

UNIVERZITET U BEOGRADU
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET

Marina M. Radišić

RAZVOJ I PRIMENA METODE TEČNE
HROMATOGRAFIJE–TANDEM MASENE
SPEKTROMETRIJE ZA ODREĐIVANJE PESTICIDA U
VOĆU I VOĆNIM SOKOVIMA

doktorska disertacija

Beograd, 2013.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Marina M. Radišić

DEVELOPMENT AND APPLICATION OF LIQUID
CHROMATOGRAPHY-TANDEM MASS
SPECTROSKOPY METHOD FOR PESTICIDE
ANALYSIS IN FRUITS AND FRUIT JUICES

PhD Thesis

Belgrade, 2013.

Mentor: Dr Mila Laušević, redovni profesor
Tehnološko-metalurškog fakulteta
Univerziteta u Beogradu

Članovi komisije: Dr Tatjana Vasiljević, vanredni profesor
Tehnološko-metalurškog fakulteta
Univerziteta u Beogradu

Dr Antonije Onjia, naučni savetnik
Institut za nuklearne nauke Vinča

Datum odbrane:

Koristim ovu priliku da se posebno zahvalim prof. dr Mili Laušević na svestranoj i nesebičnoj pomoći koju mi je pružala tokom svih ovih godina mentorstva, kao i na savetima i podršci prilikom izrade ove doktorske disertacije.

Takođe se zahvaljujem prof. Dr Tatjani Vasiljevic na svestranoj pomoći i veoma vrednim stručnim savetima koji su pomogli oblikovanje teme doktorske disertacije.

Želim da se zahvalim dr Antoniju Onjia, na korisnim sugestijama koje mi je pružio prilikom pisanja disertacije.

Posebnu zahvalnost dugujem koleginicama dr Svetlani Grujić i Nikolini Antić na pruženoj pomoći pri izvođenju eksperimenata i pisanju radova.

Najtoplije se zahvaljujem svim kolegama sa Katedre za analitičku hemiju i kontrolu kvaliteta, Katedre za inženjerstvo zaštite životne sredine i Inovacionog centra Tehnološko-metalurškog fakulteta na pomoći i podršci.

Svojoj porodici i prijateljima najtoplije se zahvaljujem na nesebičnoj podršci, strpljenju i razumevanju.

Beograd, 2013

Marina Radišić

RAZVOJ I PRIMENA METODE TEČNE HROMATOGRAFIJE-TANDEM MASENE SPEKTROMETRIJE ZA ODREĐIVANJE PESTICIDA U VOĆU I VOĆNIM SOKOVIMA

Rezime

Predmet ovog rada je razvoj i primena nove, brze i osetljive multirezidualne analitičke metode za određivanje tragova pesticida različitih hemijskih grupa u voćnim sokovima i voću. Za analizu su odabrani pesticidi koji spadaju u najčešće korišćene u našoj zemlji. Rad obuhvata razvoj metode disperzije matrice na čvrstoj fazi, za efikasnu ekstrakciju i predkoncentrisanje veoma različitih analita. Metoda obuhvata istovremeno razaranje, usitnjavanje i homogenizaciju čvstih i polučvstih uzoraka, kao i ekstrakciju i prečišćavanje analita. Kao sorbent korišćena je dijatomejska zemlja a dihlormetan je korišćen za eluiranje analita. Takođe, urađena je optimizacija hromatografskog razdvajanja i uspostavljen je protokol za potvrdu prisustva analita pomoću masenog detektora sa jonskim trapom. Kvantifikacija analita je urađena posmatranjem najintenzivnijeg fragmenta. Razvijena metoda za određivanje pesticida u voćnim sokovima obuhvata dvanaest pesticida i uspešno je validirana na uzorcima soka od jabuke, narandže, breskve i maline. Metoda je proširena sa još pet pesticida i uspešno validirana na uzorcima voća, jabuke, kajsije, narandže i jagode. Kao parametri validacije određivani su: prinos, linearnost, granica detekcija i granica kvantifikacije za sve ispitivane pesticide u svim ispitivanim matricama. Vrednosti dobijene za prinose u većini slučajeva su bile u opsegu od 70 do 120% uz relativnu standardnu devijaciju uglavnom ispod 20%. Dostignute su veoma niske granice detekcije i kvantifikacije. Razvijena metoda je primenjena na realne uzorke komercijalno dostupnih sokova i voća dostupnih na beogradskom tržištu.

Ključne reči: pesticidi, multirezidualna analiza, disperzija matrice na čvrstoj fazi, tečna hromatografija, masena spektrometrija, jonski trap, voće, voćni sokovi

Naučna oblast: Hemija i hemijska tehnologija

UDK broj:

DEVELOPMENT AND APPLICATION OF LIQUID CHROMATOGRAPHY– TANDEM MASS SPECTROSCOPY METHOD FOR PESTICIDE ANALYSIS IN FRUITS AND FRUIT JUICES

Abstract

This study presents the development and application of a new, rapid and sensitive analytical method for determination of pesticide residues in fruit juices and fruits. Pesticides, chosen for the analysis, belong to different chemical classes and are among the most frequently used in our country. The study includes the development of the matrix solid-phase dispersion sample preparation method for extracting and pre-concentrating different analytes. This sample preparation technique involves simultaneous disruption, fragmentation and homogenization of solid and semi-solid samples as well as extraction and clean-up of the analytes. Diathomeus earth was used as a dispersant, while dichloromethane was used as an eluting solvent. Also, optimization of the chromatographic separation was done and the protocol for reliable confirmation of pesticide residues with ion trap mass detector was established. The quantification of the analytes was carried out using the most sensitive transition. Developed method for pesticide analysis in fruit juices includes twelve pesticides and was successfully validated in apple, orange, peach and raspberry fruit juices. The method was expanded with five more pesticides and it was successfully validated for fruit samples, apple, apricot, orange and strawberry. The method was validated for accuracy, linearity, reproducibility, and sensitivity. Mean values for recoveries were in the range of 70–120 % for all tested matrices. Repeatability of the method, expressed as the relative standard deviation, was in general, lower than 20 %. Low limits of detection and quantification were readily achieved with this method for all tested pesticides. The applicability of the method to routine analysis was tested in real fruit and fruit juices samples with good performance.

Key words: pesticides, multiresidue analysis, matrix solid-phase dispersion, liquid chromatography, mass spectroscopy, ion trap, fruit juices, fruits.

Scientific field: Chemistry and Chemical technology

UDC number:

Sadržaj

1. Uvod	1
2. Teorijski deo	3
2.1. Podela i svojstva pesticida	3
2.1.1. Podela pesticida	3
2.1.2. Toksikološka svojstva pesticida	5
2.2. Pesticidi odabrani za analizu	9
2.3. Analitičke metode za određivanje pesticida u voću i voćnim sokovima	13
2.3.1. Tehnike pripreme uzorka	14
2.3.1.1. Metoda disperzije matrice na čvrstoj fazi (MSPD)	19
2.3.2. Instrumentalne metode analize	23
2.3.2.1. Tečna hromatografija	23
2.3.2.1.1. Osnovni delovi HPLC uređaja	25
2.3.2.2. Masena spektrometrija	25
2.3.2.2.1. Tehnike jonizacije	26
2.3.2.2.2. Maseni analizator	29
2.4. Praktični aspekti analize pesticida	34
3. Eksperimentalni deo	36
3.1. Rastvori odabranih pesticida i reagensi	38
3.2. Uzorci voćnih sokova	39
3.3. Uzorci voća	39
3.4. MSPD procedura	39
3.4.1. Uzorci voćnih sokova	39
3.4.2. Uzorci voća	40
3.4.3. Kalibracija	41
3.5. LC-MS ² metoda	41
3.5.1. Potvrda prisustva analita	43
4. Rezultati i diskusija	44

4.1. Voćni sokovi	44
4.1.1. Snimanje masenih spektara i optimizacija hromatografskog razdvajanja ..	44
4.1.1.1. Snimanje masenih spektara	44
4.1.1.2. Optimizacija hromatografskog razdvajanja.....	51
4.1.2. Potvrda prisustva analita u uzorku	53
4.1.3. Priprema uzorka	58
4.1.4. Uticaj matrice	60
4.1.5. Validacija analitičke metode	62
4.1.6. Realni uzorci	66
4.2. Voće.....	69
4.2.1. Snimanje masenih spektara i optimizacija hromatografskog razdvajanja..	69
4.2.1.1. Snimanje masenih spektara	69
4.2.1.2. Hromatografsko razdvajanje	73
4.2.2. Potvrda prisustva analita u uzorku	75
4.2.3. Validacija analitičke metode.....	77
4.2.4. Uticaj matrice	82
4.2.5. Realni uzorci	84
5. Zaključak.....	89
Literatura	91
PRILOG	107
Biografija autora	125
Izjava o autorstvu	126
Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada	127
Izjava o korišćenju	128

1. Uvod

Hemijske supstance pomoću kojih se kontroliše populacija štetočina oduvek se koriste. U početku to su uglavnom bile neorganske supstance kao što su sumpor, arsen, živa i olovo. Masovnu upotrebu pesticida započelo je otkriće insekticida dihlordifenil-trihloroetana (DDT) 1939. godine. U to vreme pesticidi su imali dobru reputaciju pošto su omogućili kontrolu bolesti koje su u to vreme odnosile milione života, kao što su malarija i kuga. Međutim, u međuvremenu mišljenje o pesticidima se značajno promenilo, naročito nakon saznanja o štetnim posledicama upotrebe DDT-a. U današnje vreme, registracija i upotreba pesticida je definisana veoma strogim regulativama, naročito u ekonomski razvijenim zemljama. Međutim, i pored napretka koji je postignut u razvoju bioloških metoda borbe protiv štetočina i u razvoju biljaka koje su otpornije na štetočine, pesticidi i dalje nemaju alternativu kada je proizvodnja hrane i zaštita stanovništva od bolesti u pitanju. Procene su da bi preko jedne trećine useva bilo izgubljeno bez upotrebe pesticida (Tadeo et al., 2008). Pokušaji da se gubici svedu na što manju meru doveli su do razvoja širokog spektra jedinjenja koja se upotrebljavaju kao pesticidi. Danas je registrovano preko 1000 različitih jedinjenja koji se koriste kao pesticidi. Pesticide koji su komercijalno dostupni karakteriše veliki diverzitet u pogledu njihovih hemijskih struktura i funkcionalnih grupa što čini razvoj multirezidualne laboratorijske metode veoma kompleksnom.

S obzirom na veliku upotrebu pesticida u poljoprivredi, kao i uvođenje sve većeg broja novih vrsta, neophodna je stroga kontrola tragova pesticida u proizvodima za ljudsku upotrebu, prije svega voću i povrću. Poseban značaj ima određivanje tragova pesticida u voćnim sokovima zbog toga što su deca njihovi najčešći konzumenti.

Iako se analitičke metode za ekstrakciju i izolovanje pesticida iz hrane i drugih kompleksnih matrica broje u hiljadama, ekstrakcija pesticida i njihovih metabolita i

dalje predstavlja veliki analitički izazov. Sve stroži zakonski propisi u ovoj oblasti, kao i uvođenje novih vrsta pesticida na tržište, zahtevaju konstantno unapređivanje analitičkih metoda. Određivanje pesticida i produkata njihove degradacije u realnim uzorcima predstavlja komplikovan zadatak zbog njihove polarnosti i termičke nestabilnosti, kao i veoma niskih granica detekcije koji su propisani direktivama Evropske unije (Picó et al., 2004).

Predmet ovog rada je razvoj i primena nove, brze i osetljive multirezidualne analitičke metode za određivanje tragova pesticida različitih hemijskih grupa u voćnim sokovima i voću. Za analizu su odabrani pesticidi koji spadaju u najčešće korišćene u našoj zemlji. Rad obuhvata razvoj metode za efikasnu ekstrakciju i predkoncentrisanje veoma različitih analita, koja obuhvata istovremeno razaranje, usitnjavanje i homogenizaciju čvstih i polučvstih uzoraka, kao i ekstrakciju i prečišćavanje analita. Takođe, urađena je optimizacija hromatografskog razdvajanja i uspostavljen je protokol za potvrdu prisustva analita pomoću masenog detektora. Posebna pažnja je posvećena izboru reakcija za pouzdanu maseno-spektrometrijsku detekciju tragova pesticida i razvoju novih načina identifikacije i nedvosmisleni potvrdu prisustva analita pomoću masenog detektora sa jonskim trapom. Razvijena metoda je primenjena na realne uzorke komercijalno dostupnih sokova i voća na beogradskom tržištu.

2. Teorijski deo

2.1. Podela i svojstva pesticida

2.1.1. Podela pesticida

Pesticidi predstavljaju veoma heterogenu grupu jedinjenja čija je jedina zajednička karakteristika da su delotvorni u suzbijanju štetočina. Koriste se za suzbijanje biljnih bolesti, štetnih insekata i drugih životinja (glodara, ptica) kao i biljaka pri proizvodnji hrane, suzbijanje štetočina i gljivica pri skladištenju poljoprivrednih proizvoda, te za uništavanje insekata i drugih organizama koji prenose uzročnike zaraznih bolesti na ljude i životinje kao i za suzbijanje raznih parazita.

U literaturi se mogu naći podele pesticida prema nameni tj. prema grupi živih organizama koje suzbijaju, zatim prema pripadnosti hemijskoj grupi, prema mehanizmu delovanja, prema toksičnosti, prema kancerogenosti itd. Osnovna podela pesticida izvršena je prema grupi živih organizama koje kontrolišu i suzbijaju (Janjić & Mitrić, 2004):

1. herbicidi – jedinjenja za uništavanje korova i drugih biljaka;
2. zoocidi – jedinjenja za kontrolu i suzbijanje štetnih organizama iz grupa animalia, dele se s obzirom na grupu životinja koje suzbijaju na:
 - a) insekticide – sredstva za suzbijanje insekata,
 - b) akaricide – sredstva za suzbijanje grinja,
 - c) nematocide – sredstva za suzbijanje nematoda,
 - d) muluskocide (limacide) – sredstva za suzbijanje puževa,

- e) rodenticide (muricide) – sredstva za suzbijanje glodara,
 - f) avicide – sredstva za suzbijanje ptica;
3. fungicidi – jedinjenja za suzbijanje i prevenciju pojave fitopatogenih gljiva;
 4. baktericidi – jedinjenja za suzbijanje i prevenciju pojave fitopatogenih bakterija;
 5. antibiotici – jedinjenja koja deluju antagonistički na neke mikroorganizme, prouzrokovaoče biljnih bolesti;
 6. repelenti i atraktanti – repelenti su sredstva za odbijanje insekata, grinja, ptica i glodara, a atraktanti su sredstva za primamljivanje isekata, grinja, ptica i glodara, kako bi se oni skoncentrisano skupljali i tako uspešnije suzbijali;
 7. hemosterilizanti – sredstva za suzbijanje štetočina izazivanjem sterilnosti muških ili ženskih individua;
 8. fiziotropi – jedinjenja koja usporavaju ili modifikuju pojedine fiziološke procese kod biljaka.

Neke pesticide nije jednostavno okarakterisati na osnovu navedene podele s obzirom na to da su efikasni protiv više grupa štetočina ili se mogu naći u formulacijama koje imaju različite mehanizme delovanja (Picó et al., 2004).

Druga podela koja se često koristi je podela pesticida na osnovu njihovih hemijskih osobina. Osnovna struktura svih pesticida koji pripadaju jednoj istoj hemijskoj grupi je slična, i obično se razlikuju u vrsti, rasporedu i broju heteroatoma i funkcionalnih grupa. Poznavanje hemijske grupe je jako važno kod izbora pesticida, a pogotovo u cilju sprečavanja rezistentnosti jer obično pesticidi iz iste hemijske grupe imaju isti mehanizam delovanja (Picó et al., 2004). Osnovna podela je na neorganske i organske pesticide. Većina pesticida koji se danas koriste su organske supstance. Mali broj pesticida koji su u upotrebi se dobijaju ekstrakcijom direktno iz biljaka, većinu predstavljaju sintetička jedinjenja koja su i odgovorna za naglu ekspanziju upotrebe pesticida od četrdesetih godina prošlog veka.

Pesticide koji su danas komercijalno dostupni karakteriše veliki diverzitet u pogledu njihovih hemijskih struktura i funkcionalnih grupa što čini njihovu klasifikaciju veoma kompleksnom. Međutim, određene grupe pesticida se mogu izdvojiti imajući u vidu njihovu veoma rasprostranjenu upotrebu (Picó et al., 2004):

- Organohlorni pesticidi – predstavljaju grupu ugljovodonika sa jednim ili više atoma hlora. Najpoznatiji predstavnici ove grupe pesticida su hlordan, dieldrin i DDT.

- Organofosfatni pesticidi – predstavljaju jedinjenja integrisana sa estriima fosfatne, fosfonske ili fosfinske kiseline. Neki od predstavnika ove grupe pesticida su diazinon, dimetoat, malation.
- Karbamatni pesticidi – predstavljaju soli ili estre karbaminske kiseline. Predstavnicima ove grupe pesticida su karbaril, karbofuran, proposkur.
- Triazini – ovu grupu pesticida čine supstituisani 1,3,5-triazini. Po svojoj aktivnosti spadaju u grupu herbicida.
- Supstituisane uree – čine dosta veliku grupu pesticida u koju spadaju feniluree, sulfoniluree i benzouree. Uglavnom su po svojoj aktivnosti herbicidi, međutim, neki derivati urea imaju insekticidno dejstvo.

2.1.2. Toksikološka svojstva pesticida

Pesticidi su u suštini otrovne supstance koje unesene u organizam čoveka mogu pod izvesnim okolnostima da izazovu bolest ili smrt. Upravo se zbog toga proučavanju toksikoloških osobina pridaje veliki značaj, i u ta istraživanja ulažu ogromna sredstva. Da bi se hemijska supstanca registrovala kao pesticid mora da prođe veoma rigorozna ispitivanja. Neophodno je prikupiti detaljne podatke o fizičko-hemijskim osobinama pesticida, zatim njihovoj efikasnosti, toksikološkom i ekotoksikološkom ponašanju (Tadeo et al., 2008). Polaznu tačku toksikoloških ispitivanja pesticida predstavljaju ogledi sa životinjama, zatim se vrši ekstrapolacija dobijenih podataka o toksičnosti pesticida za životinje, na čoveka. Određivanje toksičnosti pesticida po čoveka, na osnovu oglada sa životinjama, ima niz ograničenja pošto pre svega postoje razlike u odgovoru čoveka i životinja na delovanje pesticida.

Osnovni zadatak ispitivanja toksičnih supstanci je da se za neku supstancu na neki način kvantificiraju podaci o toksičnosti, zbog čega je uveden pojam *doze*. Doza predstavlja količinu neke supstance koja je potrebna da bi se postigao određeni efekat u organizmu. Doza supstance koja u organizmu, na današnjem nivou diagnostike, ne izaziva nikakve efekte naziva se *granična doza*, a najmanja doza supstance koja ima neko dejstvo u organizmu naziva se *fiziološkom dozom* (Janjić & Mitrić, 2004).

Tabela 1. Klasifikacija pesticida na osnovu njihove akutne toksičnosti prema kriterijumima Svetske zdravstvene organizacije (WHO) (The WHO Recommended Classification of Pesticides, 2010).

Grupa otrova	Klasa	LD ₅₀ za pacove (mg/kg TM)	
		Oralna doza	Dermalna doza
Ia	Ekstremno toksični	<5	<50
Ib	Visoko toksični	5–50	50–200
II	Srednje toksični	50–2000	200–2000
III	Slabo toksični	≥2000	≥2000
U	Veruje se da nema opasnosti od akutnog trovanja		≥ 5000

Eksperimenti na životinjama obuhvataju četiri osnovna testa toksičnosti, test akutne, subakutne i hronične toksičnosti, a koji se razlikuju po dužini trajanja i metodici izvođenja. Prilikom ispitivanja toksikoloških osobina pesticida utvrđuju se kvantitativni pokazatelji toksičnosti, prikazani kroz određene doze.

Akutna toksičnost izazvana je jednokratnim unošenjem otrova u organizam i može da bude oralna, inhalaciona i dermalna akutna toksičnost. Test akutne toksičnosti ima za cilj da odredi toksičnost supstance, pri jednokratnom unošenju pesticida u organizam eksperimentalne životinje, nakon čega se odgovor organizma, tj. smrtni efekat posmatra sledećih 14 dana. Kvantitativni pokazatelj akutne toksičnosti nekog pesticida, tj. mera njegovog toksiciteta je srednja letalna doza – LD₅₀. Srednja letalna doza predstavlja količinu supstance izraženu u mg/kg telesne mase ispitivanih organizama koja izaziva 50% smrtnosti i služi nam za klasifikaciju supstanci prema toksičnosti (Janjić & Mitrić, 2004). U tabeli 1 data je klasifikacija pesticida na osnovu njihove akutne toksičnosti po kriterijumima Svetske zdravstvene organizacije (engl. World Health Organization–WHO), a u tabeli 2 klasifikacija pesticida prema kriterijumima američke Agencije za zaštitu životne sredine (engl. Environmental Protection Agency – EPA) (The WHO Recommended Classification of Pesticides, 2010; Tomlin, 2002–2003).

Tabela 2. Klasifikacija pesticida na osnovu njihove akutne toksičnosti prema kriterijumima američke Agencije za zaštitu životne sredine (EPA) (Tomlin, 2002–2003).

Grupa otrova	Oralna LD ₅₀ (mg/kg)	Akutna toksičnost za pacove		Efekat na oči	Efekat na koži
		Dermalna LD ₅₀ (mg/kg)	Oralna LD ₅₀ (mg/kg)		
I	≤50	≤200	≤0,2	Korozivan i neprovidnost rožnjače	Korozivan
II	50-500	200-2000	0,2-2,0	Neprovidnost rožnjace Iritacija	Iritacija 72h
III	500-5000	2000-20000	2,0-20	reverzibilna u toku 7 dana	Srednja iritacija
IV	≥5000	≥20000	≥20	Bez iritacije	Veoma blaga iritacija 72h

Test hronične toksičnosti traje od šest meseci do dve godine. Pri tome se životinje svakodnevno izlažu maloj, tolerantnoj, srednjoj i velikoj dozi pesticida pri čemu se odgovor životinje kontinualno prati. Osnovni zadatak hroničnog ogleada je da se odredi granična doza, tj. najveća doza koja ne prouzrokuje efekte koji se smatraju štetnim, pri dugotrajnom i svakodnevnom unošenju pesticida u organizam. Ova doza se naziva maksimalna netoksična doza – MNTD, (engl. No Adverse Effect Level – NAEL) i izražava se u miligramima pesticida na 1 kilogram telesne mase ispitivane životinje na dan (mg/kg TM dan) (Janjić & Mitrić, 2004).

Prihvatljivi dnevni unos, (engl. Acceptable Daily Intake – ADI) izražava se u miligramima pesticida na 1 kg tjelesne mase čoveka na dan (mg/kg TM/dan), koju čovek može svakodnevno unositi u svoj organizam, preko hrane i pića, do kraja života, bez vidljivih štetnih efekata na organizam. ADI je vrednost koja se izračunava deljenjem maksimalne netoksične doze – MNTD sa faktorom sigurnosti. Vrednosti ADI se odnose na unos pesticida tokom čitavog života i tradicionalno se smatralo da povremeni unos većih koncentracija koje su iznad ADI vrednosti ne izaziva zdravstvene tegobe naročito ukoliko je srednji unos ispod ADI. Ovo se međutim ne može smatrati tačnim ukoliko je riječ o pesticidima sa značajnom akutnom toksičnošću.

Zbog ove mogućnosti da kratkotrajni unos veće koncentracije pesticida može dovesti do akutnog trovanja uveden je koncept Akutne referentne doze - ARfD (engl. Acute Reference Dose). ARfD se definiše kao količina pesticida koja se može konzumirati u toku jednog obroka ili jednog dana sa praktičnom sigurnošću na bazi poznatih faktora, da se nikakvi štetni efekti neće ispoljiti (Janjić & Mitrić, 2004). Vrednosti ADI-a nam služe za izračunavanje maksimalno dozvoljenih koncentracija pesticida u poljoprivrednim i prehrambenim proizvodima.

Maksimalno dozvoljena koncentracija (MDK) pesticida (engl. Maximum Residue Level – MRL) je naziv za kvantitativnu veličinu koja određuje maksimalno dozvoljeni maseni udeo pesticida i njihovih tragova u i/ili na poljoprivrednim proizvodima i uspostavljena je na temelju dobre poljoprivredne prakse i najmanje potrebne izloženosti potrošača u svrhu zaštite osetljive populacije potrošača. Vrednost MDK jednim delom zavisi od toksičnosti samog pesticida tj. od vrednosti prihvatljivog dnevnog unosa. Drugim delom zavisi od procene izloženosti potrošača i računa se na osnovu prosečne telesne mase čoveka. U praktičnim proračunima se uzima prosečna masa čoveka od 60 kg. Vrednost MDK se izražava u mg/kg, tj. u masenom udelu pesticida u jednom kilogramu svežeg poljoprivrednog proizvoda. MDK vrednosti prvobitno su uspostavljene radi lakše trgovine, a ne kao sigurnosne granice vezane za zaštitu ljudskog zdravlja. Prekoračenje MDK vrednosti ne znači odmah i ugrožavanje ljudskog zdravlja, jer su toksikološke granice daleko iznad MDK vrednosti. Ipak svako prekoračenje MDK vrednosti ukazuje na potrebu procene rizika za potrošače tog proizvoda, upozorenja proizvođaču proizvoda da primjenjuje pesticid u skladu s dobrom poljoprivrednom praksom, odnosno uputstvima za primjenu pesticida i/ili preporuku inspeksijskim službama da pojačaju kontrolu uzoraka proizvoda kod kojih je analizom utvrđeno prekoračenje MDK kao i proizvođača koji tim proizvodima snabdevaju tržište (European food safety authority, 2009).

2.2. Pesticidi odabrani za analizu

Pesticidi predstavljaju veoma značajnu komponentu moderne poljoprivredne industrije. I pored upotrebe pesticida, usled dejstva štetnih organizama, skoro jedna trećina svetskih zasada godišnje bude uništena. Procene su da oko 10 000 različitih vrsta mikroorganizama i organizama odgovorni za velike ekonomske gubitke, na svetskom nivou. Pokušaj da se gubici svedu na što manju meru doveli su do razvoja širokog spektra jedinjenja koja se danas upotrebljavaju kao pesticidi. Prema podacima američke Agencije za zaštitu životne sredine (engl. Environmental protection agency–EPA), više od 1180 jedinjenja je registrovano kao pesticidi, od čega su 435 herbicidi, 335 insekticidi i 410 su fungicidi. A svi oni se na tržištu mogu naći u 32800 formulacija (Srivastava et al., 2010).

S obzirom na ovako veliki broj jedinjenja, različitih hemijskih osobina, nije moguće razviti jednu metodu za posmatranje svih pesticida u voću i voćnim sokovima. U razvoju analitičke metode neophodno je napraviti izbor relevantnih jedinjenja i hemijskih grupa jedinjenja. Pri odabiru pesticida prvenstveno je uzeto u obzir koji se najviše koriste u poljoprivrednoj praksi. Zatim, takođe je razmatrano kojoj hemijskoj grupi jedinjenja pripadaju odabrani pesticidi. Naime, cilj je bio da se razvije multirezidualna metoda za određivanje pesticida koji pripadaju hemijski različitim grupama. Hemijska grupa, dejstvo i toksikološki podaci za odabrane pesticide prikazani su u tabeli 3.

Organofosfatni pesticidi, kao najčešće korišćena grupa pesticida, su zastupljeni u najvećem broju. Mehanizam delovanja organofosfatnih pesticida je isti i kod insekata, za čije se uništavanje uglavnom koriste, i kod sisara. Naime, ponašaju se kao inhibitori acetilholinesteraze (AChE), ključnog enzima u prenosu nervnog impulsa, sa subsekventnom akumulacijom toksičnih nivoa acetilholina (ACh) koji je neurotransmiter. U mnogim slučajevima enzim koji nastaje ovim putem je dosta stabilan tako da intoksikacija može da bude veoma spora. (Bosak, 2006). Organofosfatni pesticidi nanose se na biljku u fazi njenog rasta. Frekvencija i količina koja se nanosi varira u velikoj meri od klimatskih uslova tretiranog podneblja. Tako u području sa umerenom klimom mogu biti dovoljna samo dva nanošenja dok u području

sa visokom vlažnošću i visokim temperaturama potrebno je nekada i do pedeset nanošenja. Zaostala količina pesticida na biljci i plodu zavisi u velikoj meri od vremenskog razmaka između poslednjeg nanošenja pesticida i branja plodova, kao i od količina padavina pošto kiša može da spere nanetu količinu pesticida i tako stvori uslove za njihovu hidrolizu. (Environmental health criteria 63, 1986.). Organofosfatni pesticidi odabrani za analizu su: monokrotofos, dimetoat, acefat i malation.

Tabela 3. Hemijska grupa, dejstvo i toksikološki podaci pesticida odabranih za analizu u voću i voćnim sokovima.

Pesticid	Dejstvo	Toksičnost		ADI ^c mg/kg TM/dan	ArfD ^c	Kancerogenost ^d
		WHO ^a	EPA ^b			
<i>Organofosfati</i>						
Acefat	Insekticid	II	III	0,03	0,1	+
Dimetoat	Insekticid	II	II	0,001	0,01	+
Malation	Insekticid	III	III	0,03	0,3	–
Monokrotofos	Insekticid	Ib	I	0,0006	0,002	–
<i>Karbamati</i>						
Karbofuran	Insekticid	Ib	I	0,00015	0,00015	–
Karbaril	Insekticid	II	I	0,0075	0,01	+
<i>Triazini</i>						
Atrazin	Herbicid	III	III	0,02	0,1	–
Simazin	Herbicid	U	IV	–	–	–
Propazin	Herbicid	U	IV	–	–	–
<i>Neonikotinoidi</i>						
Acetamiprid	Insekticid	–	–	0,07	0,1	–
Imidakloprid	Insekticid	II	II	0,06	0,08	–
<i>Feniluree</i>						
Diuron	Herbicid	III	III	0,007	0,016	+
Monuron	Herbicid	–	III	–	–	–
Linuron	Herbicid	III	III	0,003	0,03	+
<i>Benzimidazol</i>						
Karbendazim	Fungicid	III	–	0,02	0,02	+
<i>Benzohidrazid</i>						
Tebufenozid	Insekticid	U	III	0,02	–	–
<i>Dinitrofenol</i>						
DNOC	Herbicid	Ib	I	–	–	–

^a– (The WHO Recommended Classification of Pesticides, 2010); ^b– (Tomlin, 2002–2003); ^c– (EU pesticide database); ^d– (Hazardous Substances Data Bank)

Mehanizam delovanja karbamatnih insekticida je sličan kao kod organofosforinih insekticida tj. djeluju kao inhibitori acetilholinesteraze (AChE), ključnog enzima u prenosu nervnog impulsa. Karbamulacija enzima je relativno nestabilna tako da je regeneracija AChE enzima dosta brza u poređenju sa regeneracijom fosforizovanog enzima. Samim tim su i koncentracije koje izazivaju smrtni ishod dosta veće nego uslučaju organofosforinih pesticida (Environmental health

criteria 64, 1986). Kao predstavnik karbamatnih pesticida odabran su karbofuran, insekticid koji se koristi za suzbijanje zemljišnih štetočina tretiranjem semena (Janjić & Mitrić, 2004) i karbaril, kontaktni insekticid koji se upotrebljava za tretiranje više od 120 različitih useva (Tomlin, 2002–2003).

Triazini su herbicidi koji se adsorbuju korenom i transportuju ksilemom u grančice i listove pri čemu inhibiraju fotosintezu i zaustavljaju rast biljke. Hemijski su stabilni i dugo perzistiraju u životnoj sredini (Tadeo et al., 2008). Za analizu kao predstavnici triazina odabrani su atrazin, simazin i propazin. Atrazin, iako zabranjen u Evropskoj uniji (EU) i dalje je na listi najčešće upotrebljivanih pesticida, na svetskom nivou (Ackerman, 2007). U Sedinjenim američkim državama, atrazin je drugi najčešće korišteni pesticid u periodu od 2001 do 2007 godine, dok je simazin 2007 godine bio 16. najčešće korišteni pesticid (Grube et al., 2011).

Sintetički neonikotinoidi su jedina nova velika grupa pesticida koja je uvedena u poslednjih 40 godina. Najznačajniji predstavnik neonikotinoida je imidakloprid koji spada među najprodavanije insekticide na svetskom nivou (Yamamoto & Casida, 1999). Aktivnost neonikotinoida je slična dejstvu prirodnog insekticida nikotina, deluje na centralni nervni sistem. Spadaju među dosta selektivne pesticide, tj. ispoljavaju mnogo veću toksičnost prema insektima nego prema sisarima (Tomizawa & Casida, 2005). Prema klasifikaciji Svetske zdravstvene organizacije svrstani su u umereno i blago toksične pesticide (The WHO Recommended Classification of Pesticides, 2010). Acetamiprid se koristi kao sistemični insekticid za suzbijanje štetnih insekata voćaka i vinove loze, krompira, paradajza, duvana i kupusa (Janjić & Mitrić, 2004).

Urea herbicidi su jedna od najznačajnijih grupa herbicida. Fenilurea herbicidi se u značajnim količinama koriste kao selektivni i neselektivni herbicidi u poljoprivredi, industriji i domaćinstvu. Njihovo dejstvo je zasnovano na sposobnosti da blokiraju fotosintezu biljaka (Liu, 2001; Morais et al. 2011). Kao predstavnici ove grupe herbicida za analizu su odabrani diuron, monuron i linuron. U Sedinjenim američkim državama, diuron se u periodu od 2003 do 2007. godine nalazi među 25 najprodavanijih pesticida (Grube et al. 2011).

Najčešća aktivna supstanca fungicida iz hemijske grupe benzimidazola je karbendazim. Karbendazim tj. metilbenzimidazol-2-il-karbat je sistematski fungicid sa protektivnim i kurativnim delovanjem. U Republici Srbiji ovaj fungicid je

registrovan za suzbijanje uzročnika bolesti koštičavog voća, suncokreta, šećerne repe i pšenice (Janjić & Mitrić, 2004). Karbendazim je takođe produkt razlaganja fungicida benomila i metil-tiofanata, pri čemu se benomil gotovo potpuno razloži na karbendazim, direktno na voću ili tokom analize, dok se metil-tiofanat razloži samo delimično pod istim uslovima (Sannino, 1995). Karbendazim je toksičan za ljude, životinje i biljke. Pokazuje značajnu stabilnost u površinskim i otpadnim vodama, zemljištu i hrani (Boundina et al., 2003).

Tebufenozid, pesticid iz hemijske grupe benzohidrazida, dizajniran je kao alternativa sintetičkim insekticidima širokog dejstva. Deluje kao kontaktni agonist hormona presvlačenja prvenstveno kod leptira. U Jugoistočnoj Aziji namenjen je za tretiranje pirinča, u Evropi za tretiranje stabala jabuke i vinograda, u Sedinjenim Američkim državama za tretiranje voćnjaka i šuma (Hamoutene et al., 2008).

DNOC (4,6-dinitro-o-krezol) spada u hemijsku grupu dinitrofenola. Spada u ekstremno toksične pesticide (The WHO Recommended Classification of Pesticides, 2010). Njegova upotreba u poljoprivredi, zabranjena je u Evropskoj uniji 1999. godine (Commission Decision, 1999), dok se u našoj zemlji prestao proizvoditi i koristiti 2002. godine (Stamenković, 2005). DNOC deluje kao nesistematični insekticid sa kontaktnim i digestivnim delovanjem (Janjić & Mitrić, 2004).

2.3. Analitičke metode za određivanje pesticida u voću i voćnim sokovima

Veoma niske maksimalno dozvoljene koncentracije tragova pesticida u hrani, koje su propisane od strane Evropske unije i nacionalnih regulatornih tela, postavljaju veoma stroge zahteve koje analitička metoda za određivanje pesticida u hrani treba da zadovolji. Odabir analitičke metode za određivanje tragova pesticida u hrani u prvom redu zavisi od hemijskih osobina analita i očekivanih koncentracija. Svaka analitička metoda se uglavnom sastoji od nekoliko odvojenih koraka (priprema uzorka, separacija, kvantifikacija analita i analiza podataka), od kojih je svaki kritičan za dobijanje tačnih i reproduktivnih rezultata. Bez obzira koja metoda se odabere potrebno je izvršiti validaciju analitičke metode kojom se dokazuje da predloženi metod odgovara nameni. Pri validaciji određuju se osetljivost, prinos, preciznost, granica detekcije, granica kvantifikacije i linearnost kalibracionih krivih za predloženi analitički metod. Kada je u pitanju kvantitativno određivanje tragova pesticida u kompleksnim matricama, kao što su voće i povrće, analitička metoda mora da ispunjava sledeće uslove (SANCO, 2011):

- Prinos metode – mora biti u opsegu od 70 do 120%, za razmatrani opseg koncentracija u svakoj reprezentativnoj matrici iz relevantne grupe uzoraka.
- Ponovljivost metode – izražena preko relativne standardne devijacije (RSD), treba da je $\leq 20\%$.
- Granica detekcije i kvantifikacije – najmanje koncentracije analita koje je moguće pouzdano detektovati i kvantifikovati. Granica detekcije (engl. Limit of Detection–LOD) definiše se kao koncentracija pri kojoj je odnos signala i šuma jednak 3 (engl. Signal to Noise – S/N=3), dok se granica kvantifikacije (engl. Limit of Quantification–LOQ) definiše kao koncentracija pri kojoj je odnos signala i šuma jednak 10 (S/N=10). LOQ za razvijeni analitički metod mora da bude ispod MDK za određeni pesticid.
- Linearnost kalibracionih krivih – dobijeni signal mora biti direktno proporcionalan koncentraciji analita. Kalibracija se može izvršiti upotrebom eksternih standarda, internih standarda ili metodom standardnog dodatka.

Priprema uzorka je najčešće neophodna da bi se iz matrice izolovale komponente od interesa, kao i da se analiti prečiste i predkoncentrišu. Određivanje pesticida u kompleksnim matricama kao što su voće, povrće, voćni sokovi i dr. zahteva najviši nivo osetljivosti instrumenta i takvu pripremu uzorka koja može povećati koncentraciju analita od interesa pre izvođenja analize. Moderne instrumentalne tehnike, kao što su gasna hromatografija (engl. Gas Chromatography–GC) i tečna hromatografija visoke performanse (engl. High Performance Liquid Chromatography–HPLC) sa selektivnim detektorima, danas dominiraju u analizi pesticida i njihovih ostataka u voću i povrću.

2.3.1. Tehnike pripreme uzorka

Idealna tehnika pripreme uzorka treba da bude jednostavna, jeftina, efikasna, selektivna i kompatibilna sa širokim opsegom separacionih metoda. Treba da omogući istovremeno izolovanje i koncentrisanje analita, kao i eventualnu upotrebu na samom mestu uzorkovanja. Takođe, mora da bude ekonomski isplativa, laka i sigurna za izvođenje. Međutim, još uvek nije pronađena metoda koja u potpunosti ispunjava navedene zahteve (Blasco et al., 2002a).

Pri određivanju tragova pesticida u kompleksnim matricama, kao što su voće, povrće i voćni sokovi, tehnika pripreme uzorka se dugi niz godina smatrala zamornom i neinventivnom, tako da se njenom razvoju nije posvećivala značajnija pažnja. Tek razvojem veoma osetljivih instrumentalnih tehnika postaje očigledno da je priprema uzorka veoma značajan deo celokupnog procesa. Bez adekvatne pripreme uzorka finalni rezultat analize ne može biti zadovoljavajući bez obzira na osetljivost instrumenta.

Izbor tehnike pripreme uzorka zavisi od više faktora:

1. fizičko-hemijskih osobina analita, kao što su: isparljivost, rastvorljivost (u vodi i organskim rastvaračima), stabilnosti, kiselosti, baznosti itd;
2. fizičko-hemijskih prirode matrice uzorka (sadržaj masti i ulja, kiselost, baznost, sadržaj vode itd.);
3. jedinstvene svrhe analize (npr. da li su voće ili voćni sok dovoljno sigurni za konzumiranje).

Tehnika pripreme uzoraka za određivanje tragova pesticida u hrani sastoji se od sledećih koraka (Huat Tan & Chai, 2011):

- homogenizacija – dobijanje uniformnog uzorka;
- ekstrakcija – analit od interesa se prenosi iz matrice uzorka u rastvarač. Pod idealnim uslovima analit se selektivno ekstrahuje iz matrice uzorka, a sve nepoželjne komponente zaostaju;
- prečišćavanje – izolovanje analita od interesa od ostalih delova matrice uzorka koji su ko-ekstrahovani i mogu da interferiraju sa analitima;
- predkoncentrisanje – povećanje koncentracije ekstrahovanih analita i na taj način poboljšanje ukupne osetljivosti analize. Koncentrisanje analita koji se nalazi u rastvaraču može se postići raznim tehnikama uparavanja dok se rekonstituisanje vrši u rastvaraču kompatibilnom sa odabranom instrumentalnom tehnikom.

Ekstrakcija pesticida iz voća i povrća najčešće se postiže primenom organskih rastvarača. Rastvarači koji se u tu svrhu obično koriste su metanol (Hernández et al., 2006; Topuz et al. 2005), etilacetat (Blasco et al., 2002b; Mol et al., 2003; Blasco et al., 2004; Jansson et al., 2004; Botitsi et al., 2007; Vankateswarly et al., 2007; Remedios et al., 2009; Berrada et al. 2010; Savant et al., 2010;) i acetonitril (Liu et al., 2010). Često se umesto čistih rastvarača koriste njihove smeše sa vodom u raznim zapreminskim odnosima (Tekel & Hatrík, 1996) ili smeše organskih rastvarača različitih polarnosti (Sannino et al., 2004; Araoud et al., 2007). Izbor organskog rastvarača u najvećoj meri zavisi od polarnosti ispitivanih analita. Za ekstrakciju nepolarnih pesticida, kao što su organohloridi, najpogodnije je koristiti nepolarni rastvarač, dok je za ekstrakciju polarnih pesticida, kao što su organofosfati, najpogodnije je koristiti blago do srednje polaran rastvarač. Najčešće korišćena priprema uzorka je ekstrakcija sa etilacetatom uz natrijum sulfat, sa ili bez dodatnog prečišćavanja. Polarnost rastvarača najbolje se može predstaviti preko dielektrične konstante, a ukoliko je dobijeni ekstrakt potrebno i upariti radi koncentrisanja uzorka, osim polarnosti u obzir treba uzeti i tačku ključanja rastvarača (Tabela 4) (Reynolds, 2004).

Tabela 4. Fizičke osobine rastvarača koji se najčešće koriste za ekstrakciju pesticida.

Rastvarač	Dialektrična konstanta (20 °C)	Tačka ključanja (°C)	Napon pare (kP na 25 °C)
Aceton	20,7 ^a	56	30,8
Acetonitril	37,5	82	11,8
Cikloheksan	2,0	81	13,0
Dihlormetan	9,1	40	58,2
Etilacetat	6,0 ^a	77	12,6
Heksan	1,9	69	20,2
Metanol	32,6 ^a	65	16,9
Pentan	1,8	36	68,3
Petroleum etar	–	30–60	–
Voda	78,5	100	–

a – 25 °C

Izolovanje analita najčešće se postiže tečno–tečnom particijom (engl. Liquid–liquid partition – LLP), putem koje se analiti prebacuju u organski sloj ostavljajući nepoželjne hidrofilne komponente u vodenoj fazi. Aceton i acetonitril su rastvarači koji se mešaju sa vodom u svim zapreminskim odnosima, etilacetat meša se sa vodom, međutim u vema malom zapreminskom odnosu. Kada se za ekstrakciju koristi etilacetat, formiranje odvojenog organskog sloja je skoro trenutno. U slučaju acetona i acetonitrila, za odvajanje organskog sloja, potrebno je dodati nepolarni organski rastvarač i/ili soli. Vrsta rastvarača i soli koje se dodaju imaju odlučujući uticaj na raspodelu analita između faza, a samim tim i na selektivnost metode. Nakon LLP, dalje uklanjanje neželjenih komponenti matrice (prečišćavanje) uglavnom se postiže upotrebom adsorpcione hromatografije, pomoću normalno ili reverzno faznih sorbenata.

Prednost ovih metoda je da su zasnovane na dobro poznatim i izučanim principima, nisu skupe, ne zahtevaju upotrebu skupih instrumenata, a rastvarači visoke čistoće, iako skupi, dosta se lako mogu nabaviti (Reynolds, 2004). Međutim, glavni nedostaci su upotreba velikih količina toksičnih i skupih organskih rastvarača, zatim dugo vreme ekstrakcije, kao i upotreba velike količine laboratorijskog posuđa, što može dovesti do relativno velikih grešaka pri kvantifikaciji analita (Kmellár et al., 2008).

