



UNIVERZITET U NIŠU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET



Milica D. Branković

**RAZVOJ I PRIMENA PRELIMINARNIH
SKRINING METODA ZA PROCENU
SADRŽAJA REZIDUALNIH PESTICIDA U
JABUKAMA TEHNIKAMA MASENE
SPEKTROMETRIJE**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Tekst ove doktorske disertacije stavlja se na uvid javnosti,
u skladu sa članom 30., stav 8. Zakona o visokom obrazovanju
("Sl. glasnik RS", br. 76/2005 , 100/2007 – autentično tumačenje, 97/2008, 44/2010, 93/2012,
89/2013 i 99/2014)

NAPOMENA O AUTORSKIM PRAVIMA:

Ovaj tekst smatra se rukopisom i samo se saopštava javnosti (član 7. Zakona o autorskim i
srodnim pravima, "Sl. glasnik RS", br. 104/2009 , 99/2011 i 119/2012).

**Nijedan deo ove doktorske disertacije ne sme se koristiti ni u kakve svrhe,
osim za upoznavanje sa njenim sadržajem pre odbrane disertacije.**



UNIVERSITY OF NIS
FACULTY OF SCIENCES AND MATHEMATICS



Milica D. Brankovic

**DEVELOPMENT AND APPLICATION OF
PRELIMINARY SCREENING METHODS FOR
THE ASSESSMENT OF PESTICIDE RESIDUES
IN APPLES BY MASS SPECTROMETRY
TECHNIQUES**

DOCTORAL DISSERTATION

Nis, 2022



**ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
НИШ**

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА


Редни број, РБР:	
Идентификациони број, ИБР:	
Тип документације, ТД:	монографска
Тип записа, ТЗ:	текстуални / графички
Врста рада, ВР:	докторска дисертација
Аутор, АУ:	Милица Д. Бранковић
Ментор, МН:	Дарко Х. Анђелковић
Наслов рада, НР:	Развој и примена прелиминарних скрининг метода за процену садржаја резидуалних пестицида у јабукама техникама масене спектрометрије
Језик публикације, ЈП:	српски
Језик извода, ЈИ:	енглески
Земља публикавања, ЗП:	Србија
Уже географско подручје, УГП:	Србија
Година, ГО:	2022.
Издавач, ИЗ:	ауторски репринт
Место и адреса, МА:	Ниш, Вишеградска 33.
Физички опис рада, ФО: (поглавља/страна/ цитата/табела/слика/графика/прилога)	8 поглавља, 365 страна, 127 цитата, 103 табеле, 186 слика, 52 прилога (7 табела и 45 слика)
Научна област, НО:	хемија
Научна дисциплина, НД:	хемија животне средине
Предметна одредница/Кључне речи, ПО:	пестициди, фунгициди, инсектициди, јабуке, скрининг, QuEChERS, масена спектрометрија, гасна хроматографија, течна хроматографија, миграција пестицида
УДК	543.51 : (632.95 + 634.11)
Чува се, ЧУ:	библиотека
Важна напомена, ВН:	Дисертација је део истраживања у оквиру пројекта Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије ТР 31060 “Производња нових дијететских млечних производа за ризичне популације заснована на квалитативној и квантитативној анализи маркера здравственог ризика конзумирања млека“. Реализација и финансирање научно-истраживачког рада НИО је извршено према уговорима број 451-03-68/2020-14/200124, 451-03-9/2021-14/200124 и 451-03-




**ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
НИШ**

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА

	68/2022-14/200124. Експериментални рад је спроведен у Лабораторији за масену спектрометрију Департмана за Хемију Природно-математичког факултета у Нишу.
Извод, ИЗ:	<p>Јабукe су воће које је присутно на тржишту и доступно потрошачима током целе године, због чега постоји потреба за њиховом интензивном производњом, која у великој мери подразумева употребу хемијских средстава. Због овакве праксе, али и због повећаних захтева потрошача по питању квалитета плодова, критеријуми на тржишту су значајно пооштрени, а број анализа којим се проверава здравствена исправност воћа је у сталном порасту. С обзиром да стандардне методе за одређивање пестицида у прехранбеним производима, попут (СРПС) ЦЕН/ТР 17063:2017, (СРПС) ЦЕН/ТР 15641:2009 итд., могу захтевати више времена, материјала и финансијских средстава, циљ истраживања је био развој брзих и економичних метода, задовољавајуће осетљивости и репродуктивности, погодних за брзи таргетирани скрининг пестицида у јабукама, које могу представљати алтернативу стандардним методама. На примерима пириметанила, ципродинила, боскалида, трифлуксиробина и бифентрина, извршени су развој и валидација 7 метода које се заснивају на техници масене спектрометрије уз опционо додатно имплементирање технике гасне или течне хроматографије. У развој метода укључени су масени спектрометри различите генерације и перформанси, као и различите упрошћене и економичније процедуре припреме узорка. Извршена је компаративна анализа хемијско-техничких, хемијско-аналитичких и економских карактеристика развијених метода. Упоредене су економичности стандардних метода и метода са развијеном припремом узорка. Методе са развијеном припремом узорка примењене су у испитивању миграције пестицида кроз плод јабуке</p>

	ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ НИШ
	КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА

	и у аналитичком одређивању испитиваних пестицида у узорцима јабука са тржишта.
Датум прихватања теме, ДП:	04. 11. 2019. године
Датум одбране, ДО:	}
Чланови комисије, Председник:	
КО:	
	Члан:
	Члан,
	ментор:

	ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ НИШ
	KEY WORDS DOCUMENTATION

Accession number, ANO :	
Identification number, INO :	
Document type, DT :	monograph
Type of record, TR :	textual / graphic
Contents code, CC :	doctoral dissertation
Author, AU :	Milica D. Brankovic
Mentor, MN :	Darko H. Andjelkovic
Title, TI :	Development and application of preliminary screening methods for the assessment of pesticide residues in apples by mass spectrometry techniques
Language of text, LT :	Serbian
Language of abstract, LA :	English
Country of publication, CP :	Serbia
Locality of publication, LP :	Serbia
Publication year, PY :	2022
Publisher, PB :	author's reprint
Publication place, PP :	Niš, Višegradska 33.
Physical description, PD : (chapters/pages/ref./tables/pictures/graphs/appendixes)	8 chapters, 365 pages, 127 references, 103 tables, 186 figures, 52 appendixes (7 tables and 45 figures)
Scientific field, SF :	chemistry
Scientific discipline, SD :	environmental chemistry
Subject/Key words, S/KW :	pesticides, fungicides, insecticides, apples, screening, QuEChERS, mass spectrometry, gas chromatography, liquid chromatography, pesticides migration
UC	543.51 : (632.95 + 634.11)
Holding data, HD :	library



**ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
НИШ**


KEY WORDS DOCUMENTATION

Note, N:

The dissertation is a part of the research performed within the Grant of the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia TR 31060 “Production of new dietary dairy products for high-risk population based on qualitative and quantitative analysis of health risk markers for milk consumption” and within the research program – Contract Nos. 451-03-68/2020-14/200124, 451-03-9/2021-14/200124 and 451-03-68/2022-14/200124. The experimental part of this thesis was done in the Laboratory for Mass Spectrometry of the Department of Chemistry of the Faculty of Science in Nis.

Abstract, AB:

High consumption rate of apples demands their intensive production. To ensure satisfactory and healthy yields, such production mainly involves largescale usage of pesticides, which consequently rises the need for the continuous monitoring of pesticides residues, in order to deliver safe fruit. Main methods of pesticides analysis in food are well elaborated official methods such as (SRPS) CEN/TR 17063:2017 or (SRPS) CEN/TR 15641:2009 etc. These methods have satisfactory level of trueness and reliability in pesticides analysis, but are often expensive and time-consuming due to the strict demands regarding the analytical instruments preparation, qualification and quantification procedures etc. The objective of this research was to provide more economic and faster alternatives to the official methods. As a result, 7 methods were developed and validated with cyprodinil, pyrimethanil, boscalid, trifloxystrobin and bifenthrin as model compounds. The main instrumental technique was mass spectrometry; optionally methods involved gas or liquid chromatography separation of analytes. Methods development included several mass spectrometers of different generation and performances and several simplified sample preparation methods. Main features of the developed methods were compared. The reduced sample preparation methods were compared with the official methods regarding the cost-effectiveness. The developed methods were applied to the pesticides migration study and to the analytical determination of the target pesticides in apple samples from local market.

	ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ НИШ
	KEY WORDS DOCUMENTATION

Accepted by the Scientific Board on, ASB :	04. 11. 2019. godine	
Defended on, DE :		
Defended Board, DB :	President:	
	Member:	
	Member, Mentor:	

Подаци о докторској дисертацији

Ментор:

Др Дарко Анђекловић, доцент, Универзитет у Нишу,
Пољопривредни факултет у Крушевцу

Наслов:

Развој и примена прелиминарних скрининг метода за процену садржаја резидуалних пестицида у јабукама техникама масене спектрометрије

Резиме:

Јабукe су воће које је присутно на тржишту и доступно потрошачима током целе године, због чега постоји потреба за њиховом интензивном производњом, која у великој мери подразумева употребу хемијских средстава. Због овакве праксе, али и због повећаних захтева потрошача по питању квалитета плодова, критеријуми на тржишту су значајно пооштрени, а број анализа којим се проверава здравствена исправност воћа је у сталном порасту. С обзиром да стандардне методе за одређивање пестицида у прехранбеним производима, попут (СРПС) ЦЕН/ТР 17063:2017, (СРПС) ЦЕН/ТР 15641:2009 итд., могу захтевати више времена, материјала и финансијских средстава, циљ истраживања је био развој брзих и економичних метода, задовољавајуће осетљивости и репродуктивности, погодних за брзи таргетирани скрининг пестицида у јабукама, које могу представљати алтернативу стандардним методама. На примерима пириметанила, ципродинила, боскалида, трифлуксистеробина и бифентрина, извршени су развој и валидација 7 метода које се заснивају на техници масене спектрометрије уз опционо додатно имплементирање технике гасне или течне хроматографије. У развој метода укључени су масени спектрометри различите генерације и перформанси, као и различите упрошћене и економичније процедуре припреме узорака. Извршена је компаративна анализа хемијско-техничких, хемијско-аналитичких и економских карактеристика развијених метода. Упоредјене су економичности стандардних метода и метода са развијеном припремом узорка. Методе са развијеном припремом узорка примењене су у испитивању миграције пестицида кроз плод јабуке и у аналитичком одређивању испитиваних пестицида у узорцима јабука са тржишта.

Научна област:

Хемија

Научна
дисциплина:

Хемија животне средине

Кључне речи:

пестициди, фунгициди, инсектициди, јабуке, скрининг, QuEChERS, масена спектрометрија, гасна хроматографија, течна хроматографија, миграција пестицида

УДК:

543.51 : (632.95 + 634.11)

CERIF
класификација:

P 003 Хемија; P 305 Хемија животне средине

Тип лиценце
Креативне
заједнице:

CC BY-NC-ND

Data on Doctoral Dissertation

Doctoral
Supervisor:

PhD Darko Andjelkovic, assistant professor, University of Nis,
Agricultural faculty, Krusevac

Title:

Development and application of preliminary screening methods for the
assessment of pesticide residues in apples by mass spectrometry
techniques

Abstract:

High consumption rate of apples demands their intensive production. To ensure satisfactory and healthy yields, such production mainly involves largescale usage of pesticides, which consequently rises the need for the continuous monitoring of pesticides residues, in order to deliver safe fruit. Main methods of pesticides analysis in food are well elaborated official methods such as (SRPS) CEN/TR 17063:2017 or (SRPS) CEN/TR 15641:2009 etc. These methods have satisfactory level of trueness and reliability in pesticides analysis, but are often expensive and time-consuming due to the strict demands regarding the analytical instruments preparation, qualification and quantification procedures etc. The objective of this research was to provide more economic and faster alternatives to the official methods. As a result, 7 methods were developed and validated with cyprodinil, pyrimethanil, boscalid, trifloxystrobin and bifenthrin as model compounds. The main instrumental technique was mass spectrometry; optionally methods involved gas or liquid chromatography separation of analytes. Methods development included several mass spectrometers of different generation and performances and several simplified sample preparation methods. Main features of the developed methods were compared. The reduced sample preparation methods were compared with the official methods regarding the cost-effectiveness. The developed methods were applied to the pesticides migration study and to the analytical determination of the target pesticides in apple samples from local market.

Scientific
Field:

Chemistry

Scientific
Discipline:

Environmental chemistry

Key Words:

pesticides, fungicides, insecticides, apples, screening, QuEChERS, mass spectrometry, gas chromatography, liquid chromatography, pesticides migration

UDC:

543.51 : (632.95 + 634.11)

CERIF
Classification:

P 003 Chemistry; P 305 Environmental Chemistry

Creative
Commons
License Type:

CC BY-NC-ND

Istraživanje predstavljeno u okviru ove doktorske disertacije urađeno je u istraživačkoj laboratoriji za Masenu spektrometriju Departmana za hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu.

Zahvaljujem se mentoru, dr Darku Anđelkoviću, docentu Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Nišu, na pomoći pri definisanju teme doktorske disertacije, na savetima i stručnoj podršci tokom doktorskih studija i izrade ove disertacije.

Zahvaljujem se dr Gordani Kocić, redovnom profesoru Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu i dr Tatjani Anđelković, redovnom profesoru Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu na saradnji u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije "Proizvodnja novih dijetetskih mlečnih proizvoda za rizične populacije zasnovana na kvalitativnoj i kvantitativnoj analizi markera zdravstvenog rizika konzumiranja mleka" u okviru koga su realizovani ciljevi ove doktorske disertacije.

Zahvalna sam svim kolegama na saradnji i razumevanju tokom doktorskih studija.

Posebno sam zahvalna majci Dragici i prijateljima za podršku pruženu tokom školovanja.

Sadržaj

1	UVOD	21
2	TEORIJSKE OSNOVE.....	25
2.1	Malus×domestica Borkh.	27
2.1.1	Poreklo	27
2.1.2	Proizvodnja	28
2.1.3	Najznačajnije komercijalne sorte	29
2.1.4	Morfologija, sastav i uloga kore.....	30
2.2	Pesticidi	33
2.2.1	Klasifikacija pesticida	34
2.2.2	Fungicidi i insekticidi.....	35
2.2.3	Pirimetanol.....	36
2.2.4	Ciprodinil	37
2.2.5	Boskalid	38
2.2.6	Trifloksistrobin	38
2.2.7	Bifentrin	39
2.2.8	Ciprodinil, pirimetanol, trifloksistrobin, boskalid i bifentrin u komercijalnim sredstvima za zaštitu bilja registrovanim u Srbiji.....	40
2.3	Analitičke metode.....	44
2.3.1	Metode pripreme uzoraka za analizu	44
2.3.2	Instrumentalne analitičke tehnike	46
2.3.2.1	Gasna i tečna hromatografija	47
2.3.2.2	Masena spektrometrija	49
2.3.2.2.1	Tehnike jonizacije molekula analita.....	49
2.3.2.2.2	Maseni analizatori.....	51
2.3.2.2.3	Tandemska masena spektrometrija	55
2.3.3	Validacija analitičkih metoda.....	58
2.3.3.1	Selektivnost i specifičnost.....	58
2.3.3.2	Tačnost i preciznost	59
2.3.3.3	Linearnost	60
2.3.3.4	Matriks efekat	61
2.3.3.5	Granica detekcije i granica kvantifikacije.....	63
2.3.4	Literaturni pregled analitičkih metoda za određivanje ispitivanih pesticida	64
3	EKSPERIMENTALNI RAD	75
3.1	Plan i program eksperimentalnog rada.....	77

3.2	Instrumenti.....	78
3.3	Potrošni materijal i pomoćni instrumenti.....	82
3.4	Instrumentalna ispitivanja.....	85
3.4.1	Ispitivanja na instrumentalnoj konfiguraciji CONF-1.....	85
3.4.2	Ispitivanja na instrumentalnoj konfiguraciji CONF-2.....	86
3.4.3	Ispitivanja na instrumentalnoj konfiguraciji CONF-3.....	93
3.4.3.1	Ispitivanja sa <i>direct injection</i> metodom unošenja uzoraka.....	93
3.4.3.2	Ispitivanja sa <i>LOOP injection</i> metodom unošenja uzorka.....	94
3.4.4	Ispitivanja na instrumentalnoj konfiguraciji CONF-4.....	95
3.5	Procedure u okviru razvijenih metoda.....	97
3.5.1	Procedure u okviru analitičke metode MET-GC-R.....	97
3.5.1.1	Primena analitičke metode MET-GC-R.....	98
3.5.2	Procedure u okviru analitičke metode MET-GC-Q.....	101
3.5.3	Procedure u okviru analitičke metode MET-LC-R1.....	102
3.5.3.1	Primena analitičke metode MET-LC-R1.....	102
3.5.4	Procedure u okviru analitičke metode MET-LC-Q.....	103
3.5.5	Procedure u okviru analitičke metode MET-DI-R.....	103
3.5.6	Procedure u okviru analitičke metode MET-LI-R.....	104
3.5.7	Procedure u okviru analitičke metode MET-LC-R2.....	105
3.6	Validacija metoda.....	106
3.7	Legislativa korišćena u interpretaciji rezultata istraživanja.....	106
4	REZULTATI.....	107
4.1	Ispitivanja na instrumentalnoj konfiguraciji CONF-1.....	109
4.1.1	Performanse instrumenta u odnosu na ispitivane analite.....	109
4.1.2	Rezultati razvoja i primene metode MET-GC-R.....	115
4.1.2.1	Analiza ekstrakata jabuke – opšta zapažanja.....	115
4.1.2.2	Rezultati ispitivanja parametara validacije.....	119
4.1.2.3	Migracija pesticida kroz koru jabuke.....	127
4.1.2.4	Rezultati ispitivanja jabuka sa tržišta.....	141
4.1.3	Rezultati razvoja metode MET-GC-Q.....	143
4.1.3.1	Rezultati ispitivanja parametara validacije.....	143
4.2	Ispitivanja na instrumentalnoj konfiguraciji CONF-2.....	146
4.2.1	Performanse instrumenta u odnosu na ispitivane analite.....	146
4.2.2	Rezultati razvoja i primene metode MET-LC-R1.....	160
4.2.2.1	Analiza ekstrakata jabuke – opšta zapažanja.....	160
4.2.2.2	Rezultati ispitivanja parametara validacije.....	162
4.2.2.3	Rezultati ispitivanja jabuka sa tržišta metodom MET-LC-R1.....	181
4.2.2.4	Rezultati komparativne analize uzoraka metodama MET-LC-R1 i MET-LC-Q.....	183
4.2.3	Rezultati razvoja metode MET-LC-Q.....	184
4.2.3.1	Rezultati ispitivanja parametara validacije.....	184
4.3	Ispitivanja na instrumentalnoj konfiguraciji CONF-3.....	187
4.3.1	Performanse instrumenta u odnosu na ispitivane analite.....	187
4.3.1.1	Rezultati ispitivanja sa <i>direct injection</i> metodom unošenja uzoraka.....	194
4.3.1.2	Rezultati ispitivanja sa <i>LOOP injection</i> metodom unošenja uzoraka.....	197
4.3.2	Rezultati razvoja metode MET-DI-R.....	203
4.3.2.1	Analiza ekstrakata kore.....	203
4.3.2.2	Rezultati ispitivanja parametara validacije.....	210
4.3.3	Rezultati razvoja metode MET-LI-R.....	213
4.3.3.1	Analiza analitičkih standarda pesticida tretiranih citratnim <i>QuEChERS</i> -om.....	213
4.3.3.2	Analiza ekstrakata jabuke – opšta zapažanja.....	219
4.3.3.3	Rezultati ispitivanja parametara validacije.....	228
4.4	Ispitivanja na instrumentalnoj konfiguraciji CONF-4.....	237
4.4.1	Performanse instrumenta u odnosu na ispitivane analite.....	238
4.4.2	Rezultati razvoja metode MET-LC-R2.....	247
4.4.2.1	Rezultati ispitivanja parametara validacije.....	249

5	DISKUSIJA	255
5.1	Hemijsko-tehnički aspekt razvijenih metoda	257
5.2	Hemijsko-analički aspekt razvijenih metoda	259
5.3	Ekonomski aspekt razvijenih metoda	268
5.3.1	Finansijska analiza skrining metoda i metodologija obračuna cene skrininga	268
5.3.1.1	Kategorizacija finansijskih troškova	268
5.3.1.2	Radne operacije u okviru metoda i metodologija obračuna cene skrininga	271
5.3.2	Komparativna analiza ekonomičnosti skrining metoda	274
6	ZAKLJUČAK	279
7	LITERATURA	283
8	PRILOG	295
8.1	Profil bioaktivnih jedinjenja jabuke	297
8.2	Bolesti jabuke i zaštita	299
8.3	Identifikacija masenih fragmenata nastalih EI jonizacijom molekula pesticida	306
8.4	Identifikacija jedinjenja u heksanskim ekstraktima kora (GC/MS analiza)	309
8.5	Identifikacija masenih fragmenata u okviru ESI/MS ⁿ analize pesticida	314
8.6	ESI/MS karakterizacija korišćenih reagenasa	317
8.7	Metoda MET-DI-R– spektri ekstrakata kore	318
8.8	<i>Tune</i> fajlovi LTQ/XL masenog spektrometra	337
8.9	LC/MS hromatogrami ekstrakata kore	340
8.10	UV/VIS spektri ekstrakata kore	344

1 UVOD

Jabuke su jedna od vrste voća koje je prisutno na tržištu i dostupno potrošačima nezavisno od sezone, zbog čega postoji potreba za njihovom intenzivnom proizvodnjom, koja u velikoj meri podrazumeva upotrebu hemijskih sredstava, dok je organska proizvodnja manje zastupljena. Od ukupne potrošnje pesticida tokom održavanja zasada jabuka, 75 % se odnosi na primenu fungicida. Fungicidi se u zasadima koriste za suzbijanje mikoza i pseudomikoza, poput pepelnice, crne i bele truleži, zelene plesni, kao i ekonomski najznačajnije čađave pegavosti lista i krastavosti ploda jabuke. Insekticidi se koriste za suzbijanje oštećenja na biljci, uzrokovanih insektima i grinjama, kao što su jabučni cvetojed, moljac ili smotavac. Za ove izazivače bolesti, karakteristično je da se upotreba insekticida ne može u potpunosti eliminisati, jer se praćenjem tj. sakupljanjem i uništavanjem štetočina ne postižu zadovoljavajući rezultati.

U intenzivnoj proizvodnji jabuka upotreba pesticida i drugih hemijskih preparata je vrlo izražena kroz količinu zaštitnih sredstava aplikovanih po jedinici površine i kroz učestaliju primenu zaštitnih tretmana. Upraznjavanje ovakve prakse, zajedno sa potencijalnom nestručnošću uzgajivača ili nepoštovanjem propisanih doza i karence, može usloviti pojavu ostataka pesticida ne samo u finalnom proizvodu, već i u prerađevinama, iznad maksimalnih vrednosti propisanih zakonom i tako negativno uticati na zdravlje potrošača. Zbog toga, ali i zbog povećanih zahteva potrošača po pitanju kvaliteta plodova, kriterijumi na tržištu voća i povrća su u današnje vreme značajno pooštreni.

Predmet ovog istraživanja je obuhvatio komercijalne sorte jabuka – Zlatni Delišes, Greni Smit i Ajdared i pesticide koji se uobičajeno primenjuju u tretmanima zasada jabuka, a to su fungicidi iz grupe anilinopirimidina (pirimetanil i ciprodinil), fungicid iz grupe strobilurina (trifloksistrobin), insekticid iz grupe piretroidnih estara (bifentrin) i fungicid iz grupe anilida (boskalid). Navedeni fungicidi prema mehanizmu delovanja pripadaju klasi sistemskih fungicida, prodiru u biljku, deluju kurativno i protektivno. Strobilurini su efikasni u malim količinama u suzbijanju početne faze u razvoju čađave pegavosti, te su odlični preventivni fungicidi. Pored trifloksistrobina, u Srbiji primenu imaju i piraklostrobin i krezoksim metil. Anilinopirimidini su namenjeni suzbijanju šireg spektra patogena, lako se usvajaju i brzo šire kroz biljku, a takođe pokazuju efikasnost i na niskim temperaturama, pa se primenjuju na samom početku vegetacije. Iz ove grupe fungicida u Srbiji su registrovani za upotrebu pirimetanil i ciprodinil. Boskalid po mehanizmu delovanja je inhibitor sukcinat dehidrogenaze i koristi se u suzbijanju *Monillia* sp. i truleži plodova jabuke. Pored njega, u Srbiji je registrovan

i fluopiram. Bifentrin spada u treću grupu insekticida (piretroidi) i koristi se za suzbijanje štetočina poput jabučnog cvetojeda, moljca i smotavca.

Cilj ovog istraživanja je bio razvoj bržih i ekonomičnijih metoda, zadovoljavajuće osjetljivosti i reproduktivnosti, pogodnih za brzi skrining targetiranih pesticida u jabukama, ali i uz određena prilagođenja, sa potencijalnom primenom i za druge kombinacije pesticida i voća/povrća.

Standardne metode za određivanje pesticida u prehrambenim proizvodima u Srbiji, poput SRPS CEN/TR 17063:2017, SRPS CEN/TR 15641:2009 itd., kao i njihovi međunarodni pandani (CEN/TR 17063:2017, CEN/TS 17061:2017) mogu zahtevati više vremena i materijala. Osim toga, zakonska procedura zahteva analizu uzoraka u akreditovanim laboratorijama, uz to i ovlašćenim za kontrolu hrane. Takvi sertifikovani pregledi uzoraka poskupljuju i usložnjavaju zdravstvenu kontrolu namirnica, mada su neophodni za stavljanje prehrambenih proizvoda u promet. Takođe, oficijalne metode mogu biti kritične ili teže za sprovođenje usled uslova da se koncentracije ksenobiotika određuju isključivo na bazi analize celokupne mase reprezentativnog uzorka, koji uključuje plod u nativnom stanju (npr. kora i pulpa zajedno). Ovo implicira da instrumentalna tehnika i proces pripreme uzorka mora izaći u susret zahtevima za određivanje vrlo niskih koncentracija kako bi se dalo mišljenje o higijensko-zdravstvenoj ispravnosti kontrolisane namirnice.

Razvijene metode treba da pruže kompromis između utroška vremena i resursa za analizu sa jedne strane i što boljih parametara validacije sa druge strane, odnosno da budu alternativa i da prethode postojećim standardnim metodama analize pesticida u voću koje su propisane različitim pravilnicima, a u cilju brže i dostupnije analize većeg broja uzoraka i pružanja uvida proizvođačima u zdravstvenu ispravnost jabuka.

S obzirom na sve striktniju regulativu u pogledu zdravstvene kontrole namirnica, ovo istraživanje treba da pruži doprinos lakšoj i bržoj dostupnosti potrebnih analitičkih podataka u pogledu sadržaja ksenobiotika, pogotovu malim i srednjim preduzećima, kao i individualnim poljoprivrednim proizvođačima u domenu interne kontrole, pre finalnih sertifikovanih analiza i plasmana proizvoda na tržište.

Osim navedenih praktičnih aspekata, razvijene metode su u pogledu fundamentalnog istraživanja primenjene i u ispitivanju migracionih osobina pesticida kroz plod jabuke, odnosno u proceni retencionog kapaciteta kore. Time je ispitana opravdanost svođenja analize na samu koru u cilju procene toksikološke opterećenosti jabuka, a u odnosu na analizu čitavog ploda koja se uobičajeno primenjuje. Razvijene metode su dodatno implementirane i potvrđene u skriningu targetiranih pesticida u jabukama sa tržišta.

2 TEORIJSKE OSNOVE

2.1 *Malus domestica* Borkh.

Jabuka (*Malus domestica* Borkh.) je jedna od najstarijih široko uzgajanih vrsta voća. Vrsta se karakteriše izuzetnom sposobnošću adaptacije na različite uslove, od ekstremno hladnih mesta poput Sibira, pa do znatno toplijih krajeva poput Kolumbije ili Indonezije. Spada u listopadna drveća i može porasti i do 15 m visine. Proces zrenja plodova varira u zavisnosti od sorte i vremenskih uslova, a obično traje od 50 do 80 dana. Plodovi postižu zrelost u kasno leto ili ranu jesen, a njihova veličina se u zavisnosti od sorte kreće od 7 do 8,5 cm u prečniku. Kora zrelih plodova je crvene, žute, zelene ili roze boje, a mogu se pronaći i dvobojne i trobojne sorte. Jabuka pripada klimakteričnom voću, koje se karakteriše konstantnim porastom proizvodnje etilena u toku zrenja, gde etilen u ulozu biljnog hormona, ubrzava proces zrenja.

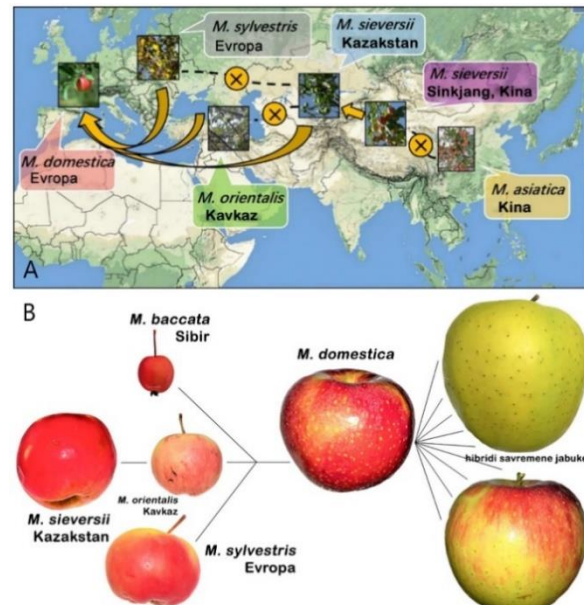
Jabuke čine značajan deo ljudske ishrane, jer predstavljaju izvor monosaharida, minerala, hranljivih vlakana i širokog spektra bioaktivnih jedinjenja poput vitamina C i fenolnih jedinjenja, koja imaju ulogu antioksidanasa. Načini konzumiranja ove vrste voća su mnogobrojni, od svežeg ploda sa drveta, preko skladištenog ploda, pa do prerađevina poput soka, kaša, soseva. Sok se konzumira svež ili u fermentisanoj formi (cider), ili u vidu jabukovog vina ili sirća.

2.1.1 Poreklo

Jabuka pripada rodu *Malus* iz porodice *Rosaceae* koji obuhvata oko 70 vrsta. Početak uzgajanja jabuka datira 4000 godina unazad u Aziju, a u današnje vreme se uzgaja više od 7500 sorti na svim kontinentima. Region Vavilov u centralnom Kazakstanu je prepoznat kao region porekla jabuke (*Malus*) i sličnih rodova kao što je kruška (*Pyrus*) i kajsija (*Prunus*) (Espley & Martens, 2013). U ovom regionu je pronađena vrsta iz roda *Malus sieversii* za koju postoje genetski dokazi da je preteča domaćih jabuka. Pored *Malus sieversii* pretečama su se inicijalno smatrale i *Malus sylvestris* (L.) Mill. iz Evrope i *Malus dasycphylla* Borkh, poznate i kao divlje jabuke, *Malus baccata* iz Sibira i *Malus prunifolia* iz Kine (Fraternale *et al.*, 2011).

Naknadnim sekvencionisanjem genoma jabuke utvrđeno je da je preteča jabuke *Malus Sieversii* iz Centralne Azije, a ne iz Kazakstana (Wang *et al.*, 2018). *Malus Sieversii* iz Sinkjanga, Kine ima visok stepen homologije, dok je *Malus sieversii* iz Kazakstana pokazuje sličnost sa genomom *Malus Sylvestris* i *Malus orientalis*. *Malus sieversii* iz Kine je u procesu ukršanja sa *Malus baccata* iz Sibira rezultovala u vidu Kineske jabuke (Slika 2.1-1 A).

Opsežne genetske studije su pokazale da je populacija savremene jabuke hibrid nekoliko vrsta (Slika 2.1-1 B); posebno se nalgašava genetski doprinos koji potiče iz ukrštanja *Malus sieversii* i *Malus orientalis*, ali je nepobitan i genetski doprinos evropske divlje jabuke (*Malus Sylvestris*), koja se je uzgajala mnogo pre pojave hibrida *M.sieversii-M.orientalis* u Evropi (Spengler, 2019). Može se zaključiti da je osnova odomaćivanja jabuke odnosno početak nastajanja savremene jabuke bila Evroazijska razmena useva, odnosno prenošenje biljaka putem Svile. Savremena jabuka nosi naziv *Malus×domestica* Borkh (Spengler, 2019).



Slika 2.1-1 Poreklo savremene jabuke (interpretirano iz: A Wang *et al.*, 2018, B Spengler, 2019)

2.1.2 Proizvodnja

Jabuke se nalaze na 17 mestu od 20 najpopularnijih agro-namirnica. Globalno gledano, uzimajući u obzir samo voće, jabuke se nalaze na drugom mestu popularnosti, posle grožđa. Proizvode se na svim kontinentima. Svetska proizvodnja voća doseže oko 500 miliona tona, pri čemu 12 % proizvodnje čine jabuke. Kina je lider u svetskoj proizvodnji sa 36 %, a prati je SAD sa 7,5 %; na severnoj hemisferi vodeće zemlje u proizvodnji jabuka su Turska, Francuska, Italija i Iran, dok su na južnoj hemisferi to Čile, Argentina, Novi Zeland i Južna Afrika (Espley & Martens, 2013).

Zbog izuzetno velikog opsega proizvodnje i širokom konkurencijom koja vlada na tržištu, ali i zahteva potrošača, kriterijumi proizvodnje jabuke, ali i drugog voća su značajno izmenjeni u smislu pooštrenja. Zahtevi potrošača se kreću u pogledu kvaliteta plodova, ali i zdravstvene ispravnosti. Problem koji se javlja u ova dva uslova, koji naizgled proističu jedan iz drugog, je činjenica da se rod jabuka tretira mnogobrojnim hemijskim sredstvima koja obezbeđuju dobra organoleptička svojstva plodova, suzbijajući štetočine i bolesti. S druge strane, ova praksa svakako ne doprinosi zdravstvenoj ispravnosti voća, kao fundamentalnom parametru kvaliteta. Uzimajući u obzir gajene kontinentalne kulture, jabuka ima najveću upotrebu pesticida po jedinici površine, sa najvećim brojem zaštitinih tretmana (Obradović *et al.*, 2013). Ovakva praksa, ako se uzme u obzir i eventualna nestručnost uzgajivača pri korišćenju hemijskih sredstava ili nepoštovanje propisane karence, može usloviti prisustvo rezidualnih sredstava

iznad maksimalno dozvoljenih koncentracija (MDK) i time direktno, u dužem periodu ugroziti zdravlje ljudi.

Kao alternativa ili u krajnjem slučaju poboljšani vid intenzivne proizvodnje voća, javlja se integralna proizvodnja. Zvanična definicija integralne proizvodnje kaže da je integralna proizvodnja „ekonomična proizvodnja voća visokog kvaliteta, koja daje prioritet ekološki bezbednijim metodama i dovodi na minimum neželjene efekte i upotrebu agro-hemijskih sredstava da bi se poboljšala zaštita životne sredine i zaštita zdravlja ljudi“. Suština integralne proizvodnje je suzbijanje primene agro-hemijskih mera i promovisanje primene bioloških mera u komercijalnoj proizvodnji voća. Umesto sprejanja ili soljenja biljaka hemijskim preparatima, u cilju suzbijanja bolesti treba primeniti suptilnije i više indirektno postupke zaštite od štetočina poput fizičkih, bioloških ili mehaničkih dejstava. Da bi se donela odluka o izboru tretmana treba redovno pratiti stanje stabala, vremenskih uslova, brojnosti štetočina i njihovog infektivnog praga i u skladu sa time doneti odluku da li i u kom trenutku primeniti pesticide.

2.1.3 Najznačajnije komercijalne sorte

Razvijen je veliki broj komercijalnih sorti jabuka, ali se svega desetina njih i uzgaja u komercijalne svrhe (Slika 2.1-2), što uglavnom zavisi od sklonosti potrošača prema pojedinim sortama. Pored teksture, ukusa, mirisa i nutritivnog profila, naklonjenost potrošača zavisi i od regiona u kome žive kao i od kulture iz koje potiču. Stanovnici Severne Amerike i Evrope prednost daju prokiselim, a stanovnici Azije slatkim jabukama. Zlatni Delišeš je najpopularnija sorta u Evropi, praćena Galom, Ajdaredom, Crvenim Delišešom i Jonagoldom, dok su u SAD najpopularnije Crveni Delišeš, Gala, Fudži, Zlatni Delišeš, Greni Smit (Tsao, 2016).

Komercijalna proizvodnja je iz tog razloga svedena na sledeće sorte: Zlatni Delišeš, Crveni Delišeš, Mekintoš i Jonagold (poreklom iz SAD), Fudži (poreklom iz Japana), Greni Smit (poreklom iz Australije) i Rojal Gala, Breburn i Džez (poreklom sa Novog Zelanda).



Slika 2.1-2 Izgled plodova komercijalno najpoznatijih sorti jabuka (izvor: Južni Banat - Fruits)

Ajdared (engl. *Idared*) je stara američka sorta, jednostavna za gajenje, ujedno i sigurna sorta po pitanju redovnosti i obilnosti rađanja. S obzirom da cveta u rano proleće, prinos ove vrste može biti smanjen pojavom mrazova u tom periodu. Preobilnost u rodu se opet, može smanjiti primenom hemijskih sredstava. Plod je krupan, sa kisel-slatkim ukusom mesa, što je donekle i ograničavajući faktor u popularnosti ove sorte kod potrošača. Međutim, plodovi se mogu

čuvati u dužem periodu čak i u prostijim uslovima skladištenja, zbog čega je popularna kod uzgajivača. S obzirom da za uzgoj ne predstavlja zahtevnu sortu, cena na tržištu joj je obično niska. Posebno je osetljiva na uzročnika pepelnice jabuke (*Podosphaera leucotricha*) (Obradović *et al.*, 2013).

Zlatni Delišeš (engl. *Golden Delicious*) je stara američka sorta, kvalitetnog ploda slatkog ukusa. Nepotpuno zreli plodovi imaju zelenkastu boju, a plodovi u punoj fazi zrenja su zlatno-žuti, po čemu je ova sorta i dobila ime. U poređenju sa drugim jabukama, npr sa Greni Smitom, plodovi ove sorte sadrže manje vode, tj manje su sočni. Poznato je da su plodovi podložni pojavi rđastih prevlaka u nepovoljnijim vremenskim uslovima. Postoje klonovi ove sorte (klon B ili klon Zlatni Rejnders) koji su otporniji na pojavu prevlaka (Obradović *et al.*, 2013). Ukoliko se plodovi ubiru na vreme i skladište u adekvatnim uslovima, moguće ih je sačuvati do naredne sezone branja. Zbog nešto većeg broja faktora na koji treba obratiti pažnju prilikom uzgajanja, sorta je zahtevnija za proizvodnju, međutim i dalje je najzastupljenija na tržištu.

Greni Smit (engl. *Granny Smith*) je stara australijska sorta. Dobila je naziv po Mariji En Smit, koja je popularisala uzgoj ove sorte u 19. veku. Greni Smit cveta srednje pozno i ima dugu vegetaciju. Plod je obično krupan i zelen u svim fazama zrenja sa beličastim lenticelama. Klon ove sorte, Čelindžer Daliver, ima još izraženije lenticеле na zelenoj podlozi, čime je vizuelno još privlačniji (Obradović *et al.*, 2013). Meso je kiselo i hrskavo, osvežavajućeg ukusa. Što se tiče proizvodnje ove sorte, najveća mana je podložnost pojavi skalda i dopunskog crvenila na plodovima. Podložnost pojavi skalda se vezuje za velike količine alfa-farnesena koju ova sorta poseduje i njegovu naknadnu oksidaciju do konjugovanih trienola koji se smatraju inicijatorima oboljenja (Whitaker *et al.*, 1997).

2.1.4 Morfologija, sastav i uloga kore

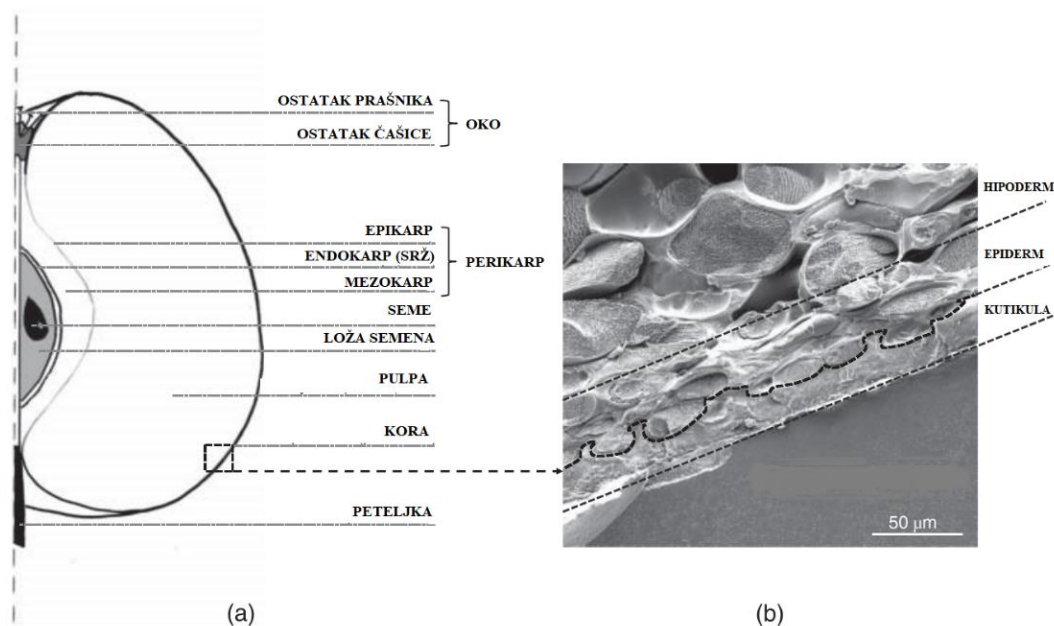
Pored razlike u hemijskom profilu različitih sorti, očigledne su i razlike u hemijskom profilu kore i pulpe u okviru jedne sorte (Kalinowska *et al.*, 2014). U većini slučajeva kora je bogatija polifenolnim jedinjenjima u odnosu na pulpu, ali izuzeci postoje u zavisnosti od sorte jabuke. Neke studije pokazuju da sorte poput Zlatnog Delišeša i Greni Smita imaju veći sadržaj hlorogenske kiseline u pulpi, a manje u kori (Escarpa & González, 1998), dok je slučaj obrnut sa sortama poput Fudži, Mekintoš, Elstar, Crveni Delišeš (Kalinowska *et al.*, 2014). Sadržaj *p*-kumaroilkininske kiseline i procijanidina B1 u sorti Gala je veći u pulpi nego u kori (Khanizadeh *et al.*, 2008), dok je kod sorti Zlatni Delišeš, Mekintoš i Greni Smit obrnuto (Kalinowska *et al.*, 2014). Kora sorti Greni Smit, Ajdared, Jonamak, Gloster i Starking Delišeš značajno doprinosi ukupnom sadržaju fenola u celoj jabuci, dok je u slučaju sorti Pilot, Mekintoš i Prima taj doprinos mali (Lata *et al.*, 2009).

Sadržaj kvercetina, katehina, epikatehina i florizina, kao i procijanidina B2 i C1 je veći u kori nego u pulpi, nezavisno od sorte jabuke, pa se može zaključiti da antioksidativna moć jabuke opada u nizu kora > srž > pulpa (Kalinowska *et al.*, 2014). Pored antioksidativnih i antihipertenzivnih svojstava flavonoida (Balasuriya & Rupasinghe, 2012) neka jedinjenja izolovana iz kore jabuke, poput ursolne kiseline i 3-*O*-*B*-*D*-glukopiranozida pokazuju i antiproliferativno dejstvo protiv ćelija raka (He & Liu, 2008). Neke studije ispituju i potencijale kore jabuke u prahu kao dodatka ishrani (Wolfe & Liu, 2003). Generalni zaključak, koji su

potvrdile i neke studije (Vieira *et al.*, 2011) je da odstranjivanje kore jabuke vodi značajnom gubitku bioaktivnih jedinjenja i samim tim njihovoj slabijoj eksploataciji iz ove vrste voća.

Slika 2.1-3a prikazuje morfologiju ploda jabuke. Centralni deo jabuke je tzv. perikarp, koji se sastoji iz endokarpa ili srži, mezokarpa – sloja koji obavija srž – i epikarpa – linije koja razdvaja mezokarp i pulpu. Kora jabuka se sastoji iz nekoliko slojeva hipoderma, epiderma i kutikule (Slika 2.1-3b). kutikula predstavlja lipofilni polimerni sloj kore, koji je u direktnom kontaktu sa spoljašnjim faktorima i sastoji se u velikom procentu od kutina (nesolubilne lipidne frakcije) i voskova (solubilne lipidne frakcije) (Khanal & Knoche, 2014). Voskovi su dispegovani kroz čitavu kutikulu; frakcija koja se nalazi bliže spoljašnjosti kutikule se naziva epikutikularnim, a frakcija bliža unutrašnjosti intrakutikularnim voskovima.

Epikutikularni voskovi su prisutni u vidu amorfne i kristalne forme. Voskovi u kristalnoj formi se nalaze na samoj površini kutikule i sastoje se uglavnom od jedinjenja dugih ugljovodoničnih lanaca. U sastav ovih konstatno rigidnih struktura mestimično ulaze i amorfne rigidne strukture koje na višoj temperaturi mogu preći u tečnu formu zahvaljujući slobodnim međuprostorima i fleksibilnijim delovima, sastavljenim od cikličnih jedinjenja i jedinjenja sa kraćim ugljovodoničnim lancima. Treći činilac epikutikularnih voskova, sa ravnomernom distribucijom između kristalnih i amornih rigidnih struktura su pokretljive amorfne regije koje se sastoje iz alifatičnih jedinjenja male molekulske mase. Veća zastupljenost ovakvih regija olakšava kretanje molekula kroz kutikulu; većina biološki aktivnih jedinjenja svoj transport kroz koru ostvaruje kretanjem kroz rigidne i pokretljive amorfne regije, jer kroz regije voskova u kristalnoj formi ne može proći usled male rastvorljivosti i sternih smetnji (Giacinti *et al.*, 2020). Idući od površine kore prema unutrašnjosti, udeo intrakutikularnih voskova i amorfne pokretljive frakcije raste, a ukupan udeo voskova se smanjuje usled zamene kutinom i polisaharidima, tako da se povećava polarnost.



Slika 2.1-3 Delovi poprečnog preseka ploda jabuke (a) i struktura kore posmatrana pod mikroskopom (b), adaptirano iz (Giacinti *et al.*, 2020)

Osnovne komponente kutikularnih voskova su masne kiseline vrlo dugog niza (engl. *very-long-chain fatty acids*) i njeni derivati, kao što su C₂₀-C₄₀ alkoholi, estri, ketoni, aldehidi (Li *et al.*,

2017). Ursolna kiselina iz grupe triterpenoida čini od 32 do 70 % ukupnih ugljovodoničnih jedinjenja voskova, alkani – C₂₉ nonakozan do 49 %, primarni alkoholi do 14,60 %, a sekundarni – zavisni od sorte – 20,40 % u voskovima Delišesa tj. 1,90 % u voskovima Zlatnog Delišesa; aldehidi i ketoni zauzimaju do 6,00 % u sastavu voskova (Belding *et al.*, 1998). Iako su pentaciklični triterpenoidi poput ursolne i oleanolne kiseline najzastupljeniji u voskastom sloju, oni nisu u pozitivnoj korelaciji sa smanjenjem gubitka vode iz plodova, već su za to odgovorne alifatične frakcije voskova vrlo dugog niza (Leide *et al.*, 2018).

Sastav kore, u domenu strukture i sastava kutikule, zavisi od biotičkih faktora tipa genetskih (vrste sorte) i stepena zrelosti ploda, ali i od abiotičkih faktora. Značajni abiotički faktori koji utiču na osobine kore su klimatski uslovi pri kojima su jabuke uzgajane i uslovi skladištenja nakon branja voća (Konarska, 2012). Sorte koje kasnije sazrevaju uglavnom imaju deblju koru od onih koje sazrevaju ranije (Homutová & Blažek, 2006). Što je kora deblja i poseduje veću količinu voskova, to je gubitak vode iz ploda manji i sorta je pogodnija za duže skladištenje. Prema rezultatima jednog ispitivanja količina epikutikularnih voskova među sortama varira od 366 do 1038 μgcm^{-2} (Belding *et al.*, 1998). U sorti Florina koja spada u sorte koje dobro podnose skladištenje, određen je sadržaj voskova od $113,1 \pm 42,2 \mu\text{gcm}^{-2}$ dok sorta Prima, koja je loša za skladištenje ima sadržaj voskova od $77,1 \pm 25,7 \mu\text{gcm}^{-2}$ (Belding *et al.*, 1998).

Kutikula i voskovi koji je prekrivaju imaju važnu ulogu u očuvanju integriteta plodova prilikom transporta i skladištenja (Grotte *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2016). Poznata je zaštitna uloga voskova ne samo od transporta patogena u plod, već i od transporta unutrašnjih sastojaka ploda na površinu jabuke tj. izlučevina, koje u tom slučaju predstavljaju nutrijente za razvoj mikroorganizama (Belding *et al.*, 2000).

Zahvaljujući svojoj morfologiji kora predstavlja prirodnu barijeru i protiv prodora pesticida i drugih ksenobiotika. Iako je evidentno da zaštitna uloga kore tj. voskova iz njenog sastava postoji, mera u kojoj se zaštita ispoljava zavisi od vrste voća, uslova u kojima se pesticidi nanose, kao i od hemijske strukture pesticida. Dobra zaštita kore jabuke i grožđa se pokazala na primeru hlorpirifos-metila, gde je veliki deo aplikovanog pesticida ostao absorbovan na koru, ali nije prošao kroz nju do ploda (Riccio *et al.*, 2006); ovo je međutim zavisno od vrste voća – kora jabuke i grožđa je pokazala zaštitni efekat, dok kora jagoda nije. Ispitivanja koja su obuhvatila osam pesticida iz različitih klasa su pokazala delimičnu zaštitnu ulogu kore grožđa, što znači da su ostaci nanetih pesticida nađeni u i pulpi, ali je najveća količina detektovana u kori grožđa (Lagunas-Allué *et al.*, 2015). Isto istraživanje je pokazalo da prodor pesticida zavisi od toga da li je pesticid sistemik ili nesistemik, kao i da pesticidi prodiru u manjoj meri kada se nanose u smeši, tj. ispoljava se kompetitivni efekat.

Prodor pesticida u plod jabuke se može podeliti u 3 osnovne faze (Giacinti *et al.*, 2020):

1. Prodor molekula pesticida počinje onog trenutka kad preparat pesticida dospe do sloja epikutikularnih voskova.
2. Rastvaranje i difuzija pesticida se odvija kroz amorfne regije kutikule, a kasnije i kroz intrakutikularne voskove i kutin.
3. Krajnja faza prodora je desorpcija molekula pesticida sa unutrašnje strane kutikule i sorpcija u ćelije epiderma.

Prodor kroz kutikulu se može objasniti kroz principe koji važe pri svakom prenosu masa preko granice dve faze. U ovom slučaju faze su formulacija na površini ploda i ćelije epiderma, a

pokretačka sila koja određuje fluks je gradijent hemijskog potencijala odnosno gradijent koncentracije između faza. Kutikula se može smatrati heterogenom asimetričnom membranom, pri čemu asimetričnosti najviše doprinosi sloj voska (Schonherr & Baur, 1994).

Što se tiče inicijalne propustljivosti kutikule prema pesticidima, nakon prvog kontakta pesticida sa plodom, epikutikularni voskovi ne utiču na propustljivost kutikule, samim tim ni na njihov prodor. Uloga epikutikularnih voskova, tačnije kristalne frakcije, je da smanje kvašljivost površine ploda, a time i efikasnost zadržavanja i vreme kontakta preparata pesticida sa plodom. U ovoj fazi na propustljivost mogu da utiču abiotički faktori poput vlažnosti vazduha i spoljašnje temperature, ali i aditivi iz komercijalnih preparata.

U fazi kada je evidentno rastvaranje pesticida u amorfnim frakcijama epikutikularnih voskova, propustljivost kutikule postaje određena koeficijentom raspodele i koeficijentom difuzije kroz kutikulu. Koeficijent raspodele zavisi od fizičko-hemijskih osobina aktivne materije pesticida, ali i samog komercijalnog preparata. Od fizičko-hemijskih osobina najznačajnije su oblik i veličina molekula, kao i hemijski sastav i posledična lipofilnost/hidrofilnost. Hlorovana, aromatična ili alifatična jedinjenja dugog niza su lipofilna, pa je koeficijent raspodele za njih veći od koeficijenta raspodele za jedinjenja sa polarnih grupama u sastavu poput amino, nitro ili alkoholnih grupa. Na dužinu putanje difuzije pesticida i na koeficijent difuzije utiče struktura kutikule u pogledu odnosa amorfne i kristalne frakcije voskova na površini i njihove prostorne strukture. Veći udeo kristalne frakcije uvećava dužinu putanje molekula kroz kutikulu, a time i vreme kontakta, što usložnjava proces difuzije. Nasuprot koeficijentu raspodele, koeficijent difuzije hidrofilnih jedinjenja je veći od koeficijenta difuzije lipofilnih jedinjenja, jer hidrofilna jedinjenja nemaju veliki afinitet prema lipofilnoj kutikuli i ne zadržavaju se u njoj, nasuprot lipofilnim jedinjenjima koja ostaju duže u matriksu kutikule, što usporava njihovu difuziju (Giacinti *et al.*, 2020).

Zahvaljujući barijernim osobinama kore i posledičnoj akumulaciji kontaminanata, pre konzumiranja se primenjuju različiti načini obrade jabuka. Tretiranje jabuka u smislu pranja, ljuštenja ili termičke obrade, pre upotrebe može smanjiti količinu zaostalih pesticida (Rasmussen *et al.*, 2003; Kong *et al.*, 2012). Pranje jabuka vodom, ali i rastvorom natrijum-hlorida ili nekog komercijalnog sredstva može smanjiti količinu ostataka pesticida u voću (Yang *et al.*, 2017), međutim efikasnost se postiže ako pesticidi nisu velikim delom ušli u koru ili dublje. Ukoliko postoji prodor pesticida u plod, ljuštenje kore je bolji način za njihovo uklanjanje. Ovaj način obrade voća se je pokazao kao efikasan za uklanjanje ostataka hlorpirifos-metila i fenitrotona iz bresaka, malationa, lindane, hlorprofama iz krompira, hlorpirifosa i njegovih proizvoda razlaganja iz krompira i plavog paradajza, dimetoata, profenofosa i pirimifos-metila kao i piridabena, pirifenoksa i tralometrina iz paradajza, ali i diazinona i karbarila iz krastavca (Djordjevic & Djurovic-Pejcev, 2016).

2.2 Pesticidi

Prema definiciji udruženja za agrokulturu i hranu (engl. *The Food and Agriculture Organization - FAO*) pesticidi predstavljaju bilo koju supstancu ili smešu supstanci koja se koristi sa ciljem prevencije, uništenja ili kontrole razvoja bilo koje štetocine, neželjene biljne ili životinjske vrste koja loše utiče na proces proizvodnje, obrade, skladištenja ili transporta

biljnih ili životinjskih namirnica. S obzirom da su neselektivni, pesticidi mogu izazvati štetu i organizmima van ciljanih grupa. Zbog širokog spektra delovanja predstavljaju najkorišćenije hemikalije na planeti, a samim tim su i najštetniji po zdravlje ljudi.

Pesticidi se na useve nanose u vidu složenih mešavina odnosno komercijalnog preparata koji sadrži aktivnu materiju – jedinjenje koje je glavni nosilac osobina komercijalnog preparata (npr. ciprodinil, endosulfan, imidakloprid itd.), rastvarač – nosilac aktivne materije (npr. smeša lakih ugljovodonika, voda, biljna ulja, gline u prahu itd.), surfaktante – pospešuju kontakt između preparata i tretirane površine i aditive – stabilizatore, adhezive odnosno supstance koje se dodaju radi pospešivanja aktivnosti i lakoće nanošenja aktivne materije.

Osobine pesticida zbog kojih pretil opasnost od njihove upotrebe su neselektivnost, bioakumulacija i perzistentnost.

2.2.1 Klasifikacija pesticida

Klasifikacija pesticida se vrši prema nekoliko kriterijuma (Slika 2.2-1). U zavisnosti od grupe organizama na koje deluju pesticidi se mogu podeliti na fungicide, insekticide, herbicide, avicide, baktericide, akaricide, nematicide, rodenticide, algicide itd. u zavisnosti od hemijske prirode mogu se podeliti na neorganske, kao što su pesticidi na bazi jedinjenja bakra ili sumpora i na organske pesticide. Organski pesticidi mogu biti prirodni i sintetički. Prirodni pesticidi ili biopesticidi potiču iz biljaka, životinja ili mikroorganizama. Prednosti prirodnih pesticida u odnosu na sintetičke je specifičnost – deluju na određene klase organizama, činjenica da su sastavni deo prirode – proizilazi da su lako razgradivi i mala je šansa sa izazivači oboljenja razviju otpornost na njih (Ishwar & Ningombam, 2017). Osnovne klase sintetičkih organskih pesticida su organofosfati, organohlorat, karbamati i piretroidi; ostale klase su anilinopirimidini, strobilurini, triazini, neonikotinoidi itd. prema sposobnosti kretanja kroz biljke pesticidi se mogu podeliti na nesistemične (neproduiruće) i na sistemične (produiruće) pesticide.



Slika 2.2-1 Shematski prikaz podele pesticida

Još jedan vid podele pesticida je prema načinu na koji ispoljavaju štetno dejstvo na organizme tj. na koji interferiraju sa metaboličnim reakcijama. Organofosforni i karbamatni pesticide inaktiviraju enzim acetilholinesterazu, koja je neophodna za pravilno funkcionisanje nerava;

organohlorna jedinjenja remete Na/K raznotežu nervnih vlakana, dok triazini ometaju proces fotosinteze (Mohammed, 2012).

Pesticidi se međusobno razlikuju i po pragu štetnosti. Akutnu toksičnost, pri kojoj se simptomi izloženosti javljaju odmah nakon kontakta, pokazuju izuzetno štetna jedinjenja. Pesticidi iz ove grupe imaju niske LD₅₀ ili LC₅₀ vrednosti (letalna doza ili letalna koncentracija – količina materije dovoljna za uništenje 50 % testiranog uzorka). Manje toksični pesticidi izazivaju subletalne efekte – efekte nedovoljne za smrtni ishod, ali dovoljne za teške promene na organizmu. Hronična toksičnost predstavlja štetne efekte koji se ispoljavaju nakon dužeg izlaganja pesticidima.

U zavisnosti od LD₅₀ ili LC₅₀ vrednosti pesticidi se mogu klasifikovati u jednu od pet kategorija: kategorija I (nema akutne toksičnosti, TJ<0.4), kategorija II (slaba akutna toksičnost, 0.4<TJ<1), kategorija III (akutna toksičnost, 1<TJ<10), kategorija IV (izražena akutna toksičnost, 10<TJ<100), kategorija V (vrlo izražena akutna toksičnost, TJ=100), pri čemu TJ predstavlja jedinice akutne toksičnosti (Mohammed, 2012).

2.2.2 Fungicidi i insekticidi

Fungicidi su najzastupljenija klasa pesticida. Imaju sposobnost inhibicije rasta plesni i gljivica. Mogu se međusobno klasifikovati u zavisnosti od toga na koji deo biljke ili u kom periodu razvoja infekcije se nanose, u zavisnosti od stepena mobilnosti kroz biljku i u zavisnosti od mehanizma delovanja.

Nesistemični neprodirući fungicidi se nanose na nadzemne delove biljaka stvarajući depozite na njihovoj površini. Ovi fungicidi nemaju sposobnost prodora, a samim tim ni kretanja kroz biljni sistem. Pošto se nalaze na samoj površini i čine prvu tačku kontakta izazivača oboljenja sa biljkom nazivaju se i kontaktnim fungicidima. U ovu klasu fungicida spadaju soli bakra, kaptan, ditianon, mankozeb, hlorotalonil, folpet i mnogi drugi (Reis & Carmona, 2013).

Nesistemični prodirući fungicidi nakon nanošenja ulaze u biljku, ali se zadržavaju lokalno na mestu aplikacije, sa manjim ili većim stepenom kretanja. Stepem kretanja podrazumeva vertikalno ili translaminarno kretanje u okviru istog organa, na primer lista. Dodin nakon aplikacije na listove jabuke se kreće vertikalno u okviru jednog epidermisa, dok se triazoli u listovima soje kreću translaminarno kroz više slojeva i dospevaju sa strane gde su aplikovani na neizloženu stranu lista (Reis & Carmona, 2013).

Fungicidi koji nakon se prodora premeste sa mesta aplikovanja na malo veću udaljenost, ali u okviru istog organa se nazivaju lokalnim sistemcima. Kretanje ovih fungicida može biti i vertikalno i translaminarno. Primer su triazoli u biljkama širokog lista (Reis & Carmona, 2013).

Mezostemični fungicidi su velikim delom kontaktni fungicidi iako male količine prodiru u biljku. Imaju tendenciju jakog vezivanja za površinu biljke, jer su lipofilni i ostvaruju interakciju sa kutikularnim voskovima, samim tim se teže ispiraju padavinama i ostvaruju rezidualni efekat. Glavni mezostemici su pojedini fungicidi iz grupe strobilurina poput trifloksistrobina i piraklostrobina (Reis & Carmona, 2013).

Sistemični fungicidi nakon nanošenja i usvajanja na nadzemne, ali i podzemne delove, bivaju premešteni preko transportnih sistema biljaka (ksilema i floema) na mesta udaljena od mesta nanošenja. S obzirom na usvojenost od strane sistema biljaka, ovi fungicidi ostvaruju duži

efekat od kontaktnih fungicida, a s obzirom da nisu izloženi Suncu i kiši mogu da se apliciraju ređe. Ovoj grupi pripadaju fungicidi iz različitih hemijskih klasa poput cimoksanila, ciprokonazola, dimetomorfa, metalaksila, miklobutanila, propamokarba, tiofanat-metila (Reis & Carmona, 2013).

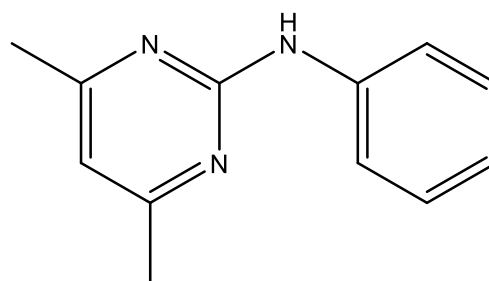
U zavisnosti od toga da li se nanose na samu biljku ili ne, kao i na koji deo biljke, fungicidi mogu da se razvrstaju u one koji se nanose na zemljište, na seme i na lišće biljaka. Svi su u suštini kontaktni fungicidi, koji se nanose sa ciljem stvaranja depozita koji bi štitili seme ili listove, a fungicidi koji se nanose na zemljište imaju ulogu dezinfekcionog sredstva. Dezinfektanti su na primer kontaktni biocidi poput metil-bromida i formaldehida, kao zaštitnici semena se koriste kaptan, iprodion, triadimenol, a lista Bordovska čorba i drugi preparati na bazi bakra (Reis & Carmona, 2013).

Prema periodu razvoja infekcije kod biljaka, fungicidi mogu da se razvrstaju u preventivne ili zaštitne, kurativne i eradiktivne. Preventivni fungicidi su kontaktni fungicidi koji treba da se nanese na površinu biljke pre razvoja spora gljivica i time spreče njihov ulazak u tkivo domaćina. Kurativni fungicidi prodiru u tkivo domaćina i prekidaju dalji razvoj infekcije koju su započele spore koje su prodrle u tkivo. Kurativni efekat postoji pre pojave vidljivih simptoma bolesti. Fungicidi se nazivaju eradiktivnim kada inhibiraju dalji razvoj bolesti nakon pojave vidljivih simptoma. Kurativni i eradiktivni efekat je prvenstveno karakterističan za prodiruće fungicide, mada postoje i obrnuti slučajevi. Uzročnik pepelnice se nakon ulaska u tkiva domaćina razvija spolja, na površini, tako da se može kontrolisati kontaktnim fungicidima, dok se uzročnik truleži korena citrusa i jabuke suzbija zahvaljujući eradiktivnom dejstvu fosetil aluminijuma koji prodire u tkiva (Reis & Carmona, 2013).

Insekticidi mogu biti sintetičkog ili prirodnog porekla. Iako im je osnovna funkcija istrebljenje insekata, ova jedinjenja štetno deluju i na kičmenjake. Većina insekticida su neurotoksini, mada mogu načiniti štetu i drugim sistemima organa. Obuhvataju širok spektar klasa hemijskih jedinjenja, a najznačajnije klase su organofosfati, karbamati, hlorovani ugljovodonici, piretrini i piretroidi, kao i neonikotinoidi.

2.2.3 Pirimetanil

Pirimetanil (Slika 2.2-2) je sistemični fungicid iz hemijske klase anilino-pirimidina. Fungicidno dejstvo ostvaruje interferencijom sa sintezom aminokiselina i proteina, konkretnije sa biosintezom metionina - FRAC kod 9; poznata je rezistencija na pirimetanil kod rodova *Botrytis* i *Venturia*, i nešto ređe kod roda *Oculimacula* (FRAC Code List ©*, 2019). S obzirom da je pološan fotodegradaciji pod dejstvom Sunčevog zračenja, teži se proizvodnji komercijalnih preparata sa nosiocima aktivne materije koji pospešuju njenu stabilnost. Neki od kandidata su ciklodekstrini, tačnije (2-hidroksipropil)- β -ciklodekstrin (HP- β -CD), čiji inkluzioni kompleks sa pirimetanilom je otporniji na fotodegradaciju i rastvorljivi u vodi u odnosu na pirimetanil (Fernandes *et al.*, 2014).



Slika 2.2-2 Strukturna formula pirimetanila

Tabela 2.2-1 prikazuje osnovne hemijske karakteristike pirimetanila.

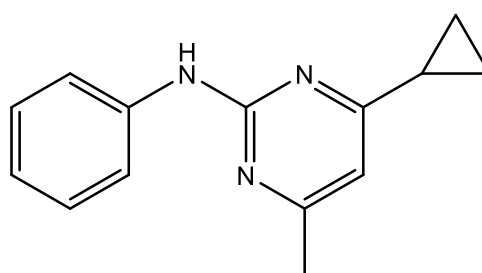
Tabela 2.2-1 Hemijske karakteristike pirimetanila i MDK u jabukama

IUPAC naziv	CAS no.	Molekulska formula	Mol. masa, g/mol	log K_{ow}	pK_a	MDK*, mgkg ⁻¹
4,6-dimetil- <i>N</i> -fenilpirimidin-2-amin	53112-28-0	C ₁₂ H ₁₃ N ₃	199,3	2,84	3,52	15,00

*Pravilnik o maksimalno dozvoljenim količinama ostataka sredstava za zaštitu bilja u hrani i hrani za životinje (broj 110-00-114/2020-09)

2.2.4 Ciprodinil

Ciprodinil (Slika 2.2-3) je kao i pirimetanil, sisitemični fungicid iz hemijske klase anilino-pirimidina. Fungicidno dejstvo ostvaruje istim mehanizmom kao i pirimetanil – FRAC kod 9 (FRAC Code List ©*, 2019). Nakon folijarne aplikacije efikasno prodire u listove i prenosi se kroz biljku putem ksilema. Rane studije su pokazale da je podjednako efikasan i na površini listova, ali i unutar njih tj. da efikasno sprečava i prodor i rast micelija izazivača oboljenja poput *P. herpotrichoides*, *E. graminis* i *B. cinereal* (Müller et al., 1998). Ispitivanje usvajanja ciprodinila preko listova i ispitivanje perzistentnosti u kontrolisanim uslovima su pokazali da su oba parametra zavisna od temperature i to usvajanje je u pozitivnoj, a perzistentnost u negativnoj korelaciji; takođe je utvrđena zavisnost od vrste biljke, pri čemu kod listova grožđa postoji bolje usvajanje i sporije razlaganje ciprodinila, nego npr. kod listova pšenice (Heye et al., 1994). Ciprodinil je u jednom in vitro ispitivanju identifikovan kao potencijalni endokrini disruptor (Medjakovic et al., 2013). Ispitivanje uticaja ciprodinila i pirimetanila na funkcionisanje moždanih ćelija je pokazalo da izazivaju oksidativni stres i da remete energetske metabolizam, jer dovode do smanjenja nivoa ćelijskog ATP-a (Coleman et al., 2012).



Slika 2.2-3 Strukturna formula ciprodinila

Tabela 2.2-2 prikazuje osnovne hemijske karakteristike ciprodinila.

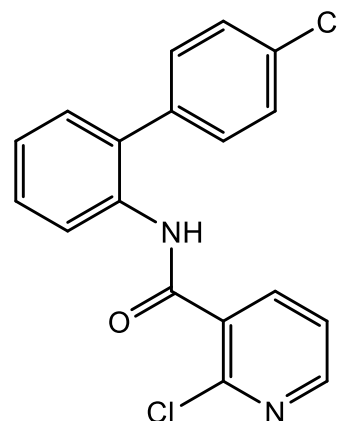
Tabela 2.2-2 Hemijske karakteristike ciprodinila i maksimalno dozvoljena količina u jabukama

IUPAC naziv	CAS no.	Molekulska formula	Mol. masa, g/mol	log K_{ow}	pK_a	MDK*, mgkg ⁻¹
4-ciklopropil-6-metil- <i>N</i> -fenilpirimidin-2-amin	121552-61-2	C ₁₄ H ₁₅ N ₃	225,29	3,59	4,44	2,00

*Pravilnik o maksimalno dozvoljenim količinama ostataka sredstava za zaštitu bilja u hrani i hrani za životinje (broj 110-00-114/2020-09)

2.2.5 Boskalid

Boskalid (Slika 2.2-4) je fungicid iz hemijske klase piridin-karboksamida. Efikasan je u inhibiciji klijanja spora, ali i u fazama razvoja zametaka i rasta micelija (Stammler *et al.*, 2008). Nakon folijarne aplikacije boskalid se brzo usvaja i prenosi translaminarno kroz tkivo lista do suprotne strane lista, ali je moguće i akropetalno kretanje kroz ksilem (Stammler *et al.*, 2008). Fungicidno dejstvo ostvaruje inhibicijom ćelijskog disanja, tačnije inhibicijom delovanja sukcinat-dehidrogenaze - FRAC kod 7 (FRAC Code List ©*, 2019).



