчунати на основу уноса ОТА и TWI изведеног од стране EFSA (120 ng/kg тм/недељно).								

## Процена изложености популација охратоксину А преко вина

Процена изложености охратоксином А преко вина за одраслу популацију у Републици Србији приказана је у Табели 20 (сценарији Н1-Н4).

У сценаријима Н1-Н3 достигнути проценат од TWI је испод 1%, са максималних 0,15% у Н3 сценарију (<LOD = LOD). Чак и у најконзервативнијем сценарију, Н4, који у обзир узима само контаминираних узорке, достигнуто је само 1,21% од TWI, што је пре свега узроковано ниском конзумираном количином вина.

Табела 20. Унос охратоксина А преко вина и карактеризација ризика

Популациона група (узраст)	Н1: < LOD = 0		Н2: < LOD = ½ LOD		Н3: < LOD = LOD		Н4: контаминирани узорци	
	Унос ОТА	%TWI	Унос ОТА	%TWI	Унос ОТА	%TWI	Унос ОТА	%TWI
	(ng/kg тм/нед.)		(ng/kg тм/нед.)		(ng/kg тм/нед.)		(ng/kg тм/нед.)	
Одрасли (15+ г.)	0,097	0,08	0,175	0,15	0,341	0,28	1,454	1,21
<i>Напомене:</i> телесна маса одраслих = 76,27 kg; конзумирана количина вина: 77 ml/недељно (нед.)								
%TWI су израчунати на основу уноса ОТА и TWI изведеног од стране EFSA (120 ng/kg тм/недељно).								

## 5.2. Оптимизација услова за одређивање остатака активних супстанци пестицида

Пре постављања методе за анализу остатака пестицида у грозђу и вину прикупљени су дневници третирања за 2016. годину од свих произвођача и списак дозвољених средстава за заштиту биља за винову лозу (Спасић, 2016). Списак активних супстанци које су коришћене на сваком локалитету понаособ дат је у Табели 21. На локалитету Заклопача је регистрована органска производња, односно нису примењивани пестициди ни у црном, ни у белом винском грозђу. Такође, на локалитету Сремски Карловци постоје сорте белог грозђа које припадају органској производњи (Табеле 1 и 2).

Табела 21. Списак активних супстанци примењених на различитим локалитетима

Доње Злегиње	Голобок/ Умчари	Копљари	Мала Сугубина	Младеновац	Радмиловац	Сремски Карловци	Топола	Страгари
азоксистробин	абамектин	бифентрин	боскалид	квиноксифен	боскалид	абамектин	азоксистробин	азоксистробин
циперметрин	аметоктрадин	боскалид	цимоксанил	манкозеб	цимоксанил	бифентрин	боскалид	боскалид
једињења на бази бакра	ципродинил	цимоксанил	ципродинил	металаксил	циперметрин	бупрофезин	цијазофамид	цијазофамид
фолпет	једињења на бази бакра	једињења на бази бакра	једињења на бази бакра	тебуконазол	ципродинил	цимоксанил	ципродинил	цимоксанил
квиноксифен	диметоморф	манкозеб	дифенокназол	сумпор	једињења на бази бакра	једињења на бази бакра	делтаметрин	фамоксадон
манкозеб	етоксазол	пираклостробин	диметоморф		диметоморф	дифенокназол	флудиоксонил	флутриафол
металаксил	фенхексамид	пириметанил	дитианон		фамоксадон	фенитротрион	фолпет	ипродион
пенконазол	флуопирам	пропаргит	фипронил		фенхексамид	ипродион	фосетил AI	квиноксифен
сумпор	фолпет	пропинаб	флудиоксонил		флудиоксонил	крзоксим метил	квиноксифен	манкозеб
спироксамин	фосетил AI	сумпор	флутриафол		флуопирам	манкозеб	манкозеб	металаксил
тебуконазол	ипродион	спироксамин	фосетил AI		фолпет	металаксил	металаксил	миклобутанил
триадименол	каптан	тебуконазол	каптан		фосетил AI	пириметанил	метрафенон	пираклостробин
	квиноксифен	триадименол	крзоксим метил		глифосат	сумпор	миклобутанил	пиридабен
	манкозеб		квиноксифен		каптан	спироксамин	пираклостробин	пириметанил
	метрафенон		манкозеб		квиноксифен	тебуконазол	пиридабен	сумпор
	миклобутанил		миклобутанил		манкозеб	триадименол	пириметанил	спироксамин
	пириметанил		пириметанил		металаксил	$\alpha$ -циперметрин	сумпор	тебуконазол
	тебуконазол		сумпор		метрафенон		тебуконазол	триадименол
	трициклазол		спироксамин		миклобутанил		триадименол	зета-циперметрин
	$\alpha$ -циперметрин		тебуконазол		пираклостробин			$\gamma$ -цихалотрин
	сумпор		триадименол		пириметанил			
			валифеналат		сумпор			
			$\gamma$ -цихалотрин		тебуконазол			

Према подацима из 2016. године, за примену у Србији регистровано је 50 активних супстанци из групе фунгицида и зооцида, који су формулисани у 203 различита средстава за заштиту биља за примену у виновој лози (Спасић, 2016). Након прикупљања ових података направљен је списак активних супстанци чији остаци се могу одређивати LC-MS/MS техником (Прилог 1).

После одабира активних супстанци које су коришћене у засадима винове лозе, и које су дозвољене за примену, постављени су аквизициони параметри масеног спектрометра. SRM прелази, фрагментационе енергије и колизионе енергије су преузете из базе података Pesticides\_TriggeredMRM\_V.06.00 (Agilent Technologies, 2012). Након постављања реакције за праћење јона и енергије фрагментације и колизије погодне за анализиране пестициде испитивани су хроматографски услови за одабране анализе. Када су одређена времена задржавања на колони (ретенционо време,  $t_R$ ) за сваки аналит постављена је метода која у одређеним временским интервалима прати јоне који потичу само од једног анализе, тзв. метода у динамичком моду (dMRM) (Табела 22).

Табела 22. SRM прелази, фрагментационе (Frag.) и колизионе (CE) енергије и ретенциона времена пестицида

Активна супстанца	Прекурсор јон, $m/z$	Производ јон, $m/z$	$t_R$ (min)	Frag. (V)	CE (V)	Поларитет
азоксистробин	404,1	372,1	13,8	110	8	позитиван
	404,1	344,1	13,8	110	24	
	404,1	329,1	13,8	110	32	
беналаксил	326,2	294,1	15,84	90	4	позитиван
	326,2	208,1	15,84	90	21	
	326,2	148,1	15,84	90	27	
боскалид	343	307,1	14,1	145	16	позитиван
	343	272,1	14,1	145	32	
	343	271,2	14,1	145	32	
бупрофезин	306,2	201,1	16,44	105	5	позитиван
	306,2	116,1	16,44	105	10	
	306,2	43,2	16,44	105	56	
карбофуран d3	225,1	165	10,92	94	10	позитиван
	225,1	123	10,92	94	22	

Активна супстанца	Прекурсор јон, <i>m/z</i>	Производ јон, <i>m/z</i>	<i>t<sub>R</sub></i> (min)	Frag. (V)	CE (V)	Поларитет
хлорантранилипрол	483,9	452,9	13,34	105	16	позитиван
	483,9	285,9	13,34	105	8	
цимоксанил	199,1	128	8,45	70	4	позитиван
	199,1	110,9	8,45	70	15	
ципродинил	226,1	91,1	13,28	140	36	позитиван
	226,1	76,9	13,28	140	50	
дифеноконазол	406,1	337	16,55	120	10	позитиван
	406,1	251	16,55	120	20	
диметоморф	388,1	301,1	14,3	145	20	позитиван
	388,1	165,1	14,3	145	32	
дитианон	296	264	14,35	100	24	негативна
	296	238	14,35	100	24	
фамоксадон	392,1	330,9	16,03	85	4	позитиван
	392,1	238	16,03	85	12	
фенамидон	312	236,1	13,9	100	8	позитиван
	312	92,2	13,9	100	28	
	312	65,1	13,9	100	56	
фенхексамид	302,1	97,1	14,9	130	20	позитиван
	302,1	55,1	14,9	130	40	
фенпироксимат	422,21	366,2	19,1	135	12	позитиван
	422,21	135	19,1	135	36	
	422,21	107	19,1	135	64	
фипронил	435	330	15,47	70	12	негативан
	435	250	15,47	70	28	
флуазинам	462,9	416	17,71	110	10	негативан
	462,9	398	17,71	110	9	
флудиоксонил	247	169	14,16	95	32	негативан
	247	126	14,16	95	32	
флуквинконазол	376	349	14,87	120	20	позитиван
	376	307,1	14,87	120	24	
	376	108	14,87	120	56	
флутриафол	302,1	122,9	12,68	90	28	позитиван
	302,1	95	12,68	90	56	
	302,1	70,1	12,68	90	16	
хекситиазокс	353,1	227,9	18,05	90	8	позитиван

Активна супстанца	Прекурсор јон, <i>m/z</i>	Производ јон, <i>m/z</i>	<i>t<sub>R</sub></i> (min)	Frag. (V)	CE (V)	Поларитет
	353,1	168,1	18,05	90	24	
ипродион	187	159	15,94	180	20	ПОЗИТИВАН
	187	124	15,94	180	30	
ипроваликарб	321,2	202,9	14,7	80	0	ПОЗИТИВАН
	321,2	119	14,7	80	16	
крезоксим метил	314,1	267	15,63	85	0	ПОЗИТИВАН
	314,1	222,1	15,63	85	10	
мандипропамид	412,13	356,1	14,34	110	4	ПОЗИТИВАН
	412,13	328,1	14,34	110	8	
металаксил	280,2	220,1	12,65	95	10	ПОЗИТИВАН
	280,2	160,1	12,65	95	20	
метоксифенозид	369,2	313,1	14,47	85	0	ПОЗИТИВАН
	369,2	149	14,47	85	10	
	369,2	133	14,47	85	24	
миклобутанил	289,1	125,1	14,63	110	32	ПОЗИТИВАН
	289,1	70,1	14,63	110	16	
пенконазол	284,1	159	15,67	70	30	ПОЗИТИВАН
	284,1	70,1	15,67	70	15	
пропиконазол	342,1	159	15,87	115	32	ПОЗИТИВАН
	342,1	69,1	15,87	115	16	
пираклостробин	388,11	193,8	16,14	95	8	ПОЗИТИВАН
	388,11	163,1	16,14	95	20	
пиридабен	365,1	309,1	20,24	80	4	ПОЗИТИВАН
	365,1	147,2	20,24	80	20	
пириметанил	200,1	106,9	11,03	120	20	ПОЗИТИВАН
	200,1	82	11,03	120	25	
квиноксифен	308	196,9	17,56	115	36	ПОЗИТИВАН
	308	161,9	17,56	115	45	
спиродиклофен	411,1	313	19,14	110	5	ПОЗИТИВАН
	411,1	71,2	19,14	110	15	
спироксамин	298,28	144,1	13,78	125	16	ПОЗИТИВАН
	298,28	100,1	13,78	125	32	
тебуконазол	308,1	124,9	15,76	100	47	ПОЗИТИВАН
	308,1	70	15,76	100	40	
тебуфенпирад	334,2	145	17,25	145	37	ПОЗИТИВАН

Активна супстанца	Прекурсор јон, <i>m/z</i>	Производ јон, <i>m/z</i>	<i>t<sub>R</sub></i> (min)	Frag. (V)	СЕ (V)	Поларитет
	334,2	117	17,25	145	47	
толифлуанид	346,9	238,1	15,69	70	0	позитиван
	346,9	137	15,69	70	25	
триадименол	296,1	99,1	14,71	70	8	позитиван
	296,1	70	14,71	70	8	
трифлумизол	346,1	278	16,27	85	4	позитиван
	346,1	43,1	16,27	85	20	
зоксамид	336	187	16	120	16	позитиван
	336	159	16	120	44	

Када је постављена хроматографска метода испитивана је поновљивост ретенционих времена за све активне супстанце пестицида као још једна тачка потврде хроматографске методе (SANTE/11813/2017). Поновљивост ретенционих времена је испитана након пет узастопних ињектовања стандарда смесе пестицида од 0,05 mg/kg (максимално дозвољено одступање ±0,1 мин.) (Прилог 2).

### 5.2.1. Линеарност одзива детектора за активне супстанце

#### Линеарност одзива детектора за активне супстанце у грозђу

Линеарност одзива детектора за активне супстанце пестицида у црном и белом грозђу је испитивана у опсегу концентрација од 0,005 - 0,500  $\mu\text{g/ml}$  што одговара концентрацији пестицида у узорку од 0,005 до 0,500  $\text{mg/kg}$ . Линеарност је испитивана у мобилној фази, матриксу узорка, и обогаћивањем контролних узорка црног и белог грозђа на четири концентрациона нивоа у три понављања (0,010 - 0,200  $\text{mg/kg}$ ) (Прилог 3, Слика 9). Линеарност у мобилној фази и у матриксу узорка је рађена у два понављања. Коefицијенти корелације за калибрационе криве у мобилној фази, оба матрикса грозђа и оба матрикса вина, и по методи стандардног додатка за грозђе и вино приказани су у Табели 23.

Табела 23. Коefицијенти корелација у различитим матриксама за различите начине калибрација

	Коefицијенти корелације пестицида у различитим матриксама										
	Црно грозђе			Бело грозђе			црвено/ бело вино	Црвено вино		Бело вино	
Активна супстанца	м.ф. <sup>2</sup> R <sup>2</sup>	m-m c <sup>3</sup> R <sup>2</sup>	м.с.д. <sup>4</sup> R <sup>2</sup>	м.ф. <sup>1</sup> R <sup>2</sup>	m-m c <sup>2</sup> R <sup>2</sup>	м.с.д. <sup>3</sup> R <sup>2</sup>	м.ф. <sup>1</sup> R <sup>2</sup>	m-m c R <sup>2</sup>	м.с.д. R <sup>2</sup>	m-m c R <sup>2</sup>	м.с.д. R <sup>2</sup>
азоксистробин	0,998	0,999	0,994	0,973	0,982	0,992	0,997	0,994	0,997	0,999	0,975
беналаксил	0,998	0,997	0,997	0,993	0,998	0,988	0,972	0,999	0,995	0,983	0,971
боскалид	0,996	0,999	0,987	0,992	0,995	0,999	0,996	0,982	0,988	0,998	0,962

<sup>2</sup> м.ф. - мобилна фаза

<sup>3</sup> m-m c - калибрација у матриксу

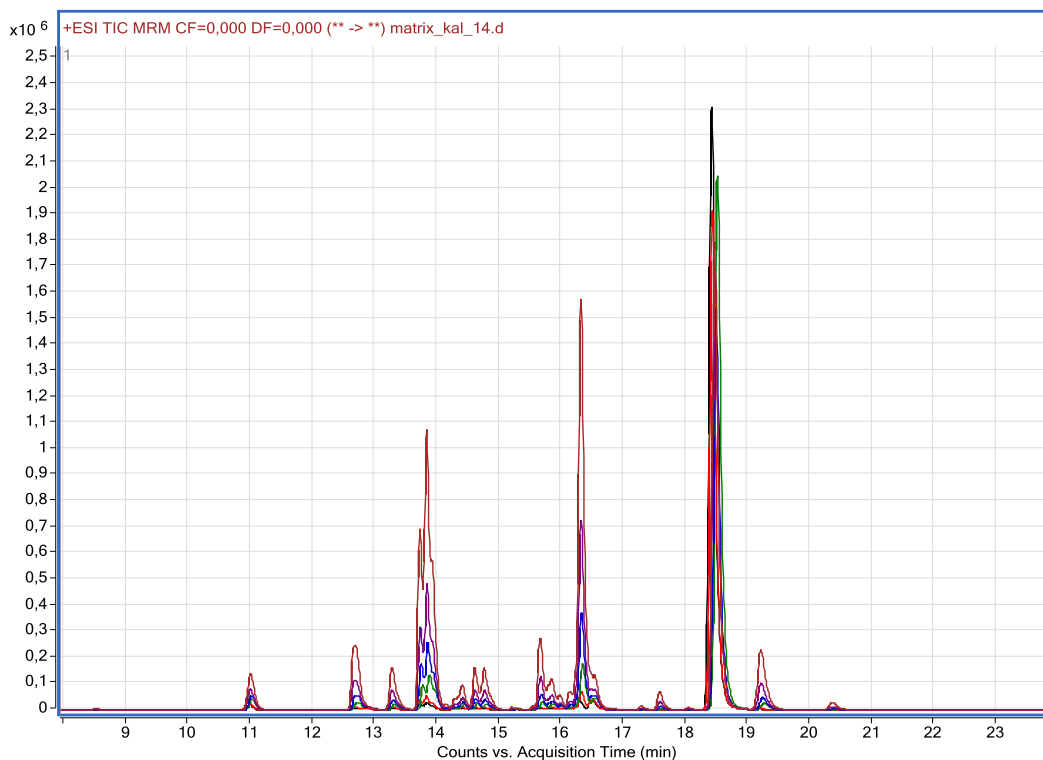
<sup>4</sup> м.с.д. - метода стандардног додатка



Коефицијенти корелације пестицида у различитим матриксама											
Активна супстанца	Црно грозђе			Бело грозђе			црвено/ бело вино	Црвено вино		Бело вино	
	м.ф. <sup>2</sup> R <sup>^2</sup>	м-м с <sup>3</sup> R <sup>^2</sup>	м.с.д. <sup>4</sup> R <sup>^2</sup>	м.ф. <sup>1</sup> R <sup>^2</sup>	м-м с <sup>2</sup> R <sup>^2</sup>	м.с.д. <sup>3</sup> R <sup>^2</sup>	м.ф. <sup>1</sup> R <sup>^2</sup>	м-м с R <sup>^2</sup>	м.с.д. R <sup>^2</sup>	м-м с R <sup>^2</sup>	м.с.д. R <sup>^2</sup>
бупрофезин	0,998	0,999	0,997	0,990	0,993	0,995	0,996	0,994	0,996	0,999	0,992
диметоморф	0,996	0,999	0,995	0,994	0,996	0,993	0,998	0,997	0,992	0,999	0,991
дитианон	0,999	0,997	0,970	0,993	0,997	0,977	0,908	0,994	0,942	0,999	0,993
дифенокназол	0,997	0,998	0,987	0,996	0,998	0,990	0,973	0,995	0,962	0,996	0,992
зоксамид	0,999	0,999	0,991	0,993	0,998	0,990	0,982	0,989	0,985	0,999	0,1018
ипроваликарб	0,998	0,998	0,996	0,999	0,995	0,995	0,998	0,981	0,986	0,996	0,989
ипродион	0,996	0,995	0,994	0,996	0,999	0,994	0,969	0,904	0,971	0,986	0,962
квиноксифен	0,998	0,998	0,982	0,997	0,997	0,999	0,996	0,987	0,998	0,999	0,974
крезоксим метил	0,998	0,999	0,993	0,987	0,992	0,994	0,985	0,994	0,986	0,990	0,979
мандипропамид	0,998	0,999	0,998	0,999	0,992	0,994	0,998	0,950	0,993	0,995	0,967
металаксил	0,998	0,999	0,998	0,989	0,993	0,999	0,995	0,993	0,999	0,999	0,996
метоксифенозид	0,997	0,996	0,992	0,995	0,997	0,995	0,968	0,981	0,992	0,999	0,983
миклобутанил	0,997	0,998	0,994	0,996	0,999	0,986	0,998	0,988	0,994	0,999	0,968
пенконазол	0,998	0,999	0,998	0,997	0,993	0,994	0,968	0,989	0,990	0,999	0,964
пираклостробин	0,999	0,999	0,991	0,991	0,996	0,995	0,974	0,970	0,999	0,999	0,922
пиридабен	0,998	0,999	0,979	0,991	0,997	0,998	0,995	0,996	0,996	0,999	0,998
пириметанил	0,998	0,999	0,991	0,995	0,998	0,998	0,998	0,972	0,944	0,998	0,993

Коефицијенти корелације пестицида у различитим матриксама											
Активна супстанца	Црно грозђе			Бело грозђе			црвено/ бело вино	Црвено вино		Бело вино	
	м.ф. <sup>2</sup> R <sup>2</sup>	м-м с <sup>3</sup> R <sup>2</sup>	м.с.д. <sup>4</sup> R <sup>2</sup>	м.ф. <sup>1</sup> R <sup>2</sup>	м-м с <sup>2</sup> R <sup>2</sup>	м.с.д. <sup>3</sup> R <sup>2</sup>	м.ф. <sup>1</sup> R <sup>2</sup>	м-м с R <sup>2</sup>	м.с.д. R <sup>2</sup>	м-м с R <sup>2</sup>	м.с.д. R <sup>2</sup>
пропиконазол	0,998	0,998	0,997	0,997	0,999	0,949	0,944	0,984	0,967	0,999	0,970
спиродиклофен	0,997	0,999	0,992	0,990	0,998	0,999	0,993	0,993	0,991	0,999	0,950
спироксамин	0,998	0,998	0,999	0,999	0,993	0,998	0,999	0,986	0,998	0,998	0,961
тебуконазол	0,986	0,987	0,991	0,999	0,995	0,966	0,984	0,976	0,983	0,997	0,963
тебуфенпирад	0,998	0,999	0,991	0,994	0,996	0,999	0,996	0,997	0,999	0,999	0,939
толифлуанид	0,998	0,999	0,990	0,997	0,999	0,985	0,978	0,998	0,985	0,997	0,989
триадименол	0,998	0,999	0,998	0,993	0,997	0,992	0,998	0,996	0,986	0,996	0,978
трифлумизол	0,996	0,999	0,983	0,994	0,997	0,996	0,989	0,998	0,967	0,921	0,925
фамоксадон	0,998	0,997	0,973	0,997	0,990	0,966	0,967	0,969	0,973	0,963	0,979
фенамидон	0,998	0,999	0,997	0,990	0,993	0,991	0,997	0,995	0,998	0,999	0,993
фенпироксимат	0,997	0,999	0,992	0,993	0,997	0,997	0,996	0,999	0,994	0,999	0,968
фенхексамид	0,997	0,999	0,976	0,997	0,997	0,996	0,998	0,981	0,961	0,999	0,977
фипронил	0,999	0,999	0,996	0,999	0,998	0,996	0,987	0,995	0,995	0,999	0,998
флуазинам	0,998	0,999	0,985	0,998	0,998	0,986	0,993	0,995	0,998	0,999	0,994
флудиоксонил	0,999	0,999	0,996	0,998	0,998	0,991	0,983	0,994	0,996	0,999	0,998
флуквинконазол	0,989	0,985	0,941	0,997	0,990	0,996	0,996	0,996	0,914	0,993	0,994
флутриафол	0,998	0,999	0,998	0,992	0,995	0,995	0,998	0,995	0,997	0,999	0,980

Коефицијенти корелације пестицида у различитим матриксама											
Активна супстанца	Црно грозђе			Бело грозђе			црвено/ бело вино	Црвено вино		Бело вино	
	м.ф. <sup>2</sup> R <sup>2</sup>	м-м с <sup>3</sup> R <sup>2</sup>	м.с.д. <sup>4</sup> R <sup>2</sup>	м.ф. <sup>1</sup> R <sup>2</sup>	м-м с <sup>2</sup> R <sup>2</sup>	м.с.д. <sup>3</sup> R <sup>2</sup>	м.ф. <sup>1</sup> R <sup>2</sup>	м-м с R <sup>2</sup>	м.с.д. R <sup>2</sup>	м-м с R <sup>2</sup>	м.с.д. R <sup>2</sup>
хекситазокс	0,998	0,999	0,986	0,993	0,997	0,997	0,996	0,995	0,994	0,999	0,981
хлорантранилипрол	0,998	0,999	0,994	0,991	0,994	0,994	0,998	0,984	0,990	0,999	0,935
цимоксанил	0,998	0,999	0,990	0,992	0,996	0,997	0,998	0,996	0,998	0,999	0,991
ципродинил	0,998	0,999	0,994	0,997	0,996	0,991	0,998	0,992	0,990	0,997	0,918



Слика 9. Упоредени LC-MS/MS хроматограми активних супстанци пестицида на различитим калибрационим нивоима

Испитан је утицај матрикса црног и белог грожђа на пестициде и да ли се калибрација у једној врсти грожђа може користити за квантификацију у другој врсти грожђа. Матрикс црног грожђа има велики утицај на повећање сигнала азоксистробина, боскалида, метоксифенозида, ипроваликарба, фенхексамида, крезоксим метила, толифлуанида, беналаксила, ипродиона, зоксамида, фамоксадона, пираклостробина, тебуфенпирада, хекситиазокса, фенпироксимата, спиродиклофена, тебуконазола и пиридабена. Матрикс белог грожђа има велики утицај на пенконазол, пропиконазол, флудиоксонил, дитианон и флуазинам. Калибрација у било ком од ова два матрикса може да се користи за одређивање мандипропамида, флуквинконазола, трифлумизола, квиноксифена, флудиоксонила, дитианона и флуазинама, јер на исти начин утичу на понашање сигнала ових пестицида. Једино у случају тебуконазола матрикси црног и белог грожђа имају супротан ефекат; матрикс црног грожђа доводи до повећања (47,6%), док матрикс белог доводи до смањења сигнала (-31,4%) (Табела 24).

Табела 24. Утицај матрикса црног и белог грозђа на испитиване пестициде

Активна супстанца	Утицај матрикса, МЕ%			
	црно грозђе	бело грозђе	црвено вино	бело вино
азоксистробин	26,21	1,25	-54	-9,95
беналаксил	50	2,96	-530,65	-50
боскалид	34,68	-0,89	-504,55	-277,27
бупрофезин	-7,89	3,41	-10,27	-251,07
диметоморф	6,28	0,42	-165,63	-87,48
дитианон	44,49	63,09	-36,77	-62,33
дифенокназол	-1,65	3,9	-97,56	-18,16
зоксамид	61,67	1,12	-115	78,33
ипроваликарб	35,32	-1,43	-97,3	-55,5
ипродион	61,32	2,21	300	-40
квиноксифен	48,34	25,63	16,08	-128,19
крезоксим метил	40,63	-1,68	-89,47	2,63
мандипропамид	30,08	27,51	-482,14	-180,36
металаксил	22,02	-0,52	-17,66	-33,24
метоксифенозид	51,29	-9,56	-563,16	68,42
миклобутанил	-7,35	-2,8	-140,57	-162,26
пенконазол	-6,6	25,85	-150,38	-112,31
пираклостробин	61,43	0,37	-66,51	83,45
пиридабен	74,83	8,93	-14,99	30,17
пириметанил	-3,46	-6,56	-59,26	-170,37
пропиконазол	-1,17	-24,75	-1,17	-24,75
спиродиклофен	56,14	3,77	-29,83	39,66
спироксамин	-9,96	2,91	-172,77	-862,06
тебуконазол	47,64	-31,39	-39,29	-146,43
тебуфенпирад	24,03	5,86	-29,86	35,07
толифлуанид	22,86	7,04	-144	10
триадименол	-11,6	1,94	-83,14	-427,06
трифлумизол	50,64	48,24	101,21	87,59
фамоксадон	73,73	11,54	-385,71	84,29
фенамидон	6,4	-1,73	16,14	-153,48
фенпироксимат	25,89	8,77	76,72	-113,23
фенхексамид	57,59	3,36	-141,23	-5
фипронил	6,52	10,47	-4,07	-465,27
флуазинам	53,94	43,82	5,43	-266,52
флудиоксонил	44	37,76	8,44	-551,95
флуквинконазол	47,85	22,22	-900	-5,26
флутриафол	-9,33	0,25	-24,24	-231,26
хекситиазокс	55,65	4,02	-36,49	53,32
хлорантранилипрол	19,37	-1,18	-211,68	-38,32
цимоксанил	4,51	-6,55	20,97	-40,32
ципродинил	13,92	-2,69	-76,65	-498,5

## **Испитивање линеарности активних супстанци пестицида у вину**

Линеарност пестицида је испитана у мобилној фази (0,005 до 0,500 µg/ml), матриксу узорка (0,005 до 0,500 mg/kg), у 7 нивоа по 2 понављања и обogaћивањем контролних узорака црвеног и белог вина на четири концентрациона нивоа у три понављања (0,010 - 0,100 mg/kg) (Прилог 4).

Испитивањем утицаја матрикса црвеног и белог вина на испитиване активне супстанце пестициде нађено је да бело вино сем на азоксистробин, флуквинконазол, фенхексамид, крезоксим метил и толифлуанид има велики утицај на повећање односно смањење сигнала свих осталих испитиваних пестицида. Црвено вино нема утицај на повећање/смањење сигнала само у случају пропиконазола, бупрофезина, пиридабена, флудиоксонила, фипронила и флуазинама. Највећи утицај има матрикс црвеног вина на смањење сигнала флуквинконазола (-900,00) (Табела 24).

### **5.2.2. Границе детекције и мерења за испитиване активне супстанце пестицида у грожђу и вину**

Граница детекције за испитиване пестициде у црном и у белом грожђу, као и у црвеном и белом вину је израчуната помоћу калкулатора „Calculate Signal-to-Noise“ (Qualitative Mass Hunter B.06.00 програма). Вредност границе детекције је рачуната на основу односа стандардне девијације висине пика и висине шума у хроматограмима за најниже калибрационе нивое оба матрикса грожђа и вина пестицидима (0,005 mg/kg). Најниже добијене вредности границе детекције су за азоксистробин (0,01 µg/kg) и мандипропамид (0,01 µg/kg) у белом грожђу и фенпироксимат (0,01 µg/kg) у црвеном вину и спироксамин у црном грожђу (0,01 µg/kg). Највише вредности границе детекције су за флуопирам (8,99 µg/kg) у белом грожђу и за цимоксанил (8,74 µg/kg) у црвеном вину (Табела 25). Бупрофезин је показао најмање одступање у зависности од матрикса, док су највећа одступања у зависности од матрикса нађена за дитианон, ипродион и фамоксадон. Као граница квантификације је постављена концентрација 0,01 mg/kg за сва четири матрикса, према захтеву SANTE/11813/2017.

Табела 25. LOD ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) испитиваних пестицида

Активна супстанца	LOD ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )			
	Црно грожђе	Бело грожђе	Црвено вино	Бело вино
азоксистробин	0,09	0,01	1,3	0,19
беналаксил	4,35	0,02	0,56	2,3
боскалид	0,64	0,29	1,65	1,28
бупрофезин	0,02	0,02	0,02	0,02
диметоморф	0,6	0,01	0,47	2,43
дитианон	2,86	2,1	8,12	3,7
дифенокназол	0,15	4,11	1,08	0,65
зоксамид	0,81	0,08	0,53	7,3
ипродион	8,72	0,81	1,34	2,31
ипроваликарб	0,18	0,36	0,84	4,64
квиноксифен	0,15	0,39	0,06	0,24
крезоксим метил	0,6	0,49	1,2	0,95
мандипропамид	1,3	0,01	1,1	3,15
металаксил	0,14	0,02	1,65	0,18
метоксифенозид	0,32	0,14	0,82	8
миклобутанил	0,12	0,51	0,84	1,27
пенконазол	0,05	0,14	0,5	1,26
пираклостробин	0,36	0,11	0,35	0,78
пиридабен	0,53	0,09	1,61	0,26
пириметанил	0,11	0,08	2,04	2,98
пропиконазол	0,12	2,48	0,35	2,65
спиродиклофен	1,04	0,66	0,3	2,37
спироксамин	0,01	1,45	0,17	1,03
тебуконазол	0,98	0,07	1,9	1,33
тебуфенпирад	2,28	0,2	0,29	0,78
толифлуанид	1,27	0,69	1,34	3,28
триадименол	0,14	1,38	2,69	0,47
трифлумизол	0,03	2,88	0,28	0,95
фамоксадон	7,06	1,96	3,33	1,68
фенамидон	0,04	0,26	0,07	0,36
фенпироксимат	0,06	0,04	0,01	0,05
фенхексамид	2,8	1,67	0,63	2,09
фипронил	0,12	0,05	0,23	0,03
флуазинам	0,25	0,1	1,02	0,06
флудиоксонил	1,44	0,74	0,46	0,23
флуквинконазол	5,65	7,85	7,74	5,52
флуопирам	2,21	8,99	1,52	1,08
флутриафол	0,09	0,04	0,25	0,07
хекситиазокс	1,22	0,09	0,21	1,04
хлорантранилипрол	1,12	0,09	0,31	1,56
цимоксанил	1,14	0,75	8,74	3,29
ципродинил	0,19	0,08	0,38	0,61

### **5.2.3. Тачност и прецизност за активне супстанце пестицида**

#### **Тачност и прецизност за активне супстанце пестицида у грозђу**

За одређивање тачности методе контролни узорци црног и белог грозђа су обогаћивани раствором смесе активних супстанци пестицида на четири концентрациона нивоа (0,01; 0,025; 0,05 и 0,10 mg/kg) у три понављања (Табеле 26 и 27). Црно грозђе има мањи утицај матрикса на принос екстракције за већину пестицида (31 од испитаних 41 пестицида је између 70 и 120%, уз коефицијент варијације мањи од 20%). За активне супстанце пестицида за које је утврђено да постоји велики утицај матрикса приноси екстракције одступају од овог интервала. Средња вредност приноса екстракције за црно грозђе се кретала од 57,85% до 149,85%, сем за дитианон, метоксифенозид и тебуконазол за које је био мањи од 40%. Коефицијент варијације у црном грозђу је износио 4,70% - 46,57%.



Табела 26. Принос екстракције за испитиване активне супстанце пестицида у црном грожђу

Активна супстанца	0,010 mg/kg		0,025 mg/kg		0,050 mg/kg		0,100 mg/kg		Avg. Rec%	RSDr %
	Rec%	CV%	Rec%	CV%	Rec%	CV%	Rec%	CV%		
азоксистробин	115,6	0,61	96,7	3,57	90,2	6,70	96,4	3,26	99,7	8,28
беналаксил	34,7	11,96	54,9	5,65	90,9	24,37	85,6	2,66	66,5	27,86
боскалид	91,2	1,60	87,5	2,00	87,7	12,56	86,9	6,26	88,3	14,27
бупрофезин	95,1	0,58	87,5	2,23	92,7	2,17	97,3	3,48	93,1	4,70
диметоморф	108,2	2,96	100,7	4,40	94,5	11,67	111,0	1,24	103,6	12,88
дитианон	25,1	0,97	10,3	2,17	6,2	20,54	3,0	11,24	11,1	23,53
дифеноконазол	107,8	18,93	99,9	9,93	92,7	5,96	48,7	7,48	87,3	23,42
зоксамид	98,6	5,84	80,3	3,28	84,0	9,12	82,7	5,38	86,4	12,53
ипроваликарб	26,7	3,35	58,1	6,13	84,3	7,31	85,5	1,38	63,7	10,20
ипродион	39,7	3,76	58,0	5,05	93,3	13,17	91,5	2,04	70,6	14,74
квиноксифен	120,0	2,12	92,0	1,63	88,8	10,60	78,3	10,43	94,8	15,11
крезоксим метил	109,8	3,78	95,0	2,61	93,5	10,08	88,2	3,35	96,6	11,57
мандипропамид	104,5	1,89	92,6	2,25	93,0	7,24	93,3	1,47	95,9	7,95
металаксил	109,2	2,51	95,3	3,73	91,7	4,87	92,7	2,46	97,2	7,07
метоксифенозид	0,0	0,00	13,7	8,19	62,1	13,46	85,1	3,78	40,2	16,20
миклобутанил	52,1	1,52	63,5	2,55	83,1	7,17	79,7	1,80	69,6	7,97
пенконазол	128,2	0,57	106,9	1,80	87,4	30,49	101,9	2,63	106,1	30,66
пираклостробин	111,4	3,34	87,9	3,58	89,8	13,85	81,5	4,13	92,7	15,26
пиридабен	118,3	4,11	76,8	1,82	65,9	8,68	68,9	9,59	82,5	13,69
пириметанил	109,1	0,26	91,6	2,06	89,4	16,31	96,9	5,29	96,7	17,27
пропиконазол	42,2	1,49	61,2	1,51	81,3	7,78	86,2	2,08	67,7	8,33
спиродиклофен	90,1	8,22	73,3	9,08	77,7	17,36	74,9	4,40	79,0	21,70
спироксамин	78,8	1,80	78,8	2,54	83,2	14,13	93,5	1,36	83,6	14,53
тебуконазол	0,0	0,00	0,0	0,00	61,9	3,19	76,1	3,50	34,5	4,74
тебуфенпирад	116,8	6,89	94,8	4,14	98,8	9,04	84,3	4,09	98,7	12,77
толифлуанид	86,3	10,93	76,1	3,21	70,3	12,31	77,4	6,69	77,5	18,06
триадименол	105,3	1,10	91,0	1,44	90,3	9,68	95,8	1,19	95,6	9,92
трифлумизол	194,2	1,73	165,7	2,50	120,7	4,12	118,8	7,21	149,9	8,84
фамоксадон	63,3	9,71	60,6	23,41	60,6	37,23	46,9	11,85	57,9	46,57
фенамидон	118,2	0,97	98,3	3,30	91,2	7,57	96,8	3,56	101,1	9,04
фенпироксимат	107,2	3,75	81,4	1,18	70,9	4,41	74,6	3,84	83,5	7,05
фенхексамид	67,0	13,42	54,4	6,08	64,8	6,25	70,9	4,99	64,3	16,76
фипронил	102,4	3,02	95,0	3,11	99,9	7,87	106,1	2,31	100,8	9,28
флуазинам	112,3	5,08	79,9	8,77	78,3	25,64	82,6	4,65	88,3	27,96
флудиоксонил	112,3	6,64	86,8	2,65	81,5	0,94	88,2	2,39	92,2	7,60
флуквинконазол	17,8	11,23	46,4	4,49	87,7	18,40	110,9	23,67	65,7	32,33
флутриафол	118,1	0,56	101,2	4,27	91,9	13,08	95,0	1,22	101,6	13,82
хекситиазокс	114,0	2,20	88,3	3,11	78,3	9,89	76,4	1,06	89,2	10,65
хлорантранилипрол	135,1	2,23	99,7	3,51	80,8	12,61	78,2	2,24	98,5	13,47
цимоксанил	115,6	0,82	103,5	1,55	105,4	8,22	105,6	5,29	107,6	9,93
ципродинил	105,2	1,41	88,8	2,44	94,7	11,59	91,9	2,09	95,1	12,11

Утврђено је да бело грожђе показује већи утицај матрикса на испитиване пестициде него црно. За 21 пестицид средња вредност приноса екстракције је била у распону од 70 до 120%; односно за 33 пестицида од 52,2 - 262,9%, уз %RSDr од 0,00 - 37,22%. За бупрофезин, дифеноконазол, дитианон, ипродион,

пенконазол, пропиконазол, пиракlostробин и трифлумизол принос екстракције је био мањи од 40% (Табела 27).

Табела 27. Принос екстракције за испитиване активне супстанце пестицида у белом грожђу

Активна супстанца	0,010 mg/kg		0,025 mg/kg		0,050 mg/kg		0,100 mg/kg		Avg. Rec%	RSDr %
	Rec%	CV%	Rec%	CV%	Rec%	CV%	Rec%	CV%		
азоксистробин	110,7	2,27	73,1	1,14	58,9	6,40	78,0	5,08	80,2	8,56
беналаксил	109,6	1,62	75,3	2,90	71,6	14,94	81,0	2,61	84,4	15,53
боскарид	66,3	8,30	72,4	7,72	92,2	14,61	120,0	1,85	87,8	18,58
бупрофезин	0,0	0,00	0,0	0,00	11,0	18,93	18,1	13,52	7,3	23,26
хлорантранилипрол	62,0	4,27	57,7	3,42	53,7	7,60	60,6	3,39	58,5	9,96
цимоксанил	0,0	0,00	63,5	6,05	103,0	9,93	115,2	2,51	70,4	11,90
ципродинил	84,7	4,92	80,8	2,97	78,5	8,15	91,8	3,40	84,0	10,54
дифеноконазол	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00
диметоморф	200,0	2,24	180,6	3,68	181,3	10,96	217,0	9,99	194,7	15,44
дитианон	14,1	2,55	5,6	1,76	2,9	7,86	1,9	19,89	6,1	21,61
фамоксадон	140,2	18,92	65,5	17,22	131,1	17,22	153,5	5,54	122,6	31,33
фенамидон	16,9	19,28	14,6	10,81	11,5	0,13	14,5	7,79	14,4	23,44
фенхексамид	77,6	7,32	66,5	11,11	71,4	6,40	98,3	12,91	78,5	19,61
фенпироксимат	83,0	5,25	72,0	5,47	69,4	0,82	70,2	3,12	73,6	8,24
фипронил	102,1	12,60	94,8	7,17	100,0	3,81	102,6	2,34	99,9	15,17
флуазинам	90,1	2,01	94,4	6,98	94,0	4,42	105,7	6,24	96,1	10,55
флудиоксонил	106,9	10,21	88,2	9,40	92,9	4,56	95,7	0,96	95,9	14,64
флуквинконазол	174,7	5,26	173,3	4,22	176,8	36,39	526,6	3,95	262,9	37,22
флутриафол	86,4	1,43	72,2	3,70	70,4	6,58	73,4	2,45	75,6	8,06
хекситиазокс	97,7	4,74	83,9	3,40	82,4	0,76	82,7	3,98	86,7	7,10
ипродион	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	41,0	6,20	10,2	6,20
ипроваликарб	107,3	1,24	99,4	4,12	104,6	9,29	112,8	0,96	106,0	10,28
крезоксим метил	67,7	2,26	64,8	4,32	61,5	7,76	70,3	2,59	66,1	9,52
мандипропамид	168,9	3,90	168,3	4,91	152,5	10,37	164,8	3,27	163,6	12,55
металаксил	82,0	6,45	66,5	1,93	67,7	4,01	68,1	1,15	71,1	7,92
метоксифенозид	111,8	2,17	81,9	9,23	93,1	18,11	123,8	0,09	102,7	20,44
миклобутанил	195,0	1,36	97,9	3,69	66,0	1,82	61,1	13,03	105,0	13,73
пенконазол	35,8	3,72	37,7	3,67	38,8	9,73	43,1	1,58	38,9	11,16
пропиконазол	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00
пираклостробин	25,2	15,95	38,0	16,51	44,0	16,01	50,1	3,00	39,3	28,15
пиридабен	77,1	3,80	57,6	7,51	52,0	17,12	57,2	8,20	61,0	20,76
пириметанил	70,4	0,06	318,6	9,62	146,4	0,11	76,5	0,55	153,0	9,64
квиноксифен	117,3	0,98	99,2	9,70	96,2	14,57	103,8	1,16	104,1	17,57
спиродиклофен	77,3	3,95	60,1	4,99	49,7	9,15	47,5	4,83	58,7	12,15
спироксамин	129,8	7,54	130,1	5,99	93,7	6,48	72,5	1,16	106,6	11,66
тебуконазол	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	42,2	6,98	10,6	6,98
тебуфенпирад	84,4	1,62	82,5	4,24	93,3	18,49	113,3	2,57	93,4	19,21
толифлуанид	105,6	3,26	79,0	5,23	91,6	26,49	171,6	5,79	116,5	27,81
триадименол	54,3	8,22	58,4	4,83	66,7	10,56	77,2	1,03	64,1	14,26
трифлумизол	62,4	0,04	25,0	0,17	12,8	2,03	6,3	1,35	26,6	2,44
зоксамид	93,0	1,91	73,2	10,92	71,1	5,26	70,7	1,43	77,0	12,35

Поновљивост методе за одређивање остатака пестицида у грожђу је рађена обogaћивањем контролних узрака црног и белог грожђа на концентрационом

нивоу од 0,010 mg/kg у шест понављања (Прилози 5 и 6, Табела 28). Поновљивост у црном грожђу је била од 0,06% за мандипропамид до 24,29% за дифеноконазол. Код белог грожђа најбоља поновљивост је била за трифлумизол (1,54%), а најмања за фамоксадон (21,08%) (Прилог 6, Табела 28).