Razvojem instrumentalnih tehnika u pogledu njihove poboljšane osetljivosti i selektivnosti, smanjena je potreba za prečišćavanjem i koncentrisanjem uzorka. Razvojem instrumenata za tečnu hromatografiju u sprezi sa masenom detekcijom

značajno je proširen diapazon pesticida koji se mogu odrediti pomoću multirezidualnih metoda. U literaturi se mogu naći mnogobrojne tehnike pripreme uzorka koje su prilagođene GC i HPLC instrumentalnim tehnikama sa maseno spektrometrijskom (MS) detekcijom. Multirezidualna metoda pripreme uzorka koja se poslednjih godina sve češće koristi je tzv. QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged and safe) (Reynolds, 2004). Ovaj metod je zadržao osnovne karakteristike klasičnih ekstrakcija, međutim, svi nepraktični, zamorni i koraci koji oduzimaju dosta vremena su maksimalno ograničeni. Metod podrazumeva mućkanje homogenizovanog uzorka sa acetonitrilom uz dodatak natrijum hlorida i magnezijum sulfata. Soli u dodiru sa vodenom fazom razvijaju toplotu, što poboljšava razdvajanje vodene i organske faze. Za ekstrakciju baznih jedinjenja koristi se modifikovana QuEChERS metoda, kod koje se kao rastvarač koristi smeša acetonitrila i 1 % sirćetne kiseline, a umesto natrijum hlorida se koristi natrijum acetat. Prečišćavanje ekstrakta se obavlja mešanjem čvrstog sorbenta sa ekstraktom. Metoda je primenjena za određivanje velikog broja pesticida u raznim matricama (Thrumann et al., 2005; Húšková et al., 2008; Kmellár et al., 2008; Krueve et al., 2008; Wang et al., 2010) uz dobijene prinose uglavnom iznad 80%. Ekstrakti dobijeni ovom tehnikom, uglavnom nisu dovoljno prečišćeni što ih čini podesnim samo za analizu gasnom ili tečnom hromatografijom u sprezi sa masenim detektorima.

U cilju prevazilaženja nedostataka klasičnih ekstrakcija, i u skladu sa trendom smanjenja upotrebe organskih rastvarača, mnoge alternativne metode pripreme uzorka su razvijene i opisane u literaturi. Ove metode mogu se podeliti na metode za ekstrakciju pod visokim pritiskom i adsorptivne ekstrakcione metode.

U ekstrakcione tehnike pod visokim pritiskom mogu se svrstati, tečna ekstrakcija pod visokim pritiskom (engl. Pressurized liquid extraction–PLE) i superkritična ekstrakcija (engl. Supercritical fluid extraction–SFE). PLE ekstrakciona tehnika koristi povećanu kinetičku energiju analita na povišenim temperaturama pomoću koje se postiže ekstrakcija uz male količine rastvarača. Povišen pritisak je neophodno održavati u ekstrakcionom sudu, pošto su radne temperature obično više od temperature ključanja rastvarača koji se koriste. Dobra strana ove tehnike je što se ekstrakcija analita postiže uz malu potrošnju organskog rastvarača. Osim toga, organski rastvarač može se u određenim uslovima zameniti vodom (Juan-García et al., 2010).

Ekstrakti dobijeni na ovaj način uglavnom zahtevaju dodatno prečišćavanje uzorka. PLE je uspešno primenjena za određivanje devet benzilurea insekticida u hrani biljnog i životinjskog porekla, uz etilacetat kao ekstrakcioni rastvarač i dijatomejsku zemlju za sušenje uzorka (Bretti et al., 2010). Dobijeni prinosi za sve pesticide su iznad 70% a ekstrakti su analizirani tečnom hromatografijom u sprezi sa masenom detekcijom (LC–MS). Veliki nedostatak ove metode je što zahteva velika inicijalna ulaganja u opremu (Reynolds, 2004).

Kod superkritične ekstrakcije najčešće se kao superkritični fluid koristi CO₂, pošto dosta lako prelazi u superkritično stanje, nije toksičan, inertan je i lako se uparava pod ambijentanim uslovima. SFE i pored toga što ne zahteva upotrebu organskih rastvarača, nije našla veliku primenu među tehnikama pripreme uzorka za određivanje ostataka pesticida u hrani. Kao osnovni nedostaci navode se velika inicijalna ulaganja, kao i kod PLE metode, i nepouzdanost komercijalno dostupnih aparatura (Reynolds, 2004).

Od adsorptivnih ekstrakcionih tehnika za određivanje ostataka u hrani najčešće primenjivane tehnike su: ekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. Solid Phase Extraction–SPE), mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. Solid Phase Microextraction–SPME) i disperzija matrice na čvrstom fazi (engl. Matrix Solid Phase Dispersion–MSPD). Sve navedene tehnike predstavljaju tečno-čvrstu ekstrakciju kod koje dolazi do raspodele analita između tečne i čvrste faze.

U slučaju SPE tehnike, do zadržavanja analita dolazi tako što se tečan uzorak propušta kroz poroznu čvrstu fazu sa velikim afinitetom prema analitu. Analit se kasnije pogodnim rastvaračem eluira sa čvrste faze. Sorbenti koji se koriste za ekstrakciju na čvrstoj fazi podeljeni su prema vrstama interakcija između sorbenta i analita. Interakcije mogu biti nepolarne, polarne, interakcije jonske izmene i adsorpcione. Najčešći problem pri radu sa viskozim, čvrstim i polučvrstim uzorcima je zapušavanje kolone. Čestice uzorka zauzimaju prostor između čestica pakovanja i otežavaju protok rastvarača stvarajući diskontinualne centre, što dovodi do netačnih rezultata analize (Barker, 2000b). SPE se u pripremi uzoraka voća i povrća najčešće koristi za prečišćavanje dobijenih ekstrakta (Di Corcia et al., 1996; Blasco et al., 2002b; Garcinuño et al., 2004; Hernández et al., 2006; Chen & Chen, 2007; Brutti et al., 2010; Liu et al., 2010;)

SPME tehnika pripreme koristi silikatna vlakna obložena stacionarnom fazom. Analit se raspodeljuje između stacionarne faze i matrice uzorka. Nakon uspostavljanja ravnoteže, adsorbovani analit za LC–MS analizu može da se desorbuje pogodnim organskim rastvaračem (Blaco et al., 2003; Sagratini et al., 2007). Kada se SPME koristi u sprezi sa GC–MS tehnikom analize, desorpcija analita se najčešće vrši u samom injektoru tj. vrši se termalna desorpcija analita (Beltran et al., 2003; Zambonin et al., 2004; Cortés-Aguado et al., 2008; Filho et al., 2010).

2.3.1.1. Metoda disperzije matrice na čvrstoj fazi (MSPD)

Osobina čvrste faze da na svojoj površini veže organske molekule putem različitih sorpcionih mehanizama poznata je u analitičkoj hemiji decenijama unazad, ali je tek poslednjih godina našla svoju primjenu u ekstrakciji pesticida iz viskoznih, čvrstih i polučvrstih uzoraka.

Disperzija matrice na čvrstoj fazi (MSPD) je relativno nova tehnika za izolovanje analita iz viskoznih, čvrstih i polučvrstih uzoraka. U literaturi se prvi put spominje 1989. godine. Ova metoda se zasniva na disperziji uzorka na čvrstom adsorbensu čime se dobija dovoljno suv materijal kojim se puni kolona iz koje se eluiranjem pogodnim rastvaračem ili mešavinom rastvarača vrši izolovanje analita. Osnovna prednost ove metode je što omogućava istovremeno razaranje, usitnjavanje i homogenizaciju čvrstih i polučvrstih uzoraka, kao i ekstrakciju, razdvajanje i prečišćavanje analita u jednom koraku (Blasco et al., 2002a; Garcinuño et al., 2004; Albero et al., 2004).

Materijali koji se koriste kao adsorbensi su isti kao i oni koji se koriste za pakovanje kolona za ekstrakciju na čvrstoj fazi (SPE), samo što se u ovom slučaju koriste na drugi način. Viskozni, čvrsti ili polučvrsti uzorak se dodaje adsorbensu u staklenom ili porcelanskom avanu. Zatim se vrši usitnjavanje i homogenizacija uzorka sa adsorbensom pomoću tučka. Adsorbens u ovom slučaju ima dodatnu ulogu abrazivnog sredstva. Naime, pri mješanju uzorka i adsorbensa, struktura uzorka se razara se na sitnije delove, komponente uzorka se oslobađaju i disperguju po površini adsorbensa, pri čemu se u jednom koraku postiže razaranje, usitnjavanje i homogenizacija uzorka. Kao rezultat dobija se homogena praškasta smeša koja se lako

prenosi u SPE kolonu. Posle punjenja kolone i komprimovanja smeše stvorena je jedinstvena hromatografska kolona u kojoj je uzorak potpuno dispergovan u celokupnom pakovanju kolone (Barker, 2000b). Zatim se vrši se eluiranje analita odgovarajućim rastvaračem. Uparavanjem sakupljenog eluenta vrši se koncentrisanje ispitivanog analita, a nakon filtriranja uzorak se može podvrgnuti instrumentalnoj analizi. Poslednjih godina, MSPD tehnika pripreme uzorka uvedena je u mnoge multirezidualne metode za određivanje pesticida u raznim matricama, neke od njih su predstavljene u tabeli 5.

Uspešna primena MSPD metode zavisi od sledećih faktora (Kristenson et al., 2006):

- Prirode adsorbensa – najčešće se koriste adsorbensi sa silikatnom osnovom (SiO_2 , Al_2O_3 , Florisil, C_{18} ili C_8). Pozitivna osobina ovih materijala je postojanje nederivatizovanih silanolnih grupa na površini i u porama čestica koje vezuju molekule vode umanjujući vlažnost uzorka. Ovo je veoma važno, pošto se mogu javiti problemi pri pakovanju i eluiranju vlažnog uzorka. Takođe, veličina pora adsorbensa je dosta bitan faktor. Čestice veličine od 3 do 20 μm prouzrokuju sporo eluiranje ili ga potpuno onemogućuju. Optimalna veličina čestica je 40–100 μm .
- Prirode ispitivanog uzorka – najznačajnija razlika između MSPD i SPE metoda je u tome što kod MSPD metode na ekstrakciju analita prvenstveno utiče matrica uzorka a ne osobine sorbenta. Naime, sve komponente uzorka su dispergovane kroz pakovanje kolone, pokrivajući veliki deo sorbenta i na taj način se stvara nova faza tako da na efikasnost ekstrakcije analita značajno mogu da utiču komponente matrice (Barker, 2000a; Barker, 2000b; Barker, 2007).
- Upotrebe modifikatora matrice uzorka - često se radi postizanja bolje veze komponenti uzorka i adsorbensa i/ili rastvora za eluiranje dodaju kiseline, baze, soli, antioksidansi i dr. Modifikatori se mogu dodati u uzorak ili rastvor za eluiranje
- Osobina rastvora za eluiranje.– polarnost rastvora za eluiranje određuje koje se komponente zadržavaju na čvrstoj fazi, a koje prelaze u tečnu, što čini njegovu polarnost najvažnijim faktorom koji treba razmotriti pri izvođenju MSPD procedure (Barker, 2000b). Najčešće korišćeni rastvarači za eluiranje su dihlormetan (Viana et al., 1996; Blasco et al., 2002c; Soler et al., 2004) i etilacetat (Perret et al., 2002; Albero et al., 2003; 2004; Tadeo & Sánchez-Brunete, 2003; Ramos et al., 2008).

Sjedinjavanje uzorka sa sorbentom obično ne zahteva mnogo truda i vremena, što se razlikuje od slučaja do slučaja i zavisi od vezivnog tkiva ispitivanog uzorka. Za eluiranje nisu potrebne velike količine rastvarača. Obično se potpuno eluiranje može postići sa 10 cm³ (Blasco et al., 2002c; Perret et al., 2002; Albero et al., 2004; Soler et al., 2004) rastvarača. Ekstrakti dobijeni MSPD metodom uglavnom su dovoljno čisti (Soler et al., 2004), ali ukoliko je potrebno dodatno prečišćavanje ono se može obaviti propuštanjem eluenta kroz SPE kolonu.

MSPD metoda je uspešno primenjena u analizi raznih vrsta pesticida u voću i povrću (Tabela 5). Generalno, analiza dobijenih ekstrakta najčešće se vrši LC–MS ili GC–MS tehnikama, a ređe sa LC ili GC tehnikama u sprezi sa konvencionalnim detektorima kao što su UV, fluorescentni ili detektor sa zahvatom elektrona. Dobijeni prinosi ne razlikuju se mnogo od prinosa dobijenih korišćenjem klasičnih tehnika pripreme uzorka. Međutim, u odnosu na konvencionalne tehnike pripreme uzorka glavne prednosti MSPD metode su (Michel & Buszewski, 2004; Sannino et al. 2004):

- niska potrošnja organskih rastvarača,
- ograničena manipulacija sa uzorkom,
- brza priprema uzoraka i niska cena pripreme po uzorku i
- primenjivost na različite matrice.

MSPD metoda uz QuEChERS se smatra alternativnom metodom koja uspešno može da zameni konvencionalne metode pripreme uzorka (Capriotti et al., 2013).

Tabela 5. Primena MSPD metode za određivanje pesticida u voću, voćnim sokovima i povrću.

Matrica	Analit	Sorbent	Rastvarač	Instrumentalna tehnika	Referenca
Jabuka i krompir	31 pesticid (različite hemijske grupe)	Karbonske nanotube	Aceton/heksan	GC/MS	(Fang et al., 2009)
Citrusi, banane, paprika, blitva	5 fungicida	C ₈	CH ₂ Cl ₂	LC/MS	(Blasco et al., 2002c)
Narandže, jagode	9 pesticida	C ₁₈	CH ₃ OH/CH ₂ Cl ₂	LC/MS/MS	(Soler et al., 2004)
Narandža	11 pesticida (različite hemijske grupe)	C ₈	CH ₃ OH/CH ₂ Cl ₂	LC/MS	(Blasco et al., 2002a)
Citrusno voće	6 pesticida	C ₁₈	CH ₃ OH/CH ₂ Cl ₂	LC/MS	(Soler et al., 2005)
Bademi	5 metabolita etilen-bisditiokarbamata	Morski pesak	CH ₃ CN	LC/UV	(Garcinuño et al., 2004)
Povrće	9 pesticida	Florisil	CH ₂ Cl ₂	GC/ECD	(Viana et al., 1996)
Sok od jabuke	266 pesticida	Dijatomitska zemlja	heksan/CH ₂ Cl ₂	GC/MS	(Chua et al., 2005)
Voćni sokovi	10 pesticida	Dijatomitska zemlja	Etil acetat	LC/MS/MS	(Perret et al., 2002)
Voćni sokovi	9 pesticida i 1 metabolit	Florisil	Etil acetat	GC/ECD	(Tadeo & Sanchez-Brunete, 2003).
Voćni sokovi	9 organohlornih pesticida	Florisil	Etil acetat	GC/NPD	(Albero et al., 2003)
Voće i povrće	8 pesticida	C ₁₈	Etil acetat	GC/NPD/ECD	(Navarro et al., 2002)
Sokovi od povrća	15 herbicida	Florisil	Etil acetat	GC/MS	(Albero et al., 2004)
Jabuka, kruška, kajsija	15 organofosfatnih i 9 triazin pesticida	C ₈	Etilacetat	GC/MS	(Ramos et al., 2008)
Povrće, voće, brašno, lekovito bilje	Lindan i ostali HCH izomeri	Florisil	Heksan/etil acetat	GC/ECD	(Abhilash et al., 2009)
Luk	5 pesticida	C ₁₈	Acetonitril	LC/MS/MS	(Rodrigues et al., 2010)
Grožđe	8 fungicida	C ₁₈	CH ₂ Cl ₂ /etilacetat	GC/MS	(Lagunas-Allué et al., 2012)
Narandža, jabuka, kruška i grožđe	15 organofosfata, 10 triazina i 13 piretroida	C ₈	Etil acetat	GC/MS i GCxGC μECD	(Ramos et al., 2009)

ECD – detektor sa zahvatom elektrona

NPD – nitrogen-fosforni detektor

2.3.2. Instrumentalne metode analize

Gasna hromatografija je zbog visoke osetljivosti, dobre rezolucije, tačnosti i preciznosti dugi niz godina bila vodeća tehnika za određivanje pesticida. Međutim, u današnje vreme, pesticidi koji se upotrebljavaju su uglavnom polarna i/ili termički nestabilna jedinjenja, što ih čini nepodobnim za GC analizu. Većina ovih jedinjenja se uspešno može odvojiti upotrebom tečne hromatografije bez predhodnog derivatizacionog koraka (Reynolds, 2004).

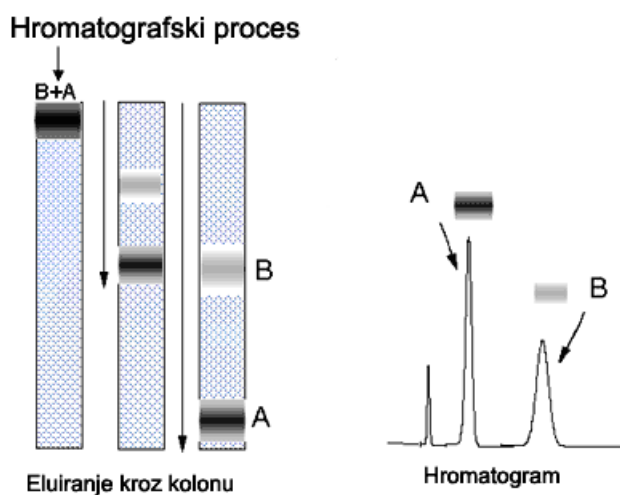
Tečna hromatografija visoke performanse je jedna od najčešće korištenih tehnika analize. U sprezi sa masenom spektrometrijom omogućava selektivnu separaciju analita praćenu osetljivom i selektivnom detekcijom. Ionizacione tehnike kao što su hemijska jonizacija na atmosferskom pritisku (engl. Atmospheric Pressure Chemical Ionization–APCI) i elektrosprej jonizacija (engl. Electrospray Ionization–ESI), praćene masenim analizatorima, kao što je kvadrupolni jonski trap, omogućili su napredak analize pesticida u kompleksnim matricama, kao što su voće i povrće (Soler et al., 2004).

2.3.2.1. Tečna hromatografija

Hromatografija predstavlja tehniku razdvajanja složenih smeša, pri čemu se razdvajanje komponenti smeše vrši na osnovu razlike u raspodeli komponenti između mobilne i stacionarne faze. Kod tečne hromatografije, mobilna faza je tečnost a stacionarna faza je čvrsta ili tečna i predstavlja pakovanje hromatografske kolone. Do razdvajanja komponenti iz smeše dolazi usled različitog stepena interakcija između analita i mobilne i/ili stacionarne faze. Analiti, koji su prethodno rastvoreni u odgovarajućem rastvaraču, propuštaju se kroz hromatografsku kolonu pod visokim pritiskom. Analiti koji formiraju jače veze sa stacionarnom fazom (komponenta B, slika 1), nego sa mobilnom, sporije se eluiraju sa kolone i samim tim imaju i veća retenciona vremena. Analiti koji formiraju jače veze sa mobilnom fazom imaju kraća retenciona vremena (komponenta A, slika 1). Da bi hromatografsko razdvajanje bilo uspešno potrebno je izabrati odgovarajuću kombinaciju različitih operativnih uslova kao što su

sastav i protok mobilne faze, pakovanje kolone, dužina i prečnik kolone, temperatura kolone (Pryde & Gilbert, 1979).

Kod tečne hromatografije visoke performanse (engl. High Performanse Liquid Chromatography – HPLC) punjenje kolone se sastoji od čestica veoma malih dimenzija, što omogućava veliku kontaktnu površinu i kao posledicu toga visoku moć razdvajanja (visoku rezoluciju), po kojoj je metoda i dobila naziv. Pakovanje kolone sadrži čestice ujednačene veličine (3–10 μm), sa veličinom pora od 70 do 300 \AA , površinom od 50 do 250 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ i brojem adsorpcionih centara od 1 do 5 po 1nm^2 . Mobilna faza se može menjati u zavisnosti od zahteva separacije. Iako se različiti rastvori i rastvarači koriste u tu svrhu, svi moraju budu visoke čistoće, kompatibilni sa detektorom, niske viskoznosti, hemijski inertni i u njima analit mora biti rastvoran (Mayer, 2004).



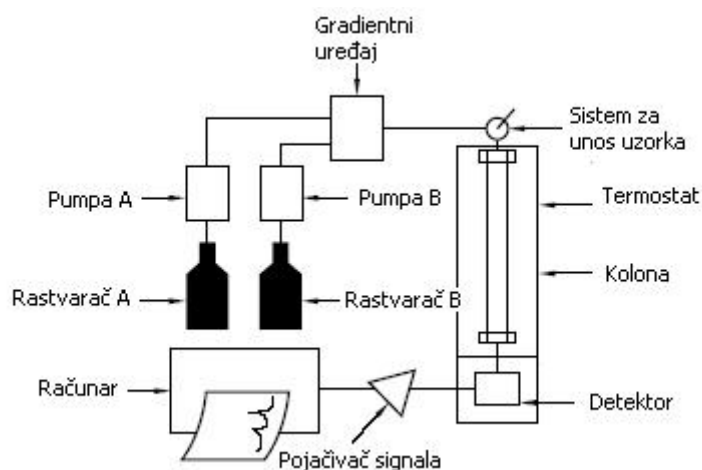
Slika 1. Prikaz hromatografskog procesa.

Prema polarnosti hromatografskog sistema razlikuju se normalno-fazna i reverzno-fazna hromatografija. Kod normalno-fazne hromatografije stacionarna faza je polarna (npr. silika-gel), dok je mobilna faza nepolarna (npr. n-heksan ili tetrahidrofur). Polarni analiti se duže zadržavaju na polarnoj površini pakovanja kolone i eluiraju sa većim retencionim vremenima. Reverzno-fazna hromatografija podrazumeva nepolarnu stacionarnu fazu a polarnu mobilnu fazu (npr. mešavina vode i metanola ili acetonitrila). Sa većim retencionim vremenom eluiraju manje polarni analiti. Ukoliko se klasifikacija hromatografskog sistema izvrši na osnovu prirode

interakcija između komponenti uzorka i stacionarne faze, razlikujemo adsorpcionu hromatografiju, podeonu , hromatografiju jonske izmjene i hromatografiju razdvajanja po veličini (engl. size exclusion) (Pryde & Gilbert, 1979). Polarnost eluenta je najvažniji parametar za sve vrste hromatografije. Eluiranje se može vršiti na dva načina: izokratski i gradijentno. Pri izokratskom eluiranju tokom čitave analize kroz kolonu prolazi mobilna faza konstantnog sastava. Kod gradijentnog tipa eluiranja sastav i jačina mobilne faze se postepeno menjaju tokom analize.

2.3.2.1.1. Osnovni delovi HPLC uređaja

Osnovne komponente od kojih se svaki HPLC uređaj sastoji su: rezervoari za mobilnu fazu, pumpa, sistem za unos uzorka, kolona, detektor i sistem za snimanje i obradu podataka (slika 2).



Slika 2. Osnovna šema HPLC uređaja.

2.3.2.2. Masena spektrometrija

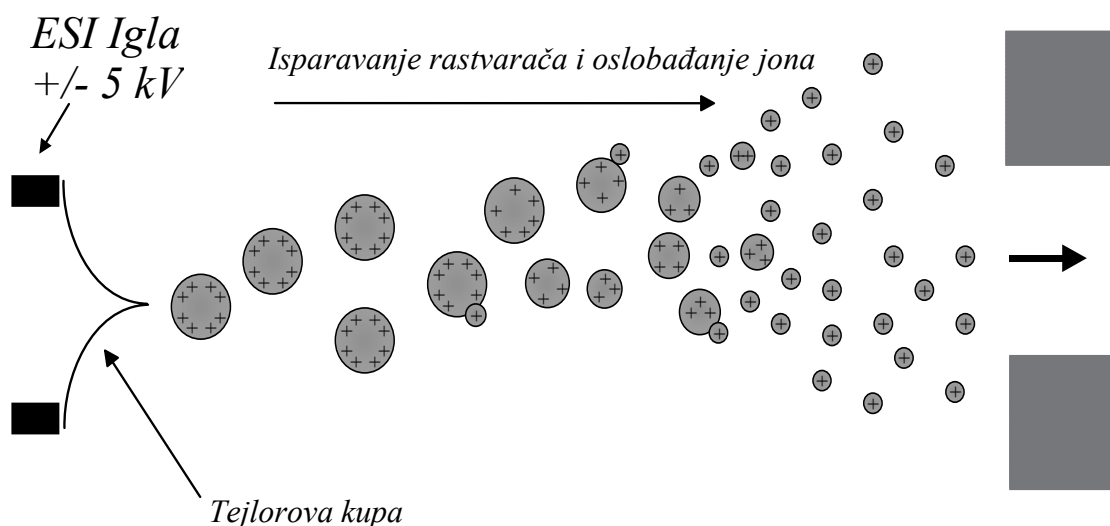
Masena spektrometrija (MS) je analitička metoda kojom se razdvajaju naelektrisane čestice prema odnosu mase i naelektrisanja (m/z). Svaki maseni spektrometar se sastoji iz jonskog izvora (deo instrumenta u kome se obrazuju joni), analizatora (deo koji služi za razvrstavanje jona na osnovu njihove m/z vrednosti) i detektora. U jonskom izvoru se neutralni molekuli uzorka jonizuju, a zatim prebacuju u maseni analizator. Svi maseni spektrometri rade pod sniženim pritiskom (vakuumom)

da bi se minimiziralo međusobno reagovanje jona, njihovo raspršavanje i neutralizacija.

2.3.2.2.1. Tehnike jonizacije

Tehnike jonizacije koje se koriste u masenoj spektrometriji su mnogobrojne. Pri izboru odgovarajuće tehnike glavne odrednice su agregatno stanje analita i energija jonizacije (Cody, 2002; Ardrey, 2003). Tehnike elektronske jonizacije i hemijske jonizacije mogu da se koriste samo u slučaju kada su analiti u gasovitom stanju. Termospreg, elektrosprej i hemijska jonizacija na atmosferskom pritisku su pogodne za jonizaciju neisparljivih i termonestabilnih jedinjenja (Ardrey, 2003).

Jedna od najčešće korišćenih tehnika jonizacije kod HPLC-MS analize je elektrosprej jonizacija (ESI, slika 3).



Slika 3. Šematski prikaz elektrosprej jonizacije.

Uzorak rastvoren u polarnom, isparljivom rastvaraču u struji azota se raspršuje kroz čeličnu kapilaru čiji je vrh pod visokim naponom (3–6 kV) (Cody, 2002). Pod dejstvom električnog polja na rastvor dolazi do razdvajanja pozitivnog i negativnog naelektrisanja prisutnog u rastvoru. Na primer, u pozitivnom režimu rada izvora, igla ESI izvora se nalazi na relativno visokom pozitivnom potencijalu u odnosu na vakuumski otvor. Anjoni, prisutni u rastvoru, kreću se prema površini igle, dok se katjoni grupišu na površini meniskusa rastvora. Kako se pozitivno naelektrisane čestice

međusobno odbijaju dolazi do udaljavanja površine tečnosti od vrha ESI igle. Kada se izjednače električne sile unutar rastvora sa površinskim naponom, površina tečnosti poprima oblik kupe sa polu uglom od $49,3^\circ$ na vrhu, tj. dolazi do formiranja tzv. Tejlorove kupe. Na vrhu Tejlorove kupe, kada pozitivno naelektrisanje prevaziđe površinski napon tečnosti, dolazi do formiranja kapljice. Uzorak napušta kapilaru u vidu aerosola sastavljenog od visoko naelektrisanih kapljica. Kapljice poseduju pozitivno naelektrisanje, odnosno, negativno naelektrisanje u zavisnosti od polarosti električnog polja. Usled isparavanja rastvarača dolazi do smanjivanja površine kapljica i u jednom trenutku, kada površinski napon ne može da izdrži nagomilano naelektrisanje, dolazi do eksplozije kapljica. Ovaj proces se ponavlja i kao rezultat toga dobijamo jone analita, oslobođene od rastvarača, koji kroz jonsku kapilaru stižu do analizatora (Cole, 1997; Cody, 2002; Niessen, 2006).

ESI tehnikom dobijaju se protonovani ili deprotonovani molekuli ($[M+H]^+$, odnosno $[M-H]^-$), što zavisi od polarosti električnog polja. Česta je pojava i višestruko naelektrisanih jona, tipa $[M+nH]^{n+}$, kao i adukata jona sa rastvaračem ($[M+R]^+$, odnosno $[M-R]^-$). Nastankom višestruko naelektrisanih jona, molekuli sa velikom molekulskom masom se pojavljuju na nižim m/z vrijednostima. Ovo povećava merni opseg analizatora, što omogućava analizu molekula sa velikom molekulskom masom upotrebom jeftinijih analizatora (Niessen, 2006).

Formiranje jona pomoću ESI izvora je veoma kompleksan proces i zavisi od karakteristika rastvarača i aditiva mobilne faze. Osobine mobilne faze kao što su isparljivost, viskoznost, površinski napon, provodljivost, jonska jačina rastvora, dielektrična konstanta, koncentracija elektrolita i pH utiču proces jonizacije i samim tim i na jačinu signala (Kostiainen & Kauppila, 2009). Osim sastava mobilne faze, na jačinu ESI signala takođe utiču i fizičko-hemijske osobine analita kao što su pK_a vrednost, hidrofobnost, površinska aktivnost, afinitet prema primanju ili otpuštanju protona, i instrumentalni parametri kao što su protok mobilne faze, temperatura i napon ESI izvora.

Rastvarači koji se najčešće koriste pri ESI jonizaciji su voda, metanol i acetonitril. Čista voda nije poželjna kao rastvarač. Visok površinski napon vode ne pogoduje efikasnom razvajanju naelektrisanja i samim tim dolazi do formiranja nestabilnog spreja. Povećanjem napona na vrhu ESI igle može stabilizovati sprej,

međutim, takođe može dovesti i do električnog pražnjenja u ESI izvoru koje za posledicu ima smanjenje osetljivosti (Kostiainen & Kauppila, 2009). ESI signal je značajno niži kada se koristi vodena mobilna faza (bez dodatka ili sa malim procentom organskog rastvarača) (Straub & Voyksner, 1993; Needham et al., 2000; Dams et al., 2002). Sa porastom procenta organskog rastvarača u mobilnoj fazi dolazi do porasta signala ESI signala (Kostiainen & Kauppila, 2009). U većini LC–ESI/MS analiza metanol se pokazao kao bolji rastvarač od acetonitrila. Naime, veći ESI signal se dobija sa metanolom (Temesi & Law, 1999), takođe, oblik pikova za bazna jedinjenja je bolji sa metanolom (McCalley, 1996). Metanol u odnosu na acetonitril ima manju eluotropnu jačinu, tako da pri gradijntnom protoku mobilne faze analiti eluiraju sa većim sadržajem organskog rastvarača, što ima za posledicu povećanu osetljivost (Steen et al., 1999).

Stabilan elektrosprej je mnogo teže postići pri analizi negativnih jona (Hiraoka & Kudaka, 1992), naime do električnog pražnjenja može doći i pri relativno niskim vrednostima napona (Kostiainen & Kauppila, 2009). Rastvarači metanol i izopropanol pokazali su se kao bolji izbor za snimanja negativnih jona od acetonitrila i etanola (Straub & Voyksner, 1993).

Dodatak aditiva i pufera u mobilnu fazu često pogoduje hromatografskom razdvajanju analita. Nažalost, većina aditiva i pufera koji su uobičajeni u tečnoj hromatografiji nisu kompatibilni za ESI/MS detekciju. Neisparljivi puferi, kao što su fosfatni ili boratni puferi prouzrokuju veliki šum, supresiju signala i zaprljanja ESI izvora, što ima za posledicu smanjenje osetljivosti (Kostiainen & Kauppila, 2009). Takođe, jake isparljive kiseline, kao što je trifluorsirćetna kiselina, mogu da dovedu do značajne supresije signala (Eshraghi & Chowdhury, 1993; Apffel et al., 1995; Kuhlmann et al., 1995). Najčešće korišćeni aditivi u LC–ESI/MS aplikacijama su sirćetna kiselina, mravlja kiselina, amonijum hidroksid, amonijum acetat i amonijum formijat (Niessen, 2006). Najbolji ESI signal se dobija kada je bazni analit već jonizovan u kiseljoj mobilnoj fazi (pH dve jedinice ispod pKa analita) tj. kada je kiseli analit već jonizovan u baznoj mobilnoj fazi (pH dve jedinice iznad pKa analita) (Gao et al., 2005). S druge strane, najbolje reverzno fazno hromatografsko razdvajanje postiže pri pH vrednostima podešenim tako da su analiti u svom nejoničanom obliku u mobilnoj fazi (Mayer, 2004). Pri razvoju LC–ESI/MS metode potrebno je naći

kompromis između zadovoljavajućeg hromatografskog razdvajanja i efikasne elektrosprej jonizacije (Jeanville et al., 2003).

2.3.2.2.2. Maseni analizator

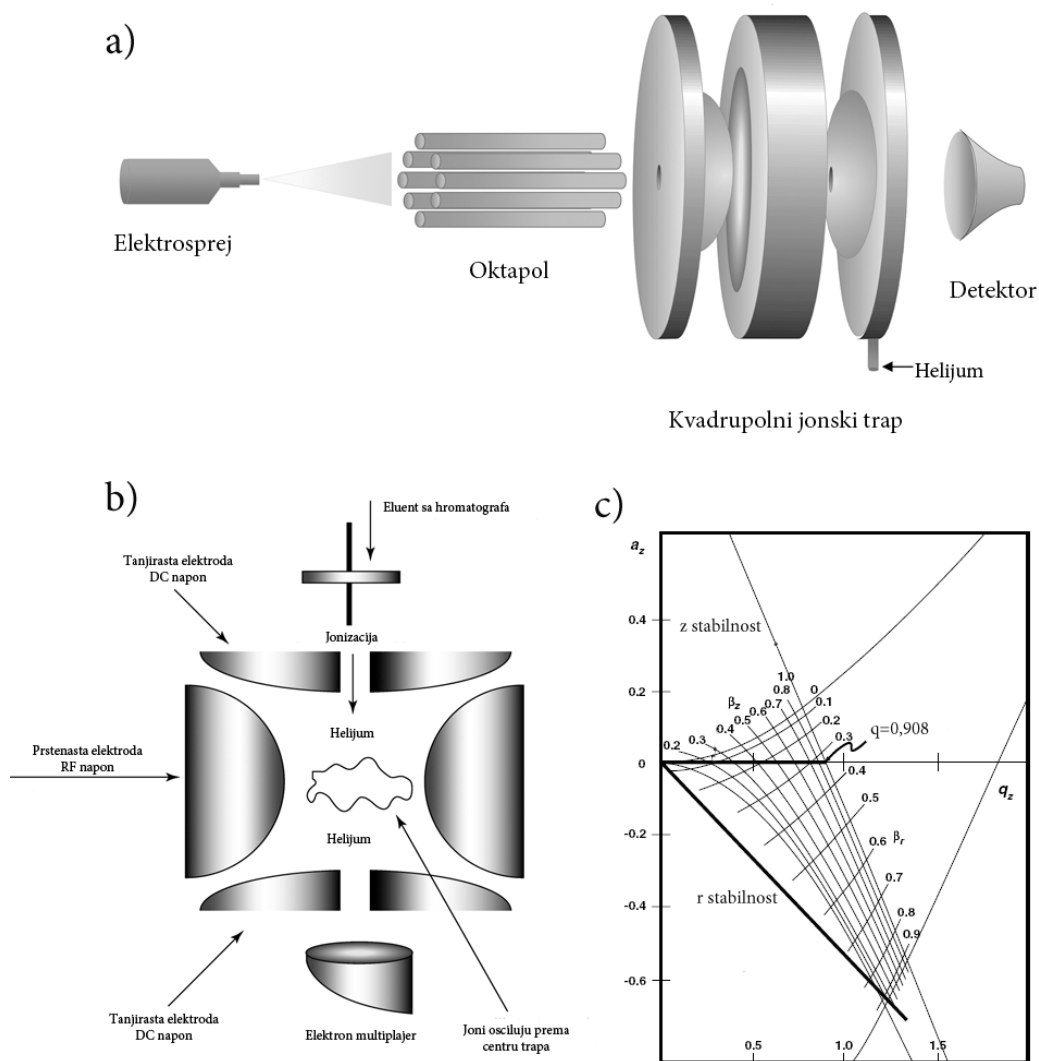
Analizator koristi električno ili magnetno polje ili njihovu kombinaciju da razdvoji jone na osnovu m/z odnosa. U HPLS-MS konfiguracijama najčešće korišteni analizatori su kvadrupolni jonski filter, jonski trap, analizatori vremena preleta (engl. Time of Flight–TOF) ili njihove kombinacije (Ardrey, 2003; Picó et al., 2004).

Jonski trap je maseni spektrometar u kome mogu da se čuvaju ili da se analiziraju joni primenom kvadrupolnog radiofrekventnog električnog polja. Prvi komercijalni instrument ovog tipa pojavio se na tržištu 1983. kao detektor za gasnu hromatografiju. Razvojem elektrosprej jonizacione tehnike (ESI), jonski trap se koristi i kao detektor za tečnu hromatografiju, a u poslednje vreme i kao maseni spektrometar sa skoro neograničenim mogućnostima MS i MSⁿ analize (Fernández, 2007).

Sastoji se iz tri elektrode, jedne u obliku prstena i dve tanjiraste elektrode koje zatvaraju trap sa obe strane (slika 4a, b). Obe tanjiraste elektrode imaju na sebi otvore kroz koje joni ulaze i napuštaju trap. Skladištenje jona u trapu se postiže dovođenjem radiofrekventnog signala na prstenastu elektrodu, što dovodi do stvaranja polja unutar prstena, dok su tanjiraste elektrode uzemljene. Joni u centralnom delu trapa imaju ograničeno kretanje u aksijalnom pravcu međutim u radijalnom oni bivaju ubrzani prema tanjirastim elektrodama i nisu zadržani. Simultano zadržavanje jona u oba pravca se postiže menjanjem smera električnog polja svaki put kada se joni približe elektrodama.

Eksterno proizvedeni joni koji ulaze u jonski trap imaju vrednost kinetičke energije koja onemogućava njihovo efikasno zadržavanje. Iz tog razloga se u trap uvodi gas helijum pri pritisku od ~1 mTorr, da bi se putem elastičnih sudara jona sa atomima helijuma umanjila njihova kinetička energija i samim tim joni grupisali u centru trapa. Pošto je nelinearna rezonanca izazvana distorzijom kvadrupolnog polja najmanja u centru trapa ovako su smanjeni gubici jona i povećana osetljivost. Pozitivni efekti se takođe mogu videti i kada je rezolucija u pitanju jer je rasipanje jona u toku masene analize malo, omogućujući da se joni istog m/z odnosa izbacuju u kompaktnim

paketima. Kretanje jona u trapu može se opisati Metjuovom jednačinom koja opisuje putanje jona u pravcu prstenaste elektrode, radijalnom (r) pravcu i u pravcu elektroda koje zatvaraju prsten, aksijalnom (z) pravcu. Set rešenja koji se može predstaviti preko tzv. dijagrama stabilnosti (slika 4c). Sa dijagrama se može videti pozicija jona u zavisnosti od primenjenog radiofrekventnog napona na prstenastu elektrodu. Usled odbojnih kolumbovih sila postoji ograničenje u broju jona koji se mogu čuvati u trapu. Kada se dostigne zasićenje trapa dolazi do smanjenja rezolucije i osetljivosti (Fernández, 2007).



Slika 4. Kvadrupolni jonski trap: a) izgled jonskog trapa; b) presek jonskog trapa; c) dijagram stabilnosti.

Linearnim menjanjem radiofrekventnog napona joni se pomeraju prema granici stabilnosti. Kada joni dođu do tačke $q_z = 0.908$, $a_z=0$ postaju nestabilni u aksijalnom pravcu i budu izbačeni iz trapa. Opseg masa koje se mogu analizirati ograničen frekvencijom i amplitudom primenjenog radiofrekventnog napona. Najjednostavniji način da se proširi maseni opseg jeste da se jon učini nestabilnim na vrednosti q_z nižoj od 0.908. Ovo se postiže primenom pomoćnog radiofrekventnog napona na tanjirastim elektrodama, sa frekvencijom koja se poklapa sa oscilatornom frekvencijom jona određenog m/z odnosa, u aksijalnom pravcu q_z , uz konstantan fundamentalni radiofrekventni napon.

Glavni nedostatak ovog masenog analizatora je ograničen dinamički opseg, usled ograničenog broja jona koji mogu biti prisuni u trapu. Ovaj problem može doći do izražaja kada se analiziraju uzorci u kojima je analit prisutan u maloj, a komponente matrice u velikoj koncentraciji (Blasco et al., 2004).

Tandem masena spektrometrija (MS/MS) koristi dve faze masene analize. Prva je izolovanje jona od interesa, dok je druga analiza nastalih fragmenata. Ova dvostruka analiza može se izvršiti tandemom u vremenu ili tandemom u prostoru. Tandem u vremenu znači da su dva masena spektrometra vezana serijski i da se eksperimenti simultano izvode, ali su prostorno odvojeni. Kod tandemom u prostoru eksperimenti se izvode u istom prostoru, ali u različito vreme. MS/MS se postiže kuplovanjem više istih ili različitih analizatora ili izvođenjem različitih eksperimenata unutar jonskog trapa (Picó et al., 2004). U jonskom trapu pre fragmentacije izoluje se samo jon od interesa (prekursor jon), dok se svi ostali joni izbacuju iz trapa. Zatim se preostalim jonima u trapu, preko tanjirastih elektroda, dovodi rezonantna frekvencija niske amplitude (1–3 kV). Na ovaj način se jonima saopštava dodatna kinetička energija koja dovodi do fragmentacije jona putem sudara sa atomima helijuma. Glavna odlika procesa fragmentacije u trapu je da primenjena rezonantna frekvencija deluje samo na prekursor jon. Nastali fragmenti nemaju iste oscilatorne frekvencije, što znači da se oni ne nalaze u pobuđenom stanju pod dejstvom primenjenog rezonantnog polja. Nastali fragmenti se zatim sekvencijalno izbacuju iz trapa i dobija se MS/MS spektar. Proces izolacije, fragmentacije i masene analize moguće ponoviti nekoliko puta i taj proces je poznat kao MS^n analiza (Fernández, 2007). Broj MS^n koraka koje moguće obaviti zavisi od ispitivanog jedinjenja i primenjenih instrumentalnih parametara (McLucky et al.,

1991). Najčešće korišćeni stupnjevi MSⁿ analize za izučavanje pesticida su MS³ i MS⁴ (Baglio et al., 1999; Blasco et al., 2004). Najveći nedostatak tandem masene analize pomoću jonskog trapa je nemogućnost detekcije fragmenata čija je *m/z* vrednost manja od 1/3 *m/z* vrednosti prekursor jona (Fernández, 2007).

Maseni analizator sa jonskim trapom je mali, jednostavan za korišćenje, pogodan za različite vrste analiza, putem MSⁿ analize moguće je dobiti dosta informacija o strukturi analita. Takođe, ima mogućnost čuvanja pozitivnih i negativnih jona u trapu (Picó et al., 2004). Sve ove osobine čine ga privlačnim analizatorom u analizi pesticida (tabela 6).

Tabela 6. Odabrane aplikacije u kojima je korišćen jonski trap kao maseni analizator za analizu pesticida.