Slika 2.2-4 Strukturna formula boskalida

Tabela 2.2-3 prikazuje osnovne hemijske karakteristike boskalida.

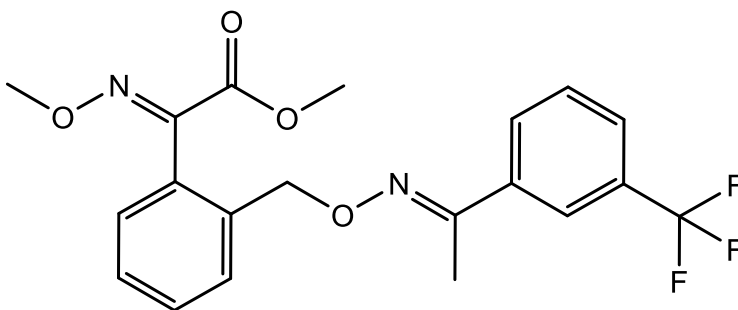
Tabela 2.2-3 Hemijske karakteristike boskalida i maksimalno dozvoljena količina u jabukama

IUPAC naziv	CAS no.	Molekulska formula	Mol. masa, g/mol	log K_{ow}	p K_a	MDK, mgkg ⁻¹
2-hlor-N-(4'-hlor-[1,1'-bifenil]-2-il)nikotinamid	188425-85-6	C ₁₈ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O	343,2	2,96	Ne disosuje	2,00

*Pravilnik o maksimalno dozvoljenim količinama ostataka sredstava za zaštitu bilja u hrani i hrani za životinje (broj 110-00-114/2020-09)

2.2.6 Trifloksistrobin

Trifloksistrobin (Slika 2.2-5) je mezostemični fungicid iz hemijske klase strobilurina – oksimino-acetata. Otkriće sintetičkih strobilurina je nastupilo zahvaljujući prirodnim derivatima β-metoksiakrilne kiseline, koji poseduju fungicidna svojstva, poput strobilurina A, oudemansina A i miksotiazola A (Bartlett *et al.*, 2002).



Slika 2.2-5 Strukturna formula trifloksistrobina (EE izomer)

Postoji ukupno četiri geometrijska izomera trifloksistrobina - EE, EZ, ZE i ZZ, pri čemu fungicidno svojstvo ima samo EE izomer (Banerjee *et al.*, 2005). Izomer sa fungicidnim svojstvom je u prirodnim uslovima podložan izomerizaciji, kao i hidrolizi do kiselinskog oblika, koji takođe nema fungicidne osobine što vodi smanjenju fungicidnog potencijala

trifloksistrobina (Banerjee et al., 2005; Banerjee et al., 2007). EE izomer trifloksistrobina fungicidno dejstvo ostvaruje inhibicijom ćelijskog disanja, vezivanjem za određena mesta u citohromu b, sastavnom delu citohrom bc1 kompleksa - FRAC kod 11 (FRAC Code List^{®*}, 2019). Ispitivanja su pokazala da su energetski zahtevne faze razvoja gljivica poput klijanja spora i njihove pokretljivosti posebno osetljive na strobilurine, upravo zbog njihovog mehanizma dejstva, tj. ometanja procesa proizvodnje energije, zahvaljujući čemu su strobilurini pre svega preventivni fungicidi (Bartlett et al., 2002).

Tabela 2.2-4 prikazuje osnovne hemijske karakteristike trifloksistrobina.

Tabela 2.2-4 Hemijske karakteristike trifloksistrobina i maksimalno dozvoljena količina u jabukama

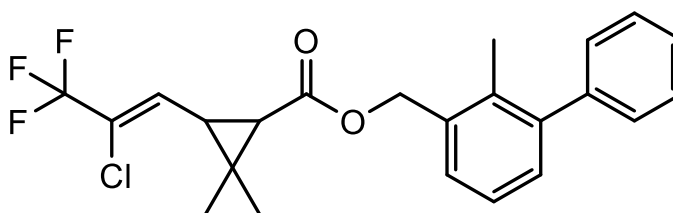
IUPAC naziv*	CAS no.	Molekulska formula	Mol. masa, g/mol	log K_{ow}	p K_a	MDK**, mgkg ⁻¹
(E)-metil 2-(metoksimino)-2-(2-(((E)-(1-(3-(trifluormetil)fenil)etiliden)amino)oksi)metil)fenil)acetat	141517-21-7	C ₂₀ H ₁₉ F ₃ N ₂ O ₄	408.4	4,5	ne disosuje	0,70

*EE izomer

**Pravilnik o maksimalno dozvoljenim količinama ostataka sredstava za zaštitu bilja u hrani i hrani za životinje (broj 110-00-114/2020-09)

2.2.7 Bifentrin

Bifentrin (Slika 2.2-6) je insekticid iz četvrte generacije piretroida. Piretroidi su neurotoksini tj. remete normalnu funkciju nerava insekata time što interferiraju sa ćelijskim kanalima natrijuma i dovode do paralize. Predstavljaju sintetske analoge piretrina, prirodnih insekticida koji se mogu izolovati iz vrste *Chrysanthemums cinerariaefolium*.



Slika 2.2-6 Strukturna formula bifentrina

Struktura piretrina, koji predstavljaju estre ciklopropankarboksilne kiseline i alkohola ciklopentenolona, sintetski je menjana, jer su nestabilni na sunčevoj svetlosti i pri drugim vremenskim uslovima pa im je primena u svojstvu insekticida ograničena. Većina piretroida je otkrivena sekvencijalnom zamenom ili kiselinskog ili alkoholnog dela novom grupom, odabranom tako da zadrži molekularni oblik i fizičke osobine izvorne strukture. Svi oni se mogu podeliti u dve klase, na osnovu toksičnosti - koja proističe iz hemijske strukture, ali i simptoma trovanja koje izazivaju kod sisara ili insekata.

Piretroidi iz klase I su jedinjenja koja u svojoj strukturi nemaju α-cijano-3-fenoksibenzil grupu poput rezmetrina i permetrina, dok piretroidi iz klase II sadrže pomenutu grupu u svojoj strukturi, poput deltametrina i fenvalerata (Soderlund, 2010). Piretroidi iz klase I izazivaju tzv.

sindrom tremora (T-sindrom), dok piretroidi iz klase II izazivaju koreoatetoza/pljuvačka sindrom (CS-sindrom) (Gupta & Milatovic, 2014).

Promene u strukturi piretroida su izuzetno značajne, jer mogu pospešiti insekticidalno svojstvo, ali i nespecifičnost određenog insekticida. Primer je prisustvo upravo α -cijanidne grupe u alkoholnom delu molekula, koja značajno povećava insekticidno svojstvo jedinjenja; tako je cihalotrin, deltametrin, cipermetrin ili fenvalerat toksičniji od bifentrina, permetrina, rezmetrina ili tetrametrina (Gajendiran & Abraham, 2018). Prema američkoj EPA/OPP klasifikaciji štetnosti pesticida (engl. *U.S. EPA's Office of Pesticide Programs*), koja se kreće od kategorije I (najštetniji) do kategorije IV (najmanje štetan), bifentrin je svrstan prema akutnoj oralnoj toksičnosti u kategoriju II, a prema akutnoj dermalnoj i inhacionoj toksičnosti u kategoriju III (Durkin, 2015). Bifentrin ne iritira niti nadražuje kožu i oči, nema uticaja na reproduktivni sistem i na razvoj ploda. S obzirom da je neurotoksin, karakteristični simptom trovanja bifentrinom je tremor.

Tabela 2.2-5 prikazuje osnovne hemijske karakteristike bifentrina.

Tabela 2.2-5 Hemijske karakteristike bifentrina i maksimalno dozvoljena količina u jabukama

IUPAC naziv	CAS no.	Molekulska formula	Mol. masa, g/mol	log K_{ow}	pK _a	MDK*, mgkg ⁻¹
(2-metil-3-fenilfenil)metil 3-[(Z)-2-hlor-3,3,3-trifluorprop-1-enil]-2,2-dimetilciklopropan-1-karboksilat	82657-04-3	C ₂₃ H ₂₂ ClF ₃ O ₂	422,87	6.00	/	0,01

*Pravilnik o maksimalno dozvoljenim količinama ostataka sredstava za zaštitu bilja u hrani i hrani za životinje (broj 110-00-114/2020-09)

2.2.8 Ciprodinil, pirimetanil, trifloksistrobin, boskalid i bifentrin u komercijalnim sredstvima za zaštitu bilja registrovanim u Srbiji

Tabela 2.2-6 daje pregled sredstava za zaštitu bilja koja kao aktivnu materiju sadrže boskalid ili smešu boskalida i druge aktivne materije. Od sredstava sa liste, za zaštitu jabuke od pepelnice i truleži plodova se posebno koristi Bellis, smeša boskalida i piraklostrobina sa karencom u trajanju od 7 dana (Grahovac *et al.*, 2011; Obradović *et al.*, 2013).

Tabela 2.2-6 Sredstva za zaštitu bilja registrovana u Srbiji koja sadrže boskalid kao aktivnu materiju (MPŠV, 2018)

Aktivna materija	Naziv sredstva za zaštitu bilja	Sadržaj aktivne materije	Proizvođač	Zastupnik u Srbiji
boskalid	Bosco	500 g kg ⁻¹	Ningbo Synagrochem, Kina	Agromarket, Kragujevac
	Cantus	500 g kg ⁻¹	BASF SE, Nemačka	BASF Srbija,
	Corvet WG	500 g kg ⁻¹	CNCCJC, Kina	Agroarm, Beograd
boskalid + dimoksistrobin	Dekada	500 g L ⁻¹	Chemical Agrosava, Beograd	/
	Pictor	200 + 200 g L ⁻¹	BASF SE, Nemačka	BASF Srbija, Beograd

boskalid + kresoksim-metil	Collis	200 + 100 g L ⁻¹	BASF SE, Nemačka	BASF Srbija, Beograd
boskalid + piraklostrobin	Bellis	252 + 128 g kg ⁻¹	BASF SE, Nemačka	BASF Srbija, Beograd
boskalid + piraklostrobin	Bosco Gold	267 + 67 g kg ⁻¹	Shangai Mio, Kina	Agromarket, Kragujevac
boskalid + piraklostrobin	Luminis	267 + 67 g kg ⁻¹	Galenika Fitofarmacija, Zemun	/
boskalid + piraklostrobin	Markiz WG	267 + 67 g kg ⁻¹	CNCCJC, Kina	Agroarm, Beograd
boskalid + piraklostrobin	Signum	267 + 67 g kg ⁻¹	BASF SE, Nemačka	BASF Srbija, Beograd

Tabela 2.2-7 daje pregled sredstava za zaštitu bilja koja kao aktivnu materiju sadrže ciprodinil ili smešu ciprodinila i druge aktivne materije. Od sredstava sa liste za zaštitu jabuke od čađave krastavosti plodova koriste se Ciprodex i Chorus 50 WG sa karencom u trajanju od 28 dana (Obradović *et al.*, 2013), a za zaštitu jabuke od čađave krastavosti i truleži plodova Switch 62,5 WG sa karencom u trajanju od 3 dana (Grahovac *et al.*, 2011; Obradović *et al.*, 2013). Ciprodex i Chorus 50 WG se u svojstvu sistemika mogu aplicirati na jabuku u većini fenofaza razvoja ploda, posebno u najranijim fenofazama srebrni vrh i mišje uši, pri čemu efikasno deluju naredna 2-3 dana (Obradović *et al.*, 2013).

Tabela 2.2-7 Sredstva za zaštitu bilja registrovana u Srbiji koja sadrže ciprodinil kao aktivnu materiju (MPŠV, 2018)

Aktivna materija	Naziv sredstva za zaštitu bilja	Sadržaj aktivne materije	Proizvođač	Zastupnik u Srbiji
	Ciprodex	300 g L ⁻¹	Adama Makhteshim, Izrael	Adama SRB, Beograd
	Neon	300 g L ⁻¹	Galenika Fitofarmacija, Zemun	/
ciprodinil	Chorus 50 WG	500 g kg ⁻¹	Syngenta Crop Protection, Švajcarska	Syngenta Agro, Beograd
	Calcio	750 g kg ⁻¹	CNCCJC, Kina	BV Komerc, Novi Sad
	Cormax	750 g kg ⁻¹	Shanghai Mio, Kina	Agromarket, Kragujevac
ciprodinil + fludioksonil	Atlas	375 + 250 g L ⁻¹	Galenika Fitofarmacija, Zemun u saradnji sa Psyche Ccemicsals, Kina	/
ciprodinil + fludioksonil	Sven	375 + 250 g L ⁻¹	Shanghai Mio, Kina	Agromarket, Kragujevac
ciprodinil + fludioksonil	Enygma	375 + 250 g kg ⁻¹	Jiangsu Flag, Kina	BV Komerc, Novi Sad
ciprodinil + fludioksonil	Switch 62,5 WG	375 + 250 g kg ⁻¹	Syngenta Crop Protection, Švajcarska	Syngenta Agro, Beograd
ciprodinil + tebukonazol	Linus	187 + 125 g L ⁻¹	Adama Makhteshim, Izrael	Adama SRB, Beograd

Tabela 2.2-8 daje pregled sredstava za zaštitu bilja koja kao aktivnu materiju sadrže pirimetanil ili smešu pirimetanila i druge aktivne materije. Od sredstava sa liste za zaštitu jabuke od čađave krastavosti plodova i pepelnice koristi se Clarinet sa karencom u trajanju od 28 dana, koji se u svojstvu sistemika aplicira na jabuku u fazi srebrni vrh – pucanje pupoljka i mišje uši i efektivan je naredna 2-3 dana, kao i preparati ciprodinila (Obradović *et al.*, 2013).

Tabela 2.2-8 Sredstva za zaštitu bilja registrovana u Srbiji koja sadže pirimetanil kao aktivnu materiju (MPŠV, 2018)

Aktivna materija	Naziv sredstva za zaštitu bilja	Sadržaj aktivne materije	Proizvođač	Zastupnik u Srbiji
pirimetanil	Botrystock	300 g L ⁻¹	Stockton Crop Protection AG, Švajcarska	Stockton, Beograd
	Mythos	300 g L ⁻¹	Bayer CropSciences, Nemačka	Bayer, Beograd
	Botus SC 400	400 g L ⁻¹	Jiangsu Flag, Kina	BV Komerc, Novi Sad
	Pehar	400 g L ⁻¹	Galenika Fitofarmacija, Zemun	/
	Pyrus 400 SC	400 g L ⁻¹	Arysta LifeScience, Belgija	Agromarket, Kragujevac
ditianon + pirimetanil	Faban	250 + 250 g L ⁻¹	BASF Agro, Švajcarska	BASF Srbija, Beograd
hlorotalonil + pirimetanil	Pehar plus	375 + 150 g L ⁻¹	Galenika Fitofarmacija, Zemun	/
pirimetanil + flukvinkonazol	Clarinet	150 + 50 g L ⁻¹	Bayer CropSciences, Nemačka	Bayer, Beograd

Tabela 2.2.-9 daje pregled sredstava za zaštitu bilja koja kao aktivnu materiju sadrže trifloksistrobin ili smešu trifloksistrobina i druge aktivne materije. U Srbiji se sa ove liste sredstava koristi Zato 50 WG u zaštiti jabuke od pepelnice i truleži plodova (Grahovac *et al.*, 2011; Obradović *et al.*, 2013) sa karencom u trajanju od 14 dana. Za zaštitu jabuke od čađave krastavosti i pepelnice koristi se i sredstvo koga nema na listi registrovanih preparata - Flint Plus (smeša trifloksistrobina i kaptana) sa karencom u trajanju od 14 dana (Obradović *et al.*, 2013). Ovaj preparat se u svojstvu kontaktnog fungicida (kaptan) i lokalnog sistemika (trifloksistrobin) aplicira na jabuku u fenofazi srebrni vrh – pucanje pupoljka i mišje uši i efektivan je naredna 4-6 dana, dok je Zato 50 WG apliciran u istoj fenofazi efekivan naredna 3-4 dana (Obradović *et al.*, 2013).

Tabela 2.2-9 Sredstva za zaštitu bilja registrovana u Srbiji koja sadže trifloksistrobin kao aktivnu materiju (MPŠV, 2018)

Aktivna materija	Naziv sredstva za zaštitu bilja	Sadržaj aktivne materije	Proizvođač	Zastupnik u Srbiji
trifloksistrobin	Zato 50 WG	500 g kg ⁻¹	Bayer AG, Nemačka	Bayer, Beograd
trifloksistrobin + ciprokonazol	Cerox	375 + 160 g L ⁻¹	Shangai Mio, Kina	Agromarket, Kragujevac
trifloksistrobin + ciprokonazol	Sphere	375 + 160 g L ⁻¹	Bayer AG, Nemačka	Bayer, Beograd
trifloksistrobin + ciprokonazol	Venere	375 + 160 g L ⁻¹	Jiangsu Flag, Kina	BV Komerc, Novi Sad

Ispitivanje efekta ciprodinila, pirimetanila i trifloksistrobina na krastavost ploda jabuke sorte Gala pokazuje da efikasnost kontrole oboljenja na plodovima dostiže od 78% do 100%, dok se efikasnost kontrole oboljenja na listovima od 100% ne može postići nijednim od pesticida, već je taj procenat maksimum 70 (Berton *et al.*, 2007).

Tabela 2.2-10 daje pregled sredstava za zaštitu bilja koja kao aktivnu materiju sadrže bifentrin ili smešu bifentrina i druge aktivne materije. U Srbiji se sa ove liste sredstava u tretmanima zasada jabuke koriste Fobos EC, Pinto, Pinotrin 10 EC i Talstar 10 EC, svi sa karencom u trajanju od 28 dana (Obradović *et al.*, 2013). Preparati na bazi piretroida se koriste za eliminisanje pepljaste vaši jabuke i smotavaca pupoljaka u fenofazama mišje uši i roze pupoljak, u prvom tretmanu posle cvetanja u slučaju masovnog piljenja jabukovog smotavca i u drugom tretmanu posle precvetavanja za suzbijanje staklokrilca (Obradović *et al.*, 2013).

Upotreba preparata Bellis, Switch 62,5 WG i Zato 50 WG se preporučuje za zaštitu plodova od skladišnih oboljenja jabuke poput crne mrljivosti, zelene plesni i različitih vrsta truleži (Obradović *et al.*, 2013).

Tabela 2.2-10 Sredstva za zaštitu bilja registrovana u Srbiji koja sadže bifentrin kao aktivnu materiju (MPŠV, 2018)

Aktivna materija	Naziv sredstva za zaštitu bilja	Sadržaj aktivne materije	Proizvođač	Zastupnik u Srbiji
	Bifenicus	100 g L ⁻¹	Chemical Agrosava, Beograd	/
	Byfin 100 EC	100 g L ⁻¹	Shangai Mio, Kina	Agromarket, Kragujevac
	Fobos EC	100 g L ⁻¹	Galenika Fitofarmacija, Zemun	/
	Fobos EW	100 g L ⁻¹	Galenika Fitofarmacija, Zemun	/
bifentrin	Futocid EC	100 g L ⁻¹	CNCCJC, Kina	BV Komerc, Novi Sad
	Pinto	100 g L ⁻¹	Willowood, Kina	Agrimatco, Novi Sad
	Pinotrin 10 EC	100 g L ⁻¹	Pinus, Slovenija	Pinus Plus, Novi Sad
	Talstar 10 EC	100 g L ⁻¹	FMC, USA	Galenika Fitofarmacija, Zemun
	Tors	100 g L ⁻¹	Biesterfeld, Nemačka	Delta Agrar, Beograd
bifentrin + acetamiprid	Nokaut	16 + 30 g L ⁻¹	Galenika Fitofarmacija, Zemun	/

2.3 Analitičke metode

Poglavlje sadrži osvrt na teorijsku osnovu aktuelnih metoda pripreme uzoraka za analizu i instrumentalnih analitičkih tehnika.

2.3.1 Metode pripreme uzoraka za analizu

Primarni ciljevi pripreme uzoraka za analizu su izolovanje analita uz istovremeno uklanjanje mogućih interferenata, dok sekundarni cilj može biti koncentrovanje analita do detektibilnih koncentracija. Ovaj korak hemijske analize je vremenski najzahtevniji i predstavlja glavni izvor analitičkih grešaka. Iz tog razloga priprema uzoraka ima značajan uticaj na performanse ukupnog procesa analize i poželjno je da se sastoji iz malog broja koraka.

Trajanje i broj koraka postupka pripreme uzoraka za analizu zavise od fizičkih i hemijskih osobina analita, ali i samog matriksa. Pored navedenih direktnih faktora, u faktore koji definišu ovaj postupak mogu se ubrojati i indirektni faktori, poput cilja analize; na primer da li je cilj analize odrediti tačnu koncentraciju analita u uzorku ili odrediti da li je analit prisutan iznad neke dozvoljene granice. Kratko trajanje, mali broj koraka, mala potrošnja reagenasa, kao i pogodnost primene na veliki broj analita bile bi glavne osobine idealnog postupka pripreme uzoraka.

Izolovanje analita iz matriksa uzorka se postiže različitim fizičko-hemijskim postupcima. Zbog složenosti matriksa, ali i nedovoljne selektivnosti ekstrakcionog sredstva, sa analitom se zajedno izoluje i niz drugih jedinjenja, koja praktično predstavljaju balast tj. moguće interferente. Zbog toga je korak ekstrakcije skoro uvek praćen korakom prečišćavanja ekstrakata.

U klasične tehnike ekstrakcije ubrajaju se tečno-tečno ekstrakcija, tečno-čvrsto ekstrakcija i ekstrakcija na čvrstoj fazi. Ove tehnike su često i dalje prvi korak u pripremi uzoraka, iako imaju nedostataka poput vremenske zahtevnosti i potrošnje većih količina organskih rastvarača. Tehnike poput ubrzane ekstrakcije rastvaračima (engl. *accelerated solvent extraction - ASE*), mikroekstrakcije na čvrstoj fazi (engl. *solid phase microextraction - SPME*) ili kvečers tehnike (engl. *QuEChERS*) imaju osnovni cilj da nadomeste navedene nedostatke.

Izolovanje analita organskim rastvaračima se zasniva na raspodeli analita između rastvarača i matriksa uzorka, a u skladu sa afinitetom analita prema rastvaraču. Osnovne osobine koje se imaju u vidu pri izboru ekstrakcionog sredstva su polarnost ekstrakcionog sredstva odnosno hidrofilni ili lipofilni karakter analita. Oktanol/voda podeoni koeficijent (K_{ow}) se smatra fenomenološkom definicijom hidrofobnosti jedinjenja koja se zasniva na n-oktanolnom referentnom sistemu. Raspodela rastvorene supstance između vodene faze i neke organske faze nije identična raspodeli u slučaju oktanol – voda sistema, ali je analogna, što znači da kao i u slučaju oktanol - voda sistema, viša vrednost K_{ow} podrazumeva veću tendenciju rastvorene supstance ka hidrofobnoj fazi, odnosno viša vrednost K_{ow} jedinjenja A u odnosu na jedinjenje B ukazuje na veću hidrofobnost jedinjenja A (Wells, 2003). Organski rastvarači koji se najčešće koriste u izolovanju analita su acetonitril, aceton, etilacetat, heksan, dihrometan i drugi.

Ekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *solid phase extraction - SPE*) je primarno razvijena kao alternativa tečno-tečno ekstrakciji, zbog manje potrošnje rastvarača, ali i mogućnosti automatizacije. Višefunkcionalnost ove tehnike se ogleda u mogućnosti istovremenog izolovanja i koncentrovanja analita iz velikih količina uzoraka, dok se usled različite efikasnosti sorpcije i desorpcije kao jedan od glavnih nedostataka ističe prinos analita nakon ovog koraka.

Princip SPE tehnike je raspodela analita između čvrste faze (sorbenta) i tečne faze (eluenta). Najrasprostranjeniji tip sorbenta je silika ili modifikovana silika, kod koje su površinske silanolne grupe supstituisane različitim funkcionalnim grupama (Tabela 2.3-1). Sorbenti na bazi silike modifikovane nepolarnim funkcionalnim grupama (oktadecil (C₁₈), oktil (C₈), fenil grupom i sl.) spadaju u tzv. *Reversed Phase* sorbente. U *Normal Phase* sorbente spadaju sorbenti na bazi silike i silike modifikovane polarnim funkcionalnim grupama (amino grupe, nitrilna grupa), kao i Florisil®. U upotrebi su i sorbenti koji nisu na bazi silike, poput primarnog-sekundarnog amina (PSA), ugljenika u formi GCB (*graphitized carbon black*), Florisila® (MgSiO₃) i aluminijum oksida (Al₂O₃). GCB je pogodan za uklanjanje pigmenata i sterola, pa se koristi u prečišćavanju ekstrakata biljaka, a PSA je pogodan za uklanjanje polarnih jedinjenja i masnih kiselina (Đurović & Đorđević, 2011).

Sorbent obično ima formu kolone. Pre apliciranja uzorka na kolonu, vrši se kondicioniranje sorbenta pogodnom tečnom fazom u cilju obezbeđivanja ravnomernog vezivanja analita za sorbent. Zatim se vrši nanošenje uzorka u formi rastvora, pri čemu dolazi do simultanog vezivanja analita i primesa za sorbent. Poslednjim koracima se u zavisnosti od odabira eluenta, mogu selektivno ispratiti primese uz zadržavanje analita ili obrnuto, pri čemu dolazi do njihovog međusobnog razdvajanja.

Tabela 2.3-1 Kompatibilnost između vrste analita, tipa sorbenta i eluenta u SPE tehnici

Tip analita	Odgovarajući sorbent	Tip interakcija	Mehanizam	Loš eluent/ Pogodan nosač analita za SPE	Dobar eluent/ Nepogodan nosač analita za SPE
pretežno alifatična i aromatična jedinjenja	silika-C ₁₈ , silika-C ₈ , silika-C ₆ H ₅	Van der Waals-ove sile	Reversed Phase	voda	heksan, metanol, acetonitril
jedinjenja sa heteroatomima i polarnim funkcionalnim grupama	silika, silika-NH ₂ , Florisil®	vodonična veza i dipol-dipol interakcije	Normal Phase	heksan	voda, dihlormetan, metiltercbutil etar
jedinjenja sa grupama RNH ₃ ⁺ , RCOO ⁻	silika-SO ₃ ⁻ , silika-NR ₃ ⁺	elektrostatičke interakcije	Jonska izmena	puferski rastvori na bazi vode sa odgovarajućom pH vrednošću	organski rastvarač sa odgovarajućom pH vrednošću
jedinjenja sa grupama NR ₄ ⁺ , RSO ₃ ⁻	silika-COO ⁻ , silika-NR ₃ ⁺				

QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) je postupak koji efikasno kombinuje ekstrakciju analita i prečišćavanje ekstrakta, jer se od početnog uzorka do finalnog ekstrakta dolazi u dva do tri koraka, sa malo izmena laboratorijskog posuđa i sa malim utroškom rastvarača. Izvorni postupak (Slika 2.3-1) podrazumeva sledeće korake: ekstrakcija acetonitrilom, isoljavanje smešom magnezijum-sulfata i natrijum-hlorida, prečišćavanje ekstrakta sa PSA sorbentom tehnikom disperzivne ekstrakcije na čvrstoj fazi (engl. *dispersive SPE*) i simultano uklanjanje rezidualne vode drugim dodatkom magnezijum-sulfata.

QuEChERS metoda je razvijena 2002 godine od strane Anastasiades i saradnika (2003), a danas je izuzetno rasprostranjena, često u izmenjenom obliku. Prve izmene postupka su usledile od samih autora nakon što je utvrđeno da pH vrednost matriksa ima

uticaj na prinos analita, a podrazumevale su uvođenje pufera. Obe modifikacije kvečersa su danas poznate kao zvanične metode za određivanje ksenobiotika u hrani. Modifikacija koja uključuje upotrebu citratnog pufera je evropska standardna metoda EN 15662, a ona koja uključuje upotrebu acetatnog pufera je oficijelna metoda AOAC 2007.01 (Quechers.com).

Prednosti QuEChERS metode u odnosu na ostale su dobar prinos analita i ekonomičnost u smislu male potrošnje reagenasa i zauzimanja posuđa i radnog prostora, a glavni nedostatak je potreba za koncentrovanjem finalnog ekstrakta ukoliko se želi postavljanje zadovoljavajuće niskih granica kvantifikacije (Đurović & Đorđević, 2011).

Postupci pripreme uzoraka i karakteristike instrumentalne tehnike kojom bi uzorci bili analizirani čine dve strane pouzdane hemijske analize. Upotreba savremenih instrumentalnih tehnika, koji se karakterišu visokom osetljivošću i selektivnošću, omogućava upotrebu pojednostavljenih postupaka pripreme uzoraka. Za instrumente sa visokom osetljivošću to znači da se koraci koncentrovanja uzorka mogu preskočiti, a da se problemi poput matriks efekta mogu zaobići razblaživanjem umesto iscrpnim prečišćavanjem ekstrakata. Instrumenti sa visokom selektivnošću omogućavaju upotrebu manje selektivnih metoda ekstrakcije, što ima veliki značaj u simultanoj analizi velikog broja analita.

2.3.2 Instrumentalne analitičke tehnike

Analiza pesticida u voću je dosta kompleksna, s obzirom na to da je voće hemijski složen matriks u kome se pesticidi obično nalaze u tragovima. U ovakvoj kombinaciji analita i uzorka zadovoljavajuću, a verovatno i najveću selektivnost imaju tehnike hromatografije. Najbolja osetljivost se postiže tehnikama masene spektrometrije.



Slika 2.3-1 Izvorna QuEChERS metoda

2.3.2.1 Gasna i tečna hromatografija

Tehnika gasne hromatografije (engl. *Gas Chromatography*) se primenjuje za razdvajanje jedinjenja koja se mogu prevesti u gasovitu fazu bez degradacije. Polarnija, slabo isparljiva ili termo nestabilna jedinjenja podležu degradaciji pri prvom kontaktu sa delovima gasnog hromatografa, odnosno u samom injektoru ili na koloni.

Sastavne komponente gasnog hromatografa su noseći gas, sistem za uvođenje analita na kolonu i kolona. Princip razdvajanja komponenti se zasniva na njihovoj različitoj raspodeli između kolone – tečne stacionarne faze i nosećeg gasa – mobilne faze, odnosno različitom afinitetu prema koloni. Pripremljeni uzorak, najčešće u tečnom stanju, se uz pomoć šprica unosi u injektor aparata, koji je zagrejan na visoku temperaturu, pri čemu dolazi do isparavanja uzorka odnosno analita i rastvarača. Pare uzorka se uz pomoć nosećeg gasa (helijum, azot) odvođe do kolone, koja je takođe zagrejana, gde se vrši razdvajanje. Brzina kojom jedinjenje prolazi kroz kolonu zavisi od više faktora, a karakteriše se veličinom koja se naziva retenciono vreme - vreme koje protekne od unošenja analita na kolonu, do njegovog izlaženja sa kolone. Faktori su sledeći:

- 1) Tačka ključanja analita (isparljivost) je direktno proporcionalna retencionom vremenu analita. Što je tačka ključanja niža, napon pare jedinjenja je viši, a time je i kraće retenciono vreme, jer je veća verovatnoća da se analit nalazi u parnoj fazi.
- 2) Afinitet analita prema stacionarnoj fazi - ako je polarnost kolone i analita slična, retenciono vreme je duže, jer analit ostvaruje snažnije interakcije sa kolonom. Rezultat toga je da polarna jedinjenja imaju duža retencionna vremena na polarnim kolonama, nego na nepolarnim, na istoj radnoj temperaturi.
- 3) Temperatura kolone treba biti optimalna, odnosno usklađena sa prirodom analita. Suviše visoke ili niske temperature ne doprinose dobrom razdvajanju analita. Pošto realan uzorak predstavlja smešu jedinjenja koja se po prirodi razlikuju, najbolje razdvajanje se postiže temperaturnim gradijentom odnosno postepenom promenom temperature.
- 4) Brzina protoka nosećeg gasa je parametar koji treba biti optimalan. Previsok protok gasa skraćuje retenciono vreme, ali vodi lošem razdvajanju, jer analiti nemaju dovoljno vremena za interakciju sa kolonom.

Kolone za gasnu hromatografiju (Slika 2.3-2a) nose naziv kapilarne kolone, jer su u osnovi cevi malog prečnika (unutrašnji prečnik 0,25 mm). Karakteristična dužina im je 30 metara. Kolone su punjene čvrstom fazom na čiju površinu je nanešen tanak sloj teško isparljivog polimera, debljine 0,25 μm . Iako su navedeni



Slika 2.3-2 Izgled kolona za gasnu (a) i tečnu hromatografiju (b)

parametri kolone – dužina, unutrašnji prečnik, debljina tečnog polimera – parametri koji su podložni optimizaciji u zavisnosti od broja i prirode analita, oni su uglavnom standardizovani.

Tako, najzastupljenije kolone za gasnu hromatografiju su nepolarne kolone, koje sadrže čvrstu fazu na bazi silike impregniranu 5% difenil – 95% polidimetilsiloksanom - takozvane 5 ili 5MS kolone, dužine su 30 m, unutrašnjeg prečnika 0,25 mm i debljine polimera od 0,25 µm. Poznata je primena i polarnijih kolona (50% diphenyl 50% dimethylpolysiloxane) (Hrouzková & Páleníková, 2016).

Tehnika tečne hromatografije visokih performansi (engl. *High Performance Liquid Chromatography, HPLC*) je alternativa tehnici gasne hromatografije, jer omogućava analizu i teže isparljivih odnosno lako razgradivih jedinjenja. Naziv je dobila po tome što se za razdvajanje koriste čvrste faze sa malim česticama - manjim od 10 µm.

Kolone za tečnu hromatografiju Slika 2.3-2b) su znatno kraće u odnosu na kolone za gasnu hromatografiju i većinom su na bazi silike modifikovane oktadecil grupama (C18). Ova vrsta stacionarne faze je osnova takozvane tečne hromatografije na reverznoj fazi, kojom se mogu razdvajati manje polarna jedinjenja. Dužina HPLC kolona se kreće od 50 do 250 mm, a unutrašnji prečnik od 2 do 4,6 mm. Veličina čestica punjenja kolone je vrlo bitan parametar koji određuje performanse tečne hromatografije. Česte su kolone sa česticama od 1 - 5 µm. Karakteristično je da sa smanjenjem promera čestica, pritisak koji kolona može da razvije znatno raste, što rezultira boljom rezolucijom i pruža mogućnost za kraće trajanje analize. Stoga se glavnim napretkom poslednjih godina smatra razvoj kolona sa česticama ispod 2 µm, a HPLC tehnika koja koristi ovakve kolone nosi naziv *tečna hromatografija ultra visokih performansi* (engl. *Ultra-High Performance Liquid Chromatography, UHPLC*) (Wiest & Olivé, 2012). UHPLC obezbeđuje brže razdvajanje i manju potrošnju rastvarača u odnosu na HPLC, ali ako se koriste veće brzine protoka, zbog manjih čestica se javlja rizik od pojave temperaturnog gradijenta duž kolone, što loše utiče na njene osobine (Fornstedt *et al.*, 2015).

Mobilna faza odnosno eluent u tečnoj hromatografiji na reverznoj fazi je obično organski rastvarač mešljiv sa vodom poput acetonitrila, metanola, izopropanola ili voda ili njihova smeša. Razlog za to je česta upotreba tehnika masene spektrometrije sa blagim vidovima jonizacije, poput elektrosprej jonizacije – ESI u karakterizaciji analita. Izbor mobilne faze je bitan faktor jer utiče na efikasnost procesa jonizacije analita i na eventualno formiranje adukata sa nastalim jonima. Pošto ESI podrazumeva raspršivanje mobilne faze u jakom električnom polju, pri čemu nastaju fine čestice aerosola koje su naelektrisane, to znači da efikasnu jonizaciju analita omogućavaju mobilne faze koje se lako raspršuju, odnosno koje imaju malu viskoznost, a to su rastvarači poput acetona, alkohola ili acetonitrila. Pored vode, kao mobilne faze se često koriste i kiseli vodeni rastvori, kao i rastvori određenih soli u svojstvu aditiva. Aditivi se koriste da bi se kontrolisala pH vrednost tokom analize i da bi se obezbedilo efikasno razdvajanje. Za obezbeđivanje blago kiselih uslova rada koriste se sirćetna ili mravlja kiselina u koncentracijama od 0,10 do 1,00 %, a za blago bazne uslove je pogodan amonijum-hidroksid u istom rasponu koncentracija. U slučaju rastvora soli, potrebno je da one budu lako isparljive pri datim uslovima jonizacije. Zato se najčešće koriste vodeni rastvori sirćetne kiseline i amonijum acetata ili mravlje kiseline i amonijum formijata.

Preporuka je da prvi izbor dvokomponente mobilne faze bude 0,10 % rastvor mravlje kiseline i acetonitril (Shimadzu.com_01), jer se smatra da mravlja kiselina unosi manje primesa u maseni spektrometar od sirćetne kiseline i ima manju molekulsku masu od nje, pa njeni maseni fragmenti ne predstavljaju interferente, dok acetonitril pruža veću efikasnost jonizacije od ostalih, jer ima manju viskoznost.

Mobilne faze i aditivi, nečistoće prisutne u njima, kao i sami molekuli analita međusobno, mogu formirati adukte. Česti su nekovalentni kompleksi poput protonovanih dimernih jona ($[2M+H^+]$), pseudomolekulski joni sa različitim katjonima ($[M+NH_4^+]$, $[M+Na^+]$, $[M+K^+]$), adukti sa molekulima rastvarača ($[M+H_2O+H^+]$, $[M+CH_3OH+H^+]$, $[M+CH_3CN+H^+]$, $[M+CH_3COO^-]$), kao i polimerni joni, npr. dimeri i trimeri ($[2M+Na^+]$, $[3M+H^+]$) (Chen *et al.*, 2007). Formiranje adukata je poželjno u slučajevima nedovoljne jonizacije analita odnosno slabe zastupljenosti $[M+H^+]$ jona, pa se čak male količine katjona i dodaju u eluent.

2.3.2.2 Masena spektrometrija

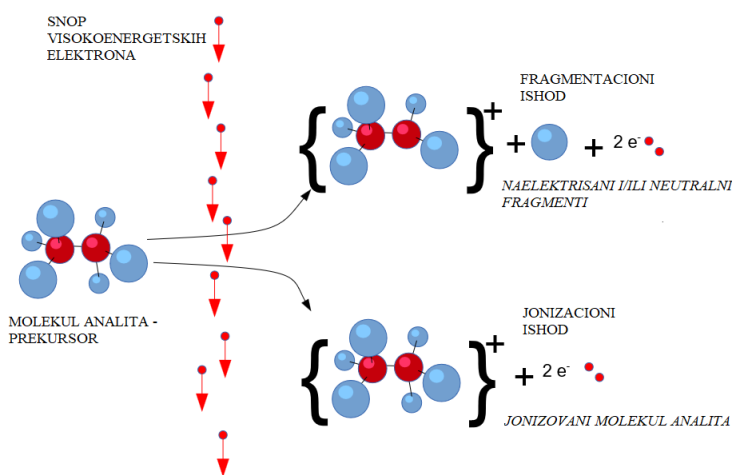
Masena spektrometrija je instrumentalna tehnika koju karakteriše brzina i visoka osetljivost. Joni, nastali jonizacijom ili fragmentacijom molekula analita, leže u samoj osnovi principa rada ove tehnike, a razdvajaju se na osnovu odnosa svoje dve osobine - mase i naelektrisanja (m/z). Ukoliko su joni nastali jonizacijom molekula analita, mogu pružiti informaciju o njegovoj molekulskoj masi, a ukoliko su nastali fragmentacijom molekula analita, onda se mogu dobiti informacije o njegovoj strukturi.

Faze u nastajanju masenog spektra, koji predstavlja rezultat rada masenog spektrometra su: (1) uvođenje analita u maseni spektrometar, (2) jonizacija molekula analita do rezultujućih jonizovanih molekula ili jonskih fragmenata u jonskom izvoru, (3) razdvajanje nastalih jona prema odnosu njihove mase i naelektrisanja u masenom analizatoru i (4) detekcija razvojenih jona.

2.3.2.2.1 Tehnike jonizacije molekula analita

Postoji veći broj razvijenih tehnika jonizacije. Dve tehnike koje su se među prvima razvile su jonizacija visoko-energetskim elektronima (engl. *electron ionization, EI*) i hemijska jonizacija (engl. *chemical ionization, CI*). Ove tehnike su takođe komplementarne, jer hemijska jonizacija pruža informacije o molekulskoj masi, dok jonizacija elektronima pruža informacije o strukturi molekula.

Molekuli analita sudaraju sa elektronima velike energije – obično 70 eV – emitovanim od strane usijanog filameta i pritom cepaju na jonizovane fragmente (Slika 2.3-3). Od dva moguća ishoda jonizacije prikazanih na slici 2.3-3, usled “agresivnog” načina jonizacije, praktično je moguć samo fragmentacioni ishod, jer se molekulski joni, nastali otpuštanjem jednog elektrona, ne vide u masenom spektru, zbog slabe zastupljenosti.



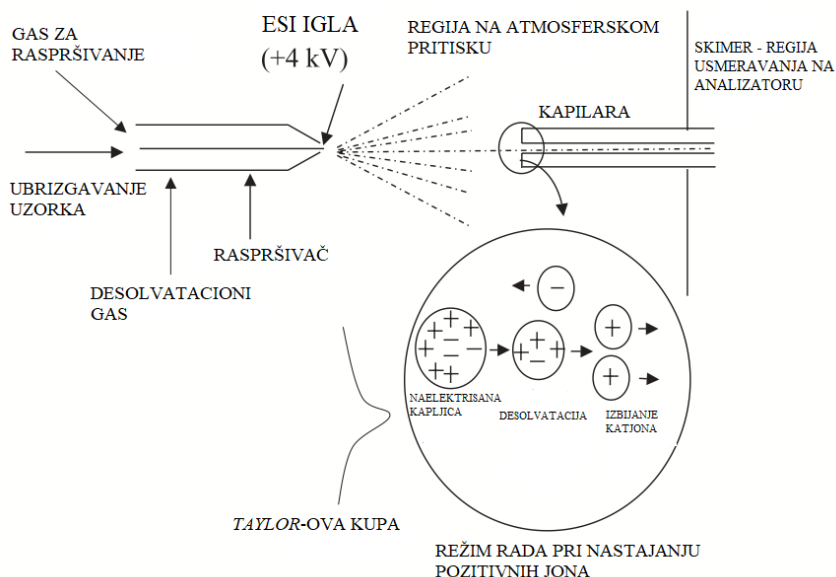
Slika 2.3-3 Jonizacija bombardovanjem visokoenergetskim elektronima (izvor: Electron ionization – Wikipedia)

Hemijska jonizacija je “blag” način jonizacije (engl. *soft ionization*), koji rezultuje nastajanjem pretežno pseudo molekulskih jona, pa su oni najzastupljeniji u masenom spektru. Mehanizam nastajanja ovih jona se razlikuje od mehanizma pri elektronskoj jonizaciji, a podrazumeva reakcije prenosa protona sa molekula

gasovitog reagensa na molekule analita. Ulogu reagensa u hemijskoj jonizaciji najčešće imaju metan, izobutan i amonijak. Efikasnost jonizacije u ovom slučaju zavisi od afiniteta molekula analita prema protonima u odnosu na molekule reagensa.

U naknadno razvijene tehnike jonizacije ubrajaju se matriksom potpomognuta laserska desorpcija/jonizacija (engl. *matrix-assisted laser desorption/ionization* - MALDI), desorpciona elektrosprej jonizacija (engl. *desorption electrospray ionization* - DESI). Najčešće primenjivanje tehnike jonizacije podrazumevaju jonizaciju na atmosferskom pritisku (engl. *atmospheric pressure ionization* - API); to su elektrosprej jonizacija (engl. *electrospray ionization* - ESI) i hemijska jonizacija na atmosferskom pritisku (engl. *atmospheric pressure chemical ionization* - APCI).

Osnovna konstrukcija ESI jonskog izvora uključuje iglu malog prečnika, koja prolazi kroz probu, kroz koju se uvodi tečni uzorak i koja se nalazi na visokom električnom potencijalu (3-8 kV), komore za ispravanje tečne faze, obično na principu zagrevanja i interfejsa sa analizatorom koji se nalazi



Slika 2.3-4 ESI jonizacija (*positive ion mode*) (Chen *et al.*, 2007)

pod vakuumom (Slika 2.3-4). ESI jonizacija je “blag” način jonizacije, a nastajanje protonovanih molekulskih jona se odvija mehanizmom u dve faze. Prva faza formiranja jona podrazumeva nastanak naelektrisanih kapljica tzv. Tejlorovih konusa, usled postojanja jakog električnog polja. Druga faza formiranja jona podrazumeva isparavanje tečne faze, što je potpomognuto paralelnim protokom gasa – azota, pri čemu gustina istoimenog naelektrisanja u kapljici raste, rezultirajući cepanjem kapljica na sitnije kapljice usled preovlađivanja Kulonovih sila u odnosu na površinski napon. Isti proces ponovljen kaskadno, dovodi do formiranja protonovanih molekulskih jona analita bez prisustva rastvarača, koji se kroz konusni deo – skimer usmeravaju u analizator.

ESI ima nekoliko bitnih karakteristika: prva je mogućnost nastajanja višestruko naelektrisanih jona, što omogućava analiziranje jedinjenja velikih molekulskih masa, poput proteina, standardnim kvadrupolima kao analizatorima; druga karakteristika je izuzetno blagi način jonizacije, a treća karakteristika je jednostavnost u dizajnu i mogućnost rada na atmosferskom pritisku, što omogućava rutinsko povezivanje sa sistemima tečnih hromatografa (Chen *et al.*, 2007). Zbog toga što je jonizacija elektronima visoke energije posebno pogodna za lakoisparljive analite - molekule male mase, a ESI i za lako i za teško isparljive analite – molekule velike mase, najzastupljenije kombinacije hromatografskih sistema i masenih spektrometara odnosno analizatora su GC-EI-MS i LC-ESI-MS.

Osnovna konstrukcija APCI jonskog izvora uključuje probu kroz koju se uvodi tečni uzorak i korona iglu na koju se primenjuje visoka voltaža. Za razliku od ESI igle, koja se nalazi u sklopu ESI probe, korona igla se nalazi odvojeno od APCI probe (Slika 2.3-5). U APCI mehanizmu, se vrši raspršivanje i desolvatisanje tečne faze pomoću gasa za raspršivanje, najčešće azota i zagrevanja. Desolvatisani molekuli analita se potom jonizuju prevashodno u



Slika 2.3-5 Konfiguracija ESI probe (1,2) i APCI probe sa korona iglom (3,4) u okviru jonskog izvora

reakcijama sa molekulima mobilne faze, kojih ima u višku u nastalom aerosolu, a koji su prethodno pobuđeni u korona pražnjenju pod dejstvom visoke voltaže sa korona igle. Ovaj mehanizam vodi nastajanju različitih klastera molekula mobilne faze i molekula analita, koji bivaju razbijeni kolizijom sa pobuđenim molekulima gasa, pri čemu se u najvećoj meri formiraju protonovani molekulski joni analita. Tokom APCI jonizacije, moguća je termalna razgradnja termolabilnih molekula, a time i veći udeo fragmenata u izvoru, nego kod ESI jonizacije. APCI jonizacija je najefikasnija u analizi termostabilnih, isparljivih i nepolarnih jedinjenja.

Idealne osobine bilo kog jonskog izvora podrazumevaju visoku efikasnost jonizacije i visoku stabilnost nastalih jona, radi efikasne analize u narednom delu spektrometra - masenom analizatoru.

2.3.2.2.2 Maseni analizatori

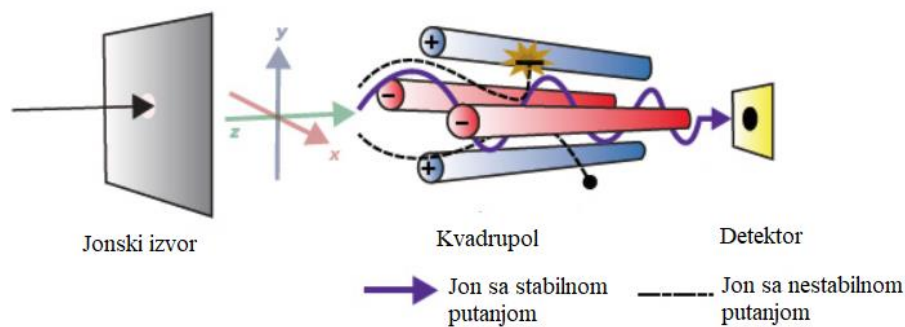
Osnovna funkcija masenog analizatora je da međusobno razdvoji jone koji dolaze iz jonskog izvora. Razdvajanje jona se vrši u zavisnosti od odnosa njihovih osobina – mase i naelektrisanja (m/z). Analiza odnosa mase i naelektrisanja je različita u zavisnosti od analizatora. Ova analiza se zasniva na merenju momenta kretanja kod magnetnih sektora, kinetičke energije kod elektrostatičkih sektora, stabilnosti kretanja kod transmisionog kvadrupola, frekvence orbitalnog kretanja kod 3D jonskog trapa, frekvence aksijalnog kretanja duž centralne elektrode kod Orbitrapa, kao i brzine kretanja jona kod analizatora na principu vremena preletanja, (engl. *Time of Flight*, TOF) (Hu *et al.*, 2005).

Mogućnost instrumenta da napravi razliku između dva jona istog intenziteta i bliskih m/z vrednosti definiše se kao moć razlaganja (*resolving power*) (Macherone, 2013). IUPAC definicija moći razlaganja se može predstaviti izrazom $m1/m1-m2$ u slučaju kada između dva pika istih visina sa masama $m1$ i $m2$ postoji preklapanje na određenom procentu visine bilo kog pika (obično je to 10 % visine). IUPAC definicija rezolucije masa se može predstaviti izrazom $m/\Delta m$, pri čemu m predstavlja masu jednog pika u masenom spektru, a Δm širinu tog pika obično na 50 % visine. To znači da moć razlaganja od 100000 omogućava potpuno razdvajanje

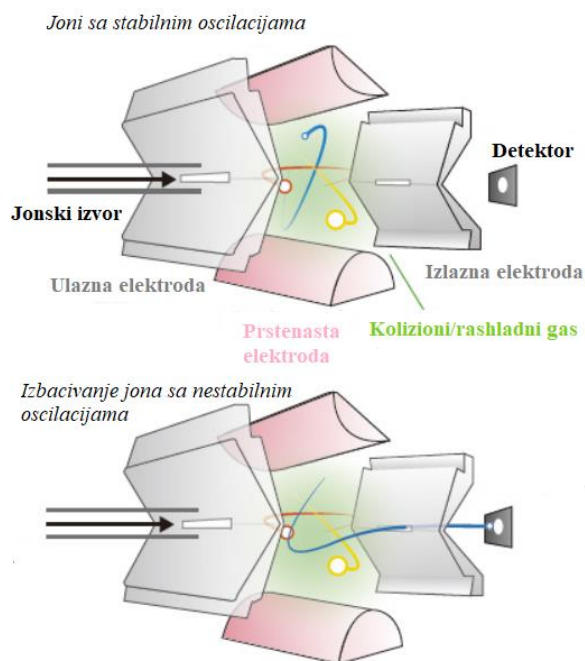
jona m/z 1000 od jona m/z 1000.01 pri 10% visine pikova ($\Delta M = 0.01$). Moć razlaganja u opsegu od 100 do 500 se smatra niskom, u opsegu od 1000 do 5000 srednjom, a u opsegu preko 10000 visokom (Downard, 2004a). Maseni analizatori poput magnetnog sektora i dvostruko fokusirajućeg analizatora rade pri konstantnoj moći razlaganja, što znači da se rezolucija smanjuje sa porastom m/z , dok kvadrupol radi pri konstantnoj rezoluciji u okviru datog m/z opsega.

Transmisioni kvadrupol se sastoji od dva para međusobno paralelnih cilindričnih šipki, pri čemu par čine šipke istog znaka potencijala koje se nalaze nasuprot jedna drugoj (Slika 2.3-6). Na jedan par šipki je primenjen konstantan napon, a na drugi par oscilirajući radiofrekventni napon. Joni se usmeravaju iz jonskog izvora u pravcu z -ose kvadrupola. Superpozicija oscilirajućeg napona na konstantni napon omogućava oscilaciju jona u pravcu x i y -ose. Ukoliko je amplituda oscilacija prevelika, jon udara u jednu od šipki i time se eliminiše iz putanje ka detektoru. Jedino joni koji ostvare optimalne oscilacije za date uslove, tj. održe stabilnu putanju kroz kvadrupol, mogu dospeti do detektora. Rezolucija kod kvadrupola je obično dovoljna za razdvajanje jona u iznosu $m/z \sim 0,3$.

Transmisioni kvadrupol omogućava dva režima rada masenog spektrometra. Skenirajući režim rada (*Scan mode*) podrazumeva sekvencijalnu primenu različitih potencijala na šipke, što omogućava u nekom trenutku rada analizatora stvaranje stabilne putanje za svaki jon koji dođe iz jonskog izvora, odnosno omogućava se vremenski ograničeno (*dwell time*) ‘traženje’ jona na svakoj vrednosti m/z u zadatom m/z opsegu. U toku režima praćenja odabranog jona (*Selected Ion Monitoring mode*), u kvadrupolu postoje uslovi koji omogućavaju prolaz i detekciju isključivo jona sa predefinisanim odnosom mase i naelektrisanja.



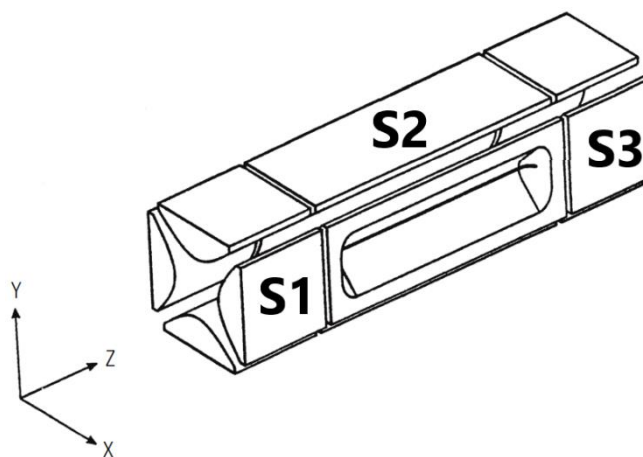
Slika 2.3-6 Ilustracija konstrukcije i principa rada transmisionog kvadrupola (izvor: Shimadzu.com_02)



Slika 2.3-7 Ilustracija konstrukcije i principa rada 3D jonskog trapa (izvor: Shimadzu.com_02)

razlaganja trodimenzionalnog jonskog trapa se kreće od 1000 do 4000.

Linearni jonski trap konstrukcijski predstavlja transmisioni kvadrupol na čije krajeve su dodate ulazna i izlazna elektroda koje omogućavaju zadržavanje jona. Sastoji se iz četiri hiperbolične šipke usmerena jedna ka drugoj tako da obrazuju kvadar (Slika 2.3-8). Zbog veće zapremine linearni trap može da skladišti više jona od trodimenzionalnog trapa, što rezultuje znatno većom osetljivošću. Maksimalni kapacitet skladištenja jona je procenjen na 7×10^6 , dok je broj uskladištenih jona dovoljan za produkciju masenog spektra procenjen na oko 2×10^4 što je preko 10 puta više nego kod 3D trapa (Douglas *et al.*, 2005).



Slika 2.3-8 Primer konstrukcije linearnog trapa (karakteristična za LTQ XL instrumente; S1 – ulazna sekcija, S2 – centralna, skladišna sekcija i S3 – izlazna sekcija)

Orbitrap™, izvorno konstruisan od strane Aleksandra Makarova, koristi električno polje za hvatanje i skladištenje jona. Sastoji se iz dve spoljašnje i jedne centralne elektrode, koje mu omogućavaju funkciju analizatora, ali i detektora (Slika 2.3-9). Stabilno kretanje jona u okviru Orbitrapa podrazumeva orbitalno kretanje oko centralne elektrode (Slika 2.3-9b) i istovremeno oscilovanje u pravcu z-ose Orbitrapa. Jačanje električnog polja usled promene napona na centralnoj elektrodi sažima putanju jona i drži je u blizini centralne elektrode (tzv.

Jonski trap ili jonska zamka funkcioniše slično kao kvadrupol, ali se konstrukcijski razlikuje, što omogućava ‘skladištenje’ dospelih jona obično na vreme reda veličine mikrosekundi. Postoje dve vrste jonskog trapa – linearni i trodimenzionalni trap.

Trodimenzionalni jonski trap se sastoji od tri elektrode – jedne ulazne, jedne izlazne i centralne prstenaste elektrode (Slika 2.3-7). Promenom napona ulazne i izlazne elektrode vrši se punjenje trapa. Radiofrekventni (RF) napon primenjen na centralnu elektrodu omogućava primljenim jonima da obrazuju stabilnu 3D orbitalnu putanju, pri čemu je radijus putanje veći za jone manjeg m/z , odnosno oni su bliži izlaznoj elektrodi. Promena napona na centralnoj elektrodi destabilizuje putanju jona u zamci, i to najpre onih sa najvećim radijusom putanje, pri čemu prvi počinju da napuštaju trap. Moć

elektrodinamičko sažimanje, engl. *electrodynamic squeezing*) (Slika 2.3-9a), tako da je gubitak jona usled sudara sa spoljnim elektrodama minimalan. Kada se završi punjenje jonima, napon na centralnoj elektrodi postaje statičan.

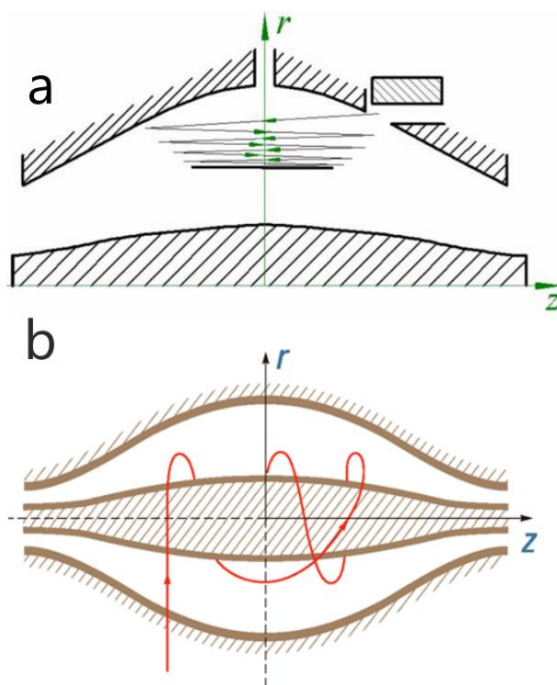
Joni različitog odnosa mase i naelektrisanja imaju različite frekvencije oscilovanja, što je osnova njihove detekcije. Detekcija jona se vrši merenjem promena u površinskom naelektrisanju spoljašnjih elektroda, do kojih dolazi usled periodičnog približavanja i udaljavanja jona od elektroda odnosno oscilovanja. Što je više jona prisutno i što su oni bliži spoljnim elektrodama, intenzivnija je promena u naelektrisanju. Ove promene stvaraju signale koji se obrađuju kompjuterski primenom *Fourier*-ove transformacije i rezultiraju masenim spektrom.

Prednosti Orbitrapa u odnosu na druge analizatore su visoka moć razlaganja – oko 150000, koja je rezultat toga da se električno polje može definisati sa visokom preciznošću i veći kapacitet punjenja prostora za teže jone usled nepostojanja zavisnosti skladišnog napona od odnosa mase i naelektrisanja (Hu *et al.*, 2005).

Problem koji se javlja kod trapa bilo koje konstrukcije je *space charge* efekat. Efekat podrazumeva interakcije između jona koji se nalaze u ograničenom prostoru, a do kojih dolazi kada broj jona pređe određeni limit. Interakcije utiču na kretanja jona u samom trapu, što za krajnji ishod ima pogoršavanje performansi poput osetljivosti, preciznosti u merenju masa i moći razlaganja. *Space charge* efekat se kod Orbitrapa javlja pri znatno većim gustinama naelektrisanja u poređenju sa RF trapovima odnosno efekat je znatno smanjen zbog postojanja centralne elektrode koja zaklanja jone sa jedne strane elektrode od dejstava jona sa suprotne strane (Hecht *et al.*, 2019). Ovaj problem se može prevazići održavanjem optimalnih gustina jona u trapu, što se postiže kraćim vremenom punjenja trapa ili izolacijom jona. Savremeni instrumenti implementiraju AGC proceduru (*Automatic Gain Control*) koja podrazumeva kratak *prescan* kojim se određuje količina jona u odabranom m/z opsegu i tako omogućuje skladištenje optimalnog broja jona tokom analize (“*AGC target value*”) (Makarov *et al.*, 2006).

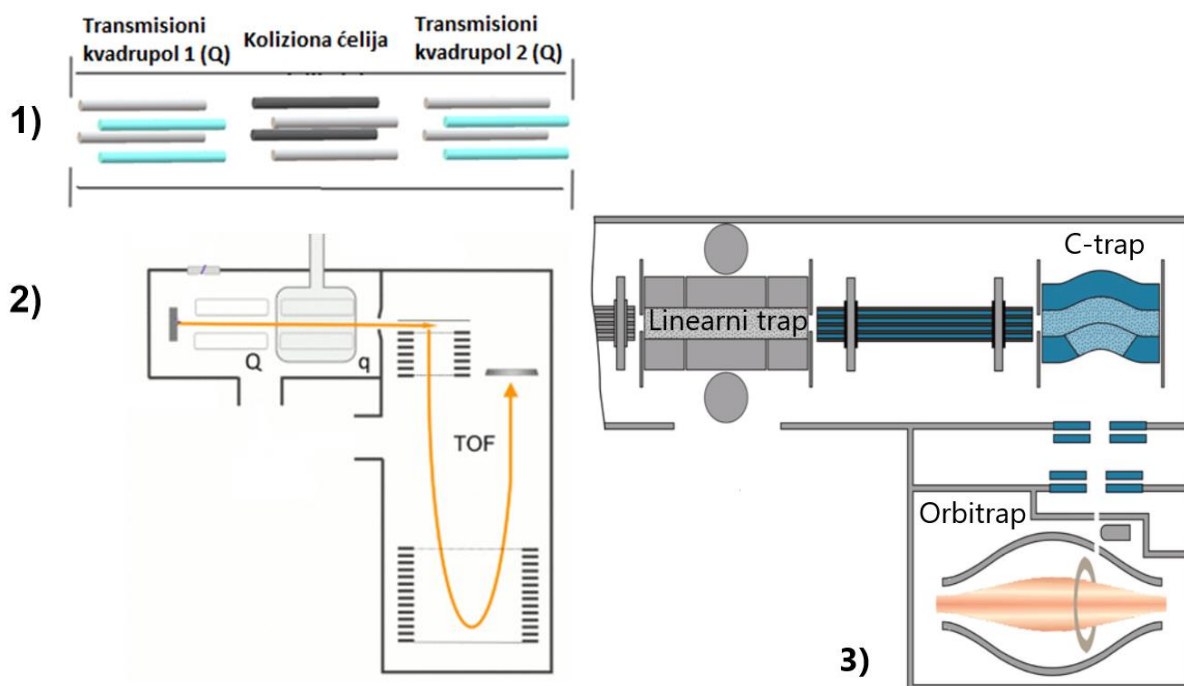
Hibridni spektrometri predstavljaju spoj više analizatora u okviru jednog instrumenta s ciljem kombinovanja njihovih različitih performansi poput moći razlaganja ili brzine analize.

Trostruki kvadrupol (triple quad, QqQ) je prvi hibrid konstruisan za potrebe tandemске masene spektrometrije, u kasnim 1970. godinama u Australiji (Downard, 2004b), a danas i najčešći hibrid u upotrebi (Slika 2.3-10). Prvi i poslednji kvadrupol u nizu su klasični transmisioni kvadrupoli koji rade na RF i DC naponima, dok središnji kvadrupol ima ulogu kolizionе ćelije i radi isključivo pod RF naponom, omogućujući jonima da budu koncentrisani u tom prostoru. U njemu se nalaze helijum ili argon pod niskim pritiskom.



Slika 2.3-9 Ilustracija konstrukcije Orbitrapa: sažimanje kretanja jona oko centralne elektrode (a) i oscilovanje jona oko centralne elektrode (b)

Kombinacija kvadrupola i analizatora na bazi vremena preletanja (Qq-TOF) prvi put je razvijena u ranim 1980. godinama, a prvi komercijalni instrument je nastao 1996. Konstrukcijski gledano instrument se sastoji od trostrukog kvadrupola kod kojeg je posljednji kvadrupol zamenjen TOF analizatorom; kod prve verzije instrumenta TOF je bio spojen sa Qq linearno, a u poboljšanoj verziji koja se i danas koristi TOF je povezan ortogonalno (Slika 2.3-10). Prednost QqTOF instrumenta u odnosu na QqQ je velika moć razlaganja koja iznosi >10000, dok je nedostatak manja osetljivost u režimu skeniranja prekursora (Chernushevich *et al.*, 2001).



Slika 2.3-10 Ilustracija konstrukcije QqQ (1), QqTOF (2) i LT-Orbitrap hibrida

Linearni trap (LT) i Orbitrap su prvi put spojeni u vidu hibrida pod nazivom LTQ Orbitrap XL™ proizvođača Thermo Fisher Scientific. Ovo je prvi komercijalni hibrid iz serije hibrida koji implementiraju Orbitrap. Predstavlja spoj linearnog trapa i Orbitrapa preko zakrivljenog kvadrupolnog trapa (C-trap) (Slika 2.3-10), čija je osnovna uloga da preusmeri jone iz prvog analizatora u Orbitrap u vidu paketa. U okviru hibrida linearni trap (LTQ XL™) može da funkcioniše nezavisno, ali postoji mogućnost proširenja detekcije na Orbitrap ukoliko je potrebna veća preciznost u merenju masa.

Razvijeno je mnogo drugih hibrida na bazi Orbitrapa poput LTQ Velos™ (poboljšana verzija kombinacije linearnog trapa i Orbitrapa), Q Exactive™ (kombinacija sa kvadrupolom) i najnovijih tribrida Orbitrap Fusion™ i Orbitrap Fusion Lumos™ (kombinacija sa linearnim trapom i kvadrupolom).

2.3.2.2.3 Tandemska masena spektrometrija

Tandemska masena spektrometrija je vid masene spektrometrije koji omogućava analizu strukture nepoznatog jedinjenja kroz sukcesivno fragmentisanje molekula. Ovaj vid eksperimenata je moguć kod masenih spektrometara koji u svom sastavu imaju kombinaciju masenih analizatora, a ekskluzivno i kod 3D jonskog trapa. Eksperimenti podrazumevaju aktivaciju i disocijaciju jona čije se struktura želi ispitati tzv. prekursora (engl. *parent ion*) i

analizu njegovih fragmenata (engl. *daughter ions*). Kod hibridnih instrumenata maseni analizator koji sledi jonski izvor ima ulogu da izdvoji željeni jon od drugih jona i da ga usmeri u kolizionu ćeliju u kojoj dolazi do fragmentacije prekursora. Maseni analizator koji sledi kolizionu ćeliju ima ulogu u analizi svih ili odabranog jona iz grupe fragmenata, što zavisi od vrste sprovedenog eksperimenta.

Postoji nekoliko mehanizama fragmentacije prekursora, a najčešći je fragmentacija kolizijom. U toku ovog procesa prekursori se sudaraju sa molekulima kolizionog gasa, koji je pod određenim pritiskom prisutan u kolizionoj ćeliji. Kada se jon sa određenom energijom kretanja neelastično sudari sa neutralnom vrstom, deo njegove energije kretanja prelazi u unutrašnju energiju, čije povećanje dovodi do fragmentacije jona (Sleno & Volmer, 2004). Proces se može podeliti u dve faze. Prva faza procesa se naziva koliziona aktivacija (*collision activation, CA*), gde nakon sudara dolazi do pobuđivanja prekursora, koji se u narednoj fazi fragmentišu odnosno disosuju, a što se naziva disocijacija izazvana sudarom (*collision-induced dissociation, CID*).

Gas koji se koristi u koliziji treba da bude nereaktivan i sa visokim jonizacionim potencijalom. Veličina molekula gasa utiče na način rasejanja nastalih fragmenata, pri čemu je poželjno zbog efikasnosti detekcije jona da rasejanje bude malo. Iz ovih razloga najviše se koriste helijum ili argon. Bitan parametar kolizije je i pritisak gasa unutar ćelije. Što je veći pritisak gasa u ćeliji raste i broj jona podložan sudarima, ali i verovatnoća da se jedan isti jon sudari više puta. Takođe povećava se verovatnoća da se i dobijeni fragmenti ekscituju i disosuju na nove fragmente.

Kolizione energije pri kojima se dešavaju sudari i disocijacije se kreću od 1-100 eV u kvadrupolima i jonskim zamkama (niske kolizione energije) do nekoliko hiljada eV u sektorskim i TOF/TOF spektrometrima (visoke kolizione energije), dok se energije iz srednjeg domena (100-1000 eV) koriste ređe (Sleno & Volmer, 2004).

Postoji nekoliko vrsta eksperimenata u tandemskoj masenoj spektrometriji. Najprostiji eksperiment podrazumeva da se odabrani prekursor fragmentiše samo jednom. Pošto se u celom procesu dva puta primenjuje analiza masa – prilikom odabira prekursora i prilikom analize njegovih fragmenata, ovakav tip eksperimenta se obeležava MS/MS ili MS² eksperiment. Varijacije MS² eksperimenta prikazuje Slika 2.3-11.