Табела 28. Поновљивост за активне супстанце пестицида у матриксама црног и белог грожђа и црвеног и белог вина

Активна супстанца	Поновљивост на 0,010 mg/kg			
	%RSDr црно грожђе	%RSDr бело грожђе	%RSDr црвено вино	%RSDr бело вино
азоксистробин	2,55	2,19	5,36	3,31
беналаксил	7,79	6,46	0,45	9,56
боскарид	1,12	15,90	1,39	22,28
бупрофезин	1,26	6,83	3,50	6,89
диметоморф	6,92	9,08	2,22	16,16
дитианон	3,05	16,69	7,52	6,99
дифеноконазол	24,29	10,42	6,34	22,82
зоксамид	4,44	1,95	0,55	11,98
ипроваликарб	15,77	2,07	0,91	8,01
ипродион	13,37	10,09	3,56	18,61
квиноксифен	7,89	3,97	7,46	4,25
крзоксим метил	15,01	4,27	1,53	8,41
мандипропамид	0,06	6,26	1,27	11,38
металаксил	5,20	2,60	17,95	1,61
метоксифенозид	4,40	4,21	0,52	12,43
миклобутанил	3,37	3,56	1,38	16,93
пенконазол	0,83	2,33	0,27	7,72
пираклостробин	10,83	8,40	0,89	12,28
пиридабен	16,36	7,27	8,23	12,80
пириметанил	2,95	13,80	11,75	3,65
пропиконазол	2,36	20,78	0,93	9,59
спиродиклофен	13,24	4,01	5,11	11,08
спироксамин	13,40	2,57	0,69	3,75
тебуконазол	16,43	18,04	6,59	21,84
тебуфенпирад	8,46	1,88	4,86	12,24
толифлуанид	5,51	4,60	1,20	27,86
триадименол	1,45	2,07	4,81	13,54
трифлумизол	3,33	1,54	1,80	7,47
фамоксадон	7,31	21,08	3,86	24,23
фенамидон	2,25	3,80	3,94	1,95
фенпироксамат	10,45	3,69	8,72	7,78
фенхексамид	14,10	17,52	2,43	20,73
фипронил	0,97	3,67	14,78	3,71
флуазинам	16,68	5,21	12,34	2,26
флудиоксонил	3,52	5,63	12,80	2,21
флуквинконазол	7,66	13,81	22,63	17,90
флутриафол	1,97	2,33	2,69	6,24
хекситазокс	8,85	2,77	4,89	7,64
хлорантранилипрол	3,10	4,28	1,21	8,11
цимоксанил	4,53	3,27	14,31	10,40
ципродинил	14,19	4,52	1,69	8,91

## Тачност и прецизност за активне супстанце пестицида у вину

Одређивање тачности методе за остатке активних супстанци пестицида у вину је рађено обogaћивањем контролних узорака црвеног и белог вина раствором смесе активних супстанци, на истим концентрационим нивоима као и за грозђе. Средња вредност приноса екстракције у црвеном вину се кретала од 0,0 - 424,8%, (за 19 пестицида принос екстракције се кретао од 70 до 120%) уз коефицијенте варијације од 0,00 - 25,36% (Табела 29).

Средња вредност приноса екстракције за 23 од испитаних 41 пестицида у белом вину се кретала од 70 - 120%, уз коефицијент варијације од 2,83 - 30,30%. За највећи број пестицида принос екстракције на најнижем концентрационом нивоу је показао одступање од прихватљивих вредности (Табела 30).

Поновљивост методе за одређивање остатака пестицида у црвеном и белом вину је рађена обogaћивањем контролних узорака на концентрационом нивоу од 0,010 mg/kg у шест понављања (Прилози 7 и 8, Табела 28). Поновљивост у црвеном вину је била од 0,27% за пенконазол до 22,63% за флуквинконазол, а у белом вину од 1,61% за металаксил до 27,86% за толифлуанид.

Табела 29. Принос екстракције за испитиване активне супстанце пестицида у  
црвеном вину

Активна супстанца	0,010 mg/kg		0,025 mg/kg		0,050 mg/kg		0,100 mg/kg		Avg. Rec%	RSDr %
	Rec%	CV%	Rec%	CV%	Rec%	CV%	Rec%	CV%		
азоксистробин	139,8	1,27	106,4	2,62	86,9	4,10	80,0	3,50	103,3	6,13
беналаксил	111,9	2,13	62,3	3,30	42,2	2,41	36,9	19,75	63,3	20,28
боскалид	16,7	10,32	45,5	10,13	49,0	2,67	47,1	6,99	39,6	16,28
бупрофезин	136,2	2,46	118,6	2,26	104,4	3,48	95,0	0,70	113,6	4,87
диметоморф	42,3	18,36	64,5	3,59	62,5	2,84	61,0	6,00	57,6	19,85
дитианон	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00
дифеноконазол	47,4	8,72	72,1	10,91	69,9	6,01	53,4	3,99	60,7	15,72
зоксамид	9,0	16,91	36,8	10,45	46,0	5,35	48,6	10,57	35,1	23,14
ипродион	0,0	0,00	0,0	0,00	14,3	17,21	79,6	9,01	23,5	8,24
ипроваликарб	0,0	0,00	42,6	5,73	59,5	3,91	71,7	11,29	43,5	13,25
квиноксифен	70,5	6,21	87,0	5,14	81,6	4,16	81,5	10,90	80,1	14,18
крезоксим метил	0,0	0,00	0,0	0,00	14,3	17,21	79,6	9,01	23,5	19,43
мандипропамид	64,3	9,29	82,8	0,71	77,0	4,33	76,8	10,61	75,2	14,77
металаксил	34,7	11,84	52,0	10,56	52,0	9,56	45,5	9,91	46,0	21,01
метоксифенозид	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00
миклобутанил	119,7	0,90	114,5	3,76	103,3	2,47	100,7	2,09	109,6	5,04
пенконазол	62,9	6,42	71,9	5,56	63,4	5,13	93,9	5,08	73,0	11,15
пираклостробин	31,0	11,67	38,9	3,88	41,6	2,98	42,1	0,94	38,4	12,69
пиридабен	118,3	1,63	96,3	6,18	80,9	0,74	73,0	7,63	92,1	9,98
пириметанил	531,4	0,33	220,1	0,96	120,7	1,81	73,3	5,87	236,4	6,23
пропиконазол	76,1	16,89	72,1	3,61	58,4	2,67	76,7	14,72	70,8	22,85
спиродиклофен	157,9	0,98	111,8	3,70	82,9	6,51	72,1	5,38	106,2	9,27
спироксамин	22,5	14,72	56,1	5,43	58,5	5,68	56,7	2,63	48,5	16,89
тебуконазол	148,3	10,51	121,7	10,21	95,9	1,65	95,5	9,51	115,3	17,55
тебуфенпирад	83,0	7,41	86,0	3,44	82,1	2,57	79,4	1,54	82,6	8,70
толифлуанид	140,6	4,24	90,2	4,11	61,4	1,25	76,3	4,95	92,1	7,81
триадименол	84,5	8,34	97,5	1,82	93,3	3,95	90,3	9,69	91,4	13,50
трифлумизол	469,7	5,00	542,0	6,08	407,3	3,70	280,2	7,43	424,8	11,44
фамоксадон	0,0	0,00	0,0	0,00	17,4	11,19	20,7	12,49	9,5	16,77
фенамидон	151,5	0,85	145,2	1,87	133,3	4,03	127,2	2,57	139,3	5,20
фенпироксимат	104,1	12,15	224,9	7,33	193,5	6,24	165,8	3,10	172,1	15,81
фенхексамид	0,0	0,00	37,1	9,14	51,4	13,39	82,0	3,02	42,6	16,49
фипронил	105,7	11,74	133,7	1,65	115,0	6,52	112,3	15,32	116,7	20,44
флуазинам	114,8	5,33	113,5	2,91	92,1	4,94	76,1	18,71	99,1	20,28
флудиоксонил	93,6	10,43	128,8	2,03	112,5	8,20	100,5	0,88	108,9	13,45
флуквинконазол	47,6	16,58	40,8	6,04	39,5	2,41	35,5	18,05	40,8	25,36
флутриафол	132,9	1,21	121,0	3,19	106,7	3,46	97,2	1,73	114,4	5,16
хекситазокс	92,7	2,01	86,5	5,36	78,8	2,37	74,3	6,03	83,1	8,65
хлорантранилипрол	67,6	5,30	61,8	3,22	55,5	2,75	48,2	4,81	58,3	8,32
цимоксанил	134,6	2,46	121,4	3,41	113,5	5,97	112,9	1,98	120,6	7,57
ципродинил	69,5	3,20	70,8	2,42	62,6	1,67	61,7	1,54	66,1	4,61

Табела 30. Принос екстракције за испитиване активне супстанце пестицида у  
 белом вину

Активна супстанца	0,010 mg/kg		0,025 mg/kg		0,050 mg/kg		0,100 mg/kg		Avg. Rec%	%RSDr
	Rec%	%RSD	Rec%	%RSD	Rec%	%RSD	Rec%	%RSD		
азоксистробин	105,7	2,47	99,8	2,66	77,2	8,37	89,1	3,10	92,9	9,64
беналаксил	103,8	5,92	70,4	0,45	52,5	10,19	71,7	13,39	74,6	17,84
боскалид	44,3	18,59	91,4	15,92	47,3	13,42	72,1	9,11	63,8	29,36
бупрофезин	79,7	1,04	87,9	15,18	78,5	5,67	103,2	5,74	87,3	17,22
диметоморф	54,9	7,13	143,4	3,01	71,2	6,81	80,4	7,31	87,5	12,64
дитианон	14,1	2,55	5,6	1,76	2,9	7,86	1,9	19,89	6,1	21,61
дифеноконазол	0,0	0,00	116,2	3,13	34,0	12,80	74,0	2,59	56,1	13,43
зоксамид	0,0	0,00	72,0	0,54	50,3	0,59	75,0	2,71	49,3	2,83
ипроваликарб	123,5	3,09	95,9	13,99	70,8	5,50	84,8	13,03	93,8	20,13
ипродион	0,0	0,00	0,0	0,00	119,3	1,59	65,5	5,42	46,2	5,65
квиноксифен	100,0	0,20	95,7	11,31	83,4	11,69	96,6	12,30	93,9	20,39
крезоксим метил	181,6	4,89	101,7	12,19	76,2	10,43	84,8	9,98	111,0	19,52
мандипропамид	180,4	2,45	100,6	11,98	58,7	14,21	76,4	0,84	104,0	18,77
металаксил	119,7	2,41	95,6	7,20	91,4	4,39	96,0	4,73	100,7	9,96
метоксифенозид	0,0	0,00	0,0	0,00	47,8	15,00	112,2	6,72	40,0	16,44
миклбутанил	0,0	0,00	75,4	4,52	65,1	2,72	92,6	8,16	58,3	9,72
пенконазол	0,0	0,00	14,7	10,16	39,7	12,80	76,0	15,07	32,6	22,23
пираклостробин	0,0	0,00	108,3	2,32	31,7	9,34	60,9	15,33	50,2	18,10
пиридабен	98,1	2,53	89,7	9,15	88,2	5,27	111,5	4,51	96,9	11,76
пириметанил	70,4	0,06	318,6	9,62	146,4	0,11	76,5	0,55	153,0	9,64
пропиконазол	22,2	6,80	75,5	6,36	47,4	12,40	82,8	10,51	57,0	18,73
спиродиклофен	82,8	4,79	70,7	14,39	59,2	9,34	81,0	18,75	73,4	25,86
спироксамин	128,6	0,88	98,6	18,18	67,4	7,68	84,3	13,41	94,7	23,88
тебуконазол	79,2	2,35	126,8	5,80	131,3	0,37	176,7	3,70	128,5	7,28
тебуфенпирад	97,4	4,06	86,4	14,68	65,7	5,24	103,4	18,62	88,3	24,62
толифлуанид	86,6	13,24	81,2	19,30	39,0	6,42	53,3	4,15	65,0	24,62
триадименол	120,8	1,27	92,9	9,92	76,1	13,55	89,9	14,33	94,9	22,11
трифлумизол	1005,6	1,70	812,4	15,19	543,4	2,89	501,1	21,26	715,6	26,34
фамоксадон	237,7	14,95	99,8	3,62	111,7	18,02	85,7	2,01	133,7	23,78
фенамидон	135,4	0,78	130,5	10,14	119,1	3,37	127,8	6,29	128,2	12,42
фенпироксимат	113,8	1,75	102,9	17,99	72,0	6,64	73,1	2,52	90,4	19,42
фенхексамид	30,9	7,97	101,3	2,27	62,2	6,68	76,2	2,29	67,6	10,89
фипронил	102,1	12,60	94,8	7,17	100,0	3,81	102,6	2,34	99,9	15,17
флуазинам	90,1	2,01	94,4	6,98	94,0	4,42	105,7	6,24	96,1	10,55
флудиоксонил	106,9	10,21	88,2	9,40	92,9	4,56	95,7	0,96	95,9	14,64
флуквинконазол	0,0	0,00	243,4	11,85	29,2	5,76	109,3	5,41	95,5	14,24
флутриафол	55,9	2,27	109,5	11,66	76,1	8,67	98,4	9,38	85,0	17,44
хекситиазокс	102,3	3,78	118,2	14,81	91,9	5,79	106,7	8,65	104,8	18,49
хлорантранилипрол	73,2	7,75	88,8	9,72	52,2	9,16	72,4	15,96	71,7	22,21
цимоксанил	96,3	12,49	92,3	7,66	87,5	7,18	96,6	7,28	93,2	17,87
ципродинил	105,2	3,36	81,0	27,94	41,5	5,92	45,9	9,54	68,4	30,30

#### **5.2.4. Анализа узорака на остатке активних супстанци пестицида**

##### **Анализа узорака винског грожђа на остатке активних супстанци пестицида**

Остаци активних супстанци пестицида су испитивани у 250 узорака зрелог винског грожђа прикупљаног од августа до октобра 2016. године у време бербе. Од укупног броја анализираних узорака црног винског грожђа (n=125), пет узорака је било из органске производње. Код анализираних узорака белог винског грожђа (n=125), из органске производње је анализирано 25 узорака. Сви испитивани узорци су припремани и анализирани према претходно описаним развијеним методама за црно, односно бело грожђе. Количина остатака активних супстанци пестицида је одређена према калибрацији добијеној методом стандарног додатка.

Од укупно испитиваног 41 пестицида у узорцима црног винског грожђа детектовано је 19 (Табела 31 и График 1). Најнижу вредност концентрације имао је боксалид (0,002 mg/kg) у узорцима сорте Молдова са локалитета Мала Сугубина. Дифеноконазол је детектован у највећој концентрацији (28,7 mg/kg) на локалитету Голобок у узорцима Cabernet sauvignon. У осам од укупно 13 узорака у којима је детектован дифеноконазол његова концентрација је била преко МДК вредности. Тебуконазол је детектован у свих 25 испитиваних сорти црног винског грожђа, а пиракlostробин у 20 сорти. Концентрације осталих испитиваних пестицида су биле испод МДК вредности. У узорцима Регент (Заклопача) из органске производње детектован је тебуконазол у концентрацији од 0,196 mg/kg.

Табела 31. Резултати анализе црног винског грожђа према калибрацији методом стандардног додатка

	Копљари	Мала Сугубина				Доње Злегиње	Заклопача	Страгари	Сремски Карловци					Младеновац		Радмиловац			Топола	Голобок		Умчари				
	Стражински	Game bojadiser	Вранац	Мусканг хамбург	Молдова	Бургулдац црни	Регент	Бургулдац црни	Франковка	Гапе	Бургулдац црни	Пробус	Мерло	Cabernet franc	Мерло	Cabernet sauvignon	Бургулдац црни	Мерло	Cabernet franc	Cabernet sauvignon	Мерло	Cabernet sauvignon	Cabernet sauvignon	Прокупац	Cabernet sauvignon	
Активна супстанца	концентрација (mg/kg)																									
азоксистробин						0,027		0,05																		0,02
боскалид	0,067	0,056	0,008	0,005	0,002			0,076							0,348			0,011	0,013	0,129						
бупрофезин									0,009	0,007	0,006	0,005	0,005													
ципродинил														0,08	0,007	0,018	0,009									0,05
дифенокназол		0,175	5,948	6,5	6,694				0,085		0,246	0,192	0,148				6,418	6,658						28,706	5,213	5,162
диметоморф		0,069	0,014	0,007	0,009										0,006	0,005	0,004	0,005			0,025	0,042	0,043	0,053	0,021	
фенхексамид															0,012	0,015							0,078	0,067	0,408	0,056
флудиоксонил														0,09		0,017	0,006	0,005	0,005			0,017				
флутриафол		0,007						0,003														0,006				
ипродион														0,017	0,016											
крезоксим метил										0,009																
металаксил						0,079			0,036	0,015	0,026	0,054	0,008	0,008	0,004	0,009	0,008				0,020					
миклобутанил		0,276																								
пропиконазол														0,022	0,019											
пираклофторин	0,028	0,014				0,013	0,014	0,03							0,067											
пириметанил		1,826	0,124	0,154	0,049			0,039	0,153			0,021	0,028	0,057	0,053	0,01	0,008	0,005		0,003	0,099	0,109	0,248	0,118	0,162	
квиноксифен		0,358	0,025	0,02	0,019																		0,007	0,067	0,013	
спироксамин	0,009					0,015	0,008		0,008					0,003	0,003					0,004						
тебуконазол	0,232	0,179	0,038	0,032	0,02	0,308	0,196	0,544	0,708	0,792	0,786	0,356	0,262	0,057	0,075	0,061	0,034	0,018	0,023	0,079	0,046	0,043	0,061	0,018	0,025	





Одређивањем концентрације остатака пестицида у белом грожђу према калибрацији методом стандардног додатка квантификовано је присуство 15 пестицида (Табела 32 и График 2). У највећем броју узорака су детектовани металаксил (15 узорака), пириметанил (12), ципродинил (9) и тебуконазол (9). У најмањем броју узорака су детектовани азоксистробин, цимоксанил, флудиоксонил, крезоксим метил, миклобутанил и пираклостробин у по 8% узорака. По један пестицид је детектован у узорцима Смедеревка (Мала Сугубина), Сила, Петка и Sauvignon blanc (Сремски Карловци). По два пестицида су детектована у четири узорка, док је у свим осталим узорцима детектовано по три и више пестицида. Тебуконазол је детектован у највећој концентрацији од 2,496 mg/kg у узорцима сорте Тамјаника бела на локалитету Мала Сугубина. Спироксамин је детектован у концентрацијама испод LOQ у узорцима Ризлинг италијански (Сремски Карловци). У концентрацијама преко МДК су детектовани тебуконазол у три узорка Тамјаника бела (2,496 mg/kg), Петра (1,115 mg/kg) и Sauvignon blanc (1,037 mg/kg) и пропиконазол у шест узорака. У узорцима из органске производње Рубинка, Морава и Бачка (берба 21.09.2016.) са локалитета Сремски Карловци нису детектовани остаци пестицида, а у узорцима Бачка (берба 05.09.2016.), Панониа и Петка су детектовани остаци пестицида. У узорцима Бачка (датум бербе 05.09.2016.) и Панониа детектовани су ципродинил (0,017 и 0,026 mg/kg), металаксил (0,010 и 0,011 mg/kg), пириметанил (0,044 и 0,055 mg/kg) и тебуконазол (0,052 и 0,065 mg/kg), а у узорцима Петка цимоксанил (0,013 mg/kg). У узорцима са локалитета Заклопача (Панониа) детектовани су остаци три активне супстанце дифенконазол (0,540 mg/kg), пропиконазол (0,517 mg/kg) и металаксил (0,036 mg/kg). Остаци пестицида нису детектовани у узорцима Ризлинга италијанског и Ризлинга рајнског са локалитета Радмиловац.

Табела 32. Резултати анализе белог винског грожђа према калибрацији методом стандардног додатка

	Копљари		Мала Сугубина		Доње Злегиње		Страгари	Заклопача	Сремски Карловци										Младеновац	Радмиловац			Голобок				
	Мускато отонел	Тамјаника бела	Смедеревка	Ризлинг италијански	Јагода	Sauvignon blanc	Панониа	Ризлинг италијански	Бачка (05.09.2016.)	Панониа	Петра	Жуљанка	Сила	Рубинка	Бачка (21.09.2016.)	Морава	Петка	Неопланта	Sauvignon blanc	Chardonnay	Sauvignon blanc	Chardonnay	Ризлинг рејнски	Ризлинг италијански	Морава		
Активна супстанца	концентрација (mg/kg)																										
азоксистробин				0,014		0,049																					
боскалид	0,104	0,023				0,053																					
цимоксанил																	0,013	0,024									
ципродинил		0,879				0,154		0,052	0,017	0,026	0,021									0,162	0,04	0,041					
дифеноконазол	0,521	0,786		0,438		0,475	0,54	0,204			0,119																
диметоморф		0,07																				0,036				0,036	
флудиоксонил		0,14																		0,049							
крезоксим метил		0,021				0,012																					
металаксил		0,018		0,054	0,02	0,019	0,036	0,035	0,01	0,011	0,017	0,033	0,027				0,011		0,012	0,015	0,018						
миклобуганил		0,171				0,034																					
пропиконазол	0,535	0,698		0,427		0,566	0,517	0,045			0,355																
пираклостробин	0,045					0,02																					
пириметанил		1,698	0,472			0,148		0,641	0,044	0,055	0,029							0,039	0,135	0,069	0,041				0,234		
спироксамин		0,015			0,036			0,006														0,013					
тебуконазол		2,496		0,894		1,037		0,564	0,052	0,065	1,115	0,407							0,075								

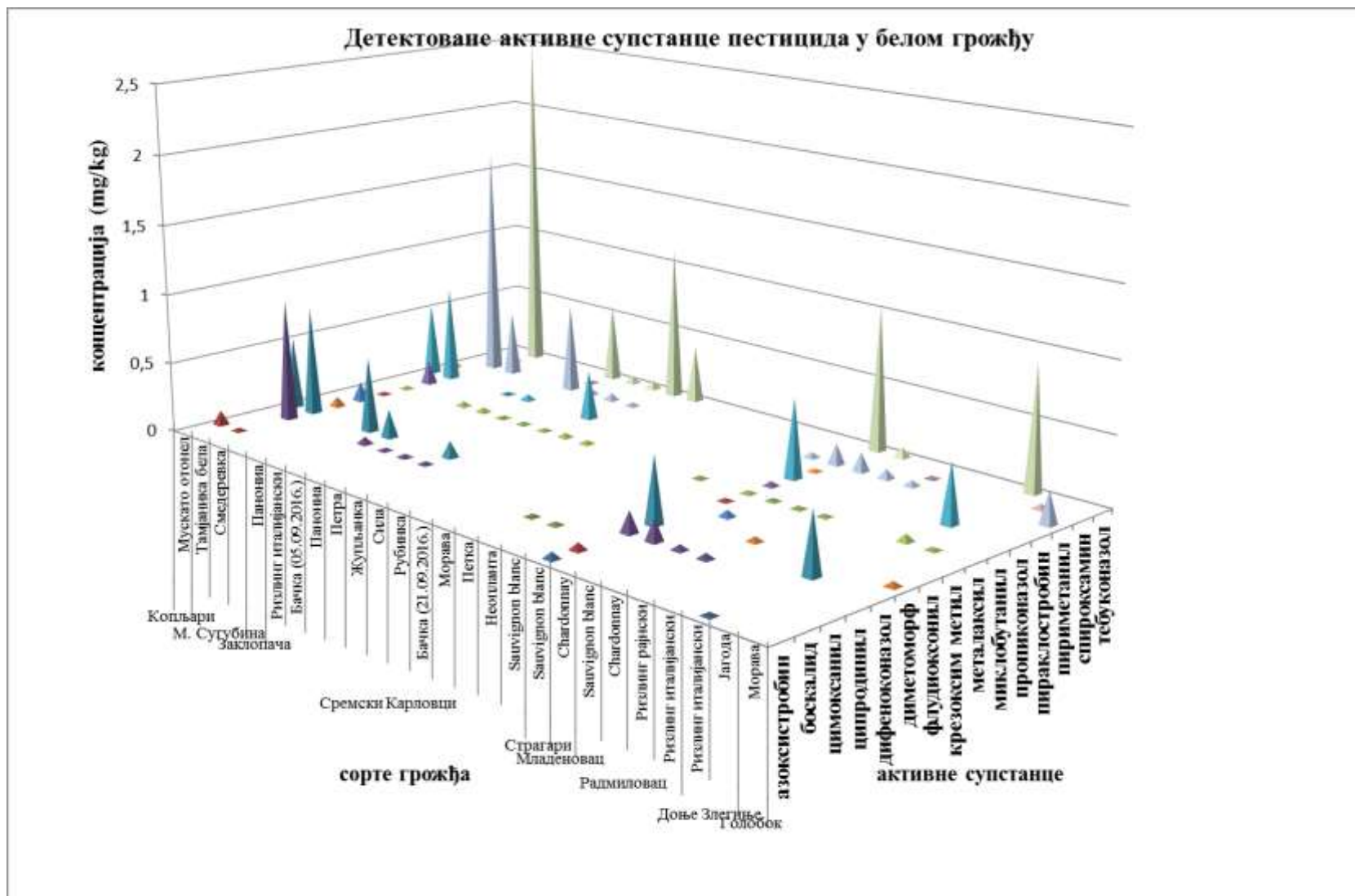


График 2. Активне супстанце пестицида квантификоване у узорцима белих винских сорти

### **Анализа узорака вина на остатке активних супстанци пестицида**

Од прикупљених сорти грожђа произвођачи су правили црвено и бело вино које је узорковано у јануару и фебруару 2017. године. Узорковано је 18 сортних црвених вина, један розе и 13 белих сортних вина, у по пет понављања. Од укупног броја анализираних сортних црвених вина ( $n=95$ ), пет узорака је било из органске производње. Такође, од укупног броја анализираних сортних белих вина ( $n=65$ ), из органске производње је анализирано 10 узорака. Количина остатака пестицида у црвеном и белом вину је одређивана према калибрацији методом стандарног додатка. У узорцима црвеног вина квантификовано је девет активних супстанци (Табела 33 и График 3). Пириметанил (у 17 узорака) и металаксил (13 узорака) су биле две најчешће детектоване активне супстанце. Азоксистробин је детектован у траговима у узорцима Бургундац црни (Доње Злегиње), у нешто већој количини ( $0,013 \text{ mg/l}$ ) је детектован пираклостробин у узорцима вина Регент (Заклопача), а у највећој пириметанил ( $0,205 \text{ mg/l}$ ) у узорцима розеа (Мала Сугубина).

Табела 33. Резултати анализе сортног црвеног вина према гесcovery калибрацији

	Радомиловац							Заклопача	Страгари	Сремски Карловци			Голобок		Д. Злегиње	М. Сугубина	Топола	Умчари	
	Прокупац	Гаме и Франковка	Pinot noir	Вранац	Cabernet sauvignon	Cabernet franc	Мерло			Регент	Pinot noir	Пробус	Cabernet sauvignon	Пробус, Мерло, Cabernet sauvignon				Мерло	Cabernet sauvignon
активна супстанца	концентрација (mg/kg)																		
азоксистробин									0,025						0,003				
боскарид									0,01								0,099		
ципродинил																	0,032		
диметоморф													0,009	0,008				0,01	0,013
фенхексамид														0,009				0,022	0,163
металаксил	0,006	0,01	0,008	0,009	0,023	0,003	0,003		0,006	0,042	0,018	0,021			0,03		0,009		
пираклостробин								0,013											
пириметанил	0,011	0,013	0,013	0,017	0,014	0,013	0,013		0,064	0,044	0,012	0,016	0,025	0,021		0,205	0,026	0,048	0,043
тебуконазол										0,009	0,048	0,008							



График 3. Активне супстанце пестицида квантификоване у сортним црвеним винима

Добијени резултати показују да су у узорцима белог вина детектовани остаци 10 активних супстанци (Табела 34, График 4). Највише су заступљени остаци ципродинила (12 узорака) и пропиконазола (у седам сортних белих вина). Металаксил је детектован у траговима у узорцима Ризлинг италијански (Доње Злегиње), а дифеноконазол у највећој концентрацији од 0,897 mg/l у узорцима Бачка (Сремски Карловци). У узорцима Панониа (Заклопача) из органске производње нису детектовани остаци активних супстанци пестицида. Међутим, у узорцима из органске производње са локалитета Сремски Карловци - Бачка детектовани су, сем дифеноконазола, остаци још пет активних супстанци пестицида. Крезоксим метил детектован је само у узорцима Тамјанике беле (Мала Сугубина) у концентрацији од 0,015 mg/kg. У узорцима Петра и Сила (Сремски Карловци) и Јагода и Ризлинг италијански (Доње Злегиње), детектовано је по пет активних супстанци пестицида. Седам активних супстанци пестицида детектовано је у узорку Тамјаника бела са локалитета Мала Сугубина, док је шест активних супстанци пестицида детектовано, осим у узорцима Бачка са локалитета Сремски Карловци, и у узорцима Ризлинг италијански са истог локалитета.



Табела 34. Резултати анализе сортних белих вина према recovery калибрацији

	Радмиловац				Заклопача	Сремски Карловци				Голобок	Доње Злегиње		Мала Сугубина
	Chardonnay	Ризлинг рајнски	Ризлинг италијански	Sauvignon blanc	Панонија	Сила	Ризлинг италијански	Петра	Бачка	Морава	Ризлинг италијански	Јагода	Тамјаника бела
активне супстанце	концентрација (mg/kg)												
боскарид	0,058	0,133	0,121	0,062									0,023
ципродинил	0,018	0,012	0,013	0,018		0,017	0,019	0,269	0,023	0,028	0,026	0,021	0,047
дифенокназол						0,041	0,048	0,275	0,897		0,052	0,061	
диметоморф										0,175			0,049
крезоксим метил													0,015
металаксил						0,027	0,018	0,039	0,03		0,009	0,013	
миклобуганил													0,033
пропиконазол						0,024	0,024	0,171	0,04		0,027	0,04	0,029
пириметанил							0,066		0,039	0,126	0,012	0,011	0,421
тебуконазол						0,01	0,022	0,101	0,032				

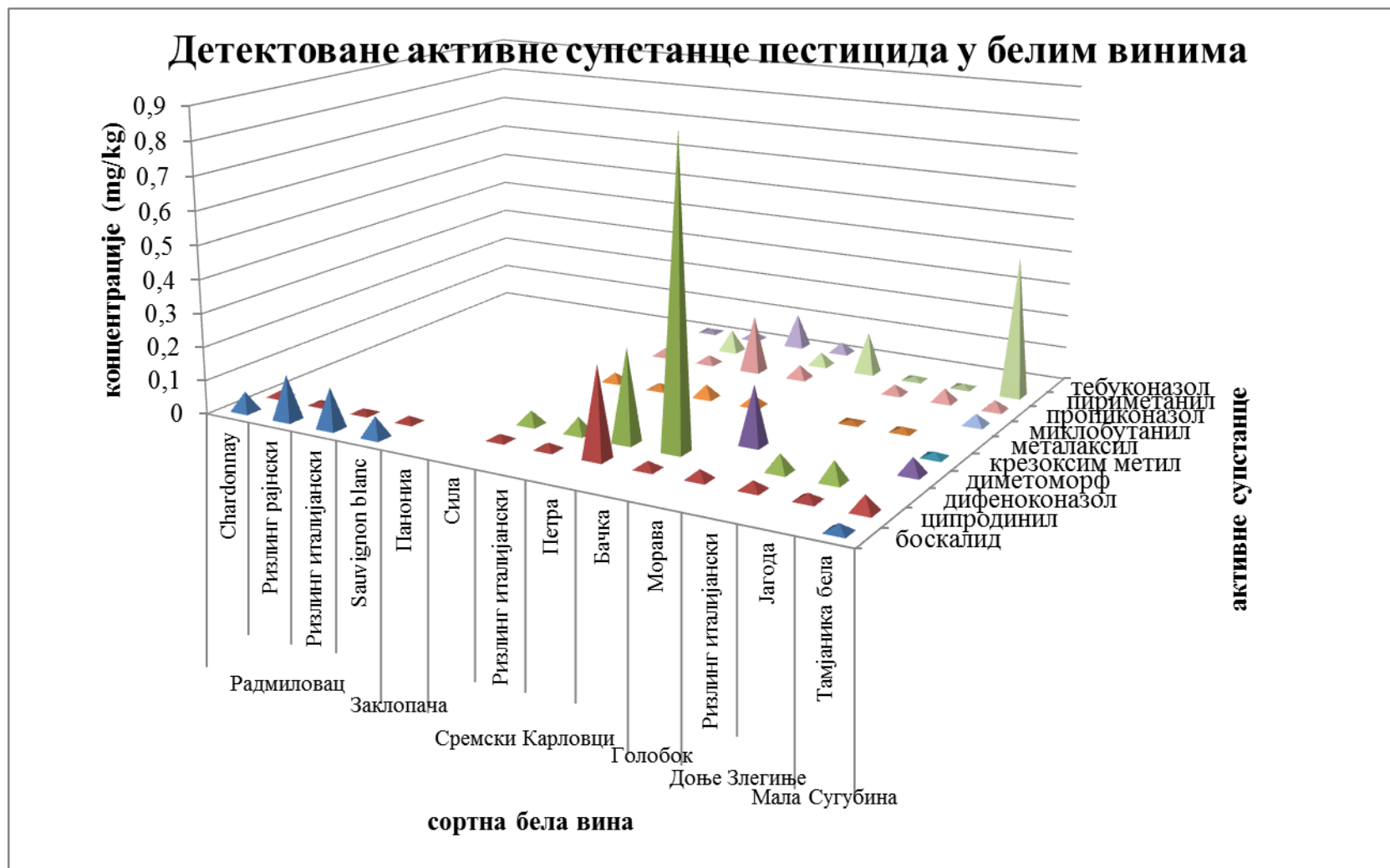


График 4. Активне супстанце пестицида квантификоване у узорцима сортних белих вина

## Процена изложености појединачних активним супстанцама преко грожђа

Резултати детерминистичке процене хроничног уноса појединачних активних супстанци преко грожђа за различите узрастне групе у Републици Србији приказани су у Табелама 35 (црно грожђе) и 36 (бело грожђе).

Процењени унос сваке детектоване активне супстанце је испод нивоа толеришућег дневног уноса.

Табела 35. Унос појединачних активних супстанци преко црног грожђа и  
карактеризација ризика

	Популациона група (узраст)									
	Одојчад (8-12 м.)		Предшколска деца		Деца (7-10 г.)		Адолесценти (11-14 г.)		Одрасли (15+ г.)	
	Унос	%TDI	Унос	%TDI	Унос	%TDI	Унос	%TDI	Унос	%TDI
	(ng/kg тм/дан)		(ng/kg тм/дан)		(ng/kg тм/дан)		(ng/kg тм/дан)		(ng/kg тм/дан)	
азоксистробин	21,1	0,011	10,5	0,005	6,4	0,003	4,1	0,002	2,8	0,001
боскалид	60,4	0,15	30,2	0,076	18,2	0,046	11,7	0,029	7,9	0,02
ципродинил	23,0	0,077	11,5	0,038	6,9	0,023	4,4	0,015	3,0	0,01
дифеноконазол	3867	38,7	1934	19,3	1166	11,7	747	7,5	507	5,1
диметоморф	18,0	0,036	9,0	0,018	5,4	0,011	3,5	0,007	2,4	0,005
флудиоксонил	28,9	0,008	14,5	0,004	8,7	0,002	5,6	0,002	3,8	0,001
крезоксим метил	4,8	0,001	2,4	0,0006	1,4	0,0004	0,92	0,0002	0,62	0,0002
металаксил	17,0	0,021	8,5	0,011	5,1	0,006	3,3	0,004	2,2	0,003
миклобутанил	193	0,77	96,7	0,39	58,3	0,23	37,3	0,15	25,4	0,10
пропиконазол	14,6	0,036	7,3	0,018	4,4	0,011	2,8	0,007	1,9	0,005
вираклостробин	18,1	0,060	9,0	0,030	5,5	0,018	3,5	0,012	2,4	0,008
пириметанил	134	0,079	66,9	0,039	40,3	0,024	25,8	0,015	17,5	0,01
спироксамин	6,9	0,028	3,5	0,014	2,1	0,008	1,3	0,005	0,91	0,004
тебуконазол	167	0,56	83,6	0,28	50,4	0,17	32,3	0,11	21,9	0,073
флутриафол	3,9	0,039	2,0	0,020	1,2	0,012	0,76	0,008	0,51	0,005
квиноксифен	61,9	0,031	30,9	0,016	18,7	0,009	12,0	0,006	8,1	0,004
бупрофезин	4,5	0,045	2,2	0,022	1,3	0,013	0,86	0,009	0,58	0,006
фенхексамид	52,3	0,026	26,1	0,013	15,8	0,008	10,1	0,005	6,9	0,003
ипродион	11,8	0,059	5,9	0,030	3,6	0,018	2,3	0,011	1,6	0,008
<i>Напомене</i> : телесна маса: одојчад = 10 kg; предшколска деца = 20 kg; деца = 33,17 kg; адолесценти = 51,78 kg; одрасли = 76,27 kg.										
Конзумирана количина грожђа: за све популационе групе 6,8 г/дан										
%TDI су израчунати на основу појединачних уноса пестицида и одговарајућих TDI преузетих из EU pesticide database										

Табела 36. Унос појединачних активних супстанци преко белог грозђа и карактеризација ризика

	Популациона група (узраст)									
	Одојчад (8-12 м.)		Предшколска деца		Деца (7-10 г.)		Адолесценти (11-14 г.)		Одрасли (15+ г.)	
	Унос (ng/kg тм/дан)	%TDI	Унос (ng/kg тм/дан)	%TDI	Унос (ng/kg тм/дан)	%TDI	Унос (ng/kg тм/дан)	%TDI	Унос (ng/kg тм/дан)	%TDI
азоксистробин	22,1	0,011	11,1	0,006	6,7	0,003	4,3	0,002	2,9	0,002
боскалид	40,6	0,10	20,3	0,051	12,2	0,031	7,8	0,020	5,3	0,013
цимоксанил	13,0	0,10	6,5	0,050	3,9	0,030	2,5	0,019	1,7	0,013
ципродинил	385	1,28	192	0,64	116,0	0,39	74,3	0,25	50,4	0,17
дифенокназол	396	4,0	198	2,0	119,5	1,2	76,5	0,77	52,0	0,52
диметоморф	34,2	0,068	17,1	0,034	10,3	0,021	6,6	0,013	4,5	0,009
флудиоксонил	69,0	0,019	34,5	0,009	20,8	0,006	13,3	0,004	9,0	0,002
крезоксим метил	14,4	0,004	7,2	0,002	4,3	0,001	2,8	0,0007	1,9	0,0005
металаксил	26,9	0,034	13,4	0,017	8,1	0,010	5,2	0,007	3,5	0,004
миклобутанил	76,1	0,30	38,0	0,15	22,9	0,092	14,7	0,059	10,0	0,040
пропиконазол	394	0,99	197	0,49	119	0,30	76,1	0,19	51,7	0,13
пираклостробин	22,6	0,075	11,3	0,038	6,8	0,023	4,4	0,015	3,0	0,010
пириметанил	462	0,27	231	0,14	139	0,082	89,2	0,053	60,6	0,036
спироксамин	13,1	0,053	6,6	0,026	4,0	0,016	2,5	0,010	1,7	0,007
тебуконазол	915	3,1	458	1,5	276	0,92	177	0,59	120	0,4

Напомене : телесна маса: одојчад = 10 kg; предшколска деца = 20 kg; деца = 33,17 kg; адолесценти = 51,78 kg; одрасли = 76,27 kg.

Конзумирана количина грозђа: за све популационе групе 6,8 g/дан

%TDI су израчунати на основу појединачних уноса пестицида и одговарајућих TDI преузетих из EU pesticide database

Резултати процене акутног уноса активних супстанци присутних у грозђу приказани су у Табелама 37 и 38 за различите узрастне групе у Републици Србији. Акутни унос дифенокназола из црног грозђа премашује акутну референтну дозу за одојчад, адолесценте и одрасле (121%, 625%, 424%, редом). Такође и унос тебуконазола прекорачује акутну референтну дозу: у случају конзумирања црног грозђа у групи адолесцената (145%), односно у случају конзумирања белог грозђа код одојчади, адолесцената и одраслих (103%, 532%, 361%, редом).