Jedinjenja	Tehnika jonizacije	Separaciona tehnika	MS ⁿ	Aplikacija	Referenca
Insekticidi					
Organofosfati	CI	GC	MS ²	Voće	(Liapis et al., 2003 ; Blasco et al., 2005)
	APCI +	LC	MS ² MS ³		
Karbamatni	EI	GC	MS ²	Ispitivanje fragmentacija; Voće; Voćni sokovi	(Yinon & Vincze 1997; Blasco et al., 2004; Sagratini et al., 2007; Zrostlíková et al., 2003)
	APCI +	LC	MS ² MS ³		
	ESI +	LC	MS		
Piretroidi	ESI +	LC	MS ²	Povrće; Voćni sokovi	(Chen & Chen 2007; Soler et al., 2004)
	ESI +	LC	MS		
	ESI +	LC	MS ²		
Uree	ESI +	LC	MS ²	Voće	(Zrostlíková et al., 2003)
Herbicidi					
Fenoksi kisljine	EI	GC	MS	Ceralije	(Sánchez-Brunete et al., 1994)
Feniluree	ESI +	LC	MS MS ²	Voćni sokovi	(Sagratini et al., 2007)
Organifosfati	ESI –	LC	MS ² MS ³	Ispitivanje fragmentacija	(Goodwin et al., 2003)
Triazini	ESI+	LC	MS ³	Prerađene ceralije	(Li et al., 2013)
	EI	GC	MS ²	Jagode	(Fernandes et al., 2012)
Fungicidi					
Konazoli	ESI +	LC	MS ² MS ³	Ispitivanje fragmentacija u voću	(Thurman et al., 2005)
Benzamidi	EI CI	GC	MS ²	Degradacioni produkti u voću i piću	(Angioni et al., 2005)
Benzomidazoli	ESI +	LC	MS ²	Voće	(Zrostlíková et al., 2003)
Nitroanilini	APCI –	LC	MS ²	Voće	(Blasco et al., 2003)
Tiofosfati	APCI –	LC	MS ²	Voće	(Blasco et al., 2003)

Praćenjem odgovora masenog detektora u toku vremena dobija se hromatogram. U toku rada možemo izabrati da se snima ceo maseni spektar i na taj način dobijamo ukupni jonski hromatogram (engl. Total Ion Chromatogram–TIC). Ukoliko odaberemo da se registruje samo određeni jon od interesa dobijamo hromatogram odabranog jona (engl. Selected Ion Monitoring–SIM). Možemo odabrati i da se detektuje samo jon koji je nastao kao rezultat fragmentacije određenog jona i kao rezultat imamo hromatogram odabrane reakcije (engl. Selected reaction monitoring–SRM).

2.4. Praktični aspekti analize pesticida

Prilikom detektovanja analita u realnim uzorcima može doći do pojave lažnih signala. Pozitivni nalazi ostataka pesticida obično zahtevaju dodatnu potvrdu. Pouzdana identifikacija analita nije obavezna u svim slučajevima ali je obavezna za vrednosti iznad MDK (SANCO, 2011). U hromatografiji identifikacija analita vrši se poređenjem retencionih vremena nepoznatih sastojaka i standardnih supstanci pod istim eksperimentalnim uslovima. Međutim, samo retenciono vreme često nije dovoljno da bi se postigla pouzdana identifikacija jedinjenja kada su kompleksne smeše u pitanju. Potvrda pozitivnih rezultata tragova pesticida u hrani i u uzorcima iz životne sredine može se postići upotrebom gasne hromatografije sa dva različita detektora (Morello et al., 1996), upotrebom dve kolone različitih polarnosti (Najam et al., 1999; Tomkins & Barnard, 2002; James et al., 2002) ili kombinovanjem dve različite hromatografske tehnike (Liška & Slobodnik, 1996; Brzezinka & Bertram, 2002). Međutim, ove tehnike potvrde pozitivnih rezultata ne pružaju informacije o strukturi analita. Masena spektrometrija u sprezi sa hromatografskim tehnikama omogućava identifikaciju analita sa visokim stepenom sigurnosti. Naime, maseni spektri većine supstanci su dovoljno specifični što uz retenciono vreme omogućuju pouzdanu identifikaciju analita (SANCO, 2011).

Evropska unija definisala je smernice koje obezbeđuju pouzdanu identifikaciju tragova pesticida u hrani. Pomoću tandem masene spektrometrije, minimum dva fragmentna jona, tj. dva SRM prelaza, potrebno je snimiti za pouzdanu identifikaciju. Za identifikaciju mogu se koristiti samo karakteristični SRM prelazi, nije poželjno npr. koristiti fragmente dobijene gubitkom molekula vode. Ukoliko se akvizicija vrši snimanjem odabranog jona tj. SIM-a, identifikacija se vrši preko minimum tri jona. Odnos intenziteta identifikacionih jona mora da se poklapa u uzorku i standardu uz minimalno dozvoljeno odstupanje od 20%. Maksimalno odstupanje od 50% je dozvoljeno za jone čiji je relativni intenzitet u odnosu na osnovni jon $\leq 10\%$ (Commission Decision, 2002; SANCO, 2011).

Za pouzdanu identifikaciju i kvantifikaciju analita od presudnog značaja je izbor kalibracionih standarda. Naime LC-ESI-MS tehnika podložna je pojavi tzv. uticaja matrice ili matriks efekta koji može dovesti do pojave lažnih pozitivnih ili negativnih

signala, kao i do promene intenziteta signala analita što uzrokuje netačnu kvantifikaciju. Sastojci matrice koji koeluiraju sa analitom mogu dovesti do promene efikasnosti jonizacije analita. U većini slučajeva uticaj matrice se manifestuje smanjenjem signala dok ređe dovodi do povećanja intenziteta signala (Gosetti et al., 2010). Tačan mehanizam putem kojeg sastojci matrice ometaju signal nije do kraja razjašnjen ali je poznato da dolazi do izražaja u kompleksnim matricama. Smanjena jonizacija može se objasniti visokom koncentracijom neisparljivih supstanci u spreju koja smanjuje efikasnost nastanka ili isparavanja kapljica (Annesley, 2003). Koliko će biti uticaj matrice takođe zavisi i od hemijske prirode posmatranog analita. Tako npr. polarnija jedinjenja su više podložna uticaju matrice od manje polarnih (Bonfiglio et al., 1999).

Uticaj matrice može se umanjiti promenom tehnike pripreme uzorka tj. boljim prečišćavanjem ekstrakta, promenom hromatografskih uslova, modifikacijom maseno spektrometrijskih uslova ili odabirom odgovarajućih kalibracionih standarda (Gosetti et al., 2010). Promena hromatografskih uslova može biti veoma zametan posao a da na kraju ne dovede do željenih rezultata (Kruve et al., 2008), kao i rigoroznija priprema uzorka (Zrostlíková et al., 2002). Uglavnom je praksa da se uticaj matrice uzima u obzir odabirom odgovarajućih standarda. Pristup koji daje najtačnije rezultate je metoda standardnog dodatka, međutim na ovaj način broj injektovanja može biti veoma veliki. Interni standardi se veoma retko koriste u multirezidualnim metodama. Idealan interni standard može biti izotopski obeleženo jedinjenje, međutim takva jedinjenja su često teško dostupna i veoma skupa (Gosetti et al., 2010). Da bi se uzeo u obzir uticaj matrice najčešće se koriste standardi koji odgovaraju matrici uzorka. Ovi standardi se pripremaju dodatkom standardnog rastvora pesticida u ekstrakte slepih proba koji su dobijenih nakon pripreme uzorka. U toku rada dosta je nerealno pripremati standarde koji odgovaraju matrici za sve uzorke i ispitivane matrice. Problem nastupa pri izboru reprezentativne matrice uzorka ili grupe uzoraka (Kruve et al., 2008; Gosetti et al., 2010). Naime, uticaj matrice za različite vrste voća se veoma razlikuje. Validacija metode nužna ne samo za različite koncentracije već i za različite matrice. Takođe, uticaj matrice potrebno je proveriti i kada se radi o različitim sortama iste vrste voća. Uticaj matrice, između različitih sorti iste vrste voća, za neke pesticide, može da se razlikuje i do 40% (Kruve et al., 2008).

3. Eksperimentalni deo

U voćnim sokovima posmatrano je 12 pesticida koji pripadaju različitim hemijskim grupama. Analitički standardi za acefat (97,0 %), acetamiprid (99,5 %), atrazin (99,0 %), karbendazim (99,1 %), karbofuran (99,2 %), dimetoat (98,9 %), diuron (99,0 %), malation (97,7 %), monokrotofos (99,9 %), simazin (99,0 %) i tebufenozid (95,0 %) su nabavljeni od Riedel-de Haën (Seelze, Nemačka), dok je standard DNOC-a (99,5 %) nabavljen od firme Supelco (Bellfonte, USA). Nazivi, molekulske mase i strukture su predstavljene u tabeli 7.

Tabela 7. Nazivi, molekulske mase i strukture pesticida analiziranih u ekstraktima voćnog soka.

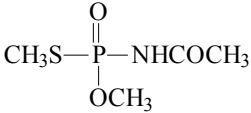
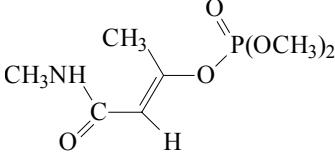
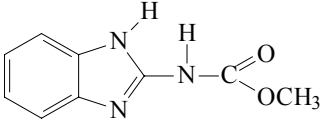
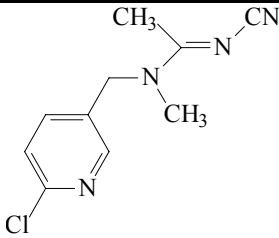
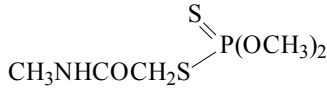
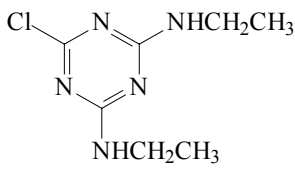
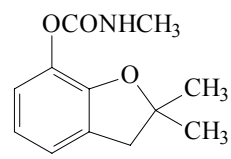
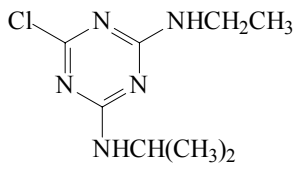
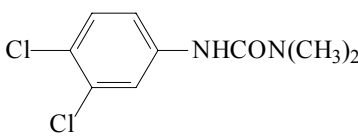
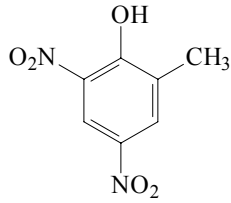
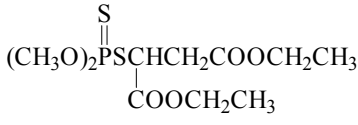
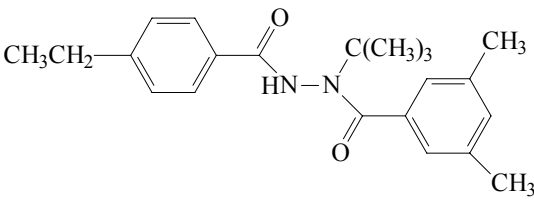
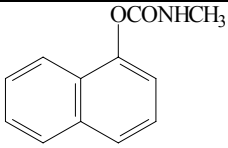
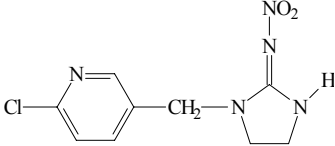
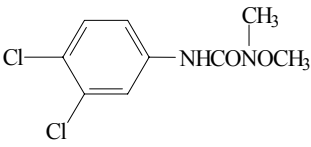
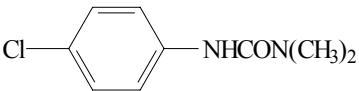
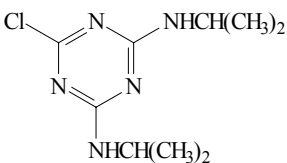
Pesticid	Mw	Hemijska struktura
Acefat C ₄ H ₁₀ NO ₃ PS	183,2	
Monokrotofos C ₇ H ₁₄ NO ₅ P	223,2	
Karbendazim C ₉ H ₉ N ₃ O ₂	191,2	

Tabela 7. nastavak

Pesticid	Mw	Hemijska struktura
Acetamiprid C ₁₀ H ₁₁ ClN ₄	222,7	
Dimetoat C ₅ H ₁₂ NO ₃ PS ₂	229,3	
Simazin C ₇ H ₁₂ ClN ₅	201,7	
Karbofuran C ₁₂ H ₁₅ NO ₃	221,3	
Atrazin C ₈ H ₁₄ ClN ₅	215,7	
Diuron C ₉ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O	233,1	
DNOC C ₇ H ₆ N ₂ O ₅	198,1	
Malation C ₁₀ H ₁₉ O ₆ PS ₂	330,4	
Tebufenozid C ₂₂ H ₂₈ N ₂ O ₂	352,5	

U voću je analizirano ukupno 16 pesticida. Jedanest pesticida su isti kao u slučaju voćnih sokova tj. u analizi voća nije bio posmatran DNOC, međutim metoda je proširena sa pet novih pesticida koji pripadaju nekim od analiziranih hemijskih grupa. Anlitički standardi za karbaril (99,8 %), imidaklopid (99,9 %), linuron (99,7 %), monuron (99,0 %) i propazin (99,0 %) su nabavljeni od Riedel-de Haën (Seelze, Nemačka). Nazivi, molekulske mase i strukture za navedenih pet pesticida su predstavljene u tabeli 8.

Tabela 8. Nazivi, molekulska mase i strukture dodatnih pet pesticida analiziranih u voću.

Pesticid	Mw	Hemijska struktura
Karbaril $C_{12}H_{11}NO_2$	201,2	
Imidaklopid $C_9H_{10}ClN_5O_2$	255,7	
Linuron $C_9H_{10}Cl_2N_2O_2$	249,1	
Monuron $C_9H_{11}ClN_2O$	198,7	
Propazin $C_9H_{16}ClN_5$	229,7	

3.1. Rastvori odabranih pesticida i reagensi

Osnovni standardni rastvori za sve pesticide pripremljeni su u metanolu tako da je koncentracija iznosila $0,1 \text{ mg cm}^{-3}$, osim u slučaju karbendazima gde je osnovni standardni rastvor bio koncentracije od $0,05 \text{ mg cm}^{-3}$, zbog njegove slabe

rastvorljivosti. Radni standardni rastvor dobijen je mešanjem odgovarajućih zapremina pojedinačnih standardnih rastvora da bi se dobila krajnja koncentracija od $2 \mu\text{g cm}^{-3}$. Svi rastvori čuvani su na 4°C . Za podešavanje pH vrednosti uzoraka korišćen je rastvor hlorovodonične kiseline, koncentracije 1 mol dm^{-3} , kao i rastvor amonijaka, koncentracije 5 mol dm^{-3} . Svi reagensi bili su analitičke čistoće (proizvođači Fluka ili Sigma Aldrich). Adsorbens je bio dijatomejska zemlja (prizvođač Sigma). Dejonizovana voda je dobijena propuštanjem česmenske vode kroz GenPure sistem za dejonizaciju vode (TKA, Niederelbert, Nemačka).

3.2. Uzorci voćnih sokova

Komercijalno dostupni sokovi od jabuke, breskve, narandže i maline su korišćeni pri optimizaciji i validaciji analitičke metode. Za analizu realnih uzoraka odabrano je ukupno 20 sokova različitih domaćih proizvođača.

3.3. Uzorci voća

Voće za analizu (jagoda, malina, višnja, trešnja, breskva, kajsija, jabuka, narandža i mandarina) je nabavljeno na beogradskim pijacama i marketima. Validacija analitičke metode je sprovedena prema smernicama Evropske komisije, SANCO 2011 u predstavnicima namirnica sa visokim sadržajem vode (kajsija i jabuka) i sa visokom kiselošću i visokim sadržajem vode (narandža i jagoda). Tragovi pesticida su analizirani pomoću predložene metode u 42 uzorka voća. Svi uzorci su analizirani bez predhodnog skladištenja.

3.4. MSPD procedura

3.4.1. Uzorci voćnih sokova

Uzorak voćnog soka, sa predhodno podešenom pH vrednošću, sonifikovan je 15 minuta u ultrazvučnom kupatilu. Zatim je 1 cm^3 uzorka voćnog soka pomešan sa 1 g dijatomejske zemlje i 5 minuta homogenizovan u avanu sa tučkom. Praškasta smeša je prenetu u kolonu za ekstrakciju na čvstoj fazi (SPE), zapremine 6 cm^3 . Korišćene su dve

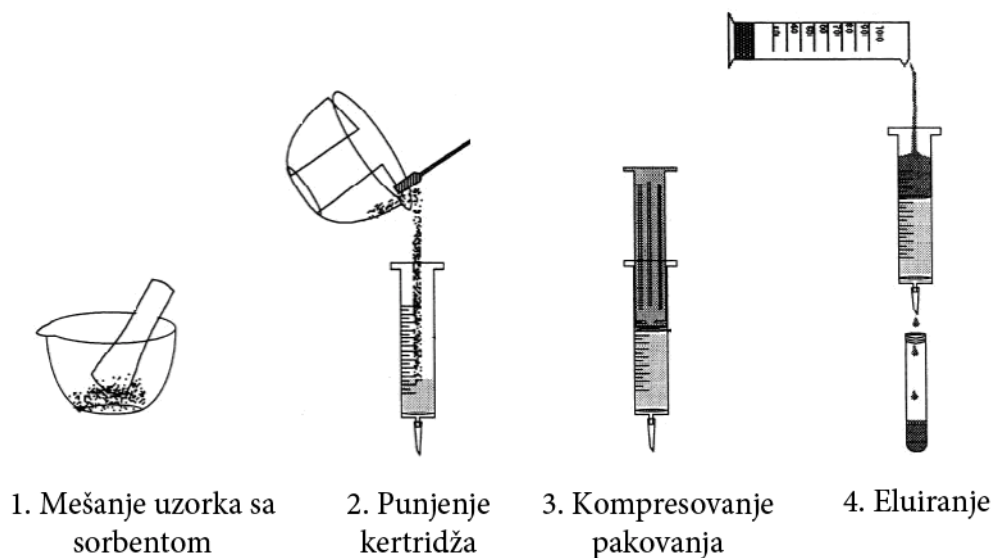
teflonske frite da zadržavaju pakovanje kolone. SPE kolona je postavljena na vakuum manifold i sušena tokom 5 minuta. Zatim je kolona natopljena sa oko 5 cm³ dihlormetana. Nakon 1 minuta, bez primene vakuuma, pri protoku od oko 0,5 cm³ min⁻¹, kolona je eluirana sa ukupno 10 cm³ dihlormetana. Dobijeni ekstrakti sakupljani su u graduisanim kivetama i uparavani u struji azota, u vodenom kupatilu na 30 °C, do zapremine od suva. Suvi ostatak je rekonstituisan u 0,4 cm³ metanola. Ovako dobijeni ekstrakti su promućkani pomoću vorteksa i filtrirani kroz najlonski filter za špric, veličine pora 0,45 μm i analizirani. Dobijeni faktor pretkoncentrisanja je 2,5. Šema opisanog postupka je prikazana na slici 5.

Uzorci voćnog soka za ispitivanje prinosa metode (engl. recovery) pripremljeni su dodatkom standardnog rastvora smeše pesticida, koncentracije 2 μg cm⁻³, tako da očekivane koncentracije, nakon MSPD procedure, iznose 10, 50, 100, 250 i 500 ng cm⁻³. Tako pripremljeni uzorci ostavljeni su 15 min u ultrazvučnom kupatilu na sobnoj temperaturi. Kao kontrolni uzorci korišćeni su uzorci soka bez dodatka standardnog rastvora.

3.4.2. Uzorci voća

Deo uzorka voća, 200 g, je isečen na sitne komade i homogenizovan pomoću blendera. pH uzorka je podešen pomoću 5 mol dm⁻³ amonijaka i ostavljen 15 minuta u ultrazvučnom kupatilu. Nakon sonificiranja 1 g uzorka voća pomešan je sa 1 g dijatomejske zemlje i 5 minuta homogenizovan u avanu sa tučkom. Dalja priprema uzorka je identična kao kod voćnog soka. Dobijeni faktor pretkoncentrisanja je 2,5.

Za određivanje prinosa metode, uzorci voća su pripremljeni mešanjem odgovarajuće zapremine mešanog standarda pesticida, koncentracije 2 μg cm⁻³, sa 10 g homogenizovanog voća tako da su očekivane koncentracije nakon MSPD procedure, iznosile 10, 50, 100, 250 i 500 ng cm⁻³. Ovako pripremljeni uzorci su ostavljeni na sobnoj temperaturi 1 h, da se uravnoteže, i zatim sonificirani u ultrazvučnom kupatilu 15 minuta. Kao slepa proba korišćeni su uzorci bez dodatog standarda smeše pesticida.



Slika 5. Šematski prikaz MSPD tehnike pripreme uzorka

3.4.3. Kalibracija

Za svaku matricu pripremani su standardi koji odgovaraju matrici (matrix-matched) koji su pripremljeni dodavanjem odgovarajuće zapremine mešanog standarda pesticida u ekstrakt dobijen nakon MSPD procedure. Standardi su pripremljeni u opsegu koncentracija od 10 do 500 ng cm⁻³

3.5. LC-MS² metoda

U ovom radu korišćen je Surveyor HPLC sistem (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Reverzno-fazno razdvajanje analita izvršeno je na Zorbax Eclipse® XDB-C18 koloni (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), dimenzija 4,6 mm x 75 mm, veličine čestica od 3,5 μm. Ispred kolone postavljena je predkolona istog proizvođača, dimenzija 4,6 mm x 12,5 mm, veličine čestica od 5 μm. Za hromatografsko razdvajanje mobilna faza se sastojala od ultračiste vode (A), metanola (B) i 10% (v/v) vodenog rastvora sirćetne kiseline. Optimalno razdvajanje analita je

postignuto pomoću gradijenta prikazanog u tabeli 9. Hromatografske metode korišćene za voće i voćene sokove razlikuju se u gradijentu kiseline. Naime, kod voćnih sokova DNOC je analiziran kao negativan jon kojem ne pogoduje kisela sredina usled čega imamo gradijent kiseline u toku hromatografskog razdvajanja. Kod voća DNOC nije analiziran pa je procenat kiseline držan konstantnim. Nakon hromatografskog razdvajanja početni uslovi su uspostavljeni tokom 15 min. Protok mobilne faze bio je $0,5 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. U HPLC sistem je unošeno $0,01 \text{ cm}^3$ ($10 \mu\text{l}$) uzorka.

Tabela 9. Sastav i gradijent mobilne faze za hromatografsko razdvajanje ispitivanih pesticida u ekstraktima voćnog soka i voća.

Vreme (min)	Protok ($\text{cm}^3 \text{ min}^{-1}$)	H ₂ O (%)	CH ₃ OH (%)	10% CH ₃ COOH (%)
Mobilna faza korišćena za analizu ekstrakta voćnih sokova				
0	0,5	66	33	1
7,5	0,5	41,4	58	0,6
25	0,5	100	0	0
27	0,5	100	0	0
27,01	0,5	66	33	1
40	0,5	66	33	1
Mobilna faza korišćena za analizu ekstrakta voća				
0	0,5	66	33	1
7,5	0,5	41	58	1
25	0,5	99	0	1
27	0,5	99	0	1
27,01	0,5	66	33	1
40	0,5	66	33	1

Maseni spektri dobijeni su korišćenjem LCQ Advantage (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) masenog spektrometra sa jonskim trapom. Korišćena je elektrosprej jonizaciona tehnika. Svi pesticidi su analizirani u pozitivnom režimu rada jonskog izvora, pozitivnom modu, osim DNOC-a koji je analiziran u negativnom režimu rada jonskog izvora, negativnom modu. Utvrđeno je da je su za detektovanje svih analita optimalni sledeći parametri jonskog izvora: temperatura kapilare ($290 \text{ }^\circ\text{C}$), protok azota (26 au za osnovni tok i 3 au za pomoćni tok azota; au – arbitrary units, jedinice na skali od 0–100 koje su definisane LCQ Advantage sistemom), i napon izvora (4,5 kV). Obrada rezultata izvršena je pomoću softverskog paketa Xcalibur v. 1.3 (Thermo, USA). Za većinu posmatranih pesticida odabran je protonovani molekul,

$[M+H]^+$ kao prekursor jon. U slučaju DNOC-a i tebufenozida prekursor joni su bili deprotonovani molekul, $[M-H]^-$, i adukt sa natrijumom $[M+Na]^+$, respektivno. Fragmentacije izolovanih prekursora su izvršene pod optimizovanim uslovima koji su navedeni u tabeli 10 za voćne sokove, i u tabeli 19 za voće (Rezultati i diskusija). Kvantifikacija analita je izvršena preko najintenzivnijeg fragmentnog jona za sve analite osim za DNOC koji je kvantifikovan preko protonovanog molekulskog jona. Akvizicija je podeljena u pet vremenskih segmenata, tokom jednog segmenta su posmatrane 2–4 reakcije fragmentacije.

3.5.1. Potvrda prisustva analita

Prisustvo analita u uzorku je potvrđeno pomoću metoda koje sadrže karakteristične MS, MS², MS³ i/ili MS⁴ prelaze. Ovakve metode su razvijene za sve pesticide pojedinačno, a sprovode se pod već opisanim hromatografskim uslovima. Bolja osetljivost za DNOC je postignuta pomoću hemijske jonizacije pod atmosferskim pritiskom (engl. Atmospheric Pressure Chemical Ionization–APCI). Metod za potvrdu prisustva DNOC-a u uzorcima je optimizovan pomoću APCI jonizacionog izvora. Optimizovani radni parametri su bili sledeći: napon izvora (4,5 kV), temperatura isparivača (450 °C), temperatura kapilare (200 °C) i protok azota (20 au, osnovni tok).

4. Rezultati i diskusija

4.1. Voćni sokovi

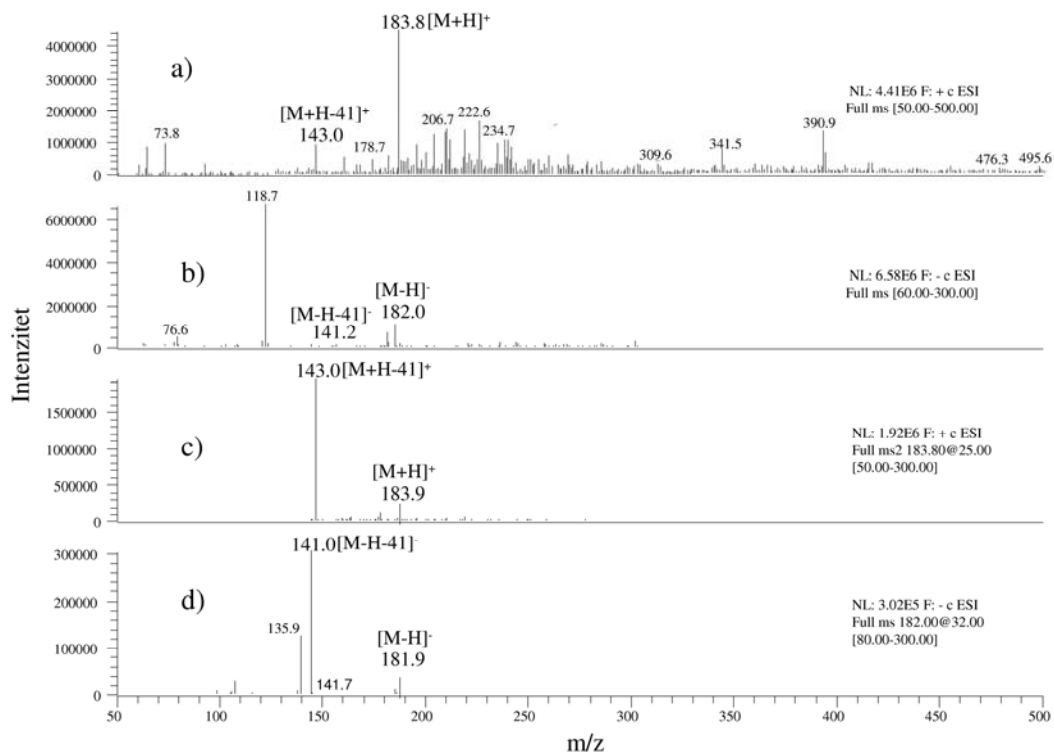
4.1.1. Snimanje masenih spektara i optimizacija hromatografskog razdvajanja

4.1.1.1. Snimanje masenih spektara

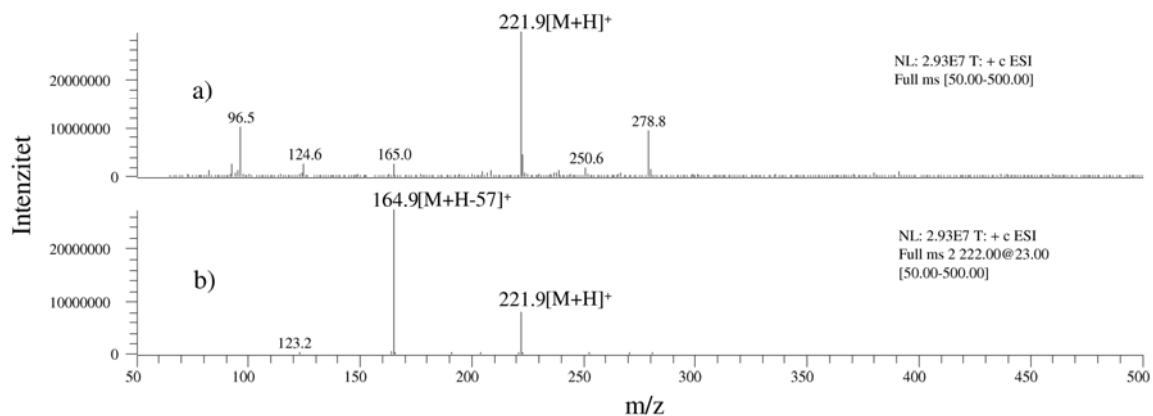
Preliminarni eksperimenti su izvršeni u cilju pronalaska najpovoljnijih instrumentalnih uslova koji bi omogućili nedvosmisleni identifikaciju i kvantifikaciju posmatranih analita u realnim uzorcima. Optimizacija instrumentalnih uslova masenog detektora izvršena je snimanjem rastvora pesticida koncentracije $10 \mu\text{g cm}^{-3}$. Standardni rastvori su uvođeni pomoću špric pumpe brzinom od $5 \mu\text{l min}^{-1}$ u struju mobilne faze sastava 66/33/1 (A/B/C) i protoka $0,5 \text{ cm}^{-3} \text{ min}^{-1}$. Snimanjem masenih spektara u opsegu od 50 do 500 m/z u pozitivnom (ESI+) i negativnom (ESI-) režimu rada elektrosprej jonizacionog izvora, izvršena je identifikacija jona. Monokrotofos, dimetoat, karbofuran, atrazin i simazin grade isključivo samo protonovane molekule, $[\text{M}+\text{H}]^+$. Acefat, karbendazim i tebufenozid grade osim protonovanih, $[\text{M}+\text{H}]^+$, i deprotonovane molekule, $[\text{M}-\text{H}]^-$. Diuron i acetamiprid grade i adukte sa anjonom acetata, $[\text{M}+\text{OAc}]^-$, u negativnom režimu rada ESI izvora. Međutim, odgovor detektora za ESI- je deset puta niži nego u slučaju ESI+. Kod malationa i tebufenozida dolazi i do formiranja veoma stabilnih adukata sa katijonima amonijaka ($[\text{M}+\text{NH}_4]^+$) i natrijuma ($[\text{M}+\text{Na}]^+$), respektivno. DNOC gradi isključivo $[\text{M}-\text{H}]^-$ jone. U daljoj optimizaciji i

analizi za sve pesticide, osim za DNOC, snimani su pozitivni ESI maseni spektri. Optimizacija uslova za određivanje DNOC-a vršena je snimanjem negativnih masenih spektara. Maseni spektri analita, na osnovu kojih odabrani prekursor joni i reakcije fragmentacije u najintenzivnije i najstabilnije fragmentne jone prikazani su na slikama 6-17.

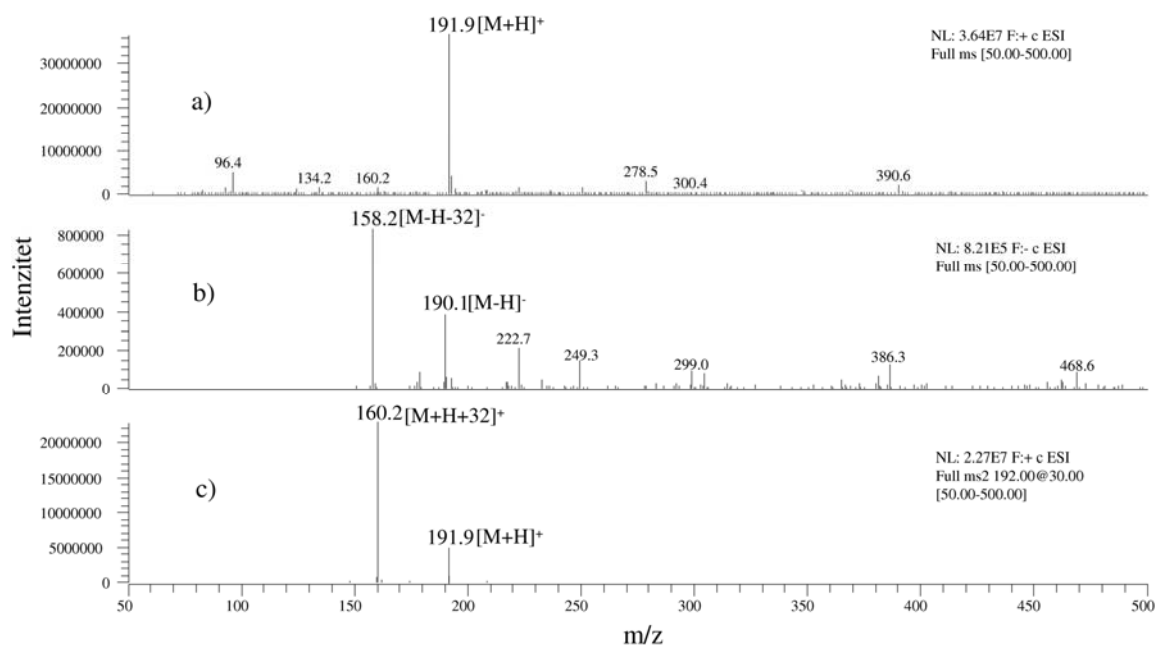
Kao prekursor joni za većinu pesticida odabrani su protonovani molekuli $[M+H]^+$. U slučaju tebufenozida fragmentacijom protonovanog molekula nije bilo moguće dobiti stabilan fragment, međutim fragmentacijom adukta sa katijonom natrijuma ($[M+Na]^+$), dobijen je veoma stabilan fragment koji je dalje korišćen za kvantifikaciju ovog analita. Nakon odabira prekursor jona za svaki analit, u daljoj MS^n analizi optimizovana je koliziona energija tj. energija sudara sa atomima helijuma, za dobijanje stabilnih i intenzivnih fragmentnih jona. Vrednosti kolizione energije izražene su u procentima, na skali 0–100% koja je definisana LCQ sistemom. Dobijeni MS^n spektri su prikazani na slikama 32–42 u prilogu, a rezultati optimizacije MS^2 analize su sumarno dati u tabeli 10. Za većinu odabranih analita bilo je karakteristično da sa MS^2 fragmentacijom nastaje više od jednog fragmentnog jona. Većinu ovako dobijenih fragmentnih jona bilo je moguće dalje fragmentisati (MS^3 analiza). Značajan broj analita takođe daje i MS^4 spektre. Na osnovu dobijenih rezultata, za svaki analit je odabrana karakteristična reakcija fragmentacije prekursor jona u najintenzivniji i stabilniji fragmentni jon na osnovu koje je vršena kvantifikacija odabranih analita. Dodatne MS^n reakcije su korišćene za potvrdu prisustva analita u uzorku. U slučaju DNOC-a fragmentacijom deprotonovanog molekula nije dobijen fragment koji je dovoljno stabilan da se može iskoristiti u daljoj analizi. Određivanje DNOC-a je dalje vršeno posmatranjem njegovog $[M-H]^-$ jona.



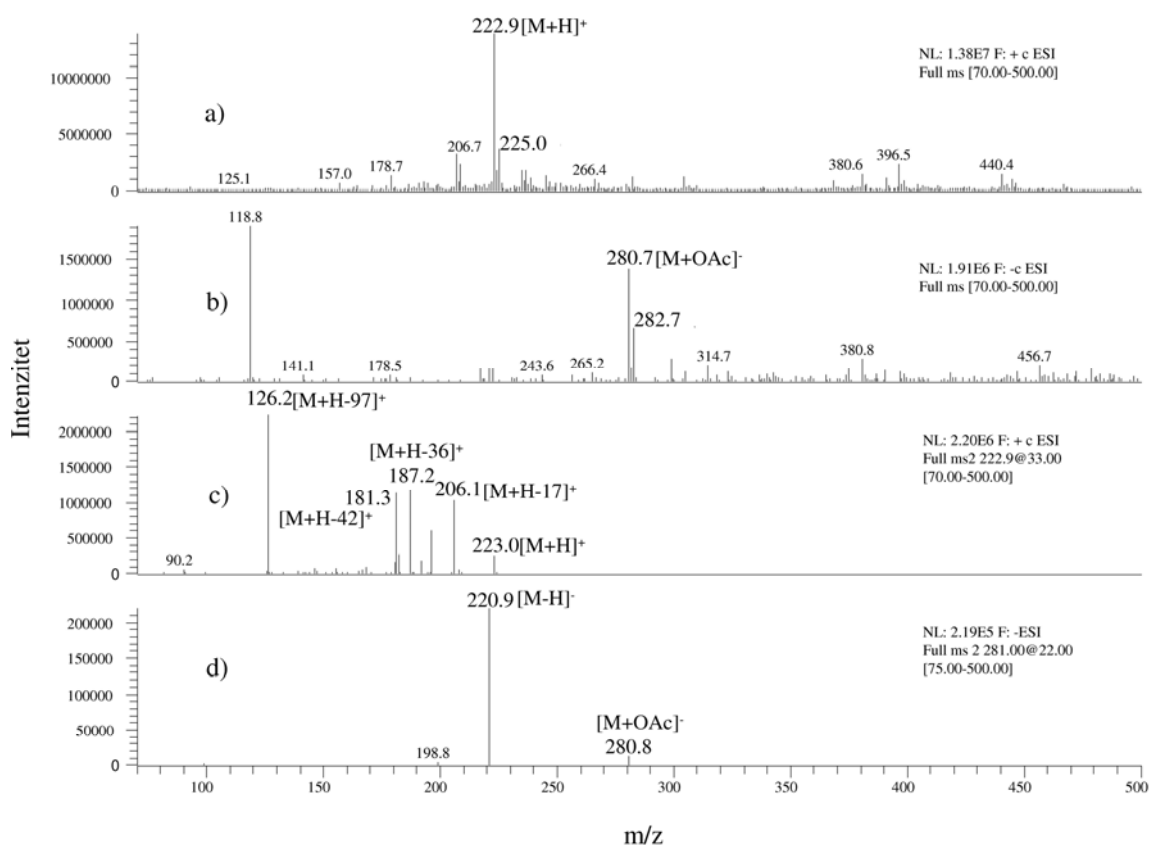
Slika 6. Maseni spektri acefata: a) MS (ESI+); b) MS (ESI-); c) MS² (ESI+); d) MS² (ESI-).



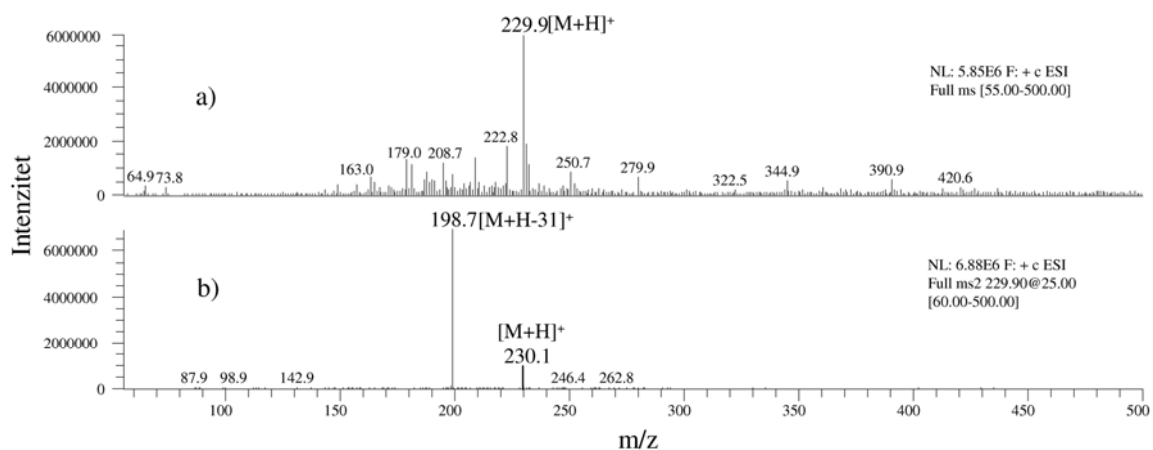
Slika 7. Maseni spektri monokrotofosa: a) MS (ESI+); b) MS² (ESI+).



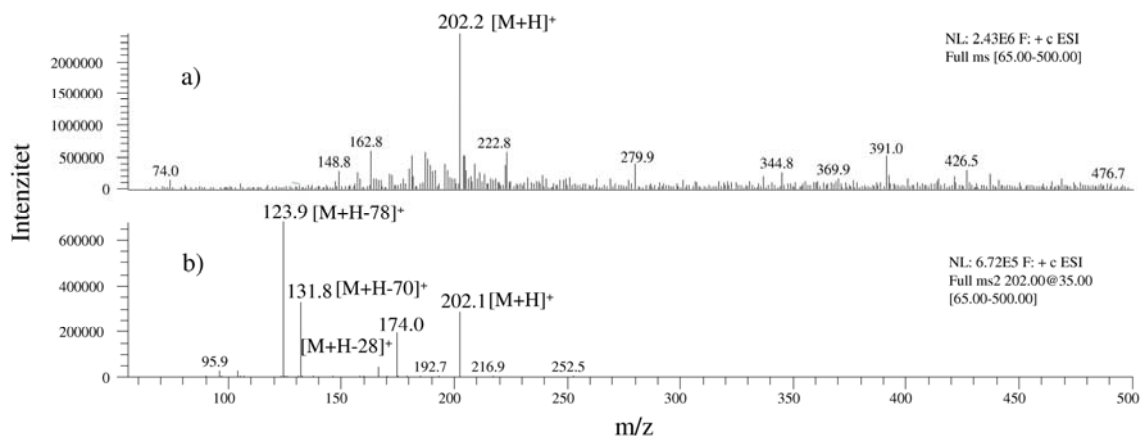
Slika 8. Maseni spektri karbendazima: a) MS (ESI⁺); b) MS (ESI⁻); c) MS² (ESI⁺).



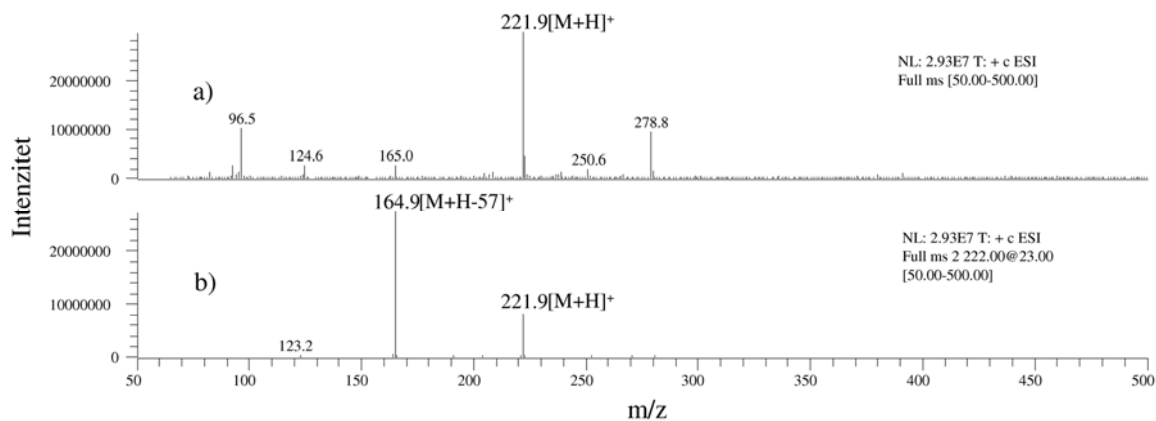
Slika 9. Maseni spektri acetamiprida: a) MS (ESI⁺); b) MS (ESI⁻); c) MS² (ESI⁺); d) MS² (ESI⁻).