Skeniranje prekursora (*precursor ion scan*) (Slika 2.3-11) podrazumeva eksperiment u kome se odabranom fragmentu odgovarajućeg m/z traži prekursor, odnosno rezultat eksperimenta je detekcija svih prekursora koji fragmentacijom daju fragment predefinisane mase i naelektrisanja. Prvi maseni analizator radi u skenirajućem, a drugi u SIM režimu.

Skeniranje fragmenata (*product ion scan*) (Slika 2.3-11) je praktično kvalitativno ispitivanje fragmentacije željenog prekursora. Prvi analizator radi u SIM, a drugi u skenirajućem režimu.

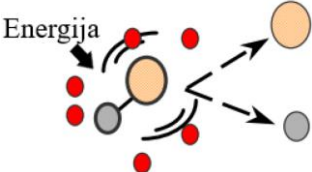
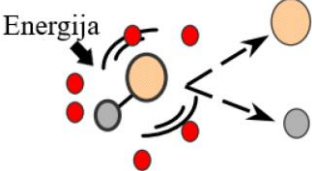
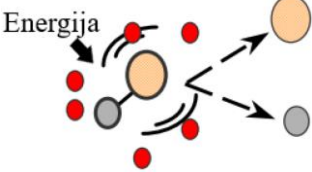
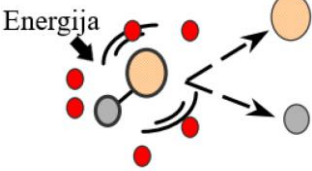
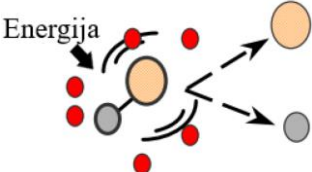
U eksperimentu **praćenja gubitka neutralnog fragmenta** (Slika 2.3-11) prvi analizator traži prekursor zadatog m/z , pri čemu drugi analizator traži fragment odnosa m/z koji je umanjen za predefinisani iznos u odnosu na m/z prekursora.

Poslednja varijacija eksperimenta je tzv. **monitornig odabrane fragmentacije** ili 'reakcije' (*selected reaction monitoring, SRM*) (Slika 2.3-11) u toku kojeg prvi analizator iz mase prekursora bira željeni prekursor koji se dalje fragmentiše, pri čemu se ne beleži njegov celokupni ishod fragmentacije već samo određeni – željeni fragment. Da bi se ova vrsta

eksperimenta izvela potrebno je poznavati mehanizam fragmentacije datog prekursora, odnosno najpre izvesti eksperiment skeniranja fragmenata, kako bi se upoznao ishod fragmentacije prekursora i identifikovao karakterističan fragment koji bi bio praćen u SRM eksperimentu.

Postoje i višestruki MS eksperimenti koji se obeležavaju sa MS^n i predstavljaju **monitoring uzastopnih fragmentacija** (*consecutive reaction monitoring, CRM*), koji u praktičnom smislu predstavljaju proširenje SRM eksperimenta za još po jedan korak – proizvod prethodne fragmentacije je prekursor za narednu fragmentaciju (Slika 2.3-11). Za izvođenje ovog eksperimenta potrebno je ispuniti iste preduslove kao i za SRM. Broj nivoa fragmentacije može ići do 10, mada je u praksi manji, zbog smanjenja raspoloživog broja jona.

Tandem-MS eksperimenti se mogu sprovoditi na hibridima i ekskluzivno na trapovima. Jonski trap omogućava primenu tandemske masene spektrometrije, iako je sam po sebi jedan analizator. Ovaj analizator je specifičan po tome što se sve faze tandemske MS - odabir prekursora, ekscitacija i fragmentacija - dešavaju u istom prostoru. Dok su kod *QqQ* ili *QqTOF* faze tandemske MS sukcesivne u prostoru, kod jonskog trapa su sukcesivne u vremenu.

Režim analizatora	Koliziona ćelija	Režim analizatora	Tip MS^n eksperimenta
Faza 1	Faza 2	Faza 3	MS^2
Scan		SIM	Skeniranje prekursora
SIM		Scan	Skeniranje fragmenata
Scan ($m/z = x$)		Scan ($m/z = x - n$)	Praćenje gubitka neutralnog fragmenta
SIM		SIM	Monitoring odabrane fragmentacije (SRM)
Faza 3 (6,9...)	Faza 4 (7,10...)	Faza 5 (8,11...)	MS^n ($n \geq 3$)
SIM		SIM	Monitoring uzastopnih fragmentacija (CRM)*

Slika 2.3-11 Varijacije MS^n eksperimenta; * tip eksperimenta moguć samo kod jonskih zamki

2.3.3 Validacija analitičkih metoda

Izraz ‘validacija’ potiče od latinske reči *validus* čiji je bukvalan prevod ‘jako’, a figurativan prevod ukazuje da je nešto dokazano kao istinito, korisno i kao takvo prihvaćeno (Araujo, 2009). Validacija analitičke metode predstavlja proces u toku koga se ispituju njene osobine i ograničenja, ali i faktori koji utiču na osobine metode i njihov opseg delovanja. Validacija služi da pokaže da je metoda u skladu sa svrhom koja joj je namenjena, a krajnji cilj svake validacije je da pokaže pouzdanost i preciznost metode u analizi realnih uzoraka, odnosno da se na osnovu rezultata validacije sa sigurnošću može tvrditi da je svaki rezultat rutinskih analiza tačan odnosno blizak nepoznatoj pravoj vrednosti parametra koja se ispituje.

Postoji nekoliko situacija kada se analitička metoda mora validovati. Validacija uvek prati razvoj novih metoda. Pored toga primenjuje se i kada se osobine novorazvijene metode žele uporediti sa standardnom ili nekom drugom već postojećom metodom. Ponovnu validaciju odnosno revalidaciju treba sprovesti ako se utvrdi da su osobine metode podložne promenama u toku vremena, kada se u metodu uvode novi koraci, kao i kada se planira primena razvijene metode u drugoj laboratoriji ili na drugačijem instrumentu.

Parametri metode koji se obično ispituju prilikom validacije su selektivnost i specifičnost, tačnost i preciznost, studije kalibracije (linearnost i kalibracioni opseg, matriks efekat), granice detekcije i kvantifikacije. Mnoge internacionalno priznate organizacije, poput Udruženja analitičkih hemičara (engl. *Association of Official Analytical Chemists*, AOAC), Evropskog komiteta za normalizaciju (engl. *European Committee for Normalization*, CEN), Organizacije za hranu i agrokulturu (engl. *Food and Agricultural Organization*, FAO), Američke administracije za hranu i lekove (engl. *United States Food and Drug Administration*, FDA) itd. daju smernice za validaciju u okviru svojih normativa, koji sistematizuju parametre validacije, njihove definicije i postupke ispitivanja.

Krajnji odabir parametara metode koji će biti uključeni u validaciju i kriterijumi prihvatljivosti za njih zavise od buduće namene metode. Na primer, da li metoda služi samo za utvrđivanje prisustva analita u uzorku (kvalitativne metode) ili za okvirno određivanje koncentracije analita (semikvantitativne metode) ili služi za potpuno i precizno određivanje koncentracije analita (kvantitativne metode). Jasno je da za validaciju kvalitativnih metoda nisu relevantni parametri koji se vezuju za koncentraciju analita poput studija kalibracije, tačnosti i preciznosti i granice kvantifikacije, ali selektivnost, specifičnost i granica detekcije radi pouzdane identifikacije jesu relevantni parametri.

2.3.3.1 Selektivnost i specifičnost

Selektivnost se može definisati kao mogućnost metode da pouzdano identifikuje analit u složenoj smeši bez negativnog uticaja interferenata iz smeše na identifikaciju i može se izraziti kao dobra, loša, delimična itd. Ukoliko je selektivnost potpuna, onda se govori o specifičnosti odnosno o 100 % odsustvu efekata interferenata.

U slučaju hromatografskih tehnika, selektivnost se definiše kao mogućnost metode da precizno izoluje analit iz realnog uzorka, što se manifestuje u vidu čistog pika pravilnog oblika i dobre rezolucije (Gustavo González & Ángeles Herrador, 2007). U skladu sa time jedan od načina procene selektivnosti metode jeste poređenje hromatograma blank uzoraka (bez prisustva analita) sa hromatogramima blank uzoraka u koje je unešen analit. Posmatra se da li se na

retencijom vremenu analita u blank uzorku bez analita javlja pik, koji bi mogao doprineti lažno pozitivnoj identifikaciji ili kvantifikaciji analita. Na pik analita iz blank uzorka sa unešenim analitom se vrši test čistoće pika, na primer tehnikama masene spektrometrije, koji treba da pokaže da pik potiče samo od jednog jedinjenja odnosno samo od analita. Još jedan način procene selektivnosti bi bilo poređenje hromatografskog odziva na datom retencijom vremenu u rastvoru čistog analita i rastvora analita sa primesama. Bilo koji doprinos matriksa odzivu analita rezultuje u vidu proporcionalne ili aditivne greške; u tom slučaju se metoda smatra nespecifičnom.

2.3.3.2 Tačnost i preciznost

Procenjivanje korektnosti metode (engl. *accuracy*) omogućava procenjivanje ukupne greške analize odnosno procenjuje uticaj i sistemске i slučajne greške na metodu. Korektnost metode samim tim obuhvata procenu dva parametra – tačnosti (engl. *trueness*) – sistemске greške i preciznosti (engl. *precision*) – slučajne greške. U postupku validacije hromatografskih metoda prihvaćeno je da se korektnost metode procenjuje na bazi minimum 9 merenja, odnosno tri oblasti koncentracije (niska, srednja i visoka) u tri replikata, odabranih tako da pokrivaju opseg koncentracija koji obuhvata sama metoda (Araujo, 2009).

Tačnost metode se može definisati kao stepen poklapanja vrednosti ispitivanog parametra dobijene kao rezultat analize srednje vrednosti replikata uzoraka i vrednosti koja je usvojena kao istinita. Procena ovog parametra se može vršiti poređenjem izmerene vrednosti ispitivanog parametra sa vrednošću tog parametra dobijenom analizom sertifikovanog referentnog materijala ili poređenjem vrednosti ispitivanog parametra analiziranog metodom koja se validuje sa vrednošću istog parametra analiziranog referentnom metodom čija tačnost je poznata i potvrđena. Međutim, u svakodnevnim laboratorijskim analizama mnogo su češći pristupi koji ne uključuju upotrebu referentnih materijala. Ovi postupci podrazumevaju unošenje poznate količine analita u uzorak (spajkovanje, engl. *fortification*) u najranijoj fazi analize, kompletan tretman uzorka po metodi koja se razvija i kvantifikaciju analita u spajkovanom uzorku, uzimajući u obzir efekat matriksa. Tačnost metode se izražava prinosom analita odnosno procentom analita izolovanog iz matriksa.

Preciznost metode se može definisati kao stepen poklapanja vrednosti ispitivanog parametra dobijene analizom nekoliko replikata. Ispitivanje ovog parametra ukazuje na stepen rasipanja ili neujednačenosti niza individualnih merenja, a izražava se kroz *standardnu devijaciju* tih merenja, *varijancu* ili *koeficijent varijacije (relativna standardna devijacija)* koji se izražava procentualno. Postoje tri osnovne vrste preciznosti: ponovljivost, reproduktivnost i srednja preciznost.

Ponovljivost (engl. *repeatability*) se procenjuje u okviru jedne iste laboratorije, kroz kratko vreme – u toku istog dana, tačnije sukcesivnom analizom nekoliko nezavisno pripremljenih replikata uzoraka od strane istog analitičara, uz pomoć istih reagenasa i na istom instrumentu. Ponovljivost se smanjuje sa porastom složenosti matriksa koji se analizira (Chandran & Singh, 2007). Reproductivnost se procenjuje analizom replikata istog uzorka zajedničkom metodom u okviru različitih laboratorija. Ova vrsta preciznosti se uključuje u validaciju ukoliko nekoliko laboratorija planira implementaciju iste metode.

2.3.3.3 Linearnost

Da bi kvantifikacija analita bila pouzdana i tačna potrebno je ispitati prirodu odnosa koji postoji između koncentracije analita i signala koji analit proizvodi na instrumentu. Povezanost koncentracije analita i odziva instrumenta daje kalibraciona kriva, koja se dobija instrumentalnom analizom kalibracionih standarda.

Kalibracioni standardi su rastvori analita nekoliko različitih koncentracija koji, u zavisnosti od potrebe koju nameće priroda analiziranog matriksa, mogu biti pripremljeni u organskim rastvaračima ili u samom matriksu. Broj kalibracionih standarda i opseg koncentracija koji pokrivaju (analitički opseg) može da varira u zavisnosti od namene metode, ali je pravilo da koncentracije analita budu ravnomerno raspoređene kroz čitav koncentracioni opseg, kao i da opseg pokriva od 10 % do 200 % ciljane koncentracije analita, odnosno koncentracije koja se očekuje u uzorku. Većina normativa za validaciju sugerise pet do osam kalibracionih standarda analiziranih u minimum dva do šest replikata, ali je u principu moguće koristiti manje kalibracionih standarda u više replikata ili obrnuto (Peters *et al.*, 2007). Kada se utvrdi model kalibracije, kalibracione krive se mogu konstruisati sa manjim brojem replikata ili bez njih.

Prema definiciji kalibracioni opseg metode predstavlja oblast između dve granične koncentracije analita u uzorku, u okviru koje analitička metoda poseduje prihvatljiv nivo linearnosti, tačnosti i preciznosti (Chan, 2008). To bi značilo da analitički i kalibracioni opseg nisu jedno te isto, ali mogu biti ukoliko svi prvobitno odabrani nivoi koncentracija ispunjavaju navedene kriterijume linearnosti, tačnosti i preciznosti.

Linearnost analitičke metode predstavlja njenu sposobnost da pruži rezultate koji su direktno ili indirektno – putem matematičkih transformacija – proporcionalni koncentraciji analita u uzorku kroz čitav koncentracioni opseg koji je od interesa (Chandran & Singh, 2007). Drugim rečima, linearnost sugerise da promena koncentracije analita u uzorku vodi ekvivalentnoj promeni u odzivu instrumenta. Procena linearnosti metode se može izvršiti vizuelnom procenom grafičke zavisnosti koncentracije analita i odziva instrumenta, procenom reziduala, faktora odziva ili procenta relativne greške povratno izračunatih koncentracija, pri čemu navedeni parametri ne isključuju jedni druge, već je najbolje da se procena linearnosti vrši njihovim paralelnim sagledavanjem.

Vizuelna procena kalibracione krive se sastoji u utvrđivanju eventualnog postojanja tačaka koje mogu uticati na parametre kalibracione krive i postojanja nelinearnog trenda. Tačke od uticaja mogu biti kalibracioni standardi sa koncentracijama znatno većim od ostalih standarda, kao i udaljene tačke – tačke u okviru kalibracione krive koje leže daleko od ostalih tačaka. Da bi se izbegli ovakvi slučajevi, poštuje se pravilo konstruisanja kalibracione krive sa ravnomerno raspoređenim nivoima koncentracije analita i eliminisanje udaljenih tačaka iz kalibracije. Ukoliko se udaljena tačka nalazi na sredini kalibracionog opsega ona utiče na odsečak kalibracione krive, ali ako se nalazi pri visokim koncentracijama utiče i na odsečak i na nagib krive. Nelinearni trend u promeni odziva sa koncentracijom analita se na prvi pogled može utvrditi preko vrednosti koeficijenta korelacije. Ovaj koeficijent u slučajevima dobre korelacije iznosi preko 0,9.

Karakteristika linearnosti je postojanje homoskedastičnosti, odnosno ravnomerne distribucije reziduala kroz čitav kalibracioni opseg. Rezidual se definiše kao razlika između izmerene vrednosti i srednje vrednosti odziva koja je predviđena kalibracionim modelom. Ukoliko postoji očigledan trend u raspodeli reziduala, odnosno njihova promenljivost sa promenom koncentracije analita, onda se govori o heteroskedastičnosti i odsustvu linearnosti.

Faktori odziva predstavljaju odnos odziva instrumenta i pripadajuće koncentracije analita. Grafička zavisnost faktora odziva i koncentracije kalibracionih standarda se sastoji u prikazivanju mediana izračunatih faktora odziva (R_c) kao centralne linije na grafiku i dva petoprocentna intervala poverenja odnosno linija postavljenih na $0,95 R_c$ i $1,05 R_c$ kao graničnih linija (Jurado *et al.*, 2017). Ukoliko vrednosti faktora odziva leže između graničnih linija, smatra se da je čitav analitički opseg linearan.

Kada se utvrdi kalibracioni model, postaje moguće preračunati koncentraciju svakog kalibracionog standarda svrstavanjem pripadajućih signala u odabranu funkciju. Odnos razlike između ovih vrednosti – preračunate (povratno izračunate) koncentracije i nominalne koncentracije – pomnožen sa 100 % predstavlja relativnu grešku u proceni koncentracija analita odabranim modelom kalibracije. Da bi se prihvatila linearnost određenog opsega potrebno je da relativne greške budu u granicama $\pm 15 \%$ odnosno $\pm 20 \%$ kada su u pitanju koncentracije blizu granice kvantifikacije (Jurado *et al.*, 2017).

2.3.3.4 Matriks efekat

Retki su slučajevi kada je prečišćavanje uzoraka dovoljno selektivno da u potpunosti ukloni interferente. Matriks efekat predstavlja svaki uticaj koekstrakata na beleženi signal analita, bilo da se radi o povećanju (pozitivan matriks efekat) ili smanjenju signala (negativan matriks efekat). Ovaj fenomen je karakterističan za analizu složenih uzoraka, poput različitih vrsta namirnica, voća ili povrća. Prisutan je i u gasnohromatografskim i tečnohromatografskim metodama analize, a njegova priroda i mehanizam manifestacije kod ovih metoda su različiti. Osnovni problem koji proističe iz pojave matriks efekta je nepouzdanost u kvantitativnoj, ali i kvalitativnoj analizi, ukoliko se pouzdano ne utvrdi da beleženi signal potiče samo od analita.

Mehanizam manifestacije matriks efekta u GC/MS tehnikama leži u konkurenciji molekula analita i molekula koekstrakata za vezivanje za aktivna mesta u hromatografskom sistemu, kao i zaštitnoj ulozi molekula koekstrakata prema molekulima analita, kako je prvobitno objašnjeno od strane Erney i saradnika (Erney *et al.*, 1993). Kada se ubrizga ekstrakt sa analitom u hromatografski sistem, jedinjenja iz matriksa uzorka blokiraju aktivna mesta, pre svega u injektoru gasnog hromatografa, rezultirajući u manjem procentu adsorbovanih molekula analita i posledično u većem procentu molekula analita dospelog na kolonu. Ovo znači da će se zabeležiti veći signal analita, nego u slučaju kada se ubrizga rastvor analita bez matriksa odnosno javlja se pozitivan matriks efekat. Negativan matriks efekat se objašnjava rastom broja aktivnih mesta u hromatografskom sistemu za koje se vezuju molekuli analita, a usled postepene akumulacije slaboisparljivih jedinjenja iz uzorka (Silvestro *et al.*, 2013).

Matriks efekat je relativan parametar. Pored toga što zavisi od vrste matriksa koji se analizira i od same pripreme uzoraka (de Sousa *et al.*, 2013), zavisi i od parametara instrumentalne analize. Promena temperature u injektoru gasnog hromatografa utiče na matriks efekat tako što više

temperature smanjuju mogućnost adsorpcije novih molekula, a ubrzavaju desorpciju adsorbovanih molekula analita sa jedne strane, a sa druge strane ubrzavaju razlaganje termolabilnih jedinjenja (Poole, 2007). Takođe, matriks efekat može da varira i za isti tip uzoraka analiziran na istom instrumentu, ukoliko prođe određeno vreme između analiza, jer je stepen čistoće injektora odnosno inserta, a time i broj dostupnih aktivnih mesta različit i zavisi od broja izvedenih analiza i nagomilavanja molekula matriksa u insertu i na početku kolone.

Mehanizam manifestacije matriks efekta u LC/MS tehnikama je vezan za jonizaciju analita u masenom spektrometru. Smatra se da matriks efekat nastaje usled istovremenog eluiranja koekstrakata i analita i posledičnog uticaja koekstrakata na efikasnost jonizacije analita, a time i na osetljivost analize (Kruve & Leito, 2013). Efikasnost jonizacije molekula analita je manja usled njihovog manjeg broja na površini kapljica u ESI izvoru u prisustvu matriksa, što se odražava kao negativan matriks efekat. Ovaj problem nije prisutan u GC/MS analizi zbog drugačijeg mehanizma jonizacije molekula analita.

Procena matriks efekta se može vršiti kroz čitav kalibracioni opseg ili za svaki kalibracioni standard. S obzirom da matriks efekat utiče na signal analita tj. odziv instrumenta, njegova procena kroz kalibracioni opseg se zasniva na praćenju osetljivosti odnosno nagiba kalibracionih krivi konstruisanih sa kalibracionim standardima pripremljenim bez matriksa – u organskim rastvaračima i pripremljenim sa matriksom - izraz [1]:

$$\text{Matriks efekat, ME (\%)} = \text{Nagib matriks krive/Nagib krive u rastvaraču} \times 100\% \quad [1]$$

Procena za svaki kalibracioni standard se vrši poređenjem signala analita u standardu pripremljenom sa matriksom sa signalom analita u standardu pripremljenom u rastvaraču – izraz [2]:

$$\text{Matriks efekat, ME (\%)} = \text{Signal matriks standarda/Signal standarda u rastvaraču} \times 100\% \quad [2]$$

Prema izračunatim vrednostima, matriks efekat se može klasifikovati u slab - do 20 %, srednji - od 20 do 50 % i jak matriks efekat - preko 50 % (Madej *et al.*, 2018). S obzirom da matriks efekat nije moguće uvek eliminisati razvijene su različite tehnike sa njegovom prevazilaženje.

Prevazilaženje matriks efekta u LC/MS tehnikama se zasniva na razblaživanju uzoraka, smanjivanjem brzine protoka mobilne faze ili čak promenom jonizacionog izvora (Kruve *et al.*, 2009). Razblaženje uzorka ili ubrizgavanje manje zapremine uzorka smanjuje broj molekula koekstrakata po jedinici površine naelektrisane kapljice u jonskom izvoru, time povećava efikasnost jonizacije i anulira matriks efekat. Ukoliko razblaženje nije efikasan način, intenzivnije prečišćavanje uzorka može biti rešenje (Bester *et al.*, 2001).

Prevazilaženje matriks efekta u GC/MS tehnici se može vršiti upotrebom protektanata analita. To su jedinjenja koja se nadmeću sa molekulima analita za aktivna mesta u hromatografskom sistemu i time ih štite od adsorpcije i termorazgradnje, a po strukturi su obično molekuli koji imaju visoku sposobnost za građenje vodoničnih veza i isparljivost sličnu analitima, uglavnom sa alkoholnim funkcionalnim grupama.

Modifikacije u pristupu kalibraciji podrazumevaju da se postigne identičnost između uzorka i kalibracionog standarda po pitanju matriksa koji vrši uticaj ili po pitanju vrste molekula na koji se vrši uticaj. U skladu sa time postoje tri načina modifikacije kalibracije u cilju prevazilaženja matriks efekta:

- 1) Metoda internog standarda ispunjava uslov identičnosti vrste molekula na koji se vrši uticaj, pa je stoga možda i najefikasniji način za kompenzaciju matriks efekta. Metoda podrazumeva unošenje poznate količine internog standarda – izotopski obeleženog analita u uzorak i u kalibracioni standard, a pretpostavka je da je matriks efekat koji deluje na obe vrste molekula – analit i izotopsko obeleženi analit – identičan što proizilazi iz sličnosti u strukturi. Ova metoda se ne koristi u svim laboratorijama, jer su izotopska jedinjenja uglavnom skupa, a takođe i teško dostupna za pojedine vrste analita.
- 2) Metoda standardnog dodatka i metoda kalibracije u matriksu ispunjavaju uslov identičnosti matriksa odnosno kod ovih metoda se kalibracioni standardi pripremaju u matriksu koji se analizira ili u reprezentativnom matriksu, tako da se očekuje ekvivalentan matriks efekat na analit u uzorku i u standardu. Metoda standardnog dodatka se primenjuje kada nije moguće obezbediti blank matriks odnosno ekstrakt matriksa bez prisustva analita – što je osnova metode kalibracije u matriksu – i pretpostavlja da matriks efekat ne zavisi od koncentracije analita. U praksi je često da se poslednji uslov ne može ispuniti, što zajedno sa velikim utroškom vremena pri pripremi standarda čini osnovne nedostatke ove metode.
- 3) Kalibracija u matriksu je najšire rasprostranjen način prevazilaženja matriks efekta. Najtačniji rezultati analize se dobijaju ukoliko su standardi pripremljeni u matriksu vrste uzorka koji se analizira, međutim u slučajevima kada se analizira veliki broj različitih tipova uzoraka moguće je standarde pripremati u reprezentativnom matriksu odnosno matriksu koji je sličan sa matriksom uzorka u pogledu sadržaja vode, sadržaja kiselina ili šećera.

Alternativu intenzivnom prečišćavanju uzoraka s ciljem eliminacije matriks efekta pružaju maseni spektrometri koji omogućavaju veću rezoluciju, kao i specifične tehnike tandemske masene spektrometrije. Problemi loše jonizacije analita u izvoru ili lošeg razdvajanja na hromatografskoj koloni ostaju kod slabije prečišćenih uzoraka. Treba težiti kombinaciji ovih načina, s obzirom da za sada i jedan i drugi imaju određene limite.

Pored toga što direktno utiče na selektivnost, osetljivost i tačnost metode, matriks efekat neposredno ima uticaj na još dva parametra validacije metode – granicu detekcije i granicu kvantifikacije, zato što postoje metode procene ova dva parametra koje uključuju nagib kalibracione krive u oblasti niskih koncentracija.

2.3.3.5 Granica detekcije i granica kvantifikacije

Granica detekcije se može definisati kao najniža koncentracija analita u uzorku koja se može detektovati, ali ne i pouzdano izmeriti; pri toj koncentraciji može se izvršiti identifikacija analita. Granica kvantifikacije je po definiciji najniža koncentracija analita koja se može meriti sa prihvatljivim odstupanjem i prihvatljivom preciznošću (Peters *et al.*, 2007). Da bi neka koncentracija bila usvojena kao granica kvantifikacije potrebno je da odstupanje između izmerene koncentracije i postavljene referentne vrednosti je bude u granicama $\pm 20\%$, dok je prihvatljiva preciznost takvih merenja 20% (Peters *et al.*, 2007).

U literaturi se sreću tri načina za procenjivanje granice detekcije i granice kvantifikacije:

- 1) Vizuelno procenjivanje je karakteristično za granicu detekcije. Instrumentalno se analiziraju uzorci koji sadrže niske i opadajuće koncentracije analita i prati se na kojoj koncentraciji se poslednji put uočava prisustvo analita – u tehnikama hromatografije to je prisustvo pika koji potiče od analita.
- 2) Za instrumentalne tehnike kod kojih se javlja pozadinski signal (tehnike hromatografije) čest pristup je poređenje signala koji proizvodi uzorak sa niskom koncentracijom analita i signala koji proizvodi blank uzorak. Ovo je tzv. metoda procene granica detekcije i kvantifikacije preko odnosa signala i šuma (*signal-to-noise*, S/N). Granica detekcije prema ovoj metodi je ona koncentracija analita u uzorku koja proizvede signal jednak trostrukoj vrednosti šuma odnosno odziva blank uzorka, dok je granica kvantifikacije ona koncentracija analita koja proizvede signal jednak desetostrukoj vrednosti šuma odnosno odziva blank uzorka.
- 3) Procena ovih parametara se može vršiti i pomoću kalibracione krive konstruisane na bazi standarda niskih koncentracija. U ovom slučaju granica detekcije (kvantifikacije) je jednaka trostrukom (desetostrukom) odnosu standardne devijacije blank uzorka ili standardne devijacije odsečka kalibracione krive i nagiba kalibracione krive. S obzirom da nagib koji figuriše u ovakvim izrazima može poticati od kalibracione krive pripremljene na bazi rastvarača ili od one na bazi proceduralnih standarda, granice detekcije i kvantifikacije se mogu klasifikovati u granice instrumentalne detekcije i instrumentalne kvantifikacije i granice detekcije i kvantifikacije same metode.

2.3.4 Literaturni pregled analitičkih metoda za određivanje ispitivanih pesticida

Standardne metode Evropskog komiteta za standardizaciju (engl. *European Committee for Normalization*, CEN) koje se primenjuju u analizi pesticida u hrani biljnog porekla (Tabela 2.3-2) su metoda EN 12393 i njeni delovi, koji obuhvataju:

- metodu ekstrakcije acetonom i sukcesivnu tečno-tečno ekstrakciju dihlormetanom i prečišćavanje na Florisilu[®]
- metodu ekstrakcije acetonom, tečno-tečno ekstrakciju sa dihlormetanom ili cikloheksanom/etilacetatom i prečišćavanje gel-propustljivom hromatografijom ili hromatografijom na silika gelu
- i metodu ekstrakcije etilacetatom i ukoliko je potrebno prečišćavanje gel-propustljivom hromatografijom.

Metoda pod oznakom EN 15662 je verzija QuEChERS metode sa citratnim solima.

Tabela 2.3-2 Pregled standarda i tehničkih izveštaja Evropskog komiteta za standardizaciju koji se odnose na analizu pesticida u hrani i analognih srpskih oznaka standarda (izvor: Institut za standardizaciju Srbije, 2020)

Oznaka EU standarda	Srpska oznaka standarda	Naziv
Metode		
EN 12393-1:2013	SRPS EN 12393-1:2014	Hrana biljnog porekla – Multirezidualne metode za određivanje ostataka pesticida pomoću GC ili LC-MS/MS - Deo 1: Opšta razmatranja
EN 12393-2:2013	SRPS EN 12393-2:2014	Hrana biljnog porekla - Multirezidualne metode za određivanje ostataka pesticida pomoću GC ili LC-MS/MS - Deo 2: Metode za ekstrakciju i prečišćavanje
EN 12393-3:2013	SRPS EN 12393-3:2014	Hrana biljnog porekla – Multirezidualne metode za određivanje ostataka pesticida pomoću GC ili LC-MS/MS - Deo 3: Određivanje i testovi potvrde
EN 15662:2018	SRPS EN 15662:2018	Hrana biljnog porekla – Višestruka metoda za određivanje ostataka pesticida primenom GC i LC zasnovanih na analizi ekstrakcije/raspodele acetonitrilom i prečišćavanju disperzivnom SPE – Modularna QuEChERS metoda
Tehnički izveštaji		
CEN/TR 15641:2007	SRPS CEN/TR 15641:2009	Analiza hrane - Određivanje ostataka pesticida LC-MS/MS metodom - Parametri tandem-masene spektrometrije
CEN/TR 16468:2013	SRPS CEN/TR 16468:2013	Analiza hrane – Određivanje ostataka pesticida GC-MS metodom – Retenciona vremena, parametri masene spektrometrije i informacije o odzivu detektora
CEN/TR 17063:2017	SRPS CEN/TR 17063:2017	Hrana biljnog porekla - Višestruka metoda za određivanje ostataka pesticida pomoću GC ili LC analize nakon ekstrakcije/raspodele acetonitrilom i prečišćavanja pomoću disperzivne SPE - Podaci o validaciji modularne QuEChERS metode

Tabela 2.3-3 pruža uvid u literaturni pregled osnovnih parametara metoda za određivanje pirimetanila, ciprodinila, trifloksistrobina, bifentrina i boskalida u jabukama. Veliki deo metoda zastupljenih u literaturi su standardne metode. U konsultovane 22 publikacije najzastupljenije metode pripreme jabuka za analizu su QuEChERS metoda i njene modifikacije (6/20) i metode ekstrakcije rastvaračima (5/20). Slede ih kombinacija ekstrakcije rastvaračima i SPE prečišćavanje (5/20), metoda analize koja ne podrazumeva posebnu pripremu jabuka za analizu (3/20), tehnike mikroekstrakcije npr. SPME (2/20) i disperzna ekstrakcija u čvrstoj fazi (1/20).

QuEChERS metoda je aktuelna i uvek je slede hromatografske tehnike povezane sa tehnikama masene spektrometrije. Od 6 primenjenih QuEChERS metoda 3 spadaju u standardne metode (citratna i acetatna verzija).

Metode ekstrakcije rastvaračima se ređe sreću u publikacijama novijeg datuma, sem pri upotrebi voltametrije kao detekcione tehnike; potiskuju se tehnikama mikroekstrakcije zbog njihove ekonomičnosti u pogledu utroška male količine rastvarača.

Kombinacija ekstrakcije rastvaračima i SPE prečišćavanje – ekstrakcija acetonom, pa tečno-tečno ekstrakcija dihlormetanom sa pratećim prečišćavanjem na Florisilu® je standardna metoda EN 12393; u pregledanim publikacijama je imala namenu u ispitivanju trenda razlaganja pesticida nakon aplikacije u realnim uslovima (Piechowicz *et al.*, 2016; Podbielska *et al.*, 2017, 2018) ili tokom skladištenja jabuka (Sadlo *et al.*, 2016a) ili u ispitivanju korelacije između nanešene doze i detektovane količine pesticida u zrelim plodovima jabuke (Sadlo *et al.*, 2016b).

Od svih sagledanih metoda pripreme jabuka za analizu metode koje ne uključuju posebnu pripremu su idealne za skrining metode (engl. *screening*) (Edison *et al.*, 2011; Farre *et al.*, 2013; Kern *et al.*, 2014). Mogućnost eliminisanja pripreme uzorka kod ovih metoda potiče od superiornosti korišćene instrumentalne tehnike – kombinacije DART jonizacije i masenih analizatora visoke preciznosti i moći razlaganja.

U pregledanim publikacijama hromatografske tehnike kao sastavni deo primenjenih instrumentalnih tehnika su preovlađujuće (15/20); gasna hromatografija (10/20) se sreće češće od tečne hromatografije (4/20), pri čemu jedna publikacija prezentuje korišćenje obe tehnike (Kim *et al.*, 2016).

Među tehnikama detekcije preovlađuje masena spektrometrija (12/20). Sledi je korišćenje NPD i μ ECD detektora (4/20), nezavisno ili u međusobnoj kombinaciji kao i DAD detektora (1/20) i paralelna upotreba DAD detektora i masene spektrometrije (1/20). Voltometrija (2/20) je našla primenu u analizi pesticida iz grupe anilinopirimidina.

Matriks efekat se kao parametar validacije metode procenjuje u dve publikacije (Liu *et al.*, 2010; Liang *et al.*, 2013). Iako je procenjeno da je zanemarljiv, kvantifikacija je vršena putem kalibracije u matriksu, kao i u većini ostalih metoda (Lacassie *et al.*, 1998; Huskova *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2011; Sadlo *et al.*, 2016b; Podbielska *et al.*, 2018).

Kriterijumi neke skrining metode bi bili što manji broj koraka u pripremi uzorka, upotreba ekonomičnih reagenasa i kratko vreme analize. U pregledu literature utvrđeno je da je 19 metoda razvijeno sa ciljem monitoringa pesticida odnosno analize pesticida radi procene kontaminacije jabuka. Među tim metodama kriterijume prave skrining metode ispunjavaju 3 metode koje uključuju upotrebu DART/MS analize.

Tabela 2.3-3 Literaturni pregled metoda za određivanje predmetnih pesticida u jabukama i njihovih osnovnih parametara

Analiti	Priprema uzorka	Instrumentalna tehnika	Tranzicije/joni, m/z	Tačnost (preciznost), %	Opseg linearnosti	LOD	LOQ	Referenca
61 pesticid uključujući pirimetanil, ciprodinil, trifloksistrobin, bifentrin	Modifikovana QuEChERS metoda – način usitnjavanja uzorka	GC/MS, SIM režim	Pirimetanil: 198, 199, 200 Ciprodinil: 224, 225 Trifloksistrobin: 116, 186, 377 Bifentrin: 181, 165, 166	nije naznačeno (10-20)	1 - 500 ngmL ⁻¹ (1 - 500 µgkg ⁻¹)	0,80 ngmL ⁻¹ (trifloksistrobin) - 3,6 ngmL ⁻¹ (pirimetanil)	2,66 ngmL ⁻¹ (trifloksistrobin) - 11,99 ngmL ⁻¹ (pirimetanil)	Huskova <i>et al.</i> , 2008
boskalid i piraklostrobin	Kombinacija dvostruke ekstrakcije rastvaračem i SPE prečišćavanja	GC/NPD	/	Od 70 do 120 (<20)	0,01 - 1 mgkg ⁻¹	nije naznačeno	korespondira najnižem nivou spajkovanja	Podbielska <i>et al.</i> , 2018
				Od 79 do 81 (38-115)				
140 pesticida uključujući svih 5 predmetnih pesticida	Brisanje površine jabuka poliuretanskom penom i njena analiza	DART/HRMS (Orbitrap)	Protonovani molekularni joni [M+H] ⁺		nije naznačeno	nije naznačeno	nije naznačeno	Edison <i>et al.</i> , 2011

Analiti	Priprema uzorka	Instrumentalna tehnika	Tranzicije/joni, <i>m/z</i>	Tačnost (preciznost), %	Opseg linearnosti	LOD	LOQ	Referenca
320 pesticida, uključujući svih 5 ispitivanih pesticida	Citratna QuEChERS metoda	GC-MS/MS (bifentrin) i LC-MS/MS (ciprodinil, pirimetanil, trifloksistrobin, boskalid), MRM režim	Boskalid: 343,1→307,1 i 343,1→140,0 Ciprodinil: 226,2→77,1 i 226,2→93,1 Pirimetanil: 200,1→77,1 i 200,1→181,1 Trifloksistrobin: 409,2→186,1 i 409,2→206,1 Bifentrin: 181→166 i 181→167	Od 93,5 (1,0) trifloksistrobin (200 µgkg ⁻¹) do 106,1 (6,0) boskalid (50 µgkg ⁻¹)	0,005-100 µgL ⁻¹	od 0,05 (trifloksistrobin) do 5 µgkg ⁻¹ (ciprodinil)	od 0,1 (trifloksistrobin) do 7 µgkg ⁻¹ (ciprodinil)	Kim <i>et al.</i> , 2016

Tabela 2.3-3. Nastavak

Analiti	Priprema uzorka	Instrumentalna tehnika	Tranzicije/joni, <i>m/z</i>	Tačnost (preciznost), %	Opseg linearnosti	LOD	LOQ	Referenca
boskalid, trifloksistrobin i još 2 pesticida	Kombinacija dvostruke ekstrakcije rastvaračem i SPE prečišćavanja	GC-MS/MS, MRM režim	nije naznačeno	Od 106,2 (4,5) (boskalid, 0,01 mgkg ⁻¹) do 112,8 (2,2) (trifloksistrobin, 0,5mgkg ⁻¹)	0,005 – 0,5 mgkg ⁻¹	nije naznačeno	0,01 mgkg ⁻¹ (boskalid i trifloksistrobin)	Sadlo <i>et al.</i> , 2016a
krezoksimitil i boskalid	- tečno-čvrsto ekstrakcija acetonom - tečno-tečno ekstrakcija dihlormetanom	GC/MS, SIM režim	140 i 342	91,1 (11,5) (0,1 mgkg ⁻¹) 105,1 (6,4) (0,5mgkg ⁻¹)	0,05 – 5 mgL ⁻¹	0,015 mgkg ⁻¹	0,05 mgkg ⁻¹	Liu <i>et al.</i> , 2010
17 pesticida uključujući ciprodinil, pirimetanil, boskalid	Acetatna i citratna QuEChERS metoda	LC-MS/MS, MRM režim	Boskalid: 342,9→307 i 342,9→139,9 Ciprodinil: 226,0→93,0 i 226,0→108,0 Pirimetanil: 200,0→107,0 i 200,0→82,0	Od 65,2 (0,02 mgkg ⁻¹ , pirimetanil, citratna metoda) do 136,8 (0,2 mgkg ⁻¹ , ciprodinil, citratna metoda)	Nije naznačeno	Nije naznačeno	Nije naznačeno	Christia <i>et al.</i> , 2015

Tabela 2.3-3. Nastavak

Analiti	Priprema uzorka	Instrumentalna tehnika	Tranzicije/joni, m/z	Tačnost (preciznost), %	Opseg linearnosti	LOD	LOQ	Referenca
boskalid, ciprodinil, trifloksistrobin i još 3 pesticida	Kombinacija dvostruke ekstrakcije rastvaračem i SPE prečišćavanja	GC/NPD (ciprodinil) GC/ μ ECD (boskalid i trifloksistrobin)	/	Od 86,5 (2,3) (0,011 mgkg ⁻¹ boskalid) do 98,1 (2,8) (0,009 mgkg ⁻¹ trifloksistrobin)	0,008-0,211 mgkg ⁻¹ (boskalid) 0,011-0,269 mgkg ⁻¹ (ciprodinil) 0,007-0,171 mgkg ⁻¹ (trifloksistrobin)	Nije naznačeno	0,01 mgkg ⁻¹ (boskalid, ciprodinil, trifloksistrobin)	Sadlo <i>et al.</i> , 2016b
bifentrin i još 8 pesticida	Ekstrakcija smešom rastvarača	GC/MS, SIM režim	181, 165, 166	61,74 (19,2) (0,1 mgkg ⁻¹) 82,49 (11,0) (0,5 mgkg ⁻¹) 60,86 (6,7) (2 mgkg ⁻¹)	0,05 - 5,0 mgkg ⁻¹	0,01 mgkg ⁻¹	0,02 mgkg ⁻¹	Lacassie <i>et al.</i> , 1998
ciprodinil	Ceđeni sok jabuke pomešan sa 10 mL smeše aceton:voda (50:50)	Voltometrija	/	101,0 (3,56) (1,0 μ gmL ⁻¹) 100,8 (1,42) (2,5 μ gmL ⁻¹)	0,25 - 4,0 mgL ⁻¹	0,076 mgL ⁻¹	0,25 mgL ⁻¹	Ayhan & Inam, 2020
azoksistrobin i trifloksistrobin	Disperzija matriksa u čvrstoj fazi (MSPD)	GC/ μ ECD	/	90,0 (7,86) (0,02 μ gg ⁻¹) 106,1 (2,87) (0,2 μ gg ⁻¹)	0,02 - 1,0 ng	0,01 mgkg ⁻¹	nije naznačeno	Giza & Sztwiertnia, 2003

Tabela 2.3-3. Nastavak

Analiti	Priprema uzorka	Instrumentalna tehnika	Tranzicije/joni, m/z	Tačnost (preciznost), %	Opseg linearnosti	LOD	LOQ	Referenca
pirimetanil	Ekstrakcija smešom etilacetat:heksan 1:1	GC/NPD	/	96,0 (4,2) (0,2 mgkg ⁻¹) 95,0 (2,4) (1 mgkg ⁻¹)	0,05 - 2,0 mgkg ⁻¹	0,1 mgkg ⁻¹	0,1 mgkg ⁻¹	Navickiene & Ribeiro, 2001
pirimetanil	Ekstrakcija smešom etilacetat:heksan 50:50, uparavanje pa rastvaranje u etanolu	Voltometrija	/	104,0 (3,2) (2 mgkg ⁻¹) 97,1 (1,8) (8 mgkg ⁻¹)	10 - 80 μM	1,04 μM (0,21 mgkg ⁻¹)	nije naznačeno	Garrido <i>et al.</i> , 2016
dietofenkarb i pirimetanil	Mikroekstrakcija pospešena ultrazvukom i surfaktantom (UASEME)	LC-DAD/ESI-MS, SIM režim	199,9 107,7	86,0 (5,8) (0,1 μg ⁻¹) 94,0 (5,1) (1 μg ⁻¹)	0,05 - 2000 μg ⁻¹	0,01 μg ⁻¹	nije naznačeno	Cheng <i>et al.</i> , 2011
pirimetanil, ciprodinil i mepanipirim i metabolit	Modifikovana QuEChERS metoda (1% sirćetne u acetonitrilu)	UHPLC-MS/MS, MRM režim	Pirimetanil: 200→107 i 200→82 Ciprodinil: 226→93 i 226→108	Pirimetanil: 99,2 (6,9) (0,002 mgkg ⁻¹) 89,1 (7,8) (2 mgkg ⁻¹) Ciprodinil: 93,6 (12,5) (0,002 mgkg ⁻¹) 88,3 (9,8) (2 mgkg ⁻¹)	0,002 - 2 mgkg ⁻¹	0,1 μgkg ⁻¹ (pirimetanil) 0,18 μgkg ⁻¹ (ciprodinil)	0,35 μgkg ⁻¹ (pirimetanil) 0,58 μgkg ⁻¹ (ciprodinil)	Liang <i>et al.</i> , 2013

Tabela 2-3.3. Nastavak

Analiti	Priprema uzorka	Instrumentalna tehnika	Tranzicije/joni, m/z	Tačnost (preciznost), %	Opseg linearnosti	LOD	LOQ	Referenca
dietofenkarb i pirimetanil	Ekstrakcija pospešena mikrotalasima (MAE) pa disperzivna tečno-tečno mikroekstrakcija sa solidifikacijom na niskoj temperaturi (DLLME-SFO)	HPLC/DAD	/	101,3 (pulpa) 83,8 (kora)	8 - 400 μgkg^{-1}	1,4 μgkg^{-1} (pulpa) 1,5 μgkg^{-1} (kora)	nije naznačeno	Zhou <i>et al.</i> , 2011
ciprodinil i još 15 pesticida	Acetatna QuEChERS metoda	GC/APCI-TOF	226,1344; 93,0578	111,0 (8,0) (0,01 mgkg^{-1}) 90,0 (3,0) (0,1 mgkg^{-1})	10 – 250 μgL^{-1}	nije naznačeno	0,01 mgkg^{-1}	Cervera <i>et al.</i> , 2014
pirimetanil, ciprodinil i još 18 pesticida	Modifikovana Schenck-ova metoda/MSPD/QuEChERS/Modifikovana QuEChERS metoda	GC/MS	198,199 224, 225	70 – 110% (<20%)	nije naznačeno	nije naznačeno	Pirimetanil: 0,07 (ostale metode) i 0,15 μgkg^{-1} (Kvečers) Ciprodinil: 0,11 (Schenck) – 0,65 μgkg^{-1} (MSPD)	Hercegova <i>et al.</i> , 2006

Tabela 2-3.3. Nastavak

Analiti	Priprema uzorka	Instrumentalna tehnika	Tranzicije/joni, m/z	Tačnost (preciznost), %	Opseg linearnosti	LOD	LOQ	Referenca
pirimetanil i još 12 ksenobiotika	Bez pripreme – direktno izlaganje kore jonizatoru	DART/MS	200, 117	nije naznačeno	nije naznačeno	nije naznačeno	nije naznačeno	Farre <i>et al.</i> , 2013
trifloksistrobin, pirimetanil, ciprodinil i još 159 pesticida	Brisanje površine jabuka poliuretanskom penom i njena analiza	DART/MS	409,137; 200,118; 226,133	nije naznačeno	nije naznačeno	nije naznačeno	nije naznačeno	Kern <i>et al.</i> , 2014
Ciprodinil, trifloksistrobin, boskalid, piraklostrobin i kaptan	Kombinacija dvostruke ekstrakcije rastvaračem i SPE prečišćavanja	GC/NPD (ciprodinil) GC/ μ ECD (boskalid i trifloksistrobin)	/	nije naznačeno	nije naznačeno	nije naznačeno	nije naznačeno	Piechowicz <i>et al.</i> , 2016
Boskalid i još 6 pesticida	Kombinacija dvostruke ekstrakcije rastvaračem i SPE prečišćavanja	GC/NPD i GC/ μ ECD	/	70-120 %	0,01 – 1,0 mgkg ⁻¹	nije naznačeno	0,01 mgkg ⁻¹	Podbielska <i>et al.</i> , 2017

3 EKSPERIMENTALNI RAD

3.1 Plan i program eksperimentalnog rada

Osnovni cilj istraživanja je bio razvoj skrining metoda za analizu odabranih pesticida u jabukama, koje bi predstavljale alternativu standardizovanim metodama analize. Modifikacija u odnosu na standardizovane metoda se ogleda pre svega u segmentu ploda jabuke koji je predmet analize.

S obzirom da kora jabuke ima retencione ili akumulacione sposobnosti – uz pretpostavku da poseduje retencioni kapacitet i prema predmetnim pesticidima – može se smatrati indikatorom kontaminacije pesticidima. Iz tog razloga skrining metode su razvijane na bazi kore jabuke kao matriksa. Parametri validacije su procenjivani za koru različitih sorti jabuka, s obzirom da se njen sastav razlikuje u zavisnosti od sorte, pa se donekle mogu smatrati različitim matriksima. Odabir sorti je izvršen u skladu sa njihovom zastupljenošću na domaćem tržištu odnosno komercijalnim značajem: korišćene su jabuke sorti Ajadared, Zlatni Delišeš i Greni Smit.

Implementirani su instrumenti različitih karakteristika i performansi u cilju sagledavanja efikasnosti njihove primene u domenu skrininga. Razvijeni su postupci pripreme uzorka koji su kompatibilni sa korišćenom instrumentalnom tehnikom, prateći načelo ekonomičnosti po pitanju vremena analize i korišćenih reagenasa.

Izvršena je uporedna analiza parametara validacije razvijenih metoda i parametara validacije različitih verzija QuEChERS metode (standardizovane metode).

Razvijena analitička metoda koja uključuje instrumentalnu tehniku gasne hromatografije primenjena je u ispitivanju prodora predmetnih pesticida kroz koru ploda jabuke odnosno retencionog kapaciteta kore.

Razvijena analitička metoda koja uključuje instrumentalnu tehniku gasne i tečne hromatografije primenjene su u skriningu uzoraka sa tržišta.

3.2 Instrumenti

U razvoju metoda korišćeni su sledeći instrumenti i varijabilni delovi instrumenata (Slika 3.2-1 - Slika 3.2-3):

Instrumenti

1 Autosempler *HP 7683* (Hewlett-Packard, USA)

sa G2612A ALS interfejs pločom, G2613A injektorom (S/N US02315013) i G2614A držačem viala (S/N CN40627846) kapaciteta 100 viala.

2 Autosempler *Surveyor* (Thermo Finnigan, USA)

S/N 55956, sa 5 držača viala (A-E) kapaciteta svakog 40 viala, grejačem za kolonu (5-95 °C) i kontrolom temperature viala (0-60 °C).

3 Autosempler *Accela* (Thermo Scientific, USA)

S/N 80812, sa 5 držača viala (A-E) kapaciteta svakog 40 viala, grejačem za kolonu (5-95 °C) i kontrolom temperature viala (0-60 °C).

4 Gasni hromatograf *HP 6890* (Hewlett-Packard, USA)

S/N DE00021653, sa *split/splitless* inletom, *splitless* lajnerom (P/N 5190-5112), kapilarnim tipom kolone i pećnicom sa opsegom radne temperature 60-350 °C.

5 MS pumpa *Surveyor* (Thermo Scientific, USA)

S/N 61670, kvaternarna *low-pressure* pumpa (radni opseg 40-400 bar), sa ugrađenim sistemom za degasiranje eluata i dampiranje pulsacija i sa opsegom brzine protoka eluenta od 0,20 μLmin^{-1} (izokratno)/25 μLmin^{-1} (gradijentno) do 2000 μLmin^{-1} .

6 MS pumpe *Accela 1250* (Thermo Scientific, USA)

S/N 700285 i 81834, kvaternarne *low-pressure* pumpe (radni opseg 10-1000 bar), sa ugrađenim sistemom za degasiranje eluata i dampiranje pulsacija i sa opsegom brzine protoka eluenta od 1,00 μLmin^{-1} (izokratno)/50 μLmin^{-1} (gradijentno) do 1000 μLmin^{-1} .

7 Maseni spektrometar *HP 5973* (Hewlett-Packard, USA)

S/N DE80310294, sa jonskim izvorom sa elektronskom jonizacijom (engl. *electron impact ionization, EI*) i sa transmisionim kvadrupolom (*single quadrupole*).

8 Maseni spektrometar *LCQ Advantage* (Thermo Finnigan, USA)

S/N LAD00113, sa pumpom za uvođenje uzorka putem šprica, API jonskim izvorom (elektrosprej ili APCI) i sa 3D jonskim trapom.

9 Maseni spektrometar *LTQ XL/LTQ Orbitrap* (Thermo Electron Corporation, USA)

S/N 01281B, sa pumpom za uvođenje uzorka putem šprica, API jonskim izvorom (elektrosprej ili APCI) i sa kombinacijom linearnog jonskog trapa i Orbitrapa.

10 Maseni spektrometar *TSQ Quantum Ultra* (Thermo Electron Corporation, USA)

S/N TQU01162, sa pumpom za uvođenje uzorka putem šprica, API jonskim izvorom (elektrosprej ili APCI) i sa trostrukim kvadrupolom.

Varijabilni delovi jonskih izvora

1 ESI proba

P/N 97144-60060, sa 26-gauge iglom (P/N 00950-00990) i *fused-silica tubing*-om 0,10 mm ID × 0,19 mm OD

2 (Heated) ESI proba (HESI)

P/N 97055-60140 sa metalnom 26-gauge iglom (P/N 97055-20273) i *fused-silica tubing*-om 0,10 mm ID × 0,19 mm OD (P/N 00106-10499).

3 Heated ESI proba II (HESI II)

P/N OPTON-20037 sa 32-gauge needle insertom (OPTON-53010) koji sadrži ESI iglu i unutar nje metalnu iglu.

4 APCI proba

P/N OPTON-20012 sa mlaznicom (P/N 97055-60090) koja sadrži *fused-silica tubing* 0,15 mm ID × 0,39 mm OD (00106-10498) i sa *corona* iglom (P/N 70005-98033).

Autosempler Surveyor



MS pumpa Surveyor



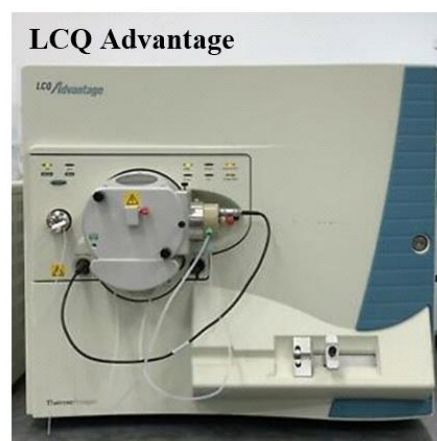
Autosempler Accela



MS pumpa Accela



Slika 3.2-1 Tipovi autosempleta i MS pumpi korišćenih u okviru istraživanja



TSQ Quantum Ultra

LTQ XL + LTQ Orbitrap



Slika 3.2-2 Tipovi masenih spektrometara korišćenih u okviru istraživanja



Slika 3.2-3 Tipovi varijabilnih delova API jonskih izvora (varijante ESI probe (1-3) i APCI proba (4))

Finalne konfiguracije instrumenata

CONF-1

Konfiguracija uključuje Autosempler *HP 7683* (Hewlett-Packard, USA), Gasni hromatograf *HP 6890* (Hewlett-Packard, USA) i Maseni spektrometar *HP 5973* (Hewlett-Packard, USA).

CONF-2

Konfiguracija uključuje Autosempler *Surveyor* (Thermo Finnigan, USA), MS pumpe *Accela 1250* (Thermo Scientific, USA) i Maseni spektrometar *LTQ XL/LTQ Orbitrap* (Thermo Electron Corporation, USA) sa (*Heated*) ESI proba (HESI) i APCI proba.

CONF-3

Konfiguracija uključuje MS pumpa *Surveyor* (Thermo Scientific, USA) i Maseni spektrometar *LCQ Advantage* (Thermo Finnigan, USA) sa *ESI proba*.

CONF-4

Konfiguracija uključuje Autosempler *Accela* (Thermo Scientific, USA), MS pumpe *Accela 1250* (Thermo Scientific, USA) i Maseni spektrometar *TSQ Quantum Ultra* (Thermo Electron Corporation, USA) sa *Heated* ESI proba II (HESI II).

3.3 Potrošni materijal i pomoćni instrumenti

Pesticidi. Primarni rastvori svakog od analitičkih standarda pesticida (*single pesticide solution, SPP*) napravljeni su odmeravanjem potrebne mase čvrstih pesticida i njihovim rastvaranjem u etanolu; koncentracija rastvora je bila 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Primarni rastvor smeše pet analitičkih standarda pesticida (*multi pesticide solution, MPP*), koji su korišćeni u svim fazama razvoja metode, napravljeni su odmeravanjem alikvota svakog od SPP rastvora i njihovim mešanjem u etanolu; koncentracija rastvora je bila 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. U zavisnosti od potrebe, MPP rastvor je dalje razblaživan do rastvora potrebnih koncentracija. Sve varijante primarnih rastvora su tokom razvoja metode čuvane na $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ u dobro zatvorenim staklenim vialama.

Primarni vodeni rastvor komercijalnih preparata pesticida, koji je korišćen u ispitivanju prodora pesticida kroz koru, napravljen je rastvaranjem potrebne mase/zapremine komercijalnih preparata u 500 mL vode pre početka ispitivanja; koncentracija svake aktivne materije u rastvoru je bila 1000 mg L^{-1} .

Tabela 3.3-1 predstavlja spisak pesticida korišćenih u okviru istraživanja i njihove karakteristike.

U sastav korišćenih komercijalnih preparata, pored aktivnih materija ulaze i sledeći aditivi: Cormax[®] - natrijum-polinaftalenformaldehid sulfonat (10%), natrijum-dodecilbenzen sulfonat (2%); Botrystock[®] - lignin, reakcioni proizvodi sa natrijum-bisulfitom i formaldehidom (1-20%); Zato 50 WG[®] - natrijum-dibutil naftalen sulfonska kiselina (1-25%), dijatomejska zemlja (>1%); Talstar 10 EC[®] - petroelum (79,8%); Bosco[®] - amonijum-sulfat (<15%), natrijum-sulfat (<5%).

Sorbenti.

Tabela 3.3-2 sadrži podatke o sorbentima korišćenim u okviru istraživanja.

Soli i kiseline.

Tabela 3.3-3 sadrži podatke o solima i kiselinama korišćenim u okviru istraživanja.

Rastvarači i reagensi.

Tabela 3.3-4 sadrži podatke o rastvaračima i ostalim reagensima korišćenim u okviru istraživanja.

Ostala potrošna oprema. Tabela 3.3-5 sadrži podatke o ostaloj potrošnoj opremi korišćenoj u okviru istraživanja.

Tabela 3.3-1. Korišćeni pesticidi

Pesticidi	Proizvođač	Aktivna materija (količina)
Standardi		
Pirimetaniil	AccuStandard®, SAD	/
Ciprodinil	AccuStandard®, SAD	/
Trifloksistrobin	Sigma-Aldrich®, Nemačka	/
Bifentrin	Sigma-Aldrich®, Nemačka	/
Boskalid	Sigma-Aldrich®, Nemačka	/
Komercijalni preparati		
Botrystock®	Stockton, Beograd	pirimetaniil (300 gL ⁻¹)
Cormax®	Agromarket, Kragujevac	ciprodinil (750 gkg ⁻¹)
Zato 50 WG®	Bayer, Beograd	trifloksistrobin (500 gkg ⁻¹)
Talstar 10 EC®	Galenika Fitofarmacija, Zemun	bifentrin (100 gL ⁻¹)
Bosco®	Agromarket, Kragujevac	boskalid (500 gkg ⁻¹)

Tabela 3.3-2 Korišćeni sorbenti

Sorbenti	Proizvođač	Karakteristike
Sorbent na bazi magnezijum-silikata	LGC Promochem, Nemačka	Florisil®, 60-100 meša
Sorbent na bazi C18	UCT, SAD	SELECTRASORB™
Primarni i sekundarni amin (PSA)	UCT, SAD	SELECTRASORB™

Tabela 3.3-3 Korišćene soli i kiseline

Soli i kiseline	Proizvođač	Karakteristike
Amonijum-formijat (AMF)	Carlo Erba, Italija	>= 98%
Magnezijum-sulfat, anh.	Zdravlje Leskovac, Srbija	99%
Mravlja kiselina	Sigma-Aldrich®, Nemačka	98-100%
Sirćetna kiselina	Sigma-Aldrich®, Nemačka	99,8%

Tabela 3.3-4 Korišćeni rastvarači i ostali reagensi

Reagensi	Proizvođač	Karakteristike
Heksan	Carlo Erba, Italija	HPLC čistoća
Metanol	J.T. Baker, SAD	HPLC čistoća/Eluent D
Etanol	Carlo Erba, Italija	HPLC čistoća
Acetonitril	J.T. Baker, SAD	HPLC čistoća/Eluent B
Dejonizovana voda	Carlo Erba, Italija	HPLC čistoća
0,30 % vodeni rastvor mravlje kiseline + 0,010 % vodeni rastvor amonijum-formijata	/	/
0,30 % vodeni rastvor mravlje kiseline + 0,050 % vodeni rastvor amonijum-formijata	/	/
Dibutil-adipat, DBA	Sigma-Aldrich Chemie®, Nemačka	96%
Helijum	Messer, Tehnogas	5.0
Argon	Messer, Tehnogas	5.0
Azot	Generator azota	analytical grade

Tabela 3.3-5 Ostala potrošna oprema

Sitna oprema	Proizvođač	Karakteristike
GC kolona	SGE, Australija	SGE 25QC2/BPX5 0.25, nepolarna, 25 m×0.22 mm×0.25 μm
HPLC kolona 1	Phenomenex, SAD	Prodigy™ ODS-3V, 5 μm, 100 Å, 150mm×4,6mm
HPLC kolona 2	Thermo Fisher Scientific, SAD	Hypersil GOLD™, 3 μm, 175 Å, 150mm×2,1mm
HPLC kolona 3	Agilent Technologies, SAD	Zorbax RRHD SB-18, 1,8 μm, 80 Å, 100mm×2,1mm
HPLC kolona 4	Waters, SAD	SunFire™ C18, 3,5 μm, 100 Å, 150mm×2,1 mm
Špric	Unimetrics, SAD	Zapremine 500 μL
Špric	Unimetrics, SAD	Zapremine 250 μL
Mikrofilter	Membrane solutions, SAD	Veličine pora 0,22 μm

QuEChERS paketi

Paket 1: paket za ekstrakciju (0,50 g anhidrovanog natrijum-acetata i 2,00 g anhidrovanog magnezijum-sulfata)

Paket 2: paket za *d*-SPE (50 mg PSA, 50 mg C18 i 150 mg anhidrovanog magnezijum-sulfata).

Paket 3: paket za ekstrakciju (4 g anhidrovanog magnezijum-sulfata, 1 g natrijum-hlorida, 1 g trinatrijum-citrata dihidrata i 0,5 g dinatrijum-hidrogencitrata seskvihidrata)

Paket 4: paket za *d*-SPE (25 mg PSA/mL ekstrakta, i 150 mg anhidrovanog magnezijum-sulfata/mL ekstrakta).

Paket 5: paket za *d*-SPE (150 mg PSA, 150 mg C18 i 900 mg anhidrovanog magnezijum-sulfata).

Paket 6: paket za *d*-SPE (400 mg PSA, 400 mg C18, 45 mg GCB i 1200 mg anhidrovanog magnezijum-sulfata).

Pomoćni instrumenti. U okviru istraživanja korišćeni su sledeći pomoćni instrumenti:

- Analitička vaga – Sartorius BP110S, Nemačka;

- Vaga (acc. ± 0.01 g) – *KB 2000-2N, KERN*, Nemačka;
- Kuhinjski blender – *TEFAL 0.9L BL142A*; Francuska;
- Ljuštilica za jabuke, Kina;
- Sistem za SPE prečišćavanje – *Waters[®]*, SAD;
- Centrifuga – *Jouan C4i*, Thermo Scientific, SAD;
- Uparivač – *TurboVap[®] LV*, Zymark, SAD;
- Homogenizator – *Vorteks-Genie[®]2*, Scientific Industries, SAD;
- Multimetar - *sensION[™] MM374*, ShangHai Shilu Instruments, Kina.
- Generator azota – *Genius SQ 24*, PEAK Scientific Instruments, UK.

3.4 Instrumentalna ispitivanja

Poglavlje sadrži opis procedura u okviru ispitivanja performansi primenjenih instrumentalnih konfiguracija u odnosu na tagretirane analite.

3.4.1 Ispitivanja na instrumentalnoj konfiguraciji CONF-1

Tabele 3.4-1 i 3.4-3 objedinjuju konstantne i promenljive parametre instrumentalne analize, kao i parametre u okviru primenjivanih instrumentalnih metoda. Beleženje i obrada podataka su vršene na ChemStation[®] softveru (*D.02.00.275*, Hewlett-Packard, SAD).

Tabela 3.4-1 Konstantni parametri instrumentalne analize

Parametri injektora
Zapremina injektovanog uzorka - 1 μ L
Temperatura – 250 °C
<i>Liner</i> – jednokonusni sa staklenom vunom, dim. 78,5 mm (dužina); 4 mm (unutrašnji prečnik)
Režim rada – <i>splitless</i>
Purge time – 1 min
Noseći gas
Helijum
Brzina protoka - 1.0 mLmin ⁻¹
Parametri kolone
Kapilarna kolona
Tip - SGE 25QC2/BPX5 0.25, nepolarna
Dimenzije - 25 m \times 0.22 mm \times 0.25 μ m
Parametri masenog spektrometra
Temp. interfejsa - 280°C
Temp. jonskog izvora - 230°C
Energija jonizacije – 70 eV
Temp. kvadrupola - 150°C

Tabela 3.4-2 Promenljivi parametri instrumentalne analize

Temperaturni režimi rada pećnice	
<i>ovenRGM-1</i>	90 °C (1 min) - 220 °C (1 min), 20 °C min ⁻¹ ; 220 °C – 280 °C (4 min), 5 °C min ⁻¹ ; <i>post run</i> 280 °C - 300°C (2 min) *
<i>ovenRGM-2</i>	90 °C (0 min) - 280 °C (4 min), 20 °C min ⁻¹ ; <i>post run</i> 280 °C - 300°C (2 min) **
Režimi rada analizatora	
<i>quadRGM-1</i>	Selected Ion Monitoring (SIM)
<i>quadRGM-2</i>	Scan

*trajanje analize – 26,50 min
** trajanje analize – 15,50 min

Tabela 3.4-3 Parametri razvijenih instrumentalnih metoda

Instrumentalna metoda	Konstantni parametri	Promenljivi parametri
MET-GC-IN-1		<i>ovenRGM-1</i> , <i>quadRGM-2</i>
MET-GC-IN-2		<i>ovenRGM-2</i> , <i>quadRGM-2</i>
MET-GC-IN-3	Tabela 3.4-1	<i>ovenRGM-1</i> , <i>quadRGM-1</i>
MET GC-IN-4		<i>ovenRGM-2</i> , <i>quadRGM-1</i>

Parametri hromatografskog razdvajanja. Parametri razdvajanja analita su utvrđeni za klasičan temperaturni režim rada pećnice sa dve temperaturne rampe (*ovenRGM-1*, Tabela 3.4-2) i izmenjeni režim rada pećnice sa jednom temperaturnom rampom (*ovenRGM-2*, Tabela 3.4-2). Temperaturni režim rada pećnice je menjan s ciljem skraćivanja trajanja analize.

Uticaj promene temperaturnog režima rada pećnice na razdvajanje analita je ispitano uporednom analizom standarda smeše pesticida koncentracije 5,00 µgmL⁻¹ instrumentalnim metodama MET-GC-IN-3 i MET GC-IN-4.

Karakterizacija analita. Za postupke karakterizacije analita pripremljeni su rastvori svakog od standarda pesticida visoke čistoće, kao i njihove smeše u heksanu u koncentraciji od 5,00 µgmL⁻¹ koji su analizirani instrumentalnom metodom MET-GC-IN-1.

Osetljivost. Ispitivanje osetljivosti je vršeno u *quadRGM-1* i *quadRGM-2* režimima rada analizatora (Tabela 3.4-2) uporednom analizom serije standarda smeše pesticida u heksanu, koncentracija 0,50; 2,50; 5,00; 7,50 i 10,00 µgmL⁻¹ instrumentalnim metodama MET-GC-IN-2 i MET GC-IN-4.

3.4.2 Ispitivanja na instrumentalnoj konfiguraciji CONF-2

Karakterizacija analita. Za postupke karakterizacije analita pripremljeni su rastvori svakog od standarda pesticida visoke čistoće, kao i njihove smeše koncentracije 5,00 µgmL⁻¹ u metanolu ili 0,050% metanolnom rastvoru AMF-a. Rastvori su analizirani ubrizgavanjem u ESI izvor putem špric pumpe spektrometra.

Parametri hromatografskog razdvajanja. Poređene su performanse tri HPLC kolone različitih karakteristika. Kolone su se razlikovale u vrsti punjenja, promeru čestica i dimenzijama (Tabela 3.3-5, str. 84). Poređene su performanse nekoliko eluenata (Tabela 3.3-4, str. 84) odnosno performanse njihovih kombinacija. Za postupke ispitivanja performansi kolona

u pogledu razdvajanja analita, razvijenog pritiska i ukupnog trajanja analize, pripremljen je rastvor smeše pesticida koncentracije $50,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ u 0,050 % rastvoru AMF-a u metanolu, koji je analiziran metodama prikazanim u tabeli 3.4-5.

Nakon odabira radne kolone, vršena je optimizacija parametara rada i to gradijenta sastava eluenta, gradijenta brzine protoka eluenta i procenta AMFa u mobilnim fazama. Rastvor smeše pesticida koncentracije $50,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ u 0,050 % rastvoru AMFa u metanolu u okviru optimizacije rada na odabranoj koloni (parametar optimizacije – gradijent sastava eluenta) analiziran je metodama MET-LTQ-23 i MET-LTQ-27 (Tabela 3.4-6). Rastvor smeše pesticida koncentracije $15,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ u 0,050 % rastvoru AMFa u metanolu u okviru optimizacije rada na odabranoj koloni (parametar optimizacije – gradijent brzine protoka eluenta) analiziran je metodama MET-LTQ-27, MET-LTQ-34, MET-LTQ-35 i MET-LTQ-37 (Tabela 3.4-6).

Za postupak ispitivanja uticaja koncentracije AMFa u mobilnim fazama na zastupljenost amonijum-adukta bifentrina pripremljena je serija rastvora smeše pesticida koncentracije 0,10; 1,00 i $10,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ u 0,050 % rastvoru AMFa u metanolu, koji je analiziran metodama MET-LTQ-27, MET-LTQ-38, MET-LTQ-39 i MET-LTQ-40 (Tabela 3.4-6).