Табела 37. Акутни унос појединачних активних супстанци преко црног грожђа и карактеризација ризика

	Популациона група (узраст)									
	Одојчад (8-12 м.)		Предшколска деца		Деца (7-10 г.)		Адолесценти (11-14 г.)		Одрасли (15+ г.)	
	Унос (ng/kg тм/дан)	%ARfD	Унос (ng/kg тм/дан)	%ARfD	Унос (ng/kg тм/дан)	%ARfD	Унос (ng/kg тм/дан)	%ARfD	Унос (ng/kg тм/дан)	%ARfD
дифеноконазол	0,19	121	0,097	60,6	0,059	36,6	1,00	625	0,68	424
диметоморф	0,0006	0,10	0,0003	0,052	0,0002	0,032	0,0032	0,54	0,0022	0,37
миклобутанил	0,0002	0,07	0,0001	0,035	0,00006	0,021	0,001	0,36	0,0007	0,24
металаксил	0,0006	0,13	0,0003	0,063	0,0002	0,038	0,0032	0,65	0,0022	0,44
пропиконазол	0,0002	0,07	0,0001	0,035	0,00006	0,021	0,0011	0,36	0,0007	0,24
пираклостробин	0,0006	2,0	0,0003	1,0	0,0002	0,60	0,0031	10,3	0,0021	7,0
спироксамин	0,0001	1,3	0,00006	0,64	0,00004	0,39	0,0007	6,6	0,0005	4,5
тебуконазол	0,0085	28,2	0,0042	14,1	0,0026	8,5	0,044	145	0,030	98,5
флутриафол	0,00007	0,14	0,00003	0,068	0,00002	0,041	0,00035	0,70	0,0002	0,47
бупрофезин	0,00008	0,016	0,00004	0,0081	0,00002	0,0049	0,00042	0,084	0,0003	0,057
ипродион	0,0001	0,20	0,00006	0,10	0,00004	0,061	0,00062	1,0	0,0004	0,70
<i>Напомене</i> : телесна маса: одојчад = 10 kg; предшколска деца = 20 kg; деца = 33,17 kg; адолесценти = 51,78 kg; одрасли = 76,27 kg.										
%ARfD су израчунати на основу уноса појединачних пестицида при максималној утврђеној концентрацији и одговарајућих ARfD преузетих из EU pesticide database										

Табела 38. Акутни унос појединачних активних супстанци преко белог грожђа и карактеризација ризика

	Популациона група (узраст)									
	Одојчад (8-12 м.)		Предшколска деца		Деца (7-10 г.)		Адолесценти (11-14 г.)		Одрасли (15+ г.)	
	Унос (ng/kg тм/дан)	%ARfD	Унос (ng/kg тм/дан)	%ARfD	Унос (ng/kg тм/дан)	%ARfD	Унос (ng/kg тм/дан)	%ARfD	Унос (ng/kg тм/дан)	%ARfD
цимоксанил	0,0006	0,78	0,0003	0,39	0,0002	0,23	0,0032	4,0	0,0022	2,7
дифеноконазол	0,014	9,0	0,0072	4,5	0,0044	2,7	0,074	46,5	0,051	31,5
диметоморф	0,0008	0,13	0,0004	0,067	0,0002	0,040	0,0041	0,68	0,0028	0,46
металаксил	0,0005	0,097	0,0002	0,049	0,0002	0,029	0,0025	0,50	0,0017	0,34
миклобутанил	0,0037	1,2	0,0019	0,60	0,0011	0,36	0,019	6,1	0,013	4,2
пропиконазол	0,0069	2,3	0,0035	1,2	0,0021	0,70	0,036	11,9	0,024	8,1
пираклостробин	0,0005	1,6	0,0002	0,80	0,0001	0,48	0,0025	8,2	0,0017	5,6
спироксамин	0,0004	0,36	0,0002	0,18	0,0001	0,11	0,0018	1,8	0,0013	1,3
тебуконазол	0,031	103	0,016	51,7	0,0093	31,1	0,16	532	0,11	361
<i>Напомене</i> : телесна маса: одојчад = 10 kg; предшколска деца = 20 kg; деца = 33,17 kg; адолесценти = 51,78 kg; одрасли = 76,27 kg.										
%ARfD су израчунати на основу уноса појединачних пестицида при максималној утврђеној концентрацији и одговарајућих ARfD преузетих из EU pesticide database										

## Процена изложености активним супстанцама преко вина

Резултати детерминистичке процене хроничног уноса активних супстанци пестицида преко вина за одраслу популацију у Републици Србији приказани су у Табелама 39 (црвено вино) и 40 (бело вино).

Процењени унос сваке детектоване активне супстанце је испод TDI.

Табела 39. Хронични унос активних супстанци преко црвеног вина и карактеризација ризика за одраслу популацију

	Конзумирана количина вина: 10 mL/дан				Конзумирана количина вина: 200 mL/дан			
	Концентрација: просек		Концентрација: max		Концентрација: просек		Концентрација: max	
	Унос	% TDI	Унос	% TDI	Унос	% TDI	Унос	% TDI
	(ng/kg тм/дан)		(ng/kg тм/дан)		(ng/kg тм/дан)		(ng/kg тм/дан)	
азоксистробин	0,39	0,0002	0,39	0,0002	7,9	0,004	7,9	0,004
боскалид	1,3	0,003	1,8	0,005	25,4	0,063	36,7	0,092
диметоморф	1,4	0,003	2,5	0,005	28,1	0,056	49,8	0,10
металаксил	6,4	0,008	39,3	0,049	128	0,16	787	0,98
пираклостробин	1,7	0,006	1,9	0,006	33,1	0,11	37,5	0,13
пириметанил	4,8	0,003	26,9	0,016	96,7	0,057	538	0,32
тебуконазол	2,4	0,008	6,3	0,021	48,2	0,16	127	0,42
фенхексамид	8,9	0,005	23,7	0,012	179	0,089	474	0,24
ципродинил	10,9	0,036	23,7	0,079	218	0,73	475	1,6

*Напомене:* телесна маса одраслих = 76,27 kg  
%TDI су израчунати на основу уноса појединачних пестицида и одговарајућих TDI преузетих из EU pesticide database

Табела 40. Хронични унос активних супстанци преко белог вина и карактеризација ризика за одраслу популацију

	Конзумирана количина вина: 10 mL/дан				Конзумирана количина вина: 200 mL/дан			
	Концентрација: просек		Концентрација: max		Концентрација: просек		Концентрација: max	
	Унос	% TDI	Унос	% TDI	Унос	% TDI	Унос	% TDI
	(ng/kg тм/дан)		(ng/kg тм/дан)		(ng/kg тм/дан)		(ng/kg тм/дан)	
боскалид	10,3	0,026	17,4	0,044	205	0,51	349	0,87
ципродинил	5,1	0,017	35,3	0,12	102	0,34	705	2,4
дифеноконазол	34,7	0,35	118	1,2	694	6,9	2352	23,5
диметоморф	23,0	0,046	29,5	0,059	461	0,92	590	1,2
крзоксим метил	2,0	0,0005	2,2	0,0006	39,3	0,010	44,5	0,011
металаксил	3,8	0,005	5,1	0,0064	75	0,094	102	0,13
миклобутанил	9,1	0,036	13,8	0,055	181	0,73	277	1,1
пропиконазол	7,8	0,020	22,4	0,056	156	0,39	448	1,1
пириметанил	8,5	0,005	19,9	0,012	169	0,10	399	0,23
тебуконазол	5,1	0,017	13,2	0,044	101	0,34	265	0,88

*Напомене:* телесна маса одраслих = 76,27 kg  
%TDI су израчунати на основу уноса појединачних пестицида и одговарајућих TDI преузетих из EU pesticide database

Резултати процене изложености појединачним активним супстанцама пестицида преко вина за одраслу популацију у Републици Србији приказани су у Табелама 41 (црвено вино) и 42 (бело вино).

Процењени акутни унос сваке детектоване активне супстанце пестицида је испод ARfD.

Табела 41. Акутни унос пестицида преко црвеног вина и карактеризација ризика

	Одрасли (15+ г.)	
	Унос	%ARfD
	(mg/kg тм/дан)	
диметоморф	0,0003	0,05
металаксил	0,005	1,0
пираклостробин	0,0002	0,8
тебуконазол	0,0008	2,7
<i>Напомене:</i> телесна маса одрасли = 76,27 kg.		
%ARfD су израчунате на основу уноса појединачних пестицида при максимално утврђеној концентрацији и одговарајућих ARfD преузетих из EU pesticide database		

Табела 42. Акутни унос пестицида преко белог вина и карактеризација ризика

	Одрасли (15+ г.)	
	Унос	%ARfD
	(mg/kg тм/дан)	
дифеноконазол	0,01	9,3
диметоморф	0,004	0,62
металаксил	0,0007	0,13
миклобутанил	0,002	0,56
пропиконазол	0,003	0,94
тебуконазол	0,002	5,6
<i>Напомене:</i> телесна маса одрасли = 76,27 kg.		
%ARfD су израчунате на основу уноса појединачних пестицида при максимално утврђеној концентрацији и одговарајућих ARfD преузетих из EU pesticide database		

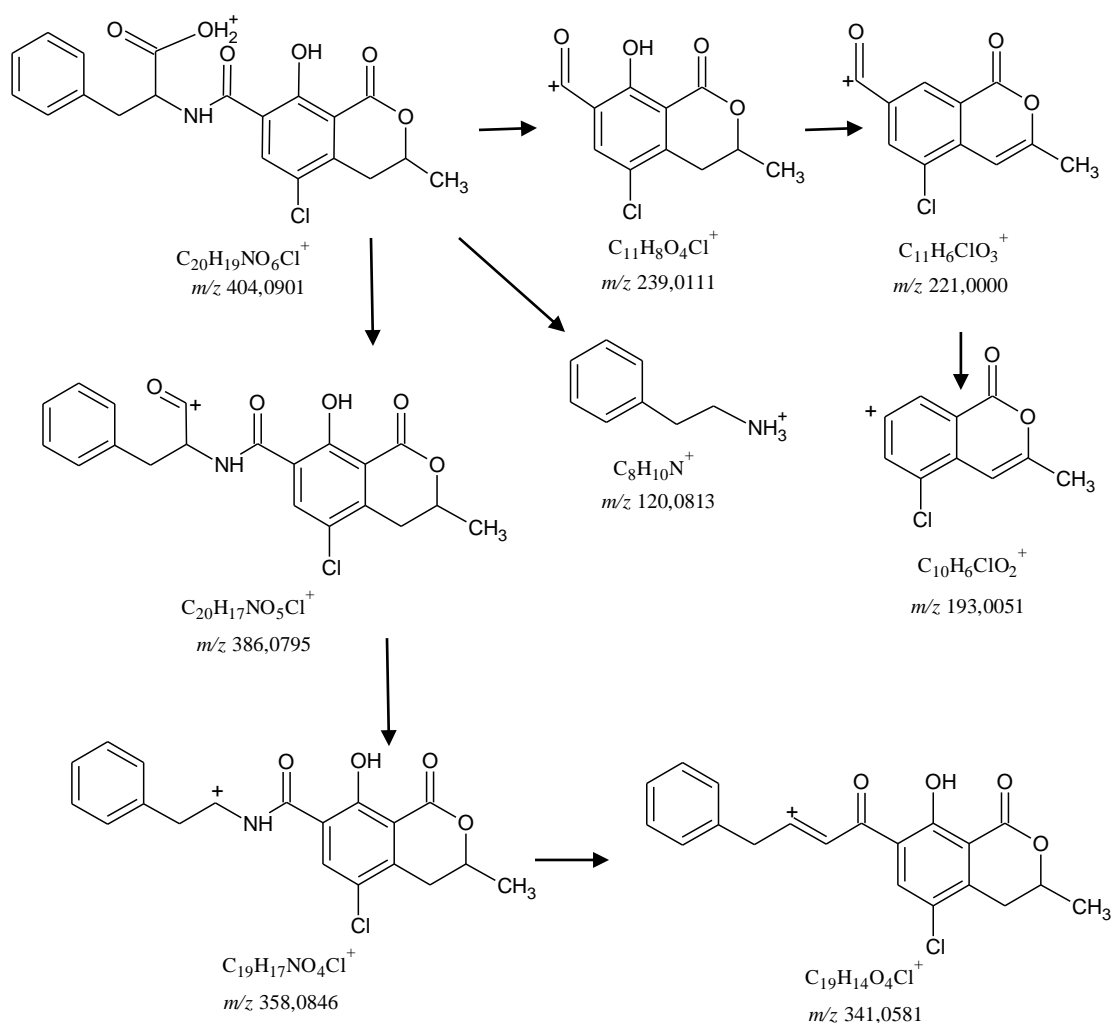
## 6. Дискусија

### 6.1. Анализа охратоксина А

#### 6.1.1. Оптимизација услова масеног спектрометра за детекцију охратоксина А

За постављање методе неопходно је прво одредити услове масеног спектрометра, тј. енергије фрагментације (Fr.) и колизије (CE), за које ће се добити јони са најинтезивнијим одговором. Помоћу Mass Hunter Optimizer Software Version B06.00 (Agilent Technologies 2011) добијено је да родитељ јон ОТА ( $m/z$  404) под утицајем Fr. од 105 V и CE 20 V даје продукт јон (Q)  $m/z$  239, а под утицајем Fr. од 120 V и CE 33 V јон  $m/z$  221. Фрагментација јона  $m/z$  404 у  $m/z$  239 настаје као последица губитка фенилаланина, а јон  $m/z$  221 настаје као последица губитка воде из јона  $m/z$  239 (Lau et al., 2000; Lindenmeir et al., 2004; Campone et al., 2011; Roland et al., 2014; Yang et al., 2015; Andrade i Lanças, 2017; Campone et al., 2018) (Слика 10). За разлику од јона  $m/z$  239 који је коришћен за квантификацију и  $m/z$  221 за квалитативну потврду Lau et al. (2000); Fernandes et al. (2013) и Mitchell et al. (2017) су користили јон  $m/z$  358, настао губитком мравље киселине, и јон  $m/z$  239. Rodríguez-Cabo et al. (2016) су на LC-QTOF-MS користили  $m/z$  358,0841 и 239,0106 као квантификационе јоне и  $m/z$  341,0575 и 120,0808 као јоне за потврду присуства ОТА у испитиваним узорцима.





Слика 10. Претпостављени пут фрагментације ОТА (Yang et al., 2015)

### 6.1.2. Валидациони параметри одређивања охратоксина А у грозђу и вину

Током истраживања остварен је циљ формирања методе која једним поступком пречишћавања и инструменталног одређивања омогућава истовремену квантификацију охратоксина А и остатака активних супстанци пестицида у вину и грозђу. До сада на нашим просторима нема објављених радова који укључују оваква истраживања. Први корак је обухватио прилагођавање QuEChERS методе припреме за истовремено одређивање ОТА и остатака активних супстанци пестицида. QuEChERS метода је званична и широко примењивана за анализу остатака, и компатибилна је са LC и GC хроматографијом куплованом са различитим масеним спектрометрима, без којих је данас немогуће замислити

контролу хране. С друге стране, за припрему узорака за анализу ОТА званична метода подразумева употребу скуких имуноафинитетних колона. Међутим, постоје истраживања која показују да се QuEChERS метода може применити и за припрему узорака за анализу микотоксина (Arroyo-Manzanares et al., 2013; Wei et al., 2018). На тај начин, уместо две различите методе припреме једног истог узорка грозђа/вина користи се једна метода којом се истовремено екстрахују сви анализи. Број узорака који се могу анализирати у току једног дана се дупло повећава, а смањује се утрошена количина растварача и потрошног материјала, а самим тим и цена анализе. Имајући све ово у виду истраживање смо започели прилагођавањем QuEChERS методе за екстракцију ОТА из узорака грозђа и вина. Други корак QuEChERS методе, пречишћавање екстракта, добијеног након екстракције узорка помоћу ацетонитрила у цитратном пуферу, помоћу dSPE китова није дало задовољавајући принос екстракције (recovery) за ОТА. Анализирањем екстракта без додатног пречишћавања добијен је добар принос екстракције, што је било у сагласности са резултатима Arroyo-Manzanares et al. (2013) који су такође добили незадовољавајуће резултате за свих 15 микотоксина укључујући и ОТА после фазе пречишћавања преко различитих сорбената ( $C_{18}$ ,  $MgSO_4$  и PSA) и истраживањима најпогоднијег растварача за екстракцију. Најбољи резултати за принос екстракције су добијени коришћењем чистог ацетонитрила и  $C_{18}$  сорбента и за грозђе и за производе од грозђа (84,56 - 112,05%) (Wei et al., 2018). Калибрационе криве добијене снимањем стандарда ОТА у ацетонитрилу и у матриксу узорка грозђа које одговарају опсегу концентрација 1,00 - 50,00  $\mu\text{g}/\text{kg}$  и помоћу методе стандардног додатка у опсегу концентрација 2,00 - 20,00  $\mu\text{g}/\text{kg}$  су квадратне функције са коефицијентима корелације преко 0,996 (Табела 13). Линеарну зависност има калибрациона крива за бело грозђе добијена методом стандардног додатка. За квантитативно одређивање садржаја ОТА у узорцима винског грозђа коришћена је калибрација методом стандардног додатка да би се избегао утицај матрикса и корекција за принос екстракције.

За одређивање садржаја ОТА у сортним винима коришћене су калибрационе криве у опсегу концентрација од 1,00 - 10,00  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , по три понављања за сваки калибрациони ниво. Добијене једначине калибрационих кривих за бело и црвено

вино у раствору ацетонитрила, матриксу узорака и по методи стандардног додатка имају квадратну зависност са коефицијентима корелације већим од 0,993 (Табела 14).

На основу нагиба калибрационих кривих у матриксу и у ацетонитрилу израчунат је утицај матрикса грозђа и вина на ОТА. Утврђено је да оба матрикса имају утицај на одређивање садржаја ОТА. Матрикс ефекат (МЕ) црног грозђа је 29,16% и утиче на повећање сигнала ОТА, а МЕ белог грозђа (-10,95%) на незнатно смањење сигнала ОТА. Црвено вино има велики утицај матрикса, доводи до смањења сигнала ОТА и износи -47,24%, док у белом вину доводи до повећања сигнала и износи 39,49% (График 5).



График 5. Упоредни приказ МЕ грозђа и вина на ОТА

Сличне резултате су у својим истраживањима добили Arroyo-Manzanares et al. (2013) када су поредили матрикс ефекат на ОТА после припреме узорака QuEChERS и DLLME методама и добили вредности од 17,1% и 22,8%, редом. Такође, Mariño-Repizo et al. (2015) су испитивали утицај матрикса црвеног вина без и након пречишћавања преко SPE колоне. МЕ после пречишћавања је износио 20%, а без пречишћавања вина 95%. С друге стране, Fernandes et al. (2013) су применом модификоване QuEChERS методе за одређивање ОТА у вину добили знатно већи МЕ (106,5%). Испитивањем МЕ у вину Rodríguez-Cabo et al. (2016) су добили вредности од 92 до 124%, при чему је већи утицај матрикса добијен за бело вино, као и нашем истраживању. Wei et al. (2018) у свом истраживању су

добили да матрикс грозђа утиче на повећање сигнала ОТА од 33%, а матрикс вина 58%. За разлику од ових истраживача Sun et al. (2017) су приликом испитивања МЕ у црвеним и белим винима добили вредност мању од 10%, док Camrone et al. (2018) нису утврдили значајну разлику између калибрације у растварачу и калибрације у матриксу узорка. Значајан утицај матрикса и велике варијације су последица велике количине шећера и пигмената који су присутни у узорцима и чији садржај варира у зависности од сорте, периода бербе, временских услова и других фактора.

Добијена вредност за LOD у овом истраживању износи 0,33  $\mu\text{g/kg}$  у црном грозђу и 0,5  $\mu\text{g/kg}$  у белом грозђу, а за LOQ је експериментално постављена вредност од 1  $\mu\text{g/kg}$ , која је 10 пута нижа од максимално дозвољене количине у сувом винском воћу (10  $\mu\text{g/kg}$ ) и омогућава поуздано одређивање ОТА. У црвеном и белом вину LOD је исти као и за црно грозђе (0,33  $\mu\text{g/kg}$ ), док је за LOQ постављена вредност која одговара најнижој тачки калибрације (0,5  $\mu\text{g/kg}$ ).

Тачност методе је испитивана у опсегу од 2  $\mu\text{g/kg}$  (1/5МДК) до 20  $\mu\text{g/kg}$  (2xМДК) за грозђе на четири нивоа у 3 понављања. Средња вредност приноса екстракције за црно грозђе се кретала од 81,2% на концентрационом нивоу од 10  $\mu\text{g/kg}$  до 104,2% на концентрационом нивоу од 2  $\mu\text{g/kg}$ , а коефицијент варијације (%RSD) од 1,03% (2  $\mu\text{g/kg}$ ) до 16,1% (20  $\mu\text{g/kg}$ ). Средња вредност приноса екстракције за бело грозђе се кретала у распону од 93,7 (10  $\mu\text{g/kg}$ ) до 117,2% (2  $\mu\text{g/kg}$ ), уз %RSD од 2,01% (5  $\mu\text{g/kg}$ ) до 5,5% (10  $\mu\text{g/kg}$ ). Укупна средња вредност приноса екстракције за црно грозђе је била 91,8% (%RSDr 12,1), а за бело грозђе 102,9%, (%RSDr 9,86) (Табела 15, График 5). Поновљивост методе је испитивана обогаћивањем контролних узорака црног и белог грозђа на концентрационом нивоу од 2  $\mu\text{g/kg}$  у шест понављања и износила је за црно грозђе %RSDr 2,70, а за бело %RSDr 2,58 (Табела 16).

За црвено и бело вино су добијене веће вредности приноса екстракције него за грозђе. Средња вредност приноса екстракције за црвено вино се кретала од 97,3% на концентрационом нивоу од 5  $\mu\text{g/kg}$  до 106,7% на концентрационом нивоу од 1  $\mu\text{g/kg}$ , а коефицијент варијације од 1,19 (5  $\mu\text{g/kg}$ ) до 8,48% (10  $\mu\text{g/kg}$ ). Средња вредност приноса екстракције за црвено вино је износила 101,5%, а %RSDr 3,83. За бело вино је била у распону од 90,6 (2  $\mu\text{g/kg}$ ) до 110,5% (1  $\mu\text{g/kg}$ ), уз %RSD од

1,57 (10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) до 23,29% (1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). И за бело вино средња вредност приноса екстракције је била блиска 100%, односно 100,7%, а %RSDr 8,11 (Табела 17, График б). За вино су добијене веће вредности за поновљивост него у грозђу. Поновљивост за црвено вино на концентрационом нивоу од 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  је износила 11,71%, а за бело 10,76% (Табела 18).



График б. Графички приказ средњих вредности приноса екстракција и %RSDr у грозђу и вину

Резултати добијени применом QuEChERS методе припреме узорак грозђа и вина су дали задовољавајуће вредности које су у исто време и у складу су са захтевима Уредбе 401/2006. Једино одступање је добијено за бело вино на најнижем концентрационом нивоу (RSDr 23,29%), што је последица мале концентрације анализата, а великог утицаја матрикса.

Применом наше методе на узорке грозђа добијене су боље вредности приноса екстракције него у истраживању MacDonald et al. (1999). На тржишту Уједињеног Краљевства аутори су прикупили 60 узорак сувог винског воћа (за које је према Уредби 1881/2006 постављена МДК од 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) за анализу на присуство ОТА. Узорци сувог винског воћа су пречишћени преко имуноафинитетних колона, након мешања са водом, метанолом, 0,1 М фосфорном киселином и садржај ОТА је одређен употребом течног хроматографа са флуоресцентним детектором. Линеарност је испитана у опсегу 1 - 15  $\text{ng}/\text{ml}$ , а принос екстракције за ниво од 5

µg/kg износио је 63,1% за рибизле, 76,7% за суво грожђе и 71,4% за султану, док је граница квантификације нешто нижа од наше вредности и износи 0,2 µg/kg.

Такође, Ottender et Majerus (2000) су добили нижу вредност границе детекције (0,01 µg/l) после разблаживања узорака вина PBS-пуфером, а затим пречишћавањем преко имуноафинитетних колона.

Сличне резултате нашим су добили de Cerain et al. (2002) после пречишћавања узорака вина преко имуноафинитетних колона. Принос екстракције су испитивали на три нивоа концентрација (0,148; 0,207 и 0,355 ngOTA/ml вина) и добили вредности од 95,2 - 116%. Граница детекције је постављена на нивоу од 0,05 ng/ml, а граница квантификације на нивоу од 0,07 ng/ml. Domijan i Peraica (2005) су за одређивање приноса екстракције обогаћивали узорке вина на нивоима концентрације 30 - 500 ng/l и добили нешто ниже вредности - 88% у црвеним и 95% у белим винима, али је граница детекције постављена на нижој концентрацији него у нашем раду (10 ng/l). Chiodini et al. (2006) су пречишћавали узорке конвенционално и органски произведених вина преко C<sub>18</sub> колона, а затим преко Oasis MAX колона и добили приносе екстракције 82,1% (за ниво 0,2 µg/l) и 105,1% (2,0 µg/l). Границе детекције и квантификације, у њиховом раду, износиле су 0,05 и 0,16 µg/l. Valero et al. (2008) су испитивали принос екстракције у зависности од садржаја шећера у винима за ниво од 2 µg/l и утврдили да постоји значајна разлика и да се принос екстракције смањује са повећањем садржаја шећера.

Argoyo-Manzanares et al. (2013) су поредили приносе екстракције добијене применом методе екстерне калибрације и помоћу калибрације са обележеним интерним стандардима за црвено и бело вино. Принос екстракције за концентрације од 12,5; 25 и 50 ng/g је био од 102,67 - 139,42% са екстерном калибрацијом и од 95,09 - 135,12% са калибрацијом са обележеним интерним стандардима, док су LOD и LOQ за ОТА применом ових метода без претходне припреме узорака били 0,1 и 0,5 ng/ml, у раствору стандарда и црвеном и белом вину. У нашем истраживању је коришћена само метода екстерне калибрације, чиме је избегнута употреба интерног стандарда што би додатно повећало цену анализе, при чему су добијене задовољавајуће вредности за принос екстракције.

Fernandes et al. (2013) су одређивали принос екстракције после примене модификоване QuEChERS методе за екстракцију ОТА из вина на сличним концентрационим нивоима, као и у нашем раду, од 0,5; 1; 5 и 10 µg/kg и добили вредности од 87,2 - 102,6%, уз %RSD мањи од 14, при чему је LOD за њихову методу износио 0,1 µg/kg, а LOQ 0,4 µg/kg.

Такође, мерењем концентрације ОТА методом екстерне калибрације у опсегу концентрација од 0,10 - 15,0 ng/ml Gentile et al. (2016) су добили коефицијент корелације ( $R^2$ ) > 0,99, док су вредности за LOD и LOQ биле 0,01 ng/ml и 0,04 ng/ml, редом. Средња вредност приноса екстракције износила је 95,4%, уз релативну стандардну девијацију мању од 4,2%.

Слично нашим резултатима, Rodríguez-Cabo et al. (2016) су за линеарност одговора детектора у опсегу концентрација од 5 до 200 ng/ml, са и без додатка интерног стандарда, добили коефицијент корелације преко 0,99. Принос екстракције су испитивали обогаћивањем узорака сувог црвеног, белог и слатког белог вина на концентрационим нивоима од 1, 2 и 4 ng/ml. Најнижа вредност приноса екстракције је била 90% за слатко бело вино (2 ng/ml), а највећа 121% за суво црвено вино (1 ng/ml), са стандардним девијацијама од 2 - 12% и LOQ од 0,05 ng/ml.

### **6.1.3. Анализа узорака винског грожђа и сортног вина**

Ни у једном од 250 анализираних узорака зрелог црног и белог винског грожђа није детектован ОТА изнад LOD. *Botrytis cinerea* је регистрована у сорти црног грожђа Бургундац црни са локалитета Страгари, и у једној сорти белог грожђа Ризлинг рајнски са локалитета Радмиловац. Од грожђа узоркованог 2016. одмах после завршене винификације, 2017. године, узорковано је 160 црвених и белих вина. Охратоксин А је детектован у узорцима вина Pinot noir са локалитета Страгари у концентрацији 1,17 µg/kg која је мања од МДК у винима (2 µg/kg). Ово представља 3,1% од укупног броја анализираних црвених вина. Pinot noir је направљен од грожђа које је било заражено гљивом *B. cinerea*, која је вероватно својом активношћу на гроздовима, односно на покожици плода „отворила врата“

за развој токсигених гљива. Ниједан узорак белог вина није био контаминиран охратоксином А преко LOD вредности.

Више од 300 узорака вина на присуство ОТА из свих винских регија Европе (EC Reg. 822/87) прикупљених од 1997 - 1999 су анализирали Ottender i Maјerus (2000). Узорке вина су разблаживали PBS-пуфером а затим су разблажене узорке пречишћавали преко имуноафинитетних колона. За детекцију ОТА је коришћен течни хроматограф са флуоресцентним детектором са постављеном границом детекције 0,01  $\mu\text{g/l}$ . За разлику од наших истраживања, аутори су у 25% од анализираних узорака белих вина (укупно 60) детектовали ОТА са средњом вредношћу концентрације 0,108  $\mu\text{g/l}$ . Код розеа је 40% (n=55) узорака било контаминирано, средња вредност концентрације 0,119  $\mu\text{g/l}$ , док је у 54% (n=89) контаминираних црвених вина средња концентрација ОТА била 0,201  $\mu\text{g/l}$ . Аутори су такође уочили повећану контаминацију у узорцима вина из јужних зона у односу на узорке из северних регија. Код белих вина је 44% узорака из јужних зона било контаминирано (ср. вр. 0,054  $\mu\text{g/l}$ ) у односу на 15% узорака из северних зона (ср. вр. 0,012  $\mu\text{g/l}$ ). У 95% узорака црвених вина из јужних зона (Сицилија, Грчка и јужна Шпанија) је детектован ОТА (ср. вр. 1,153  $\mu\text{g/l}$ ), а у северним регијама у 23% узорака (ср. вр. 0,022  $\mu\text{g/l}$ ). Разлог за већи проценат контаминације црвених вина, као и за веће концентрације ОТА и веће разлике између винских зона код узорака црвених вина у односу на узорке белих вина је процес производње вина. Наиме, приликом производње белих вина одмах се врши одвајање течне (вино) и чврсте фазе (колач), док се приликом производње црвених вина, после примарне алкохолне ферментације поново се врши пресовање коже и семена под високим притиском, чиме се део ОТА поново преноси у вино (Bellí et al., 2004; Hocking et al., 2007; Mateo et al., 2007; Quintela et al., 2013). Такође, на основу добијених података утврђено је и да црвена вина доприносе са 15% у дневном уносу ОТА.

Domijan i Peraica (2005) су испитивали 14 узорака вина из Хрватске на присуство ОТА. У свим испитиваним црвеним винима утврђено је присуство ОТА, а највећа нађена концентрација износила је 0,047  $\mu\text{g/l}$ . Од седам анализираних белих вина ОТА је детектован у четири (max 0,022  $\mu\text{g/l}$ ). Такође, утврђено је присуство ОТА у свим винима из јужног дела Хрватске (јадранска обала), док вина из северног



дела, где је клима слична као и у Републици Србији, нису садржала ОТА. Израчунали су да је највећи дневни унос уколико би се конзумирале две чаше црвеног вина 0,20 - 0,26 ng/kg телесне масе, што је мање од прихватљивог дневног уноса према критеријуму Светске здравствене организације (16 ng/kg телесне масе). У другом испитивању вина из Хрватске ОТА је детектован у црвеним винима (7/7 узорак) са средњом концентрацијом 0,020 µg/l, а у белим винима (4/7 узорак) 0,010 µg/l (Peraica et al., 2010).

Поред конвенционално произведених вина постоје и органски произведена вина, која најчешће подразумевају вина добијена од органски произведеног грожђа. Смањена употреба пестицида може повећати појаву микотоксина, јер фитопатогене гљиве и инсекти својом активношћу на гроздовима повређују покожицу плода и на тај начин „отварају врата“ за развој токсигених гљива. Међутим, то није правило и постоје различити подаци везани за присуство ОТА у узорцима грожђа и вина из конвенционалне и органске производње. Произвођачи органског грожђа по правилу бирају сорте које су отпорније на болести. Chiodini et al. (2006) су испитивали присуство ОТА у 25 конвенционално и у 19 органски произведених вина. Ни у једном анализираном узорку није нађена концентрација ОТА већа од 2 µg/l. Највеће концентрације ОТА су нађене у црвеним винима, и то у винима из конвенционалне производње 0,75 µg/l, а у винима из органске производње 0,72 µg/l. У два розеа концентрације ОТА су биле <0,05 µg/l и 0,092 µg/l. Највећа детектована концентрација ОТА у конвенционално произведеним белим винима је 0,18 µg/l, а у органски произведеним белим винима 0,22 µg/l. Од 25 анализираних вина из конвенционалне производње у 10 узорака није детектован ОТА (40%), а у 7 (37%) од 19 узорака вина из органске производње није детектован ОТА. На основу добијених резултата није нађена значајна разлика у концентрацији ОТА ни у учесталости контаминације између ова два начина производње вина, односно смањена употреба фунгицида и инсектицида није довела до повећања производње микотоксина, што је потврђено и у нашем истраживању, где је ОТА детектован само у вину из конвенционалне производње. Чак постоје и истраживања која показују да фунгициди, без обзира што сузбијају фитопатогене не сузбијају и гљиве које су одговорне за производњу микотоксина

чиме им је омогућен развој а самим тим и могућност производње токсина (Pietri et al., 2001; ФАО, 2000; Battilani et al., 2004 цит по. Chiodini et al., 2006).

Remiro et al. (2012) су анализирали 51 узорак вина са тржишта у области Навара (Шпанија) на присуство шест охратоксина (ОТА, ОТВ, ОТС, МеОТА, МеОТВ, ЕтОТВ). Из конвенционалне производње је било 35 узорака црвених вина, а из органске 16. ОТА и ОТВ су детектовани у свим винима са ср. конц. 0,0127 и 0,011  $\mu\text{g/l}$ , редом. У 20% узорака била су присутна по три охратоксина. У по 31% узорака детектовано је четири и пет охратоксина, док је свих шест анализата детектовано у 18% узорака. Аутори су на основу добијених резултата израчунали да је допринос Навара вина у случају уноса ОТА 4,7% од РТWИ, а 6,6% од РТWИ у случају укупних охратоксина.

У САД-у Arroyo-Manzanares et al. (2013) су анализирали 143 узорака вина међу којима је било 33 црвених и 32 бела вина из органске производње. ОТА је детектован, као и нашем истраживању у само 8,3% узорака у концентрацијама од 0,11 - 0,43  $\mu\text{g/l}$ .

Резултате сличне нашим добили су и Fernandes et al. (2013) након анализе 30 узорака вина модификованом QuEChERS методом. Само у два узорка је детектован охратоксин А у концентрацијама блиским најнижем калибрационом нивоу (0,5  $\mu\text{g/kg}$ ).

Durguti et al. (2015a) су анализирали 24 узорка црвеног вина и један узорак белог вина из различитих региона Италије и Косова. Бело вино је направљено од грожђа које је било заражено и труло и детектована концентрација ОТА у овом узорку је била 1,297  $\mu\text{g/l}$ . Од црвених вина из Италије било је контаминирано 5 од 11 узорака у концентрацијама ОТА од 0,458 - 1,431  $\mu\text{g/l}$ . У осталим црвеним винима (6/13) концентрација ОТА је била од 0,028 - 0,348  $\mu\text{g/l}$ .

#### **6.1.4. Процена изложености популација охратоксину А преко грожђа**

Карактеризација ризика проистекла из детерминистичке процене уноса охратоксина А преко грожђа од стране популационих група у Републици Србији приказана је на Графицима 7 и 8 (сценарија Н2 и Н3).

Процењени унос охратоксина А је испод TWИ од 120  $\text{ng/kg}$  тм/недељно у свим разматраним сценаријима. Процент TWИ за одојчад није превазишао вредност од

2%, која је достигнута при 95-ом перцентилу концентрације охратоксина А у сценарију НЗ. За предшколску децу, максимални достигнути проценат TWI (при истим условима) износио је 1%. У популационој групи деце узраста од 7 - 10 година, унос охратоксина А је окарактерисан са максималних 0,6% од TWI, у НЗ сценарију. У случају адолесцената и одраслих, процењени унос охратоксина А је био врло низак, што је за резултат дало максималне уделе у TWI у НЗ сценарију од 0,39 и 0,26%, редом. Закључно, добијени резултати показују да унос охратоксина А преко грожђа представља прихватљив ризик за све узрастне групе у Републици Србији.

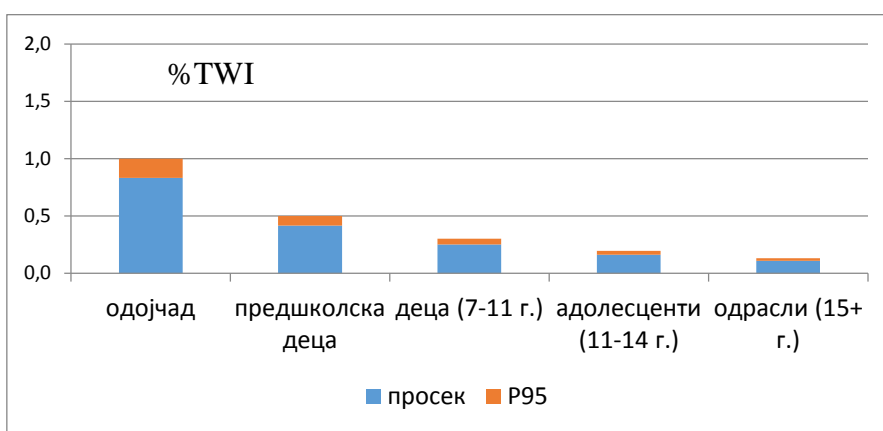


График 7. Карактеризација ризика услед уноса ОТА конзумирањем грожђа за различите узрастне групе популације у Републици Србији - сценарио Н2: <math>< LOD = \frac{1}{2} LOD</math>

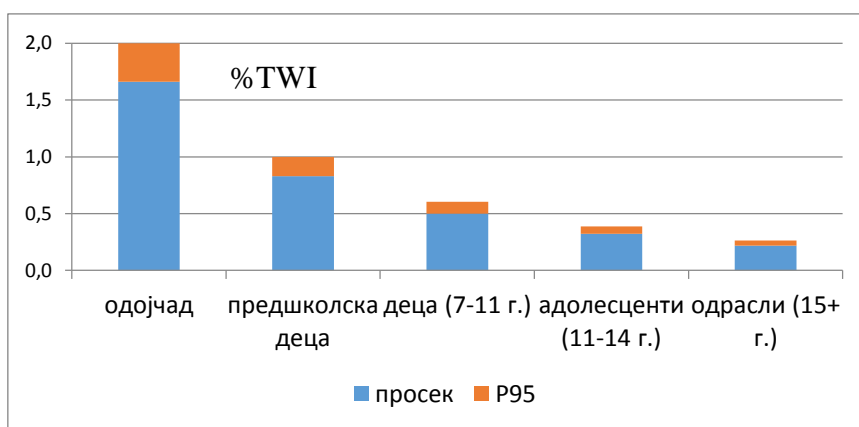


График 8. Карактеризација ризика услед уноса ОТА преко грожђа за различите узрастне групе популације у Републици Србији - сценарио Н3: <math>< LOD = LOD</math>

### 6.1.5. Процена изложености популација охратоксину А преко вина

Карактеризација ризика проистекла из детерминистичке процене уноса охратоксина А преко вина за одраслу популацију у Републици Србији приказана је на Графику 9 (сценарији Н1-Н4).

У сценаријима Н1-Н3 достигнути проценат од TWI је испод 1%, са максималних 0,15% у Н3 сценарију ( $<LOD = LOD$ ). Чак и у најконзервативнијем сценарију, Н4, који у обзир узима само контаминиране узорке, достигнуто је само 1,21% од TWI, што је пре свега узроковано ниском конзумираном количином вина. Када се саберу доприноси уносу охратоксина А конзумирањем вина и грозђа, одрасла популација достиже 0,5% TWI у Н3 сценарију, посматрано при просечним концентрацијама охратоксина А. Добијени резултати показују да унос охратоксина А преко вина и грозђа представља прихватљив ризик за одраслу популацију у Републици Србији. Mitchell et al. (2017) су испитивали процену уноса ОТА из свих намирница за популацију у САД-у. Резултати које су добили су у сагласности са нашим резултатима. Наиме, средња вредност уноса ОТА из свих намирница је износила 0,37; 0,39; 0,14 и 0,12 ng/kg тм/дан, за одојчад, децу од 12 месеци до 5 година, од 5 до 18 година и за одрасле, редом. При 95-ом перцентилу изложеност је нешто већа и износи 2,26; 1,63; 0,66 и 0,69 ng/kg тм/дан, за дате узрасне групе, редом.

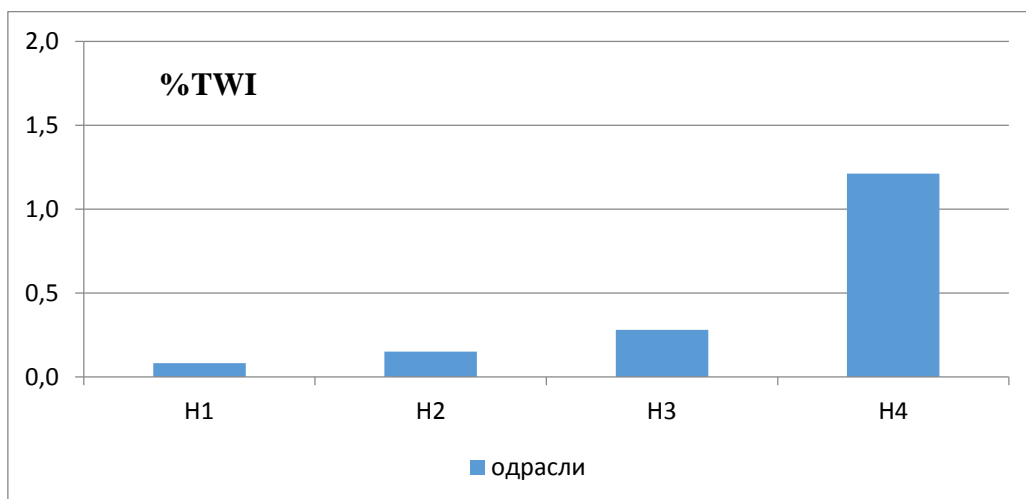


График 9. Карактеризација ризика (%TWI) услед уноса ОТА преко вина за одраслу популацију у Републици Србији (сценарији Н1-Н4)

### 6.1.6. Могућности уклањања охратоксина А из вина

Смањењем оштећења грозђа у виноградима може се смањити ризик од контаминације охратоксином А. Мере које је потребно предузети у винограду су: контрола штете на грозђу проузрокована фитопатогеним гљивама, обично применом фунгицида, контрола оштећења изазваних инсектима применом инсектицида, заштитом од сунца, резивањем, правилним наводњавањем. Потребно је континуирано праћење контаминације винограда, као и прављење мапа региона у којима постоји повећан ризик од развоја гљивица које продукују ОТА (Domijan i Peraica, 2005; Battilani et al., 2006; Durguti et al., 2014; Zhang et al., 2016; Luo et al., 2018). Уклањањем инфицираних бобица након бербе и складиштење на ниским температурама (0 °C) смањује се развој спора рода *Aspergillus*. Ризик од контаминације сувог грозђа у односу на винско грозђе охратоксином А је повећан због повећања односа *Aspergillus carbonarius* у односу на *Aspergillus niger* у току процеса сушења. *Aspergillus niger* је доминантна гљива у виноградима, а она ређе производи охратоксин А. Брзо сушење грозђа на температурама преко 30 °C, уз контролисану активност воде, такође смањује могућност продукције токсина. Пажљивим брањем грозђа, одмах после зрења, уз минимално оштећење гроздова, брзим транспортом до винарија, складиштењем у хладним условима, смањује се могућност за контаминацију охратоксином А после бербе. Велика количина ОТА се може уклонити у процесу винификације, јер се око 50 - 80% охратоксина А везује за кожицу и семе који се одбацују приликом цеђења вина или сока. Према томе, одвајање чврсте и течне фазе после ферментације је један од главних корака за смањење ОТА у процесу прављења вина. Истраживања показују нижу концентрацију охратоксина А у винима добијеним после дуже или двоструке ферментације и у оним направљеним од грозђа зараженог *B. cinerea* (Valero et al., 2008). Охратоксин А не подлеже биолошкој деградацији у процесу примарне алкохолне ферментације. Приликом производње црвених вина, после примарне алкохолне ферментације поново се врши пресовање коже и семена под високим притиском, чиме се део ОТА поново преноси у вино (Bellí et al., 2004; Hocking et al., 2007; Mateo et al., 2007; Quintela et al., 2013).