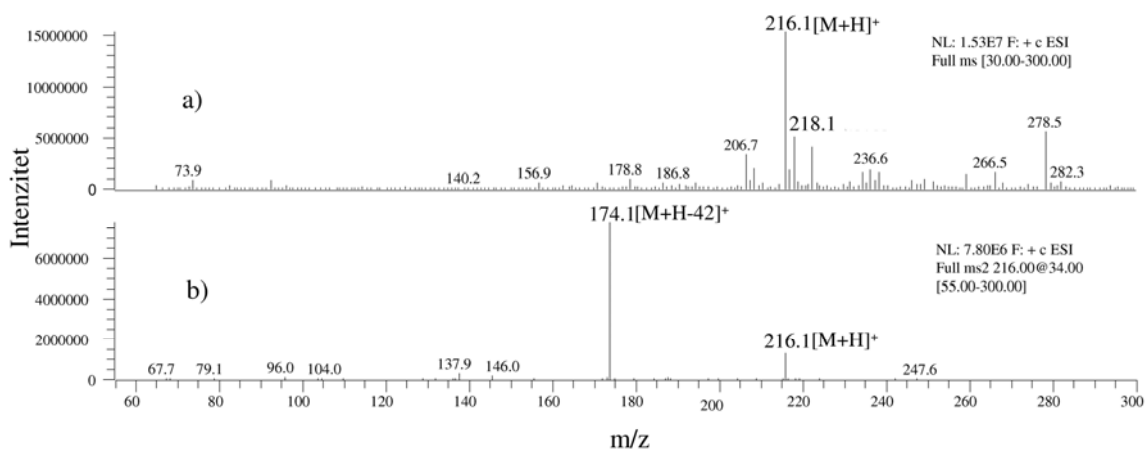
Slika 10. Maseni spektri dimetoata: a) MS (ESI+); c) MS² (ESI+).



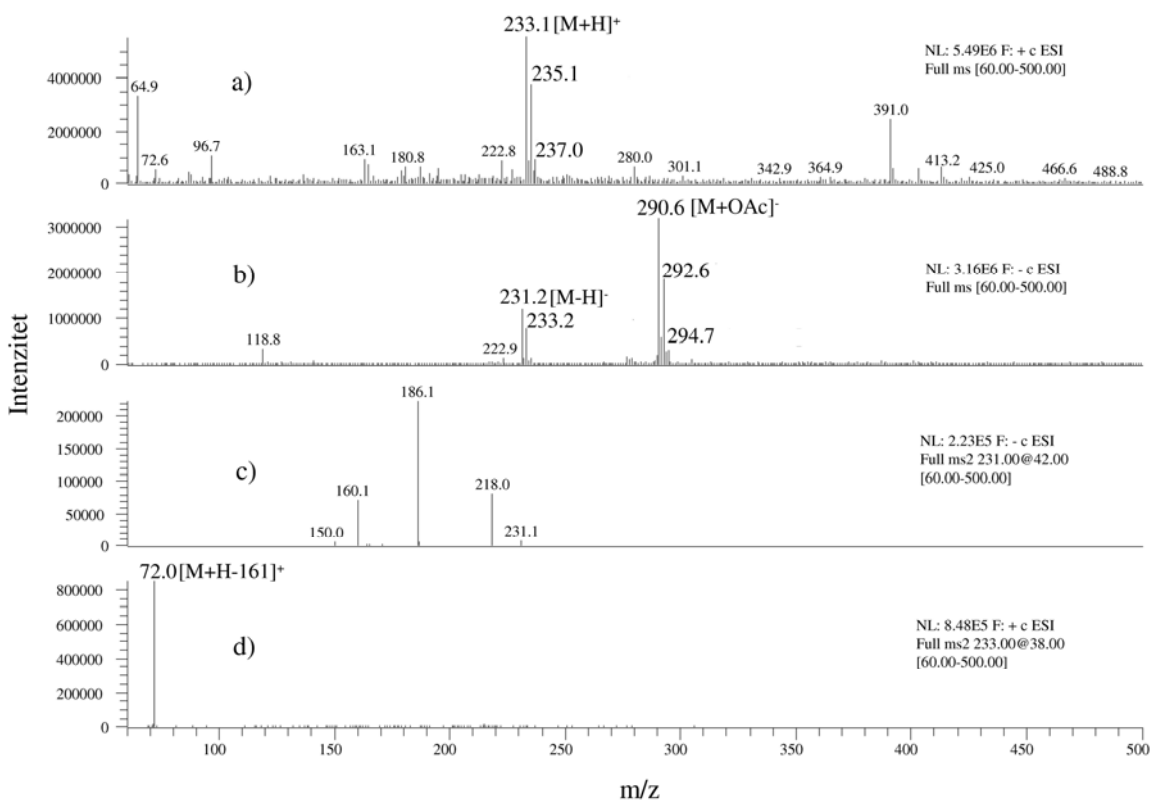
Slika 11. Maseni spektri simazina: a) MS (ESI+); c) MS² (ESI+).



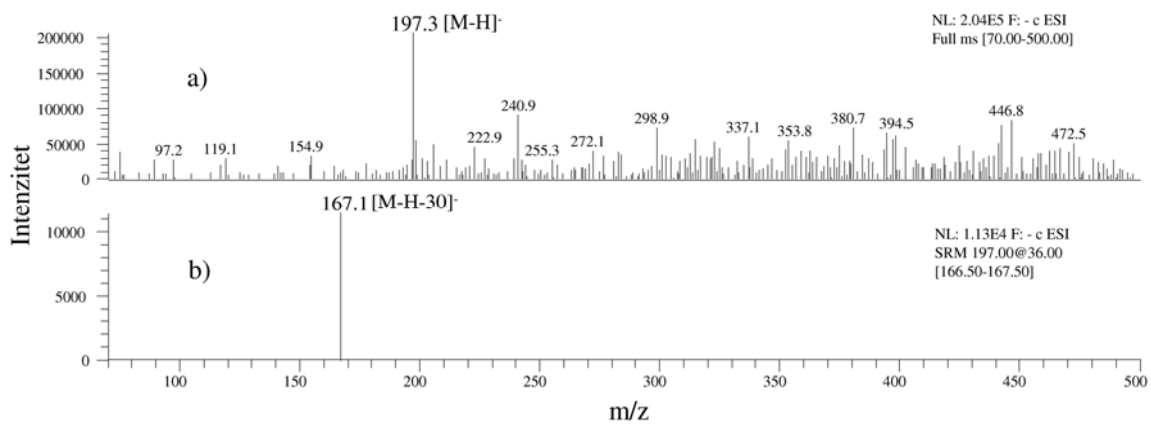
Slika 12. Maseni spektri karbofurana: a) MS (ESI+); c) MS² (ESI+).



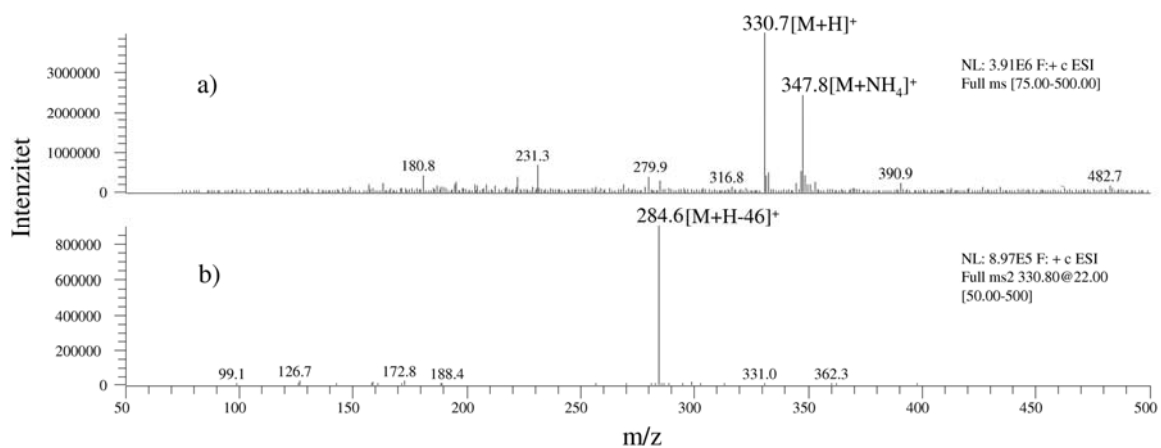
Slika 13. Maseni spektri atrazina: a) MS (ESI+); c) MS² (ESI+).



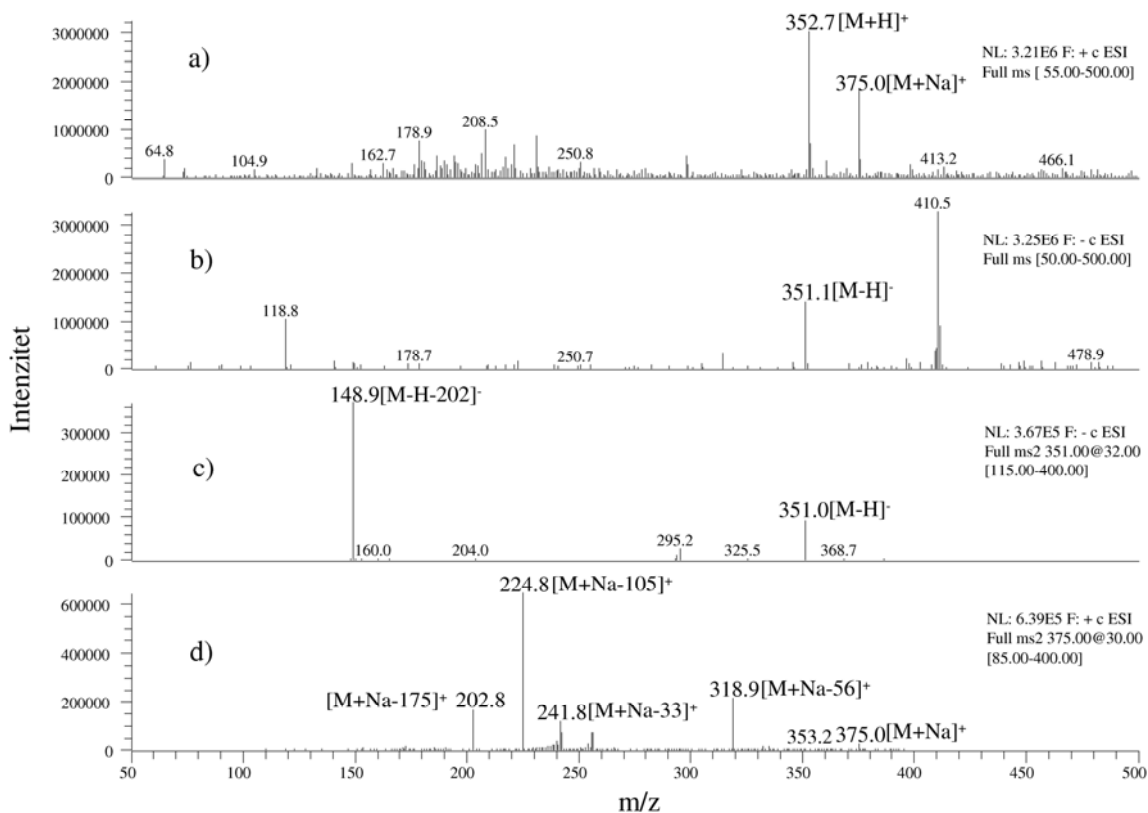
Slika 14. Maseni spektri diurona: a) MS (ESI+); b) MS (ESI-); c) MS² (ESI-); d) MS² (ESI+).



Slika 15. Maseni spektri DNOC-a: a) MS (ESI⁻); b) MS² (ESI⁻).



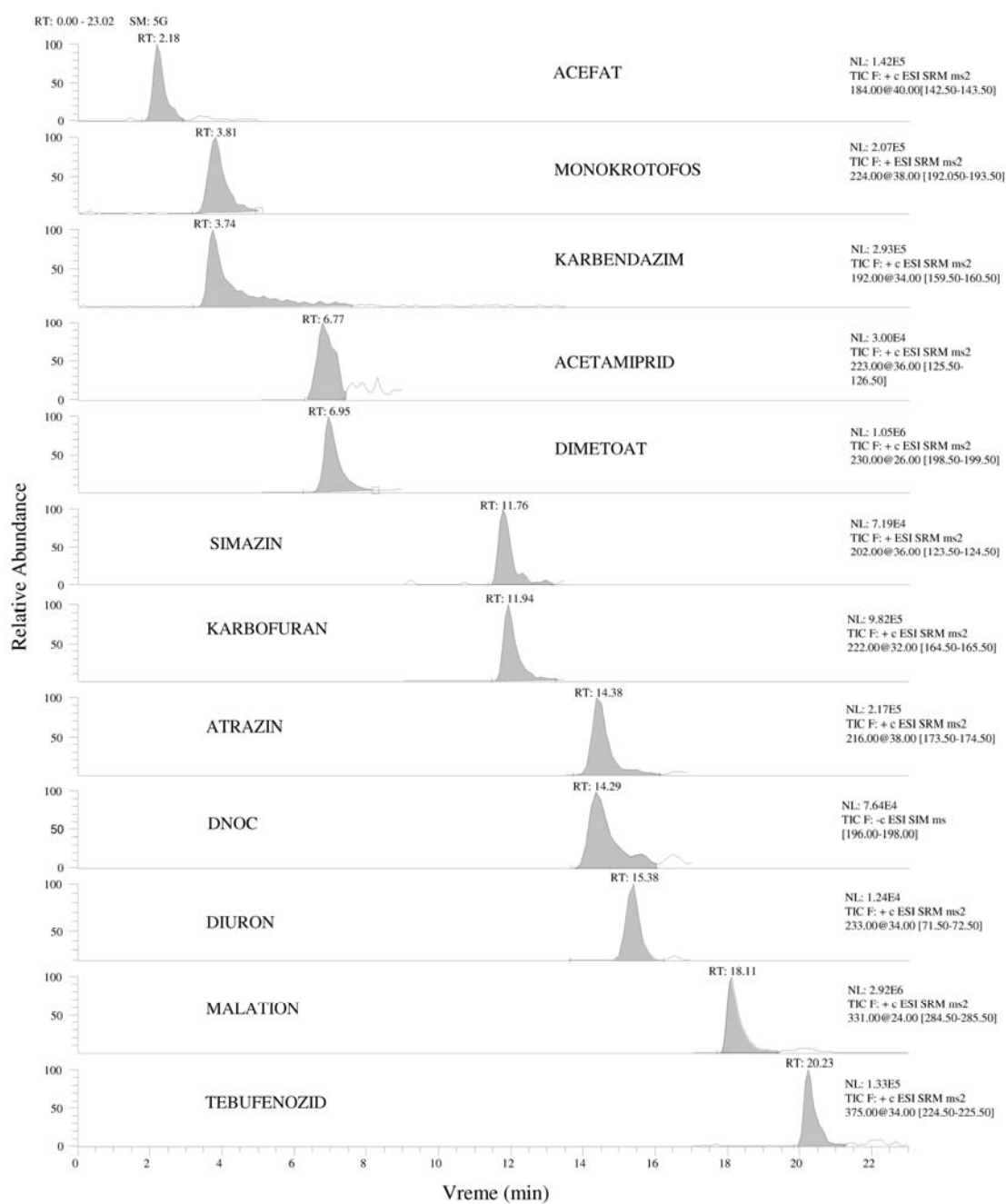
Slika 16. Maseni spektri malationa: a) MS (ESI⁺); b) MS² (ESI⁺).



Slika 17. Maseni spektri tebufenozida: a) MS (ESI+); b) MS (ESI-); c) MS² (ESI-); d) MS² (ESI+).

4.1.1.2. Optimizacija hromatografskog razdvajanja

Snimanjem odabranih fragmentnih jona (engl. Selected Reaction Monitoring–SRM) tokom HPLC-MS² analize dobijen je hromatogram odabrane reakcije. SRM detekcija je podjeljena u pet vremenskih segmenata tokom kojih su posmatrana 2–3 analita kao što je prikazano u tabeli 10. Analiza pomoću masenog detektora je moguća i bez kompletnog hromatografskog razdvajanja analita pošto je veoma mala verovatnoća da dva analita imaju isto retenciono vreme i da se na isti način fragmentišu (Køppen & Spliid, 1998). Međutim, da bi se obezbedila zadovoljavajuća osetljivost metode, neophodno je podeliti snimanje analita, tokom hromatografskog razdvajanja, u vremenske segmente. Naime, osetljivost MS detektora opada sa porastom analita koji se simultano posmatraju. Na slici 18 prikazani su SRM maseni hromatogrami smeše pesticida, koncentracije 10 ng cm⁻³ u ekstraktu soka od maline.



Slika 18. SRM maseni hromatogrami smeše pesticida u ekstraktu soka od maline koncentracije 10 ng cm^{-3} .

Tabela 10. LC–MS i MS² parametri, optimizovani za kvantifikaciju odabranih pesticida.

Pesticid	Vremenski segment	Vreme (min)	Prekursor jon (<i>m/z</i>)	Izolacioni opseg za prekursor jon	Fragmentni jon (<i>m/z</i>)	Kolizijska energija (%)
Acefat	I	0.0–5.0	184	2	143	40
Monokrotofos	I	0.0–5.0	224	2	193	38
Karbendazim	I i II	0.0–9.0	192	1	160	34
Acetamiprid	II	5.0–9.0	223	1	126	36
Dimetoat	II	5.0–9.0	230	2	199	26
Simazin	III	9.0–13.5	202	1	124	36
Karbofuran	III	9.0–13.5	222	2	165	32
Atrazin	IV	13.5–17.0	216	1	174	38
Diuron	IV	13.5–17.0	233	1	72	34
DNOC	IV	13.5–17.0	197	1	–	–
Malation	V	17.0–23.0	331	2	285	24
Tebufenozid	V	17.0–23.0	375	2	225	34

4.1.2. Potvrda prisustva analita u uzorku

Analitički metod za određivanje pesticida, osim što mora da obezbedi preciznu kvantifikaciju, takođe mora da obezbedi i nedvosmislenu identifikaciju posmatranih analita koja nije podložna subjektivnom tumačenju analitičara (Pozo et al., 2005.). Posmatranjem samo jednog SRM prelaza ne može se garantovati sigurnost identifikacije. Iz tog razloga relevantne direktive upravo preporučuju posmatranje minimum dva SRM prelaza (SANCO, 2011; Commission Decision, 2002). Generalno, kada se koriste maseni spektrometri niske rezolucije kao što su jonski trap ili kvadrupol, zadovoljavajuća potvrda prisustva analita se može postići posmatranjem retencionog vremena, odnosa intenziteta jona i snimanjem više SRM prelaza (Pozo et al., 2005.).

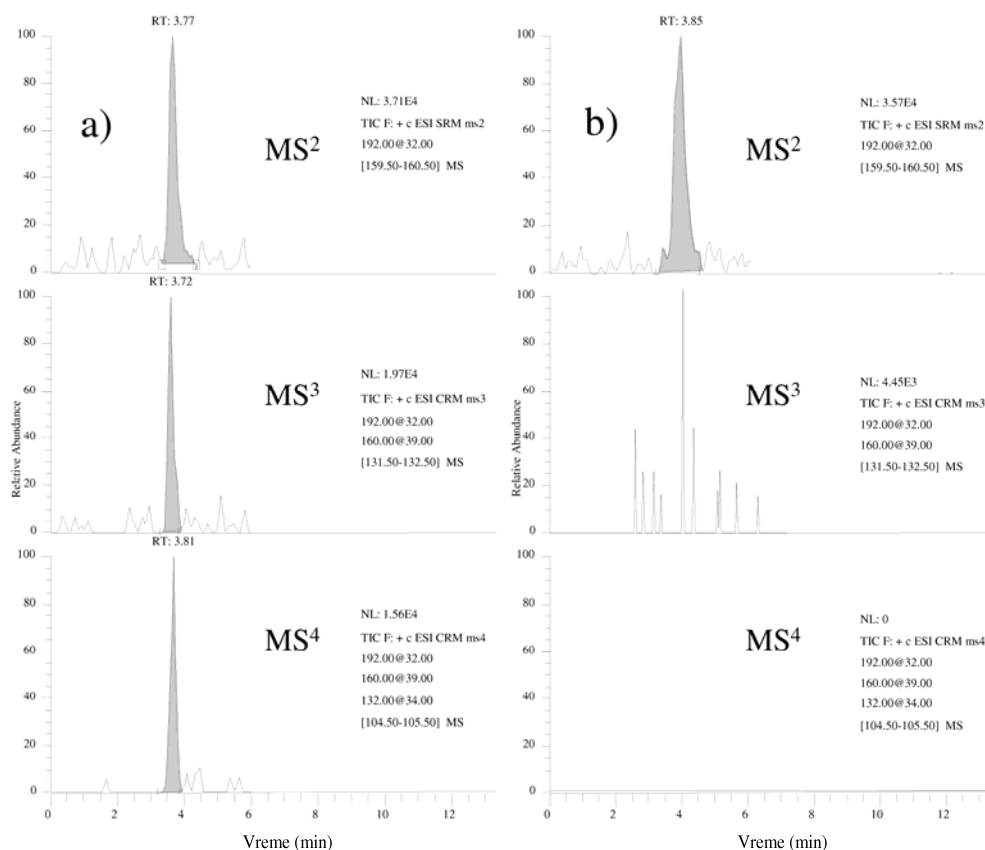
U cilju postizanja pouzdane potvrde prisustva analita u uzorku, razvijene su posebne metode, za svaki pesticid pojedinačno, koje su puštane pri naknadnom iniciranju uzorka. Naime, adekvatnu osetljivost i pouzdanu potvrdu analita je veoma teško postići u toku jednog snimanja uzorka, pošto posmatranje većeg broja jona

simultano, značajno umanjuje osetljivost masenog detektora (Brutti et al., 2010; Savant et al., 2010). Razvijene metode sadrže karakteristične MS, MS² i/ili MS³ prelaze.

Karakteristika većine posmatranih analita je da u MS² spektru, osim jona za kvantifikaciju, ne sadrže još jona dovoljnog intenziteta koji bi se mogli koristiti za potvrdu. Međutim, većinu dobijenih fragmeta pri MS² analizi je bilo moguće dalje fragmentisati tj. bila je moguća MS³ i MS⁴ analiza. Za svaku od posmatranih reakcija fragmentacije optimizovani su: izolacioni opseg, koliziona energija, aktivacioni q i aktivaciono vreme. Parametri aktivacioni q i aktivaciono vreme nisu imali veoma velikog uticaja na intenzitet fragmenata koji su korišćeni za kvantifikaciju analita. Međutim, u slučaju par pesticida, na intenzitet fragmenta koji su korišćeni za potvrdu prisustva analita, vrednosti ovih parametara imali su presudan značaj. Svakom jonu koji se nalazi unutar jonskog trapa odgovara jedna vrednost aktivacionog q . Ovaj parametar definiše RF frekvenciju koja je potrebna da bi se posmatrani jon fragmentisao. Jonima sa relativno visokim m/z odnosom odgovaraju niže vrednosti aktivacionog q (bliže kordinacionom početku, dijagram stabilnosti slika 4c), dok jonima sa nižim m/z odnosom odgovaraju veće vrednosti ovog parametra (March, 2000). Aktivaciono vreme je parametar koji definiše vremenski interval u toku kojeg deluje primenjena RF frekvencija za fragmentaciju. Uticaj ovih parametara najviše je bio primetan u slučaju karbendazima, za koji nije bilo moguće dobiti MS³ spektar radeći sa standardnim vrednostima aktivacionog q i aktivacionog vremena (slika 19). Za LCQ Advantage sistem, standardna vrednost za aktivacioni q je 0,25, dok je za aktivaciono vreme, 30 ms. Optimizovane vrednosti navedenih parametara su predstavljene u tabeli 11, joni koji su korišćeni za kvantitativno određivanje označeni su kurzivom.

U slučaju DNOC-a pod primenjenim hromatografskim uslovima nije bilo moguće dobiti stabilan fragment. Naime, u mobilnoj fazi korišćena je sirćetna kiselina koja favorizuje stvaranje protonovanih molekula, a ometa stvaranje deprotonovanih. Uklanjanjem kiseline iz mobilne faze, u slučaju DNOC-a, dobijen je mnogo intenzivniji MS signal, a i dobijeni fragmenti su bili značajno stabilniji. Međutim, ni pod ovim eksperimentalnim uslovima potvrda DNOC-a na niskim koncentracijama nije bila moguća. Imajući u vidu da je za jonizaciju manje polarnosti, kao što su fenolna jedinjenja, pogodnija hemijska jonizacija pod atmosferskim pritiskom (APCI), u metodi za potvrdu prisustva DNOC-a korišćena je ova tehnika jonizacije. Pomoću APCI

jonizacije tehnike i bez kiseline u mobilnoj fazi dobijen je intenzivan i stabilan MS, MS² i MS³ spektar (slika 40, prilog)



Slika 19. Maseni hromatogrami karbendazima dobijeni snimanjem koncentracije od 10 ng cm⁻³ u finalnom ekstraktu soka od narandže a) snimanje izvršeno sa podešenim parametrima q i aktivacionog vremena, vrednosti su navedene u tabeli 10; b) snimanje izvršeno sa standardnim vrednostima parametara q (0,25) i aktivacionog vremena (30 ms)

Tabela 11. Vrednosti MS instrumentalnih parametrov optimizovanih za vsaki analit: izolacioni opseg (IO), kolizijska energija (KE), aktivacijski q i aktivacijsko vreme (AV).

Pesticid	MS	IO	KE (%)	Aktivacijski q	AV (ms)	MS ²	IO	KE (%)	Aktivacijski q	AV (ms)	MS ³	IO	KE (%)	Aktivacijski q	AV (ms)	MS ⁴
Acefat	184	1.5	20	0.30	35	143	2.0	40	0.40	60	113	–	–	–	–	–
Monokrotofos	224	1.0	30	0.30	30	193	2.0	25	0.25	30	127	–	–	–	–	–
Karbendazim	192	1.5	32	0.30	40	160	1.0	39	0.40	45	132	1.0	34	0.37	26	105
Acetamidrid	223	1.0	33	0.30	20	126	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
						181	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
						187	1.0	34	0.35	45	146	–	–	–	–	–
						206	1.0	36	0.4	50	171	–	–	–	–	–
Dimetoat	230	2.0	26	0.25	30	199	2.0	25	0.25	30	171	1.0	27	0.30	30	143
Simazin	202	1.0	38	0.30	30	124	1.0	30	0.30	40	96	–	–	–	–	–
						132	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
						174	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Karbofuran	222	1.0	33	0.40	50	165	1.5	35	0.40	50	123	1.0	35	0.35	35	95
Atrazin	216	1.0	36	0.30	30	174	1.0	35	0.35	40	132	1.0	27	0.30	40	104
											146	–	–	–	–	–
											138	–	–	–	–	–
											96	–	–	–	–	–
											79	–	–	–	–	–
Diuron	233	2.0	35	0.25	50	72	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	235	2.0	35	0.25	50	72	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
DNOC ^a	197	1.5	35	0.25	30	167	1.0	35	0.25	30	137	–	–	–	–	–
						175	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Malation	331	1.5	22	0.25	30	285	2.0	19	0.25	30	127	2.0	23	0.25	30	99
Tebufenozid	375	2.0	30	0.21	30	225	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
						319	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
						242	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	353	4.0	30	0.25	30	297	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

^a - umesto ESI jonizacije tehnike, korišćena je APCI jonizacijska tehnika; snimani su negativni joni i mobilna faza ne sadrži kiselinu

Tabela 12. Odnosi intenziteta fragmentnih jona za sve analizirane pesticide

Pesticid	Prekursor jon	Fragment [1]	Fragment [2]	Fragment [3]	Standardi u metanolu		Standardi koji odgovaraju matrici	
					[2]/[1] (RSD, %)	[3]/[1] (RSD, %)	[2]/[1] (RSD, %)	[3]/[1] (RSD, %)
Acefat	184 [M+H] ⁺	143	113	–	0,20 (30)	–	0,18 (28)	–
Monokrotofos	224 [M+H] ⁺	193	127	–	0,64 (15)	–	0,90 (16)	–
Karbendazim	192 [M+H] ⁺	160	132	105	0,83 (14)	0,46 (7)	0,45 (20)	0,32 (21)
Acetamiprid	223 [M+H] ⁺	126	187	146	0,32 (27)	0,19 (32)	0,36 (9)	0,20 (11)
Dimetoat	230 [M+H] ⁺	199	171	143	0,59 (5)	0,38 (5)	0,57 (10)	0,36 (23)
Simazin	202 [M+H] ⁺	124	96	104	0,60 (12)	0,31 (58)	0,55 (17)	0,35 (58)
Karbofuran	222 [M+H] ⁺	165	123	95	0,54 (6)	0,14 (24)	0,52 (6)	0,13 (24)
Atrazin	216 [M+H] ⁺	174	132	104	0,52 (3)	0,35 (5)	0,66 (14)	0,34 (26)
Diuron	233 [M+H] ⁺	72	–	–	–	–	–	–
	235 [M+H] ⁺	–	72	–	0,70 (11)	–	0,83 (15)	–
DNOC	197 [M–H] [–]	167	137	–	0,29 (10)	–	0,42 (15)	–
Malation	331 [M+H] ⁺	285	127	99	0,51 (14)	0,14 (20)	0,35 (7)	0,15 (38)
Tebufenozid	375 [M+Na] ⁺	225	–	–	–	–	–	–
	353 [M+H] ⁺	–	297	–	0,57 (8)	–	0,71 (18)	–

Efikasnost metoda za potvrdu analita u uzorku, testirana je upoređivanjem intenziteta signala analita standarda u metanolu i standarda koji odgovaraju matrici, koncentracije 10 ng cm^{-3} . Odnos intenziteta jona dobijen je kao količnik površina signala najintenzivnijih jona (tabela 12). Po evropskim smernicama za određivanje pesticida u hrani (SANCO, 2011), RSD za odnose intenziteta jona može da bude od 20 do 50 %. Koliki će RSD biti prihvatljiv zavisi od samog odnosa intenziteta jona. Za jone manjeg intenziteta, u odnosu na osnovni pik ($<10\%$), dozvoljen je maksimalni RSD od 50%, za jone čiji je intenzitet 50% u odnosu na osnovni dozvoljeni RSD je 20%. Dobijena ponovljivost za odnose intenziteta jona u slučaju posmatranih pesticida jako dobro se uklopila u preporučene zahteve. U slučaju simazina u jednom slučaju je dobijena loša ponovljivost, što čini tu reakciju fragmentacije nepodobnom za potvrdu prisustva analita u uzorku.

4.1.3. Priprema uzorka

Prvi korak u razvoju MSPD metode bio je utvrđivanje odnosa u kome treba pomešati sok i adsorbens. Neophodno je obezbediti potpunu adsorpciju soka, kao i dobijanje dovoljno praškaste smeše za lako prenošenje u kolonu i kontinualno eluiranje. Metodom probe i greške utvrđeno je da je optimalni odnos soka i adsorbensa 1:1, tj. 1 cm^3 soka i 1 g adsorbensa), kao i da povećanje količine adsorbensa ne utiče na poboljšanje rezultata.

Sledeći korak bio je izbor odgovarajućeg eluenta, odnosno rastvarača, za selektivno i efikasno eluiranje pesticida sa kolone. U tu svrhu isprobani su metanol, etil-acetat, dihlormetan, aceton i acetonitril. Aceton i acetonitril su odbačeni kao rastvarači za eluiranje pošto su davali veoma zaprljan ekstrakt koji se jako teško uparavao. Rezultati koji su dobijeni za metanol, etil-acetat i dihlormetan prikazani su u tabeli 13.

Tabela 13. Prinosi i vrednosti relativne standardne devijacije (RSD) ispitivanih pesticida pri koncentraciji od 250 ng cm⁻³ u ekstraktu soka od jabuke, sa tri različita rastvarača.

Pesticid	Prinos (%), RSD (%)		
	CH ₃ OH	CH ₃ COOC ₂ H ₅	CH ₂ Cl ₂
Acefat	120 (5)	125 (8)	89 (6)
Monokrotofos	53 (19)	129 (15)	100 (16)
Karbendazim	117 (17)	111 (20)	105 (11)
Acetamiprid	156 (10)	124 (21)	94 (9)
Dimetoat	108 (12)	112 (13)	99 (15)
Simazin	85 (8)	111 (15)	91 (11)
Karbofuran	104 (33)	116 (9)	95 (3)
Atrazin	80 (5)	105 (16)	101 (7)
Diuron	103 (10)	124 (7)	103 (12)
DNOC	99 (15)	78 (31)	103 (8)
Malation	97 (16)	96 (21)	106 (11)
Tebufenozid	88 (3)	104 (23)	91 (5)

Pomoću metanola, rezultati za monokrotofos i acetamiprid nisu bili zadovoljavajući, odnosno prinosi su bili izvan opsega od 70 do 120%. Takođe, dobijena vrednost za RSD u slučaju karbofurana (RSD>20%) je bila dosta visoka. Pomoću etilacetata dobijeni su u nekoliko slučajeva prinosi veći od 120%. U slučaju dihlometana svi dobijeni prinosi su bili u opsegu od 70 do 120% i RSD vrednosti su bile manje od 20%. Imajući u vidu navedeno, dihlormetan je odabran za dalju analizu.

Potrebna zapremina eluenta određena je analizom frakcija u intervalu 10–30 cm³ dihlormetana, pri čemu je utvrđeno da je 10 cm³ dovoljno za kvantitativnu ekstrakciju odabranih pesticida.

Pošto pH vrijednost ima uticaja na efikasnost ekstrakcije karbendazima iz voćnog soka (Grujić et al., 2005; 2010) sledeći korak u optimizaciji MSPD metode bio je određivanje pH vrednosti pri kojoj će prinos metode biti najveći. Uticaj pH ispitivan je u opsegu 2-10, a rezultati su prikazani u tabeli 14. Najveći uticaj je pH vrednost imala na efikasnost ekstrakcije karbendazima. Niske vrednosti pH ne pogoduju ni ekstrakciji DNOC-a. Dobri prinosi i RSD vrednosti su dobijene na pH 6 i 8 za sve pesticide. Za dalju ekstrakciju odabrana je vrednost pH 6 pošto je potrebna manja manipulacija sa uzorkom da bi se podesila ova pH vrednost.

Tabela 14. Prinosi i vrednosti relativne standardne devijacije (RSD) ispitivanih pesticida pri koncentraciji od 250 ng cm⁻³ u ekstraktu soka od jabuke, na različitim pH.

Pesticid	Prinos (%), RSD (%)			
	pH soka (3,27)	pH 2	pH 6	pH 8
Acefat	94 (23)	91 (14)	98 (19)	103 (5)
Monokrotofos	101 (25)	97 (12)	100 (16)	108 (16)
Karbendazim	59 (14)	42 (20)	106 (11)	102 (7)
Acetamiprid	84 (10)	103 (8)	97 (12)	103 (2)
Dimetoat	102 (17)	103 (10)	99 (15)	98 (6)
Simazin	102 (13)	95 (9)	100 (2)	92 (3)
Karbofuran	100 (10)	104 (11)	98 (3)	89 (5)
Atrazin	102 (5)	107 (17)	104 (3)	92 (2)
Diuron	99 (10)	98 (11)	112 (8)	110 (13)
DNOC	–	56 (30)	98 (4)	87 (15)
Malation	98 (3)	96 (5)	102 (10)	88 (2)
Tebufenozid	106 (1)	98 (19)	91 (5)	103 (1)

4.1.4. Uticaj matrice

LC–ESI–MS tehnika podložna je pojavi tzv. uticaja matrice ili matriks efekta koji može dovesti do pojave lažnih pozitivnih ili negativnih signala, kao i do promene intenziteta signala analita što uzrokuje netačnu kvantifikaciju. Sastojci matrice koji koeluiraju sa analitom mogu dovesti do promene efikasnosti jonizacije analita. U većini slučajeva uticaj matrice se manifestuje smanjenjem signala dok ređe dovodi do povećanja intenziteta signala (Gosetti et al., 2010.). Uticaj matrice je definisan kao procenat odnosa površine pika analita u standardu koji odgovara matrici i površine pika analita u standardu u rastvaraču (Sannino et al., 2004). Na povećanje signala ukazuje dobijena vrednost veća od 100%, dok na smanjenje signala ukazuje dobijena vrednost niža od 100%. Ovaj uticaj je ispitan poređenjem standarda koncentracija 10, 50 i 100 ng cm⁻³ za sokove od jabuke, narandže, breskve i maline. Dobijene vrednosti za sve ispitivane koncentracije sumarno prikazane u tabeli 15. Pozitivne vrednosti ukazuju na povećanje signala dok negativne vrednosti ukazuju smanjenje signala.

Ukoliko je dobijena vrednost za uticaj matrice između –20 i 20 % smatra se da je uticaj matrice zanemarljiv, za vrednosti između ±20 i ±50 %, smatra se da uticaj matrice umeren dok za vrednosti iznad tj. ispod ±50 % smatra se da je uticaj matrice veoma jak (Ferrer et al. 2011). U tabeli 15 crvenom bojom su obeležene vrednosti iznad

tj. ispod $\pm 50\%$, plavom bojom su obeležene vrednosti između ± 20 i $\pm 50\%$ i belom vrednosti između -20 i 20% . Za 50% uzoraka uticaj matrice se može smatrati zanemarljivim, 40% uzoraka je pokazalo srednji uticaj matrice dok je 10% uzoraka došlo do veoma jakog uticaja matrice. Najveći uticaj matrice je nađen za acetamiprid u soku od maline pri koncentraciji od 10 ng cm^{-3} . Jedino je u slučaju karbofurana uticaj matrice zanemarljiv za sve ispitanе uzorke.

Tabela 15. Uticaj matrice u različitim matricama soka za koncentracije pesticida od 10, 50 i 100 ng cm^{-3} .

Vrsta soka	Uticaj matrice (%) ^a											
	Jabuka			Narandža			Breskva			Malina		
	10	50	100	10	50	100	10	50	100	10	50	100
Koncentracija, ng cm^{-3}												
Pesticid												
Acefat	-31	-21	-18	53	4	15	-5	-1	-22	-36	-16	-42
Monokrotofos	26	0	-18	-26	13	-18	-16	11	38	-19	20	-24
Karbendazim	22	15	17	113	16	66	23	62	85	53	37	7
Acetamiprid	106	32	15	37	35	22	22	55	-25	125	-6	-31
Dimetoat	23	15	14	24	25	27	12	20	11	41	3	-9
Simazin	20	0	52	-14	48	30	-15	32	81	30	25	1
Karbofuran	-8	-11	13	7	18	12	-10	8	0	9	-7	-16
Atrazin	-6	-12	41	58	34	19	15	8	33	24	-9	-21
Diuron	89	60	4	5	16	-29	27	20	-45	-1	33	-11
DNOC	-36	-40	-60	30	70	-8	-17	-40	-34	23	89	-18
Malation	-21	-12	0	-48	8	3	25	15	-9	-6	-3	-4
Tebufenozid	22	-14	-12	-22	-24	-39	36	-12	-6	-18	1	-5

^a Izražen kao procenat odnosa površine pika u standardu koji odgovara matrici i površine pika standarda u metanolu. Pozitivne vrednosti odgovaraju povećanju signala, negativne smanjenju signala. Crvena boja označava jak, plava umeren, bela zanemarljiv uticaj matrice.

U većini slučajeva su dobijene vrednosti koje odgovaraju povećanju signala. Samo u slučaju karbendazima u svim ispitanim uzorcima je došlo do povećanja signala. Uticaj matrice može da varira ne samo u zavisnosti od analita i matrice već može da se razlikuje od jednog merenja do drugog, što znači da nije moguće izmeriti vrednost uticaja matrice jednom pa zatim sa dobijenom vrednošću korigovati naredne rezultate (Jansson et al., 2004). Pošto se iz dobijenih rezultata ne može utvrditi neka zakonitost po kojoj se javlja uticaj matrice, usvojeno je da je upotreba standarda koji odgovaraju matrici obavezna kako bi se obezbedila pravilna kvantifikacija analita.

4.1.5. Validacija analitičke metode

Razvijena i optimizovana metoda je validirana na uzorcima voćnih sokova od jabuke, narandže, breskve i maline u koje je dodat rastvor smeše svih odabranih pesticida tako da je koncentracija u ispitivanom uzorku iznosila 10, 50, 100, 250 i 500 ng cm⁻³. Prinosi metode i ponovljivost, izražena kao relativna standardna devijacija (RSD), su određeni analizom tri probe svakog uzorka, u tri dana. Rezultati su prikazani u tabeli 16. Dobijeni prinosi metode su bili u opsegu od 71 do 118 %, dok je ponovljivost metode u većini slučajeva bila u opsegu od 5 do 15 %. Nije primećeno da prinos i ponovljivost metode zavise od koncentracije pesticida ili od matrice koja se analizira. Jedino je u slučaju acetamipirida u soku od breskve za dve koncentracije dobijena vrednost za ponovljivost veća od 20 %. Ove vrednosti se mogu objasniti promenom osetljivosti masenog detektora u toku analize (Granby et al., 2004).

Tabela 16. Prinosi i ponovljivost (RSD) razvijene metode.