Svi rastvori su analizirani u *full scan* režimu rada analizatora (m/z 150 – m/z 600) pod opštim *tune*-om (bez optimizacije).

Tabela 3.4-4 prikazuje parametre autosemplera koji su zajednički za sve primenjene metode. Tabele 3.4-5 i 3.4-6 prikazuju ukupan broj korišćenih metoda i njihove hromatografske parametre.

Tabela 3.4-4. Parametri autosemplera

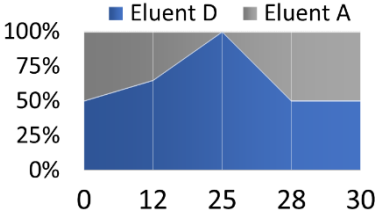
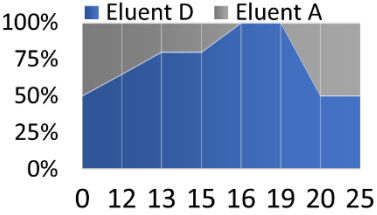
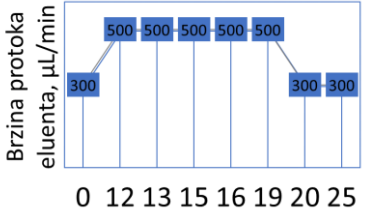
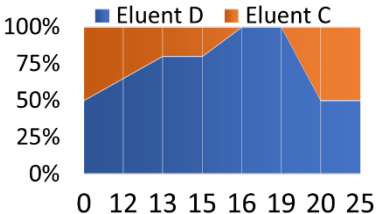
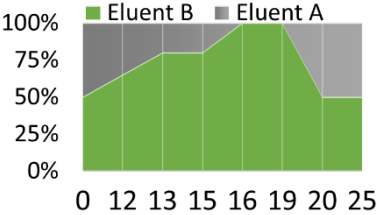
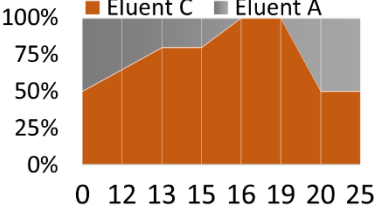
Injection mode	Injection volume, μL	Flush volume, μL	Wash volume, μL	Flush speed, $\mu\text{L s}^{-1}$	Needle height from bottom, mm	Syringe speed, $\mu\text{L s}^{-1}$	Post-injection valve switch time, min
Partial loop	10,00	400,00	0,00	100,00	2,00	8,00	0,00

Tabela 3.4-5. Hromatografski parametri metoda korišćenih u okviru postupka odabira radne kolone

Oznaka metode	Oznaka kolone	Eluenti	Brzina protoka, μLmin^{-1}	Radni pritisak, bar
MET-LTQ-01	1	A i B	500	65±0,5 (A:D=50:50) 29±0,5 (D, 100%)
MET-LTQ-02	2	A i B	300	98±0,5 (A:B=50:50) 45±0,5 (B, 100%)
MET-LTQ-03	1	A i D	500	35±0,5 (A:B=50:50) 17±0,5 (B, 100%)
MET-LTQ-04	2	A i D	300	230±0,5 (A:D=50:50) 75±0,5 (D, 100%)
MET-LTQ-19	3	A i B	100	79±0,5 (A:B=50:50) 50±0,5 (B, 100%)
MET-LTQ-22	3	A i D	100	260±0,5 (A:D=50:50) 130±0,5 (D, 100%)

Napomena:	Trajanje analize, min	Prikaz gradijenta
<p>Trajanje analize i gradijent sastava eluenta su isti za sve metode</p> <p>Eluent A: 0,30 % vodeni rastvor mravlje kiseline + 0,010 % vodeni rastvor amonijum-formijata</p> <p>Eluent B: Acetonitril</p> <p>Eluent D: Metanol</p>	60	

Tabela 3.4-6. Hromatografski parametri metoda korišćenih u okviru optimizacije parametara rada na radnoj koloni

Oznaka metode	Eluenti*	Brzina protoka, μLmin^{-1}	Trajanje analize, min	Prikaz gradijenta**
MET-LTQ-23	A i D	300	30	
MET-LTQ-27	A i D	300	25	
MET-LTQ-34	A i D	400	25	Gradijent sastava eluenta je isti kao za metodu 27
MET-LTQ-35	A i D	500	25	Gradijent sastava eluenta je isti kao za metodu 27
MET-LTQ-37	A i D	300 i 500	25	
MET-LTQ-38	C (0,30 % vodeni rastvor mravlje kiseline + 0,050 % vodeni rastvor amonijum-formijata) i D	300	25	
MET-LTQ-39	A i B	300	25	
MET-LTQ-40	A i C (0,050 % metanolni rastvor amonijum-formijata)	300	25	

**Eluent A*: 0,30 % vodeni rastvor mravlje kiseline + 0,010 % vodeni rastvor amonijum-formijata; *Eluent B*: 0,010 % metanolni rastvor amonijum-formijata; *Eluent C*: 0,30 % vodeni rastvor mravlje kiseline + 0,050 % vodeni rastvor amonijum-formijata ili 0,050 % metanolni rastvor amonijum-formijata; *Eluent D*: metanol

**Za metodu 37 prikazan je gradijent brzine protoka eluenta (gradijent sastava eluenta je isti kao za metodu 27); za ostale metode prikazan je gradijent sastava eluenta

Optimizacija parametara rada masenog spektrometra. Optimizacija parametara se je sastojala iz optimizacije protoka *sheath* i *auxiliary* gasa, voltaže spreja i iz optimizacije jonske optike masenog spektrometra. Za potrebe optimizacije pripremljen je rastvor smeše pesticida koncentracije $10,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ u 0,050 % rastvoru amonijum-formijata u metanolu. Rastvor je u ESI izvor ubrizgavan preko šprica brzinom od $25 \mu\text{L min}^{-1}$. S ciljem simulacije uslova kao pri HPLC analizi, simultano je ubrizgavana smeša eluenata A/D=50/50 sa MS pumpe, brzinom od $300 \mu\text{L min}^{-1}$, pri čemu su MS pumpa i maseni spektrometar povezani preko T spoja. Pre početka analize sistem kapilara je ispunjen rastvorom pesticida. Rastvor je analiziran u *full scan* režimu rada spektrometra (m/z 150 – m/z 600). Praćena je promena odziva/osetljivosti pseudomolekulskih jona pesticida sa promenom instrumentalnih parametara. Optimizovani parametri, koji rezultuju optimalnom osetljivošću za sve analite su usvojeni za dalji rad.

Optimizacija parametara u okviru SRM i CRM režima rada masenog spektrometra. Parametri koji figurišu u okviru podešavanja za MSⁿ eksperimente su tip aktivacije *parent* jona (engl. *activation type*), širina izolacije (engl. *isolation width, IW*), vrednost kolizione energije (engl. *collision energy, CE*), *Activation Q*¹ i period aktivacije² (engl. *activation time*). *Default* vrednosti širine izolacije (m/z), vrednosti kolizione energije (%), *Act. Q* (nema jedinicu) i perioda aktivacije (ms) su 1; 35; 0,250 i 30, respektivno. Za potrebe optimizacije ovih parametara u okviru MS² i MS³ eksperimenata pripremljen je rastvor smeše pesticida koncentracije $10,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ u 0,050 % rastvoru amonijum-formijata u metanolu. Rastvor je u ESI izvor ubrizgavan preko šprica brzinom od $25 \mu\text{L min}^{-1}$. S ciljem simulacije uslova kao pri HPLC analizi, simultano je ubrizgavana smeša eluenata A/D=50/50 sa MS pumpe, brzinom od $300 \mu\text{L min}^{-1}$, pri čemu su MS pumpa i maseni spektrometar povezani preko T spoja. Pre početka analize sistem kapilara je ispunjen rastvorom pesticida. Rastvor je analiziran u *SRM* odnosno *CRM* režimu rada spektrometra. Praćena je promena odziva/osetljivosti masenih fragmenata pesticida sa promenom instrumentalnih parametara. Optimizovani parametri, koji rezultuju optimalnom osetljivošću za sve analite su usvojeni za dalji rad.

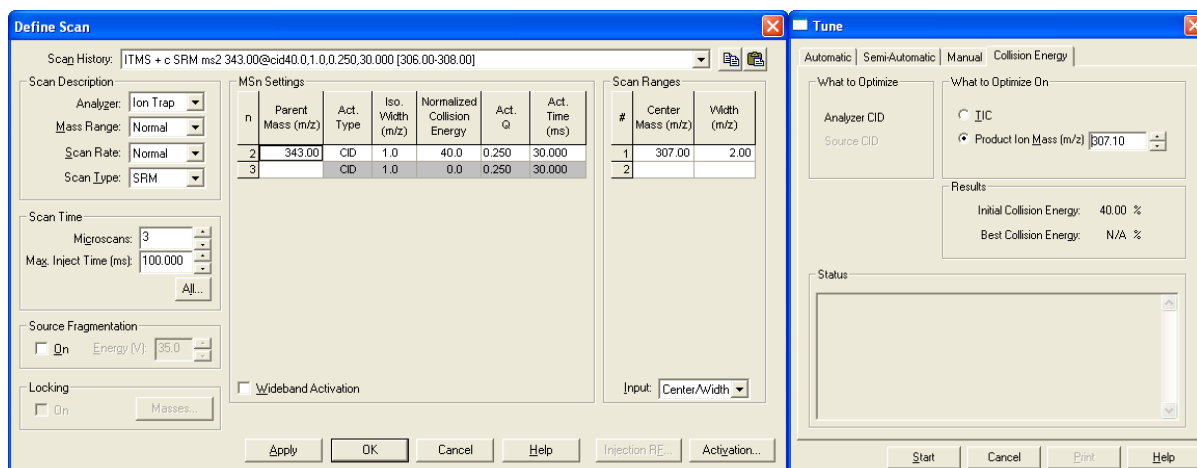
Slike 3.4-1 i 3.4-2 ilustruju na primeru boskalida definisanje instrumentalnih parametara u okviru postupka optimizacije kolizione energije. Tabela 3.4-7 prikazuje targetirane tranzicije pesticida i vrednosti *Act. Q* parametra koje su uvrštene u postupak optimizacije. Opseg testiranih vrednosti *Act. Q* parametra je odabran u skladu sa formulom koja pokazuje m/z vrednost poslednjeg stabilnog fragmenta:

$$\text{Lowest stable } m/z = (\text{Parent mass} \times \text{Act. } Q)/0,908$$

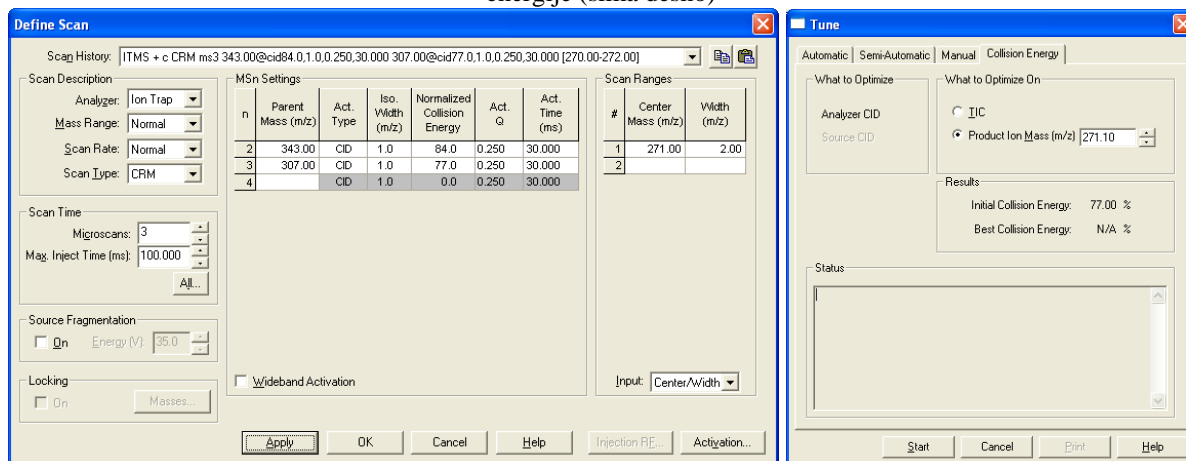
¹ Odnosi se na RF frekvencu koja se koristi za fragmentaciju jona u jonskom trapu; veća vrednost ovog parametra rezultuje izraženijom fragmentacijom.

² Trajanje apliciranja RF frekvence u milisekundama; kraće vreme rezultuje slabijom, a duže vreme izraženijom fragmentacijom.

Tabela 3.4-8 sadrži optimizovane instrumentalne parametre koji su usvojeni za dalji rad.



Slika 3.4-1 Definisani parametri za SRM tranziciju boskalida (slika levo) i za auto-optimizaciju koliziono energije (slika desno)



Slika 3.4-2 Definisani parametri za CRM tranziciju boskalida (slika levo) i za auto-optimizaciju koliziono energije (slika desno)

Tabela 3.4-7. SRM i CRM tranzicije pesticida i testirane vrednosti *Act. Q* parametra

Analit	Pirimetamil	Ciprodinil	Boskalid	Trifloksistrobin	Bifentrin
SRM prelaz*	200→107	226→185	343→140	409→186	440→166
Act. Q vrednost prema formuli	0,485	0,743	0,370	0,413	0,342
Testirane Act. Q vrednosti	0,250; 0,350; 0,450	0,250; 0,450; 0,700	0,250; 0,350; 0,370	0,250; 0,350; 0,410	0,250; 0,300; 0,340
CRM prelaz**	183→143	210→169	307→271	186→145	181→166
Act. Q vrednost prema formuli	0,709	0,730	0,801	0,707	0,832
Testirane Act. Q vrednosti	0,250; 0,450; 0,650	0,250; 0,450; 0,650	0,250; 0,450; 0,650; 0,750	0,250; 0,450; 0,650	0,250; 0,450; 0,650; 0,750

*uključuje kvalifikacioni jon, koji ima nižu m/z vrednost u odnosu na kvantifikacioni jon

**uključuje kvalifikacioni jon pirimetanila i ciprodinila, koji ima nižu m/z vrednost u odnosu na kvantifikacioni jon; CRM prelaz boskalida, bifentrina i trifloksistrobina uključuje samo jedan fragment koji je ujedno kvalifikacioni i kvantifikacioni

Tabela 3.4-8 Optimizovani parametri masenog spektrometra

ESI Izvor		Jonska optika	
Spray Voltage (kV):	5	Multipole 00 Offset (V):	-2
Sheath Gas Flow Rate:	21	Lens 0 (V):	-2.5
Aux Gas Flow Rate:	18	Multipole 0 Offset (V):	-4.5
Sweep Gas Flow Rate:	0	Lens 1 (V)	-12
Capillary Voltage (V):	29	Gate Lens (V):	-48
Capillary Temp (°C):	275	Multipole 1 Offset (V)	-15
Tube Lens (V):	65	Multipole RF (Vp-p):	400
Sistem detekcije jona		Front Lens (V):	-5.5
Conversion Dynode	On		
Dynode (kV):	-15		
Multiplier 1 (V):	-1000		
Multiplier 2 (V):	-960		

Ispitivanje granice detekcije i granice kvantifikacije instrumenta u različitim režimima rada masenog analizatora. Pripremljen je *reagent blank* odnosno 0,050 % rastvor AMF u metanolu i serija standarda smeše pesticida sledećih koncentracija: 0,005; 0,010; 0,025; 0,050; 0,075; 0,100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Snimljeni su hromatogrami svih rastvora metodama 27, 43, 44 i 45 (Tabela 3.4-9) odnosno u četiri različita režima rada analizatora: *full scan*, SIM, SRM i CRM. Na bazi parametara konstruisanih kalibracionih krivi određene su granica detekcije i granica kvantifikacije instrumenta.

Tabela 3.4-9 Parametri instrumentalnih metoda

Oznaka metode	Parametri autoemplera	Hromatografski parametri	Parametri masenog spektrometra
MET-LTQ-27	Tabela 3.4-4	Tabela 3.4-6	Tabela 3.4-8, <i>full scan</i> režim (m/z 150-600)
MET-LTQ-43	Tabela 3.4-4	Tabela 3.4-6, metoda 27	Tabela 3.4-8, <i>SIM</i> režim (m/z 199-201; m/z 225-227; m/z 342-344; m/z 408-410; m/z 439-441)
MET-LTQ-44	Tabela 3.4-4	Tabela 3.4-6, metoda 27	Tabela 3.4-8, <i>SRM</i> režim Tabela 4.2-1
MET-LTQ-45	Tabela 3.4-4	Tabela 3.4-6, metoda 27	Tabela 3.4-8, <i>CRM</i> režim Tabela 4.2-2
MET-LTQ-46	Tabela 3.4-4	Tabela 3.4-6, metoda 27	Tabela 3.4-8, <i>SRM</i> režim (pirimetanil, ciprodinil, trifloksistrobin); <i>CRM</i> režim (boskalid, bifentrin)

3.4.3 Ispitivanja na instrumentalnoj konfiguraciji CONF-3

Procedure uključuju opis rada sa *direct injection* i *LOOP injection* metodom unošenja uzorka u maseni spektrometar.

3.4.3.1 Ispitivanja sa *direct injection* metodom unošenja uzoraka

Parametri instrumentalne analize. Jonska optika instrumenta je optimizovana u odnosu na pseudomolekulski jon svakog od pesticida; u krajnju analizu uvršten je *tune* sa parametrima koji rezultuju zadovoljavajućom detekcijom za sve analite. U tabeli 3.4-10 su prikazane vrednosti parametara razvijene instrumentalne metode MET-LCQ-IN-1 (sa optimizovanim *tune*-om) – parametara u okviru ESI izvora, jonske optike i sistema za detekciju jona.

Tabela 3.4-10 Optimizovani parametri masenog spektrometra

Naziv metode	MET-LCQ-IN-1	
ESI Izvor	Jonska optika	Sistem detekcije jona
Spray Voltage (kV): 4.5	Multipole 1 Offset (V): -8	Conversion Dynode: On
Sheath Gas Flow Rate: 20	Lens Voltage (V): -22	Dynode Voltage (kV): -15
Aux/Sweep Gas Flow Rate: 0	Multipole 2 Offset (V): -8	Multiplier Voltage (V): -1250
Capillary Voltage (V): 17	Multipole RF Amp (Vp-p, sp): 400	
Capillary Temp (°C): 200	Coarse Trap DC Offset (V): -10	
Tube Lens (V, sp): 15	Fine Trap DC Offset (V): -10	

Način injektovanja uzoraka. Preliminarna ispitivanja instrumentalne osetljivosti i granica detekcije su vršena sa ubrizgavanjem standarda pesticida putem špric pumpe bez paralelne infuzije mobilne faze. Sukcesivna ispitivanja uzoraka kore su vršena uz istovremeno uvođenje uzorka putem špric pumpe (*purge* režim rada) i mobilne faze preko MS pumpe ($50 \mu\text{Lmin}^{-1}$) putem sistema kapilara prikazanim na slici 3.4-3. Za špric zapremine $500 \mu\text{L}$, brzina u *purge* režimu rada je 5 % zapremine šprica odnosno $25 \mu\text{Lmin}^{-1}$. Paralelna infuzija mobilne faze omogućava održavanje konstantnih uslova u jonskom izvoru tokom uzastopnih analiza; takođe pruža mogućnost za podešavanje parametara poput pH ili prisustva soli itd.

Karakterizacija analita. Za postupke karakterizacije analita pripremljeni su rastvori svakog od standarda pesticida visoke čistoće, kao i njihove smeše koncentracije $5,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ u metanolu ili 0,050% metanolnom rastvoru AMF-a.



Slika 3.4-3 Sistem za uvođenje uzorka u maseni spektrometar *direct injection* metodom

Ispitivanje instrumentalne osetljivosti i granica detekcije. Pripremljena je serija od 12 standarda pesticida u 0,050 % AMF u metanolu u opsegu koncentracija $0,00 - 5,00 \mu\text{g mL}^{-1}$. Svaki od standarda je ubrizgavan 12 minuta; prvih 2 min analiza je vršena u *full scan* režimu (MS^1); svaka naredna 2 min analiza je vršena u *full scan* režimu nakon fragmentacije pseudomolekulskog jona svakog od pesticida (MS^2).

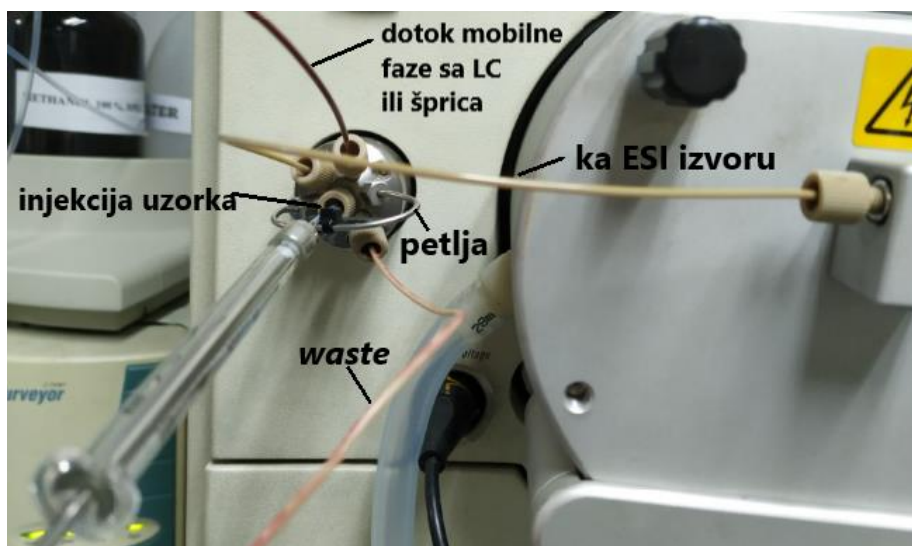
Ispitivanje uticaja vrste mobilne faze na osetljivost analize. Pripremljen je rastvor smeše pesticida koncentracije $5,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ u 0,050 % rastvoru AMF-a u metanolu. Snimljeni su hronogrami rastvora pesticida u *full scan* režimu rada analizatora u trajanju od 19 minuta. Tokom 15 minuta kontinuirane injekcije rastvora pesticida, vršene su sukcesivne injekcije mobilne faze B (100 % metanol) i mobilne faze A (vodeni rastvor 0,30% mravlje kiseline i 0,010% amonijum-formijata) svaka u trajanju od 2 minuta.

Ispitivanje prenosa uzorka iz jedne injekcije u drugu (*carryover*). Pripremljen je rastvor smeše pesticida koncentracije $10,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ u 0,050 % rastvoru AMF-a u metanolu. Snimljeni su hronogrami rastvora pesticida u *full scan* režimu rada analizatora u trajanju od 30 minuta. Tokom perioda snimanja rastvori su injektovani 3 puta u trajanju od 3 minuta, sa pauzama između uzastopnih injekcija u trajanju od 5 minuta, pri kontinuiranom radu HPLC pumpe.

3.4.3.2 Ispitivanja sa LOOP injection metodom unošenja uzorka

Parametri instrumentalne analize. Analiza uzoraka je vršena po metodi MET-LCQ-IN-1 u *full scan* režimu (opseg m/z 197 – 500). Uzorak je ubrizgavan u ESI izvor preko LOOP injektora (Slika 3.4-4). Zapremina petlje je $5 \mu\text{L}$. Protok mobilne faze (formijatni pufer) je iznosio 5, 25 i $50 \mu\text{L min}^{-1}$. Dužina Syringe – LOOP kapilare je iznosila 58 cm, a dužina LOOP – Source kapilare 20 cm.

Analiza analitičkih standarda pesticida. Pripremljena je serija rastvora smeše pesticida (6) u opsegu koncentracija $0,10 - 5,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ u 0,050 % rastvoru AMF-a u metanolu. Analizom standarda sa tri navedene brzine protoka mobilne faze, utvrđena je dinamika i osetljivost LOOP injection analize pesticida, kao i integritet hronogramskih pikova.



Slika 3.4-4 Konfiguracija sistema kapilara na LOOP injektoru tokom *LOOP injection* analize

3.4.4 Ispitivanja na instrumentalnoj konfiguraciji CONF-4

Karakterizacija analita. Za postupke karakterizacije analita pripremljeni su rastvori svakog od standarda pesticida visoke čistoće, kao i njihove smeše koncentracije $5,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ u metanolu ili 0,050% metanolnom rastvoru AMF-a. Rastvori su analizirani ubrizgavanjem u ESI i APCI izvor putem špric pumpe spektrometra.

Parametri hromatografskog razdvajanja. Analiti su razdvojeni na HPLC koloni 4, uz primenu eluenta i gradijenta koji su identični sa eluentima i gradijentom metode 27 (Tabela 3.4-6) i brzine protoka mobilnih faza od $200 \mu\text{L min}^{-1}$.

Optimizacija parametara masenog spektrometra. Optimizacija parametara se je sastojala iz optimizacije protoka *sheath* i *auxiliary* gasa i iz optimizacije jonske optike masenog spektrometra. Za potrebe optimizacije pripremljen je rastvor smeše pesticida koncentracije $5,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ u 0,050 % rastvoru amonijum-formijata u metanolu. Rastvor je u ESI izvor ubrizgavan preko šprica brzinom od $10 \mu\text{L min}^{-1}$. S ciljem simulacije uslova kao pri HPLC analizi, simultano je ubrizgavana smeša eluenta pufer/metanol=50/50 sa MS pumpe, brzinom od $200 \mu\text{L min}^{-1}$, pri čemu su MS pumpa i maseni spektrometar povezani preko T spoja. Pre početka analize sistem kapilara je ispunjen rastvorom pesticida. Rastvor je analiziran u *full scan* režimu rada spektrometra (m/z 150 – m/z 600). Praćena je promena odziva/osetljivosti pseudomolekulskih jona pesticida sa promenom instrumentalnih parametara. Optimizovani parametri, koji rezultuju optimalnom osetljivošću za sve analite su usvojeni za dalji rad (Tabela 3.4-11).

Tabela 3.4-11 Parametri *TSQ Quantum Ultra* masenog spektrometra

Jonski izvor		Jonska optika			
Voltaža spreja, V	4000	Q0 Q00 RF amplituda	260		
Pritisak sheath gasa, arb	30	Offset skimera	0		
Pritisak aux gasa, arb	10	Offset Q00	-3		
Temperatura kapilare, °C	270	Lens 0 offset	-1,2		
Offset kapilare, V	35	Q0 offset	-2		
Tube lens offset, V	140				
Prvi kvadrupol (Q1)		Drugi kvadrupol (Q2)		Treći kvadrupol (Q3)	
Lens 1-1 Offset	-2,2	Lens 2-1 Offset	-51,4	Lens 3-1 Offset	-15
Lens 1-2 Offset	-56,4	Lens 2-2 Offset	-225	Lens 3-2 Offset	-225
Q1 DC Offset	-2,7	Lens 2-3 Offset	-15	Lens 3-3 Offset	-15
Q1 Resolution	-12	Q2 RF amplituda	447	Q3 DC bias	-8
Q1 Calibration	-1,9	Q2 offset	-10	Q3 RF amplituda	105

Optimizacija parametara u SRM režimu rada. Vršena je optimizacija kolizione energije, uz prethodno zadatu vrednost pritiska kolizionog gasa od 1,50 mmTor. Za potrebe optimizacije MS² eksperimenta pripremljen je rastvor smeše pesticida koncentracije 5,00 µgmL⁻¹ u 0,050 % rastvoru amonijum-formijata u metanolu. Rastvor je u ESI izvor ubrizgavan preko šprica brzinom od 10 µLmin⁻¹. S ciljem simulacije uslova kao pri HPLC analizi, simultano je ubrizgavana smeša eluena pufer/metanol=50/50 sa MS pumpe, brzinom od 200 µLmin⁻¹, pri čemu su MS pumpa i maseni spektrometar povezani preko T spoja. Pre početka analize sistem kapilara je ispunjen rastvorom pesticida. Rastvor je analiziran u *SRM* režimu rada spektrometra. Praćena je promena odziva/osetljivosti masenih fragmenata pesticida sa promenom instrumentalnih parametara. Optimizovani parametri, koji rezultuju optimalnom osetljivošću za sve analite su usvojeni za dalji rad.

Ispitivanje osetljivosti sa primenom ESI i HESI načina jonizacije. Poređena je osetljivost prema pesticidima u opsegu koncentracija 0,10 – 5,00 µgmL⁻¹, analizom serije standarda smeše pesticida koja je pripremljena u metanolu, instrumentalnim metodama MET-TSQ-01, MET-TSQ-02 i MET-TSQ-03 (Tabela 3.4-12).

Ispitivanje osetljivosti sa primenom ESI i APCI načina jonizacije. Poređena je osetljivost prema pesticidima u opsegu koncentracija 0,10 – 5,00 µgmL⁻¹, analizom serije standarda smeše pesticida koja je pripremljena u metanolu, instrumentalnom metodom MET-TSQ-01, uz promenu tipa jonskog izvora.

Ispitivanje instrumentalnih granica detekcije i granica kvantifikacije u različitim režimima rada spektrometra. Pripremljen je *reagent blank* odnosno 0,050 % rastvor AMFa u metanolu i serija standarda smeše pesticida sledećih koncentracija: 0,010; 0,020; 0,040; 0,060; 0,080; 0,100 µgmL⁻¹. Snimljeni su hromatogrami svih rastvora metodama MET-TSQ-01, MET-TSQ-09 i MET-TSQ-10 (Tabela 3.4-12) odnosno u 3 različita režima rada analizatora: *full scan*, SIM i SRM. Na bazi parametara konstituisanih kalibracionih krivi određene su granica detekcije i granica kvantifikacije instrumenta.

Tabela 3.4-12 Parametri instrumentalnih metoda (instrumentalna konfiguracija CONF-4)

Oznaka metode	Parametri autosemplera	Hromatografski parametri	Parametri masenog spektrometra
MET-01			ESI (0 °C) ili APCI, Tabela 3.4-11, <i>full scan</i> režim (<i>m/z</i> 150-600)
MET-02		Tabela 3.4-6, metoda 27,	HESI (200 °C), Tabela 3.4-11, <i>full scan</i> režim (<i>m/z</i> 150-600)
MET-03	Tabela 3.4-4	protok 200 μLmin^{-1}	HESI (350 °C), Tabela 3.4-11, <i>full scan</i> režim (<i>m/z</i> 150-600)
MET-09			Tabela 3.4-11, <i>SIM</i> režim
MET-10			Tabela 3.4-11, <i>SRM</i> režim

3.5 Procedure u okviru razvijenih metoda

Poglavlje sadrži opis procedura u okviru razvoja metoda i njihove primene. Prilikom razvoja metoda na instrumentalnim konfiguracijama CONF-2, CONF-3 i CONF-4 nije vršeno normiranje odziva analita u odnosu na interni standard. Prethodnom analizom serija standarda analita sa internim standardom i bez njega, utvrđeno da nema varijacija u merenom signalu analita koje bi mogle poticati od samog instrumenta, tokom rada bilo koje od navedene tri instrumentalne konfiguracije. S obzirom da nema značajne razlike u parametrima linearne regresije dobijenim na bazi normalizovanih i nenormalizovanih odziva analita, upotreba internog standarda je isključena, kao još jedan vid uštede resursa.

3.5.1 Procedure u okviru analitičke metode MET-GC-R

Parametri instrumentalne analize. Za razvoj metode implementirana je instrumentalna konfiguracija CONF-1. Uzorci su analizirani instrumentalnom metodom MET GC-IN-4.

Priprema uzoraka. Priprema uzoraka za analizu je vršena prema sledećoj proceduri:

Kilogram jabuka sorti Ajdared, Zlatni Delišes i Greni Smit je oljušten, dobijeni uzorak kore je homogenizovan seckanjem u kuhinjskom blenderu, od čega je za dalju analizu uzeto po 10 grama poduzorka. U poduzorak je dodato 20 mL vode nakon čega je uzorak dodatno usitnjen u blenderu; dobijena smeša je sa dodatnih 5 mL vode kvantitativno prenešena u sud za ekstrakciju. Ekstrakcija je vršena sa 20 mL heksana, sukcesivno sa dve porcije rastvarača od 10 mL. Nakon objedinjavanja heksanskog ekstrakta, 10 mL ekstrakta je odvojeno u vialu od 40 mL i upareno do suva. U suv ostatak je dodat 1 mL metanola; nakon 10 min stajanja i mešanja na vorteksu u trajanju od 1 min, ekstrakt u metanolu je odložen na 30 min na temperaturu od -15 °C. Nakon toga ekstrakt je proceden kroz mikrofilter (0,45 μm) i instrumentalno analiziran.

Validacija metode. U okviru validacije metode ispitani su svi parametri navedeni u poglavlju 3.6. Kalibracione krive za određivanje $i\text{LOD}/i\text{LOQ}$ dobijene su analizom standarda smeše pesticida sledećih koncentracija: 0,005; 0,010; 0,015; 0,020; 0,025; 0,035; 0,045 i 0,055 $\mu\text{g mL}^{-1}$ pripremljenih u heksanu. Kalibracione krive za određivanje $m\text{LOD}/m\text{LOQ}$ dobijene su analizom proceduralnih standarda smeše pesticida sledećih koncentracija: 0,010; 0,015; 0,020; 0,025; 0,030; 0,035; 0,040 i 0,050 mg kg^{-1} . Matriks efekat je ispitan nakon prvog koraka

pripreme uzorka – u neprečišćenom heksanskom ekstraktu – i nakon prečišćavanja – u ekstraktu u metanolu.

3.5.1.1 Primena analitičke metode MET-GC-R

Poglavlje sadrži opis procedura u okviru ispitivanja migracionih karakteristika pesticida u odnosu na faze kora/pulpa i opis procedura u okviru skrininga targetiranih pesticida u jabukama sa tržišta metodama razvijenim na instrumentalnoj konfiguraciji CONF-1.

1. Migracija pesticida kroz koru jabuke

Ispitivanje prodora pesticida kroz koru jabuke vršeno je u laboratorijskim uslovima, nakon simultane aplikacije svih pesticida na plod jabuke metodom potapanja jabuke u vodeni rastvor smeše pesticida.

Za pripremu rastvora pesticida korišćeni su komercijalni preparati radi postizanja identičnosti u hemijskom sastavu rastvora za potapanje sa rastvorima koji se inače koriste u tretiranju zasada jabuke. Ispitivanja su vršena sa sortom Greni Smit.

Ispitivanje usvajanja pesticida metodom potapanja. Pre početka ispitivanja prodora pesticida kroz koru vršeno je ispitivanje stepena sorpcije pesticida na plod metodom potapanja. Preliminarno ispitivanje je vršeno da bi se odredili parametri potapanja koji dovode do usvajanja adekvatne količine pesticida odnosno količine koja je daleko iznad granice detekcije i kvantifikacije, a sve to kako bi se radilo u domenu merljivih koncentracija.

Ispitani parametri potapanja su *vreme potapanja* i *koncentracija vodenog rastvora smeše pesticida*. Sva ispitivanja su vršena na bazi tri ploda jabuke odnosno tri replikata; analizirani su i blank uzorci.

Vreme potapanja. Plodovi jabuke su potapani u 300 mL vodenog rastvora smeše pirimetanila, ciprodinila, trifloksistrobina, bifentrina i boskalida (koncentracija svakog od pesticida je $1,00 \text{ mgL}^{-1}$), dobijenog razblaživanjem primarnog rastvora komercijalnih preparata. Plodovi su bili zdravi i ujednačeni po obliku i veličini i pre potapanja su oprani od eventualno prisutnih nečistoća. Prosečna masa 15 plodova jabuke korišćenih u okviru ispitivanja je iznosila $153,64 \pm 8,89 \text{ g}$. Plodovi su potapani u trajanju od 0,30, 1,30, 4,00, 5,30 i 7,30 minuta. Uklanjanje eventualnog viška rastvora sa površine ploda je sprovedeno po vađenju plodova potapanjem plodova u trajanju od 2–3 sekunde u čistu vodu i brisanjem, nakon čega su plodovi oljušteni. U cilju provere eventualne migracije pesticida u pulpu tokom perioda potapanja, prvi sloj pulpe debljine 1 mm je oljušten i analiziran.

Koncentracija vodenog rastvora smeše pesticida. Postavka eksperimenta je identična kao postavka opisana u prethodnom paragrafu, sa sledećom razlikom: plodovi jabuke su potapani u trajanju od 1,50 minuta u 300 mL vodenog rastvora smeše pirimetanila, ciprodinila, trifloksistrobina, bifentrina i boskalida sledećih koncentracija: 1,00; 5,00; 10,00; 15,00 i 20,00 mgL^{-1} . Prosečna masa 15 plodova jabuke korišćenih u okviru ispitivanja je iznosila $183,02 \pm 9,20 \text{ g}$.

Ispitivanje migracije pesticida kroz koru. *Postavka eksperimenta.* Migracija pesticida je ispitivana nakon njihove aplikacije na plod iz rastvora niske (analitičke) koncentracije i visoke koncentracije koja je reda veličine koncentracija pesticida koje se apliciraju na useve. Aplikacija pesticida je vršena potapanjem plodova u trajanju od 2 minuta

1. u rastvor koncentracije 15 mgL^{-1} (analitička koncentracija) i

2. u rastvor koncentracije 150 mgL^{-1} .

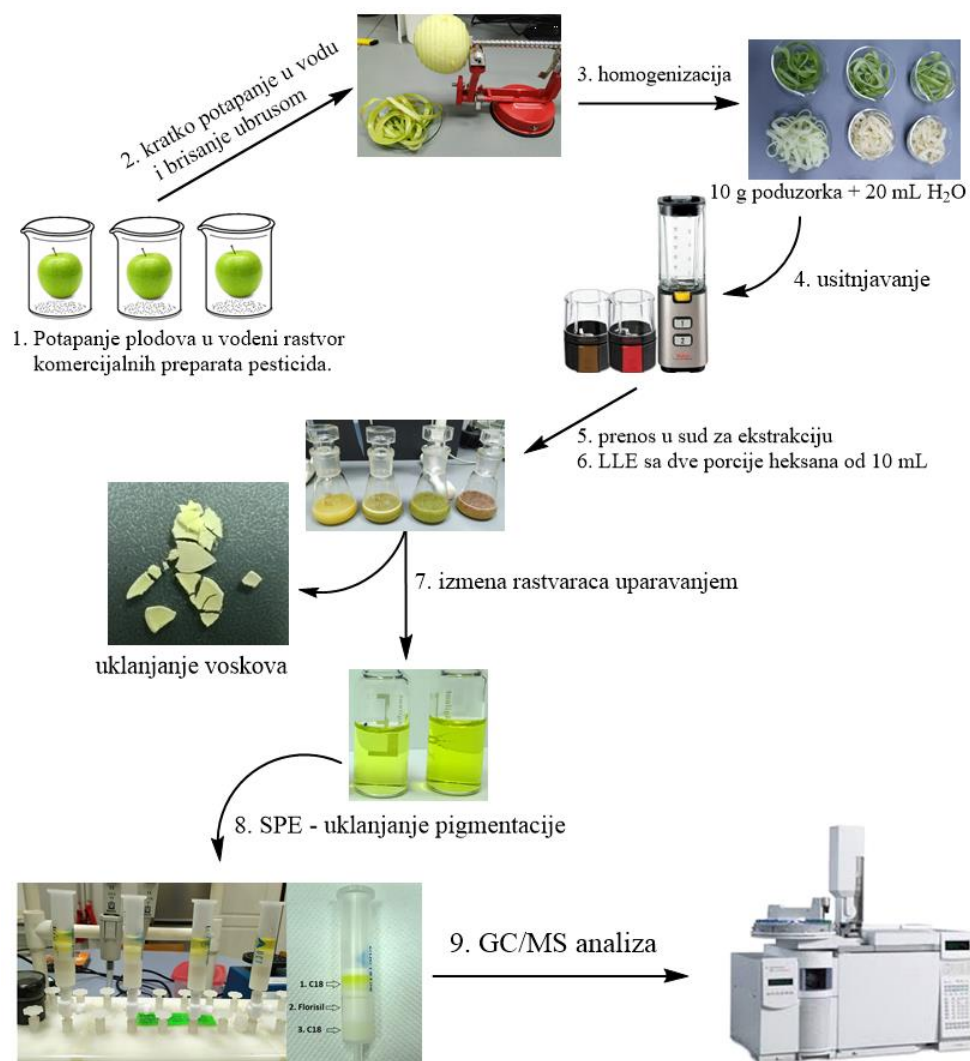
Koncentracija drugog rastvora je odabrana u skladu sa preporukama za aplikaciju koje se mogu naći na komercijalnim preparatima pesticida. Probe su rađene u tri replikata.

Početna količina pesticida u kori (100%) je određena odmah nakon aplikacije pesticida. Plodovi su isprani od viška rastvora kratkim potapanjem u čistu vodu i brisanjem ubrusom, nakon čega su ljušteni. Prodor je nakon potapanja u rastvor niže koncentracije ispitivan analizom kore i pulpe plodova koji su ljušteni nakon 20, 40 i 60 minuta stajanja na sobnoj temperaturi u slobodnom prostoru. Prodor je nakon potapanja u rastvor više koncentracije ispitivan u dužim intervalima odnosno plodovi su ljušteni nakon 1 h, 3 h, 24 h i 72 h stajanja na sobnoj temperaturi u slobodnom prostoru.

Priprema uzoraka. Priprema kore i pulpe za analizu je proširena za jedan korak u odnosu na pripremu uzorka MET-GC-R metode (poglavlje 3.5). Za plodove koji su potapani u rastvor koncentracije 150 mgL^{-1} do suva je upareno 4 umesto 10 mL heksanskog ekstrakta. Dobijeni ekstrakt u metanolu je dodatno prečišćen tehnikom ekstrakcije na čvrstoj fazi. SPE kertridž je punjen sledećim redosledom: 1. 500 mg C18, 2. 500 mg Florisila[®], 3. 500 mg C18, formirajući troslojnu formu. Pre nanošenja ekstrakta, SPE kolona je kondicionirana sa 3 mL metanola. Nakon nanošenja 1 mL ekstrakta u metanolu, eluiranje pesticida je vršeno sa 2 mL metanola. Objedinjene frakcije uzorka nakon nanošenja (1 mL) i eluata (2 mL) su uparene do suva; suv ostatak je rastvoren u 0,50 mL heksanskog rastvora DBA ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) i instrumentalno analiziran. Slika 3.5-1 ilustruje korake u okviru ispitivanja prodora pesticida i pripreme uzoraka za analizu.

Postupak kvantifikacije uzoraka. Uzorci kore su kvantifikovani kalibracijom u analitičkom opsegu $0,000 - 0,700 \text{ mg kg}^{-1}$, na bazi proceduralnih standarda smeše pesticida sledećih koncentracija: $0,000 - 0,050 - 0,100 - 0,200 - 0,300 - 0,350 - 0,400 - 0,500 - 0,600 - 0,700 \text{ mg kg}^{-1}$. Uzorci pulpe su kvantifikovani kalibracijom u analitičkom opsegu $0,000 - 0,200 \text{ mg kg}^{-1}$, na bazi proceduralnih standarda smeše pesticida sledećih koncentracija: $0,000 - 0,010 - 0,030 - 0,050 - 0,075 - 0,100 - 0,200 \text{ mg kg}^{-1}$.

Granica detekcije i granica kvantifikacije metode su određene metodom opisanom u poglavlju 3.3.1, za uzorke kore sa proceduralnim standardima koncentracija $0,000 - 0,015 - 0,035 - 0,055 - 0,075 - 0,100 \text{ mg kg}^{-1}$, a za uzorke pulpe sa proceduralnim standardima kao i za kvantifikaciju. Uzorci kore plodova potapanih u rastvor veće koncentracije su kvantifikovani kalibracijom na bazi proceduralnih standarda u analitičkom opsegu $2,00 - 10,00 \text{ mg kg}^{-1}$. Instrumentalna analiza je vršena metodom MET GC-IN-4.



Slika 3.5-1 Opšta shema pripreme uzoraka za analizu u eksperimentima ispitivanja prodora pesticida

2. Skrining tržišta

Priprema uzoraka za analizu je vršena prema proceduri metode MET-GC-R. Instrumentalna analiza je vršena po metodi MET GC-IN-4.

Radi poređenja, pored kore analizirana je pulpa i plod jabuke. Ispitivanje je obuhvatilo uzorke sorte Ajdared, Greni Smit i Zlatni Delišeš iz jednog supermarketa i sa tri pijace na teritoriji grada Niša. U okviru jedne pijace, svaka sorta je pribavljena sa posebnog prodajnog mesta, tako da uzorkovanje sa pijaca pokriva ukupno 9 prodajnih mesta, odnosno 9 proizvođača/dobavljača. Ispitivanje je obuhvatilo i uzorke iz zasada za komercijalni uzgoj jabuka koji se nalazi u oblasti Jablanica/Vučje.

Zasadi jabuke u oblasti Jablanice tretirani su sa preko 20 različitih formulacija komercijalnih pesticida prema unapred određenom planu i programu. Ukupan broj tretiranja zasada je bio 14, u periodu od marta 2019. (faza bubrenja pupoljaka) do sredine avgusta 2019. (faza posle precvetavanja); jabuke su brane sredinom septembra. Plan tretiranja je obuhvatio i formulacije komercijalnih pesticida koji kao aktivnu materiju sadrže pirimetanil, ciprodinil i boskalid; Tabela 3.5-1 sadrži redukovani plan tretiranja sa akcentom na podatke o apliciranju komercijalnih formulacija koje sadrže ispitivane pesticide.

Tabela 3.5-1 Plan tretiranja zasada jabuka

Fenološka faza gajene kulture	Datum tretiranja	Problem koji se rešava tretiranjem	Naziv primenjenog preparata/aktivna materija	Doza preparata	Karenca, dani
zeleni buketići, roze pupoljak	03.4.2019	Venturia inaequalis	Pehar® / pirimetanil	1,00 Lha ⁻¹	28
cvetanje	12.4.2019	Venturia inaequalis	Neon® / ciprodinil	1,00 Lha ⁻¹	
1. tretiranje posle cvetanja	19.4.2019	Venturia inaequalis	Neon® / ciprodinil	1,00 Lha ⁻¹	
11. tretiranje posle precvetavanja	10.8.2019	Monilinia sp.	Signum®; Bosco® / Boskalid Atlas® / ciprodinil + fludioksonil	1,00 kgha ⁻¹	28

3.5.2 Procedure u okviru analitičke metode MET-GC-Q

Parametri instrumentalne analize. Prilikom razvoja metode implementirana je instrumentalna konfiguracija CONF-1. Uzorci su analizirani instrumentalnom metodom MET GC-IN-4.

Priprema uzoraka. Priprema uzoraka za analizu vršena je prema sledećoj proceduri:

Kilogram plodova jabuke sorte Greni Smit je iseckan na sitnije komade i dodatno homogenizovan blendiranjem. U reprezentativnu porciju uzorka mase 5 g dodato je 5 mL acetonitrila koji sadrži 1 % sirćetne kiseline i *QuEChERS* Paket 1, nakon čega je vršena ekstrakcija mućkanjem u trajanju od 1 minuta. Smeša je centrifugirana 1 minut na 3500 rpm (obrtaja u minuti). U supernatant zapremine 1 mL dodat je *QuEChERS* Paket 2, nakon čega je vršena ekstrakcija mućkanjem u trajanju od 1 minuta. Smeša je centrifugirana 1 minut na 3500 rpm. Alikvot supernatanta je koncentrovan 5 puta uparavanjem. Finalni ekstrakt (suv ostatak rastvoren u heksanu) je instrumentalno analiziran.

Validacija metode. U okviru validacije metode ispitani su svi parametri navedeni u poglavlju 3.6. Kalibracione krive za određivanje $mLOD/mLOQ$ konstruisane su u opsegu prilagođenom za svaki pesticid sa proceduralnim standardima sledećih koncentracija: 0,025; 0,050; 0,075; 0,100 i 0,250 mgkg⁻¹ (bifentrin), 0,025; 0,050; 0,075 i 0,100 mgkg⁻¹ (trifloksistrobin, pirimetanil i ciprodinil) i 0,100; 0,250; 0,350; 0,450 i 0,550 mgkg⁻¹ (boskalid).

Uticaj koraka uparavanja na granicu detekcije i granicu kvantifikacije metode proveren je određivanjem $mLOD/mLOQ$ za metodu bez uparavanja i poređenjem sa vrednostima $mLOD/mLOQ$ za metodu sa uparavanjem. Kalibracione krive za određivanje $mLOD/mLOQ$ metode bez uparavanja konstruisane su u opsegu prilagođenom za svaki pesticid sa proceduralnim standardima sledećih koncentracija: 0,0125; 0,025; 0,050; 0,075 i 0,100 mgkg⁻¹ (bifentrin), 0,075; 0,100; 0,250; 0,350; 0,450 i 0,550 mgkg⁻¹ (trifloksistrobin) 0,025; 0,050; 0,075; 0,100 i 0,250 mgkg⁻¹ (pirimetanil), 0,100; 0,250; 0,350; 0,450; 0,550 i 0,750 mgkg⁻¹ (ciprodinil) i 0,500; 0,550; 0,750; 1,000; 1,250 i 1,500 mgkg⁻¹ (boskalid).

3.5.3 Procedure u okviru analitičke metode MET-LC-R1

Parametri instrumentalne analize. Prilikom razvoja metode implementirana je instrumentalna konfiguracija CONF-2. Uzorci su analizirani instrumentalnom metodom MET-LTQ-46.

Priprema uzorka za analizu. Uzorci su pripremljeni prema sledećoj proceduri:

Kilogram jabuka sorti Ajdared, Zlatni Delišes i Greni Smit je oljušten, dobijeni uzorak kore je homogenizovan seckanjem u kuhinjskom blenderu, od čega je za dalju analizu uzeto po 10 grama poduzorka. U poduzorak je dodato ekstrakciono sredstvo (1 mL na 1 g uzorka) – voda, acetonitril ili metanol. Vršena je ekstrakcija mućkanjem (1 min) i centrifugiranje (5 min/3000 rpm). Supernatant je proceđen kroz mikrofilter Nylon 0,22 μm i analiziran.

Validacija metode. Osnovni parametri validacije (poglavlje 3.6) ispitani su za metanolni i acetonitrilni ekstrakt kore. Uzorci su analizirani instrumentalnim metodama MET-LTQ-04, MET-LTQ-27, MET-LTQ-44 i MET-LTQ-45 (Tabela 3.4-6, str. 89). Kalibracione krive za određivanje $m\text{LOD}/m\text{LOQ}$ konstruisane su u opsegu 0,00 – 0,100 mgkg^{-1} sa 7 proceduralnih standarda.

UV/VIS analiza ekstrakata. Spektrofotometrijska analiza u UV/VIS području je vršena na instrumentu SHIMADZU UV-1650PC sa dvostrukim zrakom, u *single mode* režimu u opsegu 150 – 1100 nm, uz promenu izvora svetlosti na 341 nm (UV deuterijumska lampa / VIS halogena lampa). Za snimanje su korišćene kivete quartz QS sa dužinom optičkog puta $l = 1,0$ cm.

3.5.3.1 Primena analitičke metode MET-LC-R1

Poglavlje sadrži opis procedura u okviru komparativne analize targetiranih pesticida u istom tipu uzoraka i opis procedura u okviru skrininga targetiranih pesticida u jabukama sa tržišta metodama razvijenim na instrumentalnoj konfiguraciji CONF-2.

1. Komparativna analiza uzoraka metodama MET-LC-R1 i MET-LC-Q

Tačnost razvijene metode (MET-LC-R1) je proverena poređenjem rezultata analize spajkovanih uzoraka uporedno analiziranih razvijenom i zvaničnom metodom (MET-LC-Q).

Priprema spajkovanih uzoraka. Kilogram jabuka sorte Greni Smit je oljušten; kora i pulpa su odvojeno homogenizovane, pa potom pomešane u odgovarajućoj proprorciji (1:10) radi formiranja uzorka ploda. Porcije od 10 g svakog matriksa (kora, pulpa, plod) su odmerene u konusne viala, u 10 replikata. Porcije su spajkovane (50 mgkg^{-1}). Po 5 replikata kore, pulpe i ploda je obrađeno prema proceduri za pripremu uzoraka u okviru MET-LC-R1 – ekstrakcija acetonitrilom, a preostalih 5 replikata prema proceduri za pripremu uzoraka u okviru MET-LC-Q – Varijanta 1.

Analiza spajkovanih uzoraka. Uzorci su analizirani na instrumentu sa CONF-2 instrumentalnom metodom MET-LTQ-27.

2. Skrining tržišta

Priprema uzoraka za analizu je vršena prema proceduri metode MET-LC-R1. Instrumentalna analiza je vršena po metodi MET-LTQ-46. Analizirana je kora, pulpa i plod jabuke. Ispitivanje je obuhvatilo uzorke sorte Ajdared, Greni Smit i Zlatni Delišes iz dva supermarketa i tri pijace

na teritoriji grada Niša. U okviru jedne pijace, svaka sorta je pribavljena sa posebnog prodajnog mesta, tako da uzorkovanje sa pijaca pokriva ukupno 9 prodajnih mesta, odnosno 9 proizvođača/dobavljača.

3.5.4 Procedure u okviru analitičke metode MET-LC-Q

Parametri instrumentalne analize. U razvoj metode implementirana je instrumentalna CONF-2. Uzorci su analizirani instrumentalnom metodom MET-LTQ-46 (Tabela 3.4-9, str. 92).

Priprema uzoraka. Priprema uzoraka za analizu vršena je prema sledećoj proceduri:

Kilogram plodova sorte Greni Smit je iseckan na sitnije komade i dodatno homogenizovan blendiranjem. U reprezentativnu porciju uzorka mase 10 g dodato je 10 mL acetonitrila, nakon čega je vršena ekstrakcija mućkanjem u trajanju od 1 minuta. Potom je dodat *QuEChERS* Paket 3. Odmah nakon toga vršeno je kratko mućkanje da se ne bi stvorile grudve, potom je vršena ekstrakcija mućkanjem (1 min) i centrifugiranje (5 min/3000 rpm).

Varijanta 1. U supernatant zapremine 1 mL dodat je *QuEChERS* Paket 4, nakon čega je vršena ekstrakcija mućkanjem u trajanju od 1 minuta. Smeša je centrifugirana 1 minut na 3500 rpm. Supernatant je proceđen kroz mikrofilter (Nylon 0,22 μm).

Varijanta 2. U supernatant zapremine 6 mL dodat je *QuEChERS* Paket 6, nakon čega je vršena ekstrakcija mućkanjem u trajanju od 1 minuta. Smeša je centrifugirana 1 minut na 3500 rpm. Supernatant je proceđen kroz mikrofilter (Nylon 0,22 μm).

Validacija metode. U okviru validacije metode ispitani su svi parametri navedeni u poglavlju 3.6. Kalibracione krive za određivanje $m\text{LOD}/m\text{LOQ}$ konstruisane su u opsegu 0,005 – 0,075 mgkg^{-1} .

3.5.5 Procedure u okviru analitičke metode MET-DI-R

Parametri instrumentalne analize. U razvoj metode implementirana je instrumentalna konfiguracija CONF-3. Uzorci su analizirani instrumentalnom metodom MET-LCQ-IN-1 sa *direct injection* metodom unošenja uzorka.

Priprema uzoraka. Priprema uzoraka za analizu vršena je prema sledećoj proceduri:

Deset grama kore je zajedno sa vodom (20 mL) usitnjeno u blenderu. Vodeni ekstrakt je centrifugiran (10 min/3500 rpm). Supernatant (15 mL) je ekstraktovan heksanom (10 mL). Heksanski ekstrakt (6 mL) je uparen do suva na sobnoj temperaturi; suv ostatak je rastvoren u 1,5 mL 0,050 % rastvora amonijum-formijata u metanolu, proceđen kroz mikrofilter (Nylon 0,22 μm) i analiziran.

Određivanje količine suvog ostatka u finalnom ekstraktu. Određivanje količine suvog ostatka u finalnom ekstraktu kore jabuke vršeno je na bazi tri replikata prema sledećoj proceduri:

U 50 g kore sorti Greni Smit, Zlatni Delišes i Ajdared dodato je 100 mL vode, nakon čega je smeša usitnjena u kuhinjskom blenderu do kašaste konzistencije. Celokupna masa kaše je

proceđena pod vakuumom kroz filter papir (crna traka). Filtrat (75 mL) je ekstraktovan heksanom (50 mL). Heksanski ekstrakt (30 mL) je uparen do suva na sobnoj temperaturi (25 °C) i izmerena je masa suvog ostatka. Nakon toga je suv ostatak zagrevan 30 min na *hot plate* uređaju na 50 °C. Nakon hlađenja do sobne temperature izmerena je masa suvog ostatka. Potom je suv ostatak zagrevan još 30 min na 100 °C, nakon čega je ponovo merena masa suvog ostatka.

Validacija metode. U okviru validacije metode procenjena je selektivnost, matriks efekat, granica detekcije metode, prinos ekstrakcije na dva koncentraciona nivoa i linearnost u koncentracionom opsegu 0,00 – 0,75 mgkg⁻¹.

3.5.6 Procedure u okviru analitičke metode MET-LI-R

Parametri instrumentalne analize. U razvoj metode implementirana je instrumentalna konfiguracija CONF-3. Uzorci su analizirani instrumentalnom metodom MET-LCQ-IN-1 sa *LOOP injection* metodom unošenja uzorka.

Analiza analitičkih standarda pesticida tretiranih citratnim *QuEChERS*-om. Pripremljeni je rastvori smeše pesticida koncentracije 1,00 i 10,00 µgmL⁻¹ u acetonitrilu. Rastvori su pripremljeni u 10 replikata i analizirani:

- 1) Pre tretiranja *QuEChERS*-om
- 2) Nakon prvog koraka *QuEChERS*-a (sa citratnim solima)
- 3) Nakon celokupnog *QuEChERS*-a sa korakom *dSPE* sa PSA
- 4) Nakon celokupnog *QuEChERS*-a sa korakom *dSPE* sa PSA + C18
- 5) Nakon celokupnog *QuEChERS*-a sa korakom *dSPE* sa PSA + C18 + GCB

Standardi su analizirani sa brzinom protoka mobilne faze od 25 µLmin⁻¹. Statističkim poređenjem srednjih vrednosti merenih odziva standarda pre i posle tretiranja *QuEChERS* procedurom ispitano je da li procedura utiče na početnu količinu pesticida. Za statističko poređenje korišćen je *paired t test*, za parove podataka, sa testiranom hipotezom $SV_1 - SV_2 < > 0$, pri čemu je SV_1 srednja vrednost merenih odziva netretiranih standarda (n=10), a SV_2 je srednja vrednost merenih odziva tretiranih standarda (n=10) nakon svakog koraka *QuEChERS* procedure.

Analiza standarda pesticida na bazi citratnog *QuEChERS* ekstrakta kore jabuke. *Post-extraction fortification* standardi (spajkovanje analitima izvršeno nakon pripreme uzorka). Blank ekstrakt kore je pripremljen u dve *QuEChERS* varijante prema sledećim procedurama:

- 1) **Varijanta 1.** Veća masa smrznute kore Ajdareda, Delišesa i Greni Smita je izblendirana. Porcija usitnjene kore (10 g) prebačena je u vialu sa konusnim dnom (50 mL) i dodat je acetonitril (10 mL), nakon čega je vršena ekstrakcija mućkanjem (1 min). U vialu je potom dodat *QuEChERS* Paket 3. Odmah nakon je vršeno kratko mućkanje da se ne bi formirale grudve, potom je vršena ekstrakcija mućkanjem (1 min) i centrifugiranje (5 min/3000 rpm). Supernatant je proceđen kroz mikrofilter Nylon 0,22 µm i analiziran.
- 2) **Varijanta 2.** U određenu zapreminu supernatanta dobijenog prema proceduri za varijantu 1 je nakon centrifugiranja dodat *QuEChERS* Paket 4. Vršena je ekstrakcija mućkanjem (1

min) i centrifugiranje (5 min/3000 rpm). Supernatant je proceden kroz mikrofilter Nylon 0,22 μm i analiziran.

Pripremljena je serija *post-extraction fortification* standarda pesticida u opsegu koncentracija 0,10 – 5,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (šest standarda) razblaživanjem odgovarajuće zapremine MPP rastvora u blank ekstraktu kore pripremljenom po proceduri za varijantu 1 i za varijantu 2.

Pre-extraction fortification standardi (spajkovanje analitima izvršeno pre početka pripreme uzorka). Standardi su pripremljeni prema sledećoj proceduri:

Veća masa smrznute kore Ajdareda, Delišesa i Greni Smita je izblendirana. Porcija usitnjene kore (10 g) prebačena je u vialu sa konusnim dnom (50 mL) i vršeno je spajkovanje analitima u sledećim koncentracijama: 0,010; 0,040; 0,200; 1,00; 5,00 mg kg^{-1} . Nakon stajanja (1h) dodat je acetonitril (10 mL), nakon čega je vršena ekstrakcija mućkanjem (1 min). U vialu je potom dodat *QuEChERS* Paket 3. Odmah nakon je vršeno kratko mućkanje da se ne bi stvorile grudve, potom je vršena ekstrakcija mućkanjem (1 min) i centrifugiranje (5 min/3000 rpm). U određenu zapreminu supernatanta nakon centrifugiranja je dodat *QuEChERS* Paket 4. Vršena je ekstrakcija mućkanjem (1 min) i centrifugiranje (5 min/3000 rpm). Supernatant je proceden kroz mikrofilter Nylon 0,22 μm i analiziran.

3.5.7 Procedure u okviru analitičke metode MET-LC-R2

Parametri instrumentalne analize. U razvoj metode implementirana je instrumentalna CONF-4. Uzorci su analizirani instrumentalnom metodom MET-TSQ-10 (Tabela 3.4-12, str. 97).

Priprema uzorka za analizu. Uzorci su pripremljeni prema sledećoj proceduri:

Kilogram jabuka sorti Ajdared, Zlatni Delišes i Greni Smit je oljušten, dobijeni uzorak kore je homogenizovan seckanjem u blenderu, od čega je za dalju analizu uzeto po 10 grama poduzorka. U poduzorak je dodat acetonitril (1 mL na 1 g uzorka). Vršena je ekstrakcija mućkanjem (1 min) i centrifugiranje (5 min/3000 rpm). Supernatant je proceden kroz mikrofilter Nylon 0,22 μm i analiziran.

Ispitivanje osetljivosti sa ESI i HESI načinom jonizacije. Poređena je osetljivost prema pesticidima u opsegu koncentracija 0,10 – 5,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$, analizom serije standarda smeše pesticida na bazi acetonitrilnog ekstrakta kore sorte Greni Smit instrumentalnim metodama MET-TSQ-01, MET-TSQ-02 i MET-TSQ-03.

Validacija metode. Procenjeni su osnovni parametri validacije (poglavlje 3.6).

3.6 Validacija metoda

Procena selektivnosti metode. Procena selektivnosti metode je vršena uporednom analizom hromatograma obrađenog uzorka kore bez pesticida (blank) i standarda pesticida pripremljenih u blank ekstraktu kore.

Procena tačnosti i preciznosti metode. Tačnost i preciznost metode su procenjivane za tri koncentracije pesticida u uzorku koje pokrivaju testirani analitički opseg – 0,10; 1,00 i 5,00 mgkg⁻¹ – u pet replikata.

Procena linearnosti metode. Linearnost metode je testirana u analitičkom opsegu od 0,005 odnosno 0,010 mgkg⁻¹ do 5,00 mgkg⁻¹ sa >10 kalibracionih standarda.

Procena matriks efekta. Procena je vršena prema izrazu br.1 (poglavlje 2.3.3.4, str. 61). Standardi su pripremljeni u analitičkom opsegu 0,10 – 5,00 µgmL⁻¹. Pre procene matriks efekta ispitana je zavisnost matriks efekta od koncentracije analita. Najširi koncentracioni opseg u okviru kojeg matriks efekat ne zavisi od koncentracije analita je odabran za procenu matriks efekta.

Procena granice detekcije i kvantifikacije. Procenjivane su granice detekcije i granice kvantifikacije instrumentalne tehnike (iLOD; iLOQ) i granice detekcije i granice kvantifikacije metode (mLOD; mLOQ) načinom koji omogućava njihovo izražavanje u jedinicama koncentracije (poglavlje 2.3.3.5, str. 63).

3.7 Legislativa korišćena u interpretaciji rezultata istraživanja

Validacioni parametri razvijenih metoda – selektivnost, tačnost i preciznost, linearnost i matriks efekat, procenjivani su u odnosu kriterijume definisane u direktivi SANTE/2019/12682 i upoređeni su sa validacionim parametrima zvaničnih metoda koje su takođe primenjene u obradi uzoraka, a to su metoda EN 15662:2018 (srpska oznaka SRPS EN 15662:2018) i metoda AOAC 2007.01. Granice detekcije primenjenih metoda upoređene su sa MDK vrednostima za ispitivane pesticide, koje su definisane Pravilnikom o maksimalno dozvoljenim količinama ostataka sredstava za zaštitu bilja u hrani i hrani za životinje (broj 110-00-114/2020-09).

4 REZULTATI

4.1 Ispitivanja na instrumentalnoj konfiguraciji CONF-1

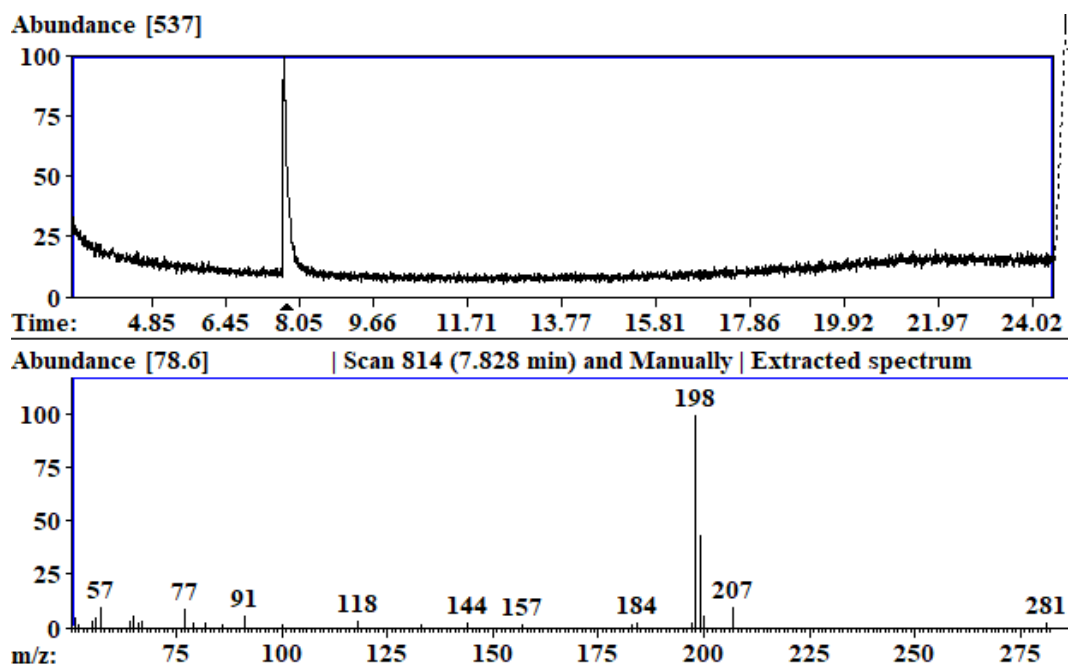
Poglavlje sadrži rezultate ispitivanja performansi instrumentalne konfiguracije CONF-1 u odnosu na ispitivane pesticide i rezultate razvoja i primene metoda koje uključuju ovu instrumentalnu konfiguraciju.

4.1.1 Performanse instrumenta u odnosu na ispitivane analite

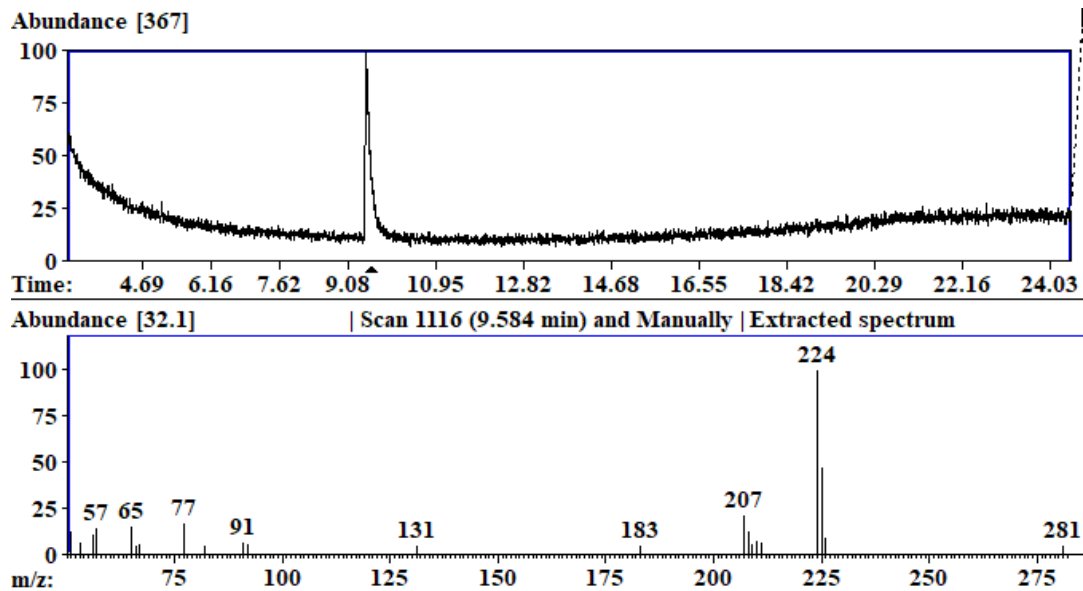
Karakterizacija analita. Slike 4.1-1 – 4.1-5 prikazuju hromatograme i masene spektre rastvora svakog od pesticida visoke čistoće u heksanu analizirani metodom MET-GC-IN-1. U masenom spektru pirimetanila (Slika 4.1-1) najintenzivniji fragment je m/z 198; po zastupljenosti ga sledi molekulski jon m/z 199 i u vrlo malom procentu m/z 77 (Tabela 4.1-1). U masenom spektru ciprodinila (Slika 4.1-2) najintenzivniji fragment je m/z 224; po zastupljenosti ga prate molekulski jon m/z 225 i fragmenti m/z 77 i m/z 210. Pirimetanil i ciprodinil, koji pripadaju istoj hemijskoj klasi jedinjenja se fragmentišu na sličan način i njihova fragmentacija je karakteristična po intenzivnom formiranju deprotonovanih fragmenata.