Неопходно је утврдити критичне тачке у којима почиње развој гљива и стварање охратоксина А. У току пољопривредне производње треба спроводити контролу квалитета и обучавати појединце који су укључени у све фазе производње. Затим, подржавати развој метода и техника за спречавање контаминације гљивама у пољу и у складиштима, као и метода за детекцију охратоксина А. Испитивања су показала да су калијум казеинат и активни угаљ погодни за уклањање ОТА из вина. У количини од 150 g/hl калијум казеинат може да уклони и до 82% токсина. Активни угаљ има већу специфичну површину, а самим тим и већи адсорптивни капацитет за ОТА, а мали адсорптивни капацитет за остале феноле. Степен уклањања токсина активним угљем зависи од концентрације адсорбента и од концентрације токсина присутне у узорцима вина. Међутим, сем уклањања ОТА, активни угаљ може адсорбовати и полифеноле и антоцијане и на тај начин може утицати на квалитет вина (Castellari et al., 2001; Gambuti et al., 2005; Var et al., 2008; Quintela et al., 2013). Токсични ефекти ОТА се могу делимично ублажити додатком суплемената у исхрану, као што се витамин Е, каротеноиди и флавоноиди (Soufleros et al., 2003).

Durguti et al. (2014) су испитивали смањење концентрације ОТА, тако што су прикупили узорке вина у току технолошког процеса после цеђења и филтрације. За процес цеђења белих и црвених вина су користили бентонит и поливинилполипропилидон, а за цеђење црвених вина још и желатин. Узорци вина су филтрирани преко филтер папира - Europor K30 и K60. За поређење су истовремено узимани узорци који нису прошли процес цеђења и филтрације. Детекција ОТА је рађена на течном хроматографу са флуоресцентним детектором. Вино је разблажено раствором полиетилен гликола и натријум бикарбоната, а затим пречишћавано преко имуноафинитетних колона. После цеђења и филтрације концентрација ОТА у винима је била мања од границе детекције (0,05 ng/ml) или уопште није детектован. Највеће смањење ОТА, односно потпуно уклањање, је постигнуто после филтрације преко K60 филтера. Бентонит може уклонити 10 - 30% присутне количине ОТА у вину, међутим утиче и на смањење полифенола и антоцијана, а самим тим се смањује и квалитет вина (Kurtbau et al., 2008; Var et al., 2008). Желатин показује бољу ефикасност у уклањању ОТА и то од 20 - 60% и за краће време у односу на бентонит. У истраживањима Sun et al.

(2017) беланце јајета се показало као најефикасније за уклањање ОТА и то до 90% концентрације. Такође, аутори су показали и да беланце најмање утиче на параметре којима се мери квалитет вина, за разлику од бентонита и желатина.

Ензим карбоксипептидаза А има могућност деградације ОТА, али истовремено има негативан утицај на квалитет вина. Неке бактерије (*Streptococcus*, *Bacillus*, *Bifidobacterium*) и гљиве (*Alternaria*, *Penicillium*, *Botrytis*) такође могу да разграде ОТА, али се ретко користе јер, такође, негативно утичу на квалитет вина (Amézqueta et al., 2009; Petruzzi et al., 2014; Zhang et al., 2016).

## **6.2.   Анализа остатака активних супстанци пестицида**

### **6.2.1.   Одабир пестицида и оптимизација услова за одређивање остатака пестицида**

На основу података из дневника третирања пестицидима за 2016. годину и на основу могућности анализе пестицида LC-MS/MS техником направљена је MRM метода за анализу остатака 41 активне супстанце пестицида у грозђу и вину. Да би се повећала осетљивост детектора постављена MRM метода се пребацује у временски сегментисану методу према времену задржавања пестицида на колони тзв. dynamicMRM или dMRM мод. Један од кључаних фактора, за проверу рада постављене dMRM, је испитивање поновљивости ретенционих времена. Овај параметар је испитан на калибрационом нивоу од 0,05 µg/ml, при чему је за све испитиване пестициде задовољен критеријум SANTE/11813/2017 од  $\delta t_R \pm 0,1 \text{ min}$ .

Линеарност одговора детектора је, и за грозђе и за вино испитивана на истим нивоима концентрације од 0,005 до 0,500 mg/kg у мобилној фази, матриксима узорака и методом стандардног додатка. Линеарне калибрационе криве су добијене за све пестициде у мобилној фази приликом развоја методе за одређивање остатака пестицида у црном и белом грозђу и методом стандардног додатка за црно и бело грозђе.

За испитивање линеарности коришћена је линеарна и квадратна регресиона једначина, како код методе калибрације у матриксу, тако и код методе стандардног додатка. Методом калибрације у матриксу квадратна зависност је коришћена код дитианона и флудиоксонила у матриксу белог грозђа и за већи број анализата у матриксу црног грозђа. Једначине калибрационих кривих у

матриксу црвеног и белог вина по методи калибрације у матриксу и по методи стандардног додатка су углавном имале квадратну зависност. Најлошију линеарност је показао зоксамид у белом вину ( $R^2=0,1018$ ) за калибрацију методом стандардног додатка и ипродион према калибрацији у матриксу у црвеном вину ( $R^2=0,904$ ). За већину осталих пестицида, без обзира на начин калибрације, коефицијенти корелације су  $>0,99$ .

Матрикс црног грожђа за већину пестицида има позитиван ефекат, односно утиче на повећање сигнала (График 10, Табела 24). Највећи утицај матрикса је на пиридабен 74,83%, а најмањи на пропиконазол (-1,17%) и дифеноконазол (-1,65%). Негативан матрикс ефекат црно грожђе има на бупрофезин, дифеноконазол, миклобутанил, пенконазол, пириметанил, пропиконазол, спироksamин, триадименол и флутриафол. Матрикс ефекат је мањи од 15% за 14 од 41 активне супстанце (бупрофезин, диметоморф, дифеноконазол, миклобутанил, пенконазол, пириметанил, пропиконазол, спироksмин, триадименол, фенамидон, фипронил, флутриафол, цимоксанил и ципродинил).

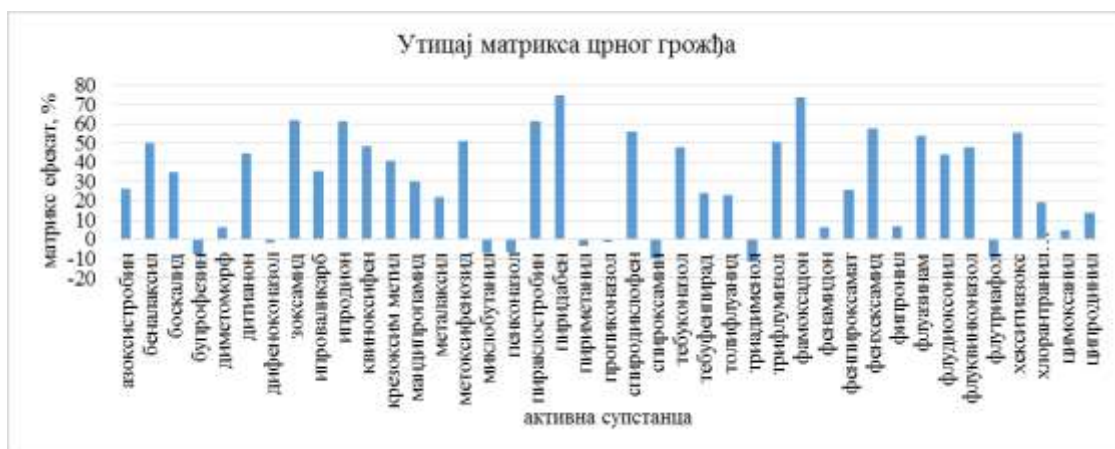


График 10. Утицај матрикса црног грожђа на активне супстанце пестицида

Као и црно грожђе и бело има позитиван матрикс ефекат на већину активних супстанци пестицида, али је за разлику од црног грожђа за већину активних МЕ мањи од 15% (за 29 од 41) (График 11, Табела 24). Матрикс белог грожђа утиче на смањење сигнала боскалида, ипроваликарба, крзоксим метила, металаксила, метоксифенозида, миклобутанила, пириметанила, пропиконазола, тебуконазола, фенамидона, хлорантранилипрола, цимоксанила и ципродинила.



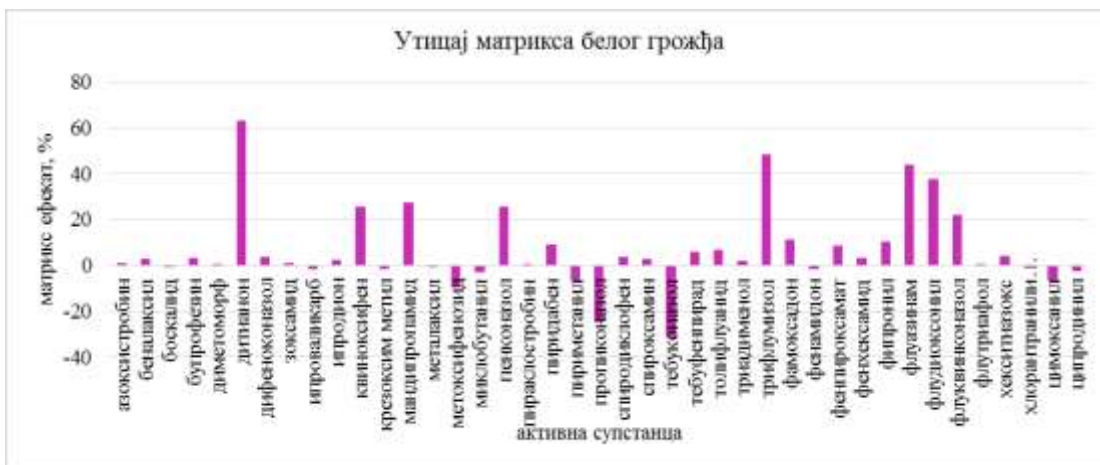


График 11. Утицај матрикса белог грозђа на активне супстанце пестицида

Црвено вино има негативан матрикс ефекат за 34 од 41 испитиване супстанце, односно на 82,9% анализа. Највећи МЕ је на флуквиконозол (-900%), а најмањи на пропиконазол (-1,17%). Матрикс ефекат је мањи од 15% за бупрофезин, пиридабен, пропиконазол, фипронил, флуазинам и флудиоксонил (График 12, Табела 24).

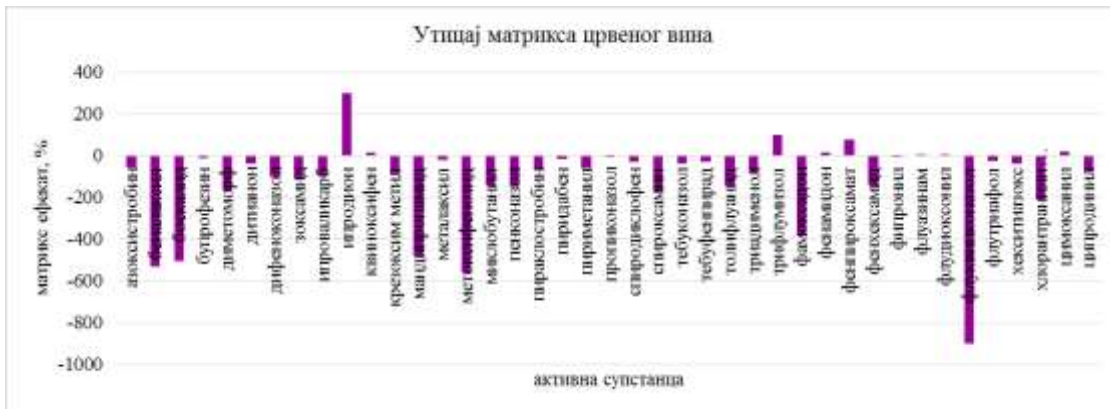


График 12. Утицај матрикса црвеног вина на активне супстанце пестицида

Бело вино као и црвено има позитиван матрикс ефекат на 10 пестицида (24,4%). Највећи утицај матрикса је на смањење сигнала спирокарбена (-862,1%), а најмањи на крезоксим метил (2,63%), док је МЕ мањи од 15% за пет (азоксистробин, крезоксим метил, толифлуанид, фенхексамид и флуквиконозол) од 41 анализа (График 13, Табела 24).







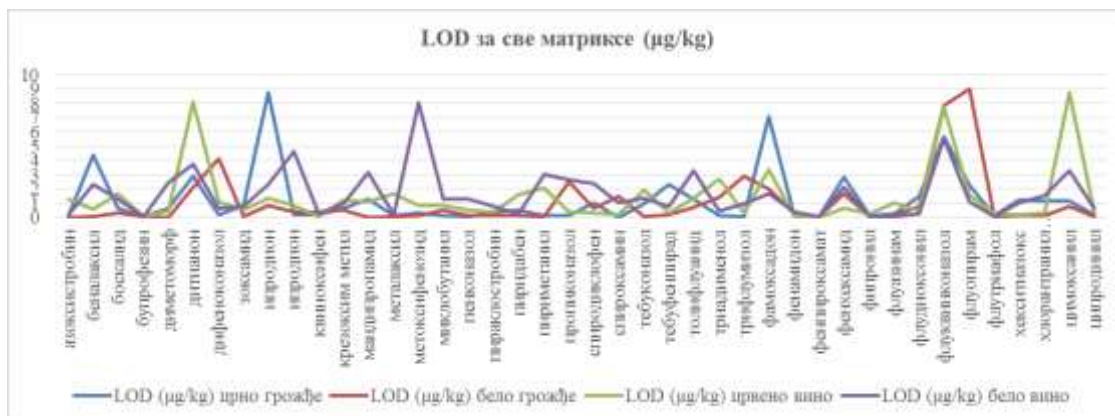


График 19. LOD за активне супстанце пестицида у свим матриксама

Принос екстракције у црном грождју је за 31 (75,6%) активну супстанцу пестицида био између 70 и 120%. Средња вредност приноса екстракције за црно грождје се кретала од 11,1% до 149,9%. Принос екстракције је био нижи од 70% за дитианон (11,1%), тебуконазол (34,5%), метоксифенозид (40,2%), фамоксадон (57,9%), ипроваликарб (63,7%), фенхексамид (64,3%), флуквинконазол (65,7%), беналаксил (66,5%) и пропиконазол (67,7%). Једино је трифлумизол имао вредност приноса екстракције преко 120% (149,9%) (График 20). Најмања вредност коефицијента варијације је била за тебуконазол 4,7%, а највећа за фамоксадон 46,6%. За 33 од 41 (80,5%) активне супстанце пестицида %RSDr је био мањи од 20% (SANTE/11813/2017).

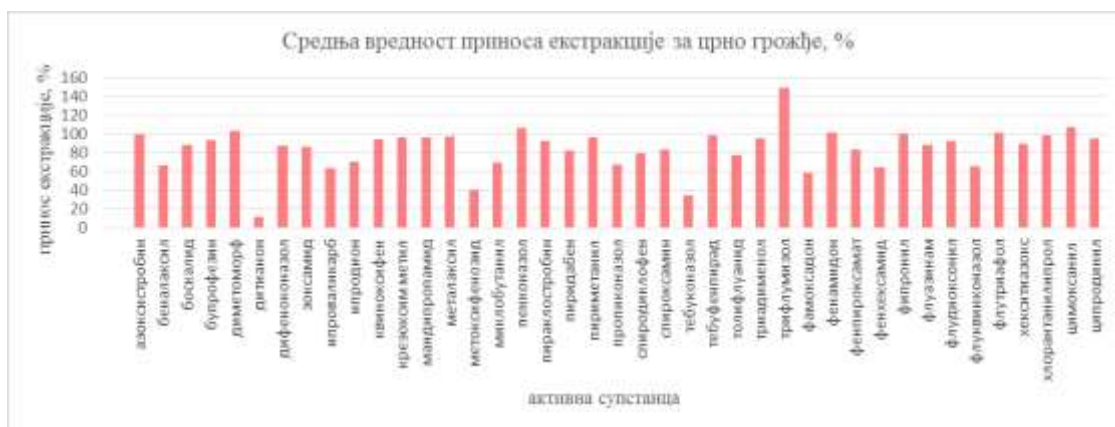


График 20. Принос екстракције за активне супстанце пестицида у црном грождју

У белом грождју је 51,2% (21/41) активних супстанци пестицида имао средњу вредност приноса екстракције између 70 и 120%. За дифеноконазол и

пропиконазол принос екстракције је на свим нивоима био 0%. Мање средње вредности од 70% за принос екстракције су добијене за дитианон (6,1%), бупрофезин (7,3%), ипродион (10,2%), тебуконазол (10,6%), фенамидон (14,4%), трифлумизол (26,6%), пенконазол (38,9%), пиракlostробин (39,3%), хлорантранилопрол (58,5%), спиродиклофен (58,7%), пиридабен (61,0%), триадименол (64,1%) и крезоксим метил (66,1%). Највећа средња вредност приноса екстракције је била за флулквиноназол (262,9%), затим за диметоморф (194,7%), мандипропамид (163,6%), пириметанил (153,0%) и фамоксадон (122,6%) (График 21). Процент RSD<sub>r</sub> је био у распону од 2,44% за трифлумизол до 37,22% за флулквиноназол, док су вредности %RSD<sub>r</sub> биле веће од 20% за фамоксадон (31,33%), пиракlostробин (28,15%), толифлуанид (27,81%), фенамидон (23,44%), бупрофезин (23,26%), дитианон (21,61%), пиридабен (20,76%) и метоксифенозид (20,44%).

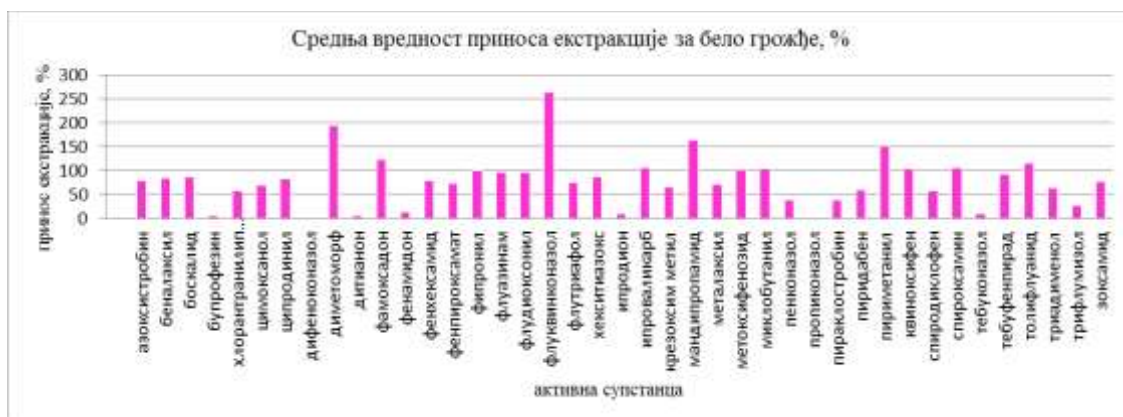


График 21. Принос екстракције за активне супстанце пестицида у белом грозђу

Teixeira et al. (2004) су одређивали принос екстракције за активне супстанце цимоксанил, оксадиксил, металаксил, азоксистробин, фолпет, просимидон, флусилазол, тебуконазол, фозалон, трифлуксистробин, фенхексамид, пириметанил и винклозолин на pokožици и у целом грозду. Резултати испитивања су показали да се принос екстракције, на pokožици грозда, кретао од 31,7% за фозалон до 121,7% за металаксил. Вредности за принос екстракције мање од 70% су добијене за фенхексамид, винклозолин, тебуконазол и трифлуксистробин, док је у целом грозду принос екстракције износио од 20,16% за трифлуксистробин до 114,4% за азоксистробин. Сем за металаксил,

азоксистробин и пириметанил, принос екстракције за остале пестициде је био мањи од 70%, што се поклапа и са резултатима наших истраживања, сем у случају пириметанила у белом грожђу (153,0%).

Такође, резултате сличне нашим су добили de Melo Abreu et al. (2006) анализирањем шест QoI активних супстанци фунгицида (азоксистробин, крезоксим метил, трифлористробин, фамоксадон, пираклостробин и фенамидон) у грожђу и вину HPLC-DAD методом. Приноси екстракције за свих шест супстанци, на три концентрациона нивоа (0,25; 1,0 и 2,0 mg/kg) и у грожђу и у вину, су се кретали од 89% до 105% уз %RSD од 8,6 - 12,7%.

Да матрикс црног грожђа, услед велике количине растворених шећера, утиче на принос екстракције и на повећање сигнала пириметанила и стробилуринских фунгицида (пираклостробина и трифлористробина), приликом LC-MS/MS одређивања, утврдили су Rose et al. (2009) у својим истраживањима, што је у складу са резултатима наших истраживања.

QuEChERS метода припреме узорка црвеног вина је ефикасна за уклањање коекстрахујућих компоненти и за квантификацију и идентификацију анализата када се користи калибрација у матриксу узорка. Коришћење PSA и GCB за пречишћавање екстракта је ефикасније у уклањању коекстрахујућих компоненти од оригиналне QuEChERS процедуре. Међутим, планарне и ароматичне супстанце (нпр. карбендазим, ципродинил, пириметанил, тиабендазол) се везују за GCB чиме им се смањује принос екстракције (63 - 75%). Ово је потврђено и резултатима приказаним у нашем раду у случају ципродинила, док су приноси екстракције пириметанила на нижим концентрационим нивоима већи од 120%. Употребом толуена је могућа десорпција ових анализата са GCB-а (Zhang et al., 2007).

Резултати слични приказаним су добијени и у истраживањима González-Rodríguez et al. (2011). Ови аутори су поредили приносе екстракције фунгицида (беналакисил, боскалид, цијазофамид, цимоксанил, ципродинил, фамоксадон, флудиоксонил, фолпет, мандипропамид, метрафенон, проквиназид, пираклостробин и валифенал) у грожђу и вину на концентрационим нивоима 0,05 и 0,5 mg/kg помоћу LC-DAD и GC-ITMS. Приноси екстракције за фамоксадон, фолпет, проквиназид и валифенал у грожђу и фолпет и проквиназид у вину,

помоћу LC-DAD технике, су били мањи од 70%. У ранијим истраживањима ових аутора (González-Rodríguez et al., 2009a) нађено је да је принос екстракције за тебуконазол у вину (92%) и шири (83%) већи него у грозђу (77%). Ово може бити последица присуства чврстих честица грозђа (покожица или семе), за које се тебуконазол може адсорбовати чиме се смањује моћ екстракције. Ово је потврђено и у нашим истраживањима; приноси екстракције за тебуконазол у грозђу су били мањи од 70%, док су у винима били од 79,2 - 176,7%.

Од испитиване 41 активне супстанце пестицида у црвеном вину средња вредност приноса екстракције за 19 (46,3%) је била у опсегу од 70 - 120%. За дитианон и метоксифенозид средње вредности су износиле 0%, што указује да се овај начин припреме, тј. примењена метода, не може користити за њихово одређивање. За 18 супстанци средња вредност приноса екстракције је мања од 70%, а највећа средња вредност је добијена за трифлумизол 424,8%. Принос екстракције преко 120%, поред трифлумизола, забележен је за пириметанил, фенамидон и фенпироксимат (График 22). Процент RSDr је за 31 супстанцу био мањи од 20%, а за беналаксил, зокасамид, ипроваликарб, металаксил, пропиконазол, фипронил, флазуинам и флуқвинконазол био је већи од 20%.

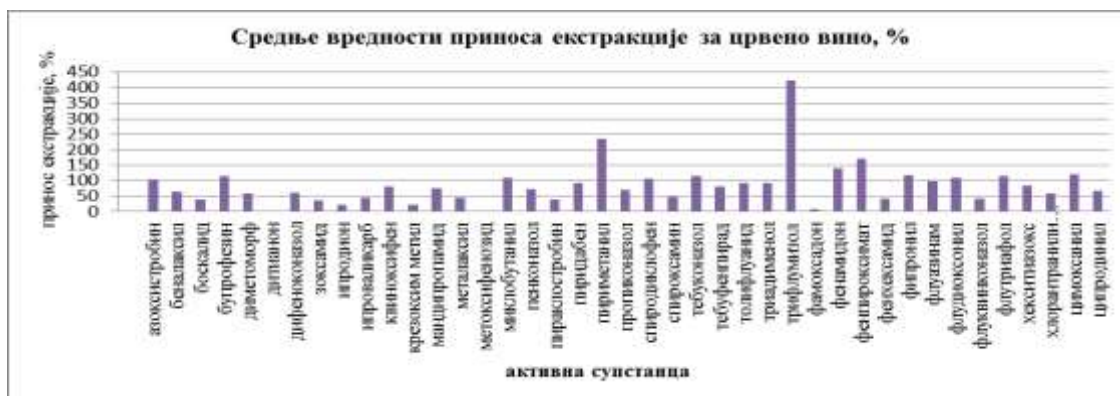


График 22. Принос екстракције за активне супстанце пестицида у црвеном вину

Средња вредност приноса екстракције за 23 анализата је била између 70 и 120%, али се опсег вредности кретао од 6,1% за дитианон, до 715,6% за трифлумизол. Сем дитианона још 12 супстанци је имало приносе екстракције мање од 70%. За пириметанил (153,0%), фамоксадон (133,7%), тебуконазол (128,5%) и фенамидон (128,2%) принос екстракције је био већи од 120% (График 23 без трифлумизола), а



%RSDr био је између 2,83% и 30,30%, и за 14 анализата је имао вредности веће од 20%.

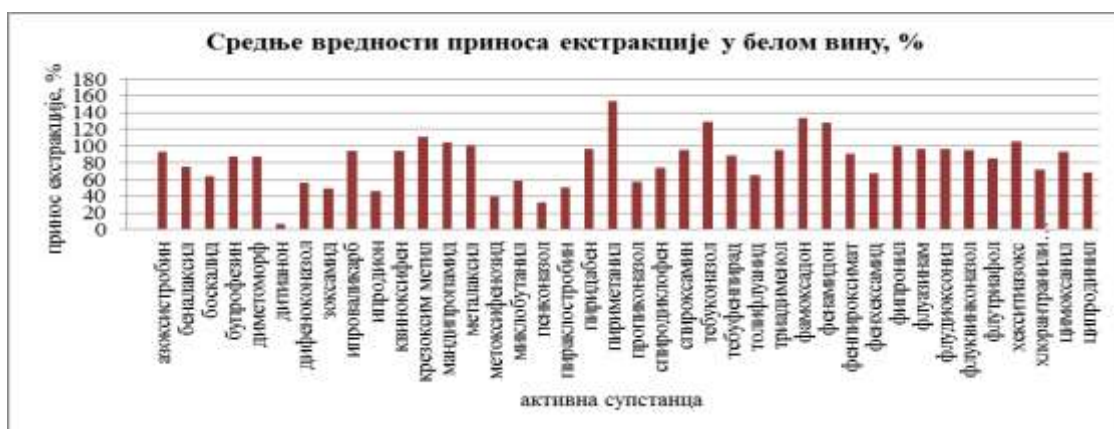


График 23. Принос екстракције за активне супстанце пестицида (без трифлумизола) у белом вину

Fernández et al. (2005) су испитивали судбину ципродинила, флудиоксонила, пириметанила и квиноксифена у грожђу и вину, при чему је принос екстракције био преко 87,5% за сва једињења сем за флудиоксонил на највећем нивоу обогаћења грожђа (0,5 mg/l) за који је износио 78,8%. Приноси екстракције за сва четири анализата у вину и шири су износили од 91,6 - 110,5%, а коефицијенти варијације су само за ципродинил и флудиоксонил у грожђу и за квиноксифен у вину били већи од 10%. У нашим истраживањима за квиноксифен и флудиоксонил и у грожђу и у вину и за ципродинил у грожђу добијени су приноси екстракције између 70 и 110%, уз %RSDr мањи од 20 и у грожђу и у вину. Вредности приноса екстракције за ципродинил у вину су били између 60 и 70%, што је вероватно последица његовог везивања за GCB приликом пречишћавања узорака, док је за пириметанил принос екстракције само у црном грожђу имао задовољавајуће вредности (96,7%).

Relajić et al. (2016) су развили SPE методу за екстракцију пестицида из црвеног вина, а затим су вршили анализу помоћу GC-MS/MS-а. Принос екстракције за флудиоксонил на нивоу од 0,5 µg/l износио је 203%, док је на нивоу од 2,5 µg/l износио 109,8%, што је последица великог утицаја матрикса. Код пираклостробина на нижем нивоу концентрације (1,4 µg/l) принос екстракције је износио 111%, а на вишем (7 µg/l) 248%, при чему су коефицијенти варијације за

оба пестицида, и на оба концентрациона нивоа, били прихватљиви (< 6,5%). Ове вредности се не поклапају са истраживањима приказаним у нашем раду. Наиме, за флудиоксонил у црвеном вину су добијене вредности приноса екстракције између 70 и 120% на сва четири испитивана нивоа, док су за пираклостобин добијене вредности мање од 42%. Процент RSDr је и у нашем истраживању за оба анализита био мањи од 20%.

Castro et al. (2018) су одређивали принос екстракције за 50 активних супстанци у црвеном и белом вину на нивоу концентрације од 10 ng/ml. Узорке су припремали преко SPE колоне, а анализирали су помоћу LC-MS/MS технике. Једино су за диниконазол и флуфеноксурон у црвеном вину добили приносе екстракције од 66% и 64%, редом, а за цимоксанил у белом вину 137%, што је у складу са вредношћу добијеном у нашем истраживању. Наиме, принос екстракције за цимоксанил на нивоу од 10 ng/ml у црвеном вину је био 134,6%, а у белом 96,3%.

Поновљивост за активне супстанце је испитивана на нивоу границе мерења (LOQ) од 0,01 mg/kg. У црном грожђу најмања вредност за поновљивост је била 0,06% за мандипопамид, а највећа 24,29% за дифенконазол (График 24), при чему је само за ову супстанцу поновљивост износила преко 20%.

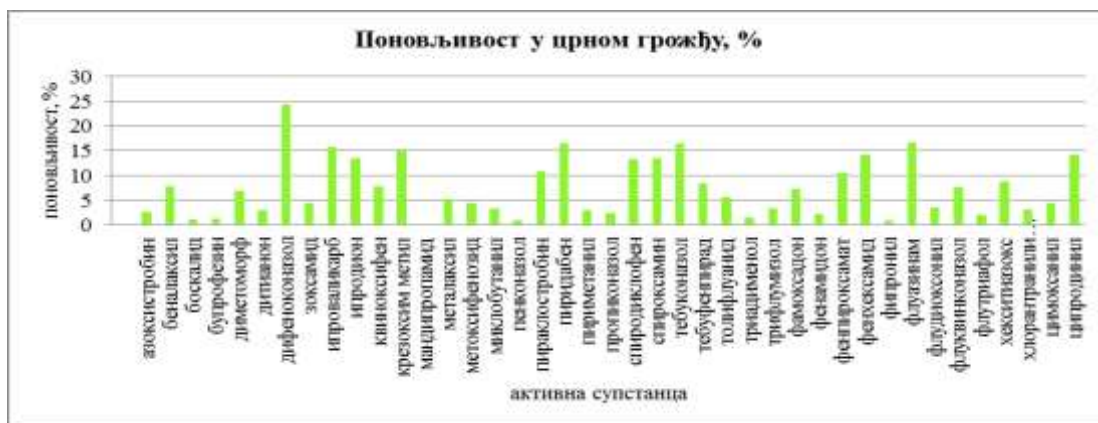


График 24. Поновљивост за активне супстанце пестицида у црном грожђу

Поновљивост у белом грожђу је била најнижа за трифлумизол (1,54%), а највећа за фамоксадон (21,08%). Поновљивост за пропиконазол је такође била незнатно већа од 20% (20,78%) (График 25).

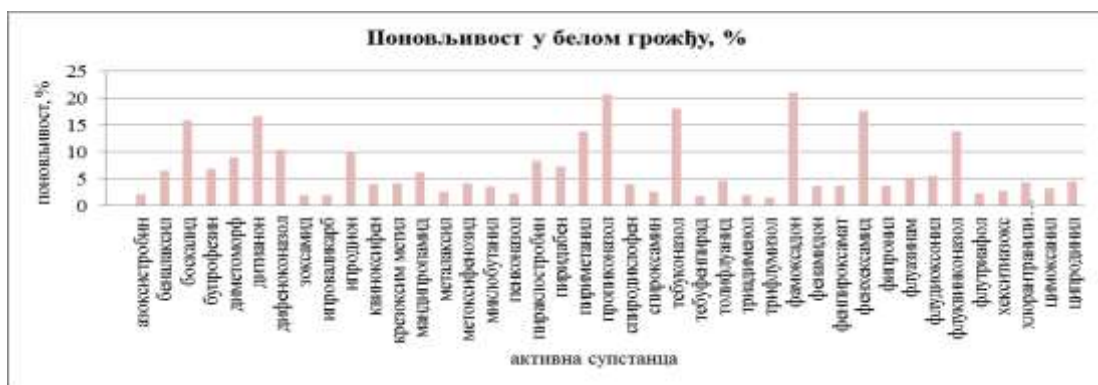


График 25. Поновљивост за активне супстанце пестицида у белом грозђу

Најнижа поновљивост у црвеном вину је била 0,27% за пенконазол, највећа за флуазинам - 22,63%, а за све остале пестициде поновљивост је била мања од 20% (График 26).



График 26. Поновљивост за активне супстанце пестицида у црвеном вину

Најнижа поновљивост у белом вину добијена је за металаксил - 1,61%, највећа за толифлуанид - 27,86%. Поновљивост већа од 20% била је још и за боскалид, дифенконазол, тебуконазол, фамоксадон и фенпироксимат (График 27).



број узорака у којима су нађени остаци, минималне и максималне концентрације, као и средње вредности концентрација за сваку детектовану супстанцу. На Графику 29 су приказане средње вредности концентрација за све детектоване активне супстанце пестицида сем дифенокназола. Ни у једном узорку црног грожђа није детектована само једна активна супстанца, а узорци са најмање детектованих пестицида (n=3) су Регент (Заклопача), Гаме (Сремски Карловци) и Мерло (Голобок).

Табела 43. Дескриптивни подаци за детектоване активне супстанце у црном грожђу

<b>Дескриптивна статистика</b>					
	број узорака	минималне концентрације	максималне концентрације	средње вредности концентрација	стандардне девијације
азоксистробин	15	0	0,077	<b>0,030067</b>	<b>0,0190318</b>
боскалид	55	0,002	0,447	<b>0,086267</b>	<b>0,1069185</b>
ципродинил	25	0,003	0,103	<b>0,03288</b>	<b>0,0299727</b>
дифенокназол	65	0	29	<b>5,524603</b>	<b>7,4529246</b>
диметоморф	65	0,004	0,093	<b>0,025654</b>	<b>0,0223158</b>
флудиоксонил	30	0,006	0,121	<b>0,041333</b>	<b>0,038366</b>
крзоксим метил	5	0	0,01	<b>0,0068</b>	<b>0,003962</b>
металаксил	55	0,003	0,093	<b>0,024291</b>	<b>0,0234123</b>
миклобутанил	5	0,15	0,355	<b>0,2762</b>	<b>0,08513</b>
пропиконазол	10	0,011	0,031	<b>0,0208</b>	<b>0,00673</b>
пираклостробин	25	0,01	0,089	<b>0,025829</b>	<b>0,0200213</b>
пириметанил	95	0,004	2,3	<b>0,191159</b>	<b>0,4392723</b>
спироксамин	25	0,005	0,019	<b>0,009915</b>	<b>0,0037342</b>
тебуконазол	125	0,026	1,25	<b>0,238922</b>	<b>0,2665054</b>
флутриафол	10	0,002	0,01	<b>0,0056</b>	<b>0,0023238</b>
квиноксифен	34	0,005	0,458	<b>0,088375</b>	<b>0,1456735</b>
бупрофезин	25	0,004	0,012	<b>0,00636</b>	<b>0,002158</b>
фенхексимид	30	0,01	0,5	<b>0,074667</b>	<b>0,1132199</b>
ипродион	10	0,0139	0,0178	<b>0,01685</b>	<b>0,00589</b>

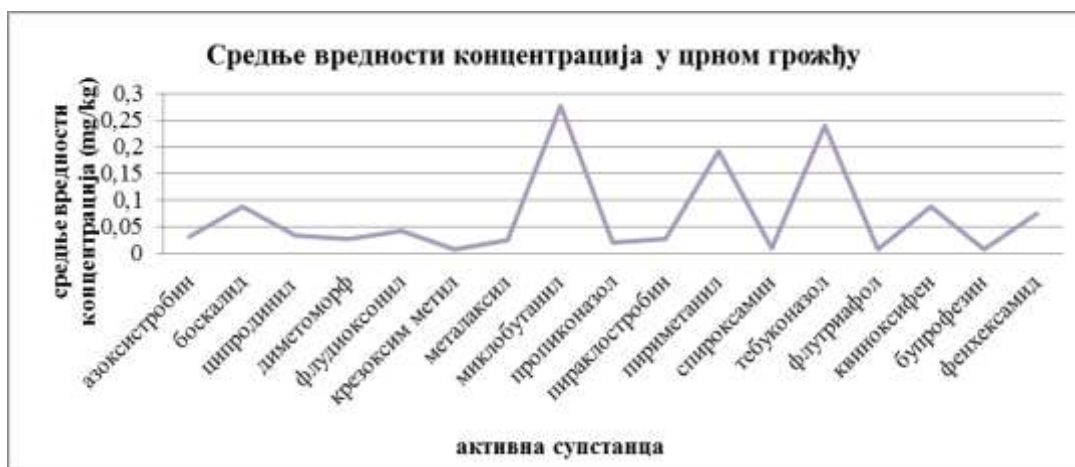


График 29. Упоредни приказ средњих вредности концентрација активних супстанци у црном грожђу без дифенконазола

Дифенконазол је једина активна супстанца детектована у концентрацијама преко МДК (3 mg/kg) на локалитетима Мала Сугубина (сорте Вранац, Мускат хамбург и Молдова), Радмиловац (Мерло и Cabernet franc), Голобок (Cabernet sauvignon) и Умчари (Прокупац и Cabernet sauvignon). Испод LOQ су детектовани бупрофезин, флутриафол и крезоксим метил у свим узорцима, ципродинил у 40% узорака, диметоморф у 46,5%, флудиоксонил у 50%, металаксил у 45,5%, пириметанил у 15,8%, квинксифен у 14,3% и спироксамин у 85,7%. У свим осталим узорцима концентрације детектованих пестицида су између LOQ и МДК вредности (График 30).

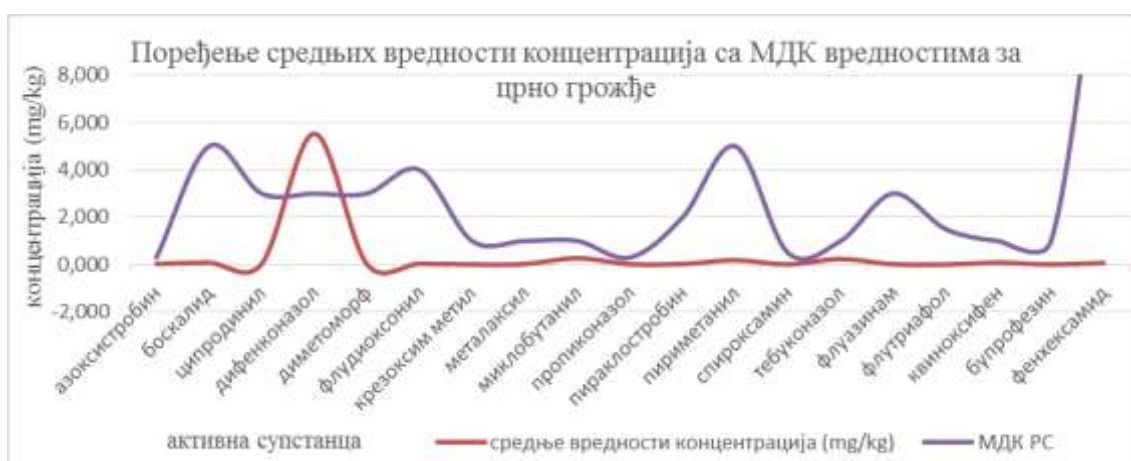


График 30. Упоредни приказ средњих вредности концентрација детектованих активних супстанци пестицида у црном грожђу и МДК вредности

У белом винском грожђу је детектовано 15 активних супстанци пестицида што представља 36,6% од свих испитиваних. Остаци су детектовани у 20 узорака белог винског грожђа, у 15 различитих сорти, са свих девет локалитета. У узорцима из органске производње у сортама Морава и Рубинка, са локалитета Сремски Карловци, није детектован ниједан пестицид. Такође, у узорцима из органске производње сорте Бачка узорковане 21.09.2016. нису детектовани остаци пестицида. У органској пољопривредној производњи употреба пестицида и ђубрива је замењена другим мерама заштите биља (превентивне и индиректне мере као што су одабир отпорнијих сорти на болести и штеточине, механичке и физичке мере и др.). Самим тим, МДК вредности за пестициде у органској пољопривредној производњи су 0,01 mg/kg. У раније узоркованим (05.09.2016.) узорцима белог грожђа сорте Бачка детектовани су ципродинил (0,017 mg/kg), металаксил (0,010 mg/kg), пириметанил (0,044 mg/kg) и тебуконазол (0,052 mg/kg). На локалитету Сремски Карловци постоји и конвенционална и органска производња, што за последицу има појаву остатака пестицида и у узорцима из органске производње, највероватније због непостојања заштитног појаса, па због близине долази до занешења приликом третирања конвенционалних засада.

У испитивањима спроведеним у Холандији од 2013. до 2017. анализирано је 1500 узорака воћа и поврћа из органске производње. Остаци пестицида су детектовани у 3% анализираних узорака. У 200 узорака је детектовано 325 пестицида, од којих је 100 пестицида детектовано у вредностима преко 0,01 mg/kg (60 узорака). Најчешће детектован пестицид је био хлорпрофам (van der Schee et al. 2018). Према последњем EFSA извештају (EFSA, 2016 цит. по Fernández-Alba et al., 2018) 12,4% узорака из органске производње је садржало остатке пестицида у оквиру дозвољених вредности, док су у 1,2% узорака детектовани пестициди преко МДК вредности, што је у сагласности са резултатима наших истраживања. Број узорака белог грожђа у којима су нађени остаци, минималне и максималне концентрације, и средње вредности концентрација за сваку детектовану активну супстанцу пестицида су приказане у Табели 44 и на Графику 31.