Pesticid	Voćni sok	Prinos, (%) (RSD%)				
		Koncentracija, ng cm ⁻³				
		10	50	100	250	500
Acefat	Jabuka	110 (6)	102 (5)	97 (13)	86 (8)	101 (10)
	Breskva	95 (7)	92 (6)	107 (5)	108 (14)	91 (3)
	Narandža	87 (15)	96 (10)	89 (8)	105 (3)	99 (11)
	Malina	92 (8)	84 (13)	83 (4)	110 (3)	104 (11)
Monokrotofos	Jabuka	88 (7)	81 (15)	86 (5)	90 (7)	86 (14)
	Breskva	94 (12)	89 (12)	93 (9)	87 (7)	84 (5)
	Narandža	72 (8)	82 (15)	107 (10)	114 (6)	112 (8)
	Malina	101 (8)	77 (5)	93 (11)	88 (9)	119 (6)
Karbendazim	Jabuka	86 (12)	98 (11)	83 (15)	80 (11)	91 (14)
	Breskva	91 (9)	90 (9)	88 (10)	97 (15)	86 (7)
	Narandža	95 (6)	94 (4)	104 (7)	97 (13)	92 (6)
	Malina	99 (19)	97 (11)	104 (12)	104 (14)	113 (8)
Acetamipirid	Jabuka	75 (2)	72 (3)	83 (2)	87 (11)	95 (11)
	Breskva	97 (14)	98 (22)	90 (28)	101 (3)	101 (5)
	Narandža	85 (3)	96 (4)	93 (3)	106 (3)	97 (3)
	Malina	85 (5)	101 (8)	87 (6)	117 (4)	113 (8)
Dimetoat	Jabuka	107 (13)	90 (10)	90 (5)	79 (14)	92 (10)
	Breskva	100 (4)	102 (12)	93 (7)	88 (3)	92 (6)
	Narandža	89 (1)	100 (2)	90 (2)	106 (3)	92 (2)
	Malina	98 (2)	101 (19)	91 (4)	105 (4)	117 (8)
Simazin	Jabuka	79 (4)	97 (5)	91 (5)	77 (16)	105 (17)
	Breskva	81 (15)	85 (11)	86 (13)	96 (12)	94 (12)
	Narandža	108 (9)	102 (6)	83 (4)	110 (2)	98 (2)
	Malina	94 (12)	95 (11)	83 (4)	96 (7)	97 (10)

Tabela 16. nastavak

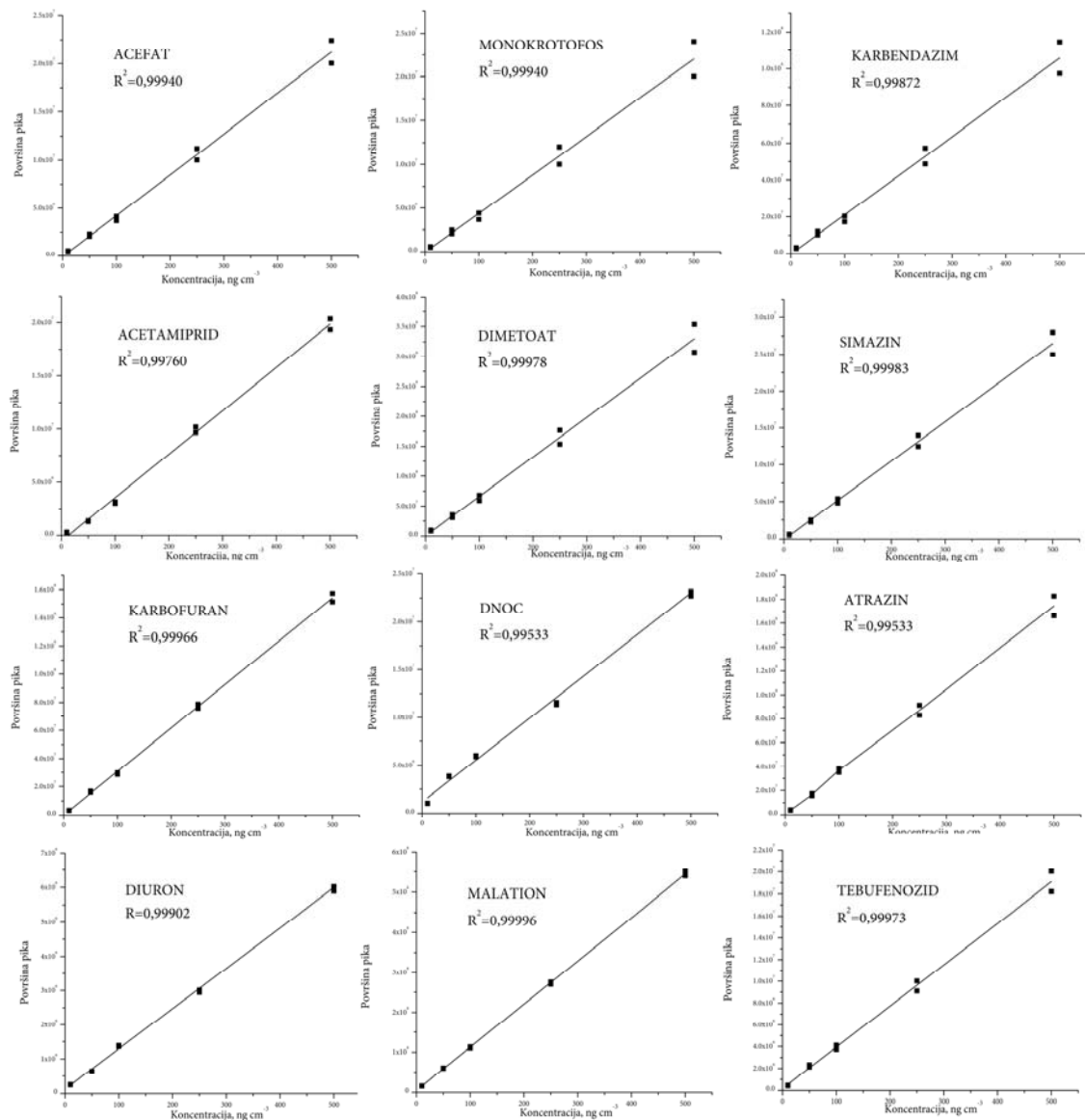
Pesticid	Voćni sok	Prinos, (%) (RSD%)				
		Koncentracija, ng cm ⁻³				
		10	50	100	250	500
Karbofuran	Jabuka	91 (9)	92 (8)	92 (8)	83 (9)	105 (10)
	Breskva	102 (4)	90 (10)	91 (5)	96 (1)	95 (3)
	Narandža	94 (2)	102 (14)	93 (4)	99 (3)	90 (4)
	Malina	91 (8)	96 (10)	92 (14)	103 (8)	99 (2)
Atrazin	Jabuka	102 (12)	97 (4)	96 (13)	77 (14)	112 (8)
	Breskva	98 (8)	81 (4)	102 (15)	106 (4)	104 (10)
	Narandža	110 (5)	107 (2)	94 (6)	113 (4)	115 (7)
	Malina	78 (5)	102 (15)	93 (6)	102 (5)	117 (9)
Diuron	Jabuka	91 (5)	107 (16)	92 (6)	90 (15)	102 (9)
	Breskva	104 (17)	96 (15)	98 (8)	104 (9)	118 (11)
	Narandža	100 (3)	117 (6)	90 (8)	94 (16)	101 (8)
	Malina	102 (6)	112 (6)	83 (21)	102 (6)	112 (9)
DNOC	Jabuka	87 (15)	71 (4)	115 (11)	86 (6)	83 (6)
	Breskva	94 (12)	80 (13)	100 (18)	107 (8)	91 (10)
	Narandža	91 (10)	90 (8)	78 (5)	105 (16)	92 (8)
	Malina	89 (8)	86 (6)	96 (22)	95 (9)	87 (10)
Malation	Jabuka	91 (10)	87 (15)	87 (11)	103 (11)	90 (7)
	Breskva	100 (3)	101 (11)	107 (10)	91 (3)	104 (3)
	Narandža	84 (9)	94 (11)	96 (8)	97 (4)	86 (7)
	Malina	91 (9)	97 (1)	85 (3)	110 (5)	117 (7)
Tebufenozid	Jabuka	103 (17)	106 (18)	98 (11)	78 (12)	96 (3)
	Breskva	72 (1)	102 (4)	79 (9)	77 (13)	85 (15)
	Narandža	106 (9)	117 (2)	111 (5)	116 (2)	96 (9)
	Malina	91 (2)	85 (4)	85 (8)	90 (5)	99 (7)

Granice detekcije (LOD) i kvantifikacije (LOQ) razvijene metode za svaki analit su izračunate koristeći odnos signala i šuma (engl. signal to noise–S/N) iz SRM masenih hromatograma za uzorak voćnog soka sa dodatom smešom pesticida, koncentracije od 10 ng cm⁻³. Granica detekcija metode izračunata je kao koncentracija pri kojoj bi vrednost S/N iznosila 3, dok vrednost granice kvantifikacije odgovara vrednosti S/N=10. Rezultati za LOD i LOQ su prikazani u tabeli 17. Izračunate vrednosti za LOD su bile u opsegu od 0,01 do 0,94 ng cm⁻³, dok su vrednosti za LOQ bile u opsegu od 0,03 do 3,12 ng cm⁻³. Dobijene vrednosti za LOD i LOQ su značajno ispod maksimalno dozvoljenih koncentracija (MDK) propisanih za voće.

Tabela 17. Vrednosti granica detekcije (LOD) i kvantifikacije (LOQ) za ispitivane pesticide.

Pesticid	Sok od jabuka		Sok od breskve		Sok od narandže		Sok od maline	
	LOD, ng cm ⁻³	LOQ, ng cm ⁻³	LOD, ng cm ⁻³	LOQ, ng cm ⁻³	LOD, ng cm ⁻³	LOQ, ng cm ⁻³	LOD, ng cm ⁻³	LOQ, ng cm ⁻³
Acefat	0,18	0,62	0,03	0,11	0,18	0,62	0,11	1,18
Monokrotofos	0,16	0,54	0,04	0,13	0,02	0,07	0,10	0,31
Karbendazim	0,06	0,20	0,02	0,07	0,06	0,21	0,01	0,07
Acetamiprid	0,54	1,82	0,71	2,37	0,32	1,05	0,59	1,56
Dimetoat	0,05	0,16	0,08	0,25	0,01	0,03	0,13	0,43
Simazin	0,34	1,16	0,20	0,67	0,46	1,54	0,27	0,91
Karbofuran	0,06	0,18	0,18	0,59	0,07	0,23	0,04	0,12
Atrazin	0,04	0,13	0,26	0,86	0,11	0,38	0,30	0,99
Diuron	0,23	0,78	0,94	3,12	0,62	2,08	0,39	1,32
DNOC	0,11	0,35	0,44	1,44	0,47	1,56	0,05	0,18
Malation	0,02	0,09	0,07	0,24	0,03	0,18	0,07	0,22
Tebufenozid	0,17	0,57	0,34	1,29	0,13	0,42	0,48	1,59

Kao što je opisano u eksperimentalnom delu, kalibracija je izvršena pomoću standarda koji odgovaraju matrici (matrix-matched) koncentracija 10, 50, 100, 250 i 500 ng cm⁻³. Linearnost kalibracionih krivih je ispitana za sve pesticide u svim ispitivanim matricama. Kalibracione krive dobijene za sok od jabuke su prikazane na slici 20. Za ostale matrice kalibracione krive su prikazane na slikama 48–50 koje su date u Prilogu. Za ispitivani opseg koncentracija dobijena je dobra linearnost kalibracionih krivih sa koeficientima korelacije od 0,99128, vrednost koja je dobijena za DNOC u soku od breskve, do 1,0000, vrednost koja je dobijena za karbendazim u soku od breskve. Izuzetak je bila vrednost koeficienta korelacije dobijena za DNOC, 0,98909 u soku od maline. Naime, u toku snimanja dolazi do zaprljanja detektora, komponentama matrice koje može uticati na osetljivost metode. DNOC je kvantifikovan preko njegovog deprotonovanog molekuskog jona a ovaj vid snimanja je manje selektivan.



Slika 20. Kalibracione krive za ispitivane pesticide u soku od jabuke.

4.1.6. Realni uzorci

Razvijena i optimizovana analitička metoda (Radišić et al., 2009) primenjena je u analizi komercijalno dostupnih sokova. Sokovi od jabuke, narandže, breskve i maline različitih domaćih proizvođača su kupljeni u lokalnim prodavnicama i analizirani pomoću predloženog metoda. Rezultati su predstavljeni u tabeli 18. Ispitivanje je pokazalo da je 80 % analiziranih uzoraka sadržalo tragove pesticida. Karbendazim je bio pesticid koji je najčešće detektovan, u 75 % uzoraka. Dimetoat i monokrotofos su detektovani u 22 % uzorka. Međutim, koncentracije koje su nađene su veoma niske i

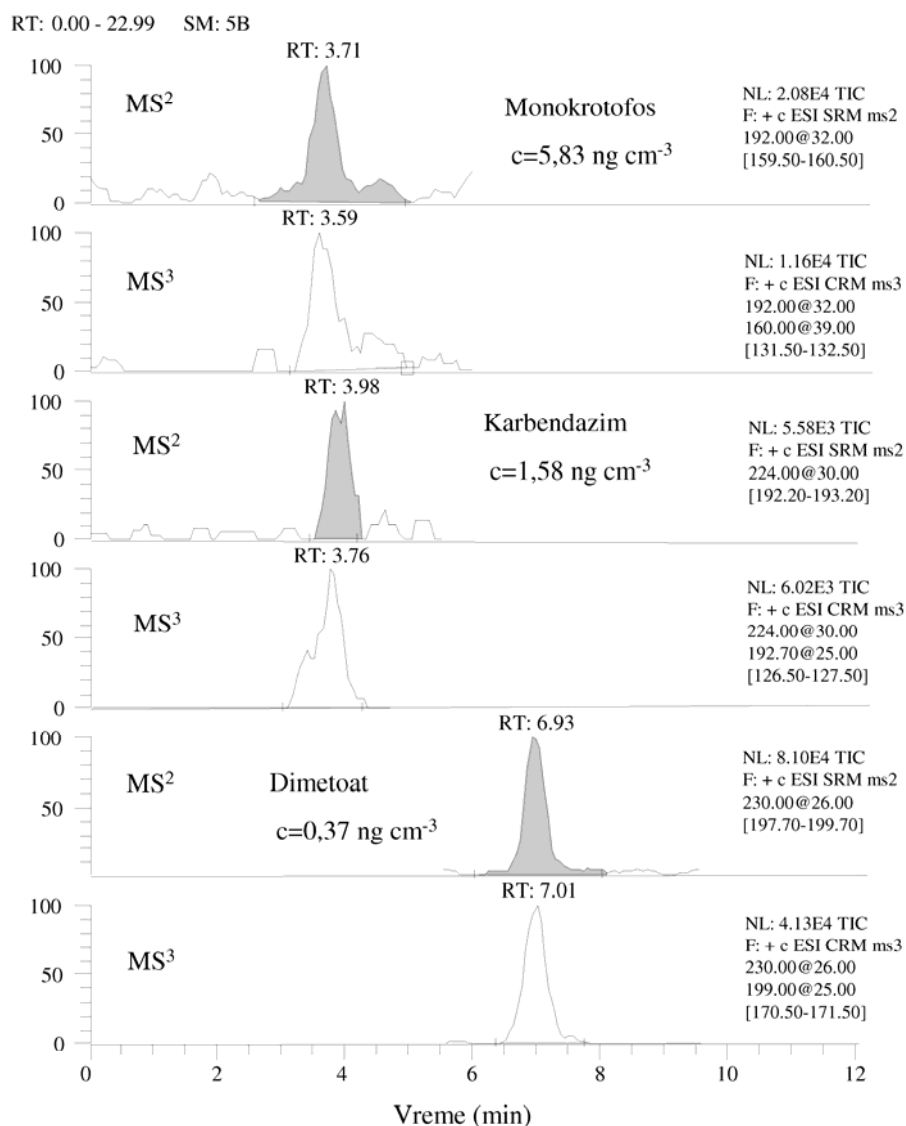
ispod MDK vrednosti propisanih za voće u Republici Srbiji i Evropskoj Uniji (Sl. gl. RS 25/2010, 2010; EU pesticide database). Za voćne sokove još uvek nisu propisane dozvoljene koncentracije. Od ispitanih 20 voćnih sokova, u četiri soka nisu nađeni tragovi pesticida.

Prema smernicama Evropske unije (SANCO, 2011), potvrda identiteta analita je obavezna ukoliko nađena koncentracija prelazi MDK vrednost. Ukoliko su nađene koncentracije ispod MDK vrednosti potvrda nije obavezna i ostavljeno je laboratorijama da same uspostave protokol ponašanja u tim slučajevima. Pošto nisu nađene vrednosti iznad MDK ni u jednom slučaju, potvrda nije rađena za sve uzorke u kojima su nađeni tragovi pesticida. Ponovo su analizirani oni uzorci u kojima je koncentracija nađenog pesticida preko 10 ng cm^{-3} i uzorci u kojima je nađeno više od jednog pesticida. Na slici 21 prikazani su hromatogrami uzorka soka od maline u kojem su pronađeni tragovi tri pesticida: monokrotofosa, karbendazima i dimetoata. Dimetoat je uspešno potvrđen iako je nađen u veoma niskoj koncentraciji. Karbendazim je takođe, uspešno potvrđen i u koncentraciji ispod 10 ng cm^{-3} . Potvrda za monokrotofos je bila nešto slabija. U uzorcima narandže i maline, u kojima je koncentracija ovog pesticida bila veoma niska (ispod 2 ng cm^{-3}), nije dobijena nedvosmislena potvrda.

Lažno pozitivni rezultati su često dobijani za DNOC, što se može objasniti nedovoljnom selektivnošću koje se postiže kada se posmatra samo deprotonovani molekul.

Tabela 18. Tragovi pesticida nađeni u ispitivanim sokovima.

Broj uzorka	Nađeni pesticid	Koncentracija, ng cm ⁻³
Sok od jabuke		
1	Karbendazim	1.50
2	Karbendazim	1.00
	Dimetoat	1.11
3	Monokrotofos	2.55
	Dimetoat	0.32
Sok od breskve		
4	Karbendazim	26.4
5	Karbendazim	2.43
6	Karbendazim	3.16
7	Karbendazim	74.5
8	Karbendazim	10.2
9	Karbendazim	9,4
Sok od narandže		
10	Karbendazim	8.21
11	Karbendazim	1.20
12	Karbendazim	1.84
13	Monokrotofos	0.58
	Karbendazim	3.21
Sok od maline		
14	Monocrotophos	5.83
	Karbendazim	1.58
	Dimetoat	0.37
15	Karbendazim	23.3
	Dimetoat	1.21
16	Monokrotofos	1.87
	Karbendazim	3.10



Slika 21. Maseni hromatogrami soka od maline sa tragovima tri pesticida.

4.2. Voće

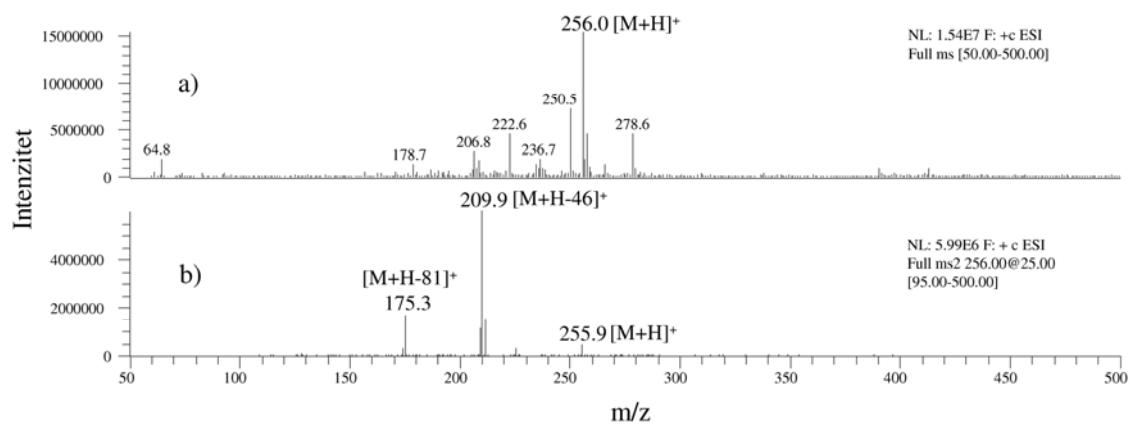
Metoda koja je optimizovana i validirana za analizu pesticida u voćnim sokovima primenjena je za analizu pesticida u voću. Metod je proširen sa pet novih pesticida koji pripadaju već ispitivanim hemijskim grupama, dok je DNOC isključen iz daljeg istraživanja zbog nezadovoljavajuće selektivnosti koja se postiže posmatranjem samo deprotonovanog molekuskog jona. Novi pesticidi su: imidakloprid (neonikotinoid), monuron (fenilurea), karbaril (karbamat), propazin (triazin), i linuron (fenilurea). Prema smernicama Evropske unije, pre primene metode na drugu matricu potrebno je izvršiti njenu validaciju.

4.2.1. Snimanje masenih spektara i optimizacija hromatografskog razdvajanja

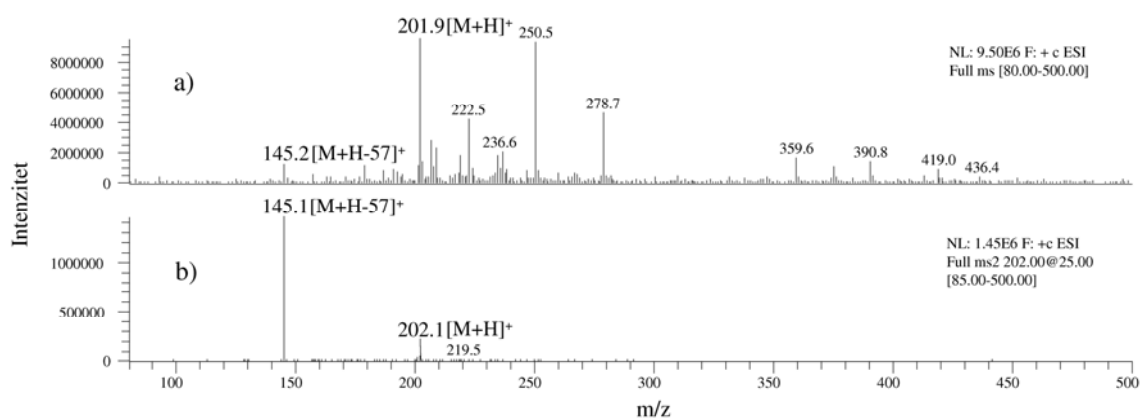
4.2.1.1. Snimanje masenih spektara

Maseni spektri su snimani za novih pet analita, za ostale analite korišćeni su podaci dobijeni prilikom optimizacije metode za određivanje pesticida u voćnim sokovima. Preliminarni eksperimenti su izvršeni u cilju pronalaska najpovoljnijih instrumentalnih uslova koji bi omogućili nedvosmislenu identifikaciju i kvantifikaciju posmatranih analita u realnim uzorcima. Optimizacija instrumentalnih uslova masenog detektora izvršena je snimanjem rastvora od $10 \mu\text{g cm}^{-3}$. Standardni rastvori su uvedeni pomoću špric pumpe brzinom od $5 \mu\text{l min}^{-1}$ u struju mobilne faze sastava 66/33/1 (A/B/C) i protoka $0,5 \text{ cm}^{-3} \text{ min}^{-1}$. Snimanjem masenih spektara u opsegu od 50 do 500 m/z u pozitivnom (ESI+) i negativnom (ESI-) režimu rada elektrosprej jonizacionog izvora izvršena je identifikacija jona.

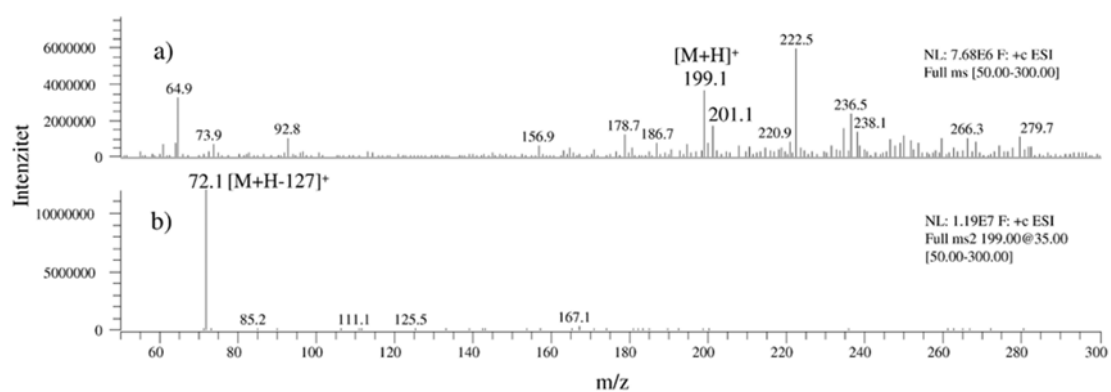
Imidakloprid, karbaril i monuron grade samo protonovane molekule, $[\text{M}+\text{H}]^+$. Linuron i propazin osim protonovanih, $[\text{M}+\text{H}]^+$, grade i deprotonovane molekule, $[\text{M}-\text{H}]^-$. Međutim, odgovor detektora za ESI- je deset puta niži nego u slučaju ESI+. Maseni spektri analita, na osnovu kojih su odabrani prekursor joni i reakcije fragmentacije u najintenzivnije i najstabilnije fragmentne jone prikazani su na slikama 22–26.



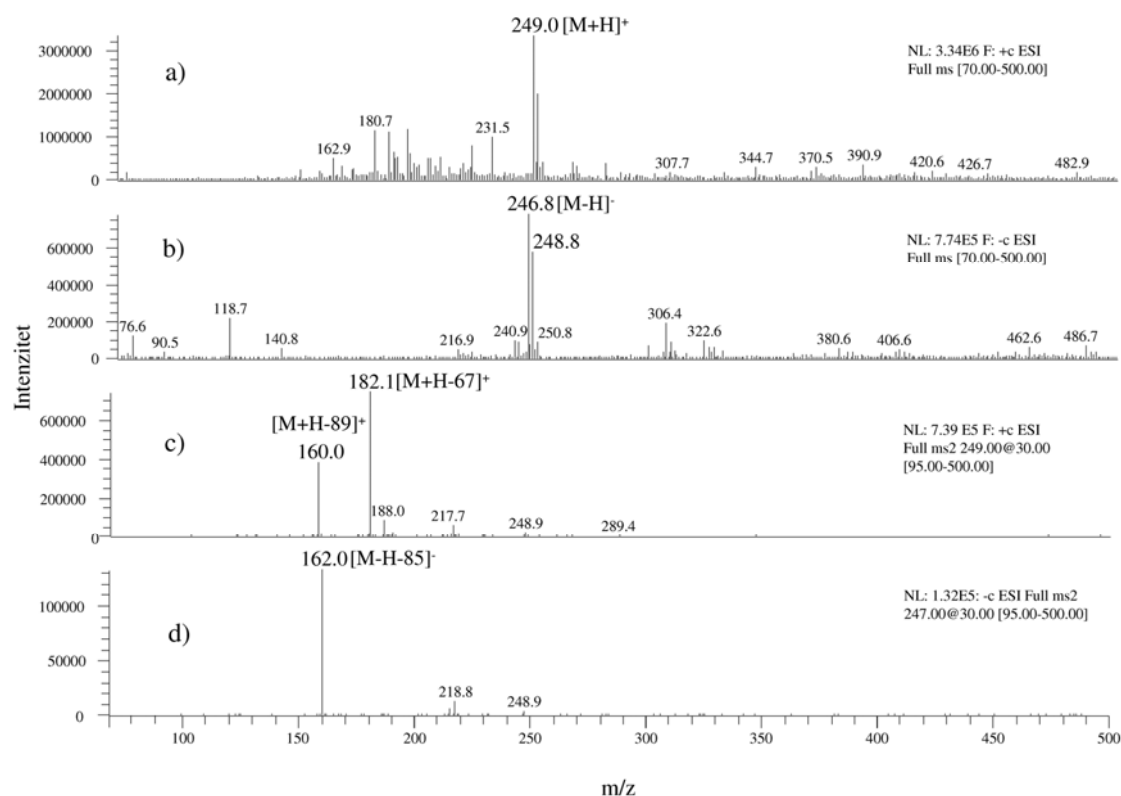
Slika 22. Maseni spektri imidakloprida: a) MS (ESI+); b) MS² (ESI+).



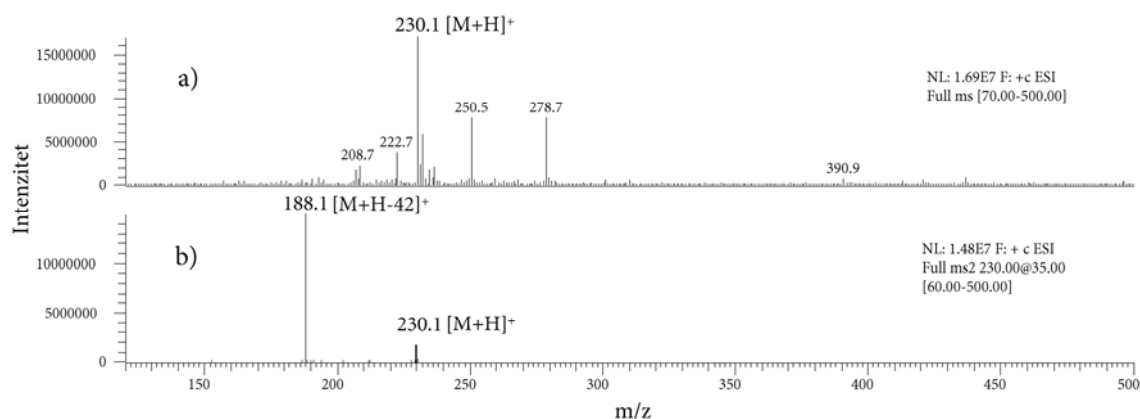
Slika 23. Maseni spektri karbarila: a) MS (ESI+); b) MS² (ESI+).



Slika 24. Maseni spektri monurona: a) MS (ESI+); b) MS² (ESI+).



Slika 25. Maseni spektri linurona: a) MS (ESI+); b) MS (ESI-); c) MS² (ESI+); d) MS² (ESI-).



Slika 26. Maseni spektri propazina: a) MS (ESI+); b) MS² (ESI+).

Kao prekursor joni za sve pesticide odabrani su protonovani molekuli [M+H]⁺. MS² analizom karbarila dobija se samo jedan fragment m/z 145 koji se dobija gubitkom metil izocijanata [M+H-CH₃NCO]⁺. Gubitak ove grupe je karakterističan za sve N-metil karbamate (Baglio et al., 1999; Fernández et al., 2000). Fragmentacijom

imidakloprida najintenzivniji fragment je m/z 210 koji odgovara gubitku nitro grupe, $[M+H-NO_2]^+$ (Xte et al., 2011, William et al., 2012). Takođe, u spektru je vidljiv jon m/z 175, $[M+H-NO_2-Cl]^+$ (Xte et al., 2011, William et al., 2012), ali mnogo slabijeg intenziteta. U slučaju linurona, za MS^2 analizu odabran je jon 249, čijom fragmentacijom je dobijeno više fragmenata od kojih je najintenzivniji jon sa m/z 182. Osim najintenzivnijeg fragmenta, takođe se mogu videti specifični joni za fenilurea pesticide m/z 160 i 188 koji odgovaraju $[M+H-C_2H_6NO]^+$ i $[M+H-C_2H_6NOCO]^+$ jonima, respektivno. MS^2 analizom monurona dobijen je samo jedan intenzivan fragment, m/z 72, $[M+H-NHC_6H_4Cl]^+$. U MS^2 spektru propazina dobijen je intenzivan jon m/z 188, $[M+H-C(CH_3)]^+$, (Niessen, 2010).

Tabela 19. HPLC–MS i MS^2 parametri, optimizovani za kvantifikaciju odabranih pesticida

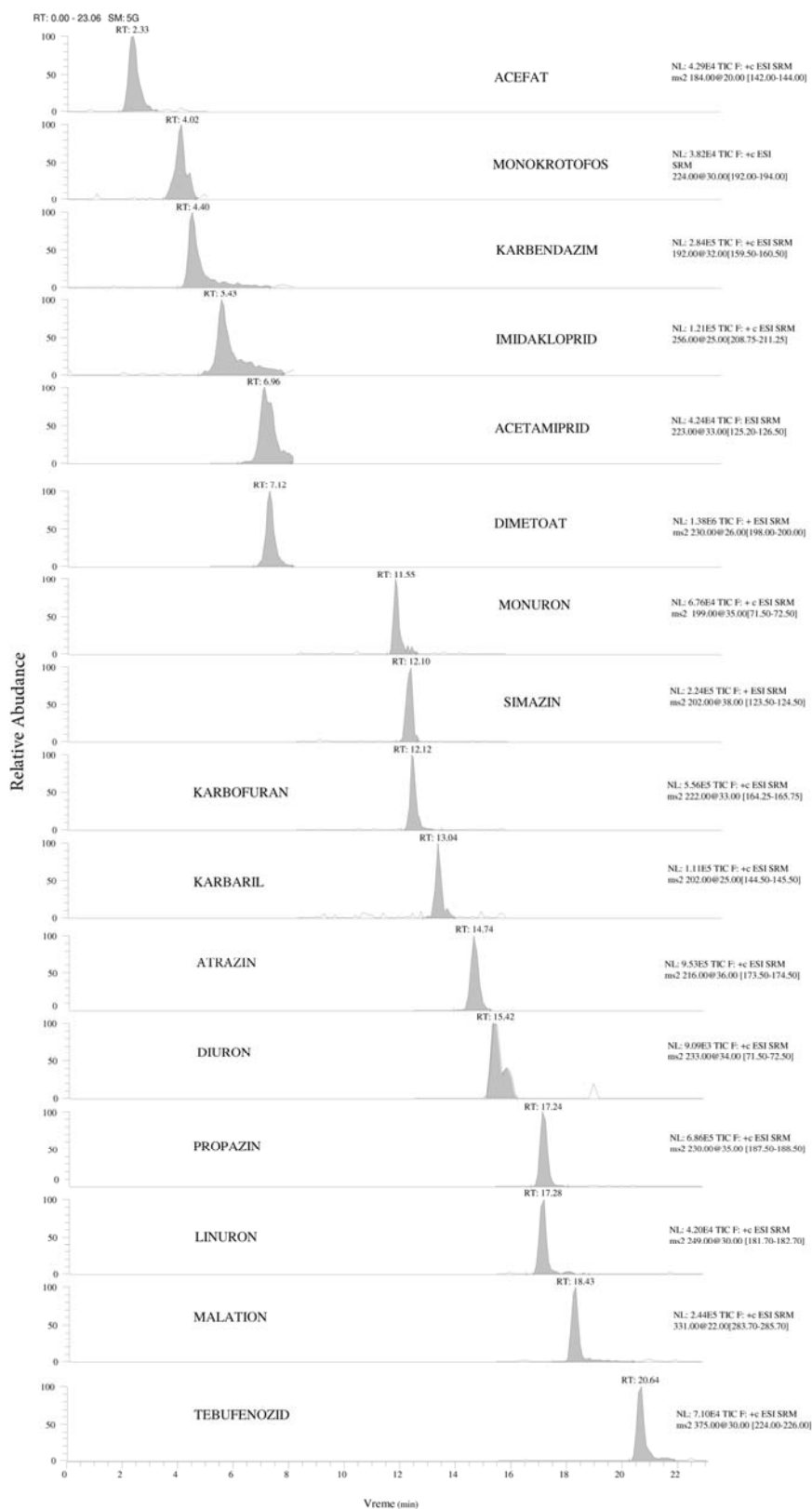
Pesticid	Vremenski segment	Vreme (min)	Prekursor jon (m/z)	Izolacioni opseg za prekursor jon	Fragmentni jon (m/z)	Koliziona energija (%)
Acefat	I	0,0–5,0	184	2	143	40
Monokrotofos	I	0,0–5,0	224	2	193	38
Karbendazim	I i II	0,0–8,0	192	1	160	34
Imidaklopid	I i II	0,0–8,0	256	1	210	25
Acetamiprid	II	5,0–8,0	223	1	126	36
Dimetoat	II	5,0–8,0	230	2	199	26
Monuron	III i IV	5,0–12,5	256	1	210	25
Simazin	III	8,0–12,5	202	1	124	36
Karbofuran	III i IV	8,0–12,5	222	2	165	32
Karbaril	III i IV	8,0–12,5	202	1,5	145	25
Atrazin	IV	12,5–15,5	216	1	174	38
Diuron	IV i V	12,5–23,0	233	1	72	34
Propazin	V	15,5–23,0	230	1	188	35
Linuron	V	15,5–23,0	249	1	182	35
Malation	V	15,5–23,0	331	2	285	24
Tebufenozid	V	15,5–23,0	375	2	225	34

Većinu ovako dobijenih fragmentnih jona bilo je moguće dalje fragmentisati (MS^3 analiza). Za monuron dalja MS^n analiza nije bila moguća. Za imidaklopid, linuron i propazin dobijeni su intenzivni i MS^4 spektri. Na osnovu dobijenih rezultata,

za svaki analit je odabrana karakteristična reakcija fragmentacije prekursor jona u najintenzivniji i najstabilniji fragmentni jon na osnovu koje je vršena kvantifikacija odabranih analita. Dodatne MSⁿ reakcije se mogu koristiti za potvrdu prisustva analita u uzorku. Dobijeni MSⁿ spektri su prikazani na slikama 43–47 u prilogu a rezultati optimizacije MS² analize su sumarno dati u tabeli 19.

4.2.1.2. Hromatografsko razdvajanje

Snimanjem odabranih fragmentnih jona (SRM) tokom HPLC-MS² analize dobijen je hromatogram odabrane reakcije. Korišćenjem hromatografskog metoda kao za sokove, bilo je moguće podeliti snimanje pesticida u pet vremenskih segmenata tokom kojih su posmatrana 4–5 analita. Pošto nije bila ugrožena osetljivost metode nije bilo potrebe da se razvija novi, poseban, hromatografski metod. Jedina razlika u odnosu na hromatografski metod koji je korišćen za sokove je u tome da je koncentracija kiseline konstantna tokom čitavog hromatografskog snimanja. Naime, posmatrani su samo pozitivni joni kojima odgovara kisela mobilna faza. Kao što je prikazano u tabeli 19, vremenski segmenti su samo donekle prilagodjeni da bi se postigao što manji broj analita u jednom vremenskom segmentu. Na slici 27 prikazan je maseni hromatogram smeše pesticida, koncentracije 10 ng cm⁻³ u ekstraktu narandže.



Slika 27. Maseni hromatogrami pesticida u finalnom ekstraktu narandže, koncentracije 10 ng cm^{-3} .

4.2.2. Potvrda prisustva analita u uzorku

U cilju postizanja pouzdane potvrde prisustva analita u uzorku, razvijene su posebne metode za svaki pesticid pojedinačno koje su puštane pri naknadnom iniciranju uzorka. Metode su razvijane za pet dodatih pesticida, dok su za ostale pesticide koršćene predhodno optimizovane. Razvijene metode sadrže karakteristične MS, MS² i/ili MS³ prelaze.

Karbaril i propazin u MS² spektru, osim jona za kvantifikaciju, ne sadrže još jona dovoljnog intenziteta koji bi se mogli koristiti za potvrdu. Međutim, dobijene fragmete pri MS² analizi je bilo moguće dalje fragmentisati tj. bila je moguća MS³ i MS⁴ analiza. Za monuron nije bila moguća dalja fragmentacija, međutim, pošto ovaj pesticid sadrži hlor, adekvatna potvrda je postignuta fragmentacijom [M+H]⁺ jona koji sadrži hlor 37. Linuron i propazin u MS² spektru imaju, osim jona za kvantifikaciju, i jone preko kojih se može vršiti potvrda a takođe, je moguća i dalja njihova fragmentacija. Za svaku od posmatranih reakcija fragmentacije optimizovani su: izolacioni opseg, koliziona energija, aktivacioni q i aktivaciono vreme. U tabeli 20 prikazani su optimizovani parametri za ovih pet pesticida, joni koji su korišćeni za kvantitativno određivanje označeni su kurzivom.

Efikasnost metoda za potvrdu analita u uzorku, testirana je upoređivanjem intenziteta signala analita u standardu u metanolu i standarda koji odgovaraju matrici, koncentracije 10 ng cm⁻³. Odnos intenziteta jona dobijen je kao količnik površina signala najintenzivnijih jona (tabela 21). Dobijena ponovljivost za odnose intenziteta jona u slučaju posmatranih pesticida jako dobro se uklopila u preporučene zahteve. U slučaju simazina u jednom slučaju je dobijena loša ponovljivost, što čini tu reakciju fragmentacije nepodobnom za potvrdu prisustva analita u uzorku.

Tabela 20. Vrednosti MS instrumentalnih parametrov optimizovanih za vsaki analit: izolacioni opseg (IO), kolizijska energija (KE), aktivacijski q i aktivacijsko vreme (AV).

Pesticid	MS	IO	KE (%)	Aktivacijski q	AV (ms)	MS ²	IO	KE (%)	Aktivacijski q	AV (ms)	MS ³	IO	KE (%)	Aktivacijski q	AV (ms)	MS ⁴
Imidakloprid	256	1.0	25	0.30	30	210	2.5	36	0.25	35	175	1.0	40	0.3	45	147
						175	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Karbaril	202	1.5	25	0.25	30	145	1.0	38	0.45	40	117	-	-	-	-	-
Monuron	199	2.0	35	0.25	50	72	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
						72	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Propazin	230	1.0	35	0.25	30	188	1.0	35	0.25	30	146	1.0	35	0.45	45	110
Linuron	249	1.0	30	0.25	30	182	1.0	37	0.35	40	153	-	-	-	-	-
										181	-	-	-	-	-	-
						160	1.0	33	0.35	40	133	-	-	-	-	-
										125	-	-	-	-	-	

Tabela 21. Odnosi intenziteta fragmentnih jona za sve analizirane pesticide.

Pesticid	Prekursor jon	Fragment [1]	Fragment [2]	Fragment [3]	Standardi u metanolu		Standardi koji odgovaraju matrici	
					[2]/[1] (RSD, %)	[3]/[1] (RSD, %)	[2]/[1] (RSD, %)	[3]/[1] (RSD, %)
Acefat	184 [M+H] ⁺	143	113	–	0,22 (27)	–	0,24 (16)	–
Monokrotofos	224 [M+H] ⁺	193	127	–	0,69 (9)	–	0,30 (6)	–
Karbendazim	192 [M+H] ⁺	160	132	105	0,94 (1)	0,44 (9)	0,53 (6)	0,32 (16)
Imidakloprid	256 [M+H] ⁺	210	175	147	0,30 (1)	0,11 (9)	0,37 (19)	0,14 (10)
Acetamiprid	223 [M+H] ⁺	126	187	146	0,43 (5)	0,41 (6)	0,36 (6)	0,10 (11)
Dimetoat	230 [M+H] ⁺	199	171	143	0,58 (5)	0,37 (4)	0,56 (14)	0,56 (32)
Monuron	199 [M+H] ⁺	72	–	–	0,45 (7)	–	0,74 (9)	–
	201 [M+H] ⁺	–	72	–	–	–	–	–
Simazin	202 [M+H] ⁺	124	96	104	0,59 (1)	0,35 (8)	0,45 (36)	0,24 (47)
Karbofuran	222 [M+H] ⁺	165	123	95	0,50 (5)	0,11 (29)	0,54 (1)	0,14 (14)
Karbaril	202 [M+H] ⁺	145	117	–	0,32 (6)	0,37 (7)	0,88 (1)	0,37 (3)
Atrazin	216 [M+H] ⁺	174	132	104	0,52 (4)	0,35 (7)	0,61 (2)	0,39 (3)
Diuron	233 [M+H] ⁺	72	–	–	0,72 (16)	–	0,75 (10)	–
	235 [M+H] ⁺	–	72	–	–	–	–	–
Propazin	230 [M+H] ⁺	188	146	–	0,22 (10)	–	0,18 (21)	–
Linuron	249 [M+H] ⁺	182/160	125	153	0,41 (20)	0,21 (32)	0,28 (24)	0,40 (14)
Malation	331 [M+H] ⁺	285	127	99	0,52 (3)	0,13 (20)	0,33 (1)	0,12 (15)
Tebufenozid	375 [M+Na] ⁺	225	–	–	0,58 (2)	–	0,42 (9)	–
	353 [M+H] ⁺	–	297	–	–	–	–	–

4.2.3. Validacija analitičke metode

Razvijena i optimizovana metoda je validirana na uzorcima voća jabuke, kajsije, narandže i jagode u koje je dodata smeša svih odabranih pesticida tako da koncentracija u ispitivanom uzorku je iznosila 10, 50, 100, 250 i 500 ng cm⁻³. Prema smernicama Evropske unije (SANCO, 2011), validacija metode mora biti izvršena za minimum jednu namirnicu koja predstavlja određenu grupu namirnica. Voće odabrano za analizu se nalazi u grupi namirnica sa visokim sadržajem vode i u grupi namirnica sa visokom kiselosti i visokim sadržajem vode. Validacija metode je urađena za kajsije i jabuke, predstavnike namirnica sa visokim sadržajem vode, i narandže i jagode, predstavnike namirnica sa visokom kiselosti i visokim sadržajem vode. Prinosi metode i

ponovljivost, izražena kao relativna standardna devijacija (RSD), su određeni analizom tri probe svakog uzorka, u tri dana. Rezultati su prikazani u tabeli 22. Dobijeni prinosi metode su bili u opsegu od 70 do 120 %, dok je ponovljivost metode u većini slučajeva bila u opsegu od 1 do 20 %. Nije primećeno da prinos i ponovljivost metode zavise od koncentracije pesticida ili od matrice koja se analizira. U par slučajeva dobijena vrednost za ponovljivost je bila veća od 20 %. Ove vrednosti se mogu objasniti promenom osetljivosti masenog detektora u toku analize (Granby et al., 2004). Naime, dolazi do promena u intenzitetu signala detektora usled njegovog zaprljanja komponentama matrice. Prinos metode za određivanje tragova pesticida u hrani treba da se nalazi u intervalu od 70 do 120 %, međutim za multirezidualne metode prinosi izvan ovog opsega mogu biti prihvaćeni. Generalno, u rutinskim multirezidualnim analizama, prinosi od 60 do 140 % smatraju se prihvatljivim (SANCO, 2011).

Tabela 22. Prinosi i ponovljivost (RSD) razvijene metode.