Maseni spektar trifloksistrobina (Slika 4.1-3) je bogatiji fragmentima; najintenzivniji fragment je m/z 116, a po zastupljenosti ga slede fragmenti m/z 131 m/z 59 i m/z 145; molekulski jon m/z 408 se ne uočava u spektru. EI jonizacija bifentrina (Slika 4.1-4) rezultira u fragmentu m/z 181, koji je najintenzivniji, i fragmentima m/z 165 i m/z 166, koji ga prate po intenzitetu; takođe se u vrlo malom procentu zastupljenosti uočava i molekulski jon m/z 422. EI jonizacija boskalida (Slika 4.1-5) rezultira u sledećim karakterističnim fragmentima: m/z 140, m/z 112 i m/z 342, pri čemu je najintenzivniji fragment m/z 140. Poglavlje 8.3 (Prilog) sadrži predložene mehanizme nastanka karakterističnih fragmenata pesticida.

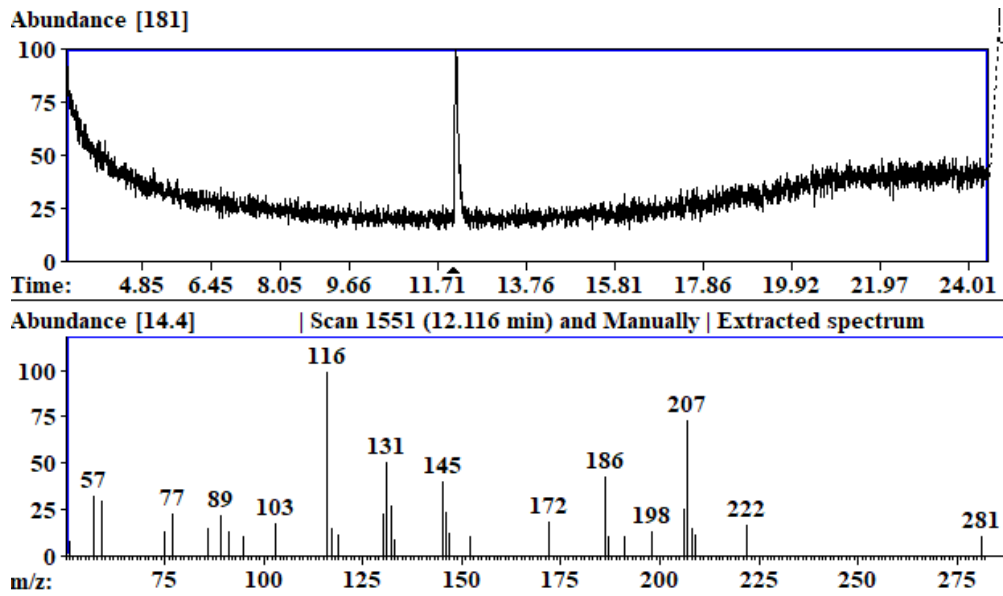
Slika 4.1-6 prikazuje hromatogram i maseni spektar rastvora dibutil-adipada (DBA) koncentracije od $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ u heksanu koji je korišćen kao interni standard.



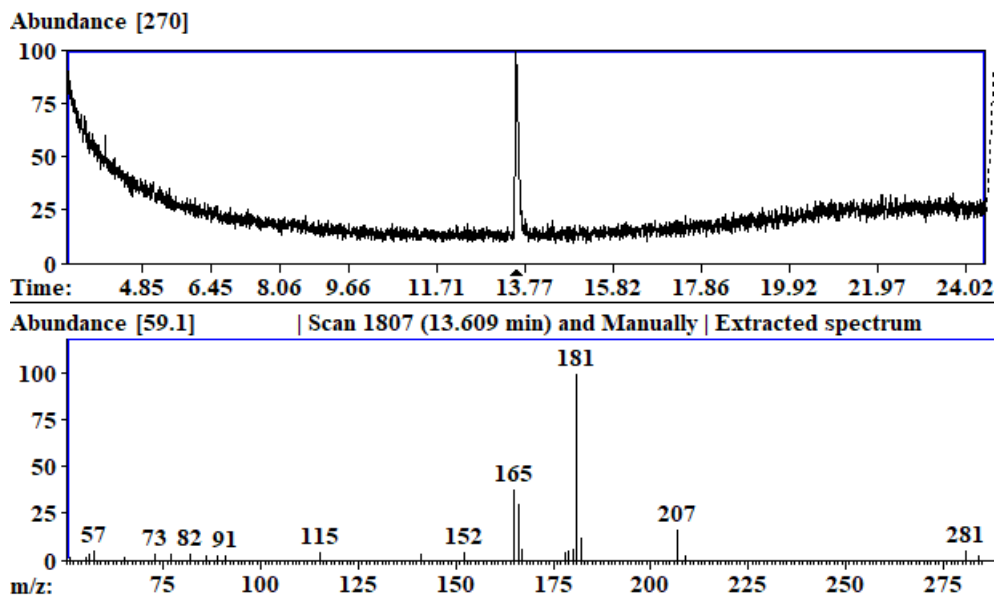
Slika 4.1-1 Hromatogram i maseni spektar rastvora pirimetanila u heksanu ($5,00 \mu\text{g mL}^{-1}$) u *scan* režimu



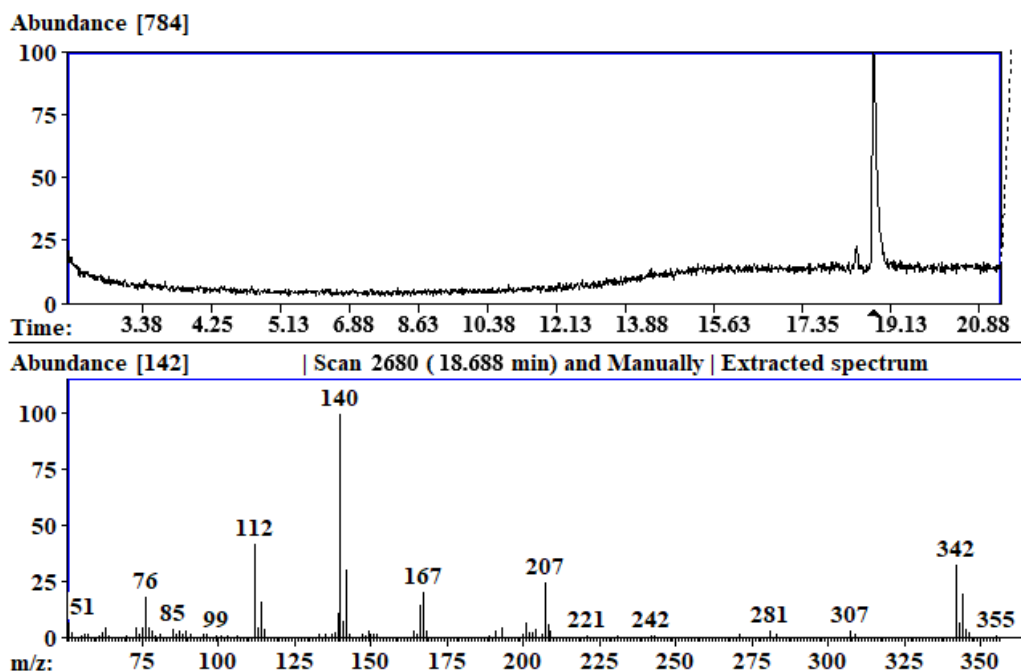
Slika 4.1-2 Hromatogram i maseni spektar rastvora ciprodinila u heksanu ($5,00 \mu\text{g mL}^{-1}$) u *scan* režimu



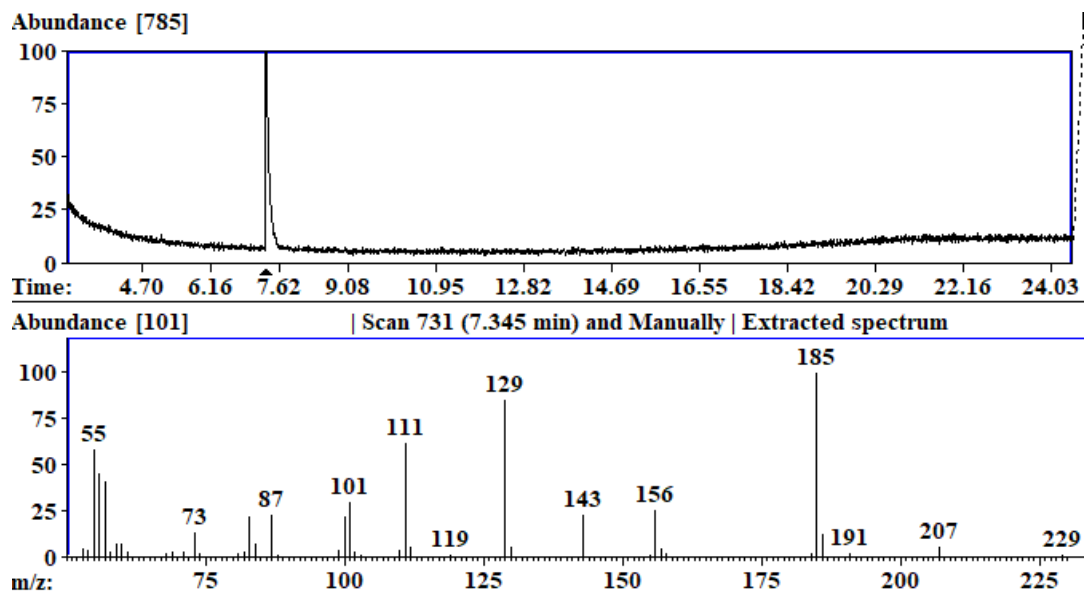
Slika 4.1-3 Hromatogram i maseni spektar rastvora trifloksistrobina u heksanu ($5,00 \mu\text{g mL}^{-1}$) u *scan* režimu



Slika 4.1-4 Hromatogram i maseni spektar rastvora bifentrina u heksanu ($5,00 \mu\text{g mL}^{-1}$) u *scan* režimu

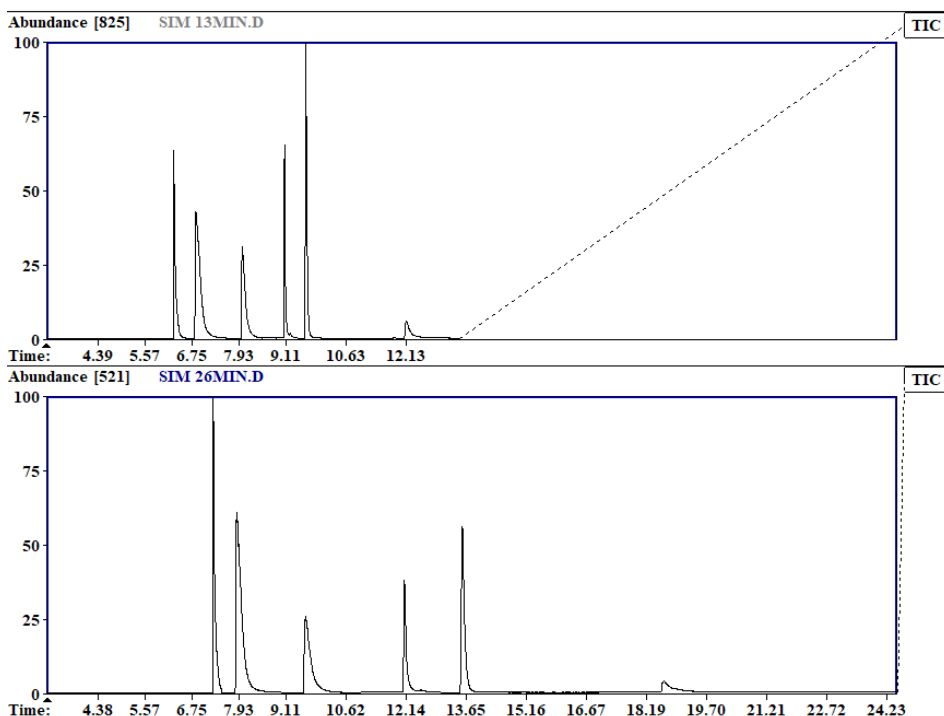


Slika 4.1-5 Hromatogram i maseni spektar rastvora boskalida u heksanu ($5,00 \mu\text{g mL}^{-1}$) u *scan* režimu



Slika 4.1-6 Hromatogram i maseni spektar rastvora DBA u heksanu ($5,00 \mu\text{g mL}^{-1}$) u *scan* režimu

Promena temperaturnog režima rada pećnice. Sa hromatografske kolone se prvi eluira pirimetanil, slede ga ciprodinil, trifloksistrobin, bifentrin i boskalid. Klasičan temperaturni režim kolone, koji podrazumeva postojanje minimum dve temperaturne rampe (ovenRGM-1, str. 86) ovde je zamenjen režimom koji uključuje jednu temperaturnu rampu (ovenRGM-2, str. 86), da bi vreme instrumentalne analize bilo kraće. Ukupno trajanje instrumentalne analize sa režimom ovenRGM-1 je 26,50 minuta, dok je ukupno trajanje instrumentalne analize sa režimom ovenRGM-2 15,50 minuta, što rezultira uštedom vremena od oko 40 %. Promena parametara rada pećnice se nije odrazila na njene performanse u pogledu razdvajanja analita (Slika 4.1-7).



Slika 4.1-7 SIM hromatogrami smeše DBA, pirimetanila, ciprodinila, trifloksistrobina, bifentrina i boskalida koncentracije $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ u heksanu, po metodi sa *ovenRGM-1* i *ovenRGM-2* temperaturnim režimom pećnice

Osetljivost u *scan* i SIM režimu rada analizatora. Za instrumentalnu analizu pesticida kao krajnji režim rada masenog spektrometra odabran je režim praćenja odabranih fragmenata (*quadRGM-1*) zbog veće osetljivosti. Najzastupljeniji fragmenti pesticida i fragmenti uvršeni u metodu MET GC-IN-4 (Tabela 4.1-1). Svaki od fragmenata je praćen 100 ms (*dwell time*). Za trifloksistrobin, bifentrin i boskalid su praćena tri fragmenta – jedan po kome je rađena kvantifikacija – i dva radi pouzdanije identifikacije (*qualifier* joni). Za pirimetanil i ciprodinil je praćen jedan jon koji se je isticao po intenzitetu. Kao *qualifier* jon trifloksistrobina, umesto jona m/z 59 koji je treći po zastupljenosti, u MET GC-IN-4 metodu uvršten je jon m/z 145, zbog veće strukturne specifičnosti.

Veća osetljivost u SIM u odnosu na *scan* režim rada analizatora je potvrđena analizom serije standarda pesticida ($0,50 - 10,00 \mu\text{g mL}^{-1}$) pripremljenim u heksanu, u oba režima rada i poređenjem nagiba kalibracionih krivi (Tabela 4.1-2). Odnos SIM/*scan* nagiba je za svaki analit veća od jedinice, što ukazuje na veću osetljivost pri SIM režimu rada analizatora. Procenat uvećanja odziva pesticida u SIM u odnosu na odziv u *scan* režimu rada (usvojen kao 100 %) se kreće od 83 % za standard ciprodinila i pirimetanila koncentracije $0,50 \mu\text{g mL}^{-1}$ do 31 % za standard ciprodinila koncentracije $10,00 \mu\text{g mL}^{-1}$; boskalid se u standardu koncentracije $0,50 \mu\text{g mL}^{-1}$ u *scan* režimu ne detektuje.

Tabela 4.1-1 Pregled karakterizacije analita; kvantifikacioni joni su dati zadebljani i u kurzivu

Analit	Retenciono vreme, minuti	Fragmenti, m/z (zastupljenost, %)	Fragmenti odabrani za SIM režim
Pirimetanol	6,85	198 (100), 199 (45), 77 (7,3)	198
Ciprodinil	8,02	224 (100), 225 (61), 77 (17), 210 (9,6)	224
Trifloksistrobin	9,08	116 (100), 131 (58), 59 (42), 145 (29), 89 (23)	116, 131, 145
Bifentrin	9,62	181 (100), 165 (36), 166 (33)	181, 165, 166
Boskalid	12,15	140 (100), 112 (41), 342 (32), 142 (27), 207 (20)	140, 112, 342

Tabela 4.1-2 Odzivi analita u različitim režimima rada masenog analizatora

Analit	Fragment, m/z	Nagib krive u <i>scan</i> režimu (ekstrakcija fragmenta iz <i>total ion</i> hromatograma)	Nagib krive u SIM režimu	Odnos SIM/ <i>scan</i> odziva
Pirimetanol	198	498361	668995	1,342
Ciprodinil	224	288577	377578	1,308
Trifloksistrobin	116	83610	111418	1,333
Bifentrin	181	268396	378424	1,410
Boskalid	140	51044	69225	1,356

Instrumentalna granica detekcije i kvantifikacije. Najveća instrumentalna osetljivost u SIM režimu se uočava za pirimetanol, a najmanja za boskalid (Tabela 4.1-3). Granice detekcije i granice kvantifikacije instrumentalne metode u SIM režimu se kreću od 0,0008 $\mu\text{g mL}^{-1}$ za ciprodinil i boskalid do 0,01 $\mu\text{g mL}^{-1}$ za trifloksistrobin i od 0,0024 $\mu\text{g mL}^{-1}$ za ciprodinil do 0,0305 $\mu\text{g mL}^{-1}$ za trifloksistrobin, respektivno.

Tabela 4.1-3 Osetljivost pri niskim koncentracijama analita i granice detekcije instrumenta

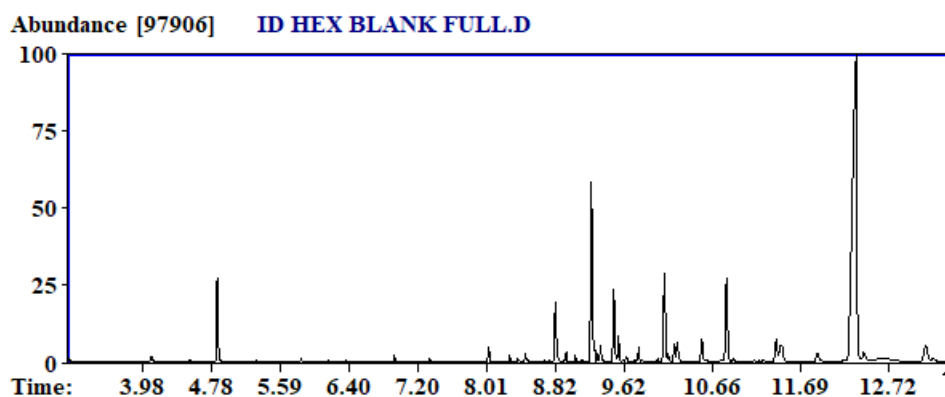
Analit	Pirimetanol	Ciprodinil	Trifloksistrobin	Bifentrin	Boskalid
SIM režim					
Nagib	1958442	1453744	626907	1941986	489270
Koeficijent korelacije, R^2	0,9991	0,9998	0,9745	0,9994	0,9998
LOD, $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,0018	0,0008	0,0100	0,0015	0,0008
LOQ, $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,0054	0,0024	0,0305	0,0045	0,0026
<i>scan</i> režim					
Nagib	1448346	1221425	470366	1382219	363725
Koeficijent korelacije, R^2	0,9992	0,9989	0,9889	0,9995	0,9997
LOD, $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,0024	0,0011	0,0110	0,0020	0,0014
LOQ, $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,0080	0,0036	0,0366	0,0066	0,0046

4.1.2 Rezultati razvoja i primene metode MET-GC-R

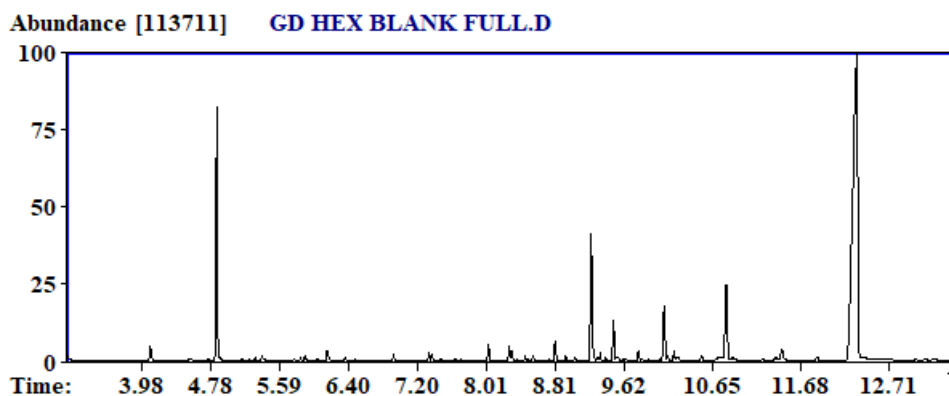
4.1.2.1 Analiza ekstrakata jabuke – opšta zapažanja

Neprečišćeni ekstrakt. Na slikama 4.1-8 – 4.1-13 prikazani su hromatogrami blank heksanskih ekstrakata kora i pulpa ispitivanih sorti jabuke. Profil jedinjenja u ekstraktima bi mogao da se podeli u tri dela: na nižim retencionim vremenima, između 4,5 i 5 minuta, uočava se pik za koji je pretragom NIST baze spektara utvrđeno da potiče od α -farnesena (Prilog, Slika 8.4-1, str. 309); u oblasti od 8 do 10 minuta uočava se nekoliko pikova koji potiču od estara masnih kiselina, s obzirom da maseni spektri ovih jedinjenja pokazuju veliku sličnost sa spektrom jedinjenja na 8,07 minuta (Prilog, Slika 8.4-2, str. 310), koje je pretragom baze spektara identifikovano kao metil-estar linoleinske kiseline; u oblasti od 10 do 13 minuta uočava se nekoliko pikova sa velikom zastupljenošću alifatičnih fragmenata u masenom spektru, na osnovu čega se može zaključiti da pripadaju frakciji masnih kiselina i voskova (Prilog, Slika 8.4-4 i Slika 8.4-5, str. 312).

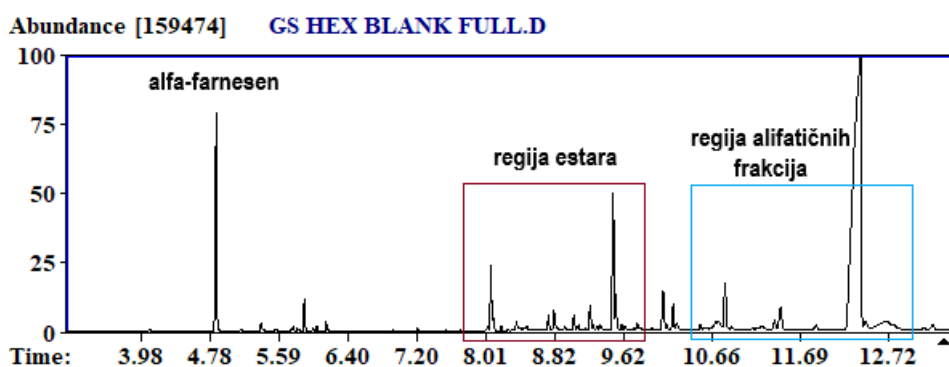
Najzastupljenije jedinjenje u heksanskim ekstraktima kore i pulpe je iz frakcije voskova, sa retencionim vremenom između 12 i 13 minuta. Kada se uporede ekstrakti kore različitih sorti, uočava se da je jedinjenje posebno zastupljeno u ekstraktu Greni Smit sorte (Slika 4.1-10). Aproximativna procena količine voskova u heksanskim ekstraktima kore sve tri sorte je izvršena gravimetrijskom metodom – 10 mL ekstrakta je upareno do suva, suv ostatak je rastvoren u metanolu, nakon čega je precipitat odvojen od metanola, osušen i izmeren. Prinos u masi je bio sledeći: 0,1053 g (Zlatni Delišeš zrelog ploda), 0,1079 g (Zlatni Delišeš nezrelog ploda), 0,1133 g (Greni Smit) i 0,0913 g (Ajdared). Utvrđeno je da ekstrakt Greni Smita ima oko 5 % više precipitata od Zlatnog Delišeša i oko 25 % više precipitata od Ajdareda. Pored frakcije voskova, profil ekstrakta Greni Smit u odnosu na druge sorte se ističe po većem sadržaju α -farnesena.



Slika 4.1-8 Hromatogram blank heksanskog ekstrakta kore Ajdareda u *scan* režimu rada analizatora



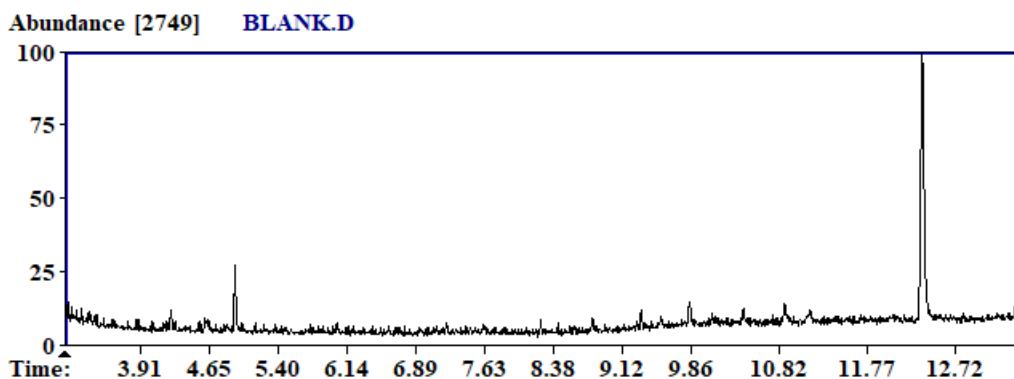
Slika 4.1-9 Hromatogram blank heksanskog ekstrakta kore Zlatnog Delišesa u *scan* režimu rada analizatora



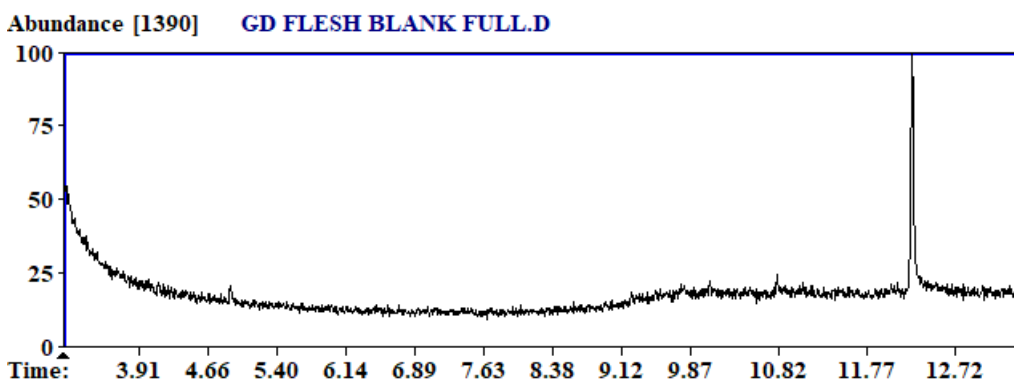
Slika 4.1-10 Hromatogram blank heksanskog ekstrakta kore Greni Smita u *scan* režimu rada analizatora

Prema ispitivanju Klein *et al.* (2018) najzastupljenije komponente u voskovima kore Greni Smita su jedinjenja poput pentakozana, nonakozana i nezasićenih masnih kiselina sastava C20:3n6, C18:2n6, C18:3n3, C22:2, C14:1, C16:1. Brojna jedinjenja iz frakcije voskova su identifikovana u kori jabuke, poput sterola, terpena i masnih kiselina (Wu *et al.*, 2007; Klein *et al.*, 2018). Ispitivanje triterpenskog sastava kore jabuke različitih sorti je dovelo do otkrivanja prisustva drugih jedinjenja i proširenja hemijskog profila kore, poput polihidroksiovanih derivata oleanolne i ursolne kiseline, uključujući dihidroksi ursolnu kiselinu, korosolnu i anurkoičnu kiselinu, trihidroksilnu ursolnu kiselinu, tormentinsku i euskafinsku kiselinu, kao i dihidroksi oleanolnu i maslininsku kiselinu (Poirier *et al.*, 2018).

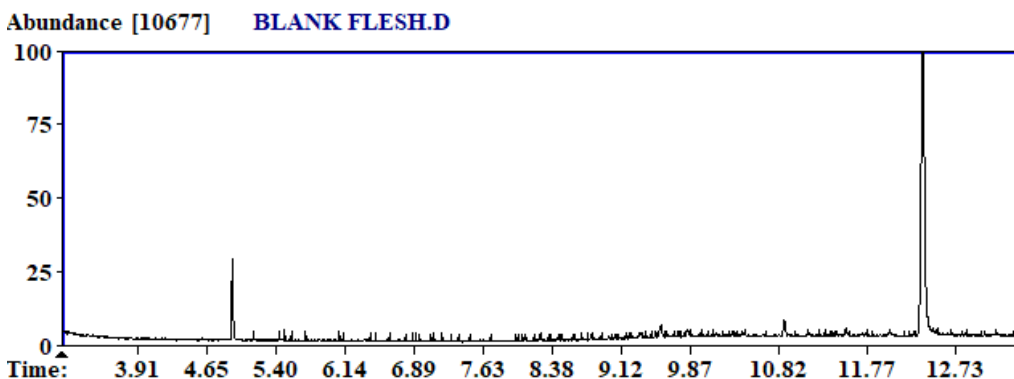
Ako se uporede hromatogrami heksanskih ekstrakata kore i pulpe, uočava se da pulpa ima znatno manji sadržaj frakcije voskova. Poređenje odziva jedinjenja koje se javlja na 12,37 minuta u ekstraktu kore i pulpe Greni Smit sorte je pokazalo njegovo i do 42 puta veće prisustvo u kori u odnosu na pulpu.



Slika 4.1-11 Hromatogram blank heksanskog ekstrakta pulpe Ajdareda u *scan* režimu rada analizatora



Slika 4.1-12 Hromatogram blank heksanskog ekstrakta pulpe Zlatnog Delišeša u *scan* režimu rada analizatora

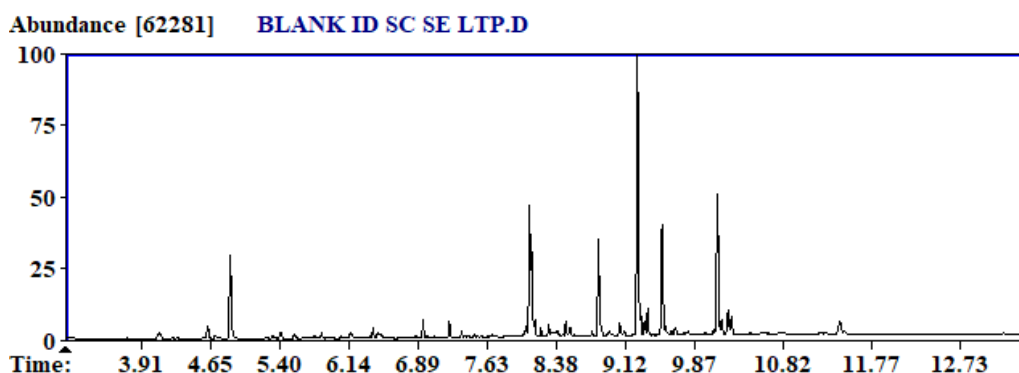


Slika 4.1-13 Hromatogram blank heksanskog ekstrakta pulpe Greni Smita u *scan* režimu rada analizatora

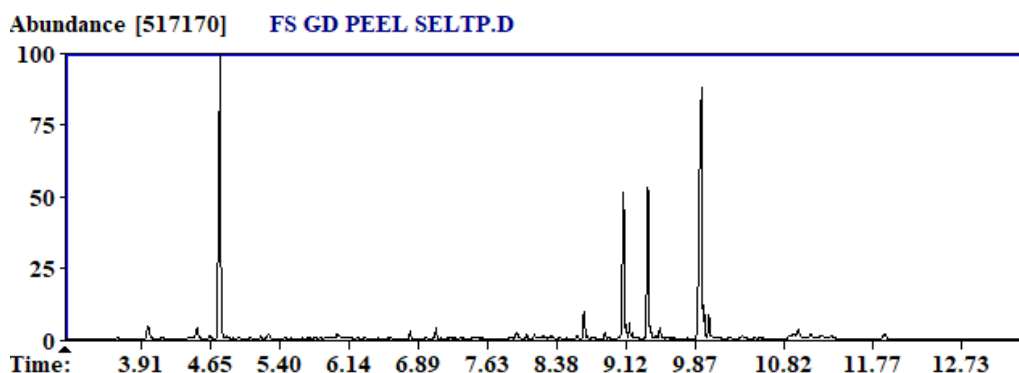
Prečišćeni ekstrakt. Glavni cilj koraka prečišćavanja ekstrakta je bilo uklanjanje voskova. Razlog za to je negativan uticaj voskova kao teško isparljivih jedinjenja na performanse kolone, u smislu njenog zaprljanja. Naredni razlog koeluiranje sa boskalidom, koje izaziva problem loše selektivnosti i pri režimu rada analizatora quadRGM-1.

Korak prečišćavanja se zasniva na principu slabe rastvorljivosti nepolarnih voskova u polarnim rastvaračima. Ovaj korak podrazumeva da se heksan kao rastvarač matriksa zameni metanolom (izmena rastvarača, IR), uz prateće odlaganje rastvora na temperaturu od $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ (precipitacija na niskoj temperaturi, PNT). Suv ostatak se nakon uparavanja heksanskog ekstrakta ne rastvara

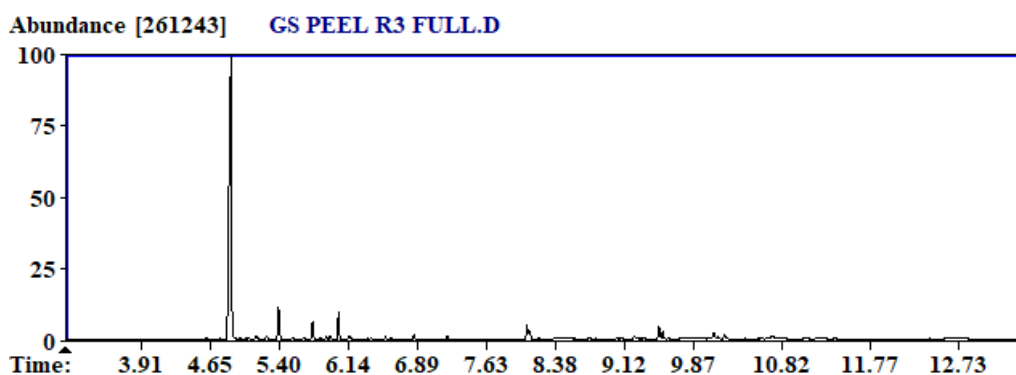
u potpunosti u metanolu; u rastvoru se formira beli precipitat. Precipitat potiče od voskova, na šta ukazuje odsustvo pikova u hromatogramima u regiji od 10 do 13 minuta (Slika 4.1-14 - Slika 4.1-16). Potpuna precipitacija frakcije voskova je osigurana periodom zamrzavanja. Iz ekstrakta su uklonjeni voskovi, ali je ostala pigmentacija (Slika 4.1-17). Procedura pripreme uzorka je prvenstveno razvijena za koru jabuke, ali se uspešno može primeniti i na čitav plod. U ekstraktima pulpe se nakon izmene rastvarača ne uočava precipitat.



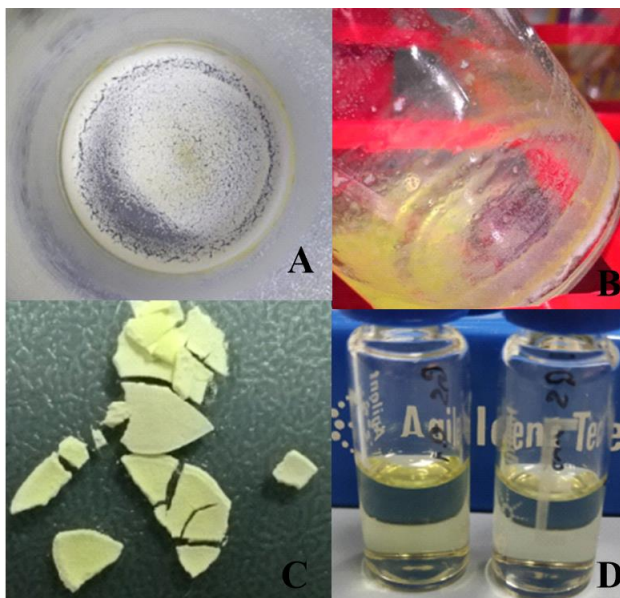
Slika 4.1-14 Hromatogram prečišćenog (IR-PNT) blank ekstrakta kore Ajdareda, u *scan* režimu rada analizatora



Slika 4.1-15 Hromatogram prečišćenog (IR-PNT) blank ekstrakta kore Zlatnog Delišesa, u *scan* režimu rada analizatora



Slika 4.1-16 Hromatogram prečišćenog (IR-PNT) blank ekstrakta kore Greni Smita, u *scan* režimu rada analizatora



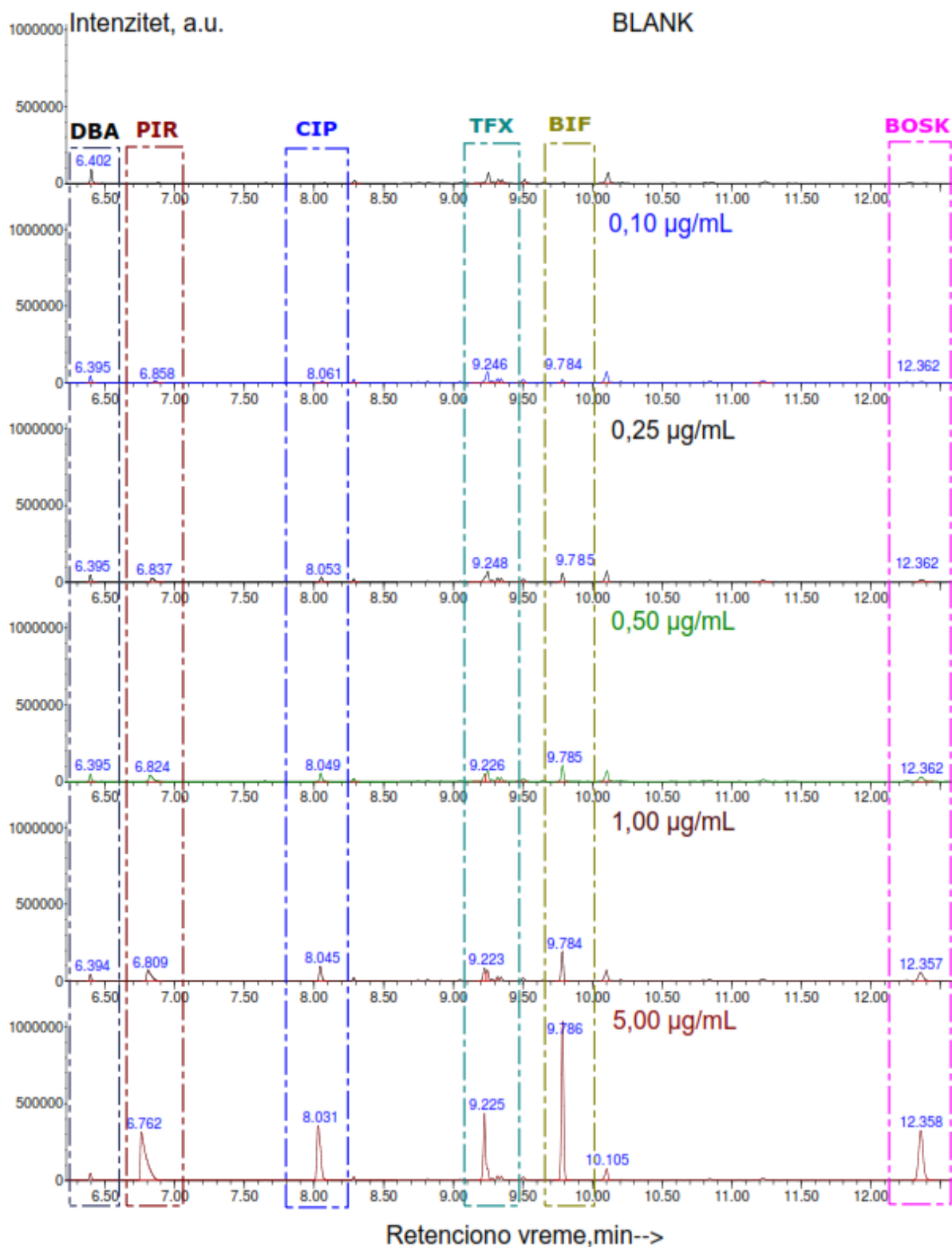
Slika 4.1-17 Ilustracija IR/PNT koraka:

- A – nakon uparavanja
- B – nakon dodavanja metanola
- C – uklonjeni precipitat
- D – finalni ekstrakt

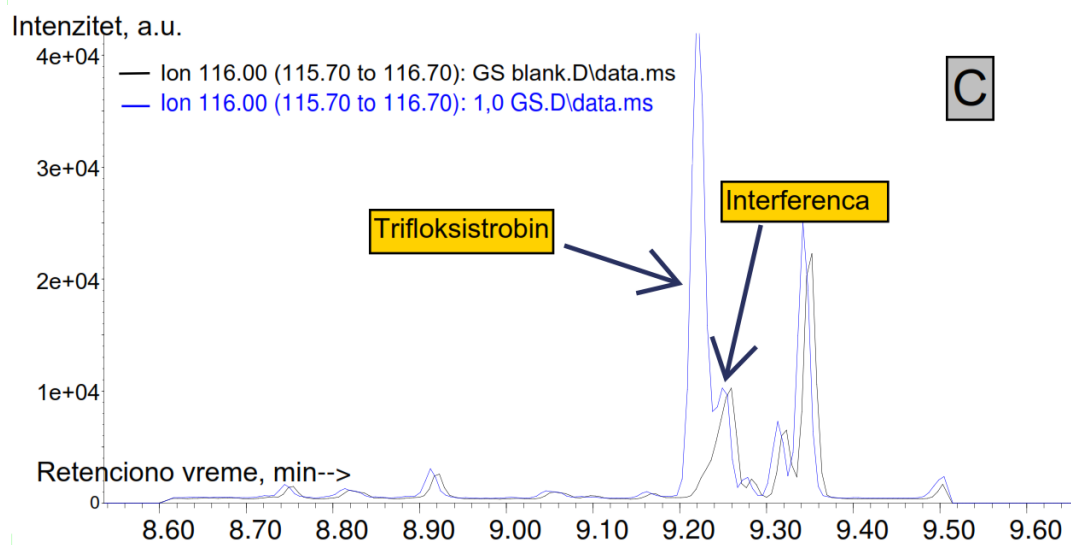
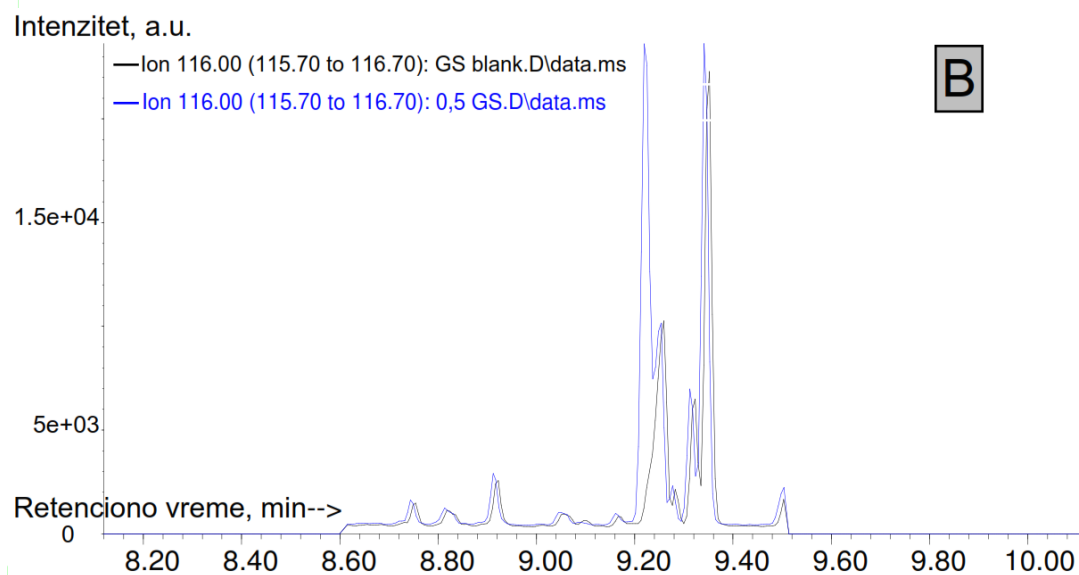
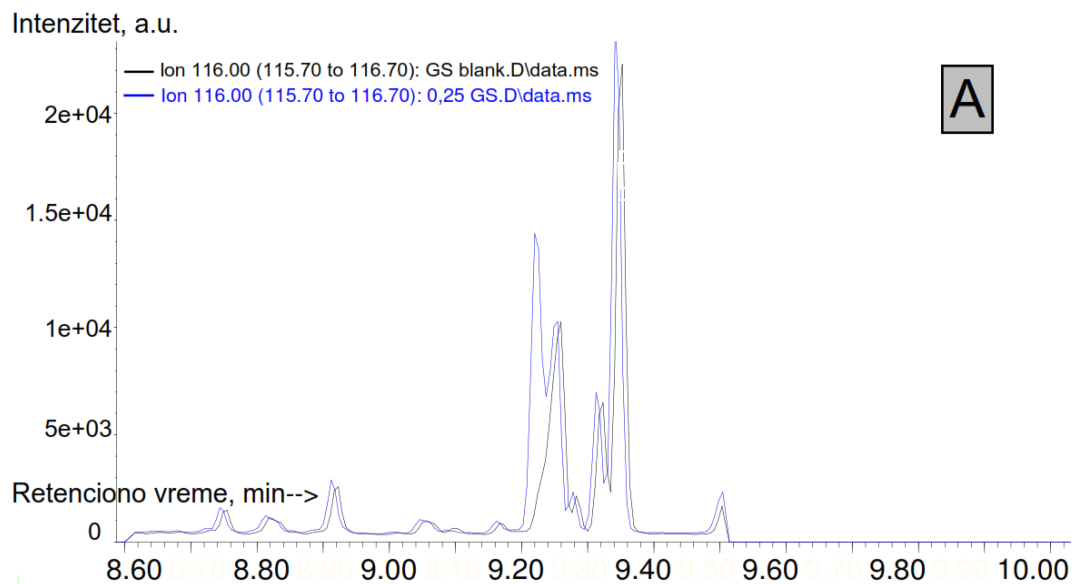
4.1.2.2 Rezultati ispitivanja parametara validacije

Selektivnost. Slika 4.1-18 prikazuje hromatograme standarda pesticida rastućih koncentracija, pripremljenih u blank ekstraktu kore Greni Smit sorte, kao i samog blank ekstrakta nakon prečišćavanja. Metoda je selektivna za pirimetanil, ciprodinil, bifentrin i boskalid, jer se u hromatogramu blank ekstrakta se ne uočavaju pikovi na retencionim vremenima ovih pesticida (Slika 4.1-18). Za trifloksistrobin, koji se eluira u regiji estara (Slika 4.1-10), kojih ima u nešto većoj koncentraciji nakon koraka prečišćavanja uočava se delimična interferenca (Slika 4.1-18).

Interferiranje sa pikom trifloksistrobina je najizraženije za niže koncentracije pesticida, kako raste površina pika trifloksistrobina smanjuje se udeo interference u njoj (Slika 4.1-19). Greška u kvalitativnom određivanju trifloksistrobina usled nepotpune selektivnosti je minimalna s obzirom da se retencionna vremena pesticida i interferenta razlikuju; takođe razlikuje se i obrazac zastupljenosti jona u okviru SIM režima, pri čemu je kod trifloksistrobina jon m/z 116 uvek najzastupljeniji sa karakterističnim obrascem 116>131>145, dok je kod interference najzastupljeniji jon uvek m/z 131 sa obrascem 131>145>116. Potencijalni problemi u kvantifikaciji usled nepotpune selektivnosti se mogu prevazići na dva načina. Jedan način prevazilaženja bi bila ručna integracija pika trifloksistrobina u prilagođenom opsegu retencionog vremena. S obzirom da je zastupljenost jedinjenja koje interferira sa pesticidom konstantna kroz sve uzorke – za isti početni udeo kore i rastvarača – drugi način prevazilaženja bi podrazumevao uključivanje površine interferenta u ukupnu površinu pika trifloksistrobina i pri obradi uzorka i pri obradi svih kalibracionih standarda.



Slika 4.1-18 SIM hromatogrami prečišćenih ekstrakata kore Greni Smita: blank i standarda (DBA + pesticidi) u rasponu koncentracija od 0,10 do 5,00 µg/mL⁻¹



Slika 4.1-19 Interferenca u blizini vremena eluiranja trifloksistrobina nakon ekstrakcije jona m/z 116 i stepen interferencije u zavisnosti od koncentracije pesticida; standardi pesticida u blank ekstraktu kore Greni Smita – A ($0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$), B ($0,50 \mu\text{g mL}^{-1}$), C ($1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$)

Linearnost i opseg metode. Tabela 4.1-4 sadrži sistematizovane podatke kalibracionih krivi koje pokrivaju procenjeni linearni opseg metode za sve tri ispitivane sorte. Linearnost metode je ispitivana u analitičkom opsegu 0,01 – 5,00 mgkg⁻¹ sa ukupno 14 koncentracija. Testirani analitički opseg se za većinu analita sastoji iz nekoliko linearnih opsega, koji pokrivaju oblast relativno niskih i relativno visokih koncentracija. Razlog za to je različita osetljivost prema analitima u ove dve oblasti koncentracija; osetljivost za oblast relativno niskih koncentracija je veća od osetljivosti za oblast relativno visokih koncentracija. Koeficijent korelacije je uvek iznad 0,9; za Ajdared se kreće od 0,9555 za trifloksistrobin (oblast niskih koncentracija) do 0,9979 za trifloksistrobin (oblast visokih koncentracija), za Zlatni Delišeš od 0,9711 za trifloksistrobin (oblast niskih koncentracija) do 0,9996 za pirimetanil (oblast visokih koncentracija), a za Greni Smit od 0,9756 za pirimetanil (oblast niskih koncentracija) do 1,00 za pirimetanil (oblast visokih koncentracija).

Tačnost i preciznost. U matriksu Zlatnog Delišeša i Ajdareda vrednosti tačnosti i repetabilnosti za odabrane nivoe koncentracija kao i vrednosti srednje tačnosti i srednje preciznosti za sve analite su u granicama koje propisuje SANTE direktiva za validaciju (EC: SANTE/12682/2019), izuzev za bifentrin u matriksu Zlatnog Delišeša (Tabela 4.1-5). Za bifentrin vrednosti srednje tačnosti i srednje preciznosti se nalaze u okviru proširenih granica koje propisuje SANTE, tj vrednosti tačnosti koje su izvan opsega 70–120 % su prihvatljive ako su ujednačene (RSD =<20 %), ali srednja tačnost treba da leži u granicama od 30 % do 140 %. Međutim, na srednjem nivou koncentracija (1 mgkg⁻¹) tačnost je nešto niža, a repetabilnost nešto viša u odnosu na propisani limit.

U matriksu Greni Smita, vrednosti srednje tačnosti i srednje preciznosti za sve analite leže u okviru proširenih granica SANTE direktive, sa vrednostima parametara nešto nižim u odnosu na druge dve sorte. U okviru pojedinačnih koncentracionih nivoa tačnost za pirimetanil i bifentrin na 1 mgkg⁻¹ i za boskalid na 5 mgkg⁻¹ je <30%. Opšti trend niže tačnosti za bifentrin se može objasniti najmanjom polarnošću ovog pesticida (log K_{ow} , Tabela 2.2-1–Tabela 2.2-5), a time i većim afinitetom prema precipitatu voska u odnosu na metanol, u okviru pripreme uzorka – koraka izmene rastvarača. Drugim rečima postoji veća verovatnoća za okluziju bifentrina u precipitatu.

Kada se uporede heksanski ekstrakt Greni Smit sorte sa heksanskim ekstraktima Zlatnog Delišeša i Ajdareda, uočava se oko 2,3 i 2,9 puta veća zastupljenost jedinjenja na 12,35 minuta. U skladu sa time niža tačnost za sve analite u matriksu Greni Smita bi mogla da se objasni znatno većom količinom jedinjenja iz frakcije voskova – koje ukazuje na veću ukupnu količinu voskova koja ova sorta ima u odnosu na druge dve – koja vodi većoj količini precipitata u okviru IR/PNT koraka i podjednake verovatnoće okluzije pesticida, nezavisno od njihove polarnosti.

Tabela 4.1-4 Parametri kalibracionih krivi koje pokrivaju linearni opseg metode

Analit	Opseg, mgkg ⁻¹	Broj standarda	Nagib	Odsečak	Koeficijent korelacije
Ajdared					
Pirimetaniil	0,01 – 0,05	8	13124284	81946	0,9889
Pirimetaniil	0,05 – 1,00	5	2326827	566973	0,9894
Ciprodinil	0,01 – 0,05	8	7544066	51824	0,9708
Ciprodinil	0,05 – 1,00	4	1310346	383465	0,9923
Trifloksistrobin	0,01 – 0,05	8	4918559	91799	0,9555
Trifloksistrobin	0,10 – 5,00	5	650928	332625	0,9979
Bifentrin	0,01 – 0,05	8	5342572	138699	0,9717
Bifentrin	0,10 – 5,00	6	650450	150878	0,9568
Boskalid	0,01 – 0,25	7	4971179	64220	0,9960
Zlatni Delišes					
Pirimetaniil	0,01 – 0,05	8	5077921	51888	0,9879
Pirimetaniil	0,05 – 1,00	4	1463356	240632	0,9996
Ciprodinil	0,01 – 0,05	8	4759459	32404	0,9770
Ciprodinil	0,50 – 5,00	4	1324201	-178211	0,9994
Trifloksistrobin	0,01 – 0,05	8	2679939	405257	0,9711
Trifloksistrobin	0,05 – 0,50	4	1081989	459025	0,9938
Trifloksistrobin	1,00 – 5,00	3	880706	2090378	0,9860
Bifentrin	0,01 – 0,05	8	3986514	41887	0,9932
Bifentrin	0,05 – 1,00	5	620630	212272	0,9957
Boskalid	0,01 – 0,05	8	4000961	261453	0,9932
Boskalid	0,10 – 5,00	6	295501	527555	0,9741
Greni Smit					
Pirimetaniil	0,01 – 0,03	5	5539567	35057	0,9756
Pirimetaniil	0,03 – 0,05	4	11883627	-165554	0,9900
Pirimetaniil	0,05 – 5,00	6	2783083	287337	1,0000
Ciprodinil	0,01 – 0,05	6	6123424	86055	0,9871
Ciprodinil	0,05 – 5,00	6	1867506	270286	1,0000
Trifloksistrobin	0,015 – 0,05	5	3608163	208707	0,9826
Trifloksistrobin	0,10 – 5,00	6	772676	299341	0,9998
Bifentrin	0,02 – 1,00	9	2664867	383158	0,9939
Boskalid	0,025 – 0,10	6	1934918	100589	0,9854
Boskalid	0,10 – 5,00	5	817096	215031	0,9993

N_C – broj kalibracionih standarda

Tabela 4.1-5 Tačnost i preciznost metode MET-GC-R

		Pirimetamil	Ciprodinil	Trifloksistrobin	Bifentrin	Boskalid
Koncentracija, mg kg ⁻¹		Zlatni Delišes				
0,10	Tačnost, %	67,53	104,47	94,90	41,23	76,39
	Repetabilnost, %	15,49	12,24	10,08	12,12	15,33
1,00	Tačnost, %	88,32	101,17	90,06	28,32	91,67
	Repetabilnost, %	20,07	22,30	27,15	23,77	18,24
5,00	Tačnost, %	93,25	92,15	94,88	40,27	97,29
	Repetabilnost, %	7,71	7,75	9,11	6,73	6,52
Srednja tačnost, %*		83,03	99,26	93,28	36,60	88,45
Srednja preciznost, %**		14,42	14,09	15,45	14,20	13,36
Koncentracija, mg kg ⁻¹		Ajdared				
0,10	Tačnost, %	78,24	87,82	92,64	78,75	72,56
	Repetabilnost, %	11,71	14,63	8,90	20,54	27,66
1,00	Tačnost, %	91,26	96,52	119,47	71,65	80,79
	Repetabilnost, %	9,37	10,42	10,93	11,40	11,06
5,00	Tačnost, %	98,00	102,12	117,44	33,13	96,69
	Repetabilnost, %	12,31	12,27	10,31	16,52	12,13
Srednja tačnost, %		89,17	95,49	109,85	61,18	83,35
Srednja preciznost, %		11,13	12,44	10,05	16,15	16,95
Koncentracioni nivo, mg kg ⁻¹		Greni Smit				
0,10	Tačnost, %	56,00	57,10	82,72	45,52	63,56
	Repetabilnost, %	18,89	21,34	19,71	12,02	17,99
1,00	Tačnost, %	24,90	30,46	36,73	24,25	32,04
	Repetabilnost, %	20,00	12,98	15,70	13,77	17,56
5,00	Tačnost, %	39,97	35,10	45,84	39,79	29,86
	Repetabilnost, %	1,34	1,11	20,20	4,41	7,72
Srednja tačnost, %		40,29	40,89	55,10	36,52	41,82
Srednja preciznost, %		13,41	11,81	18,53	10,06	14,42

*Suma tačnosti za 3 koncentracije podeljena sa brojem koncentracija

** Koeficijent varijacije tačnosti za 3 koncentracije

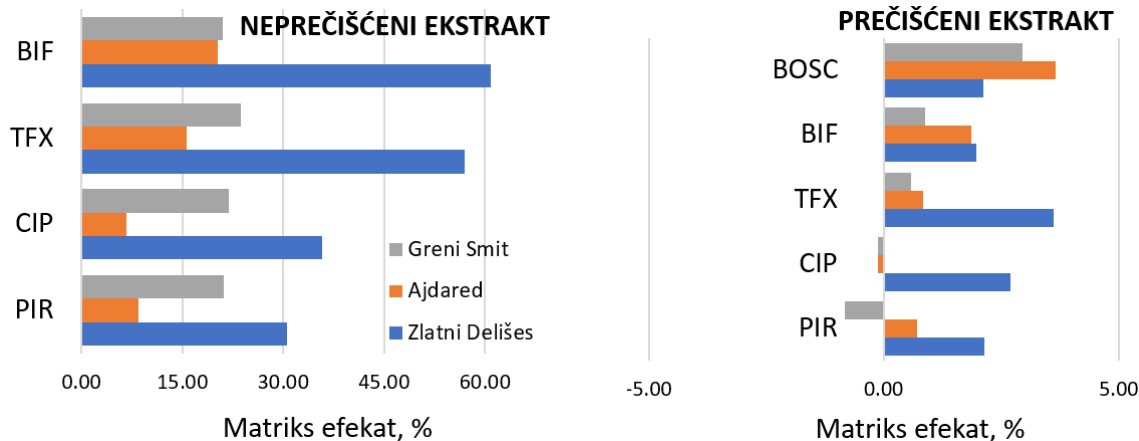
Matriks efekat. Matriks efekat u neprečišćenom ekstraktu je za pirimetamil procenjivan u opsegu 0,10 – 2,50 µg mL⁻¹ u okviru sorti Zlatni Delišes i Greni Smit, dok je u okviru sorte Ajdared procenjivan u opsegu 0,10 – 5,00 µg mL⁻¹. Za ciprodinil, matriks efekat je procenjivan u opsegu 0,10 – 2,50 µg mL⁻¹ u okviru sorte Greni Smit i u opsegu 0,10 – 5,00 µg mL⁻¹ za ostale dve sorte. Matriks efekat za trifloksistrobin je procenjivan u opsegu 0,10 – 2,50 µg mL⁻¹ za sortu Zlatni Delišes i u opsegu 0,10 – 5,00 µg mL⁻¹ u okviru sorti Ajdared i Greni Smit. Matriks efekat za bifentrin je procenjivan u linearnom opsegu 0,10 – 5,00 µg mL⁻¹ za sorte Zlatni Delišes i Ajdared i u opsegu 1,00 – 5,00 µg mL⁻¹ za sortu Greni Smit. U okviru ovih opsega je na osnovu grafičke zavisnosti matriks efekta od koncentracije standarda utvrđeno da ne postoji značajna promena matriks efekta sa koncentracijom analita.

U okviru sorte Zlatni Delišes se uočava pozitivan matriks efekat za sve analite koji je izvan granica umerenog; kreće se od 30,56 % za pirimetamil do 60,84 % za bifentrin (Slika 4.1-20). U okviru sorti Ajdared i Greni Smit se uočava pozitivan matriks efekat, ali manje izražen u

odnosu na Zlatni Delišeš; kreće se od 6,69 % za ciprodinil do 20,19 % za trifloksistrobin za sortu Ajdared i od 21,08 % za pirimetanil do 23,71 % za trifloksistrobin za sortu Greni Smit.

Opsežnije ispitivanje matriks efekta u heksanskim ekstraktima kore i pulpe Zlatnog Delišesa i Greni Smita koncentracije $1,00 \text{ gmL}^{-1}$ je pokazalo da se u ekstraktima pulpe javlja pozitivan, a u ekstraktima kore negativan matriks efekat i da je manifestacija najizraženija za sortu Greni Smit (Branković *et al.*, 2019). Razlika u predznaku matriks efekta je objašnjena različitom količinom voskova u ova dva matriksa; inverzija iz pozitivnog u negativan matriks efekat u kori je verovatno posledica delimičnog isparavanja ili kondenzacije isparenog dela znatno većih količina teško isparljivih voskova prisutnih u kori, koji fiksiraju analite u okviru depozita i/ili blokiraju ulaz na kolonu, a time i nanošenje analita. Isto ispitivanje je pokazalo da razblaženje ekstrakata kore Greni Smita vodi inverziji matriks efekta iz negativnog u pozitivni. Inverzija za trifloksistrobin se kreće od -2,80 % za ekstrakt koncentracije $0,80 \text{ gmL}^{-1}$ do 19,20 % za ekstrakt koncentracije $0,10 \text{ gmL}^{-1}$. Inverzija za ciprodinil se kreće od -22,50 do 51,50 %, za pirimetanil od -33,00 to 106,40 %, a za bifentrin od 0,98 do 39,20 %. Pojava inverzije sa razblaženjem je objašnjena smanjivanjem koncentracije voskova u ekstraktu, ispod kritične koncentracije koja vodi blokiranju ulaza kolone/fiksaciji analita. Rezultati prezentovani u ovom istraživanju obuhvataju procenu matriks efekta u heksanskom ekstraktu kore koncentracije $0,50 \text{ gmL}^{-1}$, pa je manifestacija pozitivnog matriks efekta u skladu sa rezultatima opsežnijeg ispitivanja.

Matriks efekat u prečišćenim ekstraktima se za sve analite kreće u granicama $\pm 5\%$ odnosno može se smatrati eliminisanim (Slika 4.1-20). S obzirom da je glavni ishod prečišćavanja bilo uklanjanje voskova, može se smatrati da oni doprinose pojavi matriks efekta.



Slika 4.1-20 Matriks efekat u neprečišćenom i prečišćenom ekstraktu kore Zlatnog Delišesa, Ajdareda i Greni Smita

Granica detekcije i granica kvantifikacije. Granice detekcije pirimetanila se kreću od $0,0005 \text{ mgkg}^{-1}$ u pulpi Ajdareda do $0,0112 \text{ mgkg}^{-1}$ u kori Greni Smita (Tabela 4.1-6). Granice detekcije ciprodinila se kreću od $0,03 \text{ }\mu\text{gkg}^{-1}$ u pulpi Ajdareda do $0,0082 \text{ mgkg}^{-1}$ u kori Ajdareda. Granice detekcije trifloksistrobina se kreću od $0,0003 \text{ mgkg}^{-1}$ u pulpi Ajdareda do $0,0102 \text{ mgkg}^{-1}$ u kori Ajdareda. Granice detekcije bifentrina se kreću od $0,0006 \text{ mgkg}^{-1}$ u pulpi Zlatnog Delišesa do $0,0105 \text{ mgkg}^{-1}$ u kori Greni Smita. Granice detekcije boskalida se kreću od $0,0006 \text{ mgkg}^{-1}$ u kori Ajdareda do $0,0111 \text{ mgkg}^{-1}$ u plodu Zlatnog Delišesa.

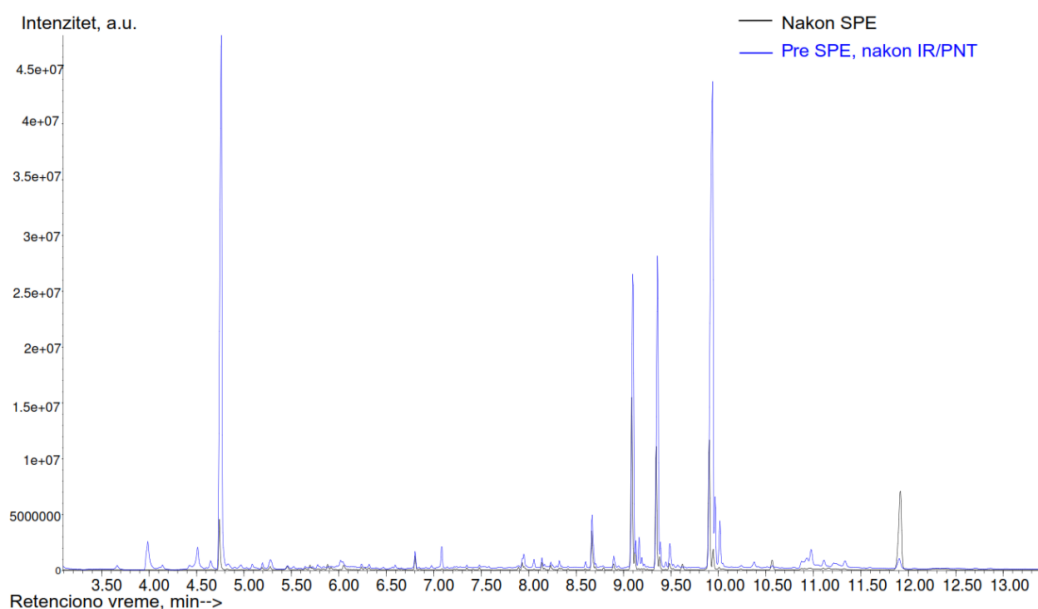
Vrednosti od $0,03$ i $0,1 \text{ }\mu\text{gkg}^{-1}$ za ciprodinil u pulpi Ajdareda su najniže procenjene granice detekcije i granice kvantifikacije metode, respektivno (Tabela 4.1-6).