Табела 44. Дескриптивни подаци за детектоване активне супстанце пестицида у белом грожђу

Дескриптивна статистика					
	број узорака	минималне концентрације	максималне концентрације	средње вредности концентрација	стандардне девијације
азоксистробин	10	0,01	0,071	<b>0,0316</b>	<b>0,0207</b>
боскалид	16	0,013	0,236	<b>0,057988</b>	<b>0,0547691</b>
цимоксанил	10	0,0046	0,0918	<b>0,018603</b>	<b>0,026005</b>
ципродинил	45	0,095	1,213	<b>0,549455</b>	<b>0,4477947</b>
дифеноконазол	35	0,37	2,135	<b>0,56619</b>	<b>0,3673811</b>
диметоморф	16	0,006	0,118	<b>0,048812</b>	<b>0,028247</b>
флудиоксонил	10	0,025	0,319	<b>0,098545</b>	<b>0,0843177</b>
крезоксим метил	5	0,013	0,032	<b>0,0205</b>	<b>0,0079687</b>
металаксил	75	0	0,072	<b>0,0384</b>	<b>0,0164872</b>
миклобутанил	10	0,015	0,547	<b>0,108636</b>	<b>0,1540326</b>
пропиконазол	35	0,19	1,025	<b>0,563095</b>	<b>0,1858644</b>
пираклостробин	10	0,015	0,0709	<b>0,03226</b>	<b>0,0191591</b>
пириметанил	58	0,072	3,551	<b>0,66</b>	<b>0,7543082</b>
спироксамин	15	0,0048	0,0529	<b>0,018738</b>	<b>0,014355</b>
тебуконазол	45	0,474	4,585	<b>1,307381</b>	<b>0,1450403</b>



График 31. Упоредни приказ средњих вредности концентрација детектованих активних супстанци пестицида у белом грожђу

У траговима, односно испод границе квантификације детектован је само спироксамин (0,006 mg/kg) у узорцима Ризлинга италијанског са локалитета Сремски Карловци. У концентрацијама преко МДК вредности детектовани су

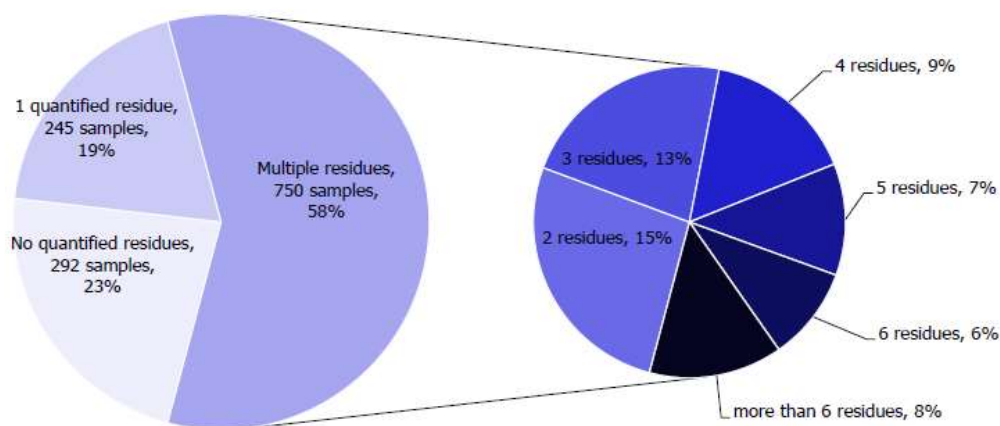


пропиконазол у шест од седам узорка у којима је детектован - Мускат отонел (0,535 mg/kg) - Копљари, Тамјаника бела (0,698 mg/kg) - Мала Сугубина, Ризлинг италијански (0,427 mg/kg) - Доње Злегиње, Панонија (0,517 mg/kg) - Заклопача, Sauvignon blanc (0,566 mg/kg) - Страгари и Петра (0,355 mg/kg) - Сремски Карловци и тебуконазол у три од девет узорка - Тамјаника бела (2,496 mg/kg) - Мала Сугубина, Sauvignon blanc (1,037 mg/kg) - Страгари и Петра (1,115 mg/kg) - Сремски Карловци. Концентрације осталих детектованих активних супстанци пестицида су биле између границе квантификације и МДК вредности (График 32).



График 32. Упоредни приказ средњих вредности концентрација детектованих активних супстанци пестицида у белом грозђу и МДК вредности

Према извештају Европске агенције за безбедност хране (EFSA, 2017), у оквиру координираног програма мониторинга остатака активних супстанци пестицида за 2015. годину, анализирано је 1287 узорка стоног грозђа. У 22,7% узорка нису детектовани остаци, док је 77,3% узорка садржало једну или више активних супстанци пестицида. Присуство вишеструких резидуа је утврђено у 58,3% узорка, при чему је нађено до 19 различитих активних супстанци у појединачним узорцима грозђа (узорак из Турске) (Слика 11).



Слика 11. Број квантификованих остатака у појединачним узорцима грожђа (EFSA, 2017)

Остаци пестицида су били изнад максимално дозвољених концентрација у 1,7% узорка. Квантификовано је укупно 80 различитих активних супстанци, најчешће фунгицида; боскалид (21,9%), диметоморф (19,7%), дитиокарбамати (18,9%), фенхексамид (18,2%), ципродинил (18%), флудиоксонил (16,1%), миклобутанил (14%), и регулатор раста етефон (19,8%). Максимално дозвољена концентрација је прекорачена за 11 различитих активних супстанци, и то најчешће етефон (2 узорка са Кипра, 1 из Египта, 1 из Грчке, 1 из Намибије и 1 из Перуа) и тебуконазол (2 узорка са Кипра и 2 из Турске). У нашим узорцима грожђа су најчешће детектовани боскалид, ципродинил, дифеноконазол, диметоморф, металаксил, приметанил, пропиконазол и тебуконазол.

Cabras i Angioni (2000) су испитивали концентрације остатака активних супстанци пестицида у грожђу након пољских огледа. После примене крезоксим метила, пенконазола и тетраконазола није детектовано њихово присуство у грожђу. У нашим истраживањима је детектован крезоксим метил али у концентрацијама блиским LOQ (0,009; 0,012 и 0,021 mg/kg). Концентрације ципродинила и мепанипирима су се смањиле за 50% у току 12 дана, док је концентрација приметанила била константна до бербе. Концентрација флуазинома се брзо смањује ( $t_{1/2}$ =4,3 дана), азоксистробина нешто спорије ( $t_{1/2}$ =15,2 дана), а концентрација флудиоксонила се смањује најспорије ( $t_{1/2}$ =24 дана). Ово је потврђено и у нашем раду. После примене, детектоване концентрације азоксистробина су биле од 0,01 - 0,077 mg/kg, ципродинила 0,003 - 1,213 mg/kg,

флудиоксомила 0,006 - 0,319 mg/kg, пириметанила 0,004 - 3,551 mg/kg. Утврђено је да су концентрације ципроконазола, хексаконазола, миклобутанила, пенконазола и триадименола у грозђу у време бербе биле ниске ( $< 0,02$  mg/kg) (Flori and Brunelli, 1995 цит. по Cabras i Angioni, 2000). Брзина смањивања концентрације органофосфата, који се најчешће користе за сузбијање гроздовог смотавца, је велика ( $t_{1/2}=0,97 - 3,84$  дана) осим за диметоат чија се концентрација смањи за недељу дана, а затим је константна две недеље. У сувом грозђу концентрације беналаксила, фозалона, металаксила и просимидона су исте као и у свежем грозђу, а концентрација ипродиона се повећава.

Teixeira et al. (2004) су испитивали остатке активних супстанци пестицида после примене у целом грозду и на покожици грозда. Све активне супстанце сем цимоксанила су детектоване испод МДК вредности. Системични пестициди као што је оксадиксил су детектовани у пулпи, док су контактни као нпр. фолпет детектовани на покожици грозда, али не и у целом грозду. Корелација између механизма деловања и места везивања (пулпа или покожица) је утврђена за све пестициде (цимоксанил, оксадиксил, металаксил, азоксистробин, фолпет, просимидон, флусилазол, тебуконазол, фозалон, трифлуксистробин) сем за фенхексамид, пириметанил и винклозолин. Аутори су велику концентрацију ових контактних фунгицида у целом грозду објаснили постојањем микро-пукотина због деловања паразита/појаве болести или абиотских оштећења, чиме је омогућено продирање пестицида у грозд. Очекивано, у целом грозду су детектовани системични пестициди оксадиксил, металаксил, азоксистробин и просимидон. Ови резултати су у складу са нашим истраживањима, где су у грозду, такође, детектовани азоксистробин, металаксил, фенхексамид и пириметанил.

Сличне резултате као и у нашем истраживању су добили и Šesnik et al. (2008) цит. по Čuš et al. (2010b), који су у 47 узорака винског грозђа из Словеније детектовали фолпет (97,9% узорака), ципродинил (51,1%), дитиокарбамате (44,7%), хлороталонил (23,4%), хлорпирифос (19,1%) и пириметанил (14,9%). Navarro et al. (2001) су проучавали брзину нестајања хлорпирифоса, фенаримола, металаксила, манкозеба, пенконазола и винклозолина у грозђу. Нашли су да се брзина разградње пестицида дешава по следећем редоследу - хлорпирифос  $>$

винклозолин > фенаримол > металаксил > пенконазол > манкозеп. Такође, Čuš et al. (2010a) су после примене пестицида у виноградима одређивали њихове остатке у црном и белом грожђу у току зрења, при чему су грожђе узорковали три пута у току месец дана. Иако су се концентрације пестицида смањивале у функцији времена, ипак су и у узорцима грожђа, које су узорковали на крају, детектовали хлороталонил, хлорпирифос, ципродинил, фолпет, фенхексамид, просимидон, пириметанил и металаксил, што је у складу са резултатима наших анализа. Најмање смањење концентрације је нађено за боскалид и фозалон. Пестициди који су примењени 30 дана пре узорковања а чије концентрације нису нађене у грожђу су цимоксанил, флудиоксонил и крезоксим метил. Слично, резултати приказани у нашем раду показују да је крезоксим метил детектован само у једном узорку црног грожђа у концентрацији мањој од 0,01 mg/kg и у два узорка белог грожђа у концентрацијама 0,012 и 0,021 mg/kg. С друге стране, флудиоксонил смо детектовали у 6 узорака црног грожђа и у 2 узорка белог грожђа. Такође, до сличних резултата, као у нашем истраживању, су дошли и González-Rodríguez et al. (2011) испитивањем остатака у грожђу након примене комерцијалних препарата фунгицида. Остаци беналаксил, цимоксанила, фолпета и пиракlostробина нису детектовани у време бербе, сем у узорцима који су касније третирани смесом фамоксадона и цимоксанила. Аутори су детектовали мандипропамид (0,97 mg/kg), валифенал (1,4 mg/kg), цијазофамид (0,72 mg/kg), цимоксанил (1,0 mg/kg), фамоксадон (2,1 mg/kg), проквиназид (0,093 - 0,13 mg/kg), метрафенон (0,041 - 0,087 mg/kg), боскалид (0,78 - 1,2 mg/kg), ципродинил (0,70 - 1,1 mg/kg), флудиоксонил (0,64 - 0,98 mg/kg).

У нашим испитивањима, у свих 95 анализираних сортних црвених вина (укључујући и пет узорака розеа и пет узорака од органски узгајаног грожђа) детектовани су остаци активних супстанци пестицида (Табела 33 и График 3). Пириметанил је детектован у 89,5% узорака, а металаксил у 68,4% узорака. У најмање узорака (5,3%) су детектовани ципродинил и пиракlostробин. По један пестицид је детектован у узорцима Регент - Заклопача (пиракlostробин) и розе - Мала Сугубина (пириметанил), док су по два пестицида детектована у девет узорака. Дескриптивни подаци за детектоване активне супстанце у црвеном вину су приказани у Табели 45 и на Графику 33.

Табела 45. Дескриптивни подаци за детектоване активне супстанце пестицида у црвеном вину

Дескриптивна статистика					
	број узорака	минималне концентрације	максималне концентрације	средње вредности концентрација	стандардне девијације
азоксистробин	10	0,003	0,003	<b>0,003</b>	0
боскалид	10	0,004	0,014	<b>0,009667</b>	0,0051316
диметоморф	10	0,004	0,019	<b>0,0107</b>	0,0044981
металаксил	16	0,003	0,3	<b>0,048937</b>	0,098539
пираклостробин	5	0,0118	0,0143	<b>0,012629</b>	0,00031
пириметанил	29	0,011	0,205	<b>0,036862</b>	0,0389649
тебуконазол	15	0,0078	0,0483	<b>0,018375</b>	0,00998
фенхексамид	4	0,0153	0,1808	<b>0,068083</b>	0,029418
ципродинил	10	0,015	0,181	<b>0,083</b>	0,0766725

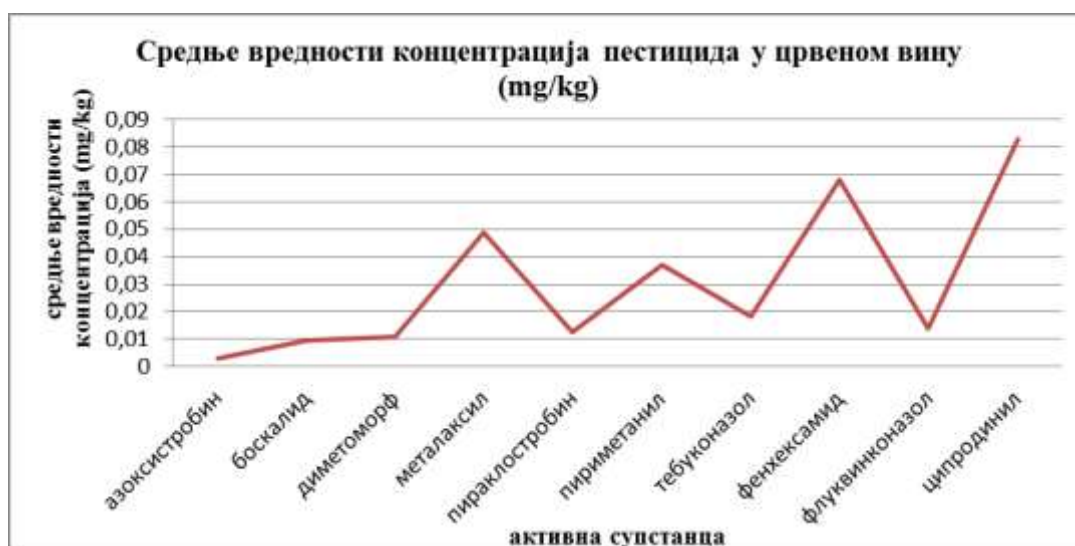


График 33. Упоредни приказ средњих вредности концентрација активних супстанци пестицида у црвеном вину

Преко препоручене МДК вредности (10% од МДК за винско грожђе) није детектована ниједна активна супстанца пестицида. У концентрацијама мањим од LOQ (0,01 mg/kg) су детектовани азоксистробин (Доње Злегиње - Pinot noir), диметоморф (Голобок - Мерло и Cabernet sauvignon), фенхексамид (Голобок - Cabernet sauvignon), металаксил (Радмиловац - Прокупац, Pinot noir, Вранац, Cabernet franc и Мерло, Страгари - Pinot noir и Топола - Cabernet sauvignon) и тебуконазол (Сремски Карловци - Пробус и Пробус, Мерло и Cabernet sauvignon).

У осталим узорцима концентрације активних супстанци пестицида су између LOQ и МДК вредности (График 34).

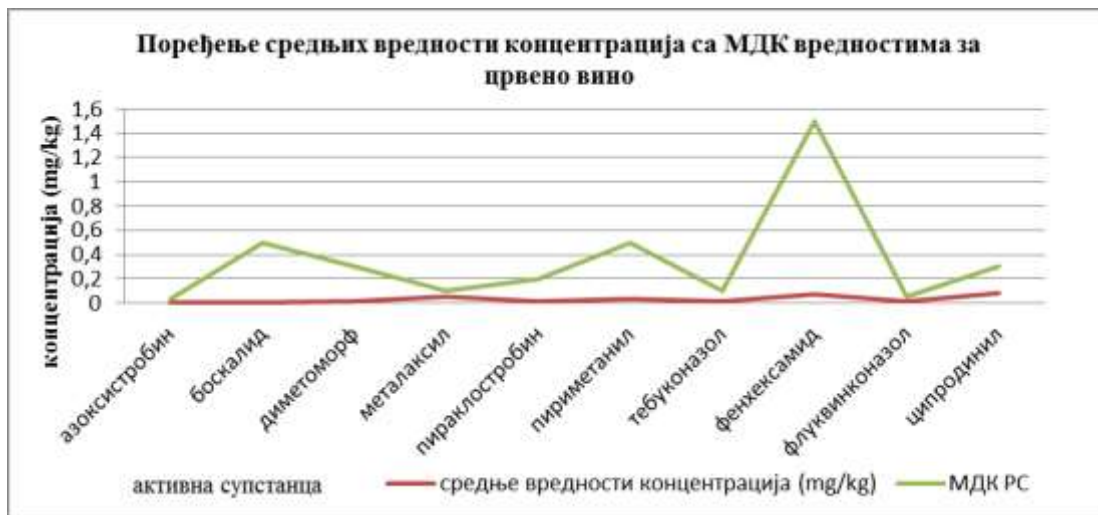


График 34. Упоредни приказ средњих вредности концентрација детектованих активних супстанци пестицида у црвеном вину и МДК вредности

Остаци активних супстанци пестицида су детектовани у 12 од 13 анализираних сортних белих вина. Једини узорци у којима нису детектовани пестициди су узорци Панонија из органске производње са локалитета Заклопача. Најчешће је детектован ципродинил 92,3%, затим пропиконазол 61,5% док је крезоксим метил детектован само у једном сортном белом вину (Табела 34 и График 4). По два пестицида су детектована у четири узорка вина са локалитета Радмиловац. Дескриптивни подаци за детектоване пестициде у белом вину су приказани у Табели 46 и на Графику 35.

Табела 46. Дескриптивни подаци за детектоване активне супстанце пестицида у белом вину

Дескриптивна статистика					
	број узорака	минималне концентрације	максималне концентрације	средње вредности концентрација	стандардне девијације
боскалид	25	0,03	0,133	<b>0,078167</b>	0,0400071
ципродинил	60	0,01	0,269	<b>0,038846</b>	0,0694488
дифеноконазол	30	0,041	0,897	<b>0,2648</b>	0,3666036
диметоморф	10	0,123	0,225	<b>0,175667</b>	0,0510816
крзоксим метил	5	0,0136	0,01698	<b>0,014987</b>	0,00635
металаксил	5	0,018	0,039	<b>0,0286</b>	0,0075033
миклобутанил	5	0,0329	0,1055	<b>0,0692</b>	0,0363
пропиконазол	5	0,024	0,171	<b>0,0596</b>	0,0627559
пириметанил	9	0,016	0,152	<b>0,064556</b>	0,0527923
тебуконазол	5	0,01	0,101	<b>0,0386</b>	0,0358581

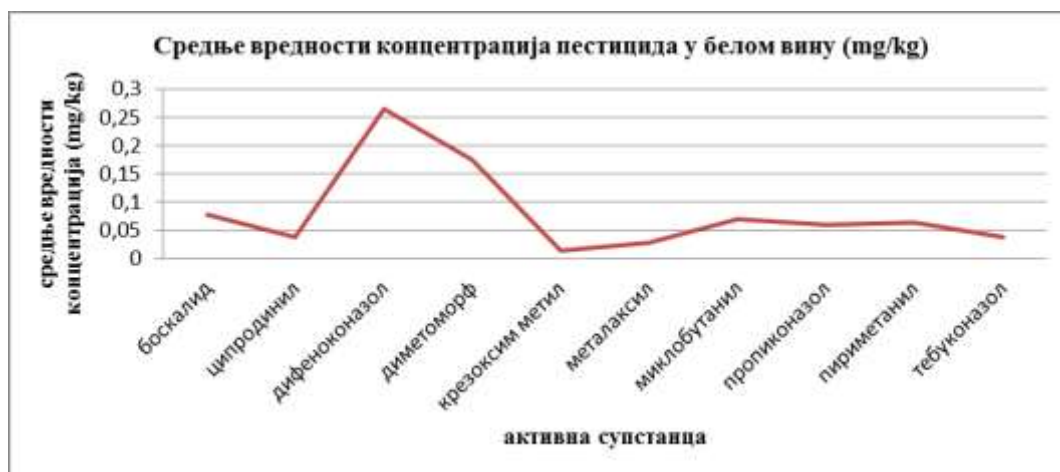


График 35. Упоредни приказ средњих вредности концентрација активних супстанци пестицида у белом вину

Преко дефинисане МДК вредности у белом вину детектовани пропиконазол (Сремски Карловци - Петра и Бачка и Доње Злегиње - Јагода) и тебуконазол (Сремски Карловци - Петра). Испод LOQ је детектован само металаксил у узорцима Ризлинга италијанског са локалитета Доње Злегиње. У осталим узорцима концентрације пестицида су између LOQ и МДК вредности (График 36).

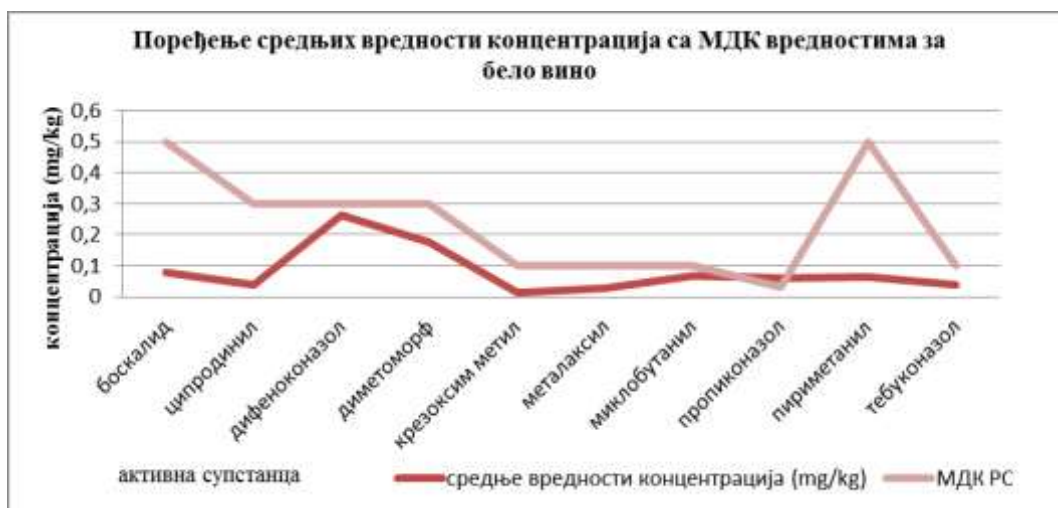
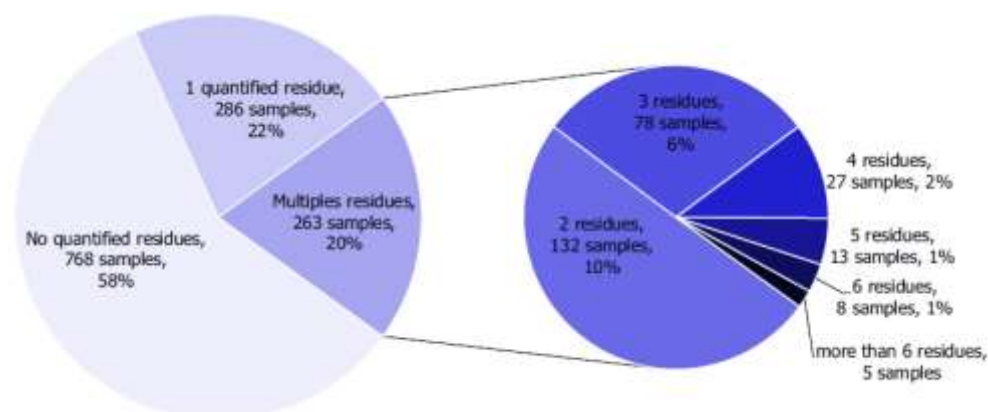


График 36. Упоредни приказ средњих вредности концентрација детектованих активних супстанци пестицида у белом вину и МДК вредности

Према извештају Европске агенције за безбедност хране (EFSA, 2018), у оквиру ЕУ координираног програма праћења остатака пестицида за 2016. годину, анализирано је 1317 узорака вина; у 58,3% узорака нису детектовани остаци активних супстанци пестицида, док је 41,7% узорака садржало једну или више активних супстанци. Присуство вишеструких резидуа је утврђено у 20% узорака, при чему је нађено до 10 различитих активних супстанци у појединачним узорцима вина (Слика 12), за разлику од нашег истраживања где је максималан број детекција био четири остатка у два сорта црвена вина и седам остатака у једном и шест остатака у два сорта бела вина.



Слика 12. Број квантификованих остатака у појединачним узорцима вина (EFSA, 2018)



У 0,4% узорака остаци су били изнад декларисаних МДК вредности. Квантификовано је укупно 37 различитих активних супстанци, најчешће металаксил (15,5%), диметоморф (13,4%), фолпет (13,3%), боскалид (10,8%), фенхексамид (8,0%), метоксифенозид (6,1%), ипроваликарб (5,7%) и пириметанил (5,3%). Максимално дозвољена концентрација је прекорачена за металаксил у узорку из Шпаније и за хлормекват у два узорка из Чилеа и по једном из Аустралије и Молдавије. У нашим узорцима вина су најчешће квантификовани пестициди боскалид, ципродинил, дифеноконазол, металаксил, пириметанил и тебуконазол.

За разлику од наших истраживања у 64 италијанска вина, из шест различитих регија, најчешће детектоване супстанце су беномил (0,05 mg/l), диметоат (0,02 - 0,06 mg/l), ипродион (0,02 - 0,07 mg/l), металаксил (0,04 - 0,14 mg/l) и винклозолин (0,02 mg/l) (Cabras et al., 1995). Слично њима, и Calhelha et al. (2006) су у португалским црвеним и белим винима детектовали остатке дихлофлуанида, беномила, ипродиона, просимидона и винклозолина. Од 25 анализираних словеначких вина два нису садржала остатке, у осам су нађени остаци по једне активне супстанце пестицида, у четири остаци по две, седам вина су садржала остатке по три и у четири вина детектовани су остаци по четири активне супстанце. У највише узорака (19) је детектован боскалид, затим фенхексамид (11), ципродинил и диметоморф (6), флудиоксонил (5), металаксил и просимидон (2), и азоксистробин и ипродион (1). Сви нађени фунгициди спадају у постојане фунгициде у процесу винификације и већина је нађена и у нашим испитивањима. Пестициди су детектовани у концентрацијама нижим од препоручених МДК вредности и то ципродинил (0,01 - 0,44 mg/kg), флудиоксонил (0,02 - 0,21 mg/kg), фенхексамид (0,02 - 0,17 mg/kg), боскалид (0,01 - 0,17 mg/kg), металаксил (0,03 - 0,06 mg/kg), просимидон (0,03 - 0,05 mg/kg), азоксистробин (0,04 mg/kg), диметоморф (0,01 - 0,04 mg/kg) и ипродион (0,03 mg/kg) (Čuš et al., 2010a). У нашем раду су добијене сличне вредности концентрација детектованих пестицида као и у претходном истраживању, и то азоксистробин (0,003 mg/kg), боскалид (0,03 - 0,13 mg/kg), ципродинил (0,01 - 0,27 mg/kg), диметоморф (0,004 - 0,27 mg/kg), фенхексамид (0,015 - 0,18 mg/kg) и металаксил (0,003 - 0,3 mg/kg). Ипродион није детектован ни у једном узорку вина, а примењен је на три

локалитета. У црном грожђу је детектован само у две сорте са локалитета Младеновац. Čuš et al. (2010b) су у винима добијеним од шест различитих врста грожђа детектовали остатке боскалида, ципродинила, диметоморфа, фенхексамида, металаксила, просимидона и тебуконазола у концентрацијама мањим од 0,14 mg/l. У нашем истраживању је анализирано вино добијено од три сорте грожђа (Пробус, Мерло и Cabernet sauvignon) из Сремских Карловаца и детектовани су остаци три активне супстанце и то металаксил (0,021 mg/kg), пириметанил (0,016 mg/kg) и тебуконазол (0,008 mg/kg).

Relajić et al. (2016) су анализирали 32 црвена вина из Хрватске на остатке пестицида; остаци су детектовани у свим узорцима, а у 30 узорака су били преко границе квантификације, слично као и у нашем истраживању. Castro et al. (2018) су анализирали 20 шпанских вина из конвенционалне производње и пет вина из органске производње. Само у једном вину из органске производње нису детектовани пестициди. У више од 24% анализираних вина су детектовани ципродинил, фенпропидин и пириметанил, и диметоморф и металаксил у преко 50% узорака. Једино је ипроваликарб детектован у концентрацији већој од 10% МДК вредности за грожђе. У једном од пет органских вина су детектовани карбендазим, ципродинил, металаксил и тебуконазол. Добијени резултати анализе узорака вина из органске производње у нашем истраживању су слични. Од три врсте вина (једно црвено и два бела), само у једном белом вину (Панонија) нису детектовани остаци, док је у црвеном вину (Регент) детектован само пираклостробин. У сортном белом вину - Бачка детектовани су остаци ципродинила, дифеноконазола, металаксила, пропиконазола, пириметанила и тебуконазола. Сви остаци су детектовани у концентрацијама већим од LOQ.

На основу добијених резултата наших истраживања на Графику 37 је приказана промена средњих вредности концентрација активних супстанци пестицида квантификованих и у црном грожђу и у црвеном вину. У црном грожђу и црвеном вину су квантификовани азоксистробин, боскалид, диметоморф, металаксил, пириметанил, фенхексамид и тебуконазол. Средње вредности концентрација азоксистробина, боскалида, диметоморфа, пириметанила, пираклостробина и тебуконазола опадају у току процеса винификације, док се за ципродинил, металаксил и фенхексамид повећавају.

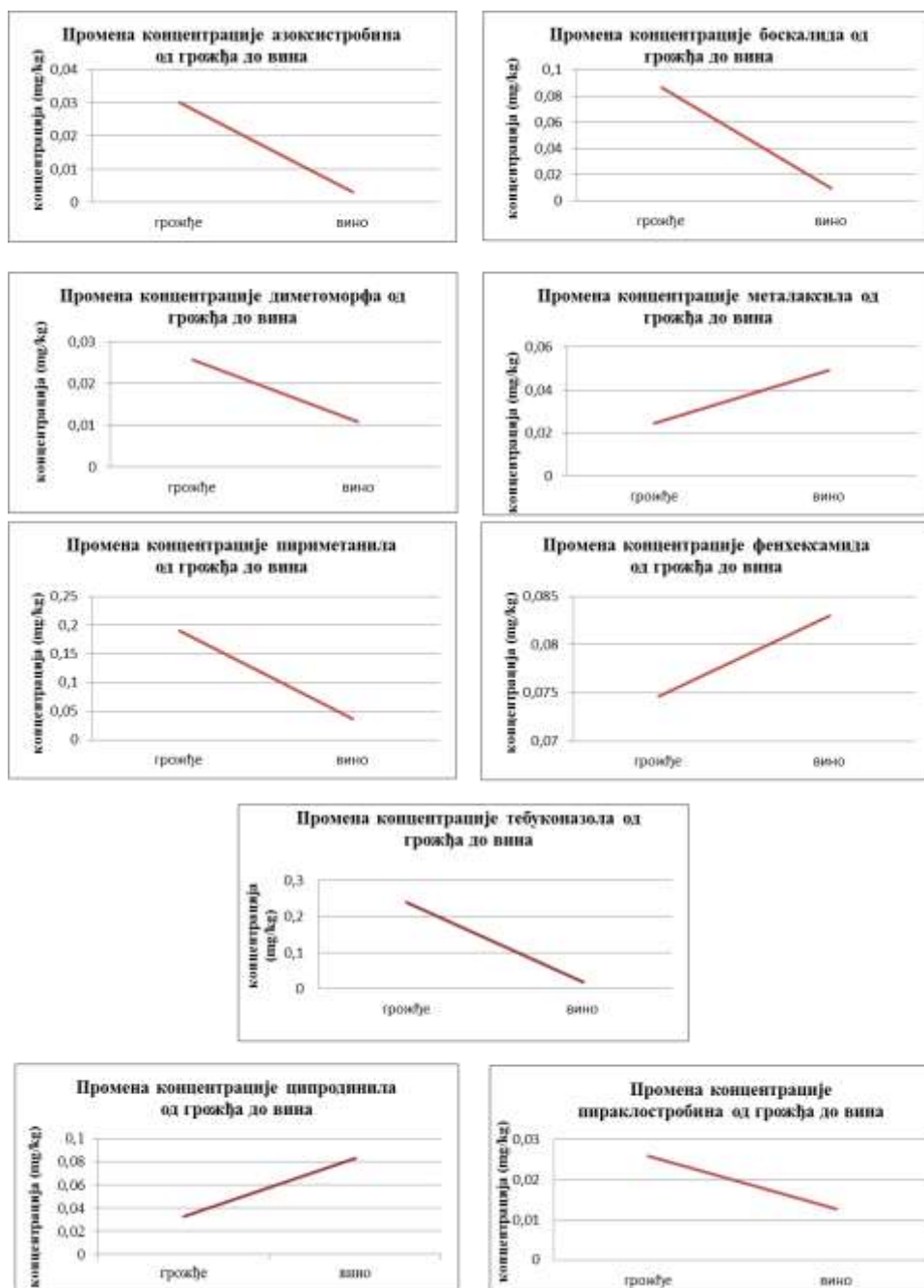


График 37. Промене концентрација активних супстанци пестицида од црног грожђа до црвеног вина

На Графику 38 је приказана промена средњих вредности концентрација активних супстанци пестицида квантификованих и у белом грожђу и у белом вину. У белом грожђу и белом вину су детектовани боскалид, ципродинил, дифеноконазол, диметоморф, крезоксим метил, металаксил, миклобутанил, пропиконазол, пириметанил и тебуконазол. Средње вредности концентрација боскалида и

диметоморфа се приликом прављења белог вина повећавају, за разлику од прављења црвених вина. Средње вредности концентрација металаксила се смањују у белом вину, као и средње вредности концентрација осталих квантификованих пестицида у белом грозђу и белом вину.

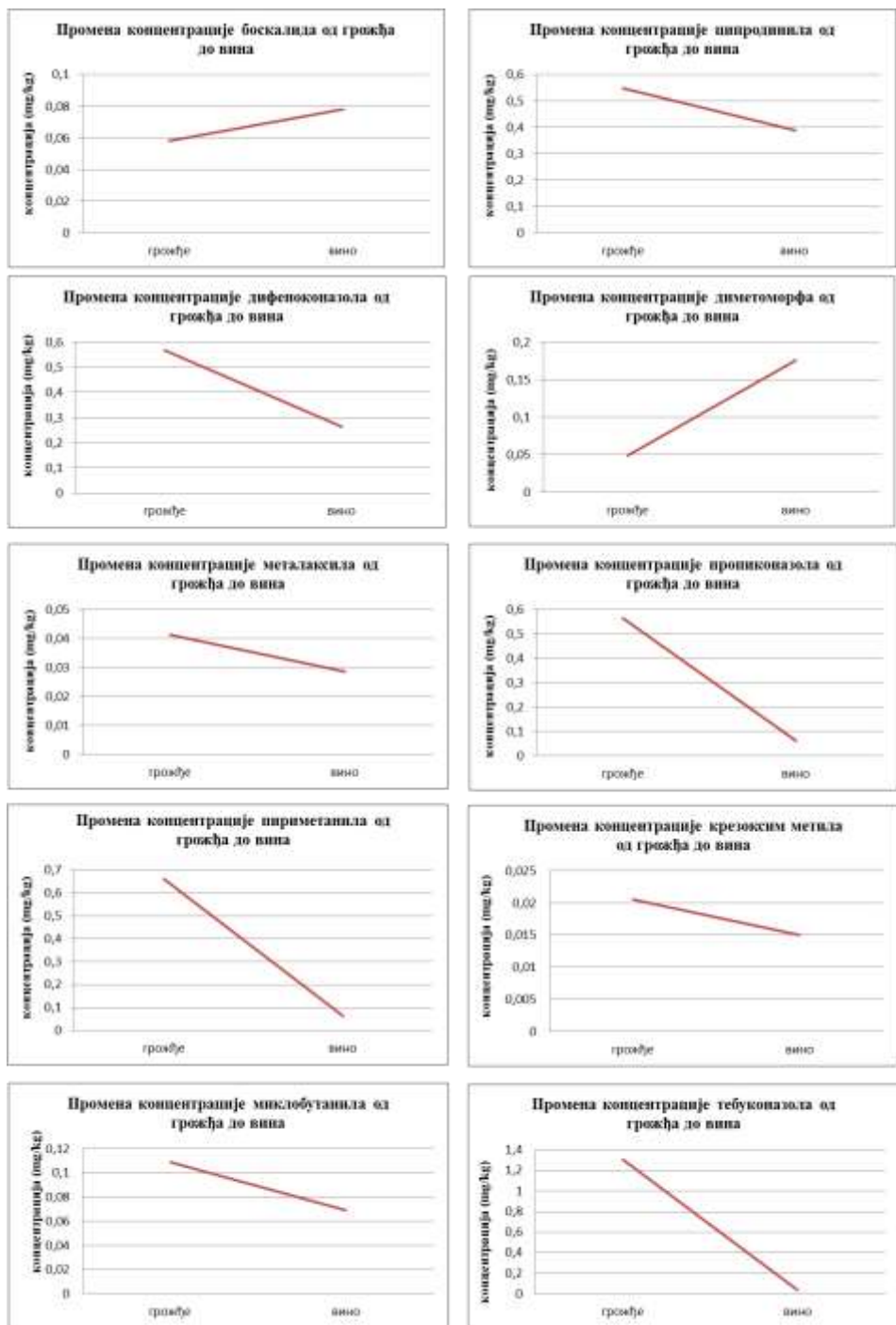


График 38. Промене концентрација активних супстанци пестицида од белог грозђа до белог вина

Garcia-Cazorla i Xirau-Vayreda (1994) су проучавали постојаност ипродиона, просимидона и винклозолина у току винификације. Без обзира што њихова концентрација опада у току процеса производње вина, остаци су ипак присутни у вину и могу се квантификовати. До истих резултата су дошли и Sala et al. (1996). Navarro et al. (1999) су утврдили да су фенаримол и металаксил постојани у току процеса винификације црвених вина, што потврђују и наши резултати добијени за металаксил.

У току процеса винификације пестициди са површине гроздова су у контакту са широм и расподељују се између течне (шира) и чврсте фазе (колач). Концентрације азоксистробина, диметоата и пириметанила су исте у шири и вину као и у грозђу. Остаци миклобутанила и тетраконазола су испод LOD у шири. Неки пестициди имају велики афинитет везивања за чврсту фазу (ципродинил, тебуконазол и хлорпирифос) те им се концентрације смањују, чак и потпуно елиминишу центрифугирањем и пречишћавањем шире. Када се врши винификација целог грозда са кожом остаци флудиоксонала се не могу детектовати, док је његова концентрација у вину једнака половини концентрације у шири када се добија вино од грозђа без коже. Једино се остаци диметоата и пириметанила комплетно преносе од грозђа до вина, док се већина осталих пестицида адсорбује на колачу (Cabras i Angioni, 2000). И резултати нашег истраживања су слични наведеним; азоксистробин је детектован у црном грозђу и црвеном вину, при чему му је концентрација смањена десет пута (0,03 - 0,003 mg/kg), док у белом вину није детектован. Концентрације пириметанила и тебуконазола опадају у случају добијања и црвеног и белог вина. Супротно, концентрација ципродинила се повећава у процесу добијања црвеног, а опада у процесу добијања белог вина. Концентрација тебуконазола се у случају добијања белог вина смањила око 10 пута, док је у случају добијања црвеног вина мања преко 30 пута у односу на средњу вредност детектоване концентрације у грозђу. Исто као и у овом истраживању, флудиоксонил није детектован у винима која смо анализирали. И други аутори су добили сличне резултате приликом испитивања судбине остатака пестицида од грозђа до вина. Fernández et al. (2005) су испитивали судбину четири фунгицида (ципродинил, флудиоксонил, пириметанил и квиноксифен) у току прављења црвеног вина на три начина

(традиционална производња црвеног вина, уз угљеничну мацерацију и дуготрајну мацерацију на ниским температурама) и два вина без мацерације (бело и розе). За све фунгициде је регистровано смањење концентрација при свим начинима винификације. При традиционалном поступку прављења црвеног вина брзина смањења концентрација је била флудиоксонил > квиноксифен > ципродинил > пириметанил. Приликом дуготрајне мацерације на ниским температурама брзине опадања концентрација су биле флудиоксонил > ципродинил > пириметанил > квиноксифен, а за мацерацију потпомогнуту угљен диоксидом ципродинил > флудиоксонил > квиноксифен > пириметанил. Приликом прављења белих вина и розеа редослед је био исти као и код традиционалне винификације. Флудиоксонил је за већину метода винификације показао највећу константу опадања концентрације, а пириметанил најнижу.

Слично као и у нашем истраживању, Čuš et al. (2010a) су у току процеса винификације два сорта црвена и два сорта бела вина детектовали велики број активних супстанци пестицида. Од фунгицида су детектовали боскалид, ципродинил, фенхексамид, просимидон, пириметанил, хлороталонил, диметоморф, фолпет, квиноксифен, тебуконазол и фенамидон, а од инсектицида хлорпирифос и фозалон. Уопштено, концентрације већине фунгицида су знатно ниже у вину него у грожђу. Једино је у истраживањима González-Rodríguez et al. (2009b) нађена слична концентрација ипроваликарба и у вину и грожђу. С друге стране, концентрација тебуконазола која је присутна у вину је јако мала с обзиром на његову малу растворљивост у води. И наши резултати показују да су концентрације тебуконазола детектоване у већини узорка вина око LOQ вредности. Такође, и други фунгициди из групе триазола (миклобутанил, тетраконазол), нису детектовани на крају алкохолне ферментације (Cabras i Angioni, 2000; Cabras et al., 2000; González-Rodríguez et al., 2009a,c). С друге стране, Franc i de Revel (2018) су у својим истраживањима утврдили да се већина пестицида који се додају у ширу пре алкохолне ферментације могу детектовати и када се заврши ферментација.

### 6.2.3. Процена изложености популација активним супстанцама пестицида преко грозђа

Карактеризација ризика проистекла из детерминистичке процене хроничног уноса активних супстанци пестицида преко грозђа од стране популационих група у Републици Србији приказана је на Графицима 39 (црно грозђе) и 40 (бело грозђе).

Уочава се да допринос црног грозђа толеришућем дневном уносу превазилази 1% само у случају дифенконазола, који достиже високе вредности: 38,7%, 19,3%, 11,6%, 7,5% и 5,1%, редом за одојчад, предшколску децу, децу (7 - 10 г.), адолесценте и одрасле. У случају белог грозђа, унос дифенконазола је знатно нижи, у распону од 0,5% (одрасли) до 4,0% (одојчад), а следе тебуконазол, ципродинил и пропиконазол (опсег 0,4 - 3,0%, 0,17 - 1,3%, 0,13 - 1,0%, редом), док су за све остале детектоване активне супстанце доприноси толеришућем дневном уносу испод 1% у свакој од популационих група.