Pesticid	Voće	Prinos, (%) (RSD%)				
		Koncentracija (ng mg ⁻¹)				
		10	50	100	250	500
Acefat	Jabuka	96 (4)	80 (6)	107 (7)	96 (4)	99 (1)
	Kajsija	78 (9)	86 (10)	77 (8)	99 (4)	90 (5)
	Narandža	91 (17)	91 (17)	88 (15)	88 (2)	76 (5)
	Jagoda	104 (7)	88 (2)	88 (4)	96 (12)	83 (5)
Monokrotofos	Jabuka	83 (10)	85 (17)	96 (23)	120 (9)	114(2)
	Kajsija	109 (2)	88 (11)	89 (9)	99 (3)	97 (3)
	Narandža	95 (20)	95 (20)	95 (8)	89 (6)	84 (1)
	Jagoda	99 (5)	84 (5)	84 (5)	107 (3)	87 (4)
Karbendazim	Jabuka	78 (15)	98 (4)	107 (7)	92 (1)	104 (1)
	Kajsija	84 (16)	89 (7)	85 (6)	112 (15)	105 (6)
	Narandža	76 (6)	76 (6)	79 (9)	79 (5)	75 (6)
	Jagoda	102 (5)	101 (3)	86 (3)	110 (2)	94 (9)
Imidakloprid	Jabuka	106 (14)	104 (10)	115 (9)	101 (12)	115 (8)
	Kajsija	101 (17)	93 (4)	80 (12)	125 (2)	94 (4)
	Narandža	89 (10)	100 (11)	88 (13)	90 (8)	90 (4)
	Jagoda	83 (15)	99 (22)	90 (10)	119 (2)	106 (2)
Acetamiprid	Jabuka	105 (15)	102 (10)	112 (2)	105 (4)	104 (10)
	Kajsija	104 (12)	106 (5)	112 (6)	93 (18)	85 (8)
	Narandža	100 (11)	96 (15)	99 (12)	86 (2)	84 (2)
	Jagoda	100 (4)	91 (13)	84 (7)	117 (4)	106 (2)
Dimetoat	Jabuka	112 (6)	101 (7)	116 (10)	102 (4)	106 (5)
	Kajsija	89 (8)	111 (8)	85 (12)	102 (2)	99 (3)
	Narandža	96 (15)	106 (2)	93 (10)	91 (6)	82 (4)
	Jagoda	86 (1)	87 (2)	82 (1)	103 (4)	84 (5)

Tabela 22. nastavak

Pesticid	Voće	Prinos, (%) (RSD%)				
		Koncentracija (ng mg ⁻¹)				
		10	50	100	250	500
Monuron	Jabuka	96 (17)	98 (6)	119 (9)	102 (7)	112 (7)
	Kajsija	107 (7)	85 (9)	88 (8)	113 (3)	85 (5)
	Narandža	95 (4)	90 (7)	99 (10)	84 (4)	88 (1)
	Jagoda	98 (4)	76 (5)	79 (13)	105 (7)	91 (1)
Simazin	Jabuka	91 (9)	110 (6)	116 (1)	107 (4)	120 (7)
	Kajsija	107 (6)	82 (5)	87 (7)	114 (4)	110 (15)
	Narandža	106 (2)	108 (7)	100 (10)	87 (6)	88 (1)
	Jagoda	95 (7)	87 (3)	88 (3)	105 (3)	91 (1)
Karbofuran	Jabuka	82 (10)	111 (15)	117 (3)	107 (16)	121 (1)
	Kajsija	122 (10)	114 (5)	99 (3)	97 (6)	84 (7)
	Narandža	90 (7)	88 (1)	92 (6)	85 (5)	88 (1)
	Jagoda	75 (2)	90 (7)	78 (1)	89 (5)	80 (3)
Karbaril	Jabuka	88 (16)	109 (23)	125 (2)	110 (18)	101 (18)
	Kajsija	95 (22)	85 (8)	98 (3)	116 (4)	86 (12)
	Narandža	91 (8)	77 (9)	76 (13)	79 (3)	77 (15)
	Jagoda	111 (5)	88 (4)	77 (2)	105 (5)	96 (4)
Diuron	Jabuka	87 (15)	123 (3)	113 (1)	86 (6)	122 (15)
	Kajsija	94 (12)	114 (7)	98 (9)	107 (8)	89 (10)
	Narandža	91 (10)	93 (8)	112 (9)	105 (16)	118 (11)
	Jagoda	118 (3)	80 (1)	89 (19)	82 (3)	96 (4)
Atrazin	Jabuka	106 (8)	115 (4)	117 (8)	107 (7)	112 (2)
	Kajsija	73 (20)	90 (14)	89 (4)	94 (6)	100 (5)
	Narandža	108 (7)	89 (10)	92 (6)	93 (9)	83 (3)
	Jagoda	105 (8)	88 (3)	113 (5)	115 (4)	93 (2)
Propazin	Jabuka	87 (14)	110 (3)	114 (19)	107 (2)	113 (1)
	Kajsija	112 (4)	78 (10)	80 (6)	109 (7)	111 (9)
	Narandža	94 (11)	95 (4)	96 (14)	84 (6)	88 (3)
	Jagoda	120 (6)	92 (13)	90 (4)	107 (4)	95 (5)
Linuron	Jabuka	107 (20)	123 (3)	94 (1)	100 (9)	111 (1)
	Kajsija	71 (6)	120 (6)	85 (3)	100 (4)	90 (8)
	Narandža	94 (13)	91 (8)	90 (11)	87 (22)	84 (8)
	Jagoda	97 (20)	75 (14)	87 (7)	107 (14)	94 (4)
Malation	Jabuka	95 (3)	111 (17)	105 (17)	107 (11)	114 (3)
	Kajsija	80 (2)	110 (15)	105 (4)	106 (22)	108 (8)
	Narandža	88 (1)	94 (11)	94 (6)	77 (5)	85 (2)
	Jagoda	99 (3)	107 (11)	116 (4)	70 (3)	72 (10)
Tebufenozid	Jabuka	86 (11)	114 (1)	103 (11)	94 (2)	80 (1)
	Kajsija	84 (21)	98 (5)	88 (15)	113 (23)	75 (5)
	Narandža	77 (9)	94 (13)	102 (10)	79 (12)	107 (9)
	Jagoda	70 (10)	77 (3)	79 (6)	75 (10)	92 (2)

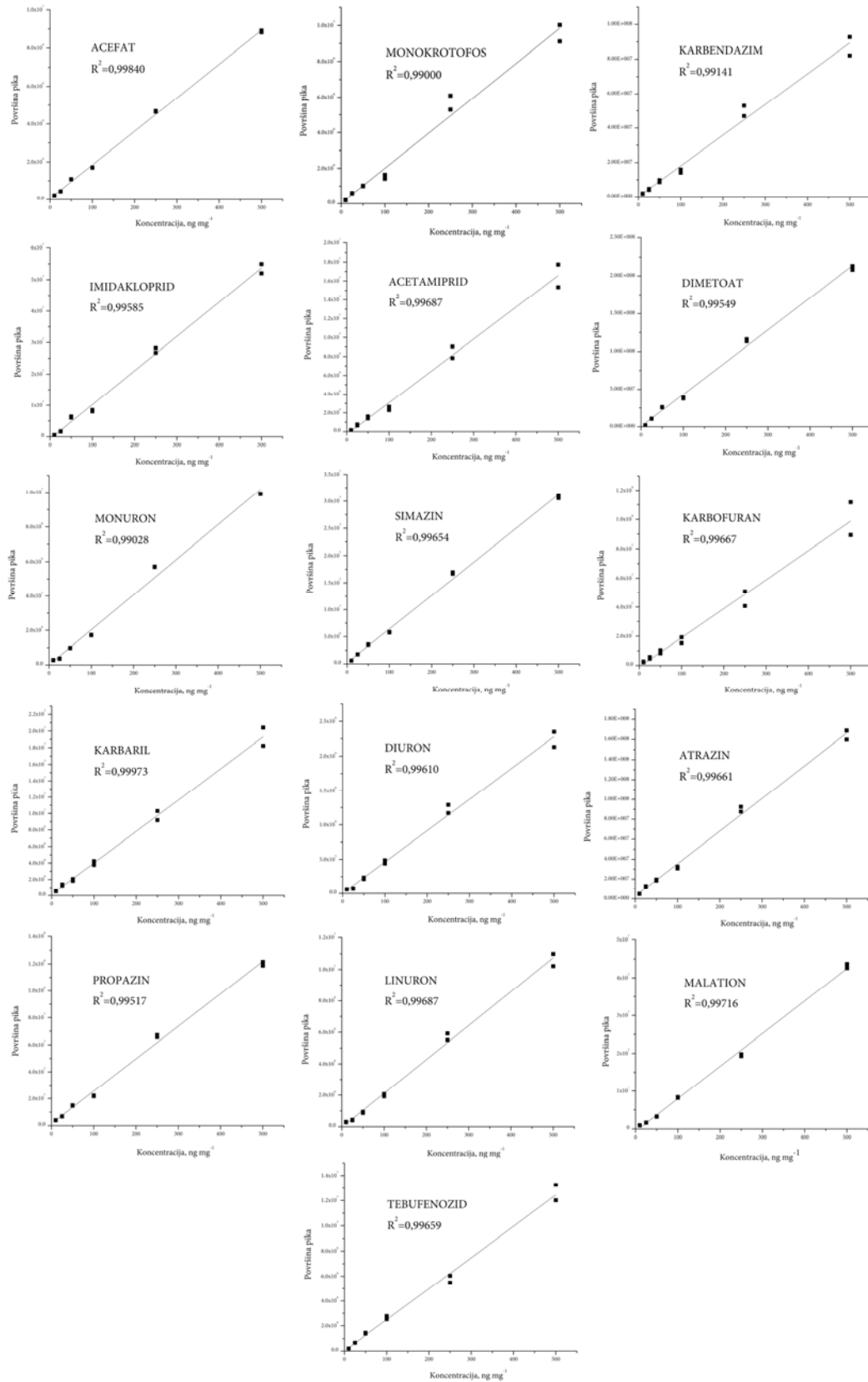
Granice detekcije (LOD) i kvantifikacije (LOQ) razvijene metode za svaki analit su izračunate koristeći odnos signala i šuma (engl. signal to noise–S/N) iz SRM masenih hromatograma za uzorak voćnog soka sa dodatom smešom pesticida, koncentracije od 10 ng cm⁻³. Granica detekcija metode izračunata je kao koncentracija

pri kojoj bi vrednost S/N iznosila 3, dok vrednost granice kvantifikacije odgovara vrednosti S/N=10. Rezultati za LOD i LOQ su prikazani u tabeli 23. Izračunate vrednosti za LOD su bile u opsegu od 0,002 do 1,43 ng cm⁻³, dok su vrednosti za LOQ bile u opsegu od 0,01 do 2,34 ng cm⁻³. Dobijene vrednosti za LOD i LOQ su značajno ispod maksimalno dozvoljenih koncentracija (MDK) propisanih za voće.

Tabela 23. Vrednosti granica detekcije (LOD) i kvantifikacije (LOQ) za ispitivane pesticide.

Pesticid	Jabuka		Kajsija		Narandža		Jagoda	
	LOD, ng mg ⁻¹	LOQ, ng mg ⁻¹	LOD, ng mg ⁻¹	LOQ, ng mg ⁻¹	LOD, ng mg ⁻¹	LOQ, ng mg ⁻¹	LOD, ng mg ⁻¹	LOQ, ng mg ⁻¹
Acefat	0,25	0,84	0,86	2,86	0,30	1,00	0,27	0,90
Monokrotofos	0,32	0,96	0,39	1,30	0,16	0,55	0,28	0,93
Karbenfazim	0,09	0,35	0,04	0,14	0,15	0,49	0,18	0,37
Imidakloprid	0,23	0,60	0,39	1,30	0,30	1,00	0,17	0,56
Acetamiprid	0,40	0,80	0,75	2,50	0,16	0,54	0,23	0,77
Dimetoat	0,07	0,15	0,16	0,55	0,08	0,28	0,02	0,07
Monuron	0,18	0,71	1,43	4,76	0,20	0,68	0,25	0,83
Simazin	0,09	0,43	0,38	1,25	0,19	0,63	0,05	0,18
Karbofuran	0,03	0,12	0,22	0,50	0,02	0,08	0,08	0,26
Karbaril	0,23	0,42	0,94	3,12	0,18	0,61	0,18	0,60
Diuron	0,05	0,13	0,10	0,50	0,11	0,95	0,02	0,08
Atrazin	0,59	2,34	0,07	0,55	0,11	0,37	0,39	1,31
Propazin	0,03	0,02	0,11	0,38	0,03	0,09	0,04	0,13
Linuron	0,25	0,82	0,55	1,85	0,28	0,94	0,30	1,00
Malation	0,09	0,41	0,002	0,01	0,15	0,51	0,11	0,35
Tebufenozid	0,18	0,59	0,51	1,69	0,10	0,33	0,20	0,67

Kao što je opisano u eksperimentalnom delu, kalibracija je izvršena pomoću standarda koji odgovaraju matrici (matrix-matched) u opsegu koncentracija od 10, do 500 ng mg⁻¹. Linearnost kalibracionih krivih je ispitana za sve pesticide u svim ispitivanim matricama. Kalibracione krive dobijene za jagodu su prikazane na slici 28. Za ostale matrice kalibracione krive su prikazane na slikama 51–53 koje su date u Prilogu. Dobijena je dobra linearnost kalibracionih krivih sa koeficientima korelacije od 0,99000 do 0,99973.



Slika 28. Kalibracione krive za ispitivane pesticide u jagodi.

4.2.4. Uticaj matrice

Uticaj matrice je ispitan poređenjem standarda koncentracija 10, 50 i 100 ng cm⁻³ za jabuku, kajsiju, narandžu i jagodu. Dobijene vrednosti za sve ispitivane koncentracije sumarno su prikazane u tabeli 24. Uticaj matrice je na isti način kao i kod voćnih sokova, tj poređenjem signala analita u standardu u metanolu i u standardu koji odgovara matrici uzorka. (Gosetti et al., 2010). Na povećanje signala ukazuje dobijena vrednost veća od 100%, dok na smanjenje signala ukazuje dobijena vrednost niža od 100%.

U tabeli 24 crvenom bojom su obeležene vrednosti iznad tj. ispod $\pm 50\%$, plavom bojom su obeležene vrednosti između ± 20 i $\pm 50\%$ i belom vrednosti između $\pm 20\%$. Pozitivne vrednosti ukazuju na povećanje signala dok negativne vrednosti ukazuju smanjenje signala. Za 72 % uzoraka uticaj matrice se može smatrati zanemarljivim ($\leq 20\%$), 23 % uzoraka je pokazalo srednji uticaj matrice (između ± 20 i $\pm 50\%$) dok je kod 5 % uzoraka došlo do veoma jakog uticaja matrice ($\geq 50\%$). Najveći uticaj matrice je nađen za linuron u narandži pri koncentraciji od 10 ng cm⁻³. U 75 % slučajeva su dobijene vrednosti koje odgovaraju povećanju signala. U slučaju propazina, linurona i malationa u svim ispitanim uzorcima, na svim posmatranim koncentracijama, je došlo do povećanja signala. Za ostale pesticide u nekim uzorcima je došlo do povećanja, a u nekim do smanjenja signala. Pošto se iz dobijenih rezultata ne može utvrditi neka zakonitost po kojoj se javlja uticaj matrice usvojeno je da je upotreba standarda koji odgovaraju matrici obavezna kako bi se obezbedila pravilna kvantifikacija analita.

Tabela 24. Uticaj matrice u različitim matricama voća za koncentracije pesticida od 10, 50 i 100 ng cm⁻³.

Voće	Uticaj matrice (%)											
	Jabuka			Kajsija			Narandža			Jagoda		
	10	50	100	10	50	100	10	50	100	10	50	100
Koncentracija, ng cm ⁻³												
Pesticid												
Acefat	16	18	17	34	15	23	-3	-5	-3	63	21	-8
Monokrotofos	4	-24	-1	6	10	2	-33	-17	13	-6	53	16
Karbendazim	28	15	15	2	4	25	-3	5	-5	40	10	9
Imidakloprid	2	21	12	2	6	3	-3	9	-5	60	6	14
Acetamiprid	24	22	14	-14	9	-5	4	-14	-6	10	4	37
Dimetoat	28	14	11	-12	-15	7	-11	-3	6	34	11	4
Monuron	21	-6	-14	22	10	-6	78	-7	12	0	21	6
Simazin	17	12	5	9	23	14	15	-12	-8	20	20	4
Karbofuran	17	22	15	-5	22	25	-8	2	5	40	63	14
Karbaril	22	-13	-27	-8	20	3	1	2	13	28	-8	8
Atrazin	35	26	10	-11	-5	9	1	-4	1	24	27	7
Diuron	43	22	5	-13	-6	-9	20	-16	10	11	-47	16
Propazin	37	8	7	8	3	8	0	1	1	18	21	1
Linuron	66	1	16	14	5	45	83	8	21	10	70	22
Malation	58	2	18	4	7	2	6	5	9	6	30	37
Tebufenozid	-15	-33	-28	4	6	21	-32	-38	38	-32	-20	-20

^a Izražen kao procenat odnosa površine pika u standardu koji odgovara matrici i površine pika standarda u metanolu. Pozitivne vrednosti odgovaraju povećanju signala, negativne smanjenju signala. Crvena boja označava jak, plava umeren, bela zanemarljiv uticaj matrice.

4.2.5. Realni uzorci

Validirana metoda je primenjena za analizu pesticida u voću kupljenom na beogradskim lokalnim pijacama (Radišić et al., 2013). Ukupno su analizirana 42 uzorka. Od voća ispitivani su: jabuka, breskva, kajsija, narandža, mandarina, trešnja, višnja, jagoda i malina. U grupu namirnica sa visokim sadržajem vode spadaju jabuka, kajsija, breskva, trešnja i višnja, dok ostalo voće spada u grupu namirnica sa visokom kiselosti i visokim sadržajem vode (SANCO, 2011). Rezultati su predstavljeni u tabeli 25.

Studija je pokazala da je 40 % uzoraka sadržalo tragove traženih pesticida. Dobijeni rezultat je u dobroj saglasnosti sa monitoring studijama sprovedenim na teritoriji Evropske unije i Brazila, prema kojima je 47 i 48 % ispitanih uzoraka voća i povrća sadržalo tragove pesticida. Najčešće detektovan pesticid, prema pomenutim studijama, je bio karbendazim (European food safety authority, 2009, Jardim & Caldas, 2012).

U ovoj studiji, karbendazim je, takođe, bio najčešće detektovan pesticid. Detektovan je u 87 % pozitivnih uzoraka. Ostali detektovani pesticidi su bili dimetoat, acetamiprid i imidakloprid koji su detektovani u 43, 25 i 12,5 % pozitivnih uzoraka. Od ukupnog broja uzoraka u kojima su detektovani tragovi pesticida, 43 % je sadržalo tragove dva pesticida. Broj uzoraka sa nađenim pesticidima je, u odnosu na veće sokove, značajno manji, međutim, koncentracije pesticida su generalno bile veće.

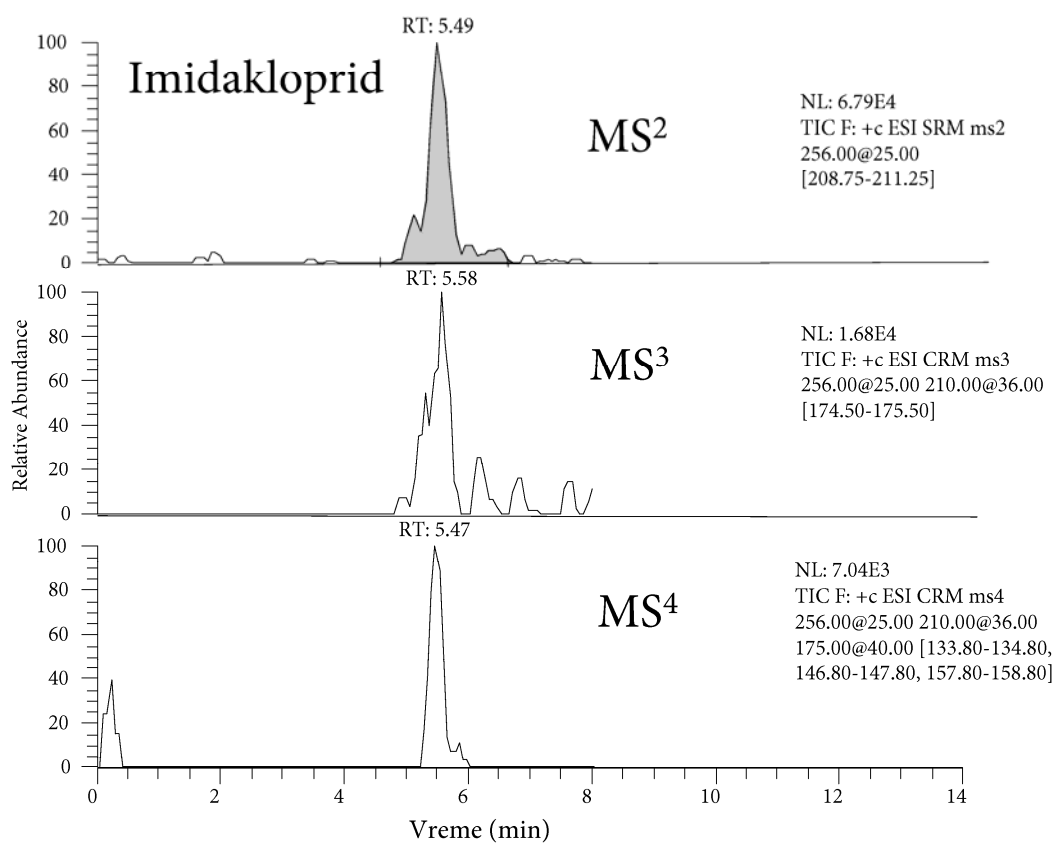
Koncentracije nađenih pesticida su bile u većini slučajeva ispod maksimalno dozvoljenih koncentracija (MDK) propisanih u Evropskoj uniji (EU pesticide database) i Republici Srbiji (Sl. gl. RS 25/2010, 2010). Samo je u jednom uzorku, uzorku kajsije, nađena koncentracija dimetotata pet puta veća od MDK vrednosti.

Generalno, broj uzoraka sa koncentracijama pesticida koje prelaze MDK vrednosti nije visok. Prema brazilskoj studiji, procenat uzoraka sa prekoračenim MDK vrednostima je ispod 3 %, u EU ispod 4 % (European food safety authority, 2009; Jardim & Caldas, 2012). Od ispitivanog voća, jedino u uzorcima mandarine i narandže nijedan od ispitivanih pesticida nije pronađen.

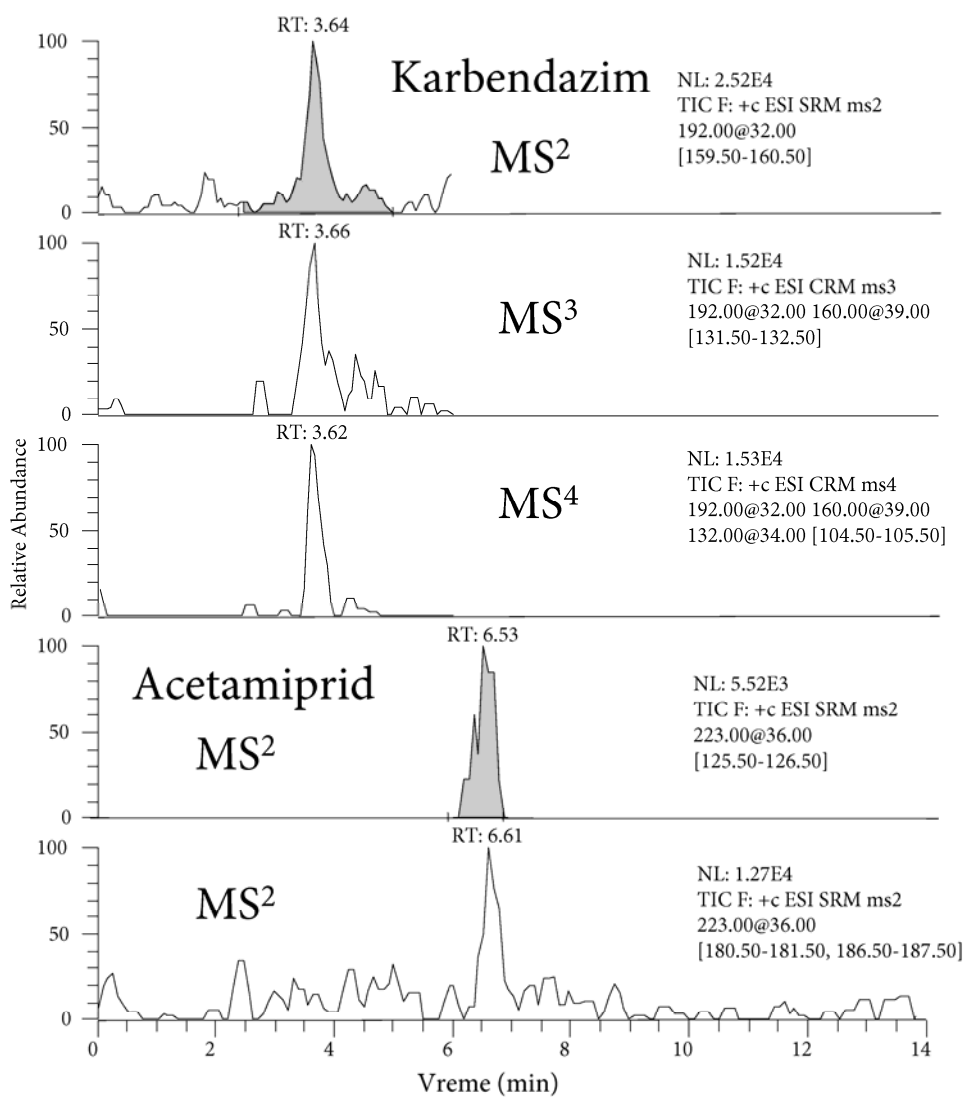
Identitet detektovanih pesticida je potvrđen pomoću metoda za potvrdu prisustva analita, kako je predhodno opisano. Obavezna je potvrda identiteta analita samo u slučaju kada je prekoračena MDK vrednost. Međutim, isto kao u slučaju sokova, naknadno su analizirani, pomoću metode za potvrdu, oni uzorci u kojima je nađeno više od jednog pesticida i ukoliko je nađena koncentracija pesticida veća od 10 ng mg^{-1} . Na slikama 29 i 30 prikazani su maseni hromatogrami za uzorke jabuke, u kojima su nađeni karbendazim i acetamiprid, i za uzorak jagode u kojem je nađen imidakloprid. Na slici 31 prikazan je hromatogram dobijen za uzorak kajsije u kojem su nađeni tragovi dva ispitivana pesticida od kojih je jedan dimetoat nađen u koncentraciji preko propisanih MDK vrednosti.

Tabela 25. Tragovi pesticida nađeni u uzorcima voća sa beogradskog tržišta.

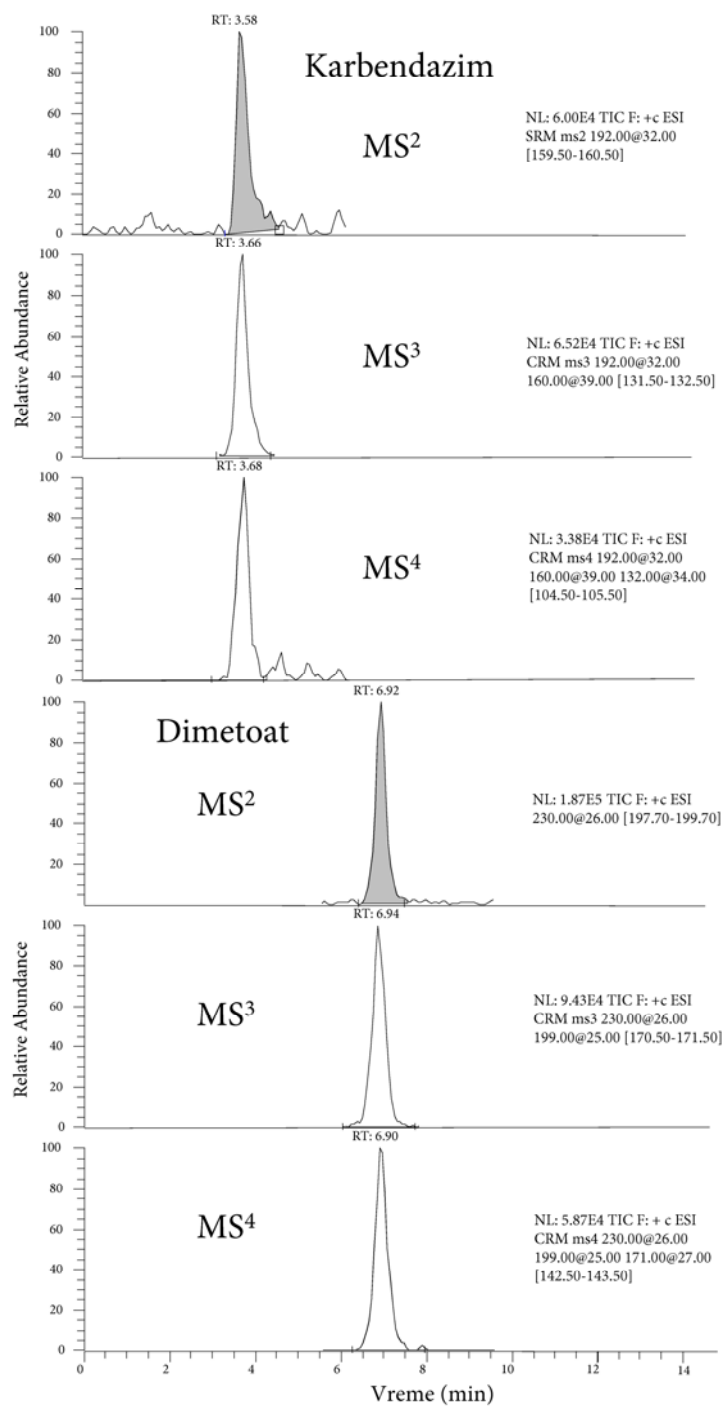
Voće	Pesticid	Koncentracija (ng mg ⁻¹)	MDK, RS (ng mg ⁻¹)	MDK, EU (ng mg ⁻¹)
Višnja				
1	Karbendazim	3.9	500	500
	Dimetoat	4.8	200	200
Trešnja				
1	Karbendazim	86.2	500	500
2	Karbendazim	97.8	500	500
	Acetamiprid	5.8	200	500
	Dimetoat	0.2	200	200
3	Karbendazim	226.6	500	500
	Imidakloprid	6.5	–	500
Jagoda				
1	Imidacloprid	61.0	–	500
Malina				
1	Karbendazim	2.1	100	100
Jabuka				
1	Karbendazim	61.4	200	200
2	Karbendazim	28.4	200	200
	Acetamiprid	12.2	100	100
3	Acetamiprid	10.6	100	100
4	Karbendazim	4.2	200	200
	Acetamiprid	14.3	100	100
5	Karbendazim	1.1	200	200
6	Karbendazim	1.2	200	200
7	Karbendazim	134.4	200	200
Kajsija				
1	Karbendazim	4.6	200	200
	Dimetoat	5.9		20
2	Karbendazim	4.1	200	200
	Dimetoat	100.0	20	20
Breskva				
1	Karbendazim	21.1	200	200
2	Karbendazim	136.5	200	200



Slika 29. Maseni hromatogrami uzorka jagode u kojem je nađen imidakloprid ($c=61,0 \text{ ng mg}^{-1}$).



Slika 30. Maseni hromatogrami uzorka jabuke u kojem su nađeni tragovi karbendazima ($c=28,4 \text{ ng mg}^{-1}$) i acetamiprida ($c=12,2 \text{ ng mg}^{-1}$).



Slika 31. Maseni hromatogrami uzorka kajsije u kojem su nađeni tragovi karbendazima ($c=4,1 \text{ ng mg}^{-1}$) i dimetoata ($c=100,0 \text{ ng mg}^{-1}$).

5. Zaključak

Cilj ovog rada je razvoj i primena nove, brze i osetljive multirezidualne analitičke metode za određivanje tragova pesticida različitih hemijskih grupa u voćnim sokovima i voću. Za analizu su odabrani pesticidi koji spadaju u najčešće korišćene u našoj zemlji. Rad obuhvata razvoj metode za efikasnu ekstrakciju i predkoncentrisanje veoma različitih analita, koja podrazumeva istovremeno razaranje, usitnjavanje i homogenizaciju čvstih i polučvrstih uzoraka, kao i ekstrakciju i prečišćavanje analita. Takođe, urađena je optimizaciju hromatografskih postupaka za razdvajanje i uspostavljanje protokola za potvrdu prisustva analita pomoću masenog detektora. Posebna pažnja je posvećena izboru reakcija za pouzdanu maseno-spektrometrijsku detekciju tragova pesticida i razvoju novih načina identifikacije i nedvosmislene potvrde prisustva analita pomoću masenog detektora sa jonskim trapom. Metoda za analizu 12 pesticida prvo je razvijena za voćne sokove, zatim je uspešno validirana za voće, s tim što je broj posmatranih analita proširen za pet pesticida koji pripadaju već posmatranim hemijskim grupama. Razvijena metoda je primenjena na realne uzorke komercijalno dostupnih sokova i voća sa beogradskih pijaca.

Na osnovu rezultata dobijenih u ovom radu može se zaključiti sledeće:

- Kvantifikacija odabranih analita može se uspešno izvesti na osnovu jednog SRM prelaza, odnosno karakteristične reakcije fragmentacije prekursor jona u najintenzivniji i najstabilniji fragmentni jon.
- Dodatne MSⁿ reakcije se mogu iskoristiti za potvrdu prisustva analita, odnosno za potvrdu pozitivnih rezultata u realnim uzorcima, ponovnom analizom

pozitivnih uzoraka uz proširenu metodu sa dodatnim SRM prelazima, u skladu sa sistemom koji je definisan SANCO 2011 protokolom.

- Dobijena ponovljivost za odnose intenziteta jona (koji se takođe koriste u potvrdi identiteta analita) u slučaju posmatranih pesticida jako dobro se uklopila u preporučene zahteve propisane SANCO 2011 protokolom.
- Pesticidi iz različitih hemijskih grupa uspešno su ekstrahovani iz matrice voćnih sokova i voća pomoću veoma brze i ekonomične tehnike pripreme uzorka, disperzije matrice na čvrstom nosaču, MSPD. Pri tome je korišćena dijamitska zemlja kao sorbent. Za kvantitativnu ekstrakciju analita dovoljna zapremina eluenta je 10 cm^3 , što predstavlja značajnu redukciju potrebne zapremine rastvarača u odnosu na klasične tehnike pripreme uzorka.
- Dobijeni prinosi metode za voće i voćne sokove su za većinu pesticida, bili u opsegu od 70 do 120%, sa RSD vrednostima uglavnom manjim od 20%. Dobijena je dobra linearnost kalibracionih krivih sa koeficijentima korelacije u većini slučajeva veća od 0,99.
- Pomoću predložene metode dostignute su veoma niske granice detekcije i kvantifikacije za sve posmatrane pesticide i u svim ispitivanim matricama.
- Uticaj matrice je bio izraženiji kod voćnih sokova nego kod voća. Pošto je u nekim slučajevima uticaj matrice bio jako visok, preko 80%, korišćeni su standardi koji odgovaraju matrici pomoću kojih je uspešno kompenzovan uticaj matrice.
- Metoda je uspešno primenjena za određivanje pesticida u voću i voćnim sokovima koji su dostupni na beogradskom tržištu. Tragovi pesticida su detektovani u 80% uzoraka voćnih sokova i u 40% uzoraka voća. I u voću i u voćnim sokovima najčešće detektovan pesticid je bio karbendazim.

Literatura

- Abhilash, P.C., Vandana Singh, & Nandita Singh. (2009). Simplified determination of combined residues of lindane and other HCH isomers in vegetables, fruits, wheat, pulses and medicinal plants by matrix solid-phase dispersion (MSPD) followed by GC–ECD. *Food Chemistry* 113, 267–271.
- Ackerman, F. (2007). The Economics of Atrazine. *International Journal of Occupational and Environmental Health* 13, 441–448.
- Albero, B., C. Sánchez-Brunete, & J.L. Tadeo. (2003). Determination of organophosphorus pesticides in fruit juices by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 6915-6921.
- Albero, B., C. Sánchez-Brunete, A. Donoso, & J.L. Tadeo. (2004). Determination of herbicide residues in juice by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1043, 127–133.
- Angioni, A, A. Garau, P. Caboni, M.T. Russo, G.A. Farris, S. Zara, & P. Cabras. (2005). Gas chromatographic ion trap mass spectrometry determination of zoxamide residues in grape, grape processing and fermentation process. *Journal of Chromatography A* 1097, 165–170.
- Annesley, T.M. (2003). Ion suppression in mass spectrometry. *Clinical Chemistry* 49, 1041–1044.
- Apffel, A., S. Fisher, G. Goldberg, P.C. Goodley & F.E. Kuhlmann. (1995). Enhanced sensitivity for peptide mapping with electrospray liquid chromatography-mass spectrometry in the presence of signal suppression due to trifluoroacetic acid-containing mobile phases. *Journal of Chromatography A* 712, 177–190.

- Araoud, M., W. Douki, A. Najjar, & N. Gazzah. (2007). Multiresidue analysis of pesticides in fruits and vegetables by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Environmental Science and Health Part B* 42, 179–187.
- Ardrey, R.E. (2003). *Liquid chromatography – mass spectrometry: an introduction*, University of Huddersfield, UK.
- Baglio, D., D. Kotzias, & B.R. Larsen. (1999). Atmospheric pressure ionisation multiple mass spectrometric analysis of pesticides. *Journal of Chromatography A* 854, 207–220.
- Barker, S.A. (2000a). Application of matrix solid-phase dispersion in food analysis. *Journal of Chromatography A*. 880. 63–68.
- Barker, S.A. (2000b). Matrix solid-phase dispersion – a review. *Journal of Chromatography A*. 885. 115–127.
- Barker, S.A. (2007). Matrix solid phase dispersion (MSPD) – a review. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 70, 151–162.
- Beltran, J., A. Peruga, E. Pitarch, F.J. López, & F. Hernández. (2003). Application of solid-phase microextraction for the determination of pyrethroid residues in vegetable samples by GC-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 376, 502–511.
- Berrada, H., M. Fernández, M.J. Ruiz, J.C. Moltó, J. Mañes, & G. Font. (2010). Surveillance of pesticide residues in fruits from Valencia during twenty months (2004/05). *Food Control* 21, 36–44.
- Blasco, C., G. Font, & Y. Picó. (2002a). Comparison of microextraction procedures to determine pesticides in oranges by liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 970, 201–212.
- Blasco, C., M. Fernández, Y. Picó, G. Font, & J. Mañes. (2002b). Simultaneous determination of imidacloprid, carbendazim, methiocarb and hexythiazox in peaches and nectarines by liquid chromatography–mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 461, 109–116.

- Blasco, C., Y. Picó, J. Mañes, & G. Font. (2002c). Determination of fungicide residues in fruits and vegetables by liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 947, 227–235.
- Blasco, C., G. Font, J. Mañes, & Y. Picó. (2003). Solid–phase microextraction liquid chromatography/tandem mass spectrometry to determine postharvest fungicides in fruits. *Analytical Chemistry* 75, 3606–3615.
- Blasco, C., G. Font, & Y. Picó. (2004). Multiple–stage mass spectrometric analysis of six pesticides in oranges by liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization–ion trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1043, 231–238.
- Blasco, C., G. Font, & Y. Picó. (2005). Analysis of pesticides in fruits by pressurized liquid extraction and liquid chromatography–ion trap–triple stage mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1098, 37–43.
- Bonfiglio, R., R.C. King, T.V. Olah, & K. Merkle. (1999). The effects of sample preparation methods on the variability of the electrospray ionization response for model drug compounds. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 13, 1175–1185.
- Bosak, A. (2006). Organofosforni spojevi: klasifikacija i reakcije sa enzimima. *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju* 57, 445–457.
- Botitsi, H., A. Economou, & D. Tsipi. (2007). Development and validation of a multi-residue method for the determination of pesticides in processed fruits and vegetables using liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 389, 1685–1695.
- Boundina, A., C. Emmelin, A. Beeliouamer, M.F. Greier-Loustalot, & J.M. Chovelon. (2003). Photochemical behaviour of carbendazim in aqueous solution. *Chemosphere* 50, 649–655.
- Brutti, M., C. Blasco, & Y. Picó. (2010). Determination of benzoylurea insecticides in food by pressurized liquid extraction and LC-MS. *Journal of Separation Sciences* 33, 1–10.

- Brzezinka, H. & N. Bertram. (2002). Combined thin-layer chromatography and mass spectrometry for the screening of pesticides in samples derived from biological origins. *Journal of Chromatographic Science* 40, 609–613.
- Capriotti, A.L., C. Cavaliere, A. Laganà, S. Piovesana, & R. Samperi. (2013). Recent trends in matrix solid-phase dispersion. *Trends in Analytical Chemistry* 43, 53–66.
- Chen, T., & G. Chen. (2007). Identification and quantitation of pyrethroid pesticide residues in vegetables by solid-phase extraction and liquid chromatography/electrospray ionization ion trap mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 21, 1848–1854.
- Chua, X.G., X.Z. Hub, & H.Y. Yaoa. (2005). Determination of 266 pesticide residues in apple juice by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography–mass selective detection. *Journal of Chromatography A*. 1063, 201–210.
- Cody, R.B. (2002). Electrospray ionization mass spectrometry: history, theory, and instrumentation. In: Pramanik, B.N., A.K. Ganguly, & M.L. Gross, (ed) *Applied electrospray mass spectrometry*, Taylor & Francis, USA.
- Cole, R.B. (1997). *Electrospray ionization mass spectrometry, fundamentals, instrumentation and applications*, John Wiley & Sons, New York, USA.
- Commision Decision. (2002). Commision Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (2002/657/EC). *Official Journal Of the European Communities* L221, 8–36.
- Commission Decision. (1999). Commission Decision of 17 February 1999 concerning the non-inclusion of DNOC of active substance in Annex I to Council Directive 91/414/EEC and the withdrawal of authorizations for plant protection products containing this active substance, *Official Journal of the European Communities* L54, 21–22.
- Cortés-Aguado, S., N. Sánchez-Morito, F.J. Arrebola, A. Garrido Frenich, & J.L. Martíney Vidal. (2008). Fast screening of pesticide residues in fruit juice by solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Food Chemistry* 107, 1314–1325.

- Dams, R., T. Benijts, W. Günther, W. Lambert, & A. De Leenheer. (2002). Influence of the eluent composition on the ionization efficiency for morphine of pneumatically assisted electrospray, atmospheric-pressure chemical ionization and sonic spray. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 16, 1072–1077.
- Di Corcia, A., C. Crescenzi, & A. Laganá. (1996). Evaluation of a method based on liquid chromatography/electrospray/mass spectrometry for analyzing carbamate insecticides in fruits and vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44, 1930-1938.
- Environmental health criteria 63. (1986). Preuzeto 20. aprila 2013. Environmental health criteria for organophosphorus insecticides: A general introduction, World Health Organization, Geneva. Dostupno na:
<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc63.htm>
- Environmental health criteria 64. (1986). Preuzeto 20. aprila 2013. Environmental health criteria for carbamate pesticides: A general introduction, World Health Organization, Geneva. Dostupno na:
<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc64.htm>
- Eshraghi, J. & K. Chowdhury. (1993). Factors affecting electrospray ionization of effluents containing trifluoroacetic acid for high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 65, 3528–3533.
- EU pesticide database. Preuzeto 22. aprila 2013. Active substances. Dostupno na:
http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm?event=activesubstance.selection
- European food safety authority. (2009). Annual report on pesticide residues according to Article 32 of Regulation (EC) No. 396/2005. *EFSA Scientific Report* 305, 1–106.
- Fang, G., G. Min, J. He, C. Zhang, K. Qian, & S. Wang. (2009). Multiwalled carbon nanotubes as matrix solid-phase dispersion extraction absorbents to determine 31 pesticides in agriculture samples by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 3040–3045.
- Fernandes, V.C., J. L. Vera, V.F. Domingues, L.M.S. Silva, N. Mateus, & C. Delerue-Matos. (2012). Mass spectrometry parameters optimization for the 46 multiclass

- pesticides determination in strawberries with gas chromatography ion-trap tandem mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 23, 2187–2197.
- Fernández, L.E.M. (2007). Introduction to ion trap mass spectrometry: application to the structural characterization of plant oligosaccharides. *Carbohydrate Polymers* 68, 797–807.
- Fernández, M., Picó Y., & Mañes J. (2000). Determination of carbamate residues in fruits and vegetables by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 871, 43–56.
- Ferrer, C., M.J. Martínez-Bueno, A. Lozano, & A.R. Fernández-Alba (2011). Pesticide residue analysis of fruit juices by LC–MS/MS direct injection. One year pilot survey. *Talanta* 83, 1552–1561.
- Filho A. M., F. Neves dos Santos, & P. Alfonso de Paula Pereira. (2010). Development, validation and application of a methodology based on solid-phase micro extraction followed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (SPME/GC–MS) for the determination of pesticide residues in mangoes. *Talanta* 81, 346–354.
- Gao, S., Z.-P. Zhang & H.T. Karnes. (2005). Sensitivity enhancement in liquid chromatography/atmospheric pressure ionization mass spectrometry using derivatization and mobile phase additives. *Journal of Chromatography B* 825, 98–110.
- Garcinuño, R.M., L. Ramos, P. Fernández-Hernando, & C. Cámara. (2004). Optimization of a matrix solid-phase dispersion method with subsequent clean-up for the determination of ethylene bisdithiocarbamate residues in almond samples. *Journal of Chromatography A* 1041, 35–41.
- Goodwin, L., R.J. Startin, M.D. Goodall, & J.B. Keely. 2003. Tandem mass spectrometric analysis of glyphosate, glufosinate, aminomethylphosphonic acid and methylphosphinicopropionic acid. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 17,963–969.