Tabela 4.1-6 Granice detekcije i granice kvantifikacije instrumentalne i celokupne analitičke metode sa pripadajućim parametrima

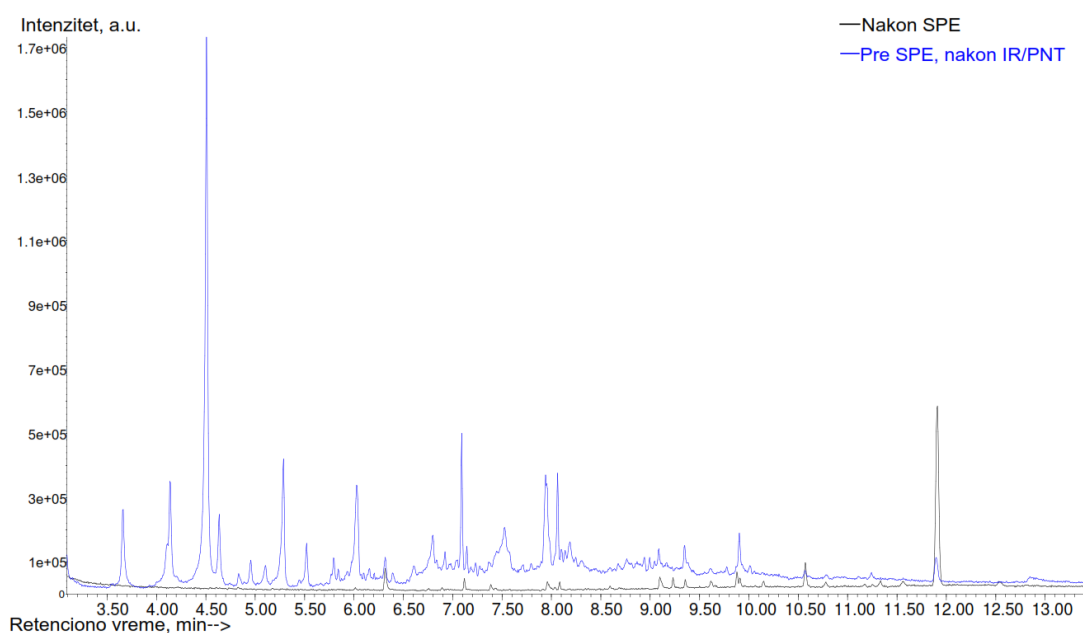
	Analit:	Pirimetamil	Ciprodinil	Trifloksistrobin	Bifentrin	Boskalid
	Matriks:			Greni Smit		
Kora	Nagib	8193173	6221740	4112370	4539999	3145579
	R ²	0,9474	0,9861	0,9613	0,9528	0,9605
	<i>m</i> LOD, mg kg ⁻¹	0,0112	0,0056	0,0095	0,0105	0,0096
	<i>m</i> LOQ, mg kg ⁻¹	0,0339	0,0171	0,0289	0,0320	0,0292
Plod	Nagib	8969544	7569223	4815723	3914456	4101115
	R ²	0,9781	0,9899	0,9439	0,9782	0,9985
	<i>m</i> LOD, mg kg ⁻¹	0,0103	0,0052	0,0084	0,0094	0,0082
	<i>m</i> LOQ, mg kg ⁻¹	0,0343	0,0173	0,0280	0,0313	0,0273
Pulpa	Nagib	12715256	11600234	5451398	5615554	7112396
	R ²	0,9885	0,9981	0,9799	0,9953	0,9999
	<i>m</i> LOD, mg kg ⁻¹	0,0092	0,0038	0,0069	0,0078	0,0065
	<i>m</i> LOQ, mg kg ⁻¹	0,0306	0,0126	0,0230	0,0260	0,0216
	Matriks:			Ajdared		
Kora	Nagib	13124284	7544066	4918559	5342572	3686890
	R ²	0,9870	0,9659	0,9481	0,9670	0,9997
	<i>m</i> LOD, mg kg ⁻¹	0,0050	0,0082	0,0102	0,0081	0,0006
	<i>m</i> LOQ, mg kg ⁻¹	0,0152	0,0249	0,0310	0,0245	0,0020
Plod	Nagib	11032089	8877987	3524236	6254538	2347766
	R ²	0,9974	0,9883	0,9867	0,9970	0,9983
	<i>m</i> LOD, mg kg ⁻¹	0,0024	0,0051	0,0055	0,0026	0,0019
	<i>m</i> LOQ, mg kg ⁻¹	0,0072	0,0156	0,0167	0,0078	0,0058
Pulpa	Nagib	11220945	8716154	3636193	7744281	2318595
	R ²	0,9998	0,9999	0,9999	0,9997	0,9987
	<i>m</i> LOD, mg kg ⁻¹	0,0005	0,00003	0,0003	0,0007	0,0016
	<i>m</i> LOQ, mg kg ⁻¹	0,0016	0,0001	0,0009	0,0023	0,0050
	Matriks:			Zlatni Delišes		
Kora	Nagib	5077921	4759459	2713856	3986514	4002465
	R ²	0,9879	0,9770	0,9998	0,9931	0,9937
	<i>m</i> LOD, mg kg ⁻¹	0,0052	0,0073	0,0004	0,0039	0,0037
	<i>m</i> LOQ, mg kg ⁻¹	0,0159	0,0221	0,0014	0,0119	0,0114
Plod	Nagib	12334123	7272817	3256412	4312043	2191259
	R ²	0,9992	0,9958	0,9611	0,9761	0,9481
	<i>m</i> LOD, mg kg ⁻¹	0,0013	0,0030	0,0095	0,0074	0,0111
	<i>m</i> LOQ, mg kg ⁻¹	0,0039	0,0093	0,0289	0,0225	0,0337
Pulpa	Nagib	11949084	9176957	3123992	7383290	2803416
	R ²	0,9989	0,9978	0,9864	0,9998	0,9994
	<i>m</i> LOD, mg kg ⁻¹	0,0015	0,0022	0,0055	0,0006	0,0010
	<i>m</i> LOQ, mg kg ⁻¹	0,0046	0,0067	0,0169	0,0020	0,0032

4.1.2.3 Migracija pesticida kroz koru jabuke

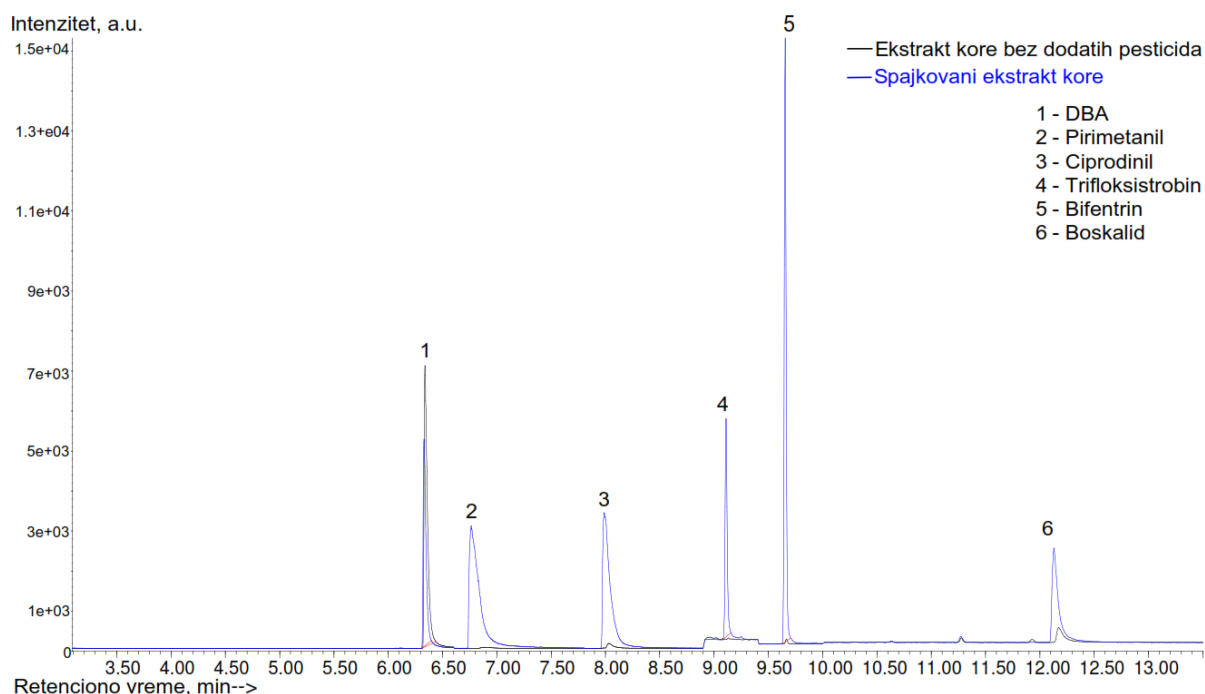
S obzirom na uočen problem selektivnosti za trifloksistrobin, radi tačnijeg određivanja koncentracije ovog pesticida u okviru ispitivanja migracije uveden je korak dodatnog prečišćavanja ekstrakta ekstrakcijom na čvrstoj fazi u odnosu na metodu MET-GC-R. Glavna prednost prečišćavanja sa datim količinama sorbenata je značajno rasterećenje ekstrakata kore od farnesena i jedinjenja iz klase estara (Slika 4.1-21), kao i potpuno uklanjanje ovih jedinjenja iz ekstrakata pulpe (Slika 4.1-22). Prečišćavanje je takođe rezultiralo uklanjanjem pigmenata koji su se zadržali na C₁₈ sorbentu (Slika 4.1-24). Posmatrajući hromatogram ekstrakta kore Zlatnog Delišesa nakon oba koraka prečišćavanja (Slika 4.1-23) zaključuje se da se uklanjanjem pigmentacije i rasterećenjem ekstrakta kore otklanja problem selektivnosti za trifloksistrobin.



Slika 4.1-21 Hromatogram blank ekstrakata kore Zlatnog Delišesa nakon prvog i nakon prvog i drugog prečišćavanja u *scan* režimu

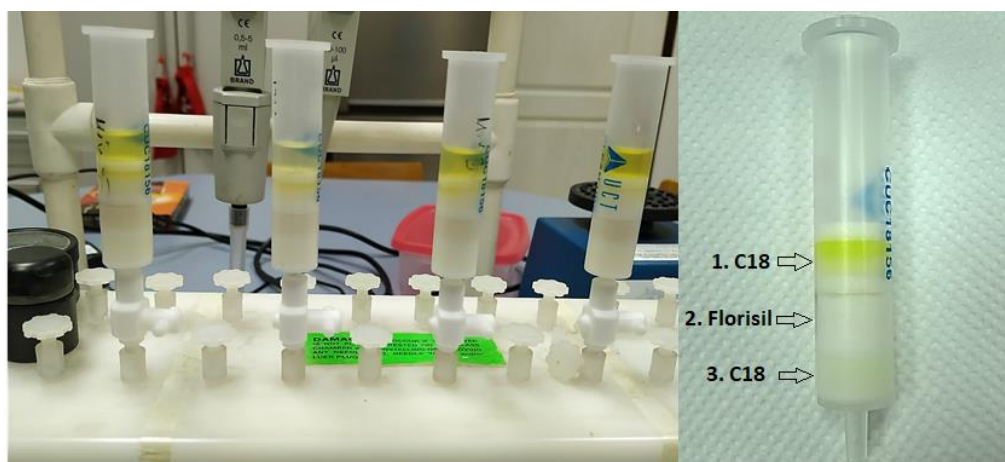


Slika 4.1-22 Hromatogram blank ekstrakata pulpe Zlatnog Delišesa nakon prvog i nakon prvog i drugog prečišćavanja u *scan* režimu



Slika 4.1-23 SIM hromatogrami ekstrakata kore Greni Smita nakon koraka SPE, sa internim standardom ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$), bez dodatih pesticida i sa dodatim pesticidima ($0,45 \mu\text{g mL}^{-1}$)

Florisil® i sorbent na bazi C_{18} faze su kombinovani zbog toga što se razlikuju u polarnosti i u mehanizmima vezivanja primesa, pa je pretpostavka da bi spektar vezanih primesa bio veći nego pri upotrebi samo C_{18} sorbenta. Drugi sloj C_{18} sorbenta (koji sledi Florisil®, na dnu kertridža) je uveden jer su ekstrakti Zlatnog Delišesa, ali i Ajdareda u zavisnosti od zrelosti ploda, opterećeni pigmentima, pa je kapacitet prvog sloja C_{18} probijen; sukcesivnom primenom C_{18} faze je ujedno obezbeđena višestepena ekstrakcija nečistoća, po analogiji sa višestepenim tečno-tečno ekstrakcijama (Slika 4.1-24). Nakon apliciranja ekstrakta u metanolu, deo pesticida prolazi kolonu bez zadržavanja, a deo biva zadržan. Selektivno eluiranje zadržane frakcije je vršeno metanolom. Ostali eluenti – testirani su aceton, dihlormetan, etanol, acetonitril – su se pokazali manje pogodnim, jer eluiraju i obojene primese sa C_{18} faze.



Slika 4.1-24 Ilustracija SPE procedure i kertridž nakon prečišćavanja uzorka

Ispitivanje stepena usvajanja pesticida metodom potapanja

Granice detekcije ($mLOD$) i granice kvantifikacije metode ($mLOQ$) za koru se kreću u granicama od 0,012 do 0,020 i od 0,037 do 0,061 $mgkg^{-1}$, respektivno. Granice detekcije i granice kvantifikacije metode za pulpu se kreću u granicama od 0,009 do 0,026 i od 0,028 do 0,079 $mgkg^{-1}$, respektivno (Tabela 4.1-7).

Tabela 4.1-7 $mLOD$ i $mLOQ$ vrednosti za MET-GC-R metodu proširenu za korak SPE prečišćavanja

	Analit	$mLOD, mgkg^{-1}$	$mLOQ, mgkg^{-1}$
Matriks: Kora	Pirimetamil	0,016	0,048
	Ciprodinil	0,020	0,060
	Trifloksistrobin	0,020	0,061
	Bifentrin	0,012	0,037
	Boskalid	0,016	0,050
Matriks: Pulpa	Pirimetamil	0,010	0,032
	Ciprodinil	0,015	0,047
	Trifloksistrobin	0,009	0,028
	Bifentrin	0,026	0,079
	Boskalid	0,011	0,035

Reziduali pesticida vs. Vreme ekspozicije. Kvantifikacija u uzorcima kore je za sve analite vršena u linearnom analitičkom opsegu 0,00 – 0,70 $mgkg^{-1}$. Linearni opseg za trifloksistrobin je obuhvatio svih 10 kalibracionih standarda, dok je taj broj manji za ostale analite (Tabela 4.1-8). Kvantifikacija u uzorcima pulpe je vršena u linearnom analitičkom opsegu 0,00 – 0,20 $mgkg^{-1}$ za sve analite, izuzev boskalida za koji je linearnost procenjena u opsegu 0,01 – 0,10 $mgkg^{-1}$.

Tabela 4.1-8 Parametri kalibracionih kriva korišćenih u kvantifikaciji uzoraka kore i pulpe u okviru eksperimenta praćenja usvajanja pesticida tokom vremena

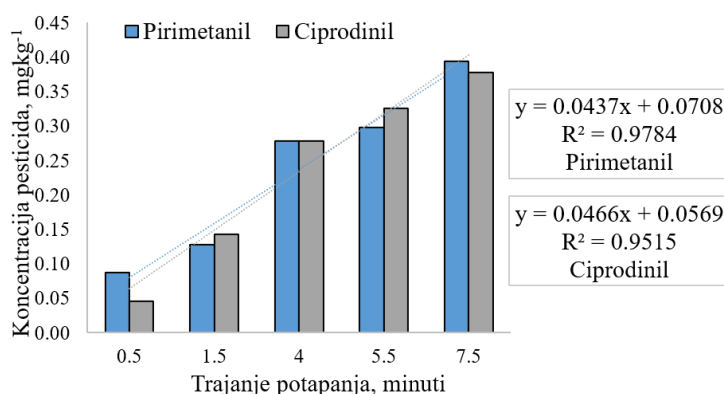
Analit	Linearni opseg, $mgkg^{-1}$ (N_c)	Koeficijent korelacije	Nagib	Odsečak
Matriks: Kora				
Pirimetamil	0,00 – 0,70 (7)	0,9801	11,0879	-0,0571
Ciprodinil	0,00 – 0,70 (7)	0,9725	6,3243	0,1843
Trifloksistrobin	0,00 – 0,70 (10)	0,9943	9,0365	-0,0701
Bifentrin	0,00 – 0,70 (8)	0,9756	6,3626	0,2656
Boskalid	0,00 – 0,70 (8)	0,9958	6,4708	-0,0039
Matriks: Pulpa				
Pirimetamil	0,00 – 0,20 (5)	0,9988	14,5238	0,2998
Ciprodinil	0,00 – 0,20 (5)	0,9981	7,2048	0,4253
Trifloksistrobin	0,00 – 0,20 (7)	0,9944	12,4337	-0,0165
Bifentrin	0,00 – 0,20 (6)	0,9910	8,1717	0,1213
Boskalid	0,01 – 0,10 (5)	0,9896	7,4526	-0,0399

N_c – broj kalibracionih standarda

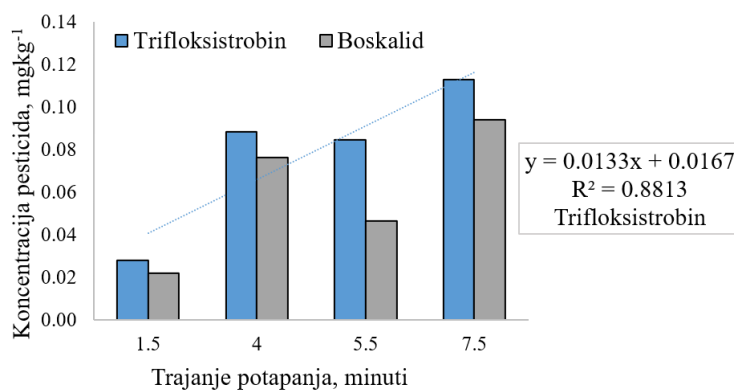
Količina svakog od pesticida u prvom sloju pulpe je za svaki od intervala potapanja bila ispod granice kvantifikacije metode za ovaj matriks; zaključeno je da nema značajnog prodora pesticida kroz koru u testiranim intervalima potapanja. Količina pirimetanila i ciprodinila u kori

se kreće od 0,087 i 0,045 mgkg⁻¹ za interval potapanja od 0,5 minuta do 0,393 i 0,378 mgkg⁻¹ za interval potapanja od 7,5 minuta, respektivno (Tabela 4.1-9). Najveća tendencija ka sorpciji na plod jabuke je uočena za bifentrin, kojeg je detektovano 3,686 mgkg⁻¹ nakon 7,5 minuta potapanja, dok je najnižu tendenciju pokazao boskalid, koji nije detektovan u kori nakon 0,5 minuta potapanja, a dostiže količinu od 0,094 mgkg⁻¹ nakon 7,5 minuta potapanja. Takođe, nakon 0,5 minuta potapanja količina trifloksistrobina u kori je oko procenjene mLOD, tačnije nešto je niža od nje (0,017 mgkg⁻¹). Korelacija intervala potapanja ploda i količine pesticida u kori je dvojak. Između ovih parametara uočena je linearna zavisnost za pirimetanil, ciprodinil i trifloksistrobin, a eksponencijalna za bifentrin (Slika 4.1-25 - Slika 4.1-27). Za boskalid nije uočena definisana zavisnost. Ukoliko se brzina povećanja koncentracije pesticida u kori posmatra kroz nagib linearnih kriva, može se smatrati da su brzine sorpcije međusobno uporedive za pirimetanil i ciprodinil, i da su nešto veće od brzine sorpcije trifloksistrobina.

Ukoliko se uzme u obzir prosečna masa kore dobijena sa tri potapana ploda (replikata) i masa svakog pesticida u 300 mL rastvora za potapanje koncentracije 1 mgL⁻¹, može se izračunati količina pesticida u kori (mgkg⁻¹) u hipotetičkom slučaju 100 % sorpcije. U tom slučaju, teoretski maksimum za svaki pesticid bi bio: 19,75 mgkg⁻¹; 21,30 mgkg⁻¹; 21,79 mgkg⁻¹; 18,83 mgkg⁻¹ i 19,00 mgkg⁻¹ u kori plodova potapanih u trajanju od 0,5; 1,5; 4,0; 5,5 i 7,5 minuta, respektivno. U tom slučaju je moguće izračunati procenat usvajanja pesticida nakon svakog od intervala potapanja (Tabela 4.1-9).

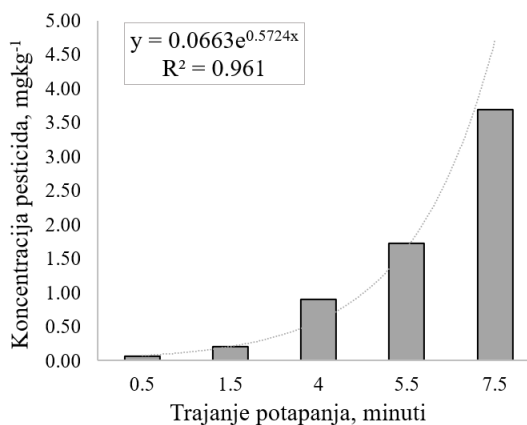


Slika 4.1-25 Odnos između perioda potapanja plodova u rastvor pesticida i detektovane količine pirimetanila i ciprodinila u kori



Slika 4.1-26 Odnos između perioda potapanja plodova u rastvor pesticida i detektovane količine trifloksistrobina i boskalida u kori

Slika 4.1-27 Odnos između perioda potapanja plodova u rastvor pesticida i detektovane količine bifentrina u kori



Iz rastvora se na plod nakon 7,5 minuta potapanja aplicira skoro 20 % početne mase bifentrina i oko 2 % pirimetanila i ciprodinila, dok je procenat apliciranog trifloksistrobina i boskalida oko 0,5 %. Sa porastom dužine potapanja plodova procenat apliciranog pirimetanila, ciprodinila i trifloksistrobina raste linearno ($R^2 = 0,9974$, $0,9762$ i $0,9589$ respektivno), ali u vrlo malom opsegu, što ukazuje da ne dolazi do značajne promene koncentracije ovih pesticida u rastvoru. Procenat apliciranog bifentrina raste eksponencijalno ($R^2 = 0,9709$), dok procenat apliciranog boskalida ostaje ujednačen.

Tabela 4.1-9 Količina pesticida u kori i procenat usvajanja pesticida (n=3) nakon potapanja plodova u rastvor pesticida koncentracije 1 mgL⁻¹ u različitom trajanju

Vreme, min	Količina	Pirimetanil	Ciprodinil	Trifloksistrobin	Bifentrin	Boskalid
0,50	mgkg ⁻¹	0,087	0,045	< _m LOD	0,058	nije detektovan
	(RSD, %)	(32,35)	(24,80)		(15,75)	
	% sorpcije	0,44	0,23	/	0,29	/
1,50	mgkg ⁻¹	0,128	0,143	0,028	0,204	0,022
	(RSD, %)	(31,09)	(18,76)	(7,01)	(15,25)	(32,18)
	% sorpcije	0,60	0,67	0,13	0,96	0,10
4,00	mgkg ⁻¹	0,278	0,278	0,088	0,903	0,076
	(RSD, %)	(35,68)	(18,83)	(29,64)	(26,67)	(17,49)
	% sorpcije	1,28	1,28	0,41	4,15	0,35
5,50	mgkg ⁻¹	0,297	0,325	0,084	1,720	0,046
	(RSD, %)	(32,08)	(26,69)	(44,25)	(23,72)	(25,85)
	% sorpcije	1,58	1,73	0,45	9,13	0,25
7,50	mgkg ⁻¹	0,393	0,378	0,113	3,686	0,094
	(RSD, %)	(21,54)	(13,13)	(23,64)	(8,69)	(1,23)
	% sorpcije	2,07	1,99	0,59	19,39	0,49

Reziduali pesticida vs. Koncentracija rastvora. Kvantifikacija u uzorcima kore je za sve analite vršena u linearnom analitičkom opsegu 0,00 – 0,70 mgkg⁻¹. Linearni opseg za trifloksistrobin je obuhvatio svih 10 kalibracionih standarda, dok je taj broj manji za ostale analite (Tabela 4.1-10). Kvantifikacija u uzorcima pulpe je vršena u linearnom analitičkom opsegu 0,00 – 0,20 mgkg⁻¹ za trifloksistrobin i bifentrin, u linearnom opsegu 0,00 – 0,075 mgkg⁻¹ za pirimetanil i ciprodinil i u linearnom opsegu 0,01 – 0,10 mgkg⁻¹ za boskalid (Tabela 4.1-10).

Tabela 4.1-10 Parametri kalibracionih krivi korišćenih u kvantifikaciji uzoraka kore i pulpe u okviru eksperimenta praćenja usvajanja pesticida sa porastom koncentracije rastvora

Analit	Linearni opseg, mgkg ⁻¹ (N_C)	Koeficijent korelacije	Nagib	Odsečak
Matriks: Kora				
Pirimetanil	0,00 – 0,70 (5)	0,9996	10,7749	0,2116
Ciprodinil	0,00 – 0,70 (5)	0,9983	6,8006	0,2753
Trifloksistrobin	0,00 – 0,70 (10)	0,9955	10,2371	-0,0141
Bifentrin	0,00 – 0,70 (7)	0,9894	7,2319	0,2570
Boskalid	0,00 – 0,70 (9)	0,9945	8,1220	-0,0418
Matriks: Pulpa				
Pirimetanil	0,00 – 0,075 (4)	0,9924	15,5154	0,3557
Ciprodinil	0,00 – 0,075 (4)	0,9956	7,2913	0,5043
Trifloksistrobin	0,00 – 0,20 (7)	0,9880	15,1614	0,0366
Bifentrin	0,00 – 0,20 (5)	0,9978	9,9409	0,1960
Boskalid	0,01 – 0,20 (5)	0,9957	13,0055	-0,0669

N_C – broj kalibracionih standarda

Analizom nasumično odabranih plodova iz skupa plodova određenih za ovaj eksperiment je utvrđeno da nema prisustva testiranih pesticida (Tabela 4.1-11); s obzirom na odabir plodova po principu slučajnog uzorka, može se smatrati da su odabrani blank uzorci reprezentativni.

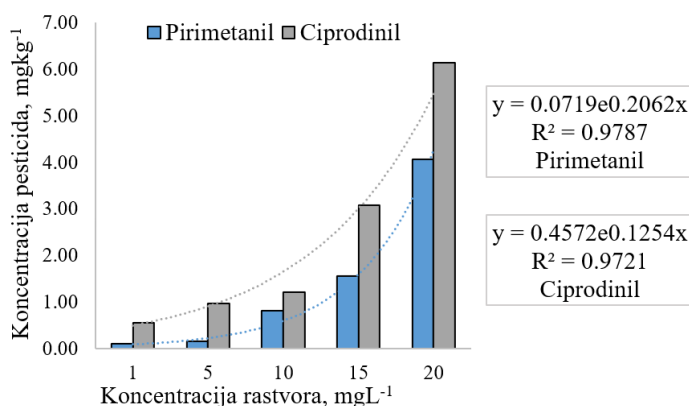
Količina pirimetanila u kori plodova se kreće od 0,092 mgkg⁻¹ za plodove potapane u rastvor koncentracije 1,00 mgL⁻¹ do 4,051 mgkg⁻¹ za plodove potapane u rastvor koncentracije 20,00 mgL⁻¹. Raspon detektovanih količina ciprodinila u testiranom opsegu koncentracija je od 0,542 do 6,135 mgkg⁻¹, trifloksistrobina od 0,176 do 0,643 mgkg⁻¹ i bifentrina od 0,293 do 0,745 mgkg⁻¹. Količina boskalida u kori ploda potapanog u rastvor koncentracije 1,00 mgL⁻¹ je ispod procenjene $mLOD$ (0,010 mgkg⁻¹), a u oblasti koncentracija rastvora 5,00 – 20,00 mgL⁻¹ se kreće od 0,070 do 0,354 mgkg⁻¹.

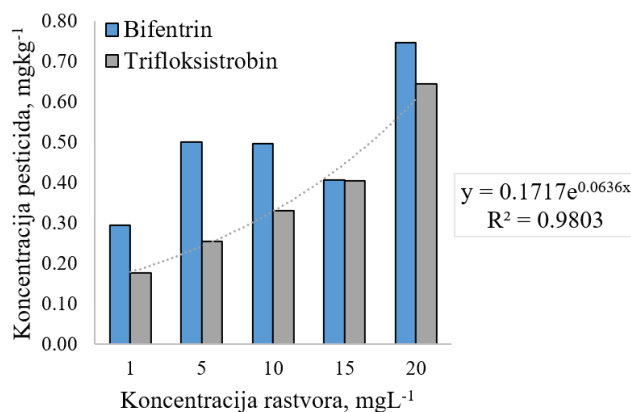
Između količine pirimetanila, ciprodinila, trifloksistrobina i boskalida u kori i koncentracije ovih pesticida u rastvoru uočena je eksponencijalna zavisnost (Slika 4.1-28 - Slika 4.1-30); sa porastom koncentracije rastvora kojem se plodovi izlažu raste količina pesticida u kori, sa visokim stepenom korelacije. Između količine bifentrina u kori i koncentracije ovog pesticida u rastvoru nije uočena posebna zavisnost (Slika 4.1-29), jer porast koncentracije rastvora od 5,00 do 15,00 mgL⁻¹ nije doveo do značajne promene u količini bifentrina u kori. Međutim, ako se promena količine ovog pesticida posmatra za tri koncentracije rastvora (1,00; 10,00 i 20,00 mgL⁻¹) uočava se jaka linearna korelacija ($R^2 = 0,9991$).

Tabela 4.1-11 Količina pesticida u kori i procenat usvajanja pesticida (n=3) nakon potapanja plodova u trajanju od 1,50 minuta u rastvore pesticida rastućih koncentracija

Koncentracija rastvora, mgL ⁻¹	Količina	Pirimetamil	Ciprodinil	Trifloksistrobin	Bifentrin	Boskalid
0,00	mgkg ⁻¹ (RSD, %)	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD
	% sorpcije	/	/	/	/	/
1,00	mgkg ⁻¹ (RSD, %)	0,092 (33,55)	0,542 (22,98)	0,176 (22,15)	0,293 (2,08)	< _m LOD
	% sorpcije	0,53	3,12	1,01	1,69	/
5,00	mgkg ⁻¹ (RSD, %)	0,152 (9,83)	0,966 (2,97)	0,253 (10,30)	0,500 (19,86)	0,070 (25,63)
	% sorpcije	0,18	1,17	0,31	0,61	0,09
10,00	mgkg ⁻¹ (RSD, %)	0,803 (29,37)	1,210 (22,10)	0,329 (42,71)	0,496 (26,28)	0,124 (34,10)
	% sorpcije	0,46	0,70	0,19	0,29	0,07
15,00	mgkg ⁻¹ (RSD, %)	1,551 (24,12)	3,077 (26,29)	0,404 (10,05)	0,405 (26,70)	0,190 (15,36)
	% sorpcije	0,58	1,16	0,15	0,15	0,07
20,00	mgkg ⁻¹ (RSD, %)	4,051 (10,05)	6,135 (24,39)	0,643 (5,56)	0,745 (17,91)	0,354 (8,13)
	% sorpcije	1,07	1,62	0,17	0,20	0,09

Slika 4.1-28 Odnos između koncentracije pirimetanila i ciprodinila u rastvoru za potapanje i koncentracije određene u kori

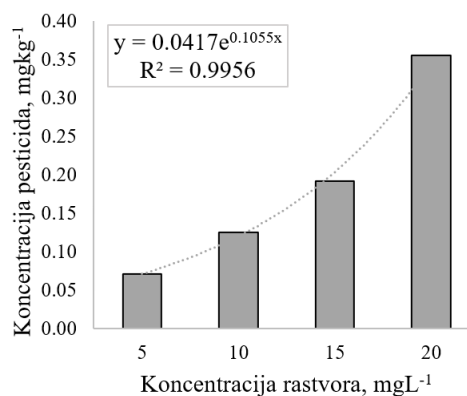




Slika 4.1-29 Odnos između koncentracije trifloksistrobina i bifentrina u rastvoru za potapanje i koncentracije određene u kori

Procenat apliciranja pesticida iz rastvora na plod je nizak i kreće se u uskim granicama, od 0,07 % za boskalid u rastvorima koncentracije 10,00 i 15,00 mgL⁻¹ do 3,12 % za ciprodinil u rastvoru koncentracije 1,00 mgL⁻¹. Interesantno je da se procenat mase apliciranog trifloksistrobina i bifentrina sa porastom koncentracije rastvora smanjuje po logaritamskoj zavisnosti ($R^2 = 0,9108$ i $0,9573$ za trifloksistrobin i bifentrin, respektivno), dok za boskalid nema značajne promene u procentu aplicirane mase. Za pirimetanil i ciprodinil se javlja minimum u procentu aplicirane mase u rastvoru koncentracije 5,00 i 10,00 mgL⁻¹, respektivno.

Posmatrajući parametre u okviru ovih ispitivanja – a) vreme kontakta plodova sa rastvorom i b) koncentracija rastvora – uočava se da je u prvom slučaju uvek najviše apliciranog bifentrina, a potom pirimetanila i ciprodinila, dok je u drugom slučaju situacija obrnuta, više je apliciranog pirimetanila i ciprodinila počevši od rastvora koncentracije 10,00 mgL⁻¹. Veća koncentracija bifentrina u kori u odnosu na druge pesticide u prvom slučaju može se objasniti činjenicom da bifentrin kao najnepolarnije odnosno najlipofilnije jedinjenje ima najveći podeoni koeficijent između voskastog sloja sa površine ploda i vodenog rastvora pesticida. S obzirom da koeficijent raspodele zavisi od hemijskog sastava jedinjenja i polarosti grupa u okviru njega, produženje kontakta plodova sa rastvorom pesticida međusobno ne ujednačava količine pesticida u kori, već je limitirajući faktor u sorpciji pesticida stepen njihove polarosti.



Slika 4.1-30 Odnos između koncentracije boskalida u rastvoru za potapanje i koncentracije određene u kori

Iako se trifloksistrobin, zaključujući na osnovu pK_{ow} , po lipofilnosti nalazi između bifentrina i ostalih pesticida, njegova količina u kori je uvek manja od količine anilinopirimidina, a približna količini boskalida. Uzrok ovoga može biti oblik i veličina molekula i eventualne sterne smetnje koje mogu prosteći iz toga. Kada je vreme kontakta ograničeno, a raste koncentracija pesticida kojoj se plodovi izlažu, u kori značajno više ima ciprodinila i pirimetanila u odnosu na druge pesticide. Ako se izuzme boskalid, ovi pesticidi su posmatrajući pK_{ow} najpolarniji i posmatrajući strukturu i masu molekula najmanji, pa se njihova veća količina u kori može objasniti većim koeficijentom difuzije u odnosu na druge pesticide. Usled toga brže difunduju

kroz rastvor do površine ploda, ali i brže i lakše ostvaruju prodor kroz površinske slojeve voskova za ograničeno vreme kontakta. Sa porastom koncentracije preko $10,00 \text{ mgL}^{-1}$ uočava se ujednačenje u količinama trifloksistrobina i bifentrina, odnosno njihove koncentracije postaju uporedive.

Za boskalid se može reći, kada je u pitanju prodor kroz slojeve voska, da poseduje karakteristike veličine i sastava molekula koji ga čine manje prodornim u odnosu na ostale pesticide. Pored ovih sorpcionih karakteristika, izvesno je da određeni doprinos imaju i aditivi koji potiču iz komercijalnih preparata. Koncentracija aditiva je identična za sve rastvore u okviru ispitivanja vremena ekspozicije, dok u drugom delu eksperimenta raste sa porastom koncentracije pesticida u rastvorima.

Ispitivanje migracije pesticida u odnosu na strukturu ploda

Količina pesticida u kori (mgkg^{-1}) koja je određena odmah po završetku potapanja plodova, bez njihovog stajanja, usvojena je kao količina koja se datim postupkom potapanja aplicira na plod jabuke. Masa pesticida aplicirana ovim postupkom, izračunata množenjem izmerene količine (mgkg^{-1}) i mase kore (kg), usvojena je u postupku praćenja migracije pesticida kao početna masa pesticida prisutna u plodovima (100 %).

Rezultati ispitivanja ekspozicije plodova nižim koncentracijama. Potapanje u trajanju od 2 minuta u rastvor pesticida niže koncentracije rezultuje apliciranom količinom od $0,205 \text{ mgkg}^{-1}$ kore za boskalid do $3,084 \text{ mgkg}^{-1}$ kore za ciprodinil (Tabela 4.1-12); nijedan od ispitivanih pesticida nije detektovan u pulpi. Protokom vremena, količina pesticida u kori se smanjuje, manjim ili većim intenzitetom. Nakon 1h u kori je izmerena približno dvostruko manja količina pirimetanila, ciprodinila i trifloksistrobina, dok je količina bifentrina i boskalida ispod granice detekcije metode.

Iako se količina pesticida u kori smanjuje, pretežni razlog za to nije prodor pesticida u pulpu, već verovatno isparavanje pesticida sa površine plodova tokom stajanja. U prilog tome govori količina pesticida izmerena u pulpi – nakon 20 minuta stajanja, u prva tri sloja pulpe je izmereno $0,042 \text{ mgkg}^{-1}$ pirimetanila i $0,073 \text{ mgkg}^{-1}$ ciprodinila, dok preostala tri pesticida nisu detektovana. Sa daljim porastom intervala stajanja uočava se trend smanjenja količine ciprodinila i pirimetanila, do trenutka kada se više ne detektuju u pulpi (Tabela 4.1-12). Iz tog razloga je pretpostavljeno da se značajan deo aplicirane mase pesticida gubi usled isparavanja.

Tabela 4.1-12 Količina pesticida u kori i prva tri sloja pulpe plodova potapanih 2 min u rastvor koncentracije 15 mgL⁻¹, detektovana odmah po aplikaciji i nakon različitih intervala stajanja na sobnoj temperaturi

Interval stajanja, min	Količina	Pirimetanil	Ciprodinil	Trifloksistrobin	Bifentrin	Boskalid
Kora						
0	mgkg ⁻¹ (RSD, %)	1,980 (38,59)	3,084 (21,41)	0,462 (13,55)	0,229 (28,75)	0,205 (40,73)
20	mgkg ⁻¹ (RSD, %)	1,252 (24,02)	1,846 (13,27)	0,401 (14,51)	0,024 (7,78)	0,190 (29,35)
40	mgkg ⁻¹ (RSD, %)	1,279 (16,60)	2,224 (15,90)	0,499 (10,05)	0,080 (13,76)	< _m LOD
60	mgkg ⁻¹ (RSD, %)	0,614 (29,99)	1,255 (12,38)	0,224 (20,56)	< _m LOD	< _m LOD
Pulpa						
0	mgkg ⁻¹ (RSD, %)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
20	mgkg ⁻¹ (RSD, %)	0,042 (28,33)	0,073 (33,61)	n.d.	n.d.	n.d.
40	mgkg ⁻¹ (RSD, %)	0,023 (29,01)	0,052 (19,73)	n.d.	n.d.	n.d.
60	mgkg ⁻¹ (RSD, %)	n.d.	< _m LOD	n.d.	n.d.	n.d.

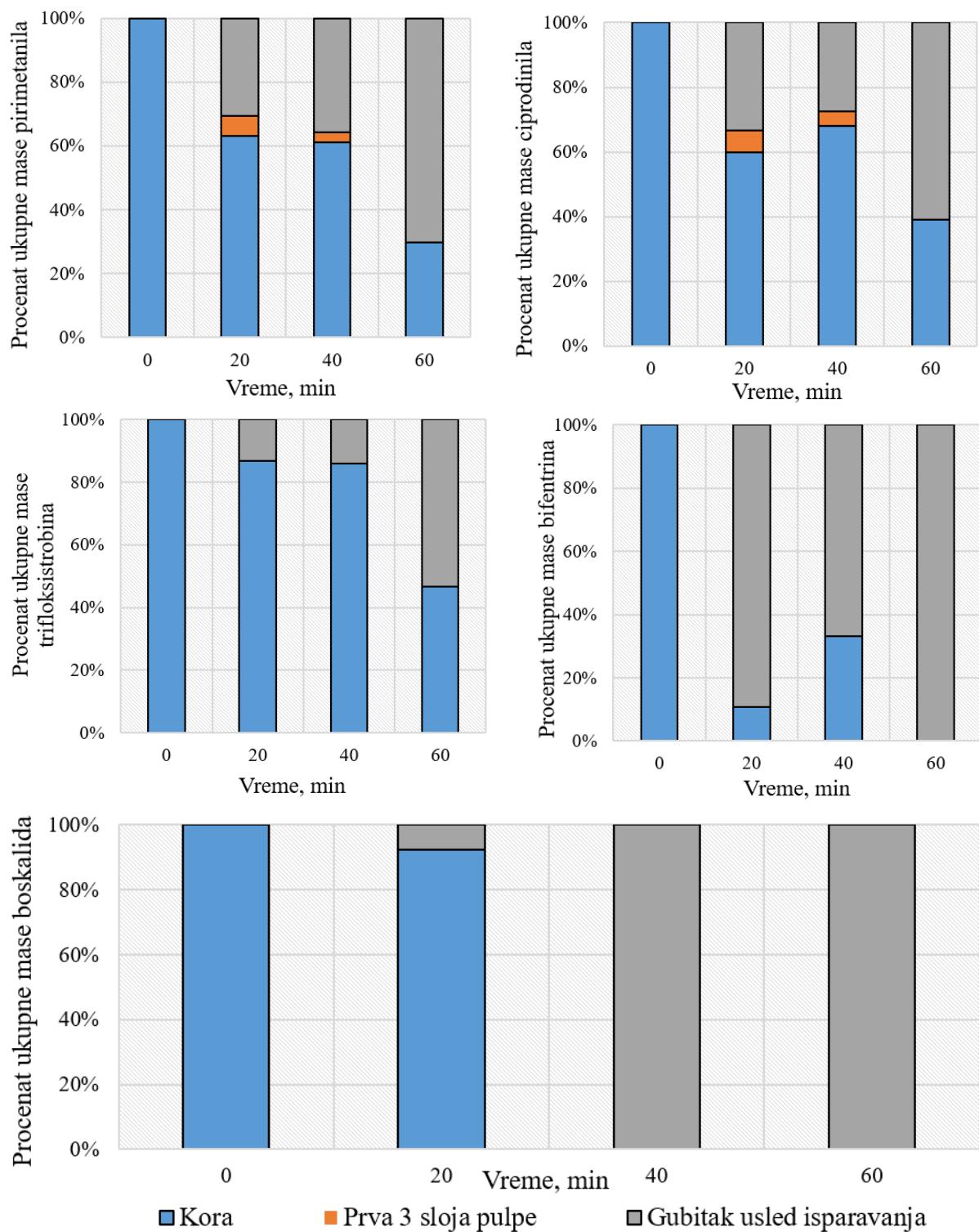
*n.d.-nije detektovan

Posle 20 i 40 minuta, u kori se zadržava oko 60 % ukupne mase pirimetanila, dok se taj procenat u pulpi kreće između 1 i 3 %. Pretpostavka je da se pritom usled isparavanja gubi između 30 i 35 % pesticida. Ovaj procenat je najveći nakon 60 minuta i iznosi 70 % (Slika 4.1-31). Sličan trend u raspodeli mase je uočen i za ciprodinil.

Oko 86 % mase trifloksistrobina je detektovano u kori nakon 20 i 40 minuta; nakon 60 minuta u kori je prisutno 46 % mase trifloksistrobina. U odnosu na ostale pesticide trifloksistrobin podleže najmanjem gubitku usled isparavanja.

Interesantno je da se nakon 20 minuta u kori nalazi oko 92 % apliciranog boskalida. Nakon 40 i 60 minuta se može reći da boskalid nije prisutan ni u kori ni u pulpi, odnosno da je celokupna masa apliciranog boskalida isparila ili se degradirala (Slika 4.1-31).

Nakon 20 i 40 minuta u kori je prisutno između 10 i 30 % početne mase bifentrina, a nakon 60 minuta bifentrin se u kori više ne detektuje. U pulpi ga nije moguće detektovati nakon nijednog vremenskog intervala.



Slika 4.1-31 Procentualna raspodela ukupne mase pirimetanila, ciprodinila, trifloksistrobina, bifentrina i boskalida između kore, slojeva pulpe i gubitka usled pretpostavljenog isparavanja sa površine plodova po potapanju ($2 \text{ min}/15 \text{ mgL}^{-1}$) i nakon različitih intervala stajanja na sobnoj temperaturi

Rezultati ispitivanja ekspozicije plodova višim koncentracijama. Potapanje u trajanju od 2 minuta u rastvor pesticida više koncentracije rezultuje apliciranom količinom od 12,710 mgkg⁻¹ kore za trifloksistrobin do 118,628 mgkg⁻¹ kore za bifentrin; ni jedan od pesticida nije detektovan u pulpi (Tabela 4.1-13). Protokom vremena smanjuje se količina pesticida u kori. Nakon 72 h količina pesticida u kori se kreće od 5,891 mgkg⁻¹ za pirimetanil do 23,594 mgkg⁻¹ za bifentrin.

Nakon stajanja plodova, pesticidi su detektovani u pulpi (prva tri sloja, dubina 3-4 mm). Protokom vremena uočava se porast količine pirimetanila sa 0,425 mgkg⁻¹ nakon sat vremena stajanja na 1,847 mgkg⁻¹ nakon 72 h stajanja. Za ostale pesticide ne postoji očigledan trend u promeni njihove količine, ali su količine merljive, izuzev trifloksistrobina, čija se koncentracija nakon 72 h približava granici kvantifikacije.

S obzirom da je vršeno potapanje plodova u relativno koncentrovan rastvor, očekivano je da oni budu detektovani i u dubljim slojevima pulpe, pa je izvršena analiza i naredna tri sloja pulpe (4, 5, 6 sloj), koji sa prva tri sloja (1, 2, i 3 sloj) čine ukupnu dubinu zahvatanja od 7-8 mm. U ovim slojevima pulpe (zbirno 4, 5, 6) pesticidi postaju detektabilni nakon 24 h stajanja plodova. Količine pirimetanila i ciprodinila nakon 24 h su vrlo uočljive i iznose 0,222 i 0,104 mgkg⁻¹ respektivno, dok su količine ostalih pesticida po vrednosti između granica detekcije i granica kvantifikacije metode. Nakon 72 h količine pirimetanila i ciprodinila iznose 0,834 i 0,129 mgkg⁻¹, respektivno. Trifloksistrobin nije detektovan, a količine bifentrina i boskalida su po vrednosti između granica detekcije i granica kvantifikacije metode.

Tabela 4.1-13 Količina pesticida u kori i prva tri sloja pulpe plodova potapanih 2 min u rastvor koncentracije 150 mgL⁻¹, detektovana odmah po aplikaciji i nakon različitih intervala stajanja na sobnoj temperaturi

Interval stajanja, h	Količina	Pirimetanil	Ciprodinil	Trifloksistrobin	Bifentrin	Boskalid
Kora						
0	mgkg ⁻¹ (RSD, %)	19,027 (29,68)	15,224 (35,06)	12,710 (29,35)	118,628 (34,60)	21,513 (40,11)
1	mgkg ⁻¹ (RSD, %)	16,306 (35,71)	11,234 (32,32)	9,907 (37,27)	29,154 (40,85)	17,781 (29,46)
3	mgkg ⁻¹ (RSD, %)	16,339 (8,37)	12,302 (25,24)	10,700 (22,81)	25,397 (36,56)	21,637 (8,10)
24	mgkg ⁻¹ (RSD, %)	13,150 (38,92)	13,355 (32,86)	11,334 (24,43)	32,654 (37,06)	20,928 (39,12)
72	mgkg ⁻¹ (RSD, %)	5,891 (27,52)	8,903 (27,96)	9,247 (17,41)	23,594 (21,30)	19,094 (4,95)
Pulpa						
0	mgkg ⁻¹ (RSD, %)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1	mgkg ⁻¹ (RSD, %)	0,425 (22,66)	0,344 (15,01)	0,061 (17,57)	0,226 (14,77)	0,097 (2,16)
3	mgkg ⁻¹ (RSD, %)	0,386 (25,42)	0,397 (15,63)	0,116 (25,40)	0,280 (46,48)	0,197 (38,69)

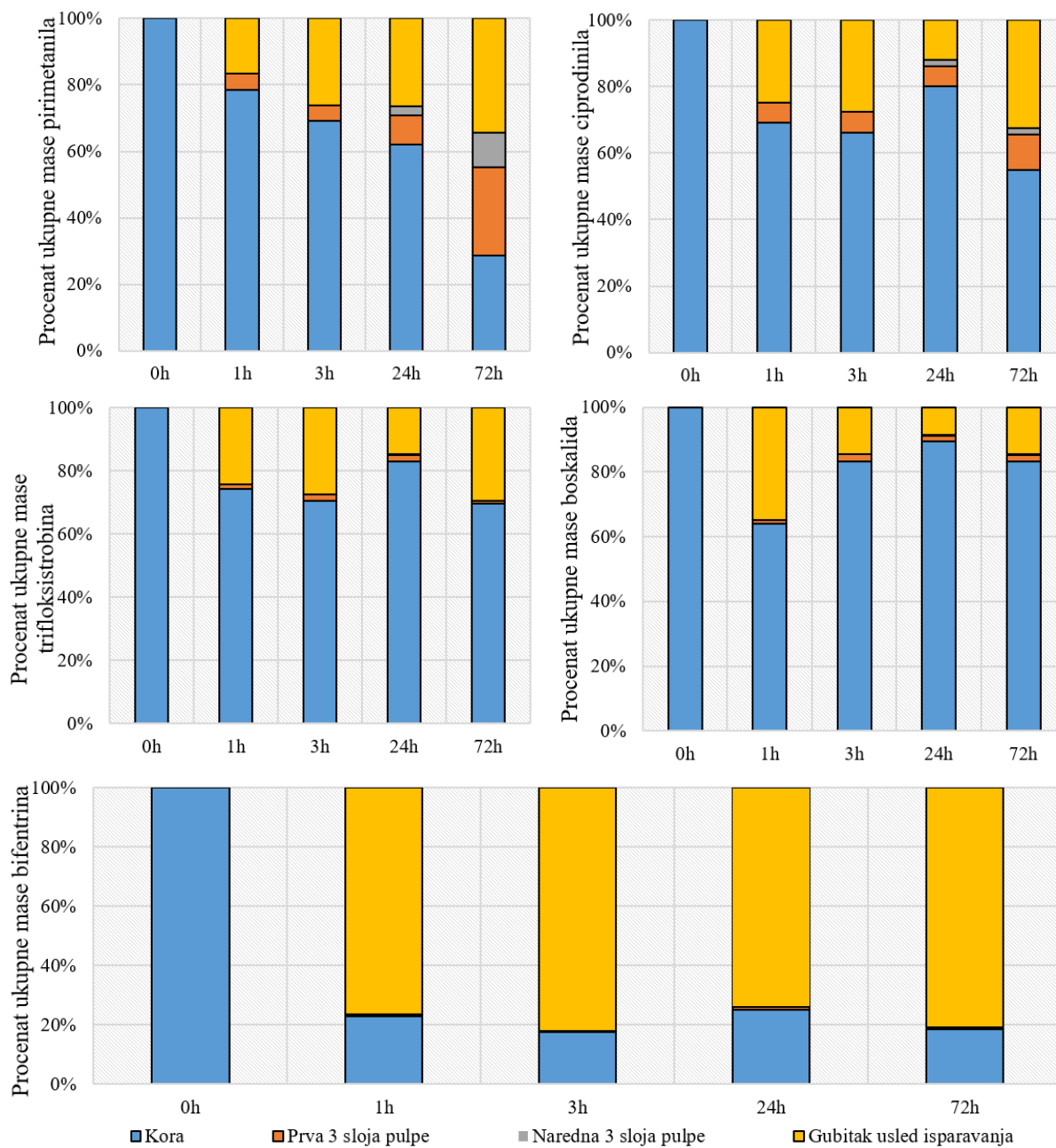
24	mgkg ⁻¹ (RSD, %)	0,645 (30,60)	0,340 (37,00)	0,090 (17,12)	0,351 (24,44)	0,138 (29,70)
72	mgkg ⁻¹ (RSD, %)	1,847 (5,47)	0,552 (20,56)	0,044 (26,81)	0,129 (13,81)	0,151 (11,09)

Sa porastom intervala stajanja procenat aplicirane mase pirimetanila koji je zadržan u kori se smanjuje sa početnih 78 % posle 1 h do 28 % posle 72 h (Slika 4.1-32). Jedan od razloga je migracija pirimetanila u prva tri, ali i naredna tri sloja pulpe. Nakon 72 h procenat mase u površinskom sloju pulpe (prva 3 mm) je blizak procentu mase u kori i iznosi 26 %. Procenat pirimetanila za koji se pretpostavlja da je ispario se kreće od 20 do 30 %.

Raspodela mase ciprodinila je bliska raspodeli za pirimetanil nakon 1 h i 3 h stajanja plodova (Slika 4.1-32). Nakon 24 h i 72 h procenat mase ciprodinila u kori iznosi 80 % i 55 %, respektivno. Procenat mase u površinskom sloju pulpe za iste intervale iznosi 6 % i 10 %. Može se zaključiti da je raspodela ciprodinila u intervalu od 1 h do 72 h manje ili više ujednačena, odnosno da se pretežno vrši između kore i gubitka isparavanjem.

Za trifloksistrobin i boskalid je karakteristično da se pretežno zadržavaju u kori. Procenat zadržavanja je iznad 70 % za trifloksistrobin i iznad 60 % za boskalid. S obzirom da su u oba slojeva pulpe detektovani u malim količinama, pretpostavlja se da je preostali deo ispario (Slika 4.1-32).

Situacija za bifentrin se razlikuje u odnosu na ostale pesticide, pre svega u apliciranoj količini. Zatim, procenat zadržavanja ovog pesticida u kori je najmanji i iznosi oko 20 % kroz celokupan interval. Procenat bifentrina u površinskom sloju pulpe se kreće od 0,5 do 0,8 %, što ukazuje da je pretežni deo ovog pesticida ispario sa površine ploda nakon aplikacije (Slika 4.1-32).



Slika 4.1-32 Procentualna raspodela ukupne mase pirimetanila, ciprodinila, trifloksistrobina, boskalida i bifentrina između kore, slojeva pulpe i gubitka usled pretpostavljenog isparavanja sa površine plodova po potapanju ($2 \text{ min}/150 \text{ mgL}^{-1}$) i nakon različitih intervala stajanja na sobnoj temperaturi

4.1.2.4 Rezultati ispitivanja jabuka sa tržišta

Targetirani pesticidi nisu detektovani u većini ispitivanih uzoraka odnosno njihove količine su ispod granice detekcije metode (Tabela 4.1-14). S obzirom da doprinos kore ukupnoj masi ploda iznosi ~10 %, količina pesticida na bazi ploda (mgkg^{-1}) može se izraziti kao $C_{\text{plod}} = \frac{C_{\text{kora}}}{10}$

Pirimetanil je detektovan dva puta u uzorcima ploda Ajdareda i jednom u uzorku ploda Zlatnog Delišesa na 2 od 4 mesta uzorkovanja, ali su njegove količine ispod granice kvantifikacije metode u 2 od 3 slučajeva. U slučaju kada prelazi granicu kvantifikacije metode, količina pirimetanila iznosi $0,005 \text{ mgkg}^{-1}$ ploda. Ni u jednom slučaju izmerena količina ne prelazi MDK od $15,00 \text{ mgkg}^{-1}$ ploda.

Ciprodinil je detektovan ukupno osam puta, 4 puta u plodovima Ajdareda i Zlatnog Delišesa i 4 puta u kori sve tri sorte, na 3 od 4 mesta uzorkovanja. U 3 od 8 detektovanih slučajeva količina ciprodinila prelazi granicu kvantifikacije metode i kreće se od $0,014 \text{ mgkg}^{-1}$ ploda do $0,046 \text{ mgkg}^{-1}$ kore. Ni u jednom slučaju izmerena količina ne prelazi MDK od $2,00 \text{ mgkg}^{-1}$ ploda.

Trifloksistrobin je detektovan ukupno 6 puta, 2 puta u pulpi Greni Smita i Ajdareda, 2 puta u plodu Ajdareda i 2 puta u kori Greni Smita i Ajdareda, na 2 od 4 mesta uzorkovanja. Količina trifloksistrobina prelazi granice kvantifikacije metode u 4 slučaja i kreće se od $0,021 \text{ mgkg}^{-1}$ ploda do $0,100 \text{ mgkg}^{-1}$ pulpe. Ni u jednom slučaju izmerena količina ne prelazi MDK od $0,70 \text{ mgkg}^{-1}$ ploda.

Bifentrin je detektovan ukupno 13 puta, pritom u svim segmentima Zlatnog Delišesa sa 3 od 4 mesta uzorkovanja, u svim segmentima Ajdareda sa 1 od 4 mesta uzorkovanja. Količina bifentrina prelazi granice kvantifikacije metode u 8 slučajeva i kreće se od $0,004$ do $0,03 \text{ mgkg}^{-1}$ pulpe. Ni u jednom slučaju izmerena količina ne prelazi MDK od $0,10 \text{ mgkg}^{-1}$ ploda.

Boskalid je detektovan ukupno 4 puta u uzorcima sa jednog mesta uzorkovanja, u kori Greni Smita i Ajdareda i u kori i plodu Zlatnog Delišesa. Izmerene količine prelaze granicu kvantifikacije metode i kreću se od $0,041 \text{ mgkg}^{-1}$ ploda do $0,173 \text{ mgkg}^{-1}$ kore. Ni u jednom slučaju izmerena količina ne prelazi MDK od 2 mgkg^{-1} ploda.

Prema dobijenim rezultati za integralni plod, pesticidi su detektovani u Ajdaredu i Zlatnom Delišesu, ali je u svakom slučaju njihova koncentracija značajno ispod MDK i ne predstavlja zdravstveni rizik po konzumente.

Tabela 4.1-14 Količina ispitivanih pesticida u mgkg⁻¹ izmerena u plodu, kori i pulpi jabuka sa tržišta

		Pirimetaniil	Ciprodinil	Trifloksistrobin	Bifentrin	Boskalid	
Supermarket (Niš)	Greni Smit	Plod	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	
		Kora	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	
		Pulpa	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOQ (0,049)	< _m LOQ (0,018)	< _m LOD
	Zlatni Delišes	Plod	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD
		Kora	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOQ (0,004)	< _m LOD
		Pulpa	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	0,012	< _m LOD
	Ajared	Plod	0,005	< _m LOD	0,021	0,012	< _m LOD
		Kora	< _m LOD	< _m LOD	0,052	< _m LOD	< _m LOD
		Pulpa	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD
		Pirimetaniil	Ciprodinil	Trifloksistrobin	Bifentrin	Boskalid	
Pijaca 1 (pijaca Čele Kula, Niš)	Greni Smit	Plod	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD
		Kora	< _m LOD	0,040	0,033	< _m LOD	< _m LOD
		Pulpa	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD
	Zlatni Delišes	Plod	< _m LOQ (0,002)	< _m LOQ (0,004)	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD
		Kora	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	0,025	< _m LOD
		Pulpa	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	0,004	< _m LOD
	Ajared	Plod	0,005	< _m LOQ (0,009)	< _m LOQ (0,022)	< _m LOQ (0,013)	< _m LOD
		Kora	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOQ (0,009)	< _m LOD
		Pulpa	< _m LOD	< _m LOD	0,100	0,030	< _m LOD
		Pirimetaniil	Ciprodinil	Trifloksistrobin	Bifentrin	Boskalid	
Pijaca 2 (pijaca Krive livade, Niš)	Greni Smit	Plod	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD
		Kora	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	0,040	< _m LOD
		Pulpa	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD
	Zlatni Delišes	Plod	< _m LOD	0,014	< _m LOD	< _m LOQ (0,016)	< _m LOD
		Kora	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	0,029	< _m LOD
		Pulpa	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD
	Ajared	Plod	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD
		Kora	< _m LOD	< _m LOQ (0,012)	< _m LOD	0,026	< _m LOD
		Pulpa	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD
		Pirimetaniil	Ciprodinil	Trifloksistrobin	Bifentrin	Boskalid	
Zasad (Jablanica, Vučje)	Greni Smit	Plod	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD
		Kora	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	0,162
		Pulpa	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD
	Zlatni Delišes	Plod	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	0,041
		Kora	< _m LOD	< _m LOQ (0,019)	< _m LOD	< _m LOD	0,141

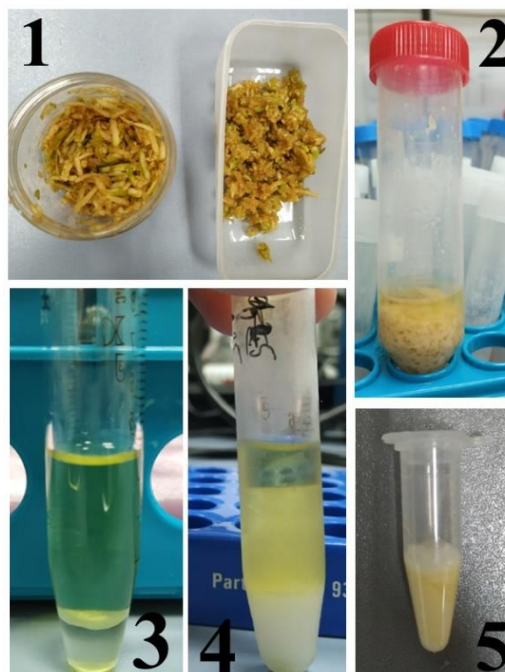
Ajda red	Pulpa	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD
	Plod	< _m LOD	< _m LOQ (0,012)	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD
	Kora	< _m LOD	0,046	< _m LOD	< _m LOD	0,173
	Pulpa	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD

4.1.3 Rezultati razvoja metode MET-GC-Q

Odabrana varijanta *QuEChERS* metode (AOAC 2007.1 metoda sa utroškom 50 mg sorbenata i 150 mg MgSO₄ po 1 mL ekstrakta) komercijalno se koristi za analizu voća i povrća sa većim udelom masti i voskova (npr. komercijalni set *Agilent* cat. no. 5982-5122). Slika 4.1-33 ilustruje primenjenu metodu. Uočava se da je u acetonitrilnom ekstraktu prisutna velika količina vode (korak 4), iako je u koraku ekstrakcije korišćen MgSO₄. Primenjeni sorbenti uklanjaju obojenje u određenoj meri (korak 5).

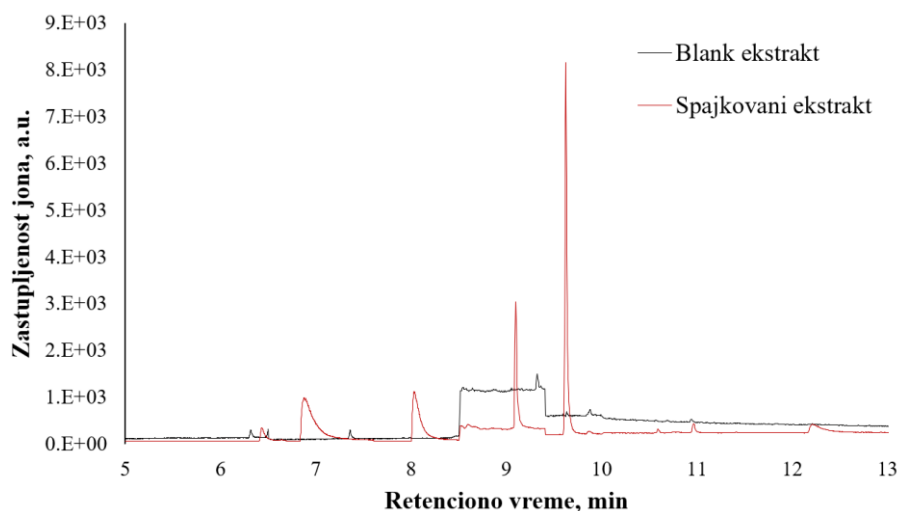
Slika 4.1-33 Ilustracija *QuEChERS* procedure kroz različite korake:

- 1 – homogenizovani uzorak
- 2 – uzorak nakon koraka ekstrakcije
- 3 – uzorak nakon centrifugiranja ekstrakta
- 4 – uzorak nakon zamrzavanja centrifugiranog ekstrakta
- 5 – izgled smeše sorbenata nakon koraka *d*-SPE



4.1.3.1 Rezultati ispitivanja parametara validacije

Selektivnost. U finalnom ekstraktu ne uočavaju se interference pesticidima; može se zaključiti da je metoda selektivna (Slika 4.1-34).



Slika 4.1-34 SIM hromatogram blank i spajkovanih ekstrakata ploda jabuke (0,50 µg mL⁻¹)

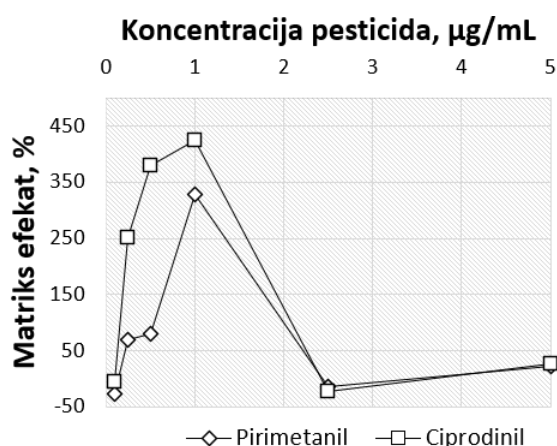
Odzivi pesticida ekstraktu i matriks efekat. Posmatrajući odziv standarda pesticida u rastvaraču kroz opseg koncentracija 0,00 – 5,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ može se zaključiti da osetljivost u SIM režimu raste u nizu boscalid < trifloksistrobin < bifentrin < ciprodinil < pirimetanil (Tabela 4.1-15). Koeficijent korelacije se kreće od 0,9526 za boscalid do 0,9893 za bifentrin.

U standardima pripremljenim u QuEChERS ekstraktu kore Greni Smita uočava se sličan trend u promeni osetljivosti (Tabela 4.1-15). Osetljivost raste u nizu boscalid < trifloksistrobin < bifentrin \approx ciprodinil < pirimetanil, s tim da su osetljivosti prema bifentrinu i ciprodinilu praktično izjednačene. Koeficijent korelacije se kreće od 0,9202 za ciprodinil do 0,9723 za bifentrin.

Tabela 4.1-15 Parametri kalibracionih kriva pesticida (0,00 – 5,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$) u čistom rastvaraču i u QuEChERS ekstraktu kore Greni Smita

Parametri krive	Pirimetanil	Ciprodinil	Trifloksistrobin	Bifentrin	Boscalid
Rastvarač					
Nagib	345810	220210	48612	155964	31751
Odsečak	-99388	-68635	-11218	-27720	-9625
Korefijent korelacije	0,9675	0,9638	0,9809	0,9893	0,9526
Greni Smit					
Nagib	406373	260544	92852	281173	57042
Odsečak	-98578	-54573	-16442	-36574	-14805
Korefijent korelacije	0,9451	0,9202	0,9677	0,9723	0,9528

Matriks efekat za trifloksistrobin, bifentrin i boscalid je izračunat prema izrazu broj 1, na osnovu nagiba kalibracionih krivi koje pokrivaju opseg koncentracija 0,50 – 5,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ u okviru kojeg je na bazi grafičke zavisnosti utvrđeno da ne postoji značajna promena ME sa koncentracijom analita. Za sva tri analita ME je pozitivan i iznosi 150,70 %, 90,38 % i 83,03 % za boscalid, trifloksistrobin i bifentrin, respektivno. Za ciprodinil i pirimetanil je utvrđeno da je ME promenljiv u čitavom testiranom opsegu koncentracija, pa su njegove vrednosti izračunate za svaku koncentraciju pojedinačno odnosno prema izrazu broj 2 i prikazane su na slici 4.1-35. Za ove analite se uočava sličan trend u promeni ME sa koncentracijom odnosno ME je posebno izražen u vidu pojačanja signala u oblasti srednjih koncentracija (0,25 – 1,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$), dok je za 0,10; 2,50 i 5,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ slabo izražen.



Slika 4.1-35 Promena ME u QuEChERS ekstraktu u zavisnosti od koncentracije pirimetanila i ciprodinila

Linearnost. Linearnost metode pokriva nekoliko redova veličine koncentracije pesticida. Metoda je linearna u opsegu koncentracija 0,025 – 5,00 mg kg^{-1} za pirimetanil i ciprodinil; u

opsegu 0,050 – 1,50 mgkg⁻¹ za bifentrin i u opsegu 0,075 – 5,00 mgkg⁻¹ za boskalid (Tabela 4.1-16). Testirani analitički opseg trifloksistrobina se sastoji od nekoliko užih linearnih opsega, u oblasti niskih (0,025-0,1 mgkg⁻¹), srednjih (0,25 – 0,75 mgkg⁻¹) i visokih koncentracija (1,25 – 5,00 mgkg⁻¹). Odsustvo linearosti u okviru analitičkog opsega je posledica različitosti u nagibima krivi (osetljivosti), koji je najveći u oblasti srednjih koncentracija (Tabela 4.1-16).

Tabela 4.1-16 Parametri kalibracionih krivi koje pokrivaju linearni opseg metode MET-GC-Q

Linearnost	Opseg, mgkg ⁻¹	Broj standarda	Nagib	Odsečak	Koeficijent korelacije
Pirimetanol	0,025 – 5,00	8	1724975	-17837	0,9994
Ciprodinil	0,025 – 5,00	11	992479	-3724	0,9865
Trifloksistrobin	0,025 – 0,10	4	217440	19107	0,9896
Trifloksistrobin	0,25 – 0,75	4	645997	-100880	0,9969
Trifloksistrobin	1,25 – 5,00	4	363216	-51757	0,9985
Bifentrin	0,050 – 1,50	9	1408472	-5631	0,9930
Boskalid	0,075 – 5,00	9	249400	-2567	0,9965

Tačnost i preciznost. Prinos ekstrakcije u oblasti nižih koncentracija (spajk 0,10 mgkg⁻¹), za pirimetanol iznosi oko 107 %, za bifentrin oko 38 %, dok je za ostale analite izuzetno nizak i kreće se od 7,31 do 12,45 % (Tabela 4.1-17). Prinos ekstrakcije u oblasti srednjih koncentracija (1,00 mgkg⁻¹) je iznad 50 % za sve analite osim za trifloksistrobin i boskalid. U oblasti viših koncentracija (5,00 mgkg⁻¹) prinos je iznad 66 % za sve analite izuzev boskalida. Trend niskog prinosa ekstrakcije za boskalid, koji se kreće od oko 12 do oko 25 %, uočava se kroz čitav opseg koncentracija. Ponovljivost je dobra za 1,00 i 5,00 mgkg⁻¹, a nešto je lošija za nivo 0,10 mgkg⁻¹; kreće se od 3,02 do 28,29 %.

Tabela 4.1-17 Prinos ekstrakcije pesticida (%) i ponovljivost (RSD, %)

Nivo spajkovanja, mgkg ⁻¹	Pirimetanol	Ciprodinil	Trifloksistrobin	Bifentrin	Boskalid
0,10	107,18	10,57	7,31	50,43	12,45
RSD, %	20,52	24,82	27,40	28,29	6,49
1,00	77,05	53,92	47,36	61,42	17,13
RSD, %	6,20	5,12	5,61	7,45	18,80
5,00	77,70	66,65	68,60	70,73	24,77
RSD, %	10,01	8,18	8,75	6,76	3,02
Srednja tačnost, %*	87,31	43,71	41,09	60,86	18,12
Srednja preciznost, %**	19,71	67,26	75,74	16,70	34,33

*Suma tačnosti za 3 koncentracije podeljena sa brojem koncentracija

** Koeficijent varijacije tačnosti za 3 koncentracije

Granice detekcije i granice kvantifikacije. Granice su procenjene za metodu bez uparavanja i sa uparavanjem kao krajnjim korakom analize. Vrednosti iz Tabela 4.1-18 sugerišu da korak koncentrovanja uzorka uparavanjem snižava granicu detekcije i kvantifikacije za boskalid, trifloksistrobin, ciprodinil i pirimetanol, dok su granice za bifentrin uporedive.

Zaključak izveden na bazi samih hromatograma odgovarajućih proceduralnih standarda (vizuelizacija pikova, uspešna autointegracija) ukazuje da do snižavanja granice detekcije realno dolazi za trifloksistrobin, ciprodinil i boskalid:

- Najniža koncentracija proceduralnog standarda trifloksistrobina u kome je moguće njegovo očitavanje, za metodu bez uparavanja iznosi 0,075 mgkg⁻¹, a sa uparavanjem 0,025 mgkg⁻¹.
- Najniža koncentracija proceduralnog standarda ciprodinila u kome je moguće njegovo očitavanje, za metodu bez uparavanja iznosi 0,10 mgkg⁻¹, a sa uparavanjem 0,025 mgkg⁻¹.
- Najniža koncentracija proceduralnog standarda boskalida u kome je moguće njegovo očitavanje, za metodu bez uparavanja iznosi 0,50 mgkg⁻¹, a sa uparavanjem 0,10 mgkg⁻¹.
- Pirimetanil i bifentrin je moguće očitati počev od proceduralnog standarda 0,025 mgkg⁻¹ za obe metode.