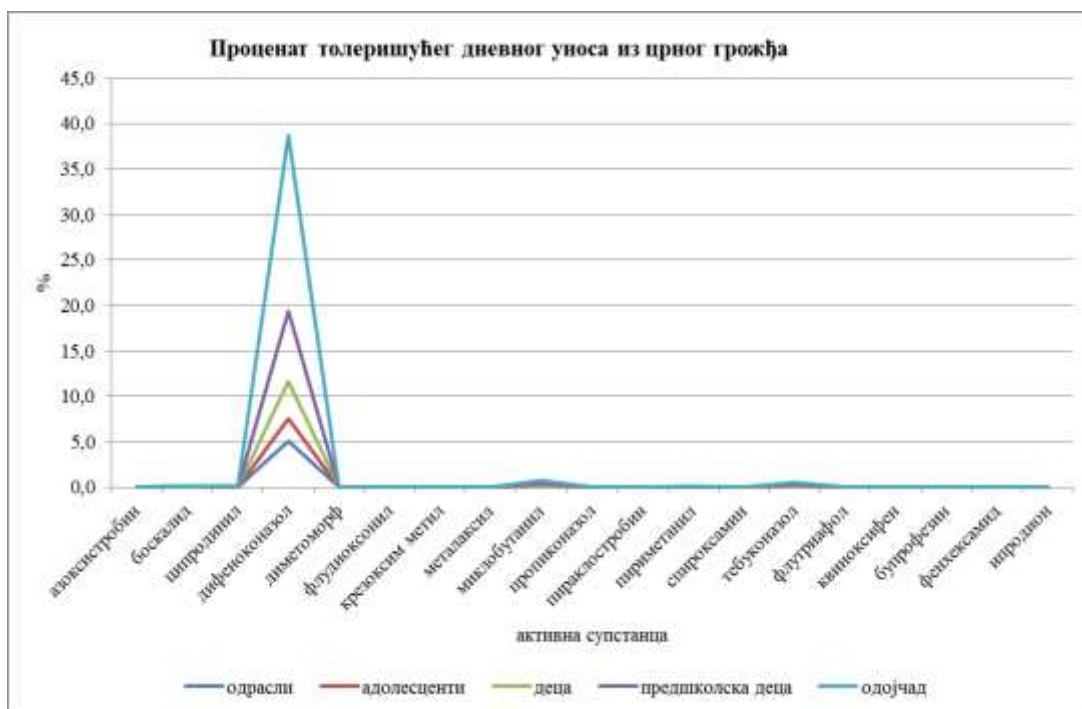


График 39. Хронични унос остатака активних супстанци пестицида из црног грозђа, по популационим групама, изражен као % толеришућег дневног уноса

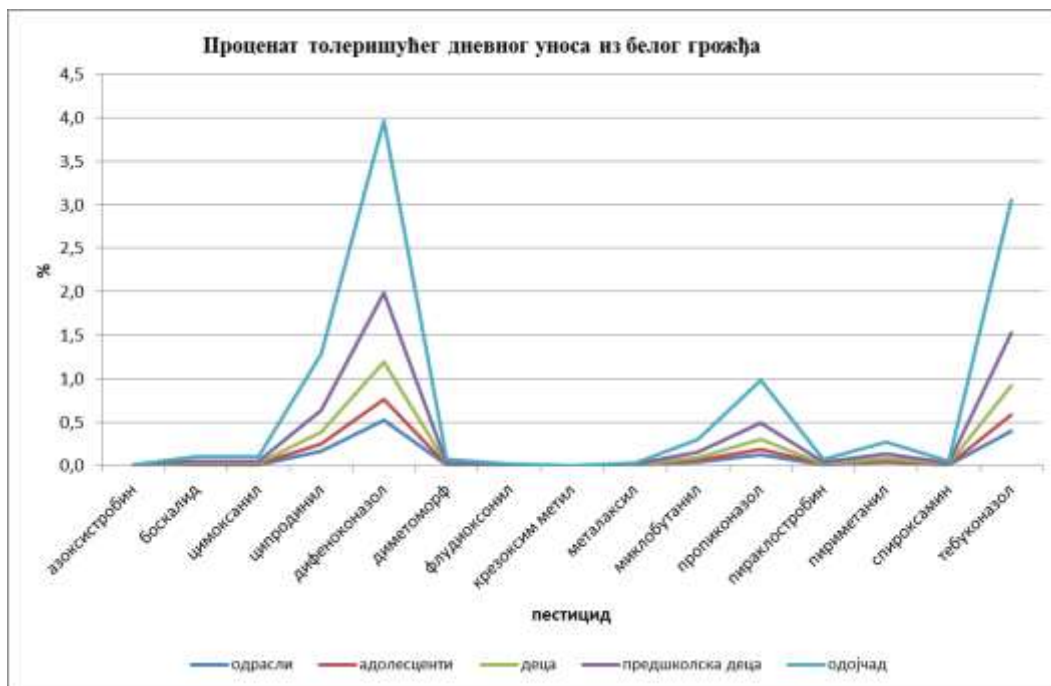


График 40. Хронични унос остатака активних супстанци пестицида из белог грозђа, по популационим групама, изражен као % толеришућег дневног уноса

Карактеризација ризика проистекла из процене акутног уноса активних супстанци пестицида преко грозђа од стране популационих група у Републици Србији приказана је на Графику 41, за пестициде за које је утврђено да прекорачују акутну референтну дозу. Уочава се да је при конзумирању црног грозђа акутни референтни унос дифенокназола (0,16 mg/kg тм/дан) прекорачен чак 6 (адолесценти), односно 4 пута (одрасли), док за одојчад прекорачење износи 21%. У групи предшколске деце и деце узраста 7 - 10 година унос дифенокназола достиже 61% и 37% акутне референтне дозе, редом. Такође и унос тебуконазола прекорачује акутну референтну дозу: у случају конзумирања црног грозђа у групи адолесцената (145%), односно у случају конзумирања белог грозђа код одојчади, адолесцената и одраслих (103%, 532% и 361%, редом).



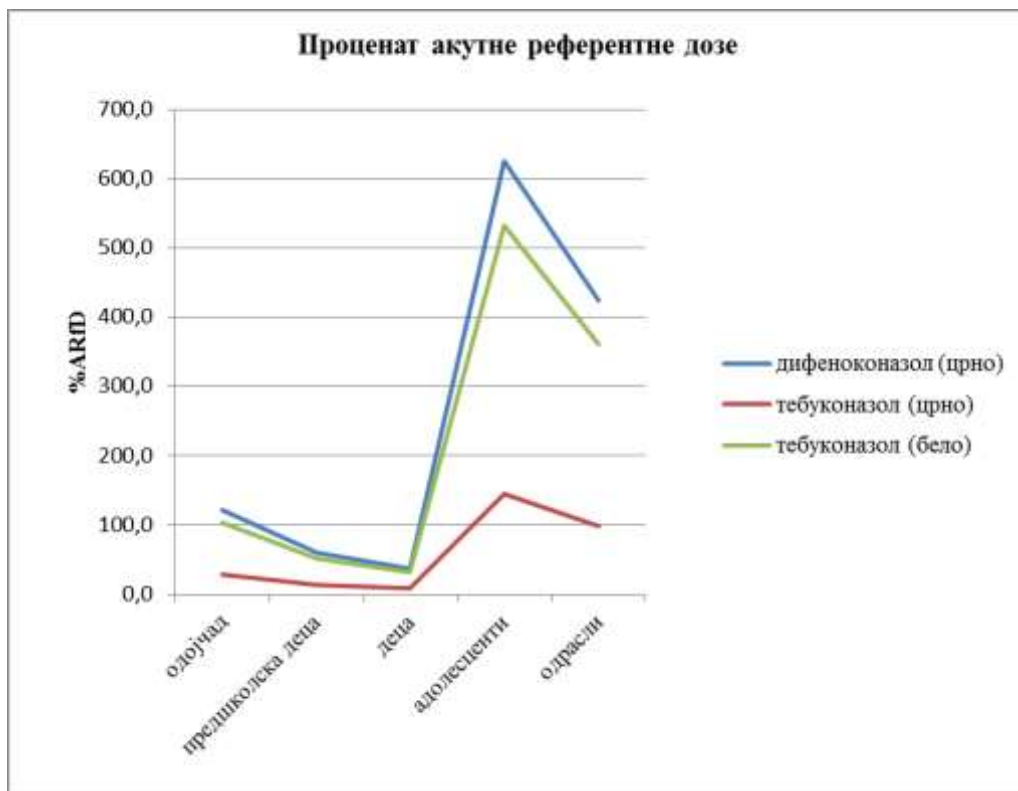


График 41. Акутни унос остатака активних супстанци пестицида по популационим групама, изражен као % акутне референтне дозе

Закључно, присуство остатака пестицида у грозђу у концентрацијама утврђеним у овом раду представља прихватљив ризик за популацију у Републици Србији, осим у случају црног грозђа са остацима дифеноконазола (28,706 mg/kg) и грозђа са остацима тебуконазола (1,25 и 4,585 mg/kg, у црном и белом грозђу редом), где ризик није прихватљив за одојчад, адолесценате и одрасле.

Према извештају Европске агенције за безбедност хране (EFSA, 2017), резултати процене акутног уноса остатака пестицида преко стоног грозђа проистекли из ЕУ координираног програма мониторинга остатака пестицида за 2015. годину, показали су прекорачење референтне вредности за низ пестицида, у укупно 65 одређивања: битертанол 282%, хлорпирифос 3143%, делтаметрин 471%, диметоат - ометоат 451% (диметоат - диметоат 90%), дитиокарбамати 238% (манеб сценарио), 494% (пропинеб сценарио), 655% (цирам сценарио), етефон 576%, форметанат 10574%, ламбда цихалотрин 210%, метамидофос 284%, метомил 3929%, пираклостробин 140%, тебуконазол 393%, триадименол 210%. Дефиниција остатка за ометоат садржи једињења са значајно различитим

токсиколошким потенцијалом (диметоат и ометоат). У извештају су дати подаци за суму диметоата и ометоата, изражену као диметоат, који су за процену акутног ризика коришћени на два начина: први, тако да се сматра да целокупна количина одговара мање токсичном диметоату, и други, у ком се сматра да целокупна количина одговара токсичнијем ометоату.

За хлорпирифос је акутна референтна доза прекорачена у чак 32 узорка, за етефон у десет, а за ламбда цихалотрин у осам. У пет узорака грожђа утврђено је да истовремено присутни остаци два различита пестицида прекорачују акутну референтну дозу.

#### **6.2.4. Процена изложености популација активним супстанцама пестицида преко вина**

Карактеризација ризика проистекла из детерминистичке процене хроничног уноса активних супстанци пестицида преко вина од стране одрасле популације у Републици Србији приказана је на Графицима 42 (црвено вино) и 43 (бело вино). При нивоу конзумирања црвеног вина од 10 ml/дан, проистеклом из националне анкете о потрошњи домаћинстава у Републици Србији, ниједан од детектованих пестицида не достиже ни 0,1% толеришућег дневног уноса. Ако би се као могући сценарио посматрало конзумирање једне чаше вина дневно (200 ml), што се сматра умереном конзумацијом вина, одговарајуће вредности за ципродинил би износиле 0,7% и 1,6% толеришућег дневног уноса. У најгорем сценарију (максимална концентрација пестицида и конзумација 0,2 l вина/дан), унос металаксила се приближава вредности од 1% толеришућег дневног уноса (0,98%). Када се посматра бело вино, просечна и максимална концентрација дифеноконазола резултују са по 0,3% и 1,2%, односно 6,9% и 23,5% толеришућег дневног уноса, у сценарију ниског и умереног уноса, редом. У комбинацији максималних концентрација и умереног уноса, ципродинил, диметоморф, миклобутанил и пропиконазол достижу 2,4%, 1,2%, 1,1% и 1,1% толеришућег дневног уноса, редом.

Закључно, присуство остатака пестицида у вину у концентрацијама утврђеним у овом раду представља прихватљив ризик за одраслу популацију у Републици Србији.



График 42. Хронични унос остатака активних супстанци пестицида из црног вина, за одраслу популацију, изражен као % толеришућег дневног уноса

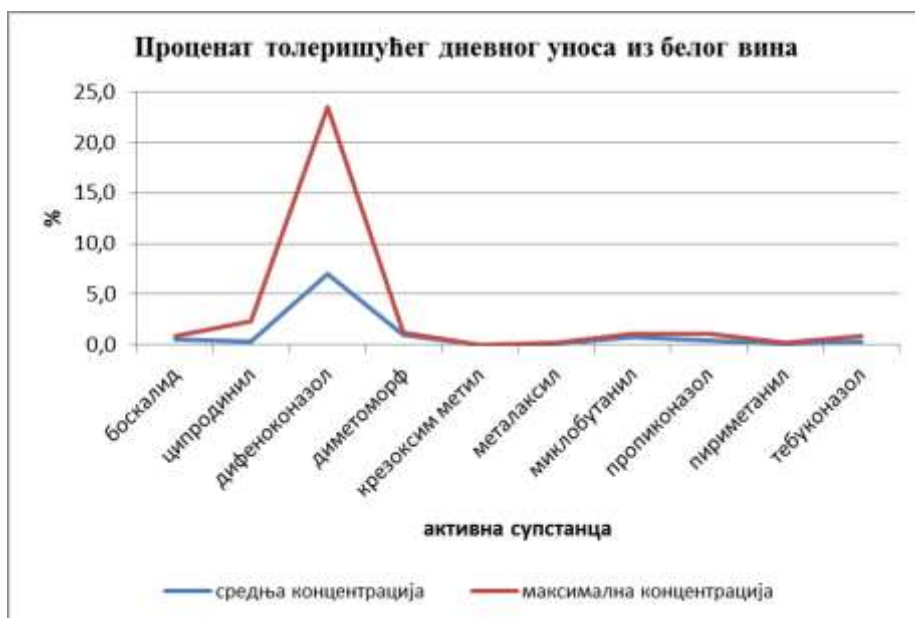


График 43. Хронични унос остатака активних супстанци пестицида из белог вина, за одраслу популацију, изражен као % толеришућег дневног уноса

Карактеризација ризика проистекла из процене акутног уноса пестицида преко вина од стране одрасле популације у Републици Србији показала је да нема ризика од прекорачења акутних референтних доза. Највиши проценат акутне референтне дозе достигао је дифенокназол унет из белог вина (9,3%), а прати га тебуконазол са 5,6% уносом из белог, односно 2,7% из црвеног вина.

Према извештају Европске агенције за безбедност хране (EFSA, 2018), резултати процене акутног уноса остатака пестицида преко вина проистекли из ЕУ координираног програма мониторинга остатака пестицида за 2016. годину (Табела 47), показали су приближно четвороструко прекорачење референтне дозе за ипродион (395%).

Табела 47. Акутни унос остатака активних супстанци пестицида преко вина у ЕУ, изражен као проценат акутне референтне дозе (EFSA, 2018)

Активна супстанца	% ARfD	Активна супстанца	% ARfD
Ацетамиприд	1	Етефон	1,3
Бупрофезин	0,03	Фенамифос	9
Карбендазим	28	Фенбуконазол	0,12
Хлормекват	5	Феноксикарб	0,03
Хлотианидин	0,24	Флуопирам	0,7
Диметоат - диметоат	37	Фолпет	1,8
Диметоат - ометоат	173	Фостиазат	5,1
Диметоморф	0,88	Имидаклоприд	0,6
Дитиокарбамати - манкозеп	45	Индоксакарб	1,5
Дитиокарбамати - манеб	14	Ипродион	395
Дитиокарбамати - пропинеб	29	Металаксил	1
Дитиокарбамати - тирам	60	Метоксифенозид	2
Дитиокарбамати - зирам	38		

### Непоузданости повезане са проценом ризика

Непоузданости повезане са приказаном проценом ризика потичу у највећој мери од података за концентрацију охратоксина А у грозђу и вину, услед тога што охратоксин А није детектован у узорцима грозђа (250), односно детектован је само у једном од 160 узорака вина. Подаци о конзумираним количинама грозђа и вина су коришћени као просечне вредности за популацију, а било би од значаја издвојити само конзументе, за шта, међутим, подаци нису доступни. У обзир нису узете ни могуће разлике међу половима, такође због недостатка потребних података. Коначно, потребно је нагласити да истраживање није обухватило све

намирнице од интереса (храна за коју се може очекивати да буде контаминирана охратоксином А, односно остацима активних супстанци пестицида), већ су у обзир узети само грозђе и вино. На пример, намирнице које представљају значајан извор охратоксина А, и које се пуно козумирају, су житарице и кафа и било би значајно анализирати их и урадити процену ризика са добијеним подацима и 'сумирати' те податке при процени ризика у будућим истраживањима.

## 7. Закључак

У оквиру ове докторске дисертације развијена је и оптимизирана мултирезидуална инструментална метода која је осетљива, селективна и поуздана за испитивање остатака 41 активне супстанце пестицида и ОТА у грожђу и вину.

Такозвана QuEChERS метода је модификована за истовремену екстракцију активних супстанци пестицида и ОТА из истог узорка грожђа, односно вина, чиме је избегнута употреба имуноафинитетних колона за припрему узорка за анализу ОТА. На овај начин је омогућена припрема 24 узорка грожђа/вина дневно за анализу пестицида и ОТА, чиме се штеди време, смањује употреба растварача и потрошног материјала, а самим тим смањује се и цена анализе.

Испитивањем линеарности одговора детектора утврђено је да су калибрационе криве за ОТА у ацетонитрилу, матриксама грожђа и вина и по методи стандардног додатка имале квадратну једначину зависности са коефицијентима корелације већим од 0,99.

Матрикс ефекат црног грожђа на одговор ОТА је 29,16% и утиче на повећање сигнала ОТА, а МЕ белог грожђа од -10,95% на смањење сигнала. Црвено вино доводи до смањења сигнала ОТА (-47,24%,) док бело вино доводи до повећања сигнала (39,49%).

Добијна вредност за LOD на нивоу од 0,33  $\mu\text{g}/\text{kg}$  у црном и 0,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  у белом грожђу омогућава поуздану детекцију ОТА, као и LOQ на нивоу од 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (1/10 МДК). У црвеном и белом вину LOD је исти као и за црно грожђе (0,33  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), док је за LOQ постављена вредност која одговара најнижој тачки калибрације (0,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) (1/4 МДК) и такође, омогућавају поуздану детекцију присуства ОТА.

Вредност приноса екстракције за ОТА у црном грожђу се кретала од 81,2% (10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) до 104,2% (2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), уз %RSD од 1,03 (2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) до 16,1 (20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), а за бело грожђе у распону од 93,7 (10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) до 117,2% (2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), уз %RSD од 2,01 (5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) до 5,5 (10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Средња вредност приноса екстракције за црно грожђе је била 91,8% (%RSDr 12,1), а за бело грожђе 102,9% (%RSDr 9,86). Поновљивост методе је износила за црно грожђе %RSDr 2,70, а за бело грожђе %RSDr 2,58.

Вредност приноса екстракције за црвено вино се кретала од 97,3% (5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) до 106,7% (1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), уз %RSD 1,19 (5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) до 8,48% (10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), за бело вино од 90,6 (2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) до 110,5% (1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), уз %RSD од 1,57 (10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) до 23,29 (1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).

Средња вредност приноса екстракције за црвено вино је износила 101,5% (%RSDr 3,83), а за бело вино 100,7% (%RSDr 8,11). Поновљивост за црвено вино на концентрационом нивоу од 1 µg/kg је износила %RSDr 11,71, а за бело вино 10,76. *Botrytis cinerea* је регистрована у два узорка грожђа (Бургундац црни и Ризлинг рајнски), међутим, ни у једном узорку није детектован ОТА изнад LOD вредности. На основу добијених резултата процењен је унос ОТА путем конзумације грожђа. Добијени резултати показују да је ризик од уноса ОТА преко грожђа прихватљив за све узрасне групе (одојчад, децу предшколског узраста, децу 7 - 10 година, адолесценте и одрасле) у Републици Србији.

Охратоксин А је детектован само у вину Pinot noir добијеном од грожђа зараженог фитопатогеном гљивом *B. cinerea*, што представља 3,1% од укупно анализираних узорака. Вино конзумирају само одрасли, а на основу добијених резултата процењено је да вино доприноси 1,21% од TWI у уносу ОТА на недељном нивоу.

Мултирезидуална метода одређивања остатака пестицида у грожђу и вину је обухватила испитивање валидационих параметара као што су селективност, линеарност, тачност и прецизност. Линеарност методе је испитивана у растварачу, матриксу и методом стандардног додатка. Калибрационе криве за већину пестицида у мобилној фази, матриксама грожђа и вина и по методи стандардног додатка су показале добру линеарну, односно квадратну зависност са коефицијентима корелације >0,99. Најлошију линеарност је показао зоксамид у белом вину ( $R^2=0,1018$ ) за калибрацију методом стандардног додатка и ипродион према калибрацији у матриксу у црвеном вину ( $R^2=0,904$ ).

Највећи позитиван матрикс ефекат црвено вино има на ипродион (300%), а бело на трифлумизол (87,6%), а највећи утицај на смањење сигнала црвено вино има на флуоквинконазол (-900%) и бело вино на спироksamин (-862,1%). Црно и бело грожђе имају уједначен МЕ за већину пестицида, док црвено и бело вино имају екстремне вредности МЕ.

Највише вредности границе детекције су за флуопирам (8,99 µg/kg) у белом грожђу, цимоксанил (8,74 µg/kg) у црвеном вину, ипродион (8,72 µg/kg) у црном грожђу, дитианон (8,12 µg/kg) у црвеном вину и метоксифенозид (8,00 µg/kg) у белом вину. Добијене вредности су усаглашене са литературним подацима, јер за ипродион метода избора је негативна јонизација (-ESI), а дитианон припада групи

пестицида који се екстрахују из јако киселе средине (EURL за његово одређивање предлаже Single Residue Method). За највећи број пестицида LOD вредности су мање од 5 µg/kg, што су значајно ниже вредности у односу на постављени МДК за пестициде.

Поновљивост методе (%RSD) у вину и грозђу је била од 0 до 27,86%. Метода показује најбољу поновљивост у белом грозђу, затим у црвеном вину и црном грозђу, а најлошију у белом вину.

Принос екстракције у црном грозђу је за 75,6% пестицида, у белом грозђу за 51,2%, у црвеном вину за 46,3%, а у белом вину за 56,1% био између 70 и 120%. Вредности приноса екстракције за флукинконазол у белом грозђу, трифлумизол у црвеном и белом вину биле су преко 200%. Већина пестицида је у сва четири матрикса на најнижим нивоима обогаћивања имала вредности приноса екстракције  $\leq 70\%$ . Вредности приноса екстракције су израчунате на основу калибрације у матриксама узорака, јер је циљ био показати изузетно изражен утицај матрикса, како грозђа тако и вина, на испитиване анализе. Треба нагласити да ова врста матрикса обилује шећерима, танинима и пигментима који имају изузетно неповољан утицај на хроматографску колону и на процесе јонизације у јонском извору. Да би се избегао неповољан утицај матрикса и корекција добијених резултата за вредности приноса екстракције, садржај детектованих пестицида је одређен методом стандардног додатка.

У свим узорцима црног винског грозђа, укључујући и узорке из органске производње детектовани су остаци пестицида; детектовано је 19 пестицида (46,3% од испитиваних пестицида), међу којима је најзаступљенији био тебуконазол. Дифеноконазол је детектован у концентрацијама преко МДК (3,0 mg/kg) вредности.

У 80% анализираних узорака белог грозђа је детектовано 15 пестицида. Пестициди су детектовани и у 50% узорака белог грозђа из органске производње. У узорцима сорте Бачка (датум бербе 21.09.2016) нису поново детектовани пестициди [у узорцима Бачка (датум бербе 05.09.2016) су детектована четири пестицида]. Најчешће детектован пестицид у белом грозђу је металаксил. Пропиконазол (85,7% узорака) и тебуконазол (30% узорака) су били заступљени у количинама изнад МДК (0,3 и 1,0 mg/kg, редом).



У свим узорцима црвеног вина је детектовано 10 активних супстанци пестицида, при чему ниједан пестицид није детектован у концентрацији преко препоручене вредности од 10% МДК вредности за винско грожђе. Најчешће детектована активна супстанца у црвеном вину је пириметанил.

Пестициди нису детектовани једино у узорцима белог вина Панонија из органске производње. У осталих 12 сортних белих вина, укључујући и органско детектовано је 10 пестицида. Пропиконазол и тебуконазол су детектовани у концентрацијама преко препоручене МДК вредности.

У процесу добијања црвеног вина смањене су концентрације азоксистробина, боскалида, диметоморфа, пириметанила, пиракlostробина и тебуконазола а концентрације ципродинила, металаксила и фенхексамида повећане.

Концентрације боскалида и диметоморфа су веће у белом вину него у белом грожђу, а концентрације металаксила, ципродинила, дифеноконазола, крезоксим метила, миклобутанила, пропиконазола, пириметанила и тебуконазола су мање.

Од црног винског грожђа три сорте са локалитета Мала Сугубина, две са локалитета Радмиловац и Умчари и једна са локалитета Голобок би биле проглашене здравствено неисправним због концентрација дифеноконазола преко МДК вредности. Од белог винског грожђа по једна сорта са локалитета Копљари, Мала Сугубина, Доње Злегиње, Заклопача, Страгари и Сремски Карловци би такође били здравствено неисправни због концентрација пропиконазола и тебуконазола преко МДК вредности. Добијени резултати указују на неопходност сталне контроле ових производа, без обзира на њихово порекло тј. да ли су из органске или конвенционалне производње. Такође, због детекције остатака активних супстанци пестицида у узорцима из органске производње неопходно је постојање заштитног појаса између конвенционалних и органских засада.

У овом истраживању је утврђено одсуство ОТА у грожђу и вину из конвенционалне и органске производње што може бити последица климатских фактора и присуства пестицида у конвенционалној производњи. Период зрења је карактерисало време без падавина и без великих осцилација у температури. Такође, на биљкама и плодовима нису биле уочене појаве болести (осим код сорти Ризлинг рајнски - Радмиловац и Бургундац црни - Страгари).

Ризик од остатака пестицида у грожђу у концентрацијама утврђеним у овом раду, прихватљив је за популацију у Републици Србији, осим у случају црног грожђа са остацима дифеноконазола (28,706 mg/kg) и грожђа са остацима тебуконазола (1,25 и 4,585 mg/kg, у црном и белом грожђу редом), где ризик није прихватљив за одојчад, адолесценате и одрасле.

Ризик од остатака активних супстанци пестицида у вину, у концентрацијама утврђеним у овом раду, је прихватљив за одраслу популацију у Републици Србији.

На основу процене акутног уноса пестицида преко вина за одраслу популацију највише вредности су добијене за дифеноконазол унет из белог вина (9,3%), затим за тебуконазол 5,6% из белог и 2,7% из црвеног вина.

## 8. Литература

- Abrunhosa, L., Paterson, R. R. M., Venâncio, A. (2010): Biodegradation of ochratoxin A for food and feed decontamination. *Toxins* 2: 1078-1099.
- Alder, L., Greulich, K., Kempe, G., Vieth, B. (2006): Residue analysis of 500 high priority pesticides: better by GC-MS or LC-MS/MS? *Mass Spectrometry Reviews* 25(6): 838-865.
- Al-Taher, F., Banaszewski, K., Jachson, L., Zweigenbaum, J., Ryu, D., Cappozzo, J. (2013): Rapid method for the determination of multiple mycotoxins in wines and beers by LC-MS/MS using a stable isotope dilution assay. *Journal of agricultural and food chemistry* 61: 2378-2384.
- Amezqueta, S., González-Peñas, E., Murillo-Arbizu, M., de Cerain, A. L. (2009): Ochratoxin A decontamination: a review. *Food control* 20: 326-333.
- Anastassiades, M., Lehotay, S.J., Stajnbaher, D., Schenck, F.J. (2003): Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International* 86(2): 412-431.
- Andrade, M. A., Lanças, F. M. (2017): Determination of ochratoxin A in wine by packed in-tube solid phase microextraction followed by high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography A* 1493: 41-48.
- Anselme, M., Tangni, E.K., Pussemier, L., Motte, J.-C., Van Hove, F., Schneider, Y.-J., Van Peteghem, C., Larondelle, Y. (2006): Comparison of ochratoxin A and deoxynivalenol in organically and conventionally produced beers sold on the Belgian market. *Food additives and contaminants* 23(9): 910-918.
- Arroyo-Manzanares, N., Gámiz-Gracia, L., García-Campaña, A. M. (2012): Determination of ochratoxin A in wines by capillary liquid chromatography with laser induced fluorescence detection using dispersive liquid-liquid microextraction. *Food chemistry* 135: 368-372.

- Arroyo-Manzanares, N., García-Campaña, A. M., Gámiz-Gracia, L. (2013): Multiclass mycotoxin analysis in *Silybum marianum* by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry using a procedure based on QuEChERS and dispersive liquid-liquid microextraction. *Journal of chromatography A* 1282: 11-19.
- Avramides, E. J., Lentza-Rizos, Ch., Mojasevic, M. (2003): Determination of pesticide residues in wine using gas chromatography with nitrogen-phosphorus and electron capture detection. *Food additives and contaminants* 20(8): 699 -706.
- Baša Česnik, H., Gregorčič, A., Čuš, F. (2008): Pesticide residues in grapes from vineyards included in integrated pest management in Slovenia. *Food additives and contaminants* 25(4): 438-445.
- Bascarán, V., Hernández de Rojas, A., Chouciño, P., Delgado, T. (2007): Analysis of ochratoxin A in milk after direct immunoaffinity column clean-up by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of chromatography A* 1167: 95-101.
- Battilani, P., Camardo, L. M. (2015): OTA-Grapes: A mechanistic model to predict ochratoxin A risk in grapes, a step beyond the systems approach. *Toxins* 7: 3012-3029.
- Battilani, P., Magan, N., Logrieco, A. (2006): European research on ochratoxin A in grapes and wine. *International journal of food microbiology* 111: S2-S4.
- Battilani, P., Logrieco, A., Giorni, P., Cozzi, G., Bertuzzi, T., Pietri, A. (2004): Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* on some grape varieties grown in Italy. *Journal of the science of food and agriculture* 84: 1736-1740.
- Bellí, N., Marín, S., Duaigües, A., Ramos, A.J., Sanchis V. (2004): Ochratoxin A in wines, musts and grape juices from Spain. *Journal of the science of food and agriculture* 84: 591-594.
- Berente, B., Móricz, Á., H.-Otta, K., Záray, G., Lékó, L., Rácz, L. (2005): Determination of ochratoxin A in Hungarian wines. *Microchemical journal* 79: 103-107.

- Biffi, R., Munari, M., Dioguardi, L., Ballabio, C., Cattaneo, A., Galli, C.L., Restani, P. (2004): Ochratoxin A in conventional and organic cereal derivatives: a survey of the Italian market, 2001-02. *Food additives and contaminants* 21(6): 586-591.
- Blesa, J., Soriano, J.M., Moltó, J.C., Mañes, J. (2004a): Concentration of ochratoxin A in wines from supermarkets and stores of Valencian Community (Spain). *Journal of chromatography A* 1054: 397-401.
- Blesa, J., Berrada, H., Soriano, J.M., Moltó, J.C., Mañes, J. (2004b): Rapid determination of ochratoxin A in cereals and cereal products by liquid chromatography. *Journal of chromatography A* 1046: 127-131.
- Boon, P. (2018): Cumulative exposure and risk. Programme and book of abstracts of the 12<sup>th</sup> European pesticide residue workshop: Pesticides in food and drink. Munich, Germany, p. 36.
- Cabañes, F. J., Bragulat, M. R. (2018): Black aspergilli and ochratoxin A-producing species in food. *Current opinion in food science* 23: 1-10.
- Cabras, P., Angioni, A. (2000): Pesticide residues in grapes, wine, and their processing products. *Journal of agricultural and food chemistry* 48(4): 967-973.
- Cabras, P., Conte, E. (2001): Pesticide residues in grapes and wine in Italy. *Food additives and contaminants* 18: 880-885.
- Cabras, P., Garau, V. L., Melis, M., Pirisi, F. M., Spanedda, L. (1995): Pesticide residues in Italian wines. *Italian journal of food science* 7(2): 133-145.
- Cabras, P., Angioni, A., Garau, V. L., Minelli, E. V., Melis, M., Pirisi, F. M. (1997): Pesticides in the distilled spirits of wine and its byproducts. *Journal of agricultural and food chemistry* 45: 2248-2251.
- Calhelha, R. C., Andrade, J. V., Ferreira, I. C., Estevinho, L. M. (2006): Toxicity effects of fungicide residues on the wine-producing process. *Food microbiology* 23(4): 393-398.
- Campone, L., Piccinelli, A. L., Rastrelli, L. (2011): Dispersive liquid-liquid microextraction combined with high-performance liquid chromatography-tandem

mass spectrometry for the identification and the accurate quantification by isotope dilution assay of ochratoxin A in wine samples. *Analytical and bioanalytical chemistry* 399: 1279-1286.

Campone, L., Piccinelli, A. L., Celano, R., Pagano, I., Russo, M., Rastrelli, L. (2018): Rapid and automated on-line solid phase extraction HPLC-MS/MS with peak focusing for the determination of ochratoxin A in wine samples. *Food chemistry* 244: 128-135.

Castellari, M., Versari, A., Fabiani, A., Parpinello, G. P., Galassi, S. (2001): Removal of ochratoxin A in red wines by means of adsorption treatments with commercial fining agents. *Journal of agricultural and food chemistry* 49: 3917-3921.

Castro, G., Pérez-Mayán, L., Rodríguez-Cabo, T., Rodríguez, I., Ramil, M., Cela, R. (2018): Multianalyte, high-throughput liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the sensitive determination of fungicides and insecticides in wine. *Analytical and bioanalytical chemistry* 410: 1139-1150.

Chen, B., Wu, F.-q., Wu, W.-d., Jin, B.-h., Xie, L.-q., Feng, W., Ouyang, G. (2016): Determination of 27 pesticides in wine by dispersive liquid-liquid microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Microchemical journal* 126: 415-422.

Chiodini, A.M., Scherpenisse, P., Bergwerff, A.A. (2006): Ochratoxin A content in wine: comparison of organically and conventionally produced products. *Journal of agricultural and food chemistry* 54: 7399-7404.

Chu, S.-P., Tseng, W.-C., Kong, P.-H., Huang, C.-K., Chen, J.-H., Chen, P.-S., Huang, S.-D. (2015): Up-and-down-shaker-assisted dispersive liquid-liquid microextraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry for the determination of fungicides in wine. *Food chemistry* 185: 377-382.

Chuche, J., Thiéry, D. (2014): Biology and ecology of the Flavescence dorée vector *Scaphoideus titanus*: a review. *Agronomy for sustainable development* 34(2): 381-403.

- Chulze, S.N., Magnoli, C.E., Dalcerro, A.M. (2006): Occurrence of ochratoxin A in wine and ochratoxigenic mycoflora in grapes and dried vine fruits in South America. *International journal of food microbiology* 111: S5-S9.
- Codex (1998): Position paper on ochratoxin A. Codex Alimentarius Commission, Joint FAO/WHO food standards programme, Codex committee on food additives and contaminants, Thirty-first session, The Hague, The Netherlands, 22 - 26 March 1999, CX/FAC 99/14, 1-9.
- Correia, M., Delerue-Matos, C., Alves, A. (2000): Multi-residue methodology for pesticide screening in wines. *Journal of chromatography A* 889: 59-67.
- Corsini, E, Sokooti, M, Galli, C.L, Moretto, A, Colosio, C. (2013): Pesticide induced immunotoxicity in humans: A comprehensive review of the existing evidence. *Toxicology* 307 123 -135.
- Čuš, F., Česnik, H. B., Velikonja Bolta, Š., Gregorčič, A. (2010a): Pesticide residues and microbiological quality of bottled wines. *Food control* 21: 150-154.
- Čuš, F., Česnik, H. B., Velikonja Bolta, Š., Gregorčič, A. (2010b): Pesticide residues in grapes and during vinification process. *Food control* 21: 1515-1518.
- Czerwiecki, L., Czajkowska, D., Witkowska-Gwiazdowska, A. (2002a): On ochratoxin A and fungal flora in Polish cereals from conventional and ecological farms. Part 1: Occurrence of ochratoxin A and fungi in cereals in 1997. *Food additives and contaminants* 19(5): 470-477.
- Czerwiecki, L., Czajkowska, D., Witkowska-Gwiazdowska, A. (2002b): On ochratoxin A and fungal flora in Polish cereals from conventional and ecological farms. Part 2: Occurrence of ochratoxin A and fungi in cereals in 1998. *Food additives and contaminants* 19(11): 1051-1057.
- De Cerain, A. L., Gonzáles-Peñas, E., Jiménez, A. M., Bello, J. (2002): Contribution to the study of ochratoxin A in Spanish wines. *Food additives and contaminants* 19(11): 1058-1064.
- De Jesus, C. L., Bartley, A., Welch, A. Z., Berry, J. P. (2018): High incidence levels of ochratoxin A in wines sourced from the United States. *Toxins* 10(1): 1-12.

- De Melo Abreu, S., Caboni, P., Cabras, P., Garau, V. L., Alves, A. (2006): Validation and global uncertainty of a liquid chromatographic with diode array detection method for the screening of azoxystrobin, krezoxim-methyl, trifloxystrobin, famoxadone, pyraclostrobin and fenamidone in grapes and wine. *Analytica chimica acta* 573-574: 291-297.
- Domijan, A-M., Peraica, M. (2005): Ochratoxin A in wine. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* 56: 17-20.
- Durguti, V., Georgieva, A., Angelov, A., Bajrami, Z. (2014): Quantitative determination of ochratoxin A in wine after clarification and filtration. *Croatian journal of food science technology* 6(2): 79-83.
- Durguti, V., Georgieva, A., Angelov, A., Bajrami, Z. (2015): Quantitative determination of ochratoxin A in must. *Agriculture and food* 3: 458-462.
- EC (2002): Community methods of sampling for the official control of pesticide residues in and on products of plant and animal origin and repealing Directive 79/700/EEC. Commission Directive 2002/63/EC, *Official Journal of the European Communities* L187/30: 1-14.
- EC (2005): Maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC. Commission Regulation EC No 396/2005, *Official Journal of the European Union*, L 70/1, 1-16.
- EC (2006): Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Commission Regulation EC No 1881/2006, *Official Journal of the European Union*, L 364/5: 1-20.
- EC (2013): Commission Regulation (EU) No 283/2013 of 1 March 2013 setting out the data requirements for active substances, in accordance with Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council concerning the placing of plant protection products on the market, *Official Journal of the European Union*, 2013, L 93/1.



- EC (2016): Guidance document on identification of mycotoxins in food and feed. SANTE/12089/2016: 1-4.
- EC (2017): Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed. SANTE/11813/2017: 1-46.
- EC (2018): EU Pesticides Database <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=homepage&language=EN/> 15.09.2018.
- EFSA (2006): Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a Request from the Commission related to ochratoxin A in food. Question N° EFSA-Q-2005-154. Adopted on 4 April 2006, The EFSA Journal 365. <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/365><http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/365>.
- EFSA (2012a): Guidance on selected default values to be used by the EFSA scientific committee, scientific panels and units in the absence of actual measured data; 2579 10(3): 1-32.
- EFSA (2012b): Guidance on the use of probabilistic methodology for modeling dietary exposure to pesticide residues 2839 10(10): 1-95.
- EFSA (2015): Revisiting the International Estimate of Short-Term Intake (IESTI equations) used to estimate the acute exposure to pesticide residues via food EFSA Supporting publication 2015: EN-907 1-81.
- EFSA (2017): The 2015 European Union report on pesticide residues in food. EFSA Journal 2017;15(4): 4791, pp. 134 <https://doi:10.2903/j.efsa.2017.4791>
- EFSA (2018): The 2016 European Union report on pesticide residues in food. EFSA Journal 2018; 16(7): 5348, pp. 139 <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5348>.
- Elmholt, S., Rasmussen, P. H. (2005): *Penicillium verrucosum* occurrence and ochratoxin A contents in organically cultivated grain with special reference to ancient wheat types and drying practice. Mycopatologia 159: 421-432.

- FAO (2000): Food safety and quality as affected by organic farming. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Presented at the Twenty second FAO regional conference for Europe, Porto, Portugal, 2000.
- FAO (2004): Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. Food and Nutrition (81): 1 – 183. <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/007/y5499f/y5499f00.pdf>
- FAO (2018): Pesticides use, <http://www.fao.org/faostat/en/#data/RP>, 15.09.2018.
- Fernandes, P. J., Barros, N., Câmara, J. S. (2013): A survey of the occurrence of ochratoxin A in Madeira based on a QuEChERS extraction procedure combined with liquid chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry. Food research international 54: 293-301.
- Fernández, M. J., Oliva, J., Barba, A., Cámara, M. A. (2005): Fungicide dissipation curves in winemaking processes with and without maceration step. Journal of agricultural and food chemistry 53: 804-811.
- Fernández-Alba, A. R., del Mar Gómez-Ramos, M., Goday, A., Murcia-Morales, M. (2018): Analytical challenges for the evaluation of pesticide residues in organic crops. Programme and book of abstracts of the 12<sup>th</sup> European pesticide residue workshop: Pesticides in food and drink. Munich, Germany, pp. 43-44.
- Fernández-Cruz, M. L., Mansilla, M. L., Tadeo, J. L. (2010): Mycotoxins in fruits and their processed products: Analysis, occurrence and health implications. Journal of advanced research 1: 113-122.
- Flajs, D., Domijan, A.-M., Ivić, D., Cvjetković, B., Peraica, M. (2009): ELISA and HPLC analysis of ochratoxin A in red wines of Croatia. Food control 20: 592-592.
- Flores, J. L., Díaz, A. M., de Córdova, M. L. F. (2007): Determination of azoxystrobin residues in grapes, musts and wines with a multicommuted flow-through optosensor implemented with photochemically induced fluorescence. Analytica chimica acta 585: 185-191.
- Flori, P., Brunelli, A. (1995): Residues of EBI fungicides on grapes, must and wine. Medicine faculty Landbouw Winkel University of Ghent 60(2b): 503-509.

- Franc, C., de Revel, G. (2018): Pesticide residues from grape to wine: monitoring during winemaking by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Programme and book of abstracts of the 12<sup>th</sup> European pesticide residue workshop: Pesticides in food and drink. Munich, Germany, pp. 56-57.
- Freire, L., Passamani, F. R. F., Thomas, A. B., de Cássia Mirela Resende Nassur, R., Silva, L. M., Paschoal, F. N., Pereira, G. E., Prado, G., Batista, L. R. (2017): Influence of physical and chemical characteristics of wine grapes on the incidence of *Penicillium* and *Aspergillus* fungi in grapes and ochratoxin A in wines. International journal of food microbiology 241: 181-190.
- Frisvad, J. C., Larsen, T. O., De Vries, R., Meijer, M., Houbraken, J., Cabañes, F. J., Samson, R. A. (2007): Secondary metabolite profiling, growth profiles and other tools for species recognition and important *Aspergillus* mycotoxins. Studies in Mycology 59: 31-37.
- Gambutì, A., Strollo, D., Genovese, A., Ugliano, M., Ritieni, A., Moio, L. (2005): Influence of enological practices on ochratoxin A concentration in wine. American journal of enology and viticulture 56(2): 155-162.
- Garau, V. L., De Melo Abreu, S., Caboni, P., Angioni, A., Alves, A., Cabras, P. (2009): Residue-free wines: fate of some quinone outside inhibitor (QoI) fungicides in the winemaking process. Journal of agricultural and food chemistry 57: 2329-2333.
- Garcia-Cazorla, J., Xirau-Vayreda, M. (1994): Persistence of dicarboximidic fungicide residues in grapes, must and wine. American journal of enology and viticulture 45(3): 338-340.
- Geisen, R., Schmidt-Heydt, M., Touhami, N., Himmelsbach, A. (2018): New aspects of ochratoxin A and citrinin biosynthesis in *Penicillium*. Current opinion in food science 23: 23-31.
- Gentile, F., la Torre, G. L., Potortì, A. G., Saitta, M., Alfa, M., Dugo, G. (2016): Organic wine safety: UPLC-FLD determination of ochratoxin A in Southern Italy wines from organic farming and winemaking. Food control 59: 20-26.