- Gosetti, F., E. Mazzucco, D. Zampirei, & M.C. Gennaro. (2010). Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1217, 3929–3937.
- Granby, K., Andersen, J. H., & Christensen, H. B. (2004). Analysis of pesticides in fruit, vegetables and cereals using methanolic extraction and detection by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 520, 165–176.
- Grube, A., D. Donaldson, T. Kiely, & L. Wu. (2011). Pesticides industry sales and usage 2006 and 2007 market estimates. United States Environmental Protection Agency, Washington, DC. Dostupno na: http://www.epa.gov/opp00001/pestsales/07pestsales/market_estimates2007.pdf
- Grujic, S., M. Radisic, T. Vasiljevic, & M. Lausevic. (2005). Determination of carbendazim residues in fruit juices by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Additives and Contaminants* 22, 1132–1137.
- Grujic, S., T. Vasiljevic, M. Radisic, & M. Lausevic. (2010). Determination of pesticides by matrix-solid phase dispersion and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. In: Nollet & Rathore (ed) *Handbook of pesticides: Methods for pesticide residues analysis* CRC Press, Boca Raton, 141–164.
- Hamoutene, D., J.F. Payne, H. Volkoff. (2008). Effects of tebufenozide on some aspects of lake trout (*Salvelinus namaycush*) immune response. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 69, 173–179.
- Hazardous Substances Data Bank. Preuzeto 22. aprila 2013. Comprehensive, peer-reviewed toxicology data for about 5,000 chemicals. Dostupno na: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>
- Hernández, F., O.J. Pozo, J.V. Sancho, L. Bijlsma, M. Barreda, & E. Pitarch. (2006). Multiresidue liquid chromatography tandem mass spectrometry determination of 52 non gas chromatography-amenable pesticides and metabolites in different food commodities. *Journal of Chromatography A* 1109, 242–252.
- Hiraoka, K., & I. Kudaka. (1992). Negative-mode electrospray-mass spectrometry using nonaqueous solvents. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 6, 265–268.

- Huat, G.T., & M.K. Chai. (2011). Sample preparation in the analysis of pesticides residue in food by chromatographic techniques. In: Stoytcheva, M. (ed) *Pesticides - Strategies for Pesticides Analysis*. InTech, DOI: 10.5772/13497. Dostupno na: <http://www.intechopen.com/books/pesticides-strategies-for-pesticides-analysis/sample-preparation-in-the-analysis-of-pesticides-residue-in-food-by-chromatographic-techniques>
- Húšková, R., E. Matisová, & M. Kirchner. (2008). Fast GC–MS pesticide multiresidue analysis of apples. *Cromatographia* 68, S49–S55.
- James, R.A., I.H. Picciotto, E. Willman, J.A. Keller, & M.J. Charles. (2002). Determinants of serum polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides measured in women from the child health and development study cohort, 1963–1967. *Environmental Health Perspectives* 110, 617–624.
- Janjić, V., & S. Mitrić. (2004). *Pesticidi u poljoprivredi i šumarstvu*, Poljoprivredni fakultet, Banja Luka. 2004.
- Jansson, C., T. Pihlström, B.G. Österdahl, & K.E. Markides. (2004). A new multi-residue method for analysis of pesticide residues in fruit and vegetables using liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection, *Journal of Chromatography A* 1023, 93–104.
- Jardim A.N.O., & Caldas E.D. (2012). Brazilian monitoring programs for pesticide residues in food—Results from 2001 to 2010. *Food Control* 25, 607–616.
- Jeanville, P.M., E.S. Estapé, & I. Torres-Negrón de Jeanville. (2003). The effect of liquid chromatography eluents and additives on the positive ion responses of cocaine, benzoylecgonine, and ecgonine methyl ester using electrospray ionization. *International Journal of Mass Spectrometry* 227, 247–258.
- Juan-García, A., G. Font, C. Juan, & Y. Picó. (2010). Pressurised liquid extraction and capillary electrophoresis–mass spectrometry for the analysis of pesticide residues in fruits from Valencian markets, Spain. *Food Chemistry* 120, 1242–1249.
- Kmellár, B., P. Fodor, L. Parea, C. Ferrer, M.A. Martínez-Uroz, A. Valverde, & A.R. Fernandez-Alba. (2008). Validation and uncertainty study of a comprehensive list of

- 160 pesticide residues in multi-class vegetables by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1215, 37–50.
- Kostiainen, R., & T.J. Kauppila. (2009). Effect of eluent on the ionization process in liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1216, 685–699.
- Kristenson, E.M., L Ramos,. & U.A.T. Brinkman. (2006). Recent advances in matrix solid phase dispersion. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 25,. 96–111.
- Kruve, A., A. Künnapas, K. Herodes, & I. Leito.(2008). Matrix effects in pesticide multi-residue analysis by liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1187, 58–66.
- Kuhlmann, F.E., A. Apffel, S.M. Fisher, G. Goldberg & P.C. Goodley. (1995). Signal enhancement for gradient reverse-phase high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry analysis with trifluoroacetic and other strong acid modifiers by postcolumn addition of propionic acid and isopropanol. *Journal of American Society for Mass Spectrometry* 6, 1221–1225.
- Lagunas-Allué, L., J. Sanz-Asensio, M.T. & Martinez-Soria. (2012). Comparison of four extraction methods for the determination of fungicide residues in grapes through gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1270, 62–71.
- Li, P., X.Yang, H. Miao, Y. Zhao, W. Liu, & Y.Wu. (2013) Simultaneous determination of 19 triazine pesticides and degradation products in processed cereal samples from Chinese total diet study by isotope dilution-high performance liquid chromatography-linear ion trap mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta* <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2013.04.027>
- Liapis, S.K., P. Aplada–Sarlis, & V.N. Kyriakidis. (2003). Rapid multi–residue method for determination of azinphos methyl, bromopropylate, chlorpyrifos, dimethoate, parathion methyl and phosalone in apricots and peaches by using negative chemical ionization ion trap technology. *Journal of Chromatography A* 996, 181–187.

- Liška, I. & J. Slobodnik. (1996). Comparison of gas and liquid chromatography for analysing polar pesticides in water samples. *Journal of Chromatography A* 733, 235–258.
- Liu, J. (2001). Phenylurea herbicides. In: Krieger, R. *Hanbook of pesticide toxicology, Volume I*. Academic Press, San Diego, USA, 1521–1523.
- Liu, S., Z. Zheng, F. Wei, Y. Ren, W. Gui, H. Wu, & G. Zhu. (2010). Simultaneous determination of seven neonicotinoid pesticide residues in food by ultraperformance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 3271–3278.
- Mayer, V.R. (2004). *Practical high-performance liquid chromatography* (forth edition), John Willy & Sons, Ltd., West Sussex, UK.
- McCalley, D.V. (1996). Effect of organic solvent modifier and nature of solute on the performance of bonded silica reversed-phase columns for the analysis of strongly basic compounds by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 738, 169–179.
- McLuckey, S.C., G.L. Glish, & G.J. Van Berkel. (1991). Multiple stages of mass spectrometry in a quadrupole ion trap mass spectrometer: prerequisites. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Process* 106, 213–235.
- Michel, M., & B. Buszewski. (2004). Optimization of a matrix solid-phase dispersion method for the determination analysis of carbendazim residue in plant material. *Journal of Chromatography B*, 800, 309–314.
- Mol, H.G.J., R.C.J. Van Dam, & O.M. Steijger. (2003). Determination of polar organophosphorus pesticides in vegetables and fruits using liquid chromatography with tandem mass spectrometry: selection of extraction solvent. *Journal of Chromatography A*, 1015, 119–127.
- Morais, S., M. Correia, V. Domingues, & C. Delerue-Matos. (2011). Urea Pesticides. In: Stoytcheva M. (ed) *Pesticides - Strategies for Pesticides Analysis*. InTech, DOI: 10.5772/13126. Available from: <http://www.intechopen.com/books/pesticides-strategies-for-pesticides-analysis/urea-pesticides>

- Morello, M., L. Previale, & P. Quaglino. (1996). Gas chromatographic system equipped with a mass detector and a selective nitrogen-phosphorous detector operating simultaneously in the analysis of pesticide residues. *Journal of Chromatography A* 740, 263–271.
- Najam, A.R., M.P. Korver, C.C. Williams, V.W. Burse, & L.L. Needham. (1999). Analysis of a mixture of polychlorinated biphenyls and chlorinated pesticides in human serum by column fractionation and dual-column capillary gas chromatography with electron capture detection. *Journal of AOAC International* 82, 177–185.
- Navarro, M., Y. Picó, R. Marín, & J. Mañes. (2002). Application of matrix solid-phase dispersion to the determination of a new generation of fungicides in fruits and vegetables. *Journal of Chromatography A* 968, 201–209.
- Needham, S.R., P.R. Brown, K. Duff, & D. Bell. (2000). Optimized stationary phases for the high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometric analysis of basic pharmaceuticals. *Journal of Chromatography A* 869, 159–170.
- Niessen, W.M.A. (2006). *Liquid chromatography mass spectrometry (third ed.)*, CRC Press, Boca Raton.
- Niessen W.M.A. (2010). Group-specific fragmentation of pesticides and related compounds in liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1217, 4061–4070.
- Perret, D., A. Gentili, S. Marchese, M. Sergi, & G. D'Ascenzo. (2002). Validation of a method for the determination of multiclass pesticide residues in fruit juices by liquid chromatography/tandem mass spectrometry after extraction by matrix solid-phase dispersion. *Journal of AOAC International* 85, 724–730.
- Picó, Y., C. Blasco, & G. Font. (2004). Environmental and food applications of LC–tandem mass spectrometry in pesticide-residue analysis: an overview. *Mass Spectrometry Reviews* 23, 45–85.
- Pryde, A., & M.T. Gilbert. (1979). *Application of high performance liquid chromatography*, Chapman & Hall Ltd., London-New York, USA.

- Radišić, M., S. Grujić, T. Vasiljević, & M. Laušević. (2009). Determination of selected pesticides in fruit juices by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Food Chemistry* 113, 712–719.
- Radišić, M.M., T.M. Vasiljević, N.N. Dujaković, & M.D. Laušević. (2013). Application of matrix solid phase dispersion and liquid chromatography-ion trap mass spectrometry for the analysis of pesticide residues in fruits, *Food Analytical Methods* 6, 648–657.
- Ramos, J.J., R. Rial-Oterob, L. Ramos, & J.L. Capelob. (2008). Ultrasonic-assisted matrix solid-phase dispersion as an improved methodology for the determination of pesticides in fruits. *Journal of Chromatography A* 1212, 145–149.
- Ramos, J.J., M.J. Gonzáles, & L. Ramos. (2009). Comparison of gas chromatography-based approaches after fast miniaturized sample preparation for the monitoring of selected pesticide classes in fruits, *Journal of Chromatography A* 1216, 7307–7313.
- Remedios, F., G.F. Antonia, M.V.J. Luis, R.G. Roberto, & H.T.M. Elena. (2009). One-year Routine application of a new and rapid method based on ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry to the analysis of selected pesticides in citrus fruits. *Analytical Sciences* 25, 535–540.
- Reynolds, S.L. (2004). Sample handling and clean-up procedures. In: Fernandez Alba A.R. (ed) *Chromatographic-Mass Spectrometric Food Analysis for Trace Determination of Pesticide Residues* 43, Elsevier.
- Rodrigues, S.A., S.S. Caldas, & E.G. Primel. (2010). A simple; efficient and environmentally friendly method for the extraction of pesticides from onion by matrix solid-phase dispersion with liquid chromatography–tandem mass spectrometric detection. *Analytica Chimica Acta* 678, 82–89.
- Sagratini, G., J. Mañes, D. Giardina, P. Damiani, & Y. Picó. (2007). Analysis of carbamate and phenylurea pesticide residues in fruit juices by solid-phase microextraction and liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1147, 135–143.

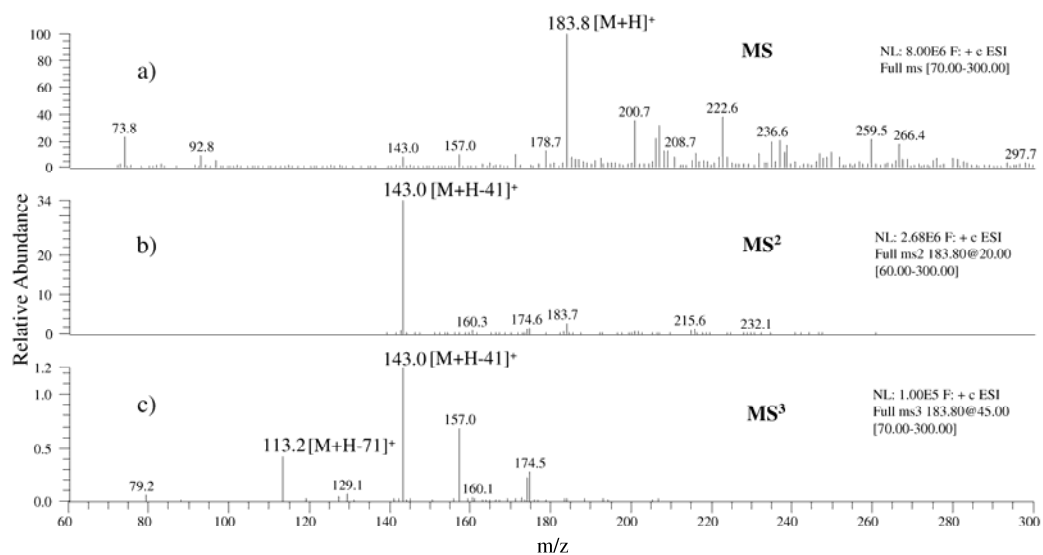
- Sánchez–Brunete, C., A.I. García–Valcárcel, & J.L. Tadeo. (1994). Determination of residues of phenoxy acid herbicides in soil and cereals by gas chromatography–ion trap detection. *Journal of Chromatography A* 675, 213–218.
- SANCO. (2011). Document No. SANCO/12495/2011, *Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed*. Dostupno na: http://ec.europa.eu/food/plant/protection/pesticides/docs/qualcontrol_en.pdf
- Sannino, A. (1995). Investigation into contamination of processed fruit products by carbendazim, methyl thiophanate and thiabendazole. *Food Chemistry* 2, 57-61.
- Sannino, A., L. Bolzoni, & M. Bandini. (2004). Application of liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry to the determination of a new generation of pesticides in processed fruits and vegetables. *Journal of Chromatography A* 1036, 161–169.
- Savant, R.H., K. Banerjee, S.C. Uttore, S.P. Soma Dugupta, M.S. Ghaste, & P.G. Adsule. (2010). Multiresidue Analysis of 50 pesticides in grape, pomegranate, and mango by gas chromatography-ion trap mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 1447–1454.
- Sl. gl. RS 25/2010. (2010). Pravilnik o maksimalno dozvoljenim količinama ostataka sredstava za zaštitu bilja u hrani i hrani za životinje za koju se utvrđuju maksimalno dozvoljene količine ostataka sredstava za zaštitu bilja. *Službeni glasnik Republike Srbije* 25, 17–184.
- Soler, C., J. Mañes, & Y. Picó. (2004). Liquid chromatography–electrospray quadrupole ion-trap mass spectrometry of nine pesticides in fruits. *Journal of Chromatography A* 1048, 41–49.
- Soler, C., J. Mañes, & Y. Picó. (2005). Routine application using single quadrupole liquid chromatography–mass spectrometry to pesticides analysis in citrus fruits. *Journal of Chromatography A* 1088, 224–233.
- Srivastava, S., P. Goyal, M.M. Srivastava. (2010). Pesticides: Past, Present and Future in Nollet, L.M.L. & H.S. Rathore (ed), *Handbook of Pesticides: Methods of Pesticide Residues Analysis*, CRC Press, Boca Raton, 47–65.

- Stamenković, S. (2005). Zimsko prskanje voćaka. Dostupno na:
<http://poljoprivreda.info/?oid=9&id=414>
- Steen, R.J.C.A., A.C. Hogenboom, P.E.G. Leonards, R.A.L. Peerboom, W.P. Cofino & U.A.Th. Brinkman. (1999). Ultra-trace-level determination of polar pesticides and their transformation products in surface and estuarine water samples using column liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 857, 157–166.
- Straub, R.F., & R.D. Voyksner. (1993). Negative ion formation in electrospray mass spectrometry. *Journal of American Society for Mass Spectrometry* 4, 578-587.
- Tadeo, J. L. & C. Sdnchez-Brunete. (2003). Analysis of pesticide residues in fruit juices by matrix-solid phase dispersion and gas chromatographic determination. *Cromatographia* 57, 793–798.
- Tadeo, J.L., C. Sánchez-Brunete, & L. González (2008). Pesticides: Classification and Properties in Tadeo J.L. (ed), *Analysis of pesticides in food and environmental samples*, CRC Press, Boca Raton, 1–34.
- Tekel, J. & Š. Hatrík. (1996). Pesticide residue analyses in plant material by chromatographic methods: clean-up procedures and selective detectors. *Journal of Chromatography A* 754, 397-410.
- Temesi, D., & Law, B. (1999). The effect of LC eluent composition on MS responses using electrospray ionization. *LC-GC Europe* 12, 175–180.
- The WHO Recommended Classification of Pesticides. (2010). *The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification: 2009*. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Thrumman, E.M., I. Ferrer, J.A. Zweigenbaum, J.F. García-Reyes, M. Woodman, & A.R. Fernández-Alba. (2005). Discovering metabolites of post-harvest fungicides in citrus with liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry and ion trap tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1082, 71–80.
- Tomizawa, M. & J.E. Casida. (2005). Neonikotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 45, 247–268.

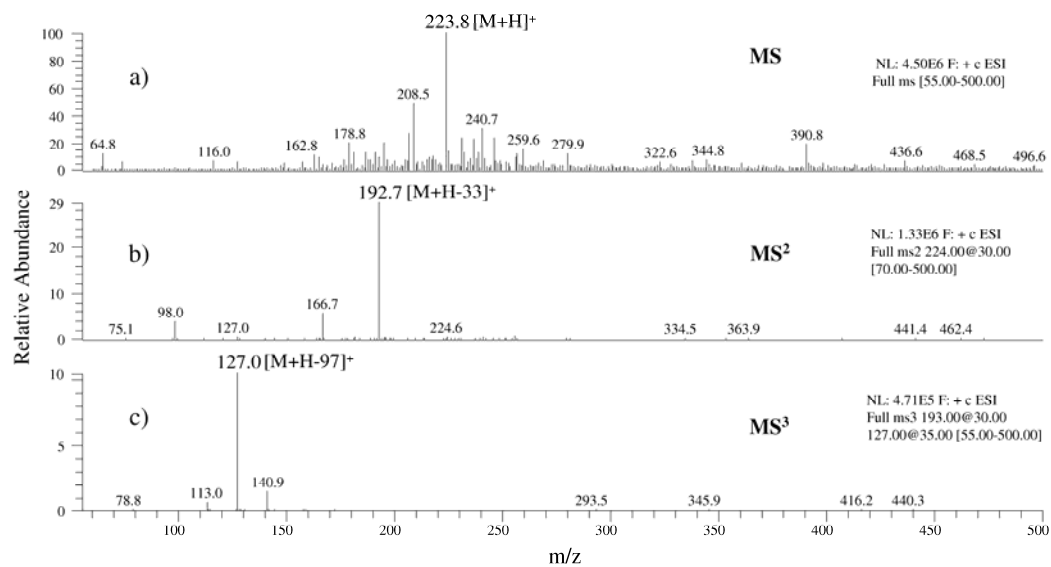
- Tomkins, B.A., & A.R. Barnard. (2002). Determination of organochlorine pesticides in ground water using solid-phase microextraction followed by dual-column gas chromatography with electron-capture detection. *Journal of Chromatography A* 964, 21–33.
- Tomlin, C.D.S. (2002–2003). *The e-pesticide manual* (12th edition, version 2.2). British Crop Protection Council, Hampshire, UK.
- Topuz, S., G. Özhan, & B. Alpertunga (2005). Simultaneous determination of various pesticides in fruit juices by HPLC-DAD *Food Control* 16, 87–92.
- Vankateswarly, P., K.R. Mohan, Ch. R. Kumar, & K. Sessaiah. (2007). Monitoring of multi-class pesticide residues in fresh grape samples using liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry. *Food Chemistry* 105 , 1760–1766.
- Viana, E., J.C. Moltó, & G. Font. (1996). Optimization of a matrix solid-phase dispersion method for the analysis of pesticide residues in vegetables. *Journal of Chromatography A*. 754, 437–444.
- Wang, J., W. Chow, & D. Leung. (2010). Applications of LC/ESI-MS/MS and UHPLC QqTOF MS for the determination of 148 pesticides in fruits and vegetables. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 396, 1513–1538.
- William A.D., M.G. Leeming, & R.A.J. O’Hair. (2012). Gas-phase ion chemistry of the pesticide imidacloprid: Proton driven radical fragmentation of the nitro-guanidine functional group. *International Journal of Mass Spectrometry* 316– 318, 91–99.
- Xte, W., C. Han, Y. Qian, H. Ding, X. Chen, & J. Xi. (2011). Determination of neonicotinoid pesticides residues in agricultural samples by solid-phase extraction combined with liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A* 1218, 4426–4433.
- Yamamoto, I., & J.E. Casida. (1999). Nicotinoid insecticides and the nicotinic acetylcholine receptor. Springer-Verlag, Tokyo.
- Yinon, J., & A.Vincze. (1997). Collision–induced dissociation (CID) processes in some carbamate and phenylurea pesticides studied by ion–trap MS/MS. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* 167/168, 21–33.

- Zambonin, C.G., M. Quinto, N. De Vietro, & F. Palmisano. (2004). Solid-phase microextraction – gas chromatography mass spectrometry: A fast and simple screening method for the assessment of organophosphorus pesticides residues in wine and fruit juices. *Food Chemistry* 86, 269–274.
- Zrostlíková, J., J. Hajšlová, J. Poustka, & P. Begany. (2002). Alternative calibration approaches to compensate the effect of co-extracted matrix components in liquid chromatography– electrospray ionisation tandem mass spectrometry analysis of pesticide residues in plant materials. *Journal of Chromatography A* 973, 13–26.
- Zrostlíková, J., J. Hajslová, T. Kovalczuk, R. Stěpán, & J. Poustka. (2003). Determination of seventeen polar/thermolabile pesticides in apples and apricots by liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of AOAC International* 86, 612–622.

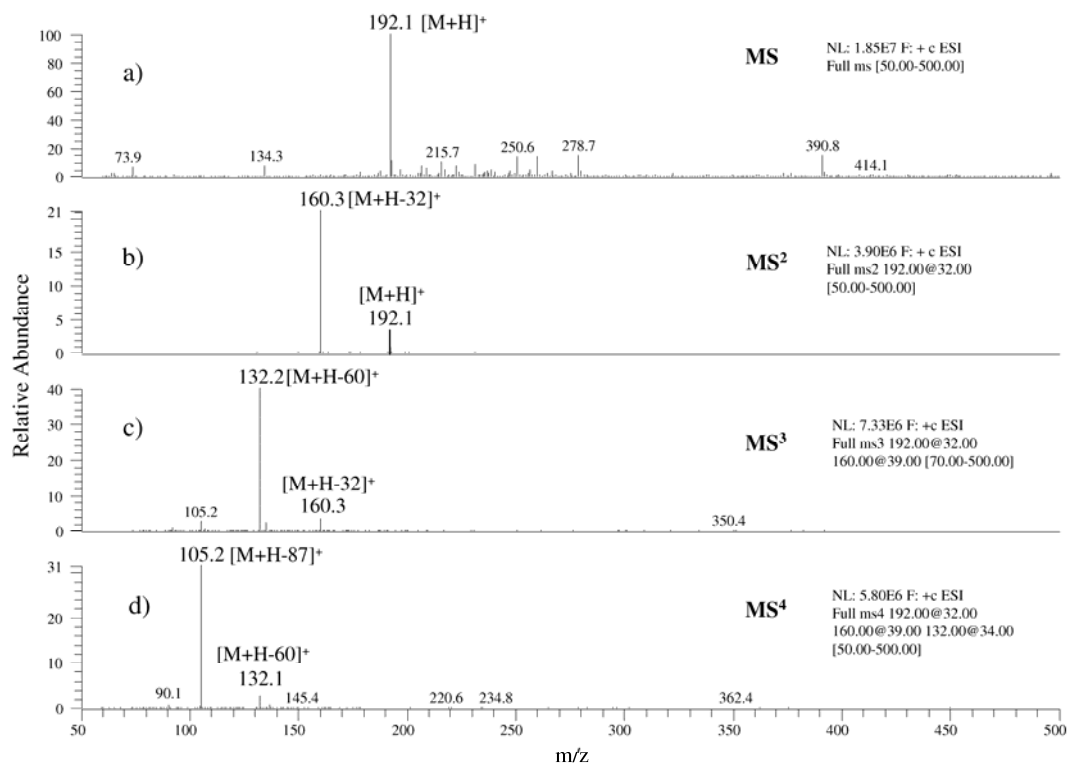
PRILOG



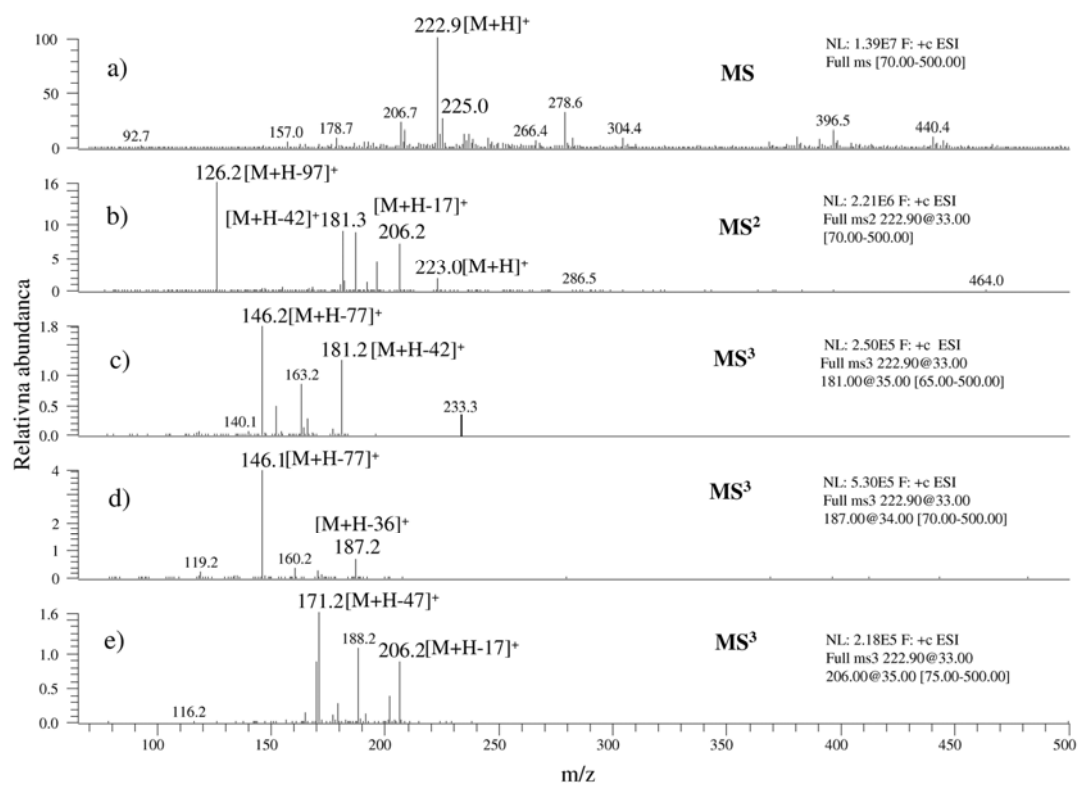
Slika 32. Maseni spektri acefata: a) MS (ESI+); b) MS² (ESI+); c) MS³ (ESI+).



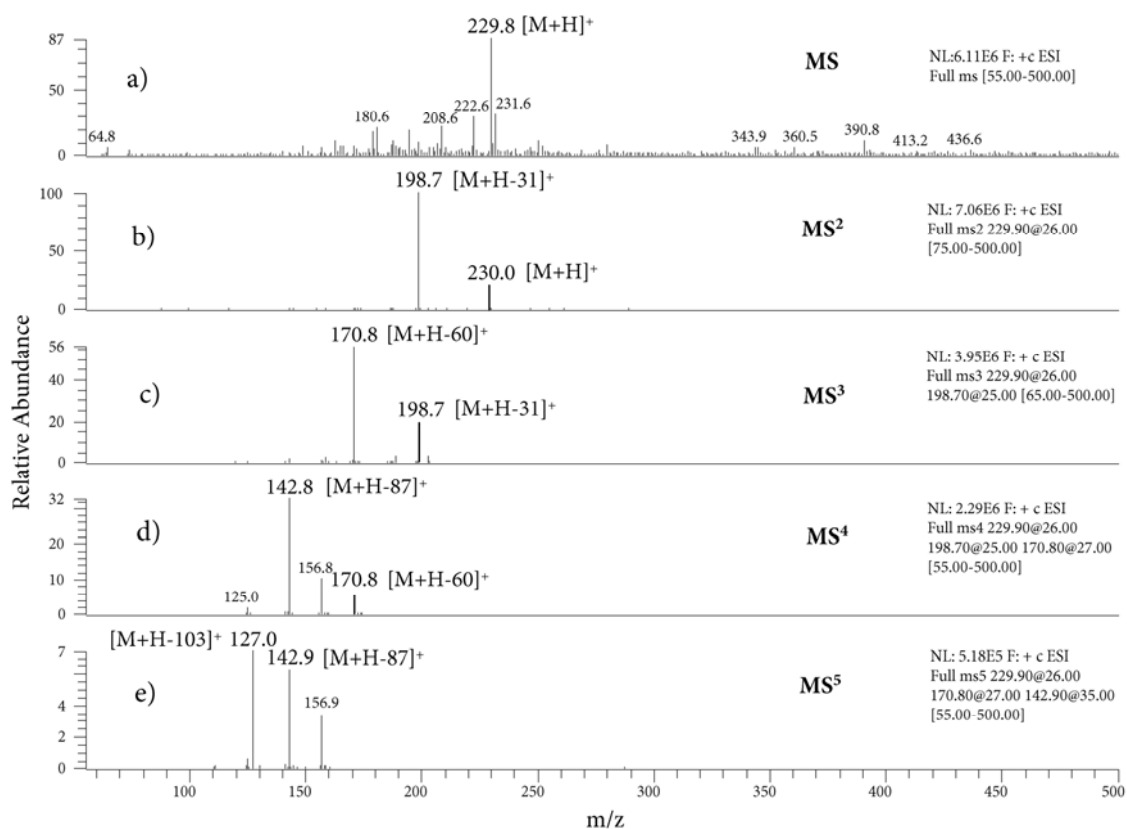
Slika 33. Maseni spektri monokrotofosa: a) MS (ESI+); b) MS² (ESI+); c) MS³ (ESI+).



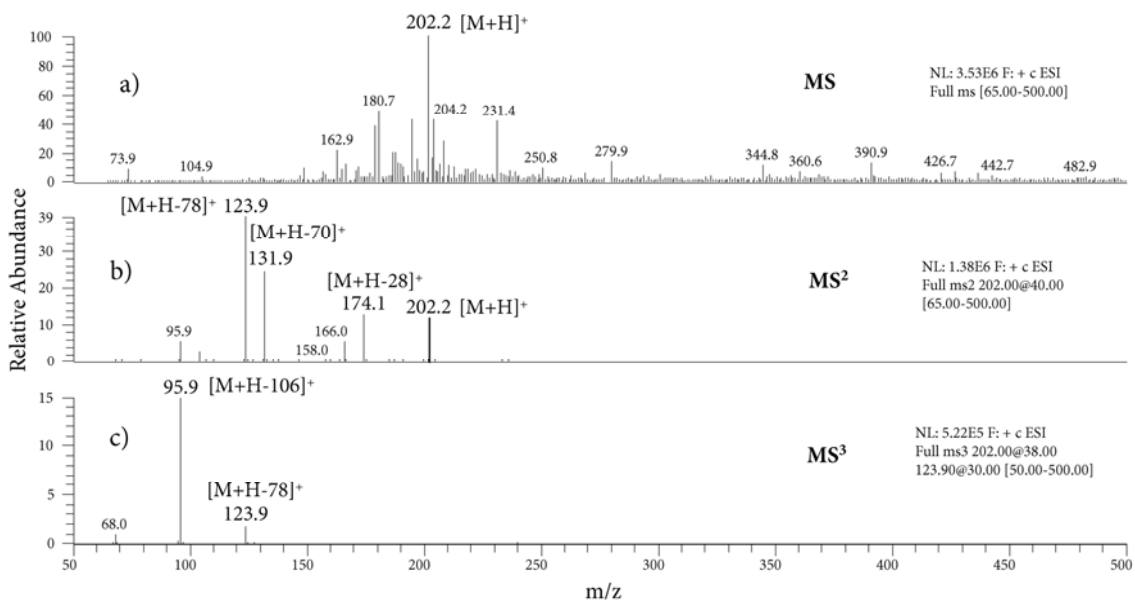
Slika 34. Maseni spektri karbendazima: a) MS (ESI+); b) MS² (ESI+); c) MS³ (ESI+); d) MS⁴ (ESI+).



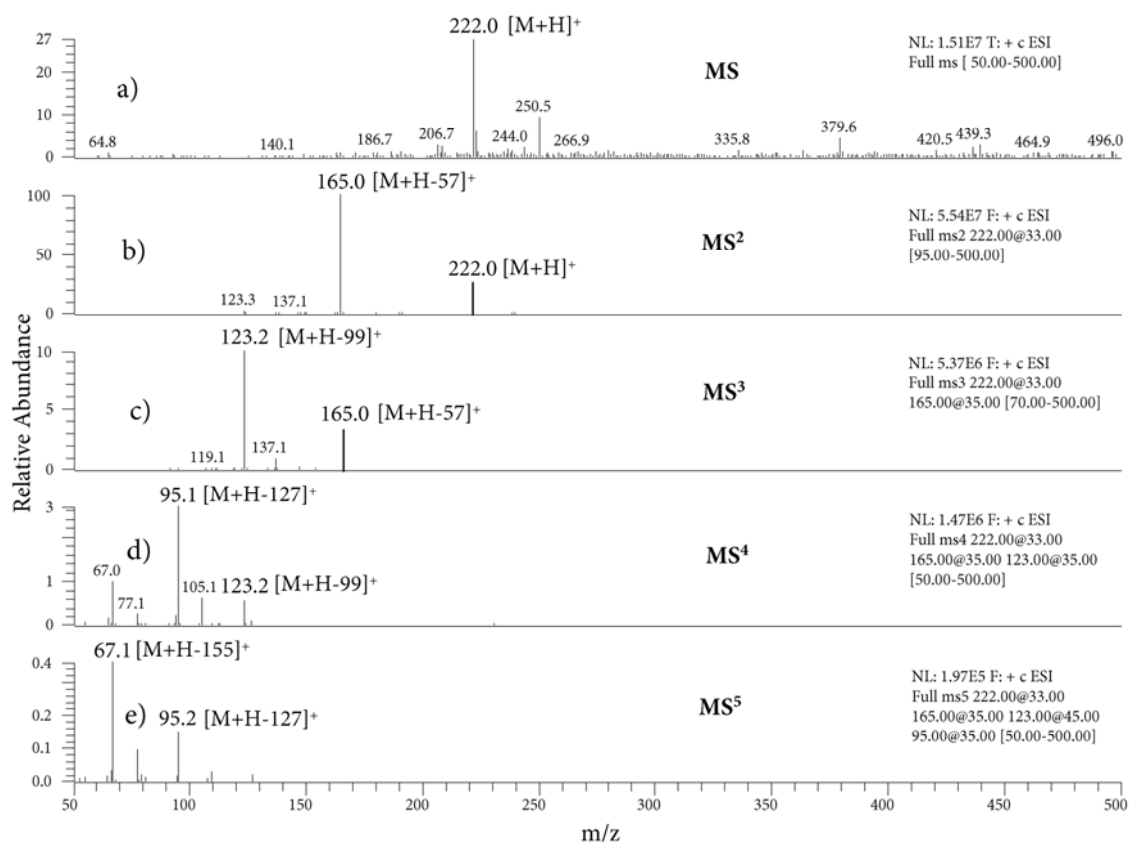
Slika 35. Maseni spektri acetamidrida: a) MS (ESI+); b) MS² (ESI+); c) MS³, (ESI+) m/z : 223→181→146; d) MS³, (ESI+) m/z : 223→187→146; e) MS³, (ESI+) m/z : 223→206→171 .



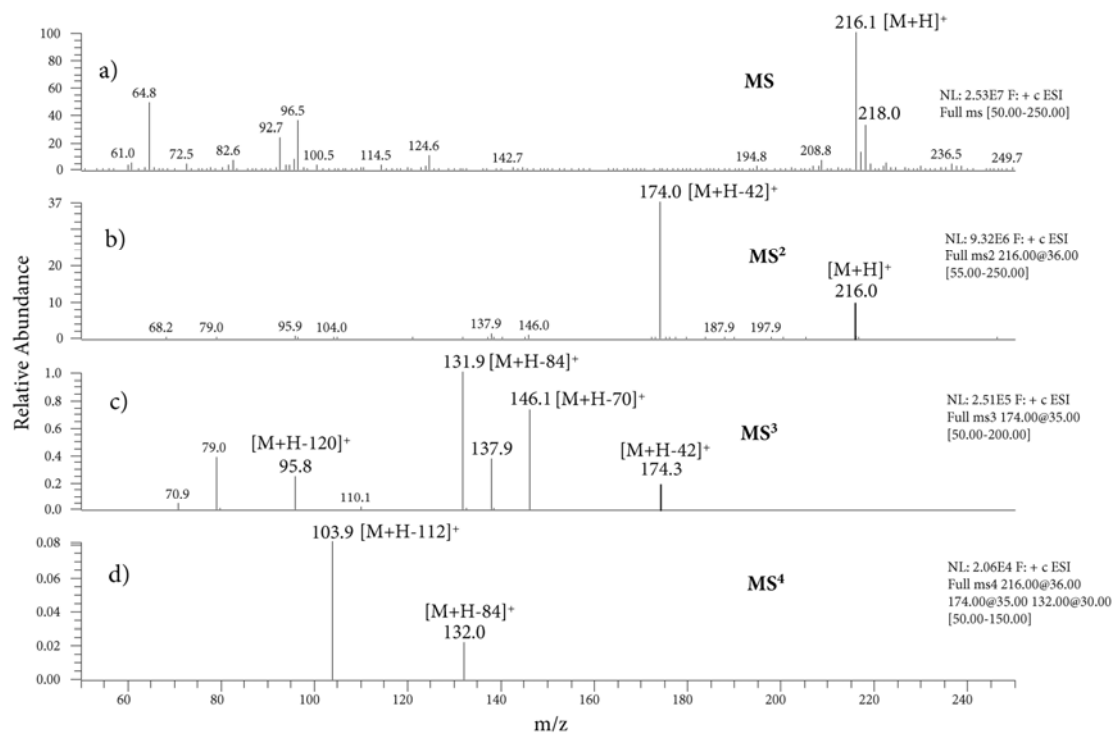
Slika 36. Maseni spektri dimetoata: a) MS (ESI+); b) MS² (ESI+); c) MS³, (ESI+); d) MS⁴ (ESI+); e) MS⁵ (ESI+).



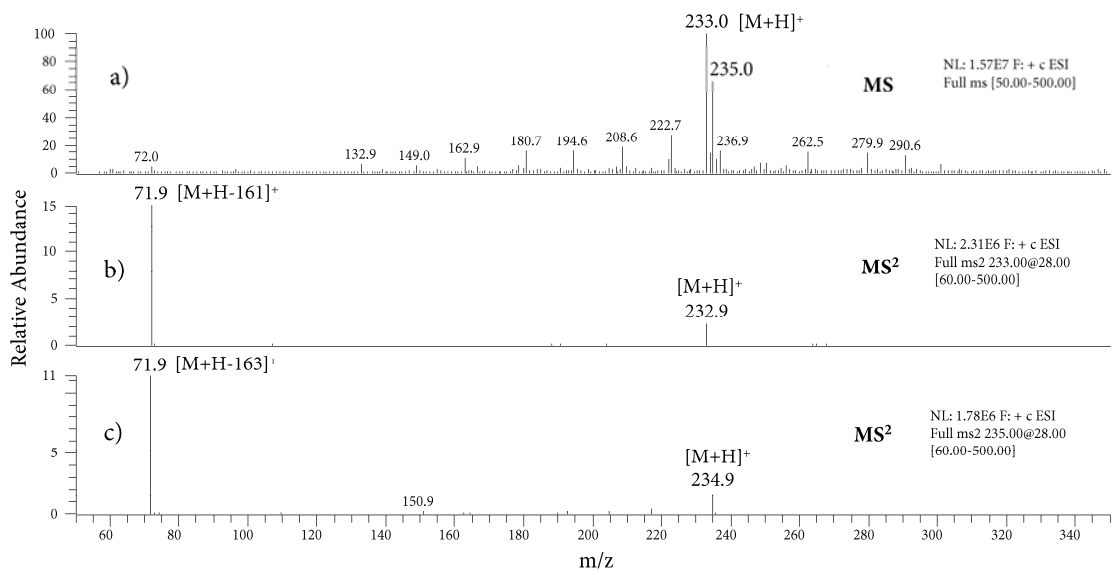
Slika 37. Maseni spektri simazina: a) MS (ESI+); b) MS² (ESI+); c) MS³, (ESI+).



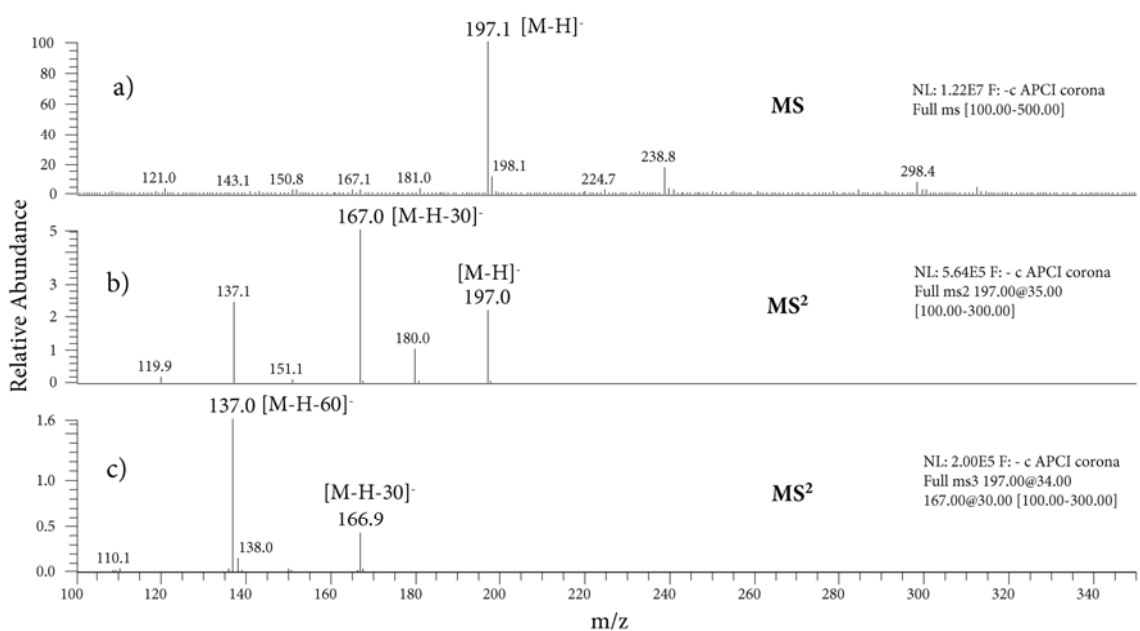
Slika 38. Maseni spektri karbofurana: a) MS (ESI+); b) MS² (ESI+); c) MS³, (ESI+); d) MS⁴ (ESI+); e) MS⁵ (ESI+).