Granice detekcije metode sa koncentrovanjem uzorka koje su procenjene na osnovu parametara kalibracionih krivi u oblasti odgovarajućih koncentracija su vrlo bliske granicama određenim vizuelnom procenom.

Tabela 4.1-18 Granice detekcije i granice kvantifikacije metode sa korakom i bez koraka koncentrovanja uzorka i parametri pripadajućih kalibracionih krivi

Analit	Opseg, mgkg ⁻¹ (Nc)	Koeficijent korelacije	Nagib	Odsečak	mLOD, mgkg ⁻¹	mLOQ, mgkg ⁻¹
Metoda bez koncentrovanja uzorka						
Pirimetanil	0,025 – 0,250 (5)	0,9842	283242	4898	0,031	0,093
Ciprodinil	0,100 – 0,750 (6)	0,9876	182552	6862	0,085	0,257
Trifloksistrobin	0,075 – 0,550 (6)	0,9911	42317	2204	0,053	0,162
Bifentrin	0,025 – 0,100 (5)	0,9336	284696	3324	0,031	0,095
Boskalid	0,500 – 1,500 (6)	0,9805	19765	1832	0,231	0,700
Metoda sa koncentrovanjem uzorka						
Pirimetanil	0,025 – 0,100 (4)	0,9918	2189208	-35892	0,015	0,044
Ciprodinil	0,025 – 0,100 (4)	0,9933	962816	5468	0,013	0,040
Trifloksistrobin	0,025 – 0,075 (3)	0,9780	225320	18778	0,027	0,081
Bifentrin	0,025 – 0,250 (5)	0,9847	787970	60209	0,030	0,092
Boskalid	0,100 – 0,550 (5)	0,9695	258629	-8813	0,126	0,383

4.2 Ispitivanja na instrumentalnoj konfiguraciji CONF-2

Poglavlje sadrži rezultate ispitivanja performansi instrumentalne konfiguracije CONF-2 u odnosu na targetirane pesticide i rezultate razvoja i primene metoda koje uključuju ovu instrumentalnu konfiguraciju.

4.2.1 Performanse instrumenta u odnosu na ispitivane analite

Karakterizacija analita. Fragmentacija protonovanog molekuskog jona pirimetanila rezultuje fragmentima m/z 107 i 183 veće zastupljenosti i nekolicinom fragmenata manje zastupljenosti

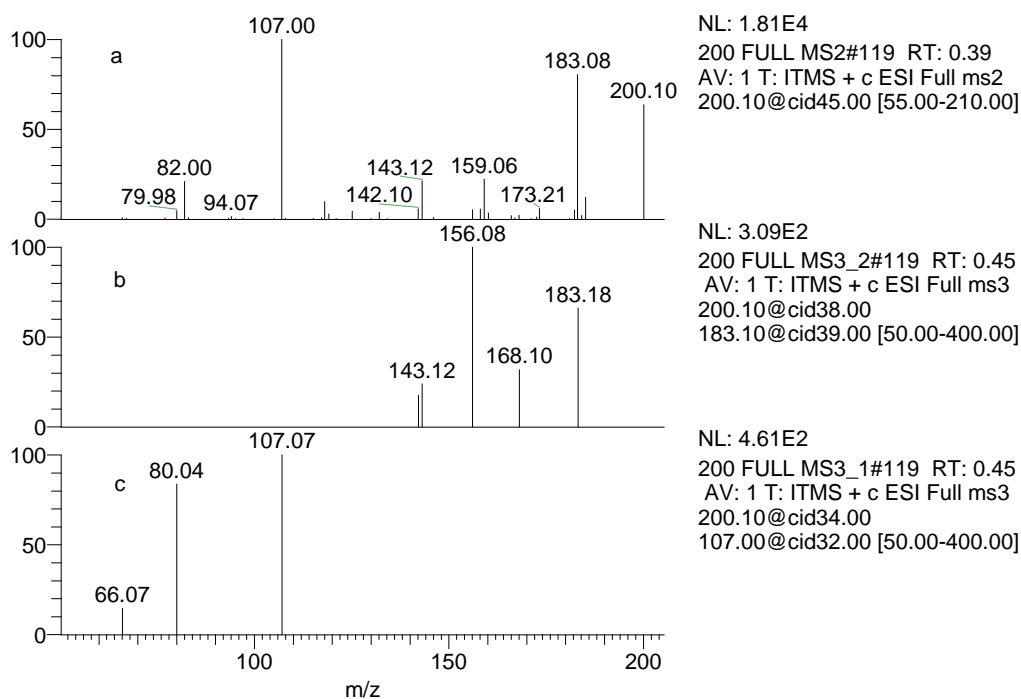
(Slika 4.2-1a). Fragmentacija najzastupljenijeg MS² fragmenta *m/z* 107 rezultuje MS³ fragmentom *m/z* 80 (Slika 4.2-1b), a fragmentacija MS² fragmenta *m/z* 183 rezultuje nekolicinom MS³ fragmenata od kojih je najzastupljeniji fragment *m/z* 156 (Slika 4.2-1c).

Fragmentacija protonovanog molekuskog jona ciprodinila rezultuje većim brojem fragmenata slične zastupljenosti, od kojih je najzastupljeniji MS² fragment *m/z* 210, a sledi ga *m/z* 185 (Slika 4.2-2a). Fragmentacija MS² fragmenta *m/z* 210 rezultuje MS³ fragmentima *m/z* 193 i 169 (Slika 4.2-2b), a MS² fragmenta *m/z* 185 MS³ fragmentom *m/z* 158 (Slika 4.2-2c).

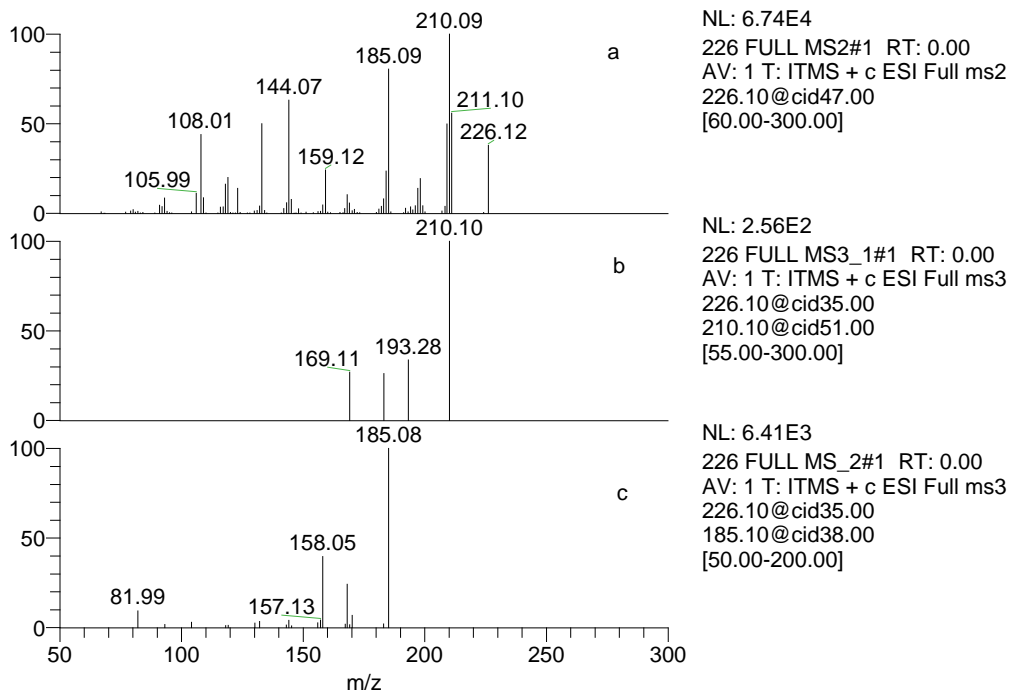
Fragmentacija protonovanog molekuskog jona boskalida rezultuje najzastupljenijim MS² fragmentom *m/z* 307 (Slika 4.2-3a). Sukcesivna fragmentacija *m/z* 307 rezultuje MS³ fragmentom *m/z* 271 (Slika 4.2-3b).

Fragmentacija protonovanog molekuskog jona trifloksistrobina rezultuje MS² fragmentima *m/z* 186 i 206 uporedive zastupljenosti (Slika 4.2-4a). Sukcesivna fragmentacija *m/z* 186 rezultuje MS³ fragmentom *m/z* 145 (Slika 4.2-4b).

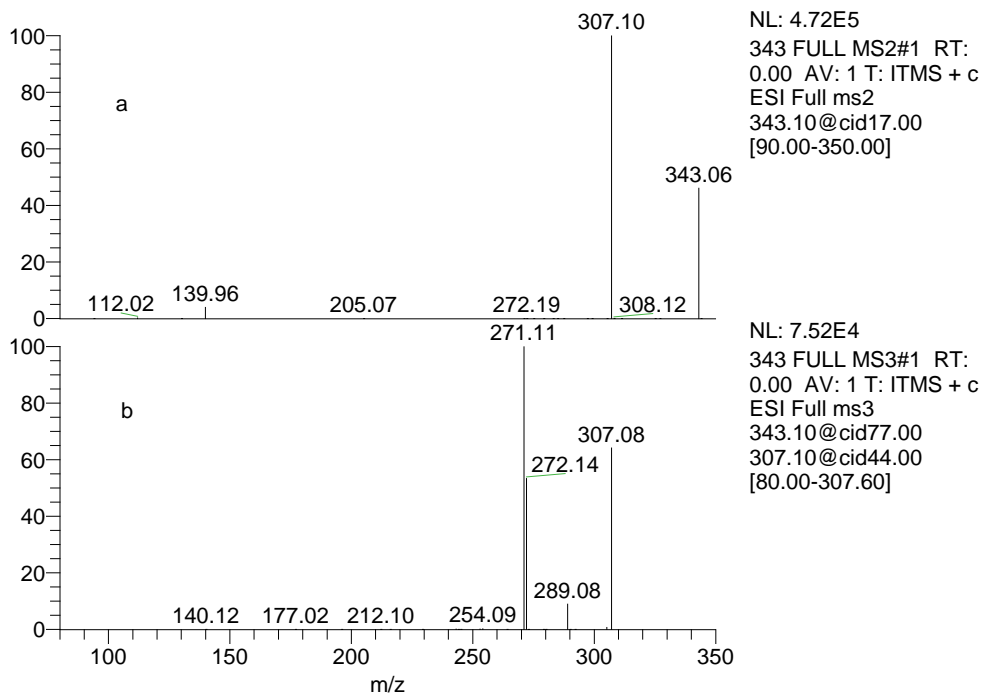
Fragmentacija pseudomolekuskog jona bifentrina (adukta molekuskog jona pesticida i amonijum jona) rezultuje MS² fragmentima *m/z* 181 i 422 (Slika 4.2-5a). Sukcesivna fragmentacija *m/z* 181 rezultuje MS³ fragmentom *m/z* 166 (Slika 4.2-5b). Potencijalne strukture nastalih fragmenata su prikazane u prilogu (poglavlje 8.5) i komentarisane u poglavlju 4.3.



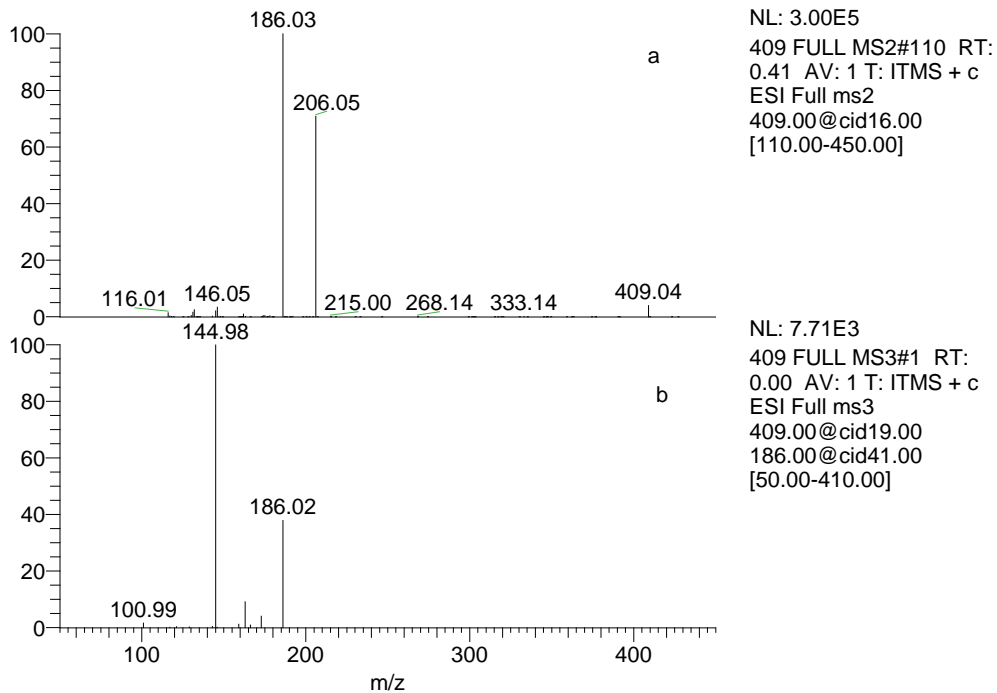
Slika 4.2-1 *Direct injection* HESI I MS² (a), HESI I MS³ (b i c) *full scan* spektri rastvora pirimetanila (molekulska masa – 199,26) koncentracije 5,00 µg mL⁻¹ u metanolu; pozitivan jonizacioni *mode*



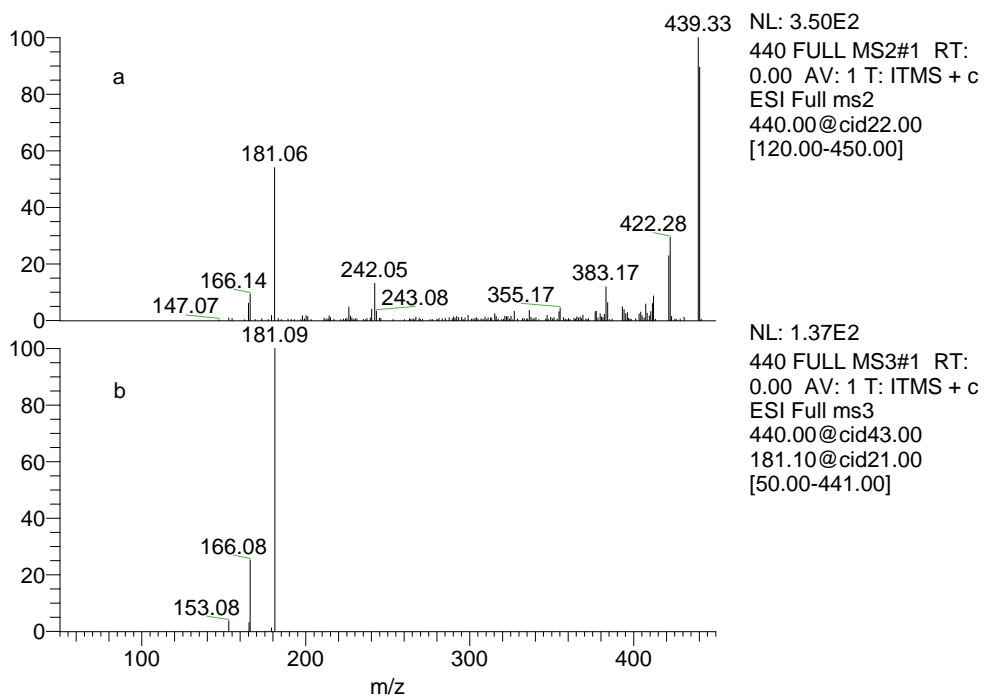
Slika 4.2-2 *Direct injection* HESI I MS² (a), HESI I MS³ (b i c) *full scan* spektri rastvora ciprodinila (molekulska masa – 225,16) koncentracije 5,00 µg mL⁻¹ u metanolu; pozitivan jonizacioni *mode*



Slika 4.2-3 *Direct injection* HESI I MS² (a), HESI I MS³ (b) *full scan* spektri rastvora boskalida (molekulska masa – 343,10) koncentracije 5,00 µg mL⁻¹ u metanolu; pozitivan jonizacioni *mode*



Slika 4.2-4 *Direct injection* HESI I MS² (a), HESI I MS³ (b) *full scan* spektri rastvora trifloksistrobina (molekulska masa – 408,38) koncentracije 5,00 µg mL⁻¹ u metanolu; pozitivan jonizacioni *mode*

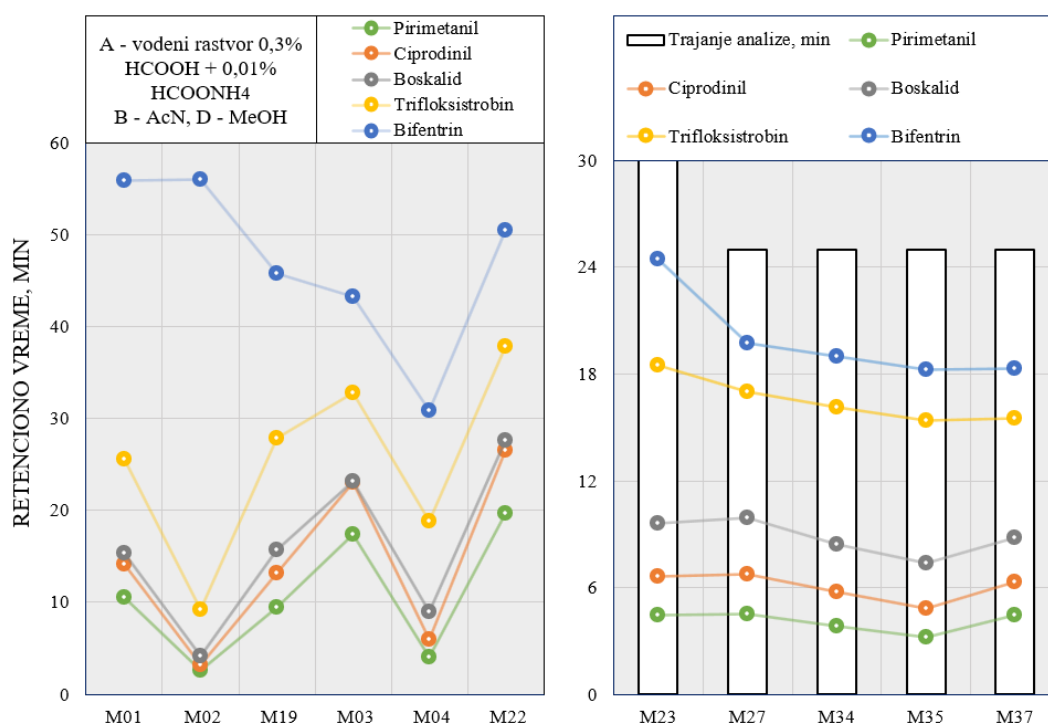


Slika 4.2-5 *Direct injection* HESI I MS² (a), HESI I MS³ (b) *full scan* spektri rastvora bifentrina (molekulska masa – 422,87) koncentracije 5,00 µg mL⁻¹ u metanolu; pozitivan jonizacioni *mode*

Parametri hromatografskog razdvajanja. Najbolji kompromis između razdvajanja analita i ukupnog vremena analize se postiže na HPLC koloni 2 (Tabela 3.3-5, str. 84) sa metanolom i vodenim rastvorom pufera kao kombinacijom eluenata (Slika 4.2-6, M04), gde se svi analiti eluiraju sa kolone pre 35 minuta analize uz optimalno razdvajanje. Na HPLC koloni 1 (Tabela 3.3-5, str. 84), koja ima punjenje većeg promera u odnosu na HPLC kolonu 2, sa protokom od $500 \mu\text{Lmin}^{-1}$, razdvajanje analita nije potpuno; takođe bifentrin se dosta kasno eluira sa kolone (Slika 4.2-6, M01 i M03). Sličan zaključak se može izvesti i za HPLC kolonu 3 (Slika 4.2-6, M19 i M22) koja ima punjenje najmanjeg promera. U dalje postupke optimizacije uvršena je HPLC kolona 2 sa metanolom i vodenim rastvorom pufera kao kombinacijom eluenata.

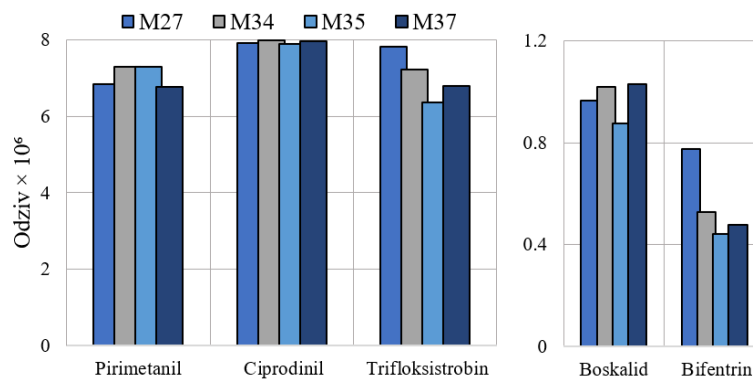
Dalja optimizacija je podrazumevala promenu gradijenta (metode 23 i 27) ili promenu brzine protoka eluenta (metode 34, 35 i 37) sa ciljem postizanja bržeg eluiranja pesticida u cilju skraćanja vremena analize. Prva modifikacija gradijenta u odnosu na metodu 04 je podrazumevala znatno bržu promenu sastava gradijenta do 100 % D i odsustvo platoa na ovom sastavu mobilnih faza (Tabela 3.4-6, str. 82). Rezultat je 50 % kraća analiza (30 min) i eluiranje svih analita u roku od 25 minuta (Slika 4.2-6, M23). Dalja modifikacija gradijenta u smislu uvođenja dva platoa – u trajanju od 2 minuta na A:D = 25 %:75 % i 3 minuta na 100 % D, rezultuje nešto bržem eluiranju trifloksistrobina i bifentrina uz očuvanost rezolucije ostalih pesticida, što omogućava dalje skraćanje analize za 5 minuta (Slika 4.2-6, M27).

Povećanje brzine protoka eluenta ne rezultuje značajnom promenom retencionih vremena analita (Slika 4.2-6, M34, M35 i M37) i ne vodi skraćanju vremena analize. Pored toga, porast brzine protoka uzrokuje pad signala analita (Slika 4.2-7), verovatno zbog nedovoljnog protoka *sheath/aux* gasa. S obzirom da izmena brzine protoka iziskuje veću potrošnju azota kao i samog eluenta, kao metoda za dalji rad odabrana je metoda 27 sa brzinom protoka eluenta od $300 \mu\text{Lmin}^{-1}$ i trajanjem od 25 min.



Slika 4.2-6 Perfomanse korišćenih metoda u pogledu razdvajanja analita i ukupnog vremena analize

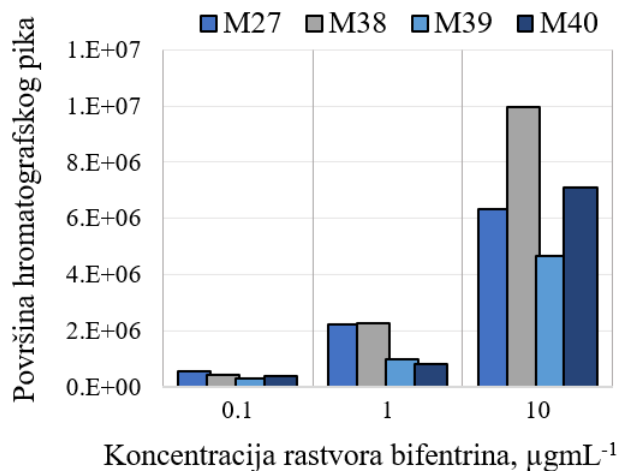
Metoda 27 kao mobilnu fazu A sadrži vodeni rastvor pufera sa udelom amonijum-formijata od 0,010 %. S obzirom da bifentrin kao pretežni jon u ESI/MS spektru daje adukt sa amonijum jonom, ispitana je zavisnost zastupljenosti ovog adukta od procenta amonijum formijata u mobilnoj fazi, kao i zavisnost zastupljenosti adukta od vrste mobilne faze u kojoj je amonijum-formijat rastvoren. Slika 4.2-8 prikazuje uticaj navedenih varijacija na zastupljenost adukta pri različitim koncentracijama bifentrina. Pri koncentracijama bifentrina od 0,10 i 1,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ porast koncentracije AMFa u vodi sa 0,010 na 0,050 % nema uticaj na zastupljenost adukta (Slika 4.2-8, M27 i M38), kao ni isti porast koncentracije AMFa u metanolu (Slika 4.2-8, M39 i M40), dok je pri koncentraciji bifentrina od 10,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ situacija obrnuta. Posmatrajući vrstu mobilne faze u kojoj je AMF rastvoren uočava se da je povoljnija faza voda, a ne metanol (Slika 4.2-8, M27/M39 ili M38/M40).



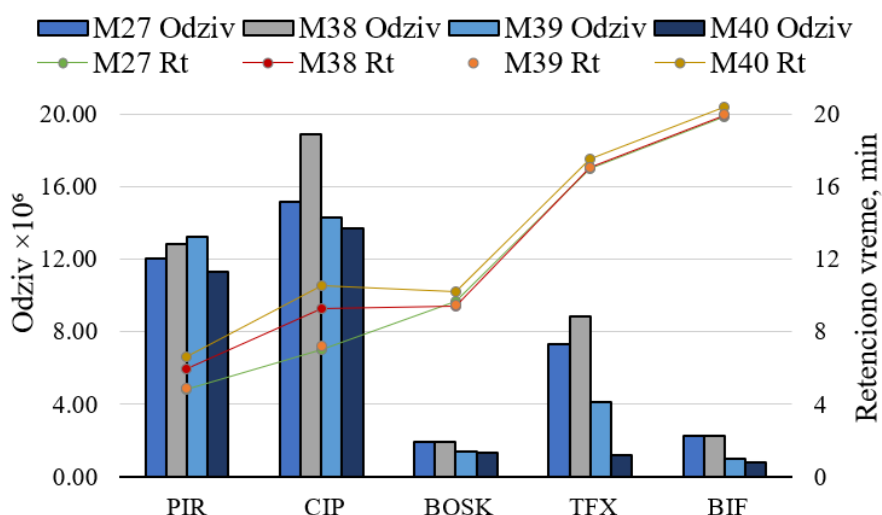
Slika 4.2-7 Uticaj brzine protoka eluenta na odziv pesticida (rastvor koncentracije 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ u 0,050 % AMF u metanolu)

Slika 4.2-8 prikazuje uticaj navedenih varijacija na zastupljenost adukta pri različitim koncentracijama bifentrina. Pri koncentracijama bifentrina od 0,10 i 1,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ porast koncentracije AMFa u vodi sa 0,010 na 0,050 % nema uticaj na zastupljenost adukta (Slika 4.2-8, M27 i M38), kao ni isti porast koncentracije AMFa u metanolu (Slika 4.2-8, M39 i M40), dok je pri koncentraciji bifentrina od 10,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ situacija obrnuta. Posmatrajući vrstu mobilne faze u kojoj je AMF rastvoren uočava se da je povoljnija faza voda, a ne metanol (Slika 4.2-8, M27/M39 ili M38/M40).

Finalni zaključak bi bio da kao mobilnu fazu treba koristiti vodeni rastvor pufera sa većim udelom AMFa, međutim ako se sagledaju retenciona vremena ostalih pesticida, uočava se da porast udela AMFa u bilo kojoj od faza (M38 ili M40) pomera retenciona vremena pirimetanila i ciprodinila u smislu njihovog kasnijeg eluiranja i vodi preklapanju retencionih vremena ciprodinila i boskalida (Slika 4.2-9). Iz ovog razloga je kao radna metoda zadržana metoda 27 sa mobilnom fazom A koja predstavlja vodeni rastvor pufera sa udelom AMFa od 0,010 % i mobilnom fazom D koja predstavlja 100 % metanol.



Slika 4.2-8 Zastupljenost adukta bifentrina sa amonijum jonom u zavisnosti od procenta AMF-a u mobilnim fazama



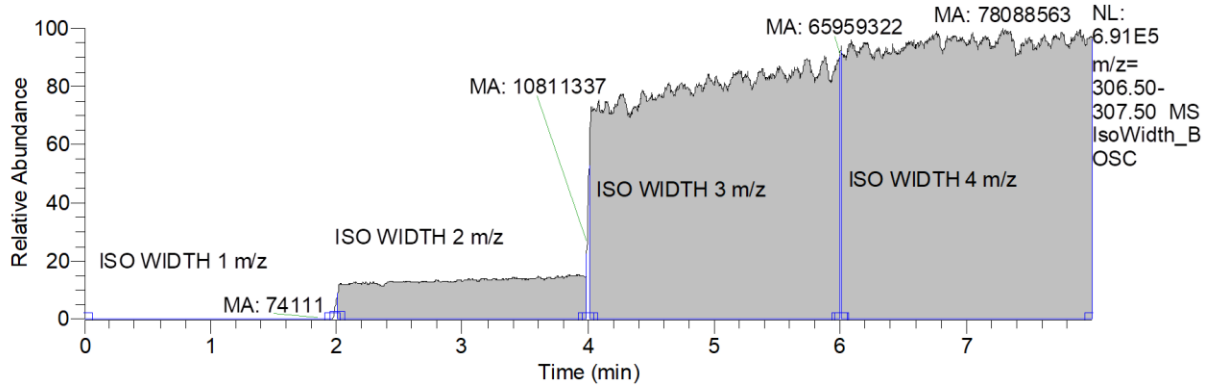
Slika 4.2-9 Pregled odziva i retencionih vremena pesticida nakon analize rastvora pesticida koncentracije 1,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ metodama koje se razlikuju u procentu AMF-a u mobilnim fazama

Optimizacija parametara za MSⁿ analize. SRM analiza. Rezultati optimizacije širine izolacije, *Act. Q* vrednosti i perioda aktivacije *parent* jona prikazani su na primeru SRM tranzicije boskalida na slikama 4.2-10 – 4.2-12. Promena širine izolacije *parent* jona boskalida ima značajan uticaj na zastupljenost kvantifikacionog fragmenta ovog pesticida (Slika 4.2-10). Pri širini izolacije 1 *m/z* zastupljenost fragmenta je zanemarljiva; povećanje širine izolacije sa 2 na 4 *m/z* rezultuje oko 7× većom zastupljenošću fragmenta. Kao optimalna vrednost širine izolacije odabrana je širina od 4 *m/z*.

Odabir finalne *Act.Q* vrednosti je vršen prateći zastupljenost i kvalifikacionog i kvantifikacionog fragmenta boskalida. Porast vrednosti *Act.Q* parametra iznad *default* vrednosti od 0,250 ne vodi boljoj detekciji kvantifikacionog fragmenta, a istovremeno rezultuje gubitkom detekcije kvalifikacionog fragmenta (Slika 4.2-11); kao optimalna vrednost *Act.Q* parametra odabrana je vrednost od 0,250.

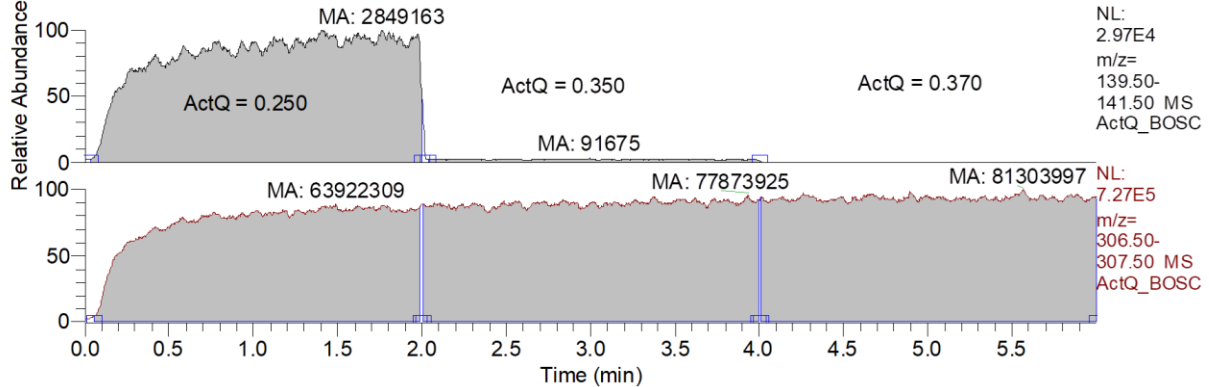
Porast perioda aktivacije *parent* jona boskalida ne utiče značajno na zastupljenost kvantifikacionog fragmenta (Slika 4.2-12); koeficijent varijacije u odzivima fragmenta iznosi oko 8 %. S obzirom da promena perioda aktivacije sa *default* vrednosti na 50 ms rezultuje najvećem porastu zastupljenosti fragmenta od oko 11 %, kao optimalna vrednost perioda aktivacije odabrana je vrednost od 50 ms. Optimizovane vrednosti kolizione energije su prikazane u tabeli 4.2-1.

RT: 0.00 - 8.00 SM: 15B



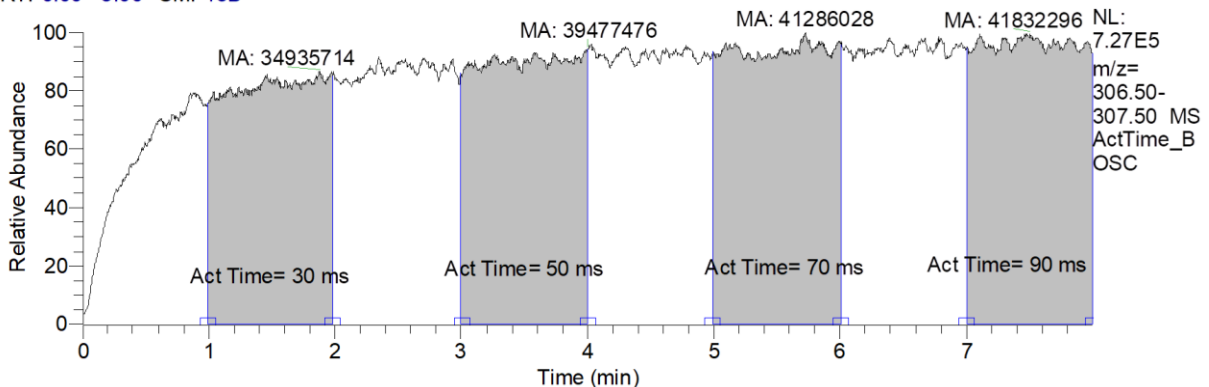
Slika 4.2-10 Zastupljenost SRM kvantifikacionog fragmenta boskalida (m/z 307) u zavisnosti od širine izolacije *parent* jona (rastvor smeše pesticida u 0,050 % metanolnom rastvoru AMFa sa koncentracijom boskalida $10 \mu\text{g mL}^{-1}$)

RT: 0.00 - 6.00 SM: 15B



Slika 4.2-11 Zastupljenost SRM fragmenata boskalida (m/z 307 i m/z 140) u zavisnosti od vrednosti Act.Q parametra (rastvor smeše pesticida u 0,050 % metanolnom rastvoru AMFa sa koncentracijom boskalida $10 \mu\text{g mL}^{-1}$)

RT: 0.00 - 8.00 SM: 15B



Slika 4.2-12 Zastupljenost SRM kvantifikacionog fragmenta boskalida (m/z 307) u zavisnosti od perioda aktivacije *parent* jona (rastvor smeše pesticida u 0,050 % metanolnom rastvoru AMFa sa koncentracijom boskalida $10 \mu\text{g mL}^{-1}$)

Tabela 4.2-1 Optimizovani parametri SRM tranzicija pesticida

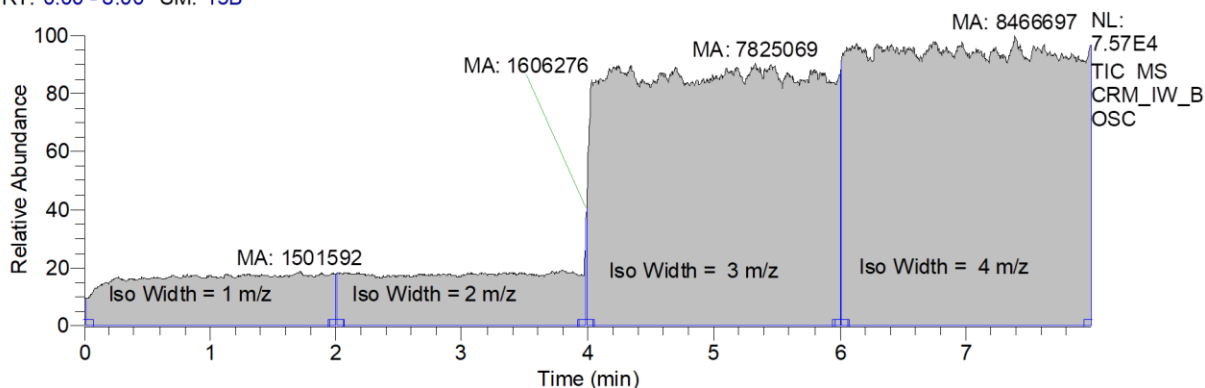
Parametri	Pirimetamil	Ciprodinil	Boskalid	Trifloksistrobin	Bifentrin
Kvalifikacioni prelaz	200→107	226→185	343→140	409→206	440→166
Kvantifikacioni prelaz	200→183	226→210	343→307	409→186	440→181
Koliziona energija, %	57	60	84	94	40
IW, m/z	2	3	4	4	2
ActQ	0,350	0,450	0,250	0,250	0,250
Act.Time, ms	90	90	50	50	50

CRM analiza. Rezultati optimizacije širine izolacije, Act.Q i perioda aktivacije *parent* jona za su prikazani na primeru CRM tranzicije boskalida na slikama 4.2-13 – 4.2-15. Promena širine izolacije *parent* jona boskalida ima značajan uticaj na zastupljenost kvantifikacionog fragmenta ovog pesticida (Slika 4.2-13). Povećanje širine izolacije sa 1 na 4 m/z rezultuje oko 6× većom zastupljenošću fragmenta. Kao optimalna vrednost širine izolacije odabrana je širina od 4 m/z .

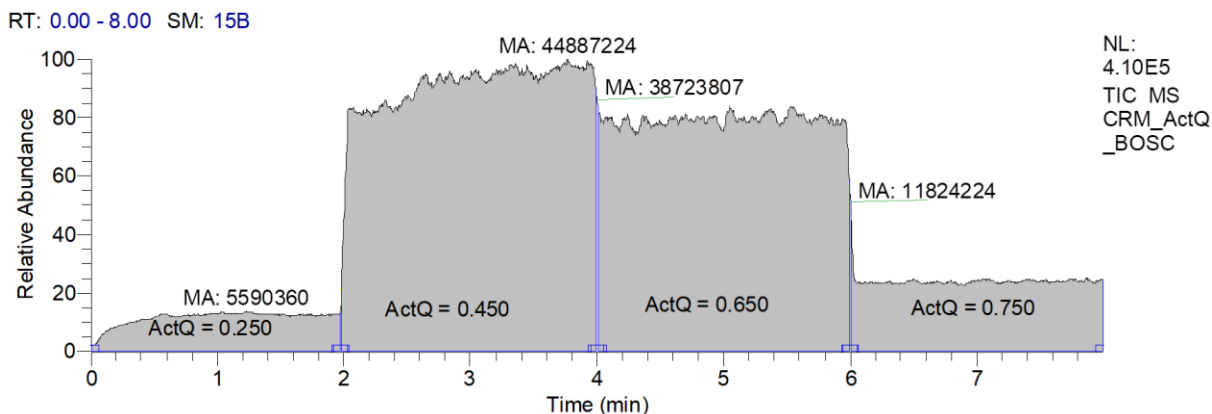
Odabir finalne Act.Q vrednosti je vršen prateći zastupljenost jedinog MS³ fragmenta boskalida. Najveći porast zastupljenosti fragmenta u iznosu od 88 % je uočen pri promeni vrednosti Act.Q parametra sa *default* vrednosti na vrednost od 0,450 (Slika 4.2-14); kao optimalna vrednost Act.Q parametra odabrana je vrednost od 0,450.

Porast perioda aktivacije *parent* jona boskalida ne utiče značajno na zastupljenost kvantifikacionog fragmenta (Slika 4.2-15); koeficijent varijacije u odzivima fragmenta iznosi oko 4,60 %. Kao optimalna vrednost perioda aktivacije odabrana je vrednost od 50 ms, koja rezultuje uvećanjem zastupljenosti fragmenta za 8 %. Optimizovane vrednosti kolizione energije u okviru MS³ analize pesticida su prikazane u tabeli 4.2-2.

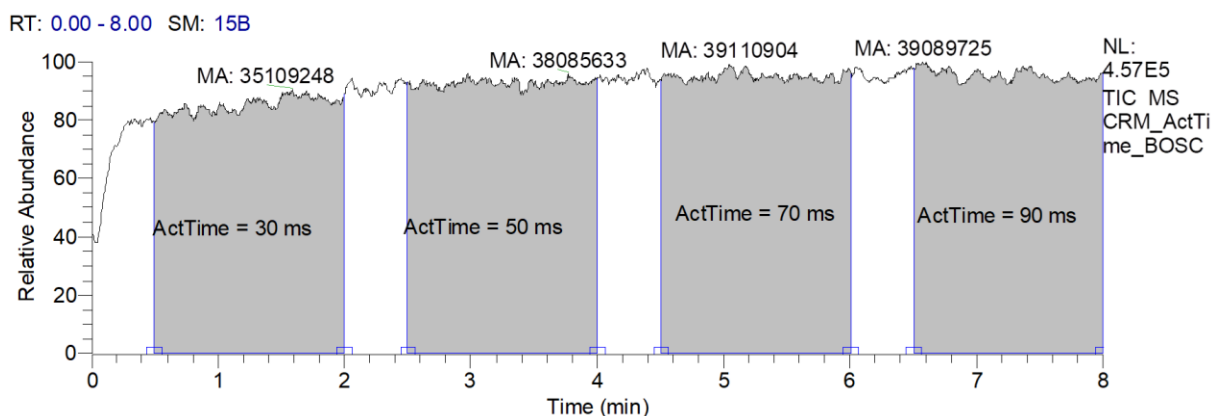
RT: 0.00 - 8.00 SM: 15B



Slika 4.2-13 Zastupljenost CRM kvantifikacionog fragmenta boskalida (m/z 271) u zavisnosti od širine izolacije *parent* jona (rastvor smeše pesticida u 0,050 % metanolnom rastvoru AMFa sa koncentracijom boskalida 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$)



Slika 4.2-14 Zastupljenost CRM kvantifikacionog fragmenta boskalida (m/z 271) u zavisnosti od vrednosti Act.Q parametra (rastvor smeše pesticida u 0,050 % metanolnom rastvoru AMFa sa koncentracijom boskalida $10 \mu\text{g mL}^{-1}$)



Slika 4.2-15 Zastupljenost CRM kvantifikacionog fragmenta boskalida (m/z 271) u zavisnosti od perioda aktivacije *parent* jona (rastvor smeše pesticida u 0,050 % metanolnom rastvoru AMFa sa koncentracijom boskalida $10 \mu\text{g mL}^{-1}$)

Sistematizovani pregled optimizovanih parametara MS^n analize pesticida je prikazan u tabelama 4.2-1 i 4.2-2. U MRM MS^2 analizu pesticida uvrštene su po dve tranzicije (Tabela 4.2-1), jedna kvantifikaciona koja uključuje najzastupljeniji jon u spektru i jedna kvalifikaciona koja uključuje jon koji je naredni po zastupljenosti.

MRM MS^3 analiza pirimetanila i ciprodinila zbog prirode fragmentacije ovih pesticida takođe uključuje jedan kvantifikacionu i jednu kvalifikacionu tranziciju, dok MS^3 analiza boskalida, trifloksistrobina i bifentrina uključuje samo jednu tranziciju (Tabela 4.2-2), jer fragmentacija proizvoda prve fragmentacije daje isključivo jedan jon.

Tabela 4.2-2 Optimizovani parametri CRM prelaza pesticida

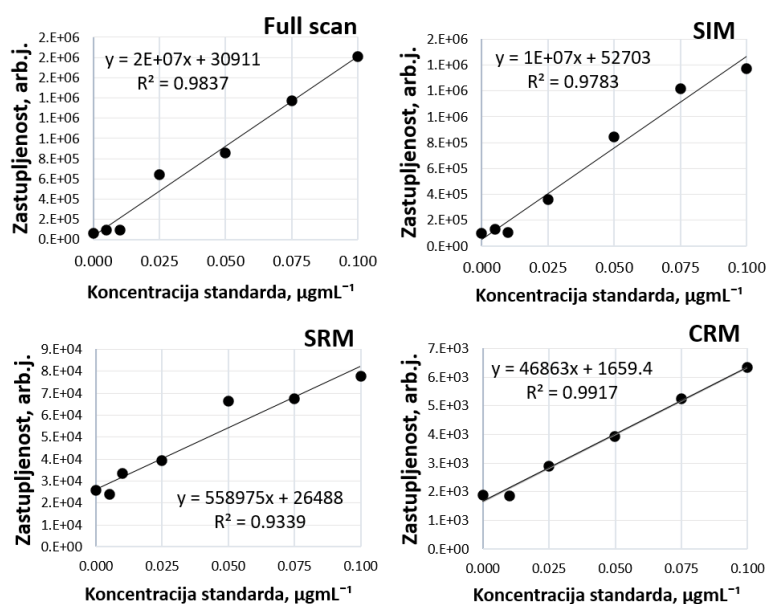
Parametri	Pirimetanol	Ciprodinil	Boskalid	Trifloksistrobin	Bifentrin
Kvalifikacioni prelaz	183→143	210→169	/	/	/
Kvantifikacioni prelaz	183→156	210→196	307→271	186→145	181→166
Koliziona energija, %	52	52	77	47	53
IW, m/z	3	3	4	1	2
ActQ	0,450	0,650	0,450	0,450	0,450
Act.Time, ms	90	50	50	50	50

Instrumentalna osetljivost, granica detekcije i granica kvantifikacije u različitim režimima rada analizatora. Sistematizovane vrednosti granica detekcije i granica kvantifikacije pesticida se nalaze u Tabela 4.2-3. Granice detekcije pirimetanila se kreću od $0,008 \mu\text{g mL}^{-1}$ za CRM do $0,020 \mu\text{g mL}^{-1}$ za SRM režim rada. Osetljivost prema pirimetanilu je najveća u *full scan* režimu; sledi je osetljivost u SIM režimu koja je istog reda veličine; osetljivost je najmanja u CRM režimu, oko 12 puta je niža nego u SRM režimu (Slika 4.2-16).

Granice detekcije ciprodinila se kreću od $0,006 \mu\text{g mL}^{-1}$ za *full scan* režim rada do $0,013 \mu\text{g mL}^{-1}$ za SRM režim rada. Granica detekcije ciprodinila u najselektivnijem režimu rada iznosi $0,009 \mu\text{g mL}^{-1}$. Najbolja diskriminacija najnižih koncentracija pesticida (blank; $0,005$ i $0,010 \mu\text{g mL}^{-1}$) je u *full scan* režimu, a slede ga CRM, SIM pa SRM režim (Slika 4.2-17).

Granice detekcije boskalida se kreću od $0,007 \mu\text{g mL}^{-1}$ za SRM do $0,013 \mu\text{g mL}^{-1}$ za *full scan* režim rada. Najbolja

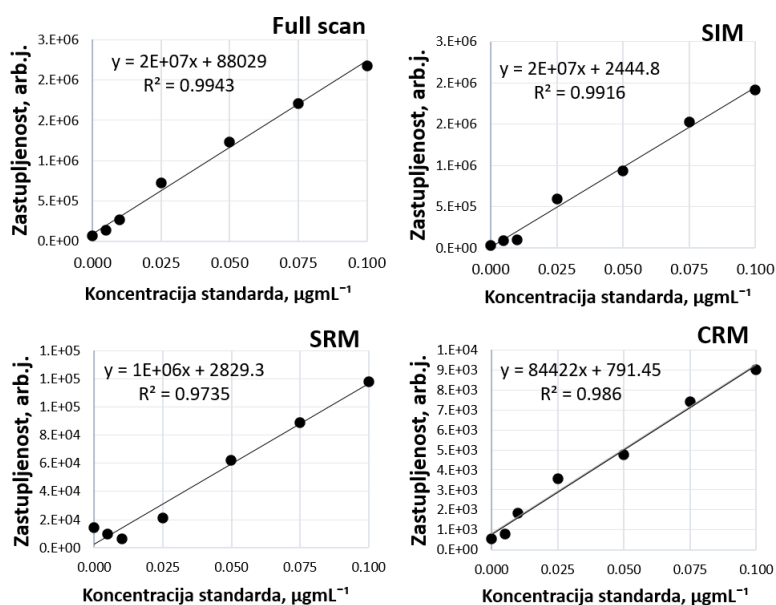
diskriminacija najnižih koncentracija pesticida (blank; $0,005$ i $0,010 \mu\text{g mL}^{-1}$) je u SRM režimu, a slede ga *full scan*, SIM, pa CRM režim (Slika 4.2-18). Osetljivost je najveća u *full scan* režimu, dok je nešto niža i praktično ista za ostala tri režima (Slika 4.2-18).



Slika 4.2-16 Promena odziva pirimetanila sa koncentracijom u MS režimima različite selektivnosti

Granice detekcije trifloksistrobina se kreću od 0,004 $\mu\text{g mL}^{-1}$ za SIM do 0,012 $\mu\text{g mL}^{-1}$ za SRM režim rada. Najbolja diskriminacija najnižih koncentracija pesticida (blank; 0,005 i 0,010 $\mu\text{g mL}^{-1}$) je u CRM režimu, a slede ga *full scan*, SIM, pa SRM režim (Slika 4.2-19). Osetljivost je najveća u *full scan* režimu, a najmanja u CRM režimu i to za red veličine (Slika 4.2-19).

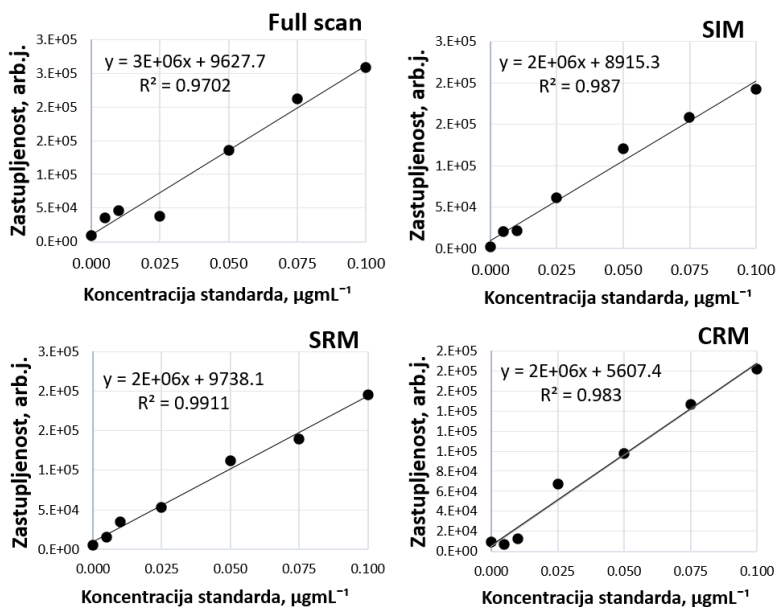
Granice detekcije bifentrina u *full scan* odnosno SIM režimu su iste i iznose 0,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Odziv pseudomolekularnog jona bifentrina pri niskim koncentracijama ($< 0,10 \mu\text{g mL}^{-1}$) ne pokazuje korelaciju sa promenom koncentracije ovog pesticida (Slika 4.2-20). Granica detekcije bifentrina u SRM režimu je procenjena na 0,015 $\mu\text{g mL}^{-1}$, a u CRM režimu na 0,021 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Diskriminacija niskih koncentracija bifentrina (blank; 0,005 i 0,010 $\mu\text{g mL}^{-1}$) je izuzetna u CRM režimu, pri čemu je osetljivost 3 do 4 puta



Slika 4.2-17 Promena odziva ciprodinila sa koncentracijom u MS režimima različite selektivnosti

veća od osetljivosti procenjene na čitavom opsegu testiranih koncentracija (0,000 – 0,100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (Slika 4.2-20); osetljivost u SRM je oko 1,30 puta veća od osetljivosti u CRM režimu.

Iz daljeg razvoja metode isključeni su *full scan* i SIM režimi rada analizatora, zbog male selektivnosti. Između SRM i CRM režima, za analizu pirimetanila i ciprodinila pogodan je SRM režim. Iako je procenjena granica detekcije pesticida nešto niža u CRM režimu, osetljivost prema pesticidima je znatno veća u SRM režimu. Takođe, iako je selektivnost veća u CRM režimu, smatra se da je selektivnost u SRM režimu zadovoljavajuća, jer je priroda fragmentacije pirimetanila i ciprodinila takva da rezultuje kvantifikacionim i kvalifikacionim fragmentima slične zastupljenosti što omogućava efikasnu MRM analizu na MS² nivou i pri niskim koncentracijama pesticida, a time i njihovu pouzdanu identifikaciju.



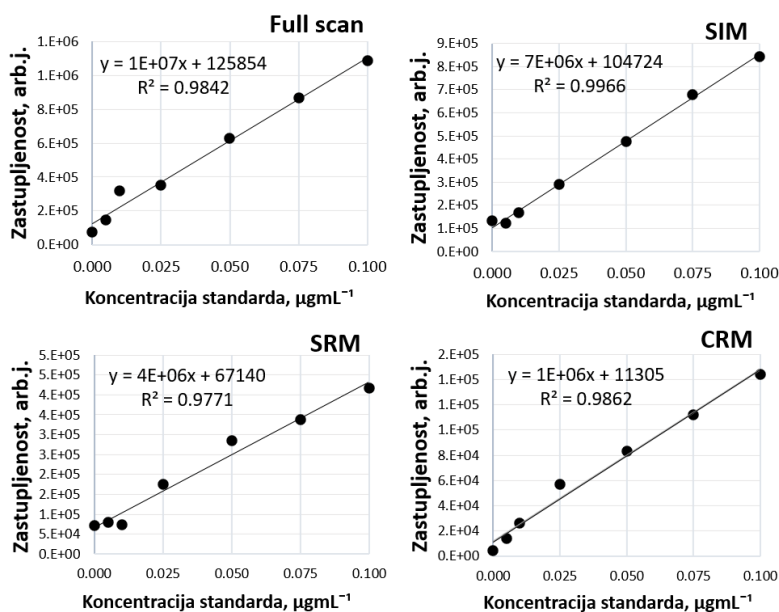
Slika 4.2-18 Promena odziva boskalida sa koncentracijom u MS režimima različite selektivnosti

Između SRM i CRM režima, za analizu boskalida i bifentrina pogodan je CRM režim. Iako je procenjena granica detekcije nešto niža u SRM režimu, selektivnost je veća u CRM režimu. Veća selektivnost u CRM režimu ima veću težinu u analizi ovih pesticida, jer iako SRM analiza praktično predstavlja MRM analizu na MS² nivou, zastupljenost fragmenta koji je odabran kao kvalifikacioni je izuzetno niska u poređenju sa kvantifikacionim fragmentom (zastupljenost kvalifikacionog fragmenta boskalida je 4,50 % zastupljenosti kvantifikacionog fragmenta; zastupljenost kvalifikacionog fragmenta bifentrina je 8,00 % zastupljenosti kvantifikacionog fragmenta), što bi pri analizi

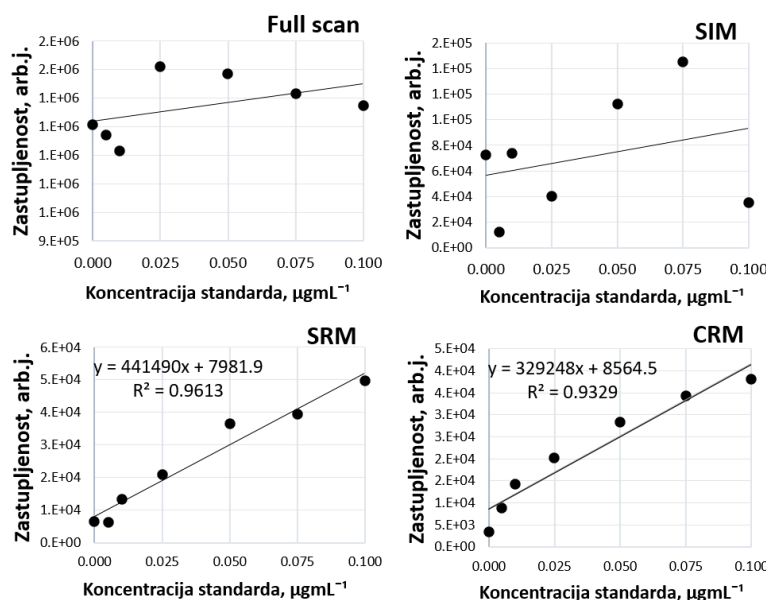
niskih koncentracija ovih pesticida moglo da rezultuje gubitkom detekcije kvalifikacionog fragmenta. Osetljivost prema boskalidu je ista u oba režima, što je posledica prirode fragmentacije *parent* jona ovog pesticida, pri čemu se pretežno formira jedan fragment – kvantifikacioni fragment *m/z* 307. Osetljivost prema bifentrinu u opsegu koncentracija 0,000 – 0,100 µg mL⁻¹ je neznatno manja u CRM režimu, ali se pokazalo da je pri najnižim koncentracijama pesticida značajno veća. Iako zbog prirode MS³ fragmentacije bifentrina i boskalida nije moguće implementirati MRM analizu na MS³ nivou, to ne predstavlja problem u pouzdanosti identifikacije pesticida s obzirom da se već radi o visoko selektivnoj MS³ analizi.

Između SRM i CRM režima, za analizu trifloksistrobina pogodan je SRM režim. Priroda fragmentacije trifloksistrobina je takva da se kao njen rezultat dobijaju samo dva fragmenta slične zastupljenosti.

Ovo omogućava efikasnu primenu MRM analize na MS² nivou odnosno dobru selektivnost i pri niskim koncentracijama pesticida, ali ne i preveliki gubitak osetljivosti u odnosu na MS¹ analizu. Granice detekcije trifloksistrobina u SRM i CRM režimu su uporedive.



Slika 4.2-19 Promena odziva trifloksistrobina sa koncentracijom u MS režimima različite selektivnosti



Slika 4.2-20 Promena odziva bifentrina sa koncentracijom u MS režimima različite selektivnosti

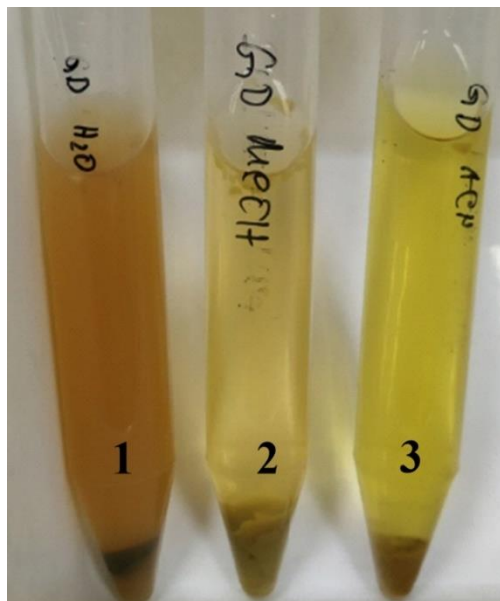
Tabela 4.2-3 Instrumentalne granice detekcije i granice kvantifikacije pesticida u $\mu\text{g mL}^{-1}$ u zavisnosti od režima rada analizatora

	Pirimetamil	Ciprodinil	Boskalid	Trifloksistrobin	Bifentrin
			Full scan režim		
LOD	0,010	0,006	0,013	0,010	0,250
LOQ	0,030	0,018	0,041	0,029	0,756
			SIM režim		
LOD	0,011	0,007	0,009	0,004	0,250
LOQ	0,035	0,021	0,027	0,013	0,756
			SRM režim		
LOD	0,020	0,013	0,007	0,012	0,015
LOQ	0,038	0,038	0,022	0,036	0,047
			CRM režim		
LOD	0,008	0,009	0,010	0,009	0,021
LOQ	0,026	0,028	0,031	0,027	0,062

4.2.2 Rezultati razvoja i primene metode MET-LC-R1

4.2.2.1 Analiza ekstrakata jabuke – opšta zapažanja

Ekstrakcija kore vodom metodom simultanog usitnjavanja u blenderu, rezultuje ekstraktom koji je zamućen (Slika 4.2-21). Centrifugiranje ovog ekstrakta dovodi do suspenzije određenog udela čvrste faze, ali mikročestice kore ostaju u vodenoj fazi. Ceđenje ovakvog ekstrakta kroz mikrofilter je teško i dovodi do brzog zapušnja filtera (otprilike posle proceđenog 1 mL), što u krajnjoj liniji vodi većoj potrošnji filtera ukoliko je potrebno obezbediti veću zapreminu proceđenog ekstrakta. Zbog teže pripreme finalnog ekstrakta, voda kao ekstrakciono sredstvo nije uzeta u dalje razmatranje. Metanolni i acetonitrilni ekstrakti kore su relativno bistri nakon centrifugiranja (Slika 4.2-21). Mikrofiltracija ovih ekstrakata je lakša u odnosu na vodeni ekstrakt kore.



Slika 4.2-21 Izgled centrifugiranih ekstrakata kore Zlatnog Delišesa: 1-vodeni; 2-metanolni; 3-acetonitrilni ekstrakt

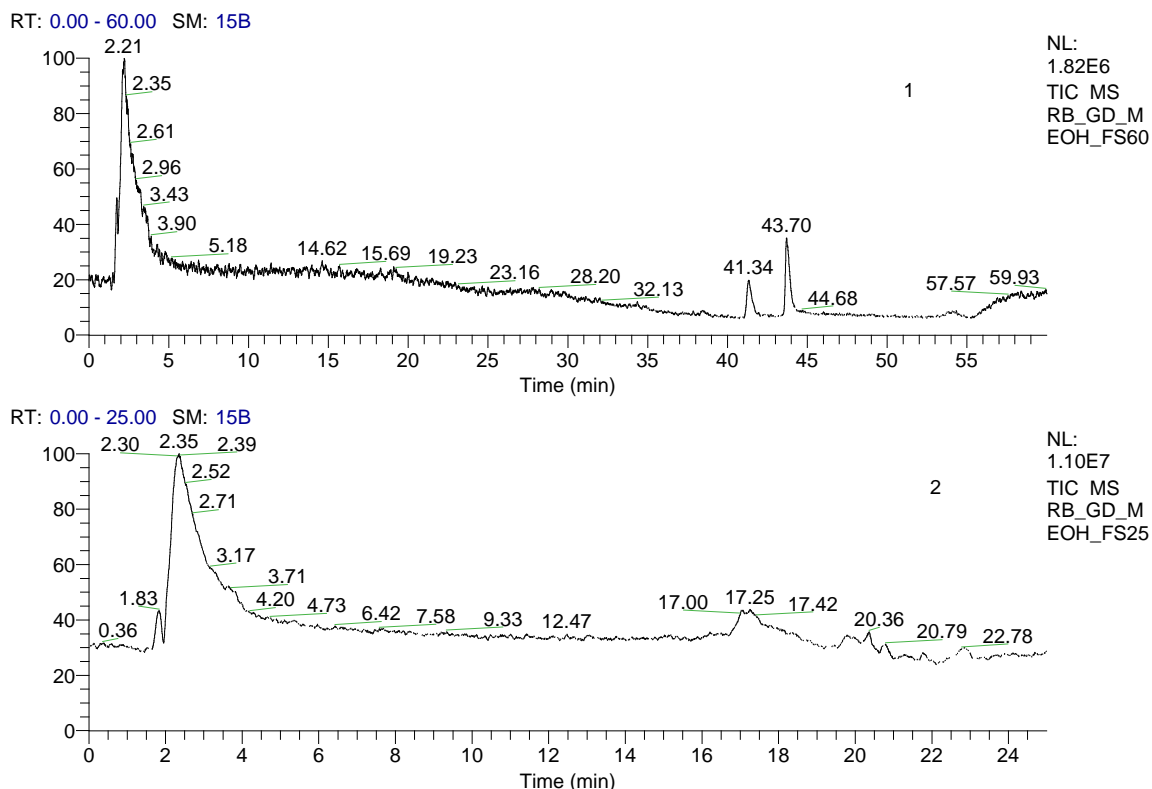
UV/VIS spektri vodenog, metanolnog i acetonitrilnog ekstrakta kore Greni Smita,

Zlatnog Delišesa i Ajdareda pokazuju određene razlike u UV oblasti i granične UV/VIS oblasti spektra (Slika 8.10-1 - Slika 8.10-3, Prilog, str. 344-346). U odnosu na vodene spektre koji pokazuju apsorpcioni maksimum na ~200 nm, apsorpcioni maksimumi metanolnih i acetonitrilnih ekstrakata su prošireni na oblast od ~200 do ~400 nm. Kada se posmatra u okviru istog tipa ekstrakta, a kroz različite sorte, u zoni od ~320 nm do ~400 nm uočava se razlika u intenzitetu apsorpcije u ekstraktu Delišesa u odnosu na Greni Smit i Ajdared. Razlike su uočene u metanolnom i acetonitrilnom ekstraktu, dok vodeni ekstrakt nije pokazao značajne razlike u spektrima kod sve tri sorte. S obzirom na prirodu ekstrakcionih sredstava, može se zaključiti da se kod Delišesa uočava veća koncentracija jako apsorbujućih nepolarnih jedinjenja iz grupe pigmenta.

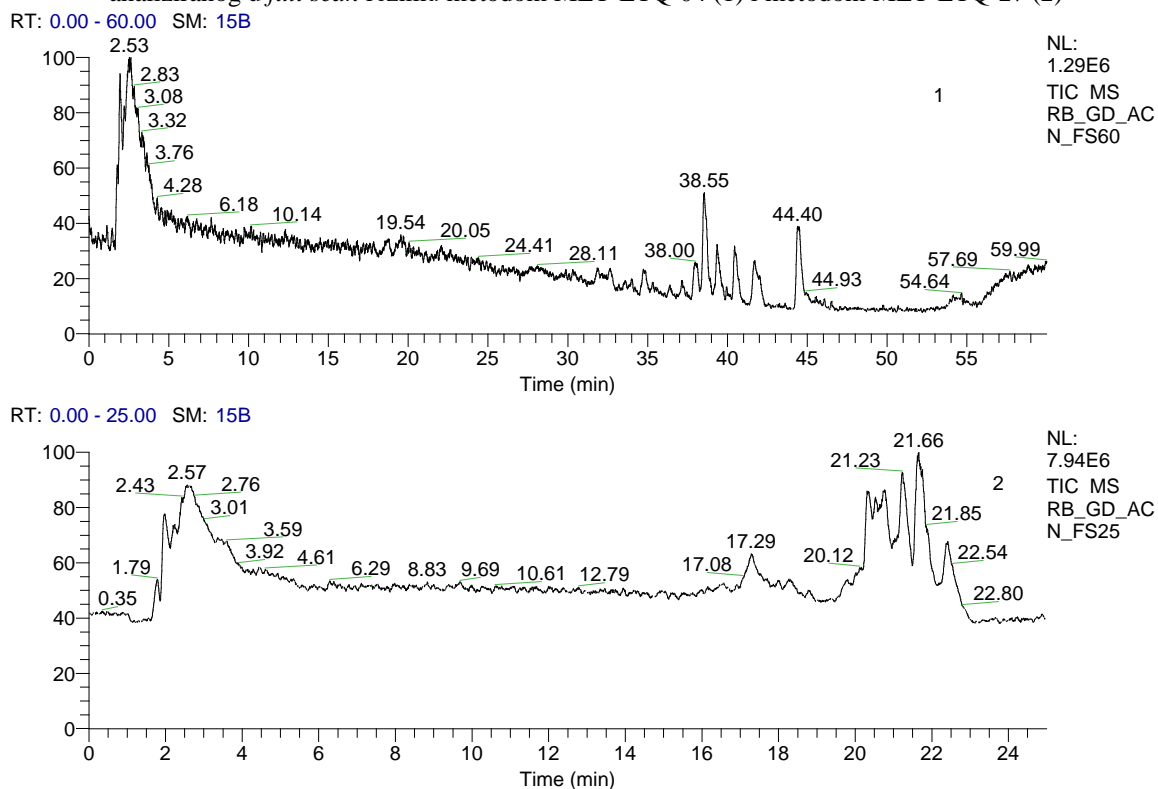
Slika 4.2-22 i Slika 4.2-23 prikazuju hromatograme metanolnog i acetonitrilnog ekstrakta kore Zlatnog Delišesa, analiziranog u *full scan* režimu u trajanju od 60 min (metoda MET-LTQ-04) i 25 min (metoda MET-LTQ-27). U odnosu na hromatogram acetonitrilnog ekstrakta, u hromatogramu metanolnog ekstrakta se može identifikovati veća količina primesa koje se eluiraju na samom početku (ret.vreme 2-3 min), a manji broj primesa na retencionim vremenima preko 30 min.

Slika 8.9-1 - Slika 8.9-4 (Prilog, str. 340-343) prikazuju hromatograme metanolnog i acetonitrilnog ekstrakta kore Ajdareda i Greni Smita. Metanolni hromatogrami ekstrakta kore različitih sorti su u velikoj meri slični, ali količina primesa koje se eluiraju na ret. vremenu 2-3 min, procenjena preko NL vrednosti, najveća je u ekstraktu Zlatnog Delišesa, a najmanja u ekstraktu Greni Smita. Acetonitrilni ekstrakti kore različitih sorti se razlikuju u količini primesa na retencionim vremenima preko 30 min (metoda MET-LTQ-04) odnosno u oblasti 20-23 min (metoda MET-LTQ-27). Poredeći NL vrednosti ili baznu liniju hromatograma ekstrakata

analiziranih metodom MET-LTQ-27, uočava se da primesa ima najviše u acetonitrilnom ekstraktu kore Greni Smita, a najmanje u ekstraktu kore Ajdareda.