- Ghafari, Z., Ghahfarokhi, N.K., Rahimi, E. (2011): Presence of ochratoxin A in red and white grape juice commercialized in Iran. *American-Euroasian journal of toxicological sciences* 3(4): 228-230.
- Ghali, R., Hmaissia-khlifa, K., Ghorbel, H., Maaroufi, K., Hedili, A. (2008): Incidence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in tunisian foods. *Food control* 19: 921-924.
- Golge, O., Kabak, B. (2018): Pesticide residues in table grapes and exposure assessment. *Journal of agricultural and food chemistry* 66: 1701-1713.
- González-Rodríguez, R. M., Cancho-Grande, B., Torrado-Agrasar, A., Simal-Gándara, J., Mazaira-Pérez, J. (2009a): Evolution of tebuconazole residues through the winemaking process of Mencía grapes. *Food chemistry* 117: 529-537.
- González-Rodríguez, R.M., Cancho-Grande, B., Simal-Gándara, J. (2009b): Multiresidue determination of 11 new fungicides in grapes and wines by liquid-liquid extraction/clean-up and programmable temperature vaporization injection with analyte protectants/gas chromatography/ion trap mass spectrometry. *Journal of chromatography A* 1216: 6033-6042.
- González-Rodríguez, R. M., Cancho-Grande, B., Simal-Gándara, J. (2009c): Efficacy of new commercial formulations to control downy mildew and dissipation of their active fungicides in wine after good agricultural practices. *Journal of the science of food and agriculture* 89(15): 2625-2635.
- González-Rodríguez, R. M., Cancho-Grande, B., Simal-Gándara, J. (2011): Decay of fungicide residues during vinification of white grapes harvested after the application of some new active substances against downy mildew. *Food chemistry* 125: 549-560.
- Grazioli, B., Fumi, M.D., Silva, A. (2006): The role of processing on ochratoxin A content in Italian must and wine: A study on naturally contaminated grapes. *International journal of food microbiology* 111: S93-S96.
- Guo, T., Fang, P., Jiang, J., Feng, Z., Yong, W., Liu, J., Dong, Y. (2016): Rapid screening and quantification of residual pesticides and illegal adulterants in red

wine by direct analysis in real time mass spectrometry. *Journal of chromatography A* 1471: 27-33.

Gómez, C., Bragulat, M.R., Abarca, M.L., Mínguez, S., Cabañes, F.J. (2006): Ochratoxin A-producing fungi from grapes intended for liqueur wine production. *Food microbiology* 23: 541-545.

Haighton, L. A., Lynch, B. S., Magnuson ,B. A., Nestmann, E. R. (2012): A reassessment of risk associated with dietary intake of ochratoxin A based on a lifetime exposure model. *Critical reviews in toxicology* 42(2): 147-168.

Harcz, P., Tangni, E. K., Wilmart, O., Moons, E., van Peteghem, C., de Saeger, S., Schneider, Y.-J., Larondelle, Y., Pussemier, L. (2007): Intake of ochratoxin A and deoxynivalenol through beer consumption in Belgium. *Food additives and contaminants* 24(8): 910-916.

Hernández, M. J., García-Moreno, M. V., Durán, E., Guillén, D., Barosso, C. G. (2006): Validation of two analytical methods for the determination of ochratoxin A by reversed-phased high-liquid chromatography coupled to fluorescence detection in must and sweet wines from Andalusia. *Analytica chimica acta* 566: 117-121.

Hernández Hierro, J. M., Garcia-Villanova, R. J., Rodríguez Torrero, P., Toruño Fonseca, I. M. (2008): Aflatoksins and ochratoxin A in red paprika for retail sale in Spain: occurrence and evaluation of a simultaneous analytical method. *Journal of agricultural and food chemistry* 56: 751-756.

Hocking, A.D., Leong, S.-L., Kazi, B.A., Emmett, R.W., Scott, E.S. (2007): Fungi and mycotoxins in vineyards and grape products. *International journal of food microbiology* 119: 84-88.

IARC (2017): Agents Classified by the IARC Monographs, Volumes 1-118. International Agency for Research on Cancer, Lyon Cedex, France.

JECFA (2001): Safety evaluation of certain mycotoxins in food. WHO Food Additives Series 47. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, FAO Food and Nutrition Paper 74.

<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je04.htm><http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je04.htm>.

Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives [Internet], 2008. Ochratoxin A. in: Safety Evaluation of Certain Mycotoxins in Food. WHO Food Additives Series 59. <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v59je01>.

Jiménez, J. J., Bernal, J. L., del Nozal, M. J., Bernal, J., Toribio, L. (2007): Persistence and degradation of metalaxyl, lindane, fenvalerate and deltamethrin during the wine making process. *Food chemistry* 104: 216-223.

Jorgensen, K. (2005): Occurrence of ochratoxin A in commodities and processed food—a review of EU occurrence data. *Food additives and contaminants Supp. 1*: 26-30.

Juan, C., Lino, C.M., Pena, A., Moltó, J.C., Mañes, J., Silveira, I. (2007): Determination of ochratoxin A in maize bread samples by LC with fluorescence detection. *Talanta* 73: 246-250.

Juan, C., Moltó, J.C., Lino, C.M., Mañes, J. (2008): Determination of ochratoxin A in organic and non-organic cereals and cereal products from Spain and Portugal. *Food chemistry* 107(1): 525-530.

Kruve, A., Künnapas, A., Herodes, K., Leito, I. (2008): Matrix effects in pesticide multi-residue analysis by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of chromatography A* 1187: 58-66.

Kurtbay, H. M., Bekçi, Z., Merdivan, M., Yurdakoç, K. (2008): Reduction of ochratoxin A levels in red wine by bentonite, modified bentonites, and chitosan. *Journal of agricultural and food chemistry* 56: 2541-2545.

Kwon, H., Lehotay, S. J., Geis-Asteggiate, L. (2012): Variability of matrix effects in liquid and gas chromatography-mass spectrometry analysis of pesticide residues after QuEChERS sample preparation of different food crops. *Journal of chromatography A* 1270: 235- 245.

Lau, B. P.-Y., Scott, P. M., Lewis, D. A., Kanhere, S. R. (2000): Quantitative determination of ochratoxin A by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of mass spectrometry* 35: 23-32.

- Likas, D. T., Tsiropoulos, N. G., Miliadis, G. E. (2007): Rapid gas chromatographic method for the determination of famoxadone, trifloxystrobin and fenhexamid residues in tomato, grape and wine samples. *Journal of chromatography A* 1150: 208-214.
- Lindenmeir, M., Schieberle, P., Rychlik, M. (2004): Quantification of ochratoxin A in foods by a stable isotope dilution assay using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography A* 1023: 57-66.
- López, L. F., López, A. G., Riba, M. V. (1989): HPLC method for simultaneous determination of fungicides: carbendazim, metalaxyl, folpet and propiconazole in must and wine. *Journal of agricultural and food chemistry* 37: 684-687.
- Luo, Y., Liu, X., Li, J. (2018): Updating techniques on controlling mycotoxins - A review. *Food control* 89: 123-132.
- MacDonald, S., Wilson, P., Barnes, K., Damant, A., Massey, R., Mortby, E., Shepherd, M.J. (1999): Ochratoxin A in dried vine fruit: method development and survey. *Food additives and contaminants* 16(6): 253-260.
- Mariño-Repizo, L., Kero, F., Vandell, V., Senior, A., Sanz-Ferramola, M. I., Cerutti, S., Raba, J. (2015): A novel solid phase extraction-ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the quantification of ochratoxin in red wines. *Food chemistry* 172: 663-668.
- Martins, J., Esteves, C., Simões, T., Correia, M., Delerue-Matos, C. (2011): Determination of 24 pesticide residues in fortified wines by solid-phase microextraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry* 59: 6847-6855.
- Mateo, R., Medina, Á., Mateo, E. M., Mateo, F., Jiménez, M. (2007): An overview of ochratoxin A in beer and wine. *International journal of food microbiology* 119: 79-83.
- Medina, A., Valle-Algarra, F. M., Gimeno-Adelantado, J. V., Mateo, R., Mateo, F., Jiménez, M. (2006): New method for determination of ochratoxin A in beer using

zinc acetate and solid-phase extraction silica cartridges. *Journal of chromatography A* 1121: 178-183.

Miliadis, G. E., Tsiropoulos, N. G., Aplada-Sarlis, P. G. (1999): High performance liquid chromatographic determination of benzoylurea residues in grapes and wine using liquid and solid-phase extraction. *Journal of chromatography A* 835: 113-120.

Millán, S., Sampedro, M. C., Unceta, N., Goicolea, M. A., Rodríguez, E., Barrio, R. J. (2003): Coupling solid-phase microextraction and high-performance liquid chromatography for direct and sensitive determination of halogenated fungicides in wine. *Journal of chromatography A* 995: 135-142.

Mitchell, J. N., Chen, C., Palumbo, D. J., Bianchini, A., Cappozzo, J., Stratton, J., Ryu, D., Wu, F. (2017): A risk assessment of dietary Ochratoxin a in the United States. *Food chemistry and toxicology* 100: 265-273.

National Toxicology Program [Internet] (1989): Toxicology and Carcinogenesis Studies of Ochratoxin a (CAS No. 303-47-9) in F344/N Rats (Gavage Studies). NTP Technical Report Series No. 358. [https://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/lt\\_rpts/tr358.pdf](https://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/lt_rpts/tr358.pdf).

Navarro, S., Barba, A., Oliva, J., Navarro, G., Pardo, F. (1999): Evolution of residual levels of six pesticides during elaboration of red wines. Effect of wine-making procedures in their disappearance. *Journal of agricultural and food chemistry* 47(1): 264-270.

Navarro, S., Barba, A., Oliva, J., Navarro, G., Pardo, F. (2000): Evolution of residual levels of six pesticides during elaboration of red wines. Effect of wine-making procedures in their disappearance. *Journal of agricultural and food chemistry* 47: 264-270.

Navarro, S., Oliva, J., Navarro, G., Barba, A. (2001): Dissipation of chlorpyrifos, fenarimol, mancozeb, metalaxyl, penconazole and vinclozolin in grapes. *American journal of enology and viticulture* 52(1): 35-40.



- Nawaz, S., Garcia Lopez, M., Read, W., Macarthur, R., Lu, Y. (2018): Assessment of effectiveness and benefits of different calibration techniques for quantifying pesticide residues. Programme and book of abstracts of the 12<sup>th</sup> European pesticide residue workshop: Pesticides in food and drink. Munich, Germany, p. 64.
- OIV (2012): Measuring ochratoxin in wine after going through an immunoaffinity column and HPLC with fluorescence detection, Compendium of international methods of analysis, Ochratoxin A, International organization of vine and wine- OIV 2, Rue d'Aguesseau, 75008 Paris, pp. 1-12.
- Oliva, J., Navarro, S., Barba, A., Navarro, G. (1999): Determination of chlorpyrifos, penconazole, fenarimol, vinclozolin and metalaxyl in grapes, must and wine by on-line microextraction and gas chromatography. *Journal of chromatography A* 833: 43-51.
- Ostry, V., Rurich, J., Skarkova, J. (2002): Raisins, ochratoxin A and human health. *Mycotoxin research* 18(2): 178-182.
- Otero, R. R., Ruiz, C. Y., Grande, B. C., Gandara, J. S. (2002): Solid-phase microextraction-gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of the fungicides cyprodinil and fludioxonil in white wines. *Journal of chromatography A* 942(1-2): 41-52.
- Otero, R. R., Grande, B. C., Gándara, J. S. (2003): Multiresidue method for fourteen fungicides in white grapes by liquid-liquid and solid-phase extraction followed by liquid chromatography-diode array detection. *Journal of chromatography A* 992: 121-131.
- Ottender, H., Majerus, P. (2000): Occurrence of ochratoxin A (OTA) in wines: influence of the type of wine and its geographical origin. *Food additives and contaminants* 17(9): 793-798.
- Paíga, P., Morais, S., Oliva-Teles, T., Correia, M., Delerue-Matos, C., Durate, S. C., Pena, A., Lino, C. M. (2012): Extraction of ochratoxin A in bread samples by the QuEChERS methodology. *Food chemistry* 135: 2522-2528.

- Paoloni, A., Michele Solfrizzo, M., Bibi, R., Pecorelli, I. (2018): Development and validation of LC-MS/MS method for the determination of ochratoxin A and its metabolite ochratoxin  $\alpha$  in poultry tissues and eggs. *Journal of environmental science and health B* 0(0): 1-7.
- Paterson, R. R. M., Venâncio, A., Lima, N., Guilloux-Bénatier, M., Rousseaux, S. (2018): Predominant mycotoxins, mycotoxigenic fungi and climate change related to wine. *Food research international* 103: 478-491.
- Payá, P., Anastassiades, M., Mack, D., Sigalova, I., Tasdelen, B., Oliva, J., Barba, A. (2007): Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection. *Analytical and bioanalytical chemistry* 389: 1697-1714.
- Pelajić, M., Peček, G., Mutavdžić Pavlović, D., Vitali Čepo, D. (2016): Novel multiresidue method for determination of pesticides in red wine using gas chromatography-mass spectrometry and solid phase extraction. *Food chemistry* 200: 98-106.
- Pelegri, J.M., Velázquez, C., Sanchís, V., Canela, R. (1997): Solid phase extraction on SAX columns as an alternative for ochratoxin A analysis in maize. *Revista iberoamericana de micología* 14: 194-196.
- Peraica, M., Flajs, D., Domijan, A. M., Ivić, D., Cvjetković, B. (2010): Ochratoxin A contamination of food from Croatia. *Toxins* 2: 2098-2105.
- Perrone, G., Mule, G., Susca, A., Battilani, P., Pietri, A., & Logrieco, A. (2006): Ochratoxin A production and amplified fragment length polymorphism analysis of *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus tubingensis*, and *Aspergillus niger* strains isolated from grapes in Italy. *Applied and environmental microbiology* 72: 680-685.
- Petruzzi, L., Sinigaglia, M., Corbo, M. R., Campaniello, D., Speranza, B., Bevilacqua, A. (2014): Decontamination of ochratoxin A by yeasts: possible approaches and factors leading to toxin removal in wine. *Applied microbiology and biotechnology* 98: 6555-6567.

- Pfohl-Leszkwicz, A., Manderville, R. A. (2007): Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. *Molecular and nutritional food research* 51: 61-99.
- Pietri, A., Bertuzzi, T., Pallaroni, L., Piva, G. (2001): Occurrence of ochratoxin A in Italian wines. *Food additives and contaminants* 18(7): 647-654.
- Pizzutti, I. R., Vreuls, R. J. J., de Kok, A., Roehrs, R., Martel, S., Friggi, C. A., Zanella, R. (2009): Design of a compressed air modulator to be used in comprehensive multidimensional gas chromatography and its application in the determination of pesticide residues in grapes. *Journal of chromatography A* 1216: 3305-3311.
- Pizzutti, I. R., de Kok, A., Scholten, J., Righi, L. W., Cardoso, C. D., Rohers, G. N., de Silva, R. C. (2014): Development, optimization and validation of a multimethod for the determination of 36 mycotoxins in wines by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta* 129: 352-363.
- Plagge, J. (2018): Dealing with pesticide residues in organic as a process based quality and sustainability scheme. Programme and book of abstracts of the 12<sup>th</sup> European pesticide residue workshop: Pesticides in food and drink. Munich, Germany, pp. 40-42.
- Provosta, C., Pedneault, K. (2016): The organic vineyard as a balanced ecosystem: Improved organic grape management and impacts on wine quality. *Scientia horticulturae* 208: 43-56.
- Pussemier, L., Larondelle, Y., van Peteghem, C., Huughebaert, A. (2006): Chemical safety of conventionally and organically produced foodstuffs: a tentative comparison under Belgian conditions. *Food control* 17: 14-21.
- Quintela, S., Villarán, M. C., de Armentia, I. L., Elejalde, E. (2013): Ochratoxin A removal in wine: A review. *Food control* 30: 439-445.
- Ratola, N., Abede, E., Simões, T., Venâncio, A., Alves, A. (2005): Evolution of ochratoxin A content from must to wine in Port Wine microvinification. *Analytical and bioanalytical chemistry* 382: 405-411.

- Reich, H. (2018): EFSA PRIMo revision 3: an updated risk assessment tool for risk assessment of pesticide residues. Programme and book of abstracts of the 12<sup>th</sup> European pesticide residue workshop: Pesticides in food and drink. Munich, Germany, p. 35.
- Remiro, R., González-Peñas, E., Lizarraga, E., de Cerain, A. L. (2012): Quantification of ochratoxin A and five analogs in Navarra red wines. *Food control* 27: 139-145.
- Robinson, J. (2006): *Oxford Companion to Wine*. Oxford University Press, Oxford. pp.780.
- Rodríguez-Cabo, T., Rodríguez, I., Ramil, M., Cela, R. (2016): Liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry selective determination of ochratoxin A in wine. *Food chemistry* 199: 401-408.
- Roland, A., Bros, P., Bouisseau, A., Cavelier, F., Schneider, R. (2014): Analysis of ochratoxin A in grapes, must and wines by LC-MS/MS: first comparison of stable isotope dilution assay and diastereomeric dilution assay methods. *Analytica chimica acta* 818: 39-45.
- Rosa, C.A.R., Magnoli, C.E., Fraga, M.E., Dalcero, A.M., Santana, D.M.N. (2004): Occurrence of ochratoxin A in wine and grape juice marketed in Rio de Janeiro, Brazil. *Food additives and contaminants* 21: 358-364.
- Rosa C.A.R., Palacios V., Combina M., Fraga M.E., de Oliveira Rekson A., Magnoli C.E., Dalcero A.M. (2002): Potential ochratoxin A producers from wine grapes in Argentina and Brazil. *Food additives and contaminants* 19: 408-414.
- Rose, G., Lane, S., Jordan, R. (2009): The fate of fungicide and insecticide residues in Australian wine grape by-products following field application. *Food chemistry* 117: 634-640.
- Sáez, J. M., Medina, Á., Gimeno-Adelantado, J. V., Mateo, R., Jiménez, M. (2004): Comparison of different sample treatments for the analysis of ochratoxin A in must, wine and beer by liquid chromatography. *Journal of chromatography A* 1029: 125-133.

- Sala, C., Fort, F., Busto, O., Zamora F., Arola, L., Guasch J. (1996): Fate of some common pesticides during vinification process. *Journal of agricultural and food chemistry* 44(11): 3668-3671.
- Savastano, M. L., Losito, I., Pati, S. (2016): Rapid and automatable determination of ochratoxin A in wine based on microextraction by packed sorbent followed by HPLC-FLD. *Food control* 68: 391-398.
- Savocchia, S., Stummer, B. E., Wicks, T. J., van Heeswijck, R., Scott, E. S. (2004): Reduced sensitivity of *Uncinula necator* to sterol demethylation inhibiting fungicides in southern Australian vineyards. *Australian plant pathology* 33: 465-473.
- Serra, R., Lourenço, A., Alípio, P., Venâncio, A. (2006): Influence of the region of origin on the mycobiota of grapes with emphasis on *Aspergillus* and *Penicillium* species. *Mycological research* 110: 971-978.
- Shundo, L., de Almeida, A. P., Alaburda, J., Lamardo, L. C. A., Navas, S. A., Ruvieri, V., Sabino, M. (2009): Aflatoxins and ochratoxin A in Brazilian paprika. *Food control* 20: 1099-1102.
- Soleas, G. J., Yan, J., Hom, K., Goldberg, D. M. (2000): Multiresidue analysis of seventeen pesticides in wine by gas chromatography with mass-selective detection. *Journal of chromatography A* 882: 205-212.
- Solecki, R. (2018): Risk communication with a focus on pesticide residues. Programme and book of abstracts of the 12<sup>th</sup> European pesticide residue workshop: Pesticides in food and drink. Munich, Germany, pp. 31-32.
- Sorrenti, V., di Griacomo, C., Acquaviva, R., Barbagallo, I., Bognanno, M., Galvano, F. (2013): Toxicity of ochratoxin A and its modulation by antioxidants: a review. *Toxins* 5: 1742-1766.
- Soto, J. B., Ruiz, M.-J., Manyes, L., Juan-García, A. (2016): Blood, breast milk and urine: potential biomarkers of exposure and estimated daily intake of ochratoxin A: a review. *Food additives and contaminants: Part A* 33(2): 313 – 328.

- Soufleros, E.H., Tricard, C., Bouloumpasi, E.C. (2003): Occurrence of ocratoxin A in Greek wines. *Journal of the science of food and agriculture* 83: 173-179.
- Stiborová, M., Arlt, V.M., Schmeiser, H.H. (2016): Balkan endemic nephropathy: an update on its aetiology. *Archives of toxicology* 90(11): 2595-2615.
- Stoev, D.S. (2017): Balkan Endemic Nephropathy - Still continuing enigma, risk assessment and underestimated hazard of joint mycotoxin exposure of animals or humans. *Chemico-biological interaction* 261: 63-79.
- Sun, X., Niu, Y., Ma, T., Xu, P., Huang, W., Zhan, J. (2017): Determination, content and removal efficiency of fining agents on ocratoxin A in Chinese wines. *Food control* 73: 382-392.
- Tam, J., Pantazopoulos, P., Scott, P. M., Moisey, J., Dabeka, R. W., Richard, I. D. K. (2011): Application of isotope dilution mass spectrometry: determination of ocratoxin A in the Canadian total diet study. *Food additives and contaminants* 28(6): 754-761.
- Tao, Y., Xie, S., Xu, F., Liu, A., Wang, Y., Chen, D., Pan, Y., Huang, L., Peng, D., Wang, X., Yuan, Z. (2018): Ochratoxin A: Toxicity, oxidative stress and metabolism. *Food chemistry and toxicology* 112: 320-331.
- Teixeira, M. J., Aguiar, A., Alfonso, C. M. M., Alves, A., Bastos, M. M. S. M. (2004): Comparison of pesticides levels in grape skin and in the whole grape by a new liquid chromatographic multiresidue methodology. *Analytica chimica acta* 513: 330-340.
- Toscani, T., Moseriti, A., Dossena, A., Dall'Asta, C., Simoncini, N., Virgili, R. (2007): Determination of ochratoxin A in dry-cured meat products by a HPLC-FLD quantitative method. *Journal of chromatography B* 855: 242-248.
- Trösken, E. R., Bittner, N., Völkel, W. (2005): Quantitation of 13 azole fungicides in wine samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography A* 1083: 113-119.

- US EPA (2013): Federal Insecticide, Fungicide, and Rodenticide Act (FIFRA) Inspection Manual. U.S. Environmental Protection Agency, Washington DC, 2013.
- Valero, A., Marín, S., Ramos, A. J., Sanchis, V. (2005): Ochratoxin A-producing species in grapes and sun-dried grapes and their relation to ecophysiological factors. *Letters in applied microbiology* 41: 196-201.
- Valero, A., Marín, S., Ramos, A. J., Sanchis, V. (2008): Survey: Ochratoxin A in European special wines. *Food chemistry* 108: 593-599.
- van der Schee, H. A., Kaandorp, B., Feenstra, A., Krol, J. W. (2018): Official control of organic products in the Netherlands-Roles and results. Programme and book of abstracts of the 12<sup>th</sup> European pesticide residue workshop: Pesticides in food and drink. Munich, Germany, pp. 48-49.
- Var, I., Kabak, B., Erginkaya, Z. (2008): Reduction in ochratoxin A levels in white wine, following treatment with activated carbon and sodium bentonite. *Food control* 19(6): 592-598.
- Varelis, P., Leong, S-L. L., Hocking, A., Giannikopoulos, G. (2006): Quantitative analysis of ochratoxin A in wine and beer using solid phase extraction and high performance liquid chromatography-fluorescence detection. *Food additives and contaminants* 23(12): 1308-1315.
- Varga, J., Kozakiewicz, Z. (2006): Ochratoxin A in grapes and grape-derived products. *Trends in food science and technology* 17: 72-81.
- Venkateswarlu, P., Mohan, K. R., Kumar, Ch. R., Seshaiyah, K. (2007): Monitoring of multi-class pesticide residues in fresh grape samples using liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry. *Food chemistry* 105: 1760-1766.
- Vitali, M., Guidotti, M., Giovanazzo, R., Cedrone, O. (1998): Determination of pesticide residues in wine by SPME and GC/MS for consumer risk assessment. *Food additives and contaminants* 15(3): 280-287.

- Von Kietzell, J. (2018): EU audits on pesticide residue controls in organic production. Programme and book of abstracts of the 12<sup>th</sup> European pesticide residue workshop: Pesticides in food and drink. Munich, Germany, p. 42.
- Wei, D., Wu, X., Xu, J., Dong, F., Liu, X., Zheng, Y., Ji, M. (2018): Determination of ochratoxin A contamination in grapes, processed grape products and animal-derived products using ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry system. *Scientific reports* 8(2051): 1-8.
- Yang, S., Zhang, H., de Saeger, S., de Boevre, M., Sun, F., Zhang, S., Cao, X., Wan, Z. (2015): In vitro and in vivo metabolism of ochratoxin A: A comparative study using ultra-performance liquid chromatography-quadrupole/time-of-flight hybrid mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry* 407(13): 3579-3589.
- Yang, X., Zhang, H., Liu, Y., Wang, J., Zhang, Y. C., Dong, A. J., Zhao, H. T., Sun, C. H., Cui, J. (2011): Multiresidue method for determination of 88 pesticides in berry fruits using solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry: determination of 88 pesticides in berries using SPE and GC-MS. *Food chemistry* 127: 855-865.
- Yonga, W., Guob, T., Fangb, P., Liub, J., Dongb, Y., Zhang, F. (2017): Direct determination of multi-pesticides in wine by ambient mass spectrometry. *International journal of mass spectrometry* 417: 53-57.
- Zhang, H., Apaliya, M. T., Mahunu, G. K., Chen, L., Li W. (2016): Control of ochratoxin A-producing fungi in grape berry by microbial antagonists: A review. *Trends in food science and technology* 51: 88-97.
- Zhang, K., Wong, J. W., Hayward, D. G., Sheladia, P., Krynitsky, A. J., Schenck, F. J., Webster, M. G., Ammann, J. A., Ebeler, S. E. (2009): Multiresidue pesticide analysis of wines by dispersive solid-phase extraction and ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry* 57: 4019-4029.
- Zimmerli, B., Dick, R. (1996): Ochratoxin A in table wine and grape-juice: Occurrence and risk assessment. *Food additives and contaminants* 13(6): 655-668.



- Иванишевић, Д., Јакшић, Д., Кораћ, Н. (2015): Виноградарски атлас. Попис пољопривреде 2012. Пољопривреда у Републици Србији. Републички завод за статистику. Република Србија, Београд.
- Ивановић, М., Ивановић, М. (2017): Болести воћака и винове лозе. Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет, Београд.
- Ипсос (2014): Истраживање здравља становника Републике Србије 2013. година - Извештај. Ипсос. 2014, Београд.
- Билтен (2017): Анкета о потрошњи домаћинства, 2016. Билтен 627. Републички завод за статистику, Република Србија, Београд.
- Вуковић, Г. Љ., Павловић, С. Ђ., Ристић, М. С. (2009): Comparison of the two sample preparation procedures for HPLC determination of ochratoxin A. Archives of biological sciences 61(4): 639-644.
- Друштво за заштиту биља (2018): Пестициди у пољопривреди и шумарству у Србији. Друштво за заштиту биља. Београд, Осамнаесто, измењено и допуњено издање: 499-504.
- Кораћ, Н., Циндрић, П., Медић, М., Иванишевић, Д. (2016): Воћарство и виноградарство (део виноградарство). Универзитет у Новом Саду, Пољопривредни факултет, Нови Сад.
- Милићевић, Д., Јурић, В., Стефановић, С., Јовановић, М. Јанковић, С. (2008): Survey of slaughtered pigs for occurrence of ochratoxin A and porcine nephropathy in Serbia. International journal of molecular sciences 9: 2169-2183.
- Службени гласник РС (2010): Правилник о максимално дозвољеним количинама остатака средстава за заштиту биља у храни и храни за животиње и о храни и храни за животиње за коју се утврђују максималне количине остатака средстава за заштиту биља, Службени гласник РС бр. 25/2010.
- Службени гласник РС (2014а): Правилник о измени Правилника о максимално дозвољеним количинама остатака средстава за заштиту биља у храни и храни за животиње и о храни и храни за животиње за коју се утврђују

максималне количине остатака средстава за заштиту биља, Службени гласник РС бр. 29/2014.

Службени гласник РС (2014б): Правилник о измени Правилника о максимално дозвољеним количинама остатака средстава за заштиту биља у храни и храни за животиње и о храни и храни за животиње за коју се утврђују максималне количине остатака средстава за заштиту биља, Службени гласник РС бр. 39/2014.

Службени гласник РС (2018): Правилник о максимално дозвољеним количинама остатака средстава за заштиту биља у храни и храни за животиње и о храни и храни за животиње за коју се утврђују максималне количине остатака средстава за заштиту биља, Службени гласник РС бр. 22/2018.

Спасић, Р. (2016): Пестициди у пољопривреди и шумарству у Србији. Друштво за заштиту биља. Београд, Осамнаесто, измењено и допуњено издање: 502-507.

Шовљански, Р., Лазић, С. (2007): Основи фитофармације. Универзитет у Новом Саду, Пољопривредни факултет, Нови Сад.

## ПРИЛОЗИ

Прилог 1. Припрема основног микс раствора активних супстанци пестицида

Активне супстанце	концентрација основног стандарда $C_{ос.стд} (mg/ml)$	одмерена запремина основног стандарда $V_{ос.стд} (\mu l)/10 ml$	концентрација стандарда у основном миксу $C_{ос.мик.стд} (\mu g/ml)$
азоксистробин	1,38	72,4	10
беналаксил	2	49,9	10
боскалид	2,1	47,6	10
бупрофезин	1,25	80	10
диметоморф	0,85	117,2	10
дитианон	1,11	90,2	10
дифеноконзол	0,98	101,7	10
зоксамид	1,05	95	10
ипроваликарб	1,01	99	10
ипродион	0,93	107,8	10
квиноксифен	1,38	72,5	10
крезоксим-метил	1,003	99,7	10
мандипропамид	1,62	61,7	10
металаксил	2,64	38	10
метоксифенозид	1,12	89,3	10
миклобутанил	1,25	80	10
пенконазол	1	100	10
пираклостробин	0,93	107,3	10
пиридабен	1,08	92,6	10
пириметанил	1,53	65,2	10
пропиконазол	1,01	99	10
спиродиклофен	1,18	84,7	10
спироксамин	1,28	78,1	10
тебуконазол	1,07	93,5	10
тебуфенпирад	1,09	91,7	10
толифлуанид	0,97	102,9	10
триадименол	1,01	99	10
трифлумизол	1,04	95,8	10
фамоксадон	1,08	92,3	10
фенамидон	1,1	91,2	10
фенпироксамат	1	100	10
фенхексимид	1,06	94,3	10
фипронил	0,98	101,7	10
флуазинам	0,99	101	10
флудиоксонил	1,11	90,2	10
флуквинконазол	1,17	85,5	10
флутриафол	0,97	103	10
хекситиазокс	1,05	95,2	10
хлорантранилипирол	1,12	89,3	10
цимоксанил	1,01	98,7	10
ципродинил	1,003	99,7	10

Прилог 2. Поновљивост ретенционих времена активних супстанци пестицида

Активна супстанца	Поновљивост $t_R$ на нивоу 0,05 $\mu\text{g/ml}$						
	I	II	III	IV	V	$Rt_{\text{cp.вр}}$ (min)	STDEV
азоксистробин	14,164	14,172	14,165	14,165	14,163	14,166	0,004
беналаксил	16,182	16,187	16,185	16,184	16,179	16,183	0,003
боскалід	14,528	14,536	14,532	14,531	14,528	14,531	0,003
бупрофезин	17,124	17,124	17,12	17,12	17,119	17,121	0,002
карбофуран d3	11,42	11,431	11,427	11,427	11,425	11,426	0,004
хлорантранилипрол	13,768	13,777	13,77	13,769	13,769	13,771	0,004
цимоксанил	9,006	9,023	9,021	9,021	9,016	9,017	0,007
ципродинил	14,232	14,241	14,234	14,234	14,231	14,234	0,004
дифенокназол	16,849	16,852	16,849	16,85	16,844	16,849	0,003
диметоморф	14,72	14,725	14,719	14,718	14,713	14,719	0,004
дитианон	14,79	14,785	14,784	14,783	14,771	14,783	0,007
фамоксадон	16,414	16,418	16,414	16,414	16,406	16,413	0,004
фенамидон	14,329	14,337	14,327	14,325	14,329	14,329	0,005
фенхексамид	15,267	15,279	15,274	15,268	15,265	15,271	0,006
фенпироксимат	20,049	20,067	20,062	20,068	20,009	20,051	0,025
фипронил	15,847	15,869	15,869	15,867	15,865	15,863	0,009
флуазинам	18,359	18,353	18,355	18,348	18,339	18,351	0,008
флудиоксонил	14,590	14,586	14,613	14,583	14,578	14,59	0,014
флуквинконазол	15,217	15,227	15,229	15,221	15,212	15,221	0,007
флутриафол	13,045	13,053	13,049	13,047	13,046	13,048	0,003
хекситиазокс	18,68	18,684	18,684	18,681	18,674	18,681	0,004
ипродион	16,368	16,375	16,369	16,367	16,366	16,369	0,004
ипроваликарб	15,135	15,138	15,135	15,132	15,127	15,133	0,004
крезоксим метил	15,941	15,946	15,944	15,941	15,937	15,942	0,003
мандипропамид	14,626	14,633	14,628	14,626	14,623	14,627	0,004
металаксил	13,129	13,136	13,132	13,13	13,128	13,131	0,003
метоксифенозид	14,783	14,787	14,782	14,781	14,778	14,782	0,003
миклобутанил	14,957	14,969	14,959	14,956	14,954	14,959	0,006
пенконазол	16,042	16,047	16,045	16,042	16,037	16,043	0,004
пропиконазол	16,243	16,248	16,146	16,243	16,241	16,224	0,044
пираклостробин	16,482	16,487	16,485	16,484	16,482	16,484	0,002
пиридабен	21,474	21,478	21,482	21,48	21,451	21,473	0,013
пириметанил	11,993	12,003	11,998	11,999	11,995	11,998	0,004
квиноксифен	18,259	18,266	18,265	18,259	18,255	18,261	0,005
спиродиклофен	20,121	20,127	20,129	20,121	20,108	20,121	0,008
спироксамин	13,941	13,949	13,941	13,94	13,939	13,942	0,004
тебуконазол	15,884	15,889	15,887	15,884	15,881	15,885	0,003
тебуфенпирад	17,787	17,789	17,789	17,787	17,785	17,787	0,002
толифлуанид	16,033	16,038	16,035	16,033	16,031	16,034	0,003
триадименол	15,145	15,152	15,149	15,145	15,141	15,146	0,004
трифлумизол	16,991	17,002	16,977	16,981	16,985	16,987	0,01
зоксамид	16,238	16,246	16,245	16,24	16,239	16,242	0,004

Прилог 3. Једначине калибрационих кривих и коефицијенти корелације у црном и белом грожђу

Активна супстанца	Мобилна фаза	Калибрација у матриксу за црно грожђе	Калибрација методом стандардног додатка за црно грожђе	Калибрација у матриксу за бело грожђе	Калибрација методом стандардног додатка за бело грожђе
азоксистробин	$y=5,528*x-0,101,$ $R^2=0,998$	$y=0,4554*x^2+4,079*x+0,0849,$ $R^2=0,999$	$y=4,722*x-0,0489,$ $R^2=0,994$	$y=8,121*x+1,1297, R^2=0,982$	$y=8,908*x+0,6496,$ $R^2=0,992$
беналаксил	$y=1,178*x-0,0299,$ $R^2=0,998$	$y=0,589*x+0,0275, R^2=0,997$	$y=0,578*x-0,0227,$ $R^2=0,997$	$y=1,967*x-0,1062, R^2=0,998$	$y=1,541*x-0,0468,$ $R^2=0,988$
боскалид	$y=0,372*x-0,0042,$ $R^2=0,996$	$y=0,0212*x^2+0,243*x+0,0094,$ $R^2=0,999$	$y=0,2473*x+0,0037,$ $R^2=0,987$	$y=0,227*x+0,0399, R^2=0,995$	$y=0,264*x+0,0285,$ $R^2=0,999$
бупрофезин	$y=27,714*x-0,516,$ $R^2=0,998$	$y=29,901*x-0,0464, R^2=0,999$	$y=29,433*x-0,5755,$ $R^2=0,997$	$y=18,421*x+1,3402, R^2=0,993$	$y=16,927*x+0,6396,$ $R^2=0,995$
диметоморф	$y=0,352*x-0,0146,$ $R^2=0,996$	$y=0,3299*x+6,737E-004,$ $R^2=0,999$	$y=0,3702*x-0,0079,$ $R^2=0,995$	$y=0,473*x-0,0016, R^2=0,996$	$y=0,453*x-0,0086,$ $R^2=0,993$
дитианон	$y=0,726*x+0,031,$ $R^2=0,999$	$y=0,0353*x^2+0,403*x+0,0060,$ $R^2=0,997$	$y=0,0026*x+0,0047,$ $R^2=0,970$	$y=0,015*x^2+0,086*x+5,41E-004, R^2=0,997$	$y=2,112*x+0,0014,$ $R^2=0,977$
дифеноконазол	$y=2,187*x-0,315,$ $R^2=0,997$	$y=2,223*x+2,2164, R^2=0,998$	$y=0,985*x+2,3148,$ $R^2=0,987$	$y=0,419*x+3,5546, R^2=0,998$	$y=0,210*x+2,6356,$ $R^2=0,990$
зоксамид	$y=0,8009*x-0,0214,$ $R^2=0,999$	$y=0,0373*x^2+0,307*x+0,0034,$ $R^2=0,999$	$y=0,312*x-0,0067,$ $R^2=0,991$	$y=0,792*x-0,0221, R^2=0,998$	$y=0,676*x-0,0153,$ $R^2=0,990$
ипроваликарб	$y=2,166*x-0,120,$ $R^2=0,998$	$y=1,401*x+0,145, R^2=0,998$	$y=1,3057*x+0,0489,$ $R^2=0,996$	$y=0,919*x-0,0085, R^2=0,995$	$y=0,871*x-0,0036,$ $R^2=0,995$
ипродион	$y=0,311*x-0,0065,$ $R^2=0,996$	$y=0,1203*x+0,0063, R^2=0,995$	$y=0,122*x-0,0062,$ $R^2=0,994$	$y=0,221*x+0,1568, R^2=0,999$	$y=0,250*x+0,0851,$ $R^2=0,994$
квиноксифен	$y=1,926*x-0,0448,$	$y=0,171*x^2+0,995*x+0,0080,$	$y=0,979*x+0,0099,$	$y=1,541*x+0,3277, R^2=0,997$	$y=2,242*x+0,2209,$

Активна супстанца	Мобилна фаза	Калибрација у матриксу за црно грожђе	Калибрација методом стандардног додатка за црно грожђе	Калибрација у матриксу за бело грожђе	Калибрација методом стандардног додатка за бело грожђе
	$R^2=0,998$	$R^2=0,998$	$R^2=0,982$		$R^2=0,999$
крезоксим метил	$y=0,384*x-0,0076,$ $R^2=0,998$	$y=0,0220*x^2+0,228*x+0,0133,$ $R^2=0,999$	$y=0,234*x+0,0136,$ $R^2=0,993$	$y=0,363*x+0,1312, R^2=0,992$	$y=0,394*x+0,0747,$ $R^2=0,994$
мандипропамид	$y=0,954*x-0,044,$ $R^2=0,998$	$y=0,667*x+0,0187, R^2=0,999$	$y=0,6171*x-0,0228,$ $R^2=0,998$	$y=1,373*x+0,0176, R^2=0,992$	$y=1,461*x-0,0379,$ $R^2=0,994$
металаксил	$y=2,529*x+0,0263,$ $R^2=0,998$	$y=0,1633*x^2+1,972*x+0,0645,$ $R^2=0,999$	$y=2,0953*x+0,0385,$ $R^2=0,998$	$y=0,960*x+0,5737, R^2=0,993$	$y=1,073*x+0,3263,$ $R^2=0,999$
метоксифенозид	$y=2,443*x-0,069,$ $R^2=0,997$	$y=1,190*x+0,180, R^2=0,996$	$y=1,232*x-0,0518,$ $R^2=0,992$	$y=1,341*x-0,1554, R^2=0,997$	$y=0,841*x+0,0097,$ $R^2=0,995$
миклобутанил	$y=2,611*x-0,111,$ $R^2=0,997$	$y=2,803*x+0,175, R^2=0,998$	$y=2,349*x-0,0823,$ $R^2=0,994$	$y=0,331*x+0,0965, R^2=0,999$	$y=0,296*x+0,1210,$ $R^2=0,986$
пенконазол	$y=4,136*x-0,167,$ $R^2=0,998$	$y=0,4088*x^2+4,409*x+0,0223,$ $R^2=0,999$	$y=5,177*x-0,0200,$ $R^2=0,998$	$y=1,337*x+0,0129, R^2=0,993$	$y=1,604*x-0,0285,$ $R^2=0,994$
пираклостробин	$y=2,5098*x-0,1179,$ $R^2=0,999$	$y=0,143*x^2+0,968*x+0,0606,$ $R^2=0,999$	$y=0,974*x+0,0518,$ $R^2=0,991$	$y=2,725*x+0,4241, R^2=0,996$	$y=2,317*x+0,3234,$ $R^2=0,995$
пиридабен	$y=1,5097*x-0,0228,$ $R^2=0,998$	$y=0,1256*x^2+0,380*x+0,0177,$ $R^2=0,999$	$y=0,355*x-6,873E-004,$ $R^2=0,979$	$y=2,946*x-0,1507, R^2=0,997$	$y=3,071*x-0,0208,$ $R^2=0,998$
пириметанил	$y=1,504*x-0,0416,$ $R^2=0,998$	$y=0,1428*x^2+1,556*x+0,0186,$ $R^2=0,999$	$y=1,778*x-0,0289,$ $R^2=0,991$	$y=2,144*x+3,4669, R^2=0,998$	$y=1,728*x+1,7749,$ $R^2=0,998$
пропиконазол	$y=1,541*x-0,0142,$ $R^2=0,998$	$y=1,559*x+0,124, R^2=0,998$	$y=1,439*x+0,0314,$ $R^2=0,997$	$y=0,615*x+5,3091, R^2=0,999$	$y=0,651*x+6,2850,$ $R^2=0,949$
спиродиклофен	$y=0,472*x-0,0189,$	$y=0,0364*x^2+0,207*x+0,0185,$	$y=0,190*x+0,0093,$	$y=0,332*x+0,0141, R^2=0,998$	$y=0,321*x+0,0143,$