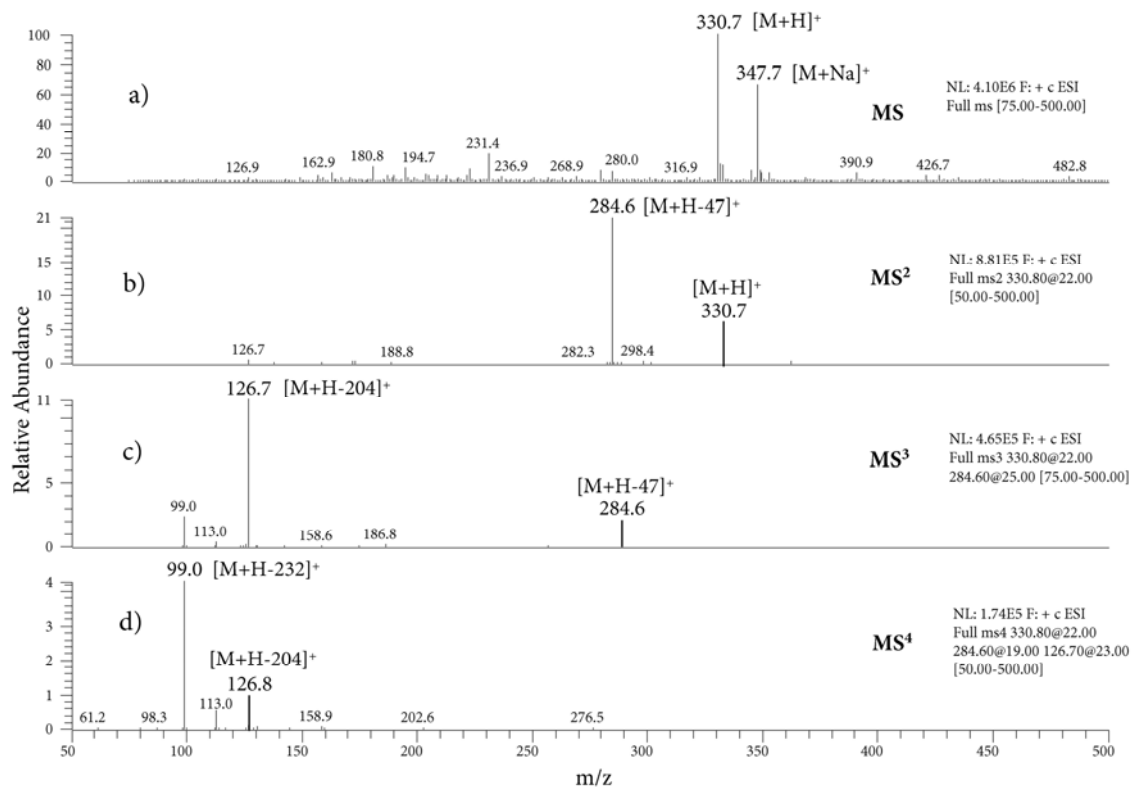
Slika 38. Maseni spektri atrazina: a) MS (ESI+); b) MS² (ESI+); c) MS³, (ESI+); d) MS⁴ (ESI+).



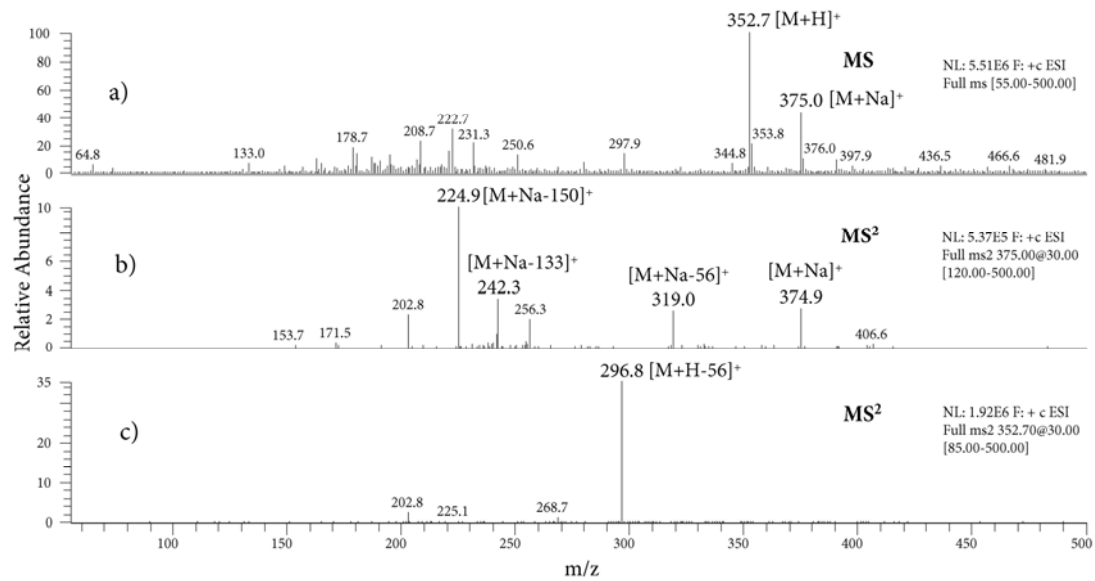
Slika 39. Maseni spektri diurona: a) MS (ESI+); b) MS², (ESI+) m/z : 233→72; c) MS², (ESI+) m/z : 235→72.



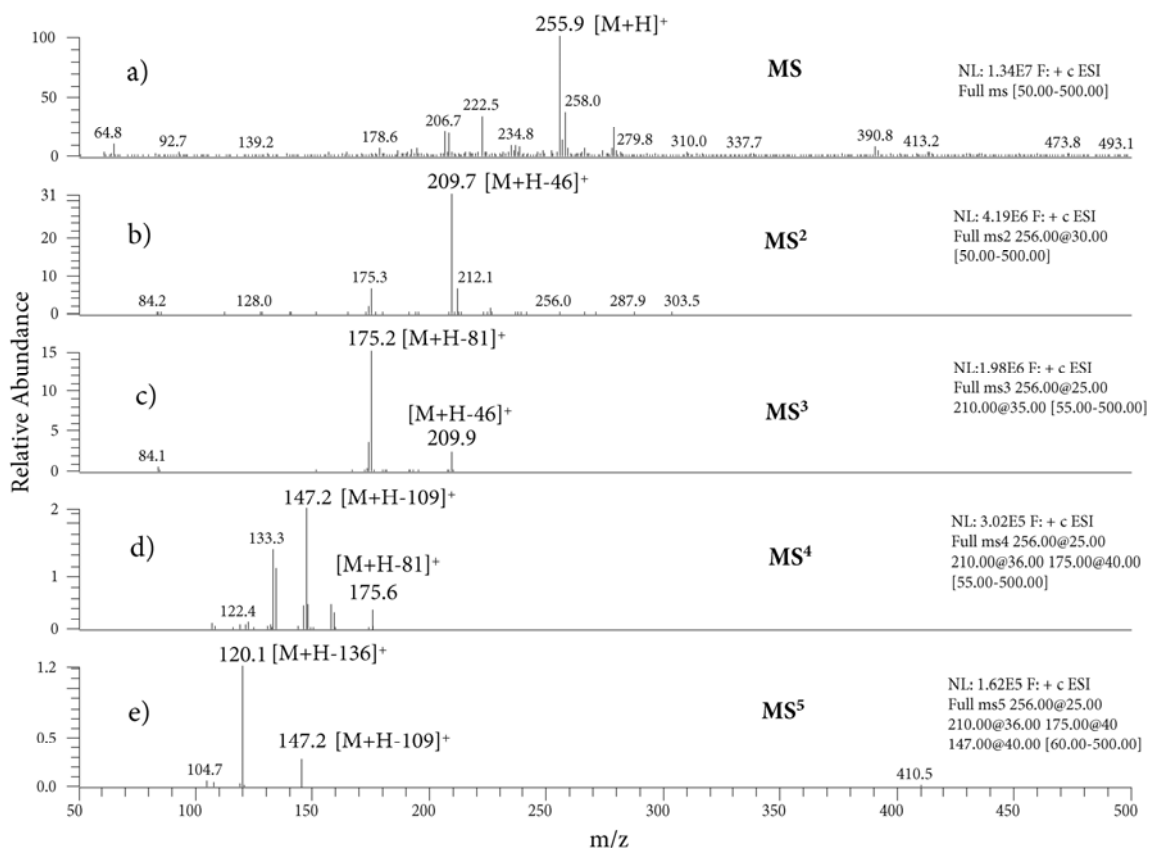
Slika 40. Maseni spektri DNOC-: a) MS (APCI-); b) MS² (APCI-); c) MS³ (APCI-).



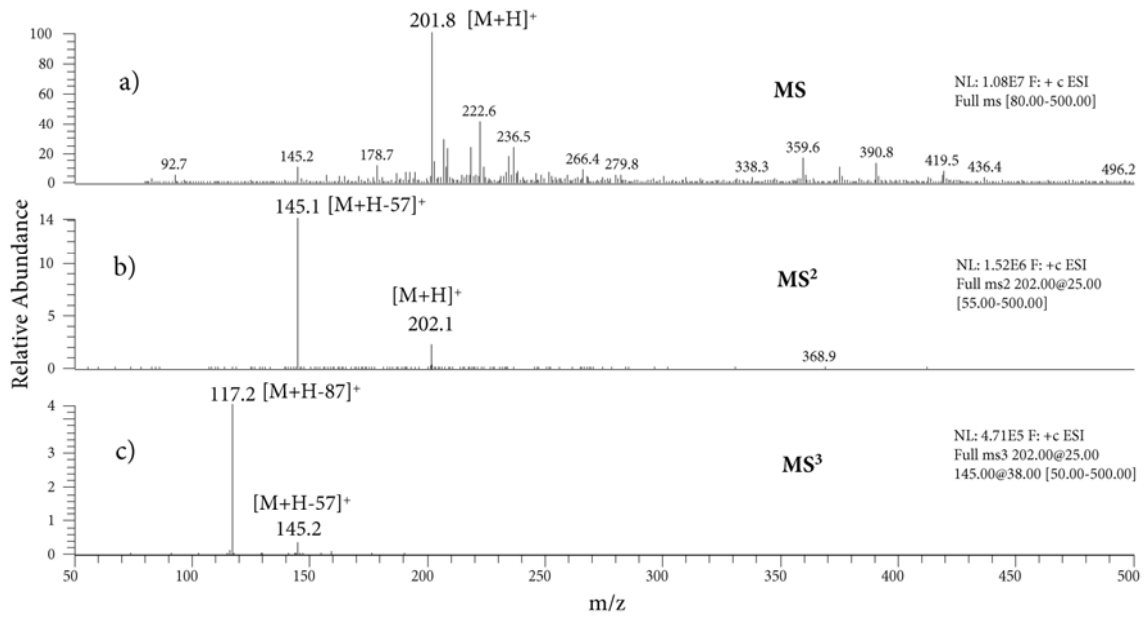
Slika 41. Maseni spektri malationa: a) MS (ESI+); b) MS² (ESI+); c) MS³, (ESI+); d) MS⁴ (ESI+).



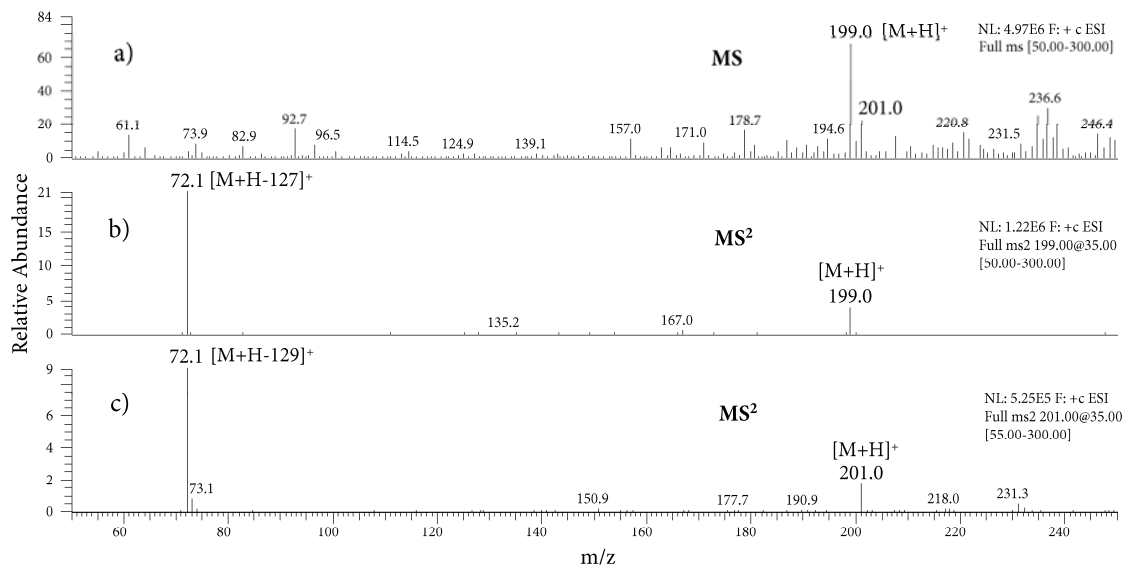
Slika 42. Maseni spektri tebufenozida: a) MS (ESI+); b) MS², (ESI+) m/z : 375→225, 242, 319; c) MS², (ESI+) m/z : 353→299.



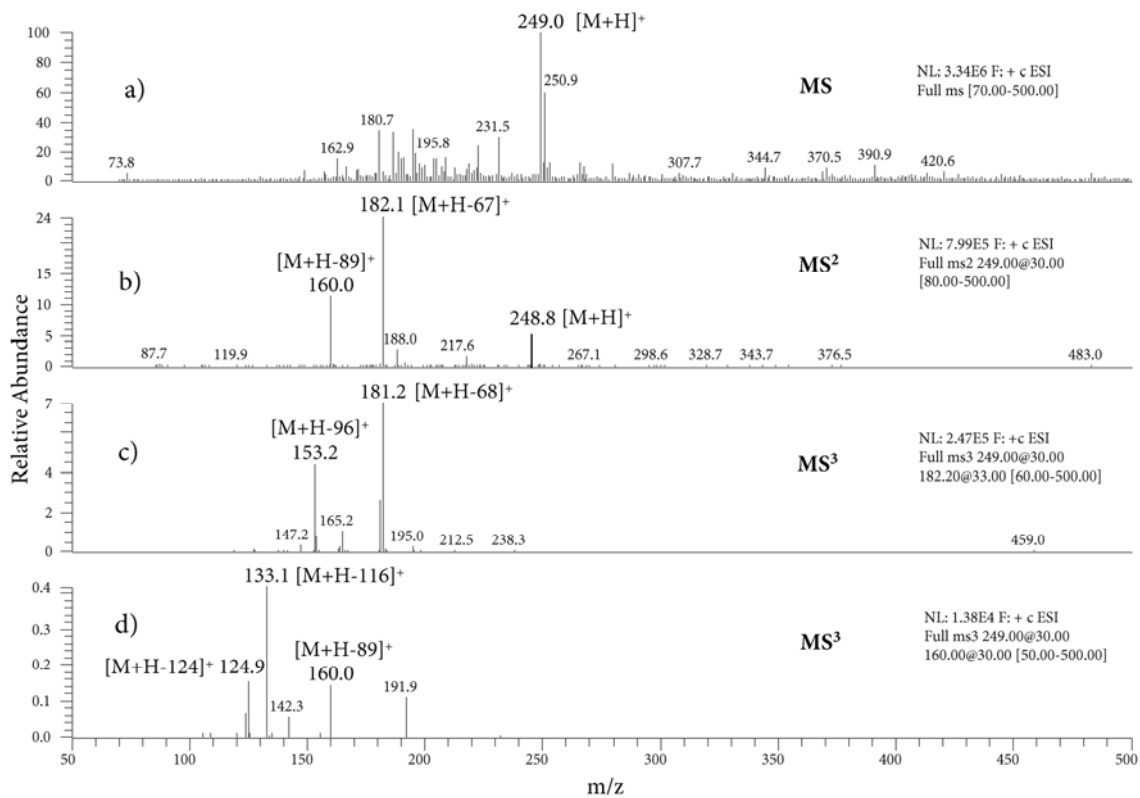
Slika 43. Maseni spektri imidakloprida: a) MS (ESI+); b) MS² (ESI+); c) MS³, (ESI+); d) MS⁴ (ESI+); e) MS⁵ (ESI+).



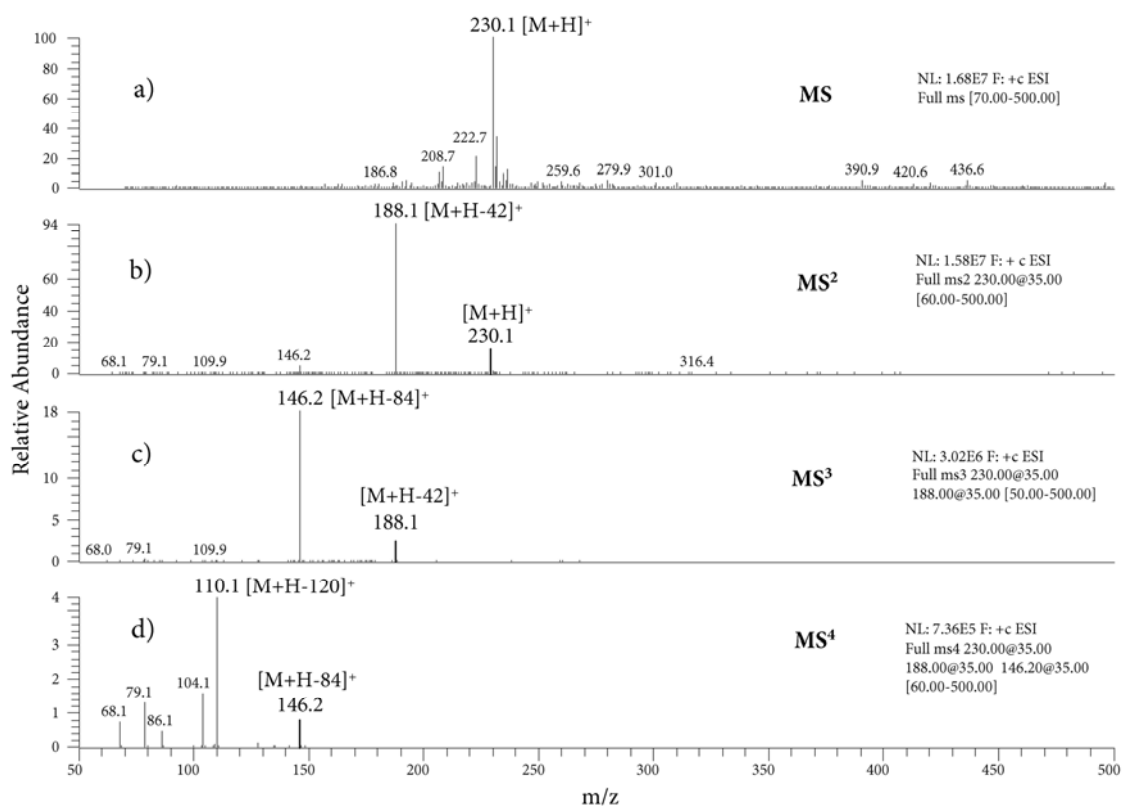
Slika 44. Maseni spektri karbarila: a) MS (ESI+); b) MS² (ESI+); c) MS³ (ESI+).



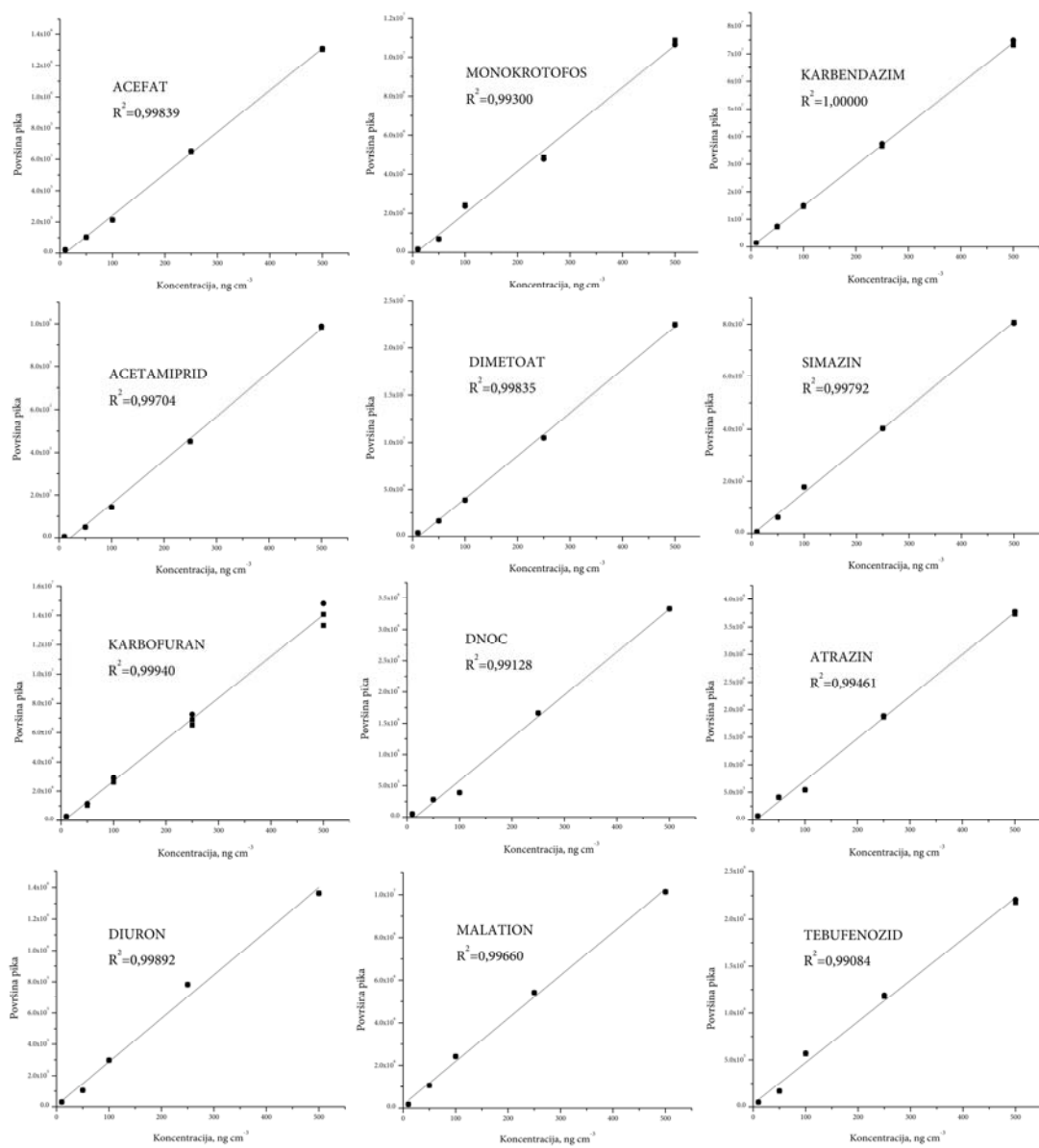
Slika 45. Maseni spektri monurona: a) MS (ESI+); b) MS², (ESI+) m/z : 199→72; c) MS², (ESI+) m/z : 201→72.



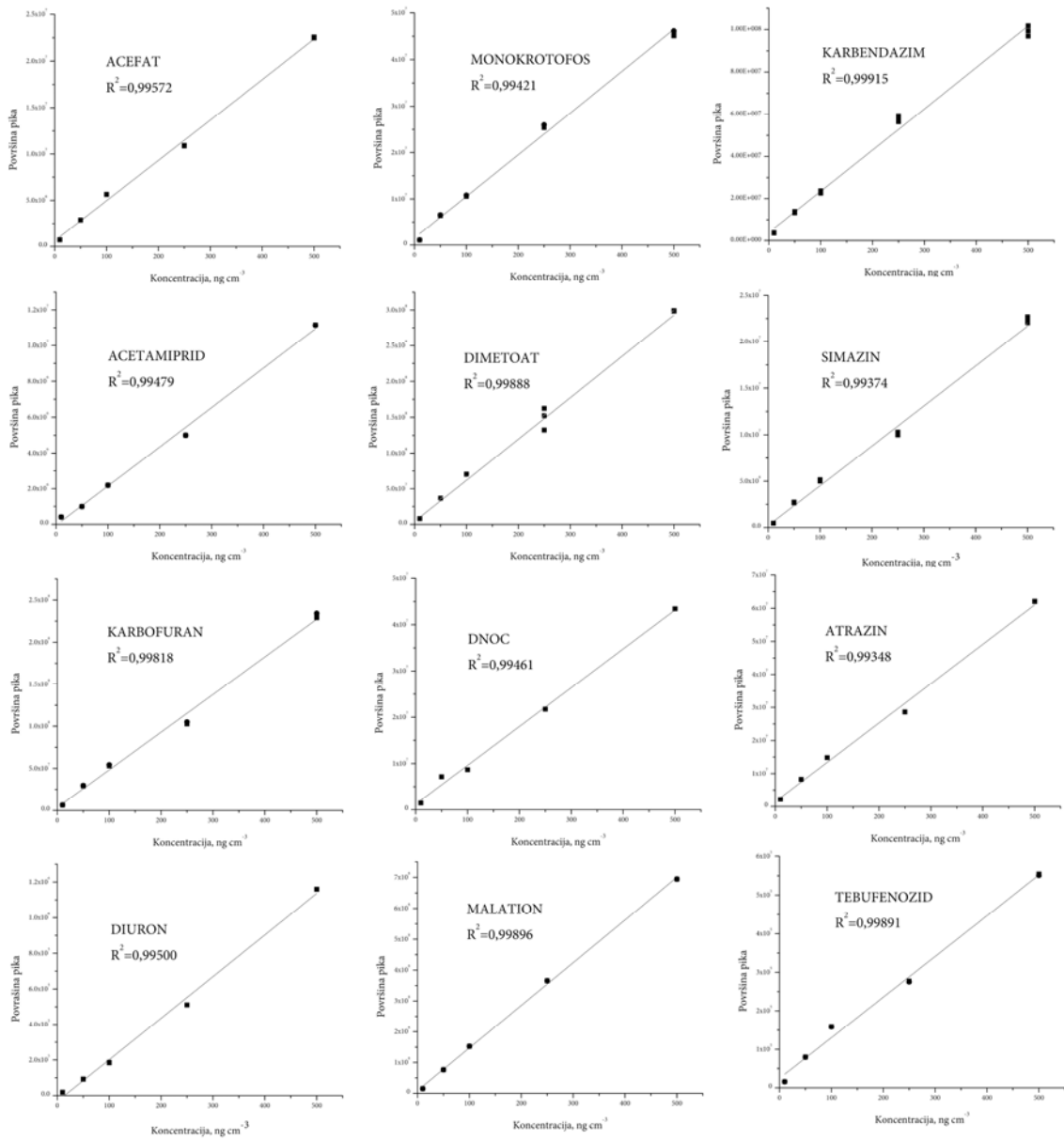
Slika 46. Maseni spektri linurona: a) MS (ESI+); b) MS² (ESI+); c) MS³ (ESI+) m/z : 249→182→181, 153; d) MS³, (ESI+) m/z : 249→160→133, 124.



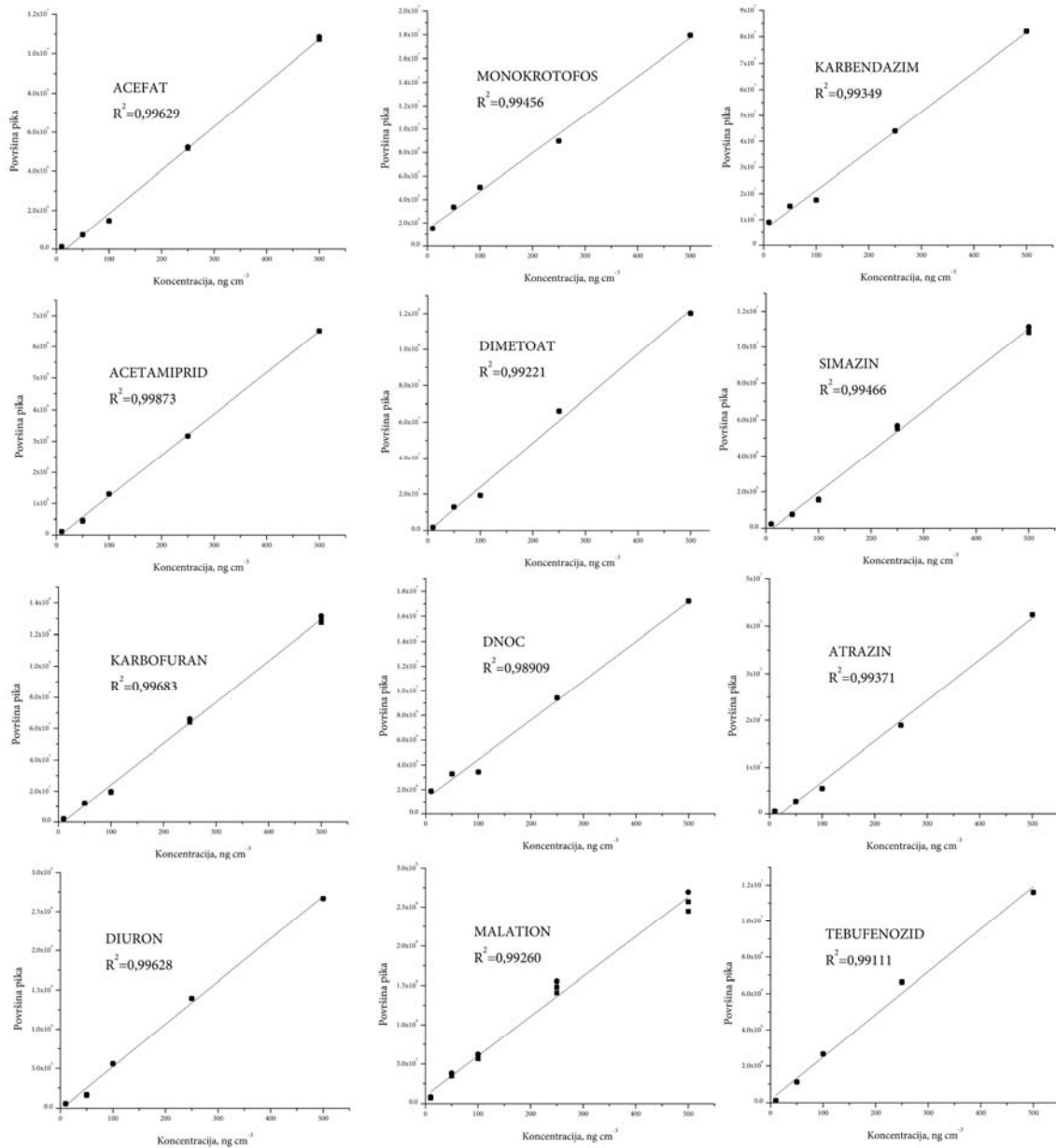
Slika 47. Maseni spektri propazina: a) MS (ESI+); b) MS² (ESI+); c) MS³, (ESI+); d) MS⁴ (ESI+).



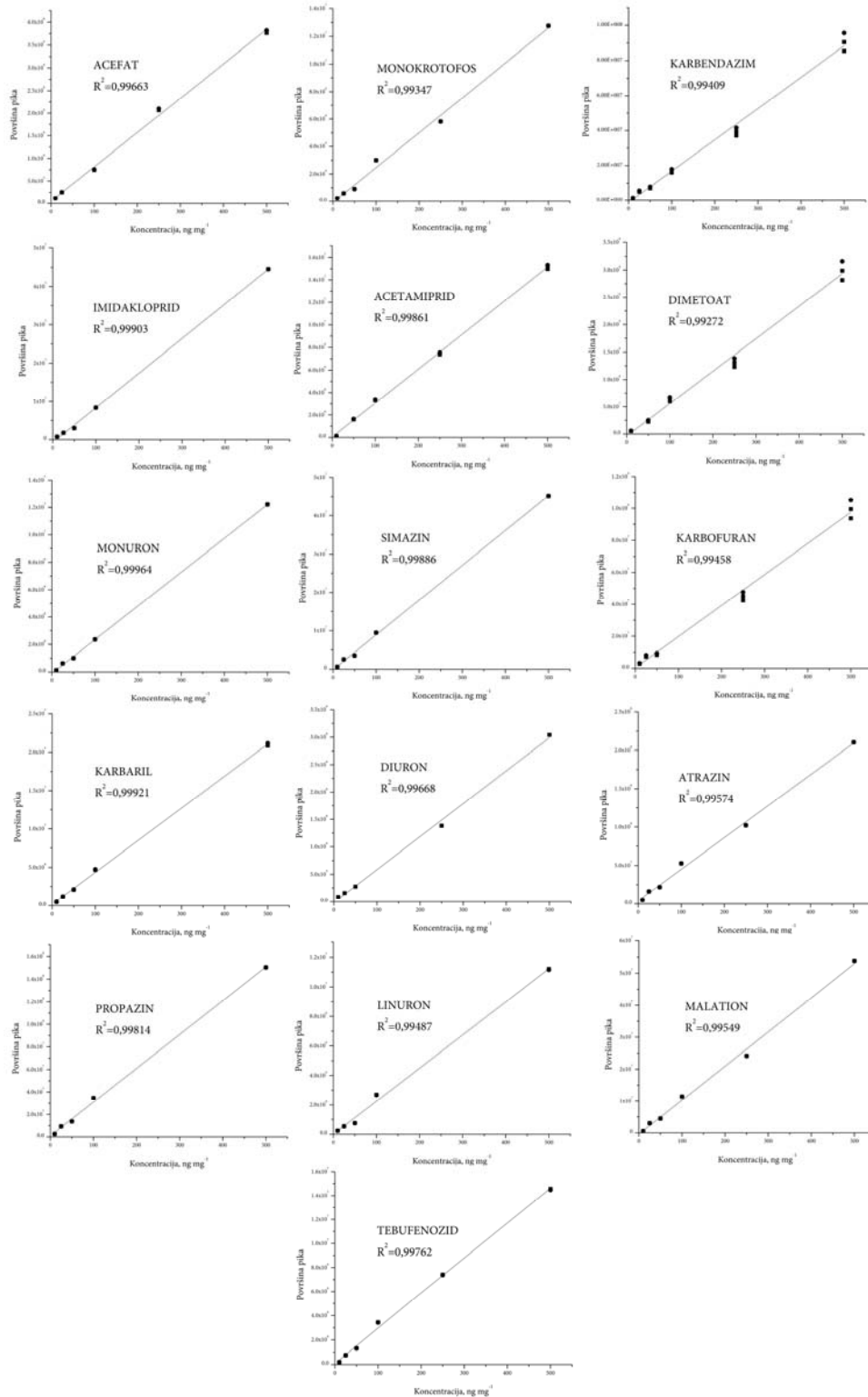
Slika 48. Kalibracione krive za ispitivane pesticide u soku od breskve.



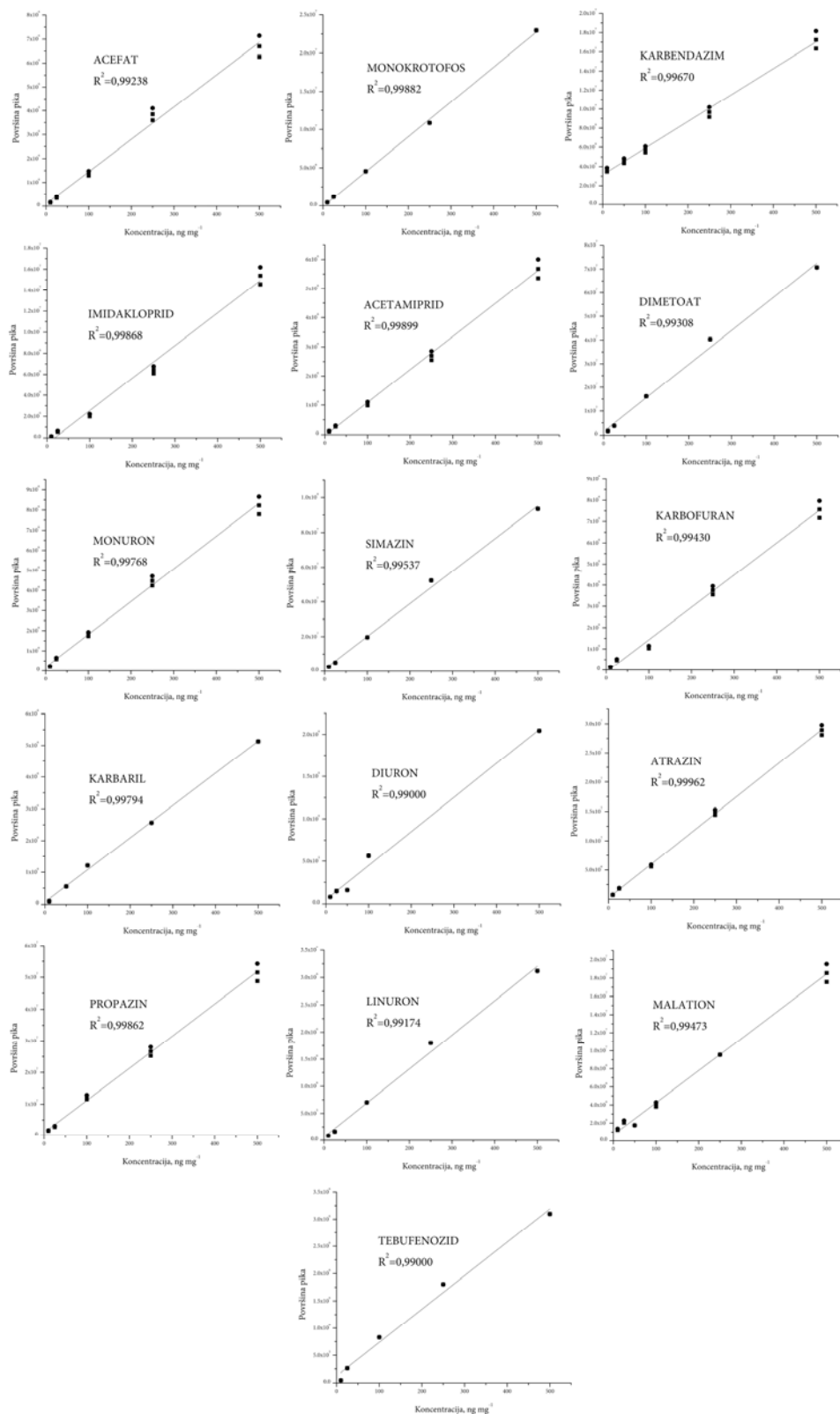
Slika 49. Kalibracione krive za ispitivane pesticide u soku od narandže.



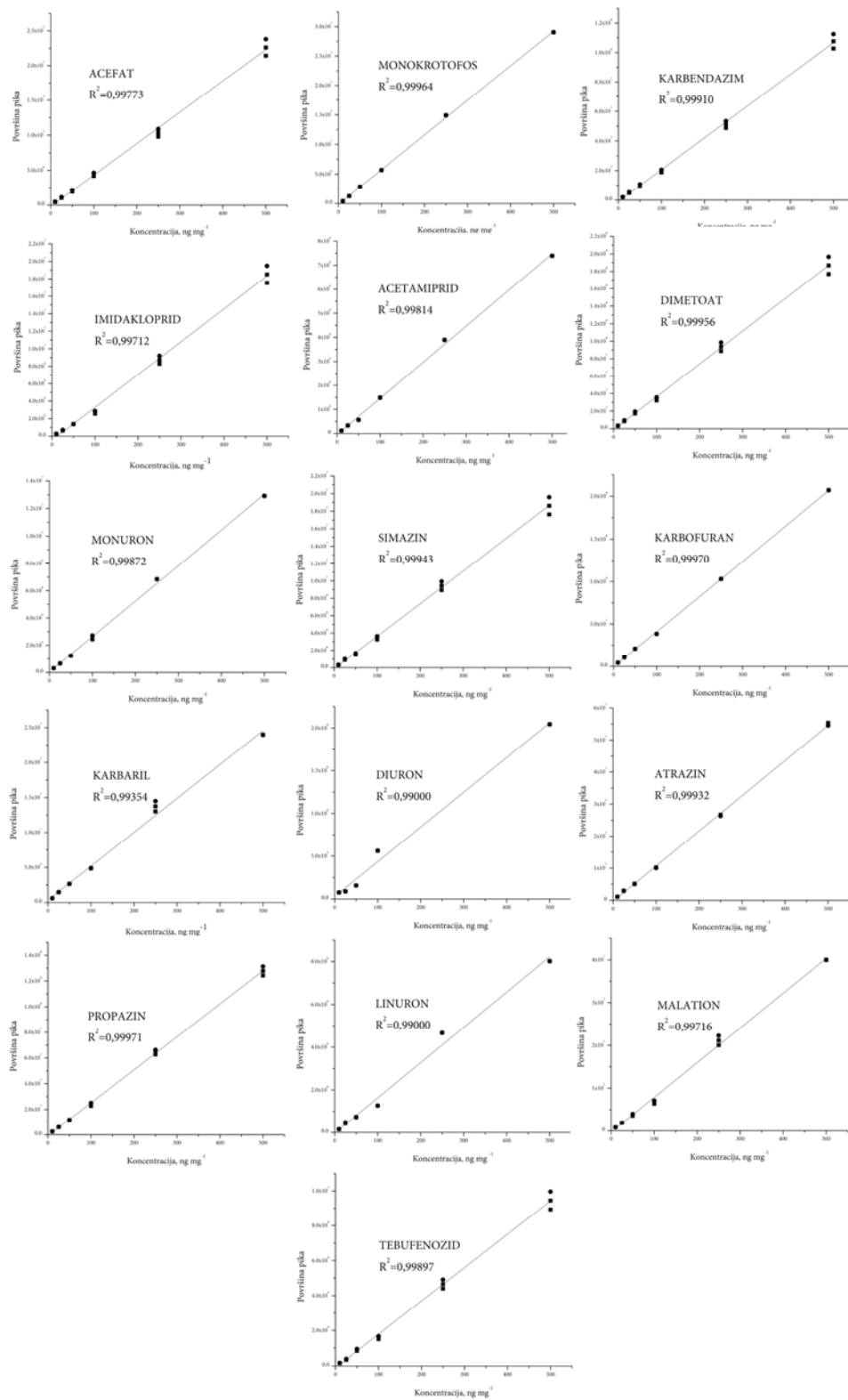
Slika 50. Kalibracione krive za ispitivane pesticide u soku od maline.



Slika 51. Kalibracione krive za ispitivane pesticide u jabuci.



Slika 52. Kalibracione krive za ispitivane pesticide u kajsiji.



Slika 53. Kalibracione krive za ispitivane pesticide u naradži.

Biografija autora

Marina Radišić rođena je 8. jula 1979. godine u Sarajevu. Diplomirala je 2005. god. na Tehnološko-metalurškom fakultetu u Beogradu na smeru Inženjerstvo zaštite životne sredine. Školske 2008/09 upisala je doktorske studije oblast Hemija, pod mentorstvom prof. dr Mile Laušević. Od januara 2006. godine angažovana je na projektima finansiranim od strane Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije, odnosno Ministarstva za prosvetu i nauku Republike Srbije. Godinu dana (01.02.2009.–01.03.2010) provela je u Agenciji za lekove i medicinska sredstva Srbije kao stručni saradnik u Nacionalnoj kontrolnoj laboratoriji na radnom mestu za instrumentalna ispitivanja. Od marta 2010. god. do danas zaposlena je u Inovacionom centru Tehnološko-metalurškog fakulteta. Jula 2010. godine izabrana je u zvanje istraživač saradnik.

Oblast naučno-istraživačkog rada Marine Radišić obuhvata primenu masene spektrometrije i tečne hromatografije u određivanju zagađujućih i toksičnih materija.

U toku dosadašnjeg rada, u svojstvu autora i koautora objavila je 13 radova u časopisima od međunarodnog značaja, 2 poglavlja u knjizi i imala veći broj saopštenja na međunarodnim konferencijama. Uz saglasnost NN veća angažovana na eksperimentalnim vežbama iz predmeta Instrumentalne metode, na III godini studija, na katedri za Analitičku hemiju i kontrolu kvaliteta, Tehnološko-metalurškog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a: Radišić Marina

Broj indeksa: 4040/2008

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

Razvoj i primena metode tačne hromatografije-tandem masene spektrometrije za određivanje pesticida u voću i voćnim sokovima

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

U Beogradu

25.06.2013

Potpis doktoranda

Marina Radišić

**Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije
doktorskog rada**

Ime i prezime autora: Marina Radišić
Brij indeksa: 4040/2008
Studijski program: Hemija
Naslov rada: Razvoj i primena metode tečne hromatografije-tandem masene spektrometrije za određivanje pesticida u voću i voćnim sokovima
Mentor: Mila Laušević

Potpisani/a: Marina Radišić

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

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

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

U Beogradu

25.06.2013.

Potpis doktoranda

Marina Radišić

Izjava o korišćenju

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

Razvoj i primena metode tačne hromatografije-tandem masene spektrometrije za određivanje pesticida u voću i voćnim sokovima

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

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

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

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

U Beogradu

25.06.2013.

Potpis doktoranda

Marina Radisic

1. Autorstvo – Dozvoljavate umnožavanje, distribucija i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. Autorstvo – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožanje, distribuciju i javno saopštavanja dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanje ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim korišćenja dela.
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. Autorstvo – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence a ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.