Активна супстанца	Мобилна фаза	Калибрација у матриксу за црно грожђе	Калибрација методом стандардног додатка за црно грожђе	Калибрација у матриксу за бело грожђе	Калибрација методом стандардног додатка за бело грожђе
	$R^2=0,997$	$R^2=0,999$	$R^2=0,992$		$R^2=0,999$
спироксамин	$y=27,924*x-0,469,$ $R^2=0,998$	$y=30,704*x+0,493, R^2=0,998$	$y=29,555*x-0,3615,$ $R^2=0,999$	$y=26,232*x+2,8728, R^2=0,993$	$y=21,405*x+0,8314,$ $R^2=0,998$
тебуконазол	$y=0,934*x-0,105,$ $R^2=0,986$	$y=0,489*x+0,1150, R^2=0,987$	$y=0,467*x-0,0117,$ $R^2=0,991$	$y=0,540*x+0,1922, R^2=0,995$	$y=0,115*x+1,4308,$ $R^2=0,966$
тебуфенпирад	$y=0,283*x-5,189E-004, R^2=0,998$	$y=0,0165*x^2+0,215*x+0,015,$ $R^2=0,999$	$y=0,199*x+0,0209,$ $R^2=0,991$	$y=0,209*x+0,0042, R^2=0,996$	$y=0,238*x+0,0115,$ $R^2=0,999$
толифлуанид	$y=0,140*x-0,0039,$ $R^2=0,998$	$y=0,0099*x^2+0,108*x+0,0017,$ $R^2=0,999$	$y=0,0989*x-0,0025,$ $R^2=0,990$	$y=0,066*x-0,0026, R^2=0,999$	$y=0,052*x+0,0038,$ $R^2=0,985$
триадименол	$y=2,611*x-0,070,$ $R^2=0,998$	$y=0,2334*x^2+2,914*x+0,0444,$ $R^2=0,999$	$y=3,232*x-0,0393,$ $R^2=0,998$	$y=0,304*x+0,0014, R^2=0,997$	$y=0,364*x-0,0117,$ $R^2=0,992$
трифлумизол	$y=5,999*x-0,2022,$ $R^2=0,996$	$y=0,4665*x^2+2,961*x+0,1027,$ $R^2=0,999$	$y=4,082*x+0,2720,$ $R^2=0,983$	$y=1,191*x-0,1191, R^2=0,997$	$y=2,250*x+0,0886,$ $R^2=0,996$
фамоксадон	$y=0,142*x-0,0056,$ $R^2=0,998$	$y=0,0373*x-0,0023, R^2=0,997$	$y=0,0177*x+0,0021,$ $R^2=0,973$	$y=0,023*x+0,0028, R^2=0,990$	$y=0,020*x+0,0046,$ $R^2=0,966$
фенамидон	$y=4,248*x-0,0309,$ $R^2=0,998$	$y=0,4998*x^2+3,976*x+0,0530,$ $R^2=0,999$	$y=4,7197*x-0,0631,$ $R^2=0,997$	$y=3,116*x-0,0036, R^2=0,993$	$y=3,991*x-0,1371,$ $R^2=0,991$
фенпироксимат	$y=6,183*x-0,146,$ $R^2=0,997$	$y=0,7545*x^2+4,582*x+0,0744,$ $R^2=0,999$	$y=4,332*x-0,0760,$ $R^2=0,992$	$y=5,391*x-0,2415, R^2=0,997$	$y=7,927*x-0,1092,$ $R^2=0,997$
фенхексамид	$y=0,290*x-0,0064,$ $R^2=0,997$	$y=0,0116*x^2+0,123*x+0,0030,$ $R^2=0,999$	$y=0,0947*x-0,0029,$ $R^2=0,976$	$y=0,115*x-7,74E-004,$ $R^2=0,997$	$y=0,090*x+0,0023,$ $R^2=0,996$
фипронил	$y=0,830*x+0,011,$	$y=0,7759*x-0,0020, R^2=0,999$	$y=0,833*x-0,0187,$	$y=-0,047*x^2+0,65*x-0,023,$	$y=0,385*x-0,0051,$

Активна супстанца	Мобилна фаза	Калибрација у матриксу за црно грожђе	Калибрација методом стандардног додатка за црно грожђе	Калибрација у матриксу за бело грожђе	Калибрација методом стандардног додатка за бело грожђе
	$R^2=0,999$		$R^2=0,996$	$R^2=0,998$	$R^2=0,996$
флуазинам	$y=1,639*x+0,103,$ $R^2=0,998$	$y=0,171*x^2+0,755*x+0,1203,$ $R^2=0,999$	$y=0,893*x+0,0613,$ $R^2=0,985$	$y=0,418*x+0,0071, R^2=0,998$	$y=0,161*x+0,0131,$ $R^2=0,986$
флудиоксонил	$y=0,150*x+0,0082,$ $R^2=0,999$	$y=0,0068*x^2+0,084*x+0,0048,$ $R^2=0,999$	$y=0,0847*x+0,0027,$ $R^2=0,996$	$y=-0,003*x^2+0,061*x-9,02E-004, R^2=0,998$	$y=0,031*x+4,86E-004,$ $R^2=0,991$
флуквинконазол	$y=0,144*x-0,0054,$ $R^2=0,989$	$y=0,0751*x+0,0050, R^2=0,985$	$y=0,1017*x-0,0087,$ $R^2=0,941$	$y=0,007*x+7,92E-004,$ $R^2=0,990$	$y=0,007*x+0,0013,$ $R^2=0,996$
флутриафол	$y=3,484*x-0,0772,$ $R^2=0,998$	$y=0,3831*x^2+3,809*x+0,0564,$ $R^2=0,999$	$y=4,232*x+0,0440,$ $R^2=0,998$	$y=1,187*x-0,0228, R^2=0,995$	$y=1,459*x-0,0418,$ $R^2=0,995$
хекситиазокс	$y=0,239*x-0,0067,$ $R^2=0,998$	$y=0,0203*x^2+0,106*x+0,0023,$ $R^2=0,999$	$y=0,101*x+0,0017,$ $R^2=0,986$	$y=0,382*x-0,0089, R^2=0,997$	$y=0,433*x-0,0078,$ $R^2=0,997$
хлорантранилипрол	$y=0,284*x-0,0046,$ $R^2=0,998$	$y=0,0289*x^2+0,229*x+0,0049,$ $R^2=0,999$	$y=0,2053*x+0,0135,$ $R^2=0,994$	$y=0,257*x+0,0053, R^2=0,994$	$y=0,318*x-0,0049,$ $R^2=0,994$
цимоксанил	$y=0,0932*x-0,00225,$ $R^2=0,998$	$y=0,0105*x^2+0,089*x+0,0020,$ $R^2=0,999$	$y=0,115*x-5,485E-004,$ $R^2=0,990$	$y=0,0309*x+0,0109, R^2=0,996$	$y=0,033*x+0,0074,$ $R^2=0,997$
ципродинил	$y=2,895*x-0,261,$ $R^2=0,998$	$y=0,1982*x^2+2,492*x+0,2702,$ $R^2=0,999$	$y=2,635*x-0,2213,$ $R^2=0,994$	$y=1,185*x+2,568, R^2=0,996$	$y=0,712*x+1,5048,$ $R^2=0,991$



Прилог 4. Једначине калибрационих кривих и коефицијенти корелације у црвеном и белом вину

Активна супстанца	Мобилна фаза	Калибрација у матриксу за црвено вино	Калибрација методом стандардног додатка за црвено вино	Калибрација у матриксу за бело вино	Калибрација методом стандардног додатка за бело вино
азоксистробин	$y=0,0079*x^2+7,033*x+0,3235$ , $R^2=0,997$	$y=-0,427*x^2+10,831*x-0,4775$ , $R^2=0,994$	$y=7,637*x-0,2986$ , $R^2=0,997$	$y=-0,311*x^2+7,733*x-0,1558$ , $R^2=0,999$	$y=6,313*x+0,0356$ , $R^2=0,975$
беналаксил	$y=0,062*x-0,0030$ , $R^2=0,972$	$y=0,013*x^2+0,391*x-0,0370$ , $R^2=0,999$	$y=0,094*x-0,0016$ , $R^2=0,995$	$y=0,093*x-0,0061$ , $R^2=0,983$	$y=0,050*x^2+0,007*x+0,0028$ , $R^2=0,971$
боскалид	$y=0,0026*x^2+0,022*x+0,0029$ , $R^2=0,996$	$y=-0,003*x^2+0,133*x+0,0061$ , $R^2=0,982$	$y=0,066*x+0,0029$ , $R^2=0,988$	$y=0,083*x+0,0026$ , $R^2=0,998$	$y=0,038*x^2+0,018*x+0,0066$ , $R^2=0,962$
бупрофезин	$y=9,186*x-0,3094$ , $R^2=0,996$	$y=-0,168*x^2+10,129*x-0,3967$ , $R^2=0,994$	$y=8,744*x+0,2767$ , $R^2=0,996$	$y=32,249*x-0,200$ , $R^2=0,999$	$y=16,630*x^2+15,309*x+1,083$ , $R^2=0,992$
диметоморф	$y=0,0082*x^2+0,064*x-1,62E-004$ , $R^2=0,998$	$y=0,002*x^2+0,170*x+0,0015$ , $R^2=0,997$	$y=0,106*x-3,57E-004$ , $R^2=0,992$	$y=0,004*x^2+0,11999*x+4,58E-004$ , $R^2=0,999$	$y=0,037*x^2+0,063*x-7,26E-004$ , $R^2=0,991$
дитианон	$y=0,223*x+0,1278$ , $R^2=0,908$	$y=0,305*x-0,0165$ , $R^2=0,994$	$y=-3,37E-004*x^2+0,002*x+2,92E-004$ , $R^2=0,942$	$y=0,036*x^2+0,362*x-0,0044$ , $R^2=0,999$	$y=0,005*x^2-0,002*x+8,33E-004$ , $R^2=0,993$
дифеноконазол	$y=0,369*x+0,1897$ , $R^2=0,973$	$y=-0,038*x^2+0,729*x+0,1911$ , $R^2=0,995$	$y=0,393*x+0,1915$ , $R^2=0,962$	$y=0,008*x^2+0,436*x+4,345$ , $R^2=0,996$	$y=0,289*x^2+0,211*x+0,1446$ , $R^2=0,992$
зоксамид	$y=0,120*x-0,0152$ , $R^2=0,982$	$y=0,258*x+0,00999$ , $R^2=0,989$	$y=0,137*x-0,0012$ , $R^2=0,985$	$y=0,004*x^2+0,026*x+0,0053$ , $R^2=0,999$	$y=0,318*x-0,0049$ , $R^2=0,1018$
ипроваликаרב	$y=0,065*x^2+0,555*x+0,0061$ , $R^2=0,998$	$y=-0,012*x^2+1,095*x+0,1182$ , $R^2=0,989$	$y=0,903*x-0,0065$ , $R^2=0,986$	$y=0,863*x-0,0056$ , $R^2=0,996$	$y=0,2399*x^2+0,357*x+0,0235$ , $R^2=0,989$

Активна супстанца	Мобилна фаза	Калибрација у матриксу за црвено вино	Калибрација методом стандардног додатка за црвено вино	Калибрација у матриксу за бело вино	Калибрација методом стандардног додатка за бело вино
		$R^2=0,981$			
ипродион	$y=0,001*x-1,51E-004,$ $R^2=0,969$	$y=-0,002*x+9,14E-004,$ $R^2=0,904$	$y=0,002*x-1,00E-005,$ $R^2=0,971$	$y=0,0014*x+9,88E-004,$ $R^2=0,986$	$y=0,002*x+1,30E-004,$ $R^2=0,962$
квиноксифен	$y=0,908*x-0,0205,$ $R^2=0,996$	$y=0,762*x+0,0263,$ $R^2=0,987$	$y=0,671*x+0,0100,$ $R^2=0,998$	$y=2,072*x-0,0210,$ $R^2=0,999$	$y=0,651*x^2+1,256*x$ $+0,0705,$ $R^2=0,974$
крезоксим метил	$y=0,076*x-0,0060,$ $R^2=0,985$	$y=-$ $0,004*x^2+0,144*x+0,0044,$ $R^2=0,994$	$y=-0,031*x^2+0,101*x-$ $0,0014,$ $R^2=0,986$	$y=-0,004*x^2+0,074*x-$ $0,0063,$ $R^2=0,990$	$y=0,048*x^2+0,0015*x$ $+0,0025,$ $R^2=0,979$
мандипропамид	$y=0,016*x^2+0,056*x+0,0084,$ $R^2=0,998$	$y=0,021*x^2+0,326*x+0,376$ $2,$ $R^2=0,950$	$y=-$ $0,055*x^2+0,227*x+0,0077,$ $R^2=0,993$	$y=-0,009*x^2+0,157*x-$ $0,0245,$ $R^2=0,995$	$y=0,087*x^2-$ $0,008*x+0,0059,$ $R^2=0,967$
металаксил	$y=1,45*x+0,1689,$ $R^2=0,995$	$y=-$ $0,062*x^2+1,706*x+0,0686,$ $R^2=0,993$	$y=1,605*x+0,1235,$ $R^2=0,999$	$y=-$ $0,088*x^2+1,932*x+0,0871,$ $R^2=0,999$	$y=0,271*x^2+1,421*x$ $+0,1687,$ $R^2=0,996$
метоксифенозид	$y=7,74E-$ $004*x^2+0,019*x+6,53E-004,$ $R^2=0,968$	$y=0,038*x^2+0,126*x+0,031$ $1,$ $R^2=0,981$	$y=-0,025*x^2+0,060*x-$ $0,0028,$ $R^2=0,992$	$y=0,039*x^2-$ $0,006*x+0,0109,$ $R^2=0,999$	$y=0,073*x^2+0,024*x$ $+0,0045,$ $R^2=0,983$
миклобутанил	$y=0,012*x^2+0,106*x+0,0115,$ $R^2=0,998$	$y=0,255*x+0,0133,$ $R^2=0,988$	$y=0,188*x+0,0131,$ $R^2=0,994$	$y=0,036*x^2+0,278*x+0,06$ $76,$ $R^2=0,999$	$y=0,191*x^2+0,154*x$ $+0,0306,$ $R^2=0,968$
пенконазол	$y=0,260*x-0,042,$ $R^2=0,968$	$y=0,651*x-0,0027,$ $R^2=0,989$	$y=-0,143*x^2+0,499*x-$ $0,0106,$ $R^2=0,990$	$y=0,201*x^2+0,552*x+0,14$ $27,$ $R^2=0,999$	$y=0,388*x^2+0,321*x$ $+0,0242,$ $R^2=0,964$

Активна супстанца	Мобилна фаза	Калибрација у матриксу за црвено вино	Калибрација методом стандардног додатка за црвено вино	Калибрација у матриксу за бело вино	Калибрација методом стандардног додатка за бело вино
пираклостробин	$y=1,033*x-0,1810$ , $R^2=0,974$	$y=-0,031*x^2+1,720*x+0,0117$ , $R^2=0,970$	$y=0,739*x-0,0063$ , $R^2=0,999$	$y=0,1097*x^2+0,171*x+0,0267$ , $R^2=0,999$	$y=0,103*x^2+0,038*x+0,006$ , $R^2=0,922$
пиридабен	$y=2,728*x-0,0876$ , $R^2=0,995$	$y=3,137*x-0,1782$ , $R^2=0,996$	$y=2,021*x+0,0266$ , $R^2=0,996$	$y=1,905*x-0,0331$ , $R^2=0,999$	$y=1,014*x^2+1,025*x-0,0488$ , $R^2=0,998$
приметанил	$y=-0,0016*x^2+0,027*x+0,0323$ , $R^2=0,998$	$y=0,043*x+0,0342$ , $R^2=0,972$	$y=0,018*x-0,0484$ , $R^2=0,944$	$y=0,073*x+0,1615$ , $R^2=0,998$	$y=-5,32E-004*x^2+0,043*x+2,40E-004$ , $R^2=0,993$
пропиконазол	$y=0,201*x-0,0221$ , $R^2=0,944$	$y=0,234*x+0,0257$ , $R^2=0,984$	$y=0,145*x+0,0261$ , $R^2=0,967$	$y=0,064*x^2+0,183*x+0,0573$ , $R^2=0,999$	$y=0,192*x^2+0,020*x+0,0326$ , $R^2=0,970$
спиродиклофен	$y=0,295*x-0,0092$ , $R^2=0,993$	$y=0,383*x-0,0340$ , $R^2=0,993$	$y=-0,040*x^2+0,270*x+0,0013$ , $R^2=0,991$	$y=0,004*x^2+0,178*x-0,0021$ , $R^2=0,999$	$y=0,054*x^2+0,063*x+0,0067$ , $R^2=0,950$
спироксамин	$y=0,454*x^2+2,596*x+0,0685$ , $R^2=0,999$	$y=-0,068*x^2+7,081*x+0,2997$ , $R^2=0,986$	$y=-1,148*x^2+5,453*x+0,0648$ , $R^2=0,998$	$y=24,975*x-2,0422$ , $R^2=0,998$	$y=12,259*x^2+5,754*x+0,9154$ , $R^2=0,961$
тебуконазол	$y=0,028*x+0,0064$ , $R^2=0,984$	$y=0,039*x+0,0018$ , $R^2=0,976$	$y=0,035*x+0,0040$ , $R^2=0,983$	$y=0,069*x+0,0205$ , $R^2=0,997$	$y=0,009*x^2+0,114*x+0,0118$ , $R^2=0,963$
тебуфенпирад	$y=0,211*x-0,0050$ , $R^2=0,996$	$y=0,274*x+0,0013$ , $R^2=0,997$	$y=0,216*x+0,0041$ , $R^2=0,999$	$y=0,137*x-0,0016$ , $R^2=0,999$	$y=0,078*x^2+0,033*x+0,0098$ , $R^2=0,939$
толифлуанид	$y=0,050*x-0,0066$ , $R^2=0,978$	$y=0,122*x-0,0127$ , $R^2=0,998$	$y=0,046*x+0,0013$ , $R^2=0,985$	$y=0,045x-0,0020$ , $R^2=0,997$	$y=0,019*x^2+5,35E-004*x+0,0019$ ,

Активна супстанца	Мобилна фаза	Калибрација у матриксу за црвено вино	Калибрација методом стандардног додатка за црвено вино	Калибрација у матриксу за бело вино	Калибрација методом стандардног додатка за бело вино
					R <sup>2</sup> =0,989
триадименол	$y=0,023*x^2+0,255*x+0,0048$ , R <sup>2</sup> =0,998	$y=0,467*x+0,0055$ , R <sup>2</sup> =0,996	$y=0,422*x+0,0073$ , R <sup>2</sup> =0,986	$y=1,344*x-0,0834$ , R <sup>2</sup> =0,996	$y=0,616*x^2+0,457*x+0,0272$ , R <sup>2</sup> =0,978
трифлумизол	$y=1,644*x-0,1297$ , R <sup>2</sup> =0,989	$y=0,068*x^2-0,0199*x+0,0749$ , R <sup>2</sup> =0,998	$y=0,525*x+0,0375$ , R <sup>2</sup> =0,967	$y=0,204*x-0,0424$ , R <sup>2</sup> =0,921	$y=0,006*x^2+0,924*x+0,0566$ , R <sup>2</sup> =0,925
фамоксадон	$y=0,007*x-6,23E-004$ , R <sup>2</sup> =0,967	$y=-0,002*x^2+0,034*x+0,0027$ , R <sup>2</sup> =0,969	$y=0,009*x+1,79E-004$ , R <sup>2</sup> =0,973	$y=0,0011*x-7,30E-005$ , R <sup>2</sup> =0,963	$y=-6,31E-004*x^2+0,001*x+1,15E-004$ , R <sup>2</sup> =0,979
фенамидон	$y=0,0299*x^2+1,840*x-0,0131$ , R <sup>2</sup> =0,997	$y=0,020*x^2+1,543*x-0,0289$ , R <sup>2</sup> =0,995	$y=1,945*x-0,0270$ , R <sup>2</sup> =0,998	$y=4,664*x-0,1109$ , R <sup>2</sup> =0,999	$y=0,9898*x^2+4,780*x+0,0720$ , R <sup>2</sup> =0,993
фенпироксимат	$y=6,365*x-0,2890$ , R <sup>2</sup> =0,996	$y=0,768*x^2+1,482*x+0,3823$ , R <sup>2</sup> =0,999	$y=4,839*x+0,1248$ , R <sup>2</sup> =0,994	$y=0,049*x^2+13,572*x-0,7596$ , R <sup>2</sup> =0,999	$y=1,081*x^2+7,764*x+0,2281$ , R <sup>2</sup> =0,968
фенхексамид	$y=0,006*x^2+0,114*x+0,0024$ , R <sup>2</sup> =0,998	$y=0,275*x+0,0267$ , R <sup>2</sup> =0,981	$y=0,200*x-0,0013$ , R <sup>2</sup> =0,961	$y=0,005*x^2+0,1197*x+0,063$ , R <sup>2</sup> =0,999	$y=0,020*x^2+0,076*x+0,0036$ , R <sup>2</sup> =0,977
фипронил	$y=0,884*x+0,0946$ , R <sup>2</sup> =0,987	$y=0,920*x-0,0144$ , R <sup>2</sup> =0,995	$y=-0,313*x^2+1,269*x-0,0305$ , R <sup>2</sup> =0,995	$y=-0,306*x^2+4,997*x-0,0594$ , R <sup>2</sup> =0,999	$y=0,039*x^2+4,758*x-0,0479$ , R <sup>2</sup> =0,998
флуазинам	$y=0,902*x+0,0294$ , R <sup>2</sup> =0,993	$y=0,853*x-0,0201$ , R <sup>2</sup> =0,995	$y=-0,179*x^2+0,845*x-4,36E-004$ , R <sup>2</sup> =0,998	$y=3,306*x+0,0284$ , R <sup>2</sup> =0,999	$y=0,798*x^2+2,662*x+0,0608$ , R <sup>2</sup> =0,994
флудиоксонил	$y=0,154*x+0,0214$ , R <sup>2</sup> =0,983	$y=0,141*x+0,0018$ , R <sup>2</sup> =0,994	$y=-0,048*x^2+0,194*x-0,0029$ , R <sup>2</sup> =0,996	$y=-0,053*x^2+1,004*x-0,0311$ , R <sup>2</sup> =0,999	$y=0,066*x^2+0,829*x-0,0134$ , R <sup>2</sup> =0,998
флуквинконазол	$y=-9,09E-005*x^2+0,0019*x-$	$y=-0,0015*x^2+0,019*x-$	$y=-0,0017*x^2+0,007*x-$	$y=0,002*x+4,77E-004$ ,	$y=-6,24E-$

Активна супстанца	Мобилна фаза	Калибрација у матриксу за црвено вино	Калибрација методом стандардног додатка за црвено вино	Калибрација у матриксу за бело вино	Калибрација методом стандардног додатка за бело вино
	4,78E-005, R <sup>2</sup> =0,996	3,49E-004, R <sup>2</sup> =0,996	2,43E-004, R <sup>2</sup> =0,914	R <sup>2</sup> =0,993	004*x <sup>2</sup> +0,002*x+1,18E-005, R <sup>2</sup> =0,994
флутриафол	y=0,034*x <sup>2</sup> +1,254*x-0,0154, R <sup>2</sup> =0,998	y=1,558*x-0,0539, R <sup>2</sup> =0,995	y=1,437*x+0,0355, R <sup>2</sup> =0,997	y=4,154*x+0,0773, R <sup>2</sup> =0,999	y=1,616*x <sup>2</sup> +2,414*x+0,1244, R <sup>2</sup> =0,980
хекситиазокс	y=0,422*x-0,0144, R <sup>2</sup> =0,996	y=0,576*x-0,0107, R <sup>2</sup> =0,995	y=0,415*x+0,0044, R <sup>2</sup> =0,994	y=0,006*x <sup>2</sup> +0,197*x+4,04E-004, R <sup>2</sup> =0,999	y=0,066*x <sup>2</sup> +0,141*x+0,0104, R <sup>2</sup> =0,981
хлорантранилипрол	y=0,019*x <sup>2</sup> +0,214*x+0,0063, R <sup>2</sup> =0,998	y=-0,027*x <sup>2</sup> +0,667*x-0,0131, R <sup>2</sup> =0,984	y=0,297*x+0,0109, R <sup>2</sup> =0,990	y=0,296*x-0,0069, R <sup>2</sup> =0,999	y=0,063*x <sup>2</sup> +0,102*x+0,0082, R <sup>2</sup> =0,935
цимоксанил	y=3,34E-004*x <sup>2</sup> +0,062*x-0,0017, R <sup>2</sup> =0,998	y=0,0011*x <sup>2</sup> +0,049*x-0,0014, R <sup>2</sup> =0,996	y=0,056*x-6,12E-004, R <sup>2</sup> =0,998	y=0,087*x+0,0030, R <sup>2</sup> =0,999	y=0,017*x <sup>2</sup> +0,066*x+0,0037, R <sup>2</sup> =0,991
ципродинил	y=0,046*x <sup>2</sup> +0,334*x+0,0357, R <sup>2</sup> =0,998	y=-0,004*x <sup>2</sup> +0,590*x+0,0215, R <sup>2</sup> =0,992	y=0,338*x+0,0322, R <sup>2</sup> =0,990	y=1,999*x-0,0707, R <sup>2</sup> =0,997	y=0,762*x+0,0548, R <sup>2</sup> =0,918

Прилог 5. Поновљивост за активне супстанце пестицида у црном грожђу

Активна супстанца	Поновљивост на 0,010 mg/kg						%RSR <sub>r</sub>
	I	II	III	IV	V	VI	
азоксистробин	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	2,55
беналаксил	0,01	0,01	0,011	0,011	0,011	0,011	7,79
боскалид	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	1,12
бупрофезин	0,01	0,01	0,011	0,011	0,011	0,011	1,26
диметоморф	0,011	0,011	0,011	0,011	0,01	0,01	6,92
дитианон	0,01	0,01	0,011	0,01	0,011	0,01	3,05
дифенокназол	0,019	0,01	0,012	0,011	0,012	0,012	24,29
зоксамид	0,01	0,01	0,01	0,01	0,011	0,01	4,44
ипроваликарб	0,012	0,009	0,014	0,011	0,013	0,01	15,77
ипродион	0,013	0,012	0,011	0,012	0,014	0,009	13,37
квиноксифен	0,01	0,01	0,011	0,01	0,012	0,011	7,89
крезоксим метил	0,011	0,011	0,008	0,008	0,009	0,009	15,01
мандипропамид	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,06
металаксил	0,009	0,009	0,009	0,009	0,01	0,01	5,2
метоксифенозид	0,011	0,011	0,012	0,012	0,012	0,012	4,4
миклобутанил	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	3,37
пенконазол	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,83
пираклостробин	0,011	0,009	0,012	0,01	0,011	0,009	10,83
пиридабен	0,012	0,009	0,011	0,009	0,012	0,009	16,36
пириметанил	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	2,95
пропиконазол	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	2,36
спиродиклофен	0,012	0,009	0,012	0,01	0,011	0,009	13,24
спироксамин	0,008	0,01	0,012	0,01	0,013	0,01	13,4
тебуконазол	0,016	0,013	0,015	0,011	0,013	0,011	16,43
тебуфенпирад	0,012	0,01	0,012	0,01	0,012	0,01	8,46
толифлуанид	0,01	0,01	0,009	0,009	0,01	0,01	5,51
триадименол	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	1,45
трифлумизол	0,01	0,009	0,01	0,009	0,01	0,009	3,33
фамоксадон	0,011	0,011	0,013	0,01	0,012	0,012	7,31
фенамидон	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	2,25
фенпироксимат	0,012	0,009	0,012	0,01	0,011	0,01	10,45
фенхексамид	0,01	0,01	0,008	0,008	0,012	0,011	14,1
фипронил	0,01	0,01	0,01	0,01	0,011	0,011	0,97
флуазинам	0,011	0,009	0,012	0,009	0,011	0,009	16,68
флудиоксонил	0,011	0,01	0,011	0,011	0,011	0,01	3,52
флуквинконазол	0,013	0,012	0,014	0,012	0,012	0,012	7,66
флутриафол	0,009	0,009	0,01	0,01	0,01	0,01	1,97
хекситиазокс	0,011	0,009	0,011	0,009	0,011	0,01	8,85
хлорантранилипрол	0,01	0,01	0,011	0,01	0,01	0,01	3,1
цимоксанил	0,011	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	4,53
ципродинил	0,01	0,01	0,011	0,009	0,013	0,009	14,19

Прилог 6. Поновљивост за активне супстанце пестицида у белом грожђу

Активна супстанца	Поновљивост на 0,010 mg/kg						%RSRr
	I	II	III	IV	V	VI	
азоксистробин	0,013	0,013	0,012	0,013	0,013	0,012	2,19
беналаксил	0,018	0,017	0,016	0,015	0,017	0,016	6,46
боскалид	0,012	0,012	0,013	0,013	0,009	0,009	15,9
бупрофезин	0,012	0,011	0,011	0,01	0,01	0,01	6,83
диметоморф	0,007	0,007	0,007	0,008	0,008	0,007	9,08
дитианон	0,011	0,009	0,009	0,008	0,008	0,011	16,69
дифеноконазол	0,012	0,01	0,01	0,011	0,012	0,009	10,42
зоксамид	0,022	0,022	0,023	0,023	0,022	0,022	1,95
ипроваликарб	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,017	2,07
ипродион	0,012	0,011	0,012	0,011	0,009	0,011	10,09
квиноксифен	0,011	0,011	0,012	0,012	0,012	0,012	3,97
крезоксим метил	0,01	0,01	0,01	0,009	0,009	0,009	4,27
мандипропамид	0,011	0,011	0,011	0,01	0,01	0,009	6,26
металаксил	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	2,6
метоксифенозид	0,045	0,048	0,043	0,045	0,047	0,044	4,21
миклобутанил	0,019	0,019	0,018	0,019	0,018	0,018	3,56
пенконазол	0,011	0,011	0,011	0,011	0,01	0,011	2,33
пираклостробин	0,014	0,014	0,012	0,013	0,011	0,012	8,4
пиридабен	0,01	0,01	0,01	0,01	0,009	0,009	7,27
пириметанил	0,007	0,007	0,007	0,007	0,009	0,009	13,8
пропиконазол	0,012	0,008	0,014	0,009	0,011	0,014	20,78
спиродиклофен	0,012	0,012	0,012	0,012	0,011	0,011	4,01
спироксамин	0,008	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	2,57
тебуконазол	0,014	0,015	0,016	0,01	0,012	0,011	18,04
тебуфенпирад	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	1,88
толифлуанид	0,013	0,014	0,012	0,014	0,013	0,013	4,6
триадименол	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	2,07
трифлумизол	0,048	0,046	0,046	0,048	0,047	0,048	1,54
фамоксадон	0,011	0,012	0,014	0,01	0,008	0,012	21,08
фенамидон	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,009	3,8
фенпироксимат	0,011	0,011	0,011	0,011	0,01	0,01	3,69
фенхексамид	0,008	0,01	0,01	0,01	0,007	0,007	17,52
фипронил	0,011	0,012	0,012	0,012	0,012	0,011	3,67
флуазинам	0,011	0,012	0,012	0,012	0,012	0,011	5,21
флудиоксонил	0,01	0,011	0,011	0,011	0,011	0,01	5,63
флуквинконазол	0,009	0,008	0,011	0,01	0,007	0,009	13,81
флутриафол	0,013	0,013	0,013	0,013	0,012	0,012	2,33
хекситиазокс	0,015	0,014	0,015	0,015	0,014	0,014	2,77
хлорантранилипрол	0,01	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	4,28
цимоксанил	0,008	0,008	0,008	0,007	0,008	0,008	3,27
ципродинил	0,011	0,011	0,011	0,011	0,012	0,012	4,52

Прилог 7. Поновљивост за активне супстанце пестицида у црвеном вину

Активна супстанца	Поновљивост на 0,010 mg/kg						%RSRr
	I	II	III	IV	V	VI	
азоксистробин	0,013	0,013	0,013	0,015	0,014	0,015	5,36
беналаксил	0,039	0,039	0,039	0,039	0,039	0,039	0,45
боскалид	0,029	0,029	0,029	0,028	0,029	0,028	1,39
бупрофезин	0,017	0,017	0,017	0,018	0,018	0,018	3,5
диметоморф	0,026	0,026	0,026	0,027	0,027	0,027	2,22
дитианон	0,016	0,017	0,014	0,014	0,015	0,016	7,52
дифеноконазол	0,022	0,021	0,021	0,024	0,024	0,023	6,34
зоксамид	0,029	0,029	0,029	0,029	0,029	0,029	0,55
ипроваликарб	0,022	0,022	0,022	0,023	0,023	0,023	0,91
ипродион	0,03	0,032	0,031	0,029	0,029	0,029	3,56
квиноксифен	0,012	0,012	0,012	0,014	0,014	0,014	7,46
крзоксим метил	0,027	0,028	0,027	0,027	0,026	0,027	1,53
мандипропамид	0,034	0,035	0,035	0,035	0,034	0,034	1,27
металаксил	0,007	0,008	0,007	0,01	0,01	0,01	17,95
метоксифенозид	0,042	0,042	0,042	0,042	0,042	0,042	0,52
миклобутанил	0,025	0,025	0,025	0,026	0,025	0,026	1,38
пенконазол	0,033	0,032	0,033	0,033	0,032	0,032	0,27
пираклостробин	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,89
пиридабен	0,012	0,012	0,011	0,014	0,014	0,013	8,23
пириметанил	0,019	0,02	0,018	0,014	0,016	0,018	11,75
пропиконазол	0,032	0,032	0,032	0,033	0,032	0,033	0,93
спиродиклофен	0,012	0,013	0,013	0,014	0,014	0,014	5,11
спироксамин	0,025	0,025	0,025	0,026	0,025	0,025	0,69
тебуконазол	0,008	0,009	0,009	0,009	0,008	0,008	6,59
тебуфенпирад	0,017	0,016	0,017	0,019	0,017	0,018	4,86
толифлуанид	0,028	0,028	0,028	0,029	0,029	0,028	1,2
триадименол	0,021	0,022	0,02	0,021	0,022	0,02	4,81
трифлумизол	0,026	0,026	0,026	0,027	0,026	0,026	1,8
фамоксадон	0,033	0,032	0,033	0,032	0,035	0,032	3,86
фенамидон	0,015	0,015	0,015	0,016	0,016	0,016	3,94
фенпироксимат	0,012	0,012	0,012	0,014	0,013	0,015	8,72
фенхексамид	0,023	0,023	0,023	0,024	0,023	0,024	2,43
фипронил	0,012	0,017	0,013	0,013	0,016	0,015	14,78
флуазинам	0,015	0,017	0,013	0,013	0,017	0,015	12,34
флудиоксонил	0,013	0,016	0,012	0,012	0,012	0,014	12,8
флуквинконазол	0,007	0,007	0,006	0,007	0,005	0,004	22,63
флугриафол	0,017	0,017	0,017	0,018	0,018	0,018	2,69
хекситиазокс	0,015	0,015	0,015	0,016	0,016	0,016	4,89
хлорантранилипрол	0,025	0,024	0,024	0,025	0,025	0,025	1,21
цимоксанил	0,012	0,012	0,012	0,016	0,014	0,016	14,31
ципродинил	0,025	0,025	0,024	0,025	0,025	0,025	1,69



Прилог 8. Поновљивост за активне супстанце пестицида у белом вину

Активна супстанца	Поновљивост на 0,010 mg/kg						%RSRr
	I	II	III	IV	V	VI	
азоксистробин	0,012	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	3,31
беналаксил	0,013	0,015	0,015	0,014	0,014	0,011	9,56
боскалід	0,012	0,013	0,013	0,008	0,012	0,007	22,28
бупрофезин	0,011	0,01	0,01	0,01	0,01	0,009	6,89
диметоморф	0,011	0,011	0,01	0,008	0,008	0,009	16,16
дитианон	0,01	0,01	0,01	0,009	0,009	0,009	6,99
дифеноконазол	0,024	0,018	0,014	0,014	0,017	0,017	22,82
зоксамид	0,011	0,013	0,011	0,01	0,01	0,013	11,98
ипроваликарб	0,015	0,013	0,012	0,013	0,012	0,012	8,01
ипродион	0,008	0,009	0,009	0,009	0,007	0,012	18,61
квиноксифен	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,009	4,25
крезоксим метил	0,016	0,018	0,017	0,016	0,018	0,014	8,41
мандипропамид	0,023	0,026	0,019	0,022	0,024	0,021	11,38
металаксил	0,01	0,011	0,01	0,011	0,011	0,01	1,61
метоксифенозид	0,009	0,009	0,011	0,01	0,008	0,008	12,43
миклобутанил	0,008	0,012	0,012	0,013	0,009	0,01	16,93
пенконазол	0,014	0,013	0,011	0,011	0,012	0,012	7,72
пираклостробин	0,012	0,012	0,013	0,009	0,011	0,012	12,28
пиридабен	0,01	0,01	0,01	0,012	0,008	0,01	12,8
пириметанил	0,079	0,079	0,078	0,079	0,073	0,073	3,65
пропиконазол	0,016	0,015	0,015	0,014	0,016	0,018	9,59
спиродиклофен	0,015	0,013	0,012	0,012	0,013	0,011	11,08
спироксамин	0,013	0,013	0,012	0,012	0,012	0,012	3,75
тебуконазол	0,015	0,01	0,016	0,011	0,011	0,016	21,84
тебуфенпирад	0,016	0,015	0,013	0,012	0,013	0,013	12,24
толифлуанид	0,017	0,01	0,016	0,012	0,008	0,013	27,86
триадименол	0,018	0,015	0,015	0,015	0,012	0,013	13,54
трифлумизол	0,027	0,027	0,032	0,029	0,028	0,028	7,47
фамоксадон	0,013	0,024	0,019	0,028	0,025	0,025	24,23
фенамидон	0,01	0,011	0,01	0,011	0,01	0,01	1,95
фенпироксимат	0,013	0,013	0,013	0,01	0,012	0,013	7,78
фенхексамид	0,009	0,009	0,008	0,005	0,005	0,007	20,73
фипронил	0,01	0,01	0,01	0,011	0,011	0,011	3,71
флуазинам	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	2,26
флудиоксонил	0,011	0,011	0,011	0,012	0,011	0,011	2,21
флуквинконазол	0,007	0,009	0,009	0,008	0,008	0,011	17,9
флутриафол	0,008	0,008	0,008	0,008	0,007	0,007	6,24
хекситиазокс	0,011	0,01	0,01	0,01	0,009	0,009	7,64
хлорантранилипрол	0,014	0,013	0,012	0,012	0,012	0,011	8,11
цимоксанил	0,008	0,008	0,01	0,009	0,008	0,01	10,4
ципродинил	0,019	0,019	0,017	0,017	0,017	0,015	8,91

## БИОГРАФИЈА

Бојана Шпировић Трифуновић је рођена 17.02.1980. године у Краљеву, Република Србија. Гимназију, природно-математички смер, завршила је у Трстенику 1999. године. Хемијски факултет, Универзитета у Београду (смер дипломирани хемичар, група Органска хемија), завршила је 2005. године. Дипломски рад под називом: „Изоловање и одређивање антиоксидативне активности флавона из биљке *Centaurea glaberrima*“, одбранила је на Катедри за органску хемију, са оценом 10. Специјалистичке студије, на истом факултету, завршила је 2008. године. Резултате из специјалистичког рада „Бисфрагментационе реакције холестанског и андростанског 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -ендопероксида под условима микроталасног озрачивања“ објавила је на међународном научном скупу.

Докторске студије, модул Фитомедицина, на Катедри за пестициде и хербологију Пољопривредног факултета, Универзитета у Београду, уписала је школске 2010/2011. године. Испитне обавезе на докторским студијама успешно је завршила, са просечном оценом 9,75.

У периоду од октобра 2006. до марта 2007. године хонорарно је била ангажована на Пољопривредном факултету Универзитета у Београду, на Катедри за пестициде и хербологију. Од марта 2007. запослена је као сарадник без сарадничког звања, на истом факултету на Катедри за пестициде и хербологију. Бави се одређивањем остатака пестицида у различитим матриксама, као и одређивањем садржаја активних супстанци и анализом физичко-хемијских својстава средстава за заштиту биља.

Похађала је више курсева и обука за рад на гасном и течном хроматографу. Усавршила је рад на гасном хроматографу са пламено-јонизујућим (FID), детектором са захватом електрона (ECD), пламено фотометријским (FPD) и азот-фосфорним (NPD) детекторима и течном хроматографу са детектором са диодним зрацима (DAD) и масеним спектрометром (MS/MS). Поседује сертификате са курсева за Процену мерне несигурности, који је организовао Савез хемијских инжењера, 2009. године. Такође је учествовала и на обукама „Capabilities of U-HPLC-MS/MS analysis of contaminants and pharmaceutical compounds in food and the environment” и „Quality assurance (QA) and quality control (QC) procedures in

analysis of contaminants and pharmaceutical compounds in food and the environment”, у организацији EU FP7 CEFSEER, у Новом Саду 2010. године.

У сарадњи са другим ауторима објавила је и саопштила **92** научна рада, уз остварени коефицијент научне компетентности, према критеријумима Министарства науке **68**. Одлично влада енглеским, а служи се немачким и француским језиком. Члан је Српског хемијског друштва од 2005. и Друштва за заштиту биља Србије од 2007. године.

## ИЗЈАВЕ

### Изјава о ауторству

Потписани-а Бојана Шпировић Трифуновић

Број индекса или пријаве докторске дисертације 10/45

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом:

Истовремено одређивање охратоксина А и остатака пестицида у грозђу и  
вину LC-MS/MS техником

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена докторска дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 24.12.2018.

**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторске  
дисертације**

Име и презиме аутора Бојана Шпировић Трифуновић

Број индекса или пријаве докторске дисертације 10/45

Студијски програм Фитомедицина

Наслов докторске дисертације Истовремено одређивање охратоксина А и  
остатака пестицида у грожђу и вину LC-MS/MS техником

Ментор први др Драгица Бркић

други др Горица Вуковић

Потписани/а \_\_\_\_\_

Изјављујем да је штампана верзија моје докторске дисертације истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис докторанда**

У Београду, 24.12.2018.

\_\_\_\_\_

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

**Истовремено одређивање охратоксина А и остатака пестицида у грождју и вину LC-MS/MS техником**

---

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на крају).

**Потпис докторанда**

У Београду, 24.12.2018.

**1. Ауторство** - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

**2. Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

**3. Ауторство - некомерцијално – без прераде.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

**4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

**5. Ауторство – без прераде.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

**6. Ауторство - делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.