Slika 4.2-22 Hromatogrami metanolnog ekstrakta kore Zlatnog Delišesa bez dodatih pesticida (blank) analiziranog u *full scan* režimu metodom MET-LTQ-04 (1) i metodom MET-LTQ-27 (2)

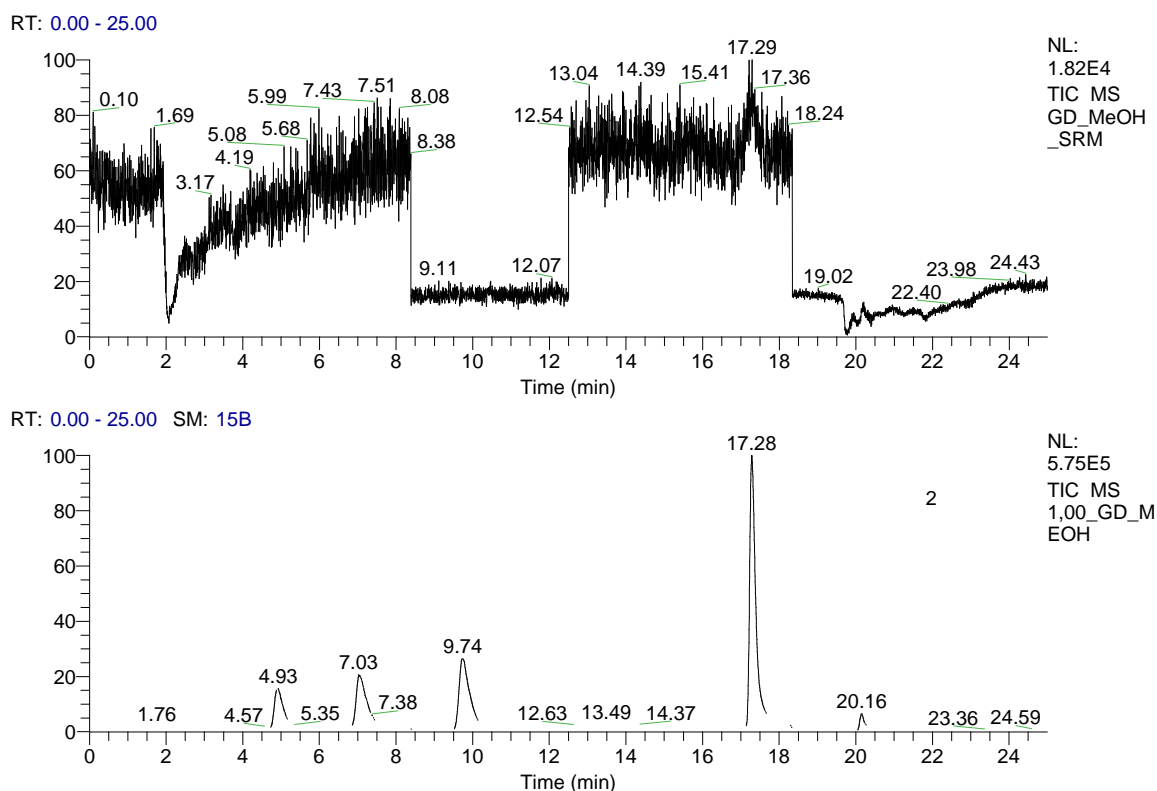


Slika 4.2-23 Hromatogrami acetonitrilnog ekstrakta kore Zlatnog Delišesa bez dodatih pesticida (blank) analiziranog u *full scan* režimu metodom MET-LTQ-04 (1) i metodom MET-LTQ-27 (2)

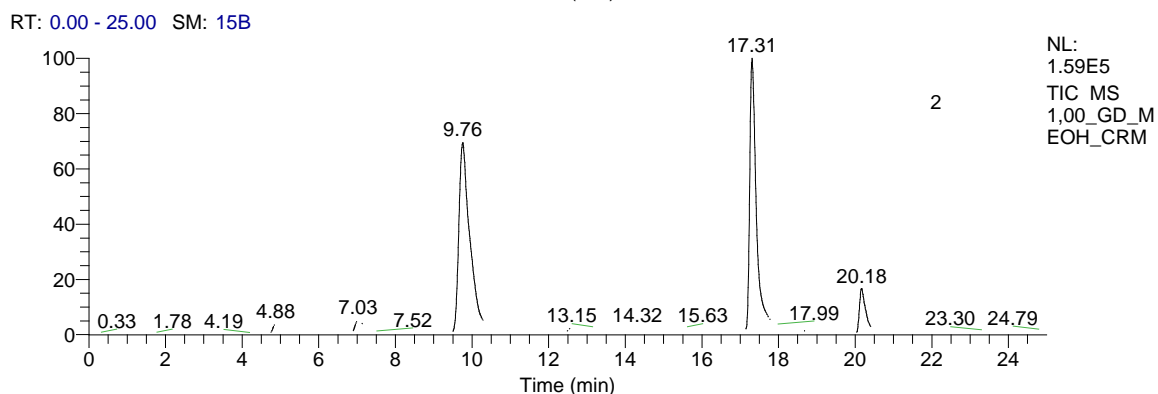
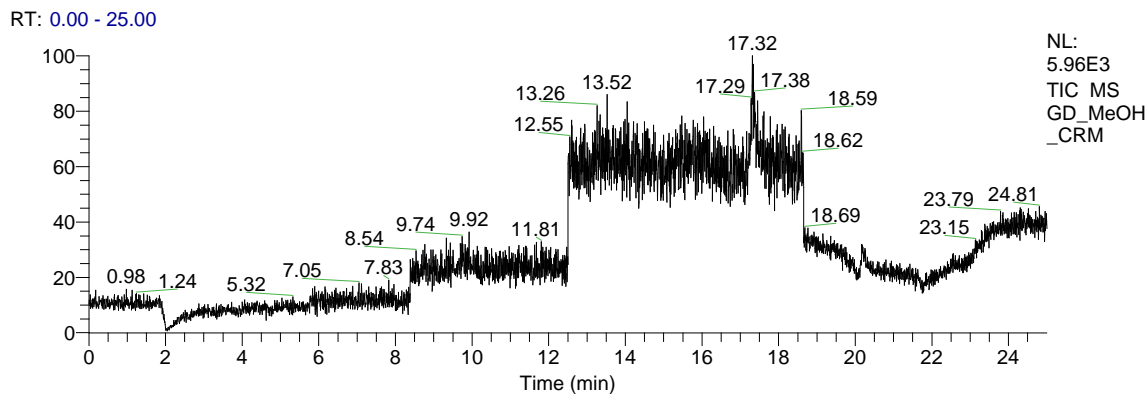
4.2.2.2 Rezultati ispitivanja parametara validacije

Osnovni parametri validacije su procenjeni za dva ekstrakciona sredstva – metanol i acetonitril; na osnovu procenjenih parametara izabrano je pogodnije ekstrakciono sredstvo.

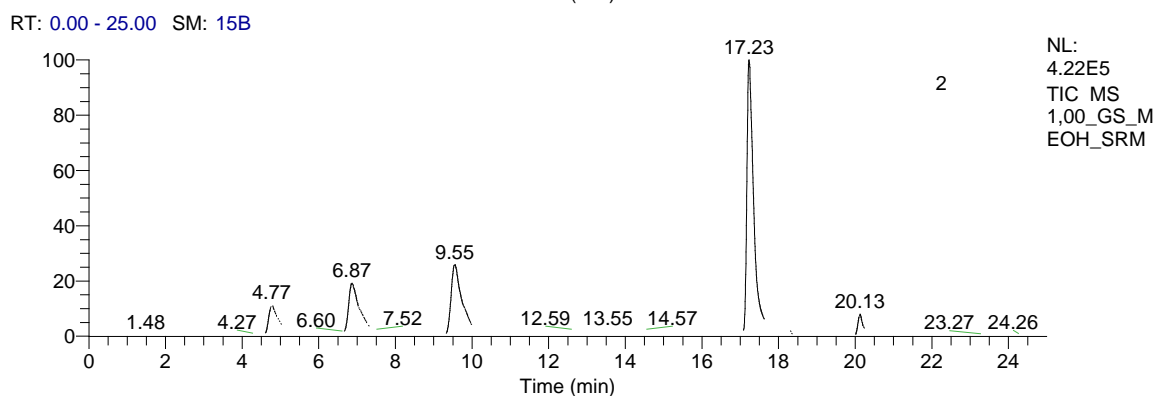
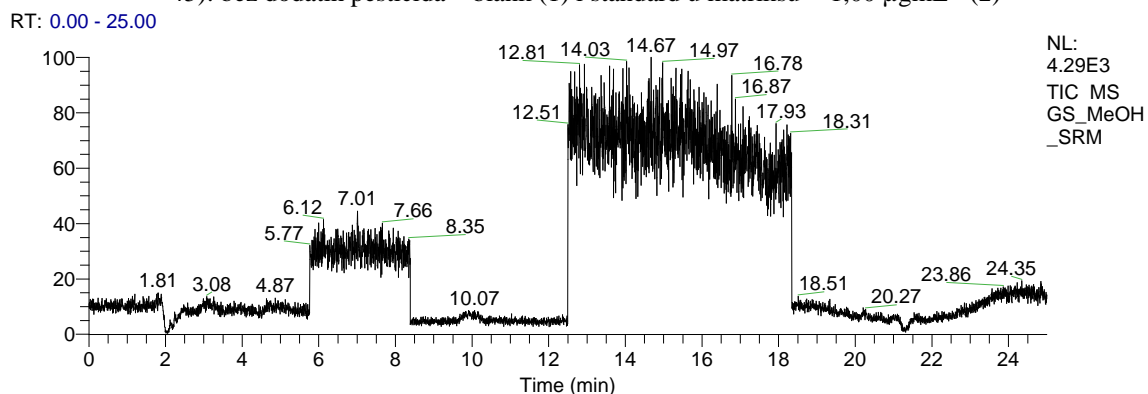
Selektivnost. U hromatogramima blank metanolnog ekstrakta (Slika 4.2-24 - Slika 4.2-29) i blank acetonitrilnog ekstrakta kore Zlatnog Delišesa, Ajdareda i Greni Smita (Slika 4.2-30 - Slika 4.2-35), analiziranih i u SRM i u CRM režimu rada analizatora, ne uočavaju se pikovi na retencionim vremenima analita, na osnovu čega se može zaključiti da je metoda MET-LC-R1 selektivna i u slučaju kada se kao ekstrakciono sredstvo koristi metanol i u slučaju kada se koristi acetonitril.



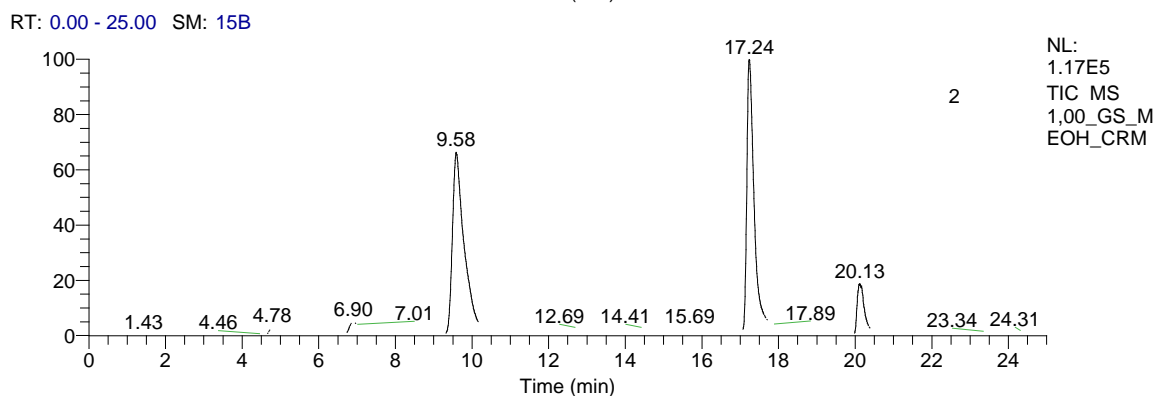
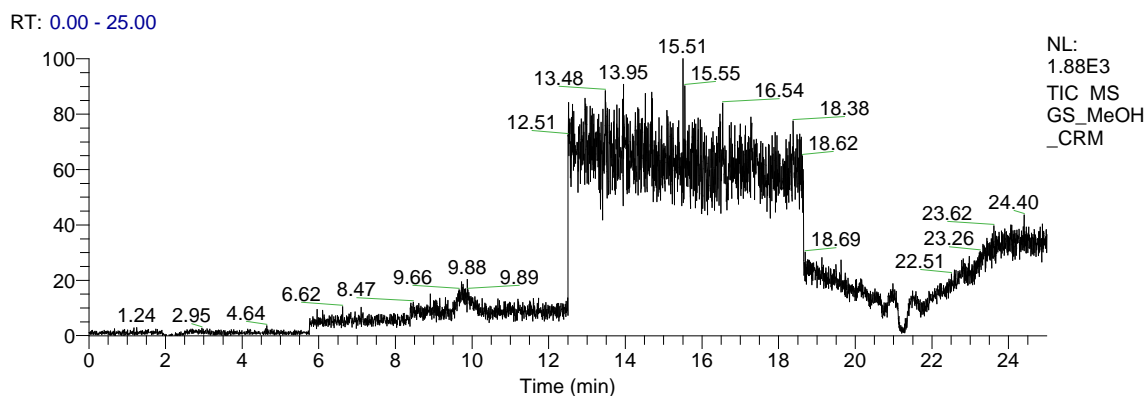
Slika 4.2-24 Hromatogrami metanolnih ekstrakata kore Zlatnog Delišesa u SRM režimu (metoda MET-LTQ-44): bez dodatih pesticida – blank (1) i standard u matriksu - 1,00 $\mu\text{g/mL}$ -1 (2)



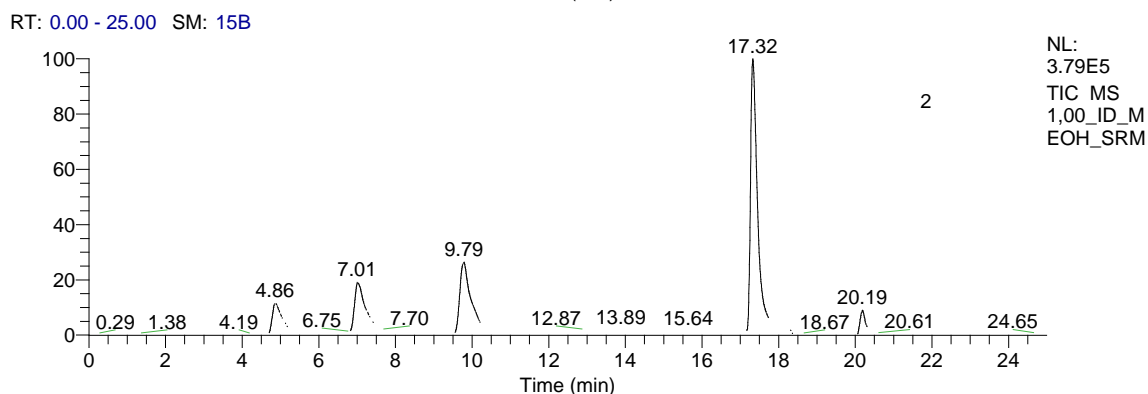
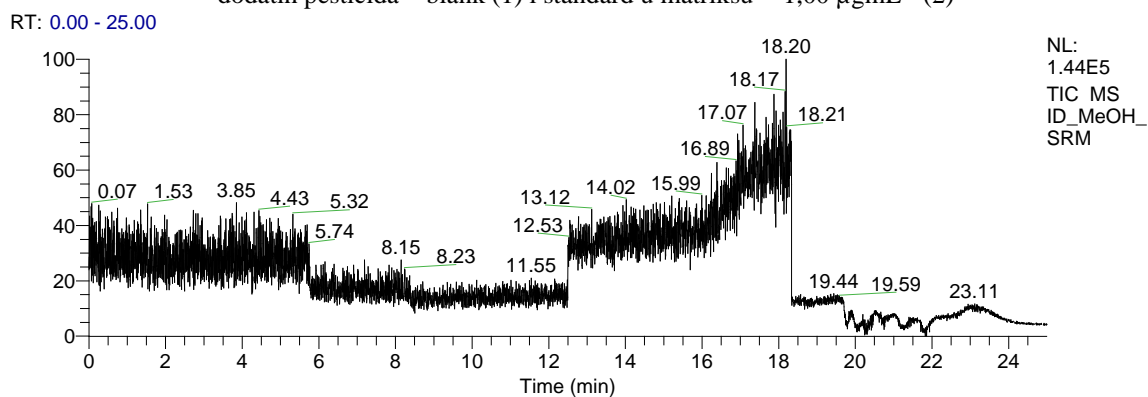
Slika 4.2-25 Hromatogrami metanolnih ekstrakata kore Zlatnog Delišesa u CRM režimu (metoda MET-LTQ-45): bez dodatih pesticida – blank (1) i standard u matriksu - 1,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (2)



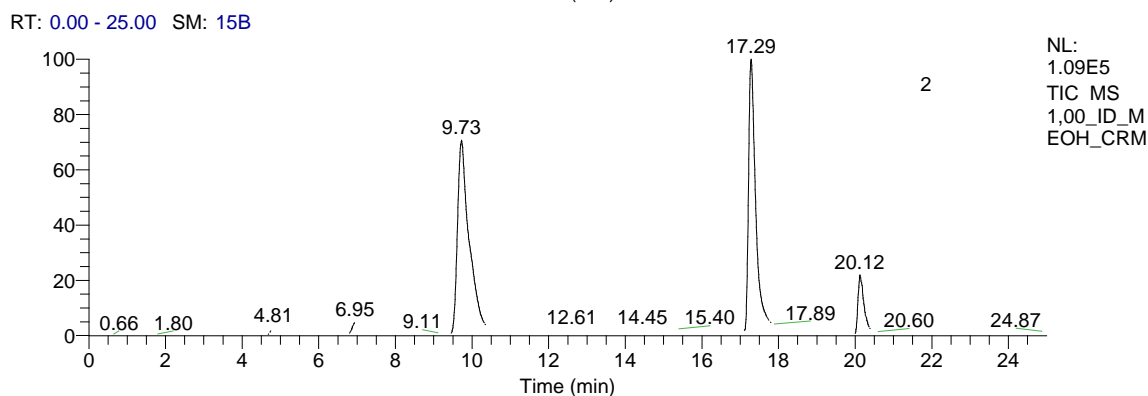
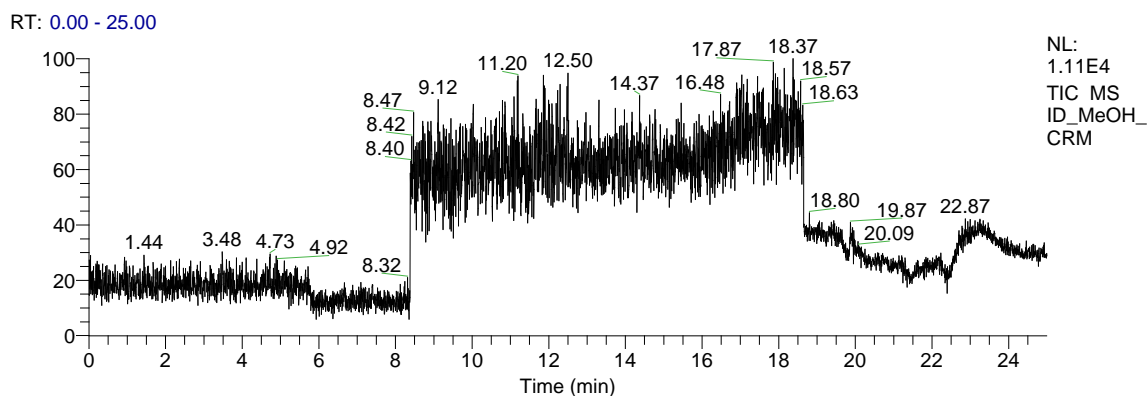
Slika 4.2-26 Hromatogrami metanolnih ekstrakata kore Greni Smita u SRM režimu (metoda MET-LTQ-44): bez dodatih pesticida – blank (1) i standard u matriksu - 1,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (2)



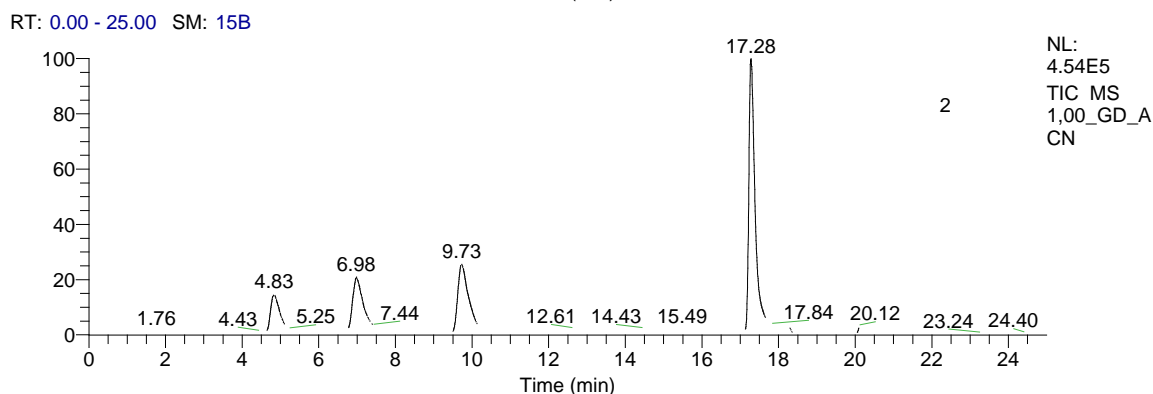
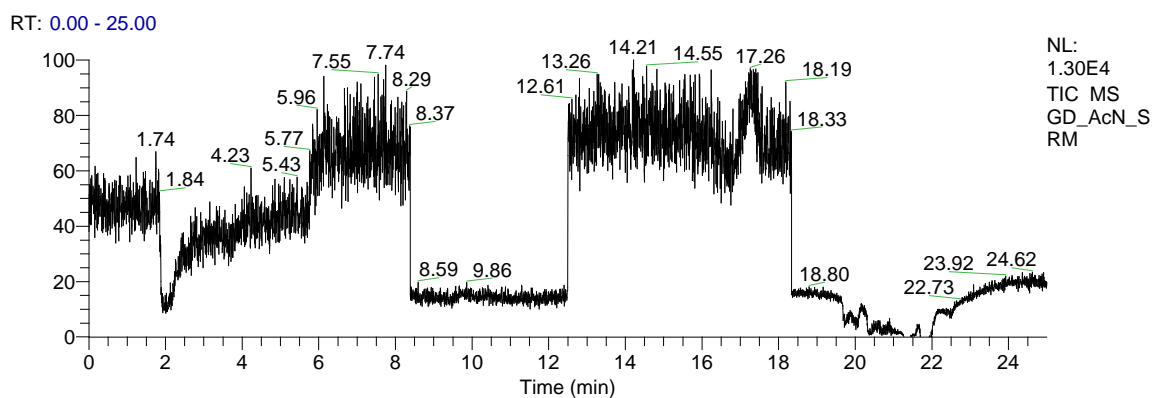
Slika 4.2-27 Hromatogrami metanolnih ekstraktata kore Greni Smita u CRM režimu (metoda MET-LTQ-45): bez dodatih pesticida – blank (1) i standard u matriksu - $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ (2)



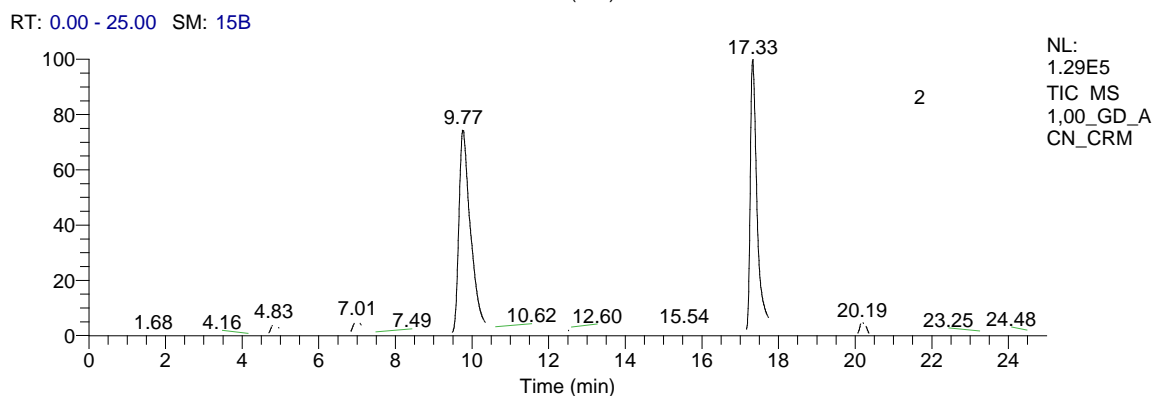
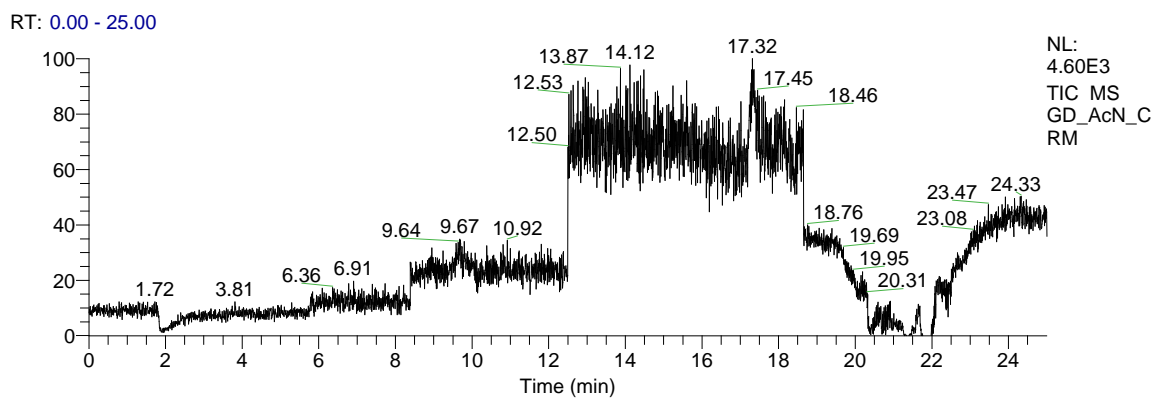
Slika 4.2-28 Hromatogrami metanolnih ekstraktata kore Ajdareda u SRM režimu (metoda MET-LTQ-44): bez dodatih pesticida – blank (1) i standard u matriksu - $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ (2)



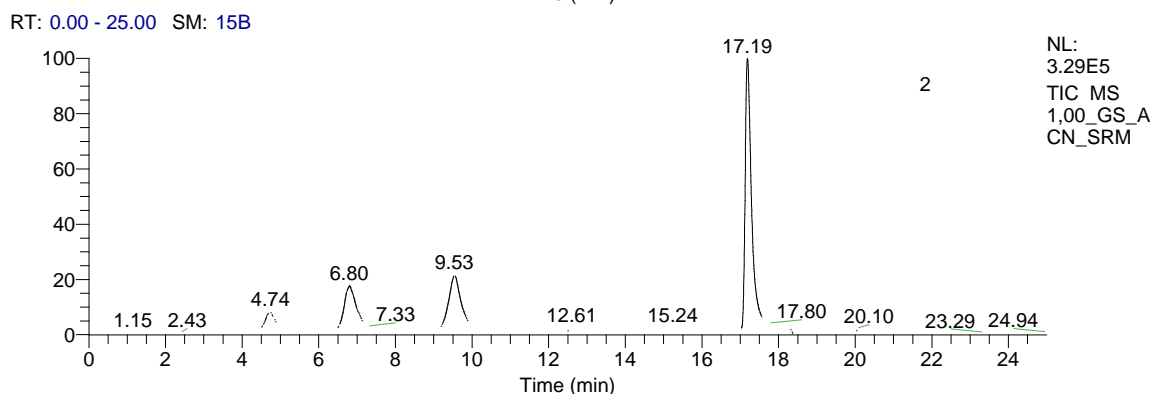
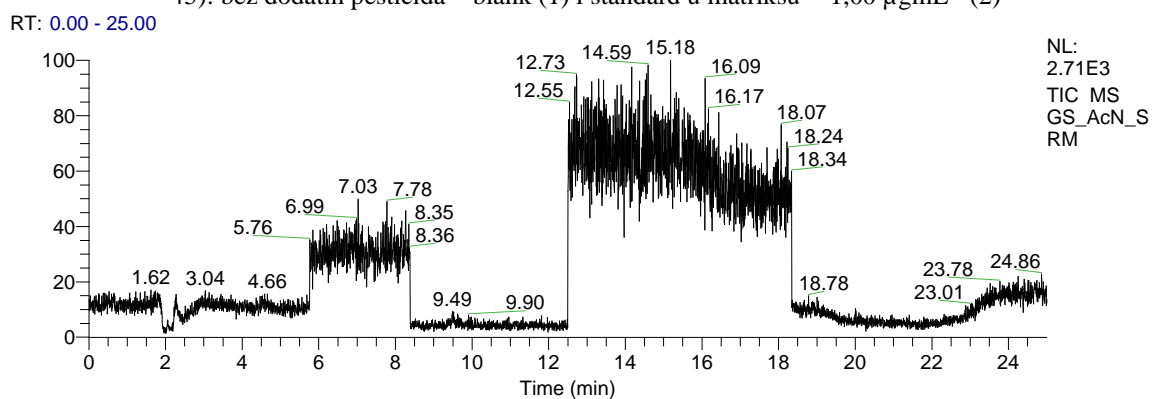
Slika 4.2-29 Hromatogrami metanolnih ekstrakata kore Ajdareda u CRM režimu (metoda MET-LTQ-45): bez dodatih pesticida – blank (1) i standard u matriksu - $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ (2)



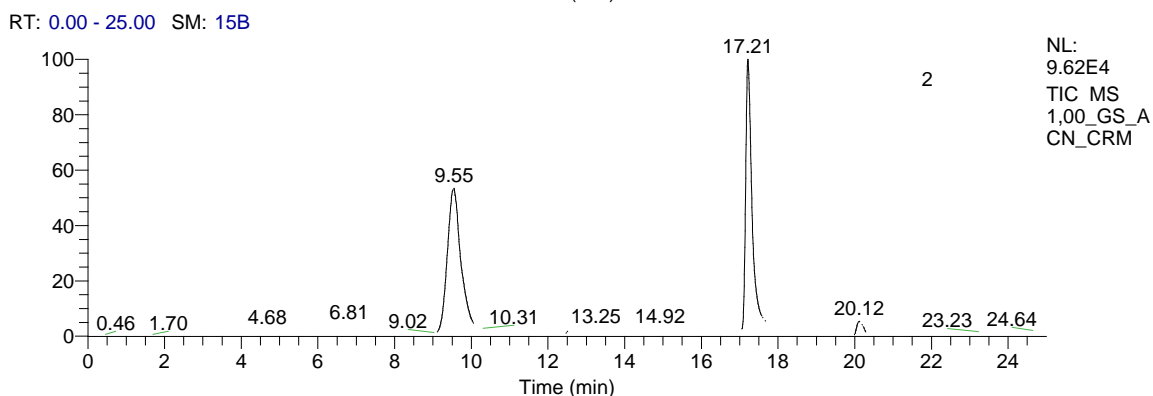
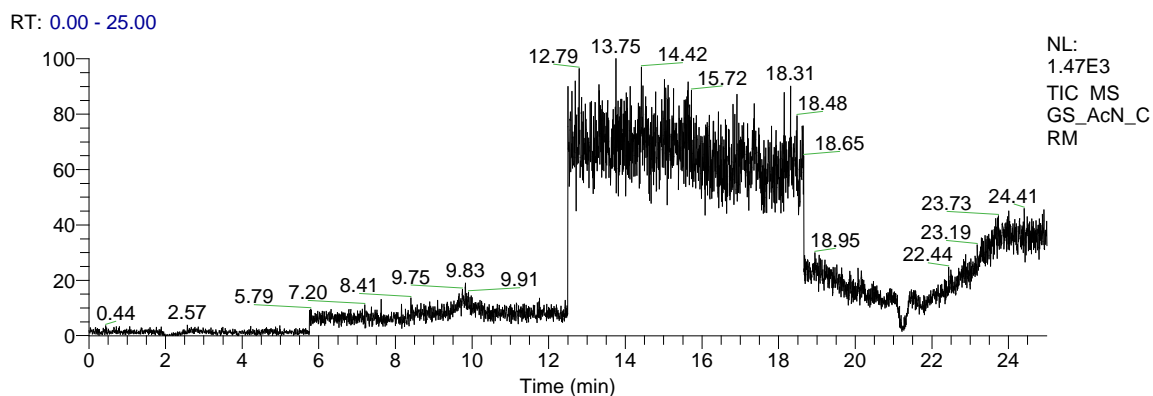
Slika 4.2-30 Hromatogrami acetonitrilnih ekstrakata kore Zlatnog Delišesa u SRM režimu (metoda MET-LTQ-44): bez dodatih pesticida – blank (1) i standard u matriksu - $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ (2)



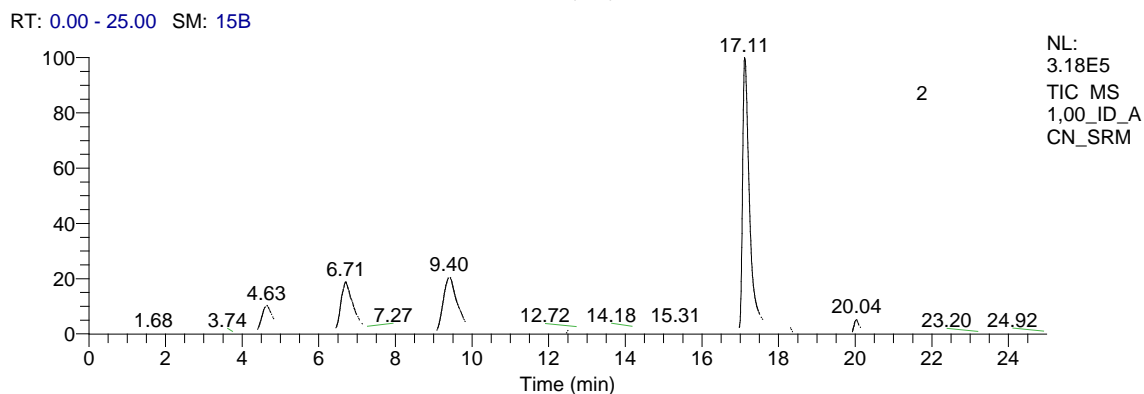
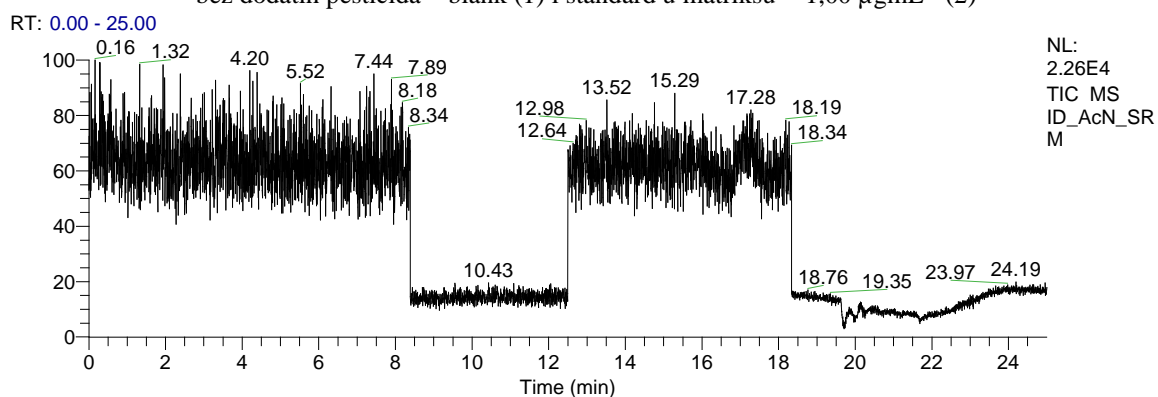
Slika 4.2-31 Hromatogrami acetonitrilnih ekstrakata kore Zlatnog Delišesa u CRM režimu (metoda MET-LTQ-45): bez dodatih pesticida – blank (1) i standard u matriksu - $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ (2)



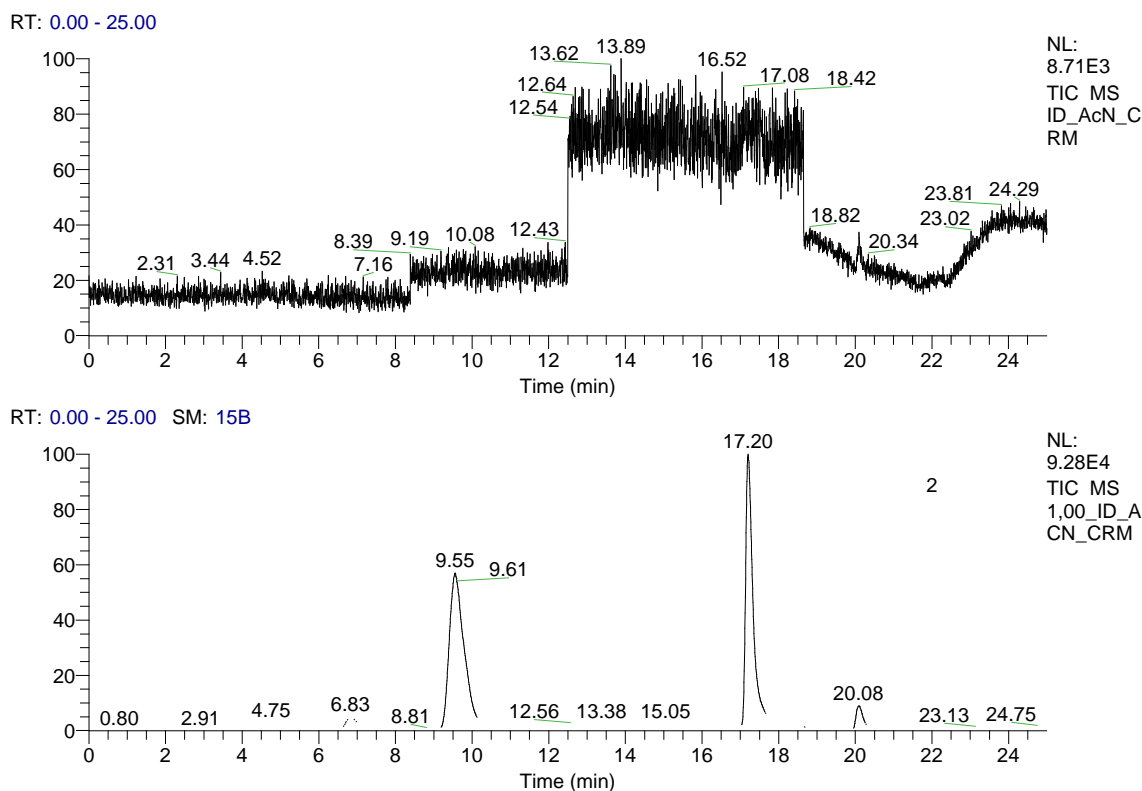
Slika 4.2-32 Hromatogrami acetonitrilnih ekstrakata kore Greni Smita u SRM režimu (metoda MET-LTQ-44): bez dodatih pesticida – blank (1) i standard u matriksu - $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ (2)



Slika 4.2-33 Hromatogrami acetonitrilnih ekstrakata kore Greni Smita u CRM režimu (metoda MET-LTQ-45): bez dodatih pesticida – blank (1) i standard u matriksu - $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ (2)



Slika 4.2-34 Hromatogrami acetonitrilnih ekstrakata kore Ajdareda u SRM režimu (metoda MET-LTQ-44): bez dodatih pesticida – blank (1) i standard u matriksu - $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ (2)



Slika 4.2-35 Hromatogrami acetonitrilnih ekstrakata kore Ajdareda u CRM režimu (metoda MET-LTQ-45): bez dodatih pesticida – blank (1) i standard u matriksu - 1,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (2)

Odzivi pesticida u ekstraktima kore i matriks efekat. Posmatrajući odziv standarda pesticida u metanolu kroz opseg koncentracija 0,00 – 5,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ može se zaključiti da osetljivost u SRM režimu raste u nizu bifentrin < pirimetanil < ciprodinil < boskalid < trifloksistrobin. Koeficijent korelacije se kreće od 0,9929 za bifentrin do 0,9994 za boskalid (Tabela 4.2-4). Osetljivost prema pesticidima u CRM režimu je donekle izmenjena; osetljivost raste u nizu ciprodinil < pirimetanil < bifentrin < trifloksistrobin < boskalid odnosno osetljivost prema bifentrinu je uporediva sa onom u SRM režimu, osetljivost prema boskalidu je nešto manja, dok je osetljivost prema trifloksistrobinu, ciprodinilu i pirimetanilu značajno manja od osetljivosti u SRM režimu. Koeficijent korelacije se kreće od 0,9730 za boskalid do 0,9914 za bifentrin (Tabela 4.2-5). Trend u promeni osetljivosti pesticida za standarde u acetonitrilu je analogan onome za standarde u metanolu. Koeficijent korelacije u SRM režimu se kreće od 0,9891 za pirimetanil do 0,9963 za ciprodinil, a u CRM režimu od 0,9714 za trifloksistrobin do 0,9972 za ciprodinil (Tabela 4.2-6 i Tabela 4.2-7).

U standardima pripremljenim u metanolnim ekstraktima kore Zlatnog Delišesa, Greni Smita i Ajdareda osetljivost u SRM režimu raste u nizu bifentrin < pirimetanil < ciprodinil < boskalid < trifloksistrobin; osetljivost u CRM režimu raste u nizu ciprodinil < pirimetanil < bifentrin < trifloksistrobin < boskalid (Tabela 4.2-4 i Tabela 4.2-5). Isti trend u promeni osetljivosti se uočava i za standarde pripremljene u acetonitrilnim ekstraktima kore Zlatnog Delišesa, Greni Smita i Ajdareda (Tabela 4.2-6 i Tabela 4.2-7). Trend u promeni osetljivosti u ekstraktima kore je analogan trendu za standarde u rastvaraču.

Tabela 4.2-4 Parametri kalibracionih kriva pesticida (0,00 – 5,00 µg mL⁻¹) u SRM režimu u metanolu i metanolnim ekstraktima kore Zlatnog Delišesa, Greni Smita i Ajdareda

Parametri krive	Pirimetanol	Ciprodinil	Boskalid	Trifloksistrobin	Bifentrin
Metanol					
Nagib	746747	1033536	1902847	2656962	262546
Odsečak	107212	148813	92479	411252	44227
Koeficijent korelacije	0,9934	0,9958	0,9994	0,9933	0,9929
Zlatni Delišes					
Nagib	438592	792907	1564875	2186036	251264
Odsečak	135223	175181	281818	735976	39226
Koeficijent korelacije	0,9780	0,9901	0,9913	0,9756	0,9962
Greni Smit					
Nagib	323139	586991	1169180	2100707	234856
Odsečak	45826	91407	216364	458199	49461
Koeficijent korelacije	0,9964	0,9965	0,9902	0,9889	0,9822
Ajdared					
Nagib	294299	541719	1174334	1874915	229141
Odsečak	42585	77174	112034	372752	22847
Koeficijent korelacije	0,9963	0,9955	0,9979	0,9917	0,9920

Tabela 4.2-5 Parametri kalibracionih kriva pesticida (0,00 – 5,00 µg mL⁻¹) u CRM režimu u metanolu i metanolnim ekstraktima kore Zlatnog Delišesa, Greni Smita i Ajdareda

Parametri krive	Pirimetanol	Ciprodinil	Boskalid	Trifloksistrobin	Bifentrin
Metanol					
Nagib	63048	48487	1194945	751381	229454
Odsečak	17932	10062	221307	187189	48659
Koeficijent korelacije	0,9753	0,9851	0,9730	0,9861	0,9914
Zlatni Delišes					
Nagib	48844	37801	1366669	745478	225015
Odsečak	11319	11295	164156	184252	46620
Koeficijent korelacije	0,9868	0,9761	0,9963	0,9846	0,9750
Greni Smit					
Nagib	38687	32364	1095758	672379	209034
Odsečak	3540	7 062	130670	134426	31324
Koeficijent korelacije	0,9989	0,9831	0,9958	0,9885	0,9942
Ajdared					
Nagib	33278	28567	992868	606095	193324
Odsečak	4864	6 656	139668	130052	43521
Koeficijent korelacije	0,9950	0,9812	0,9958	0,9885	0,9786

Tabela 4.2-6 Parametri kalibracionih kriva pesticida (0,00 – 5,00 µg mL⁻¹) u SRM režimu u acetonitrilu i acetonitrilnim ekstraktima kore Zlatnog Delišesa, Greni Smita i Ajdareda

Parametri krive	Pirimetanol	Ciprodinil	Boskalid	Trifloksistrobin	Bifentrin
Acetonitril					
Nagib	596335	841831	1585747	3036134	290358
Odsečak	81094	104285	151110	577091	38397
Koeficijent korelacije	0,9891	0,9963	0,9947	0,9859	0,9894
Zlatni Delišes					
Nagib	366692	528545	1270897	1985964	88809
Odsečak	90003	186831	202628	529799	17184
Koeficijent korelacije	0,9817	0,9678	0,9926	0,9819	0,9937
Greni Smit					
Nagib	242458	624404	803953	1658877	38933
Odsečak	49747	89245	125583	289284	9136
Koeficijent korelacije	0,9563	0,9944	0,9941	0,9927	0,9959
Ajdared					
Nagib	230494	454276	803997	1540015	131196
Odsečak	42810	84558	157193	324651	16873
Koeficijent korelacije	0,9902	0,9932	0,9885	0,9894	0,9991

Tabela 4.2-7 Parametri kalibracionih kriva pesticida (0,00 – 5,00 µg mL⁻¹) u CRM režimu u acetonitrilu i acetonitrilnim ekstraktima kore Zlatnog Delišesa, Greni Smita i Ajdareda

Parametri krive	Pirimetanol	Ciprodinil	Boskalid	Trifloksistrobin	Bifentrin
Acetonitril					
Nagib	45954	40746	845752	732353	295303
Odsečak	11754	4383	246130	199453	-1993
Koeficijent korelacije	0,9795	0,9972	0,9468	0,9714	0,9946
Zlatni Delišes					
Nagib	43127	33665	1088449	656331	110576
Odsečak	10440	8899	233168	163286	-9648
Koeficijent korelacije	0,9744	0,9788	0,9697	0,9728	0,9464
Greni Smit					
Nagib	25999	25809	831367	521351	50822
Odsečak	2663	4980	85441	88287	8126
Koeficijent korelacije	0,9983	0,9941	0,9972	0,9932	0,9920
Ajdared					
Nagib	27729	24303	767413	490071	104627
Odsečak	5293	5975	127828	106569	4864
Koeficijent korelacije	0,9890	0,9835	0,9883	0,9872	0,9798

Kada se poredi osetljivost nekog pesticida u metanolu sa osetljivošću u metanolnim ekstraktima kore uočava se sledeće: matriks efekat za sve pesticide u metanolnim ekstraktima sve tri vrste kore i u oba režima analize pretežno je negativan. Prisutna je neznatna supresija signala bifentrina, trifloksistrobina i pretežno boskalida ($-20\% < ME < +20\%$), dok se umerena i nešto izraženija supresija signala uočava za pirimetanil i ciprodinil ($-50\% < ME < -20\%$) (Slika 4.2-36).

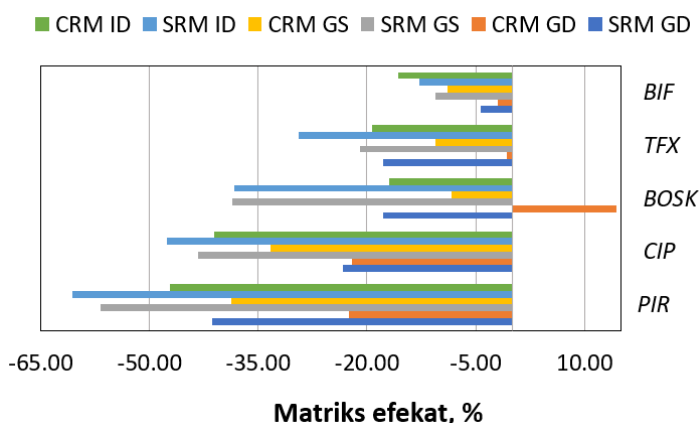
Matriks efekat za pirimetanil se kreće od -22% u ekstraktu kore Zlatnog Delišesa analiziranog u CRM režimu do -60% u ekstraktu kore Ajdareda analiziranog u SRM režimu. Kada se matriks efekat posmatra u okviru jednog matriksa, on je manje izražen u CRM režimu rada analizatora i to za oko 18% za matriks Zlatnog Delišesa i Greni Smita i za oko 13% za matriks Ajdareda.

Matriks efekat za ciprodinil se kreće od -22% u ekstraktu kore Zlatnog Delišesa analiziranog u CRM režimu do -47% u ekstraktu kore Ajdareda analiziranog u SRM režimu. Kada se matriks efekat posmatra u okviru jednog matriksa, on je praktično identičan za oba režima rada analizatora.

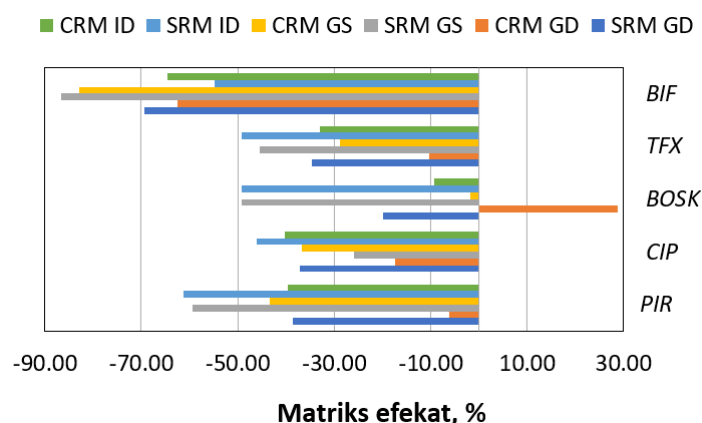
Matriks efekat za boskalid se kreće od $+14\%$ u ekstraktu kore Zlatnog Delišesa analiziranog u CRM režimu do -38% u ekstraktima kore Greni Smita i Ajdareda analiziranih u SRM režimu. Kada se matriks efekat posmatra u okviru jednog matriksa, za matriks Zlatnog Delišesa se uočava inverzija matriks efekta sa prelaskom iz SRM u CRM režim, ali on ostaje u granicama neznatnog, dok se za ostale matrikse sa prelaskom iz SRM u CRM režim matriks efekat smanjuje.

Matriks efekat za trifloksistrobin se kreće od 0% u ekstraktu kore Zlatnog Delišesa analiziranog u CRM režimu do -29% u ekstraktu kore Ajdareda analiziranog u SRM režimu. Kada se matriks efekat posmatra u okviru jednog matriksa, on je uporediv za oba režima rada analizatora.

Matriks efekat za bifentrin se kreće od -2% u ekstraktu kore Zlatnog Delišesa analiziranog u CRM režimu do -15% u ekstraktu kore Ajdareda analiziranog u CRM režimu. Kada se matriks efekat posmatra u okviru jednog matriksa, on je praktično identičan za oba režima rada analizatora.



Slika 4.2-36 Matriks efekat u metanolnim ekstraktima kore Zlatnog Delišesa, Greni Smita i Ajdareda u SRM i CRM režimu rada analizatora za opseg koncentracija $0,00 - 5,00 \mu\text{g mL}^{-1}$



Slika 4.2-37 Matriks efekat u acetonitrilnim ekstraktima kore Zlatnog Delišesa, Greni Smita i Ajdareda u SRM i CRM režimu rada analizatora za opseg koncentracija $0,00 - 5,00 \mu\text{g mL}^{-1}$

Kada se poredi osetljivost nekog pesticida u acetonitrilu sa osetljivošću u acetonitrilnim ekstraktima kore uočava se sledeće: matriks efekat za sve pesticide u acetonitrilnim ekstraktima sve tri vrste kore i u oba režima analize pretežno je negativan. Prisutna je umerena supresija signala pirimetanila, ciprodinila, boskalida i trifloksistrobina ($-20 \% < ME < +20 \%$), dok se nešto izraženija supresija signala uočava za bifentrin ($-50 \% < ME < -20 \%$) (Slika 4.2-37).

Matriks efekat za pirimetanil se kreće od -6 % u ekstraktu kore Zlatnog Delišesa analiziranog u CRM režimu do -61 % u ekstraktu kore Ajdareda analiziranog u SRM režimu. Kada se matriks efekat posmatra u okviru jednog matriksa, on je manje izražen u CRM režimu rada analizatora i to za oko 32 % za matriks Zlatnog Delišesa i za oko 17 % za matriks Ajdareda i Greni Smita.

Matriks efekat za ciprodinil se kreće od -17 % u ekstraktu kore Zlatnog Delišesa analiziranog u CRM režimu do -46 % u ekstraktu kore Ajdareda analiziranog u SRM režimu. Kada se matriks efekat posmatra u okviru jednog matriksa, on je praktično identičan za oba režima rada analizatora za matriks Ajdareda, oko 10 % manji za SRM režim za matriks Greni Smita i 20 % manji za CRM režim Zlatnog Delišesa.

Matriks efekat za boskalid se kreće od +29 % u ekstraktu kore Zlatnog Delišesa analiziranog u CRM režimu do -49 % u ekstraktima kore Greni Smita i Ajdareda analiziranih u SRM režimu. Kada se matriks efekat posmatra u okviru jednog matriksa, za matriks Zlatnog Delišesa se uočava inverzija efekata sa prelaskom iz SRM u CRM režim, ali on ostaje u granicama nezatnog, dok se za ostale matrikse sa prelaskom iz SRM u CRM režim matriks efekat smanjuje.

Matriks efekat za trifloksistrobin se kreće od -10 % u ekstraktu kore Zlatnog Delišesa analiziranog u CRM režimu do -49 % u ekstraktu kore Ajdareda analiziranog u SRM režimu. Kada se matriks efekat posmatra u okviru jednog matriksa, on je uporediv nešto manje izražen u CRM režimu rada analizatora.

Matriks efekat za bifentrin se kreće od -55 % u ekstraktu kore Ajdareda analiziranog u SRM režimu do -87 % u ekstraktu kore Greni Smita analiziranog u SRM režimu. Kada se matriks efekat posmatra u okviru jednog matriksa, on je uporediv za oba režima rada analizatora.

Linearnost. Metoda MET-LC-R1 pokriva linearni opseg od nekoliko redova veličine za sve analite i u SRM i u CRM režimu kada se kao ekstrakciono sredstvo koristi acetonitril (Tabela 4.2-8 i Tabela 4.2-9). Najširi neprekidni linearni opseg metode u SRM režimu (Tabela 4.2-8) utvrđen je za pirimetanil u matriksu Zlatnog Delišeša i Greni Smita i obuhvata koncentracije pesticida od 0,005 do 5,00 mgkg⁻¹ kore. Zbog različite osetljivosti u oblasti nižih i viših koncentracija, linearni opseg metode za ostale analite je podeljen u dva ili tri uža opsega i to za ciprodinil u matriksu Ajdareda, boskalid u sva tri matriksa i trifloksistrobin i bifentrin u matriksu Greni Smita. Koeficijenti korelacije SRM odziva i koncentracije pesticida se kreću od 0,9706 do 1,0000.

Tabela 4.2-8 Parametri kalibracionih krivi pesticida u okviru linearnog opsega metode u SRM režimu u acetonitrilnim ekstraktima kore Zlatnog Delišeša, Greni Smita i Ajdareda

Analit	Opseg, mgkg ⁻¹	Broj standarda	Nagib	Odsečak	Koeficijent korelacije
Ajdared					
Pirimetanil	0,005 – 1,000	8	453049	14781	0,9989
Ciprodinil	0,005 – 0,100	6	485992	2744	0,9985
	0,075 – 5,000	6	294852	16868	0,9960
Boskalid	0,005 – 0,100	5	580328	4576	0,9981
	0,100 – 5,000	5	421211	3566	0,9997
Trifloksistrobin	0,010 – 5,000	8	439827	5048	0,9996
Bifentrin	0,025 – 5,000	7	23377	85	1,000
Zlatni Delišeš					
Pirimetanil	0,005 – 5,000	10	355182	500	0,9984
Ciprodinil	0,025 – 2,500	8	276657	-238	0,9974
Boskalid	0,005 – 0,100	5	284375	35344	0,9948
	0,100 – 2,500	5	612110	-7011	0,9972
Trifloksistrobin	0,025 – 5,000	8	328765	4817	0,9992
Bifentrin	0,005 – 0,500	7	13207	223	0,9993
Greni Smit					
Pirimetanil	0,005 – 5,000	10	493136	-1785	0,9999
Ciprodinil	0,075 – 5,000	6	517959	-32394	0,9998
Boskalid	0,005 – 0,050	5	700661	3151	0,9999
	0,050 – 0,500	5	1419470	-24706	0,9996
	0,500 – 5,000	4	477939	382506	0,9964
Trifloksistrobin	0,005 – 0,100	6	463151	1880	0,9790
	0,100 – 2,500	5	905859	-74657	0,9925
Bifentrin	0,010 – 0,500	6	12785	70	0,9985
	0,500 – 5,000	4	6428	2714	0,9706

Najširi neprekidni linearni opseg metode u CRM režimu (Tabela 4.2-9) utvrđen je za bifentrin u matriksu Greni Smita i obuhvata koncentracije pesticida od 0,005 do 5,00 mgkg⁻¹ kore. Zbog različite osetljivosti u oblasti nižih i viših koncentracija, linearni opseg metode za ostale analite je podeljen u dva ili tri uža opsega i to za boskalid, trifloksistrobin i bifentrin u matriksu Ajdareda, pirimetanil u matriksu Zlatnog Delišesa i za boskalid i trifloksistrobin u matriksu Greni Smita. Koeficijenti korelacije CRM odziva i koncentracije pesticida se kreću od 0,9727 do 0,9999.

Tabela 4.2-9 Parametri kalibracionih krivi pesticida u okviru linearnog opsega metode u CRM režimu u acetonitrilnim ekstraktima kore Zlatnog Delišesa, Greni Smita i Ajdareda

Analit	Opseg, mgkg ⁻¹	Broj standarda	Nagib	Odsečak	Koeficijent korelacije
Ajdared					
Pirimetanil	0,025 – 1,000	7	66229	643	0,9990
Ciprodinil	0,025 – 1,000	7	27715	-68	0,9906
Boskalid	0,005 – 1,000	8	254286	2266	0,9996
	0,100 – 2,500	5	244860	5550	0,9996
Trifloksistrobin	0,005 – 0,100	6	262779	2536	0,9994
	0,100 – 5,000	5	231769	10539	0,9996
Bifentrin	0,025 – 0,500	5	25632	373	0,9999
	0,100 – 5,000	5	24290	-272	0,9983
Zlatni Delišes					
Pirimetanil	0,005 – 0,500	7	54103	40	0,9990
	0,500 – 5,000	5	33208	11045	0,9974
Ciprodinil	0,005 – 2,500	6	23250	86	0,9994
Boskalid	0,025 – 2,500	7	358752	10685	0,9983
Trifloksistrobin	0,025 – 1,000	6	364891	-3413	0,9984
Bifentrin	0,005 – 1,000	8	17794	57	0,9993
Greni Smit					
Pirimetanil	0,005 – 1,000	8	33242	40	0,9990
Ciprodinil	0,005 – 1,000	6	11672	23	0,9998
Boskalid	0,010 – 0,100	5	602361	-3005	0,9946
	0,100 – 2,500	5	398501	26289	0,9966
Trifloksistrobin	0,005 – 0,100	6	263693	1339	0,9727
	0,050 – 1,000	6	329570	-5658	0,9992
Bifentrin	0,005 – 5,000	9	14414	98	0,9999

Metoda MET-LC-R1 pokriva linearni opseg od nekoliko redova veličine za sve analite i u SRM i u CRM režimu kada se kao ekstrakciono sredstvo koristi metanol (Tabela 4.2-10 i Tabela 4.2-11). Najširi neprekidni linearni opseg metode u SRM režimu (Tabela 4.2-10) utvrđen je za bifentrin u matriksu Ajdareda i ciprodinil i trifloksistrobin u matriksu Zlatnog Delišesa. Zbog različite osetljivosti u oblasti nižih i viših koncentracija, linearni opseg metode za ciprodinil u matriksu Ajdareda je podeljen u dva uža opsega. Koeficijenti korelacije SRM odziva i koncentracije pesticida se kreću od 0,9752 do 0,9999.

Tabela 4.2-10 Parametri kalibracionih krivi pesticida u okviru linearnog opsega metode u SRM režimu u metanolnim ekstraktima kore Zlatnog Delišesa, Greni Smita i Ajdareda

Analit	Opseg, mgkg ⁻¹	Broj standarda	Nagib	Odsečak	Koeficijent korelacije
Ajdared					
Pirimetanol	0,025 – 2,500	8	64682	-976	0,9987
Ciprodinil	0,025 – 0,500	5	274862	-5308	0,9972
	0,250 – 5,000	5	192859	26182	0,9997
Boskalid	0,025 – 5,000	8	352313	-3309	0,9999
Trifloksistrobin	0,050 – 5,000	8	368100	-8635	0,9991
Bifentrin	0,025 – 5,000	9	7072	-152	0,9974
Zlatni Delišes					
Pirimetanol	0,050 – 1,000	6	75010	-2010	0,9952
Ciprodinil	0,010 – 2,500	9	61699	286	0,9998
Boskalid	0,010 – 0,100	5	77756	393	0,9968
	0,050 – 0,500	5	56283	1970	0,9991
Trifloksistrobin	0,005 – 2,500	9	80242	151	0,9999
Bifentrin	0,025 – 2,500	7	2483	46	0,9998
Greni Smit					
Pirimetanol	0,025 – 2,500	8	58355	-352	0,9912
Ciprodinil	0,010 – 1,000	7	125564	535	0,9930
Boskalid	0,050 – 2,500	6	43484	128	0,9752
Trifloksistrobin	0,025 – 2,500	7	605011	-8219	0,9999
Bifentrin	0,100 – 5,000	6	2539	213	0,9976

Najširi neprekidni linearni opseg metode u CRM režimu (Tabela 4.2-11) utvrđen je za trifloksistrobin u matriksu Ajdareda i Zlatnog Delišesa i obuhvata koncentracije pesticida od 0,050 do 5,00 odnosno od 0,025 do 2,500 mgkg⁻¹ kore. Zbog različite osetljivosti u oblasti nižih i viših koncentracija, linearni opseg metode za boskalid i trifloksistrobin je podeljen u dva uža opsega u matriksu Greni Smita. Koeficijenti korelacije CRM odziva i koncentracije pesticida se kreću od 0,9365 do 0,9998.

Tabela 4.2-11 Parametri kalibracionih krivi pesticida u okviru linearnog opsega metode u CRM režimu u metanolnim ekstraktima kore Zlatnog Delišesa, Greni Smita i Ajdareda

Analit	Opseg, mgkg ⁻¹	Broj standarda	Nagib	Odsečak	Koeficijent korelacije
Ajdared					
Pirimetamil	0,050 – 1,000	6	38119	322	0,9902
Ciprodinil	0,050 – 2,500	7	15825	-34	0,9868
Boskalid	0,075 – 1,000	5	158226	1851	0,9365
Trifloksistrobin	0,050 – 5,000	8	186250	3580	0,9963
Bifentrin	0,050 – 2,500	7	18755	602	0,9831
Zlatni Delišes					
Pirimetamil	0,010 – 1,000	7	22633	858	0,9052
Ciprodinil	0,025 – 1,000	6	18350	128	0,9964
Boskalid	0,050 – 2,500	6	258112	7645	0,9955
Trifloksistrobin	0,025 – 2,500	8	184191	2428	0,9994
Bifentrin	0,075 – 1,000	5	10115	855	0,9886
Greni Smit					
Pirimetamil	0,050 – 1,000	6	33822	156	0,9933
Ciprodinil	0,075 – 1,000	5	22652	285	0,9899
Boskalid	0,025 – 0,250	5	202551	905	0,9954
	0,250 – 2,500	5	325818	6259	0,9963
Trifloksistrobin	0,005 – 0,075	5	148458	2206	0,9837
	0,075 – 2,500	6	275890	9049	0,9998
Bifentrin	0,025 – 1,000	7	9856	53	0,9885

Tačnost i preciznost. Tačnost metode MET-LC-R1, izražena preko prinosa ekstrakcije analita, kada se kao ekstrakciono sredstvo koristi acetonitril se kreće od 39 % za koncentraciju bifentrina 0,10 mgkg⁻¹ u matriksu Ajdareda do 120 % za koncentraciju pirimetanila 0,10 mgkg⁻¹ u matriksu Zlatnog Delišesa (Tabela 4.2-12). Prinosi ekstrakcije su prihvatljivi prema definisanim kriterijumima SANTE direktive za validaciju. Srednja tačnost metode kroz opseg koncentracija pesticida od 0,10 do 5,00 mgkg⁻¹ kreće se od 68 do 90 % za matriks Zlatnog Delišesa, od 48 do 98 % za matriks Ajdareda i od 60 do 95 % za matriks Greni Smita. Preciznost metode se kreće od 1 do 25 %. Srednja preciznost metode koja svedoči o eventualnoj varijaciji prinosa ekstrakcije sa koncentracijom analita je zadovoljavajuća za većinu analita; za pirimetanil i bifentrin u matriksu Zlatnog Delišesa, pirimetanil u matriksu Ajdareda i za trifloksistrobin u matriksu Greni Smita je oko 30 %, što ukazuje da se prinos ekstrakcije ovih pesticida u datim matriksima u većoj menja sa koncentracijom pesticida.

Tabela 4.2-12 Prinos ekstrakcije metode sa korakom ekstrakcije acetonitriplom i analizom u SRM režimu

Koncentracija, mg kg ⁻¹		Pirimetanil	Ciprodinil	Boskalid	Trifloksistrobin	Bifentrin
		Zlatni Delišes				
0,10	Tačnost, %	120,62	92,56	95,14	82,98	91,65
	Ponovljivost, %	12,39	11,08	22,88	26,83	10,74
1,00	Tačnost, %	76,64	82,00	87,78	96,57	56,20
	Ponovljivost, %	3,39	3,90	6,88	3,72	22,57
5,00	Tačnost, %	73,90	79,62	70,48	84,22	56,42
	Ponovljivost, %	2,06	5,97	6,11	3,10	16,82
Srednja tačnost, %*		90,39	84,73	84,47	87,92	68,09
Srednja ponovljivost, %**		29,01	8,13	14,98	8,55	29,97
Koncentracija, mg kg ⁻¹		Ajdared				
0,10	Tačnost, %	63,24	72,07	88,64	81,78	39,02
	Ponovljivost, %	1,75	2,44	11,46	14,37	14,39
1,00	Tačnost, %	106,79	83,21	99,81	76,07	55,19
	Ponovljivost, %	8,93	3,18	17,54	16,77	8,69
5,00	Tačnost, %	70,23	69,58	105,29	62,50	48,52
	Ponovljivost, %	3,92	1,71	7,05	3,45	4,03
Srednja tačnost, %		80,90	74,95	97,91	73,45	47,58
Srednja ponovljivost, %		29,21	9,69	8,67	13,48	17,08
Koncentracija, mg kg ⁻¹		Greni Smit				
0,10	Tačnost, %	57,79	68,86	69,11	81,60	117,72
	Ponovljivost, %	12,79	22,90	9,96	17,72	12,25
1,00	Tačnost, %	61,80	45,53	56,05	43,89	72,05
	Ponovljivost, %	6,37	18,31	6,25	1,00	11,02
5,00	Tačnost, %	61,69	67,55	67,08	62,95	96,60
	Ponovljivost, %	2,09	22,46	5,19	13,48	25,98
Srednja tačnost, %		60,43	60,68	64,08	62,81	95,46
Srednja ponovljivost, %		3,78	21,65	10,96	30,02	23,94

*Suma tačnosti za 3 koncentracije podeljena sa brojem koncentracija

** Koeficijent varijacije tačnosti za 3 koncentracije

Tačnost metode MET-LC-R1, izražena preko prinosa ekstrakcije analita, kada se kao ekstrakciono sredstvo koristi metanol se kreće od 5 % za koncentraciju bifentrina 0,10 mgkg⁻¹ u matriksu Greni Smita do 85 % za koncentraciju pirimetanila 1,00 mgkg⁻¹ u istom matriksu (Tabela 4.2-13). Prihvatljiv prinos ekstrakcije metanolom procenjen je za koncentraciju boskalida i trifloksistrobina 0,10 mgkg⁻¹ u matriksu Ajdareda i za sve analite i koncentracije u matriksu Zlatnog Delišesa i Greni Smita, sem za bifentrin. Ostale vrednosti prinosa ekstrakcije nisu prihvatljive prema definisanim kriterijumima SANTE direktive za validaciju, jer su ispod donje definisane granice od 30 %. Srednja tačnost metode izražena kao srednja vrednost prinosa ekstrakcije za tri nivoa koncentracije pesticida kreće se od 10 do 45 % za matriks Zlatnog Delišesa, od 8 do 31 % za matriks Ajdareda i od 10 do 63 % za matriks Greni Smita. Preciznost metode se kreće od 0,21 do 23 %. Srednja preciznost metode koja svedoči o eventualnoj varijaciji prinosa ekstrakcije sa koncentracijom analita je zadovoljavajuća za većinu analita; za boskalid u matriksu Ajdareda iznosi 44 %, za pirimetanil i bifentrin u matriksu Greni Smita iznosi 32 i 81 %, respektivno, što ukazuje da se prinos ekstrakcije ovih pesticida u datim matriksima u većoj menja sa koncentracijom pesticida.

Poredeći prinose ekstrakcije acetonitrilom i metanolom zaključuje se da je bolje ekstrakciono sredstvo acetonitril.

Tabela 4.2-13 Prinos ekstrakcije metode sa korakom ekstrakcije metanolom i analizom u SRM režimu

Koncentracija, mg kg ⁻¹		Pirimetanil	Ciprodinil	Boskalid	Trifloksistrobin	Bifentrin
		Zlatni Delišes				
0,10	Tačnost, %	34,27	40,10	34,02	41,40	8,54
	Ponovljivost, %	10,37	1,36	9,70	5,29	15,84
1,00	Tačnost, %	37,98	30,39	48,21	39,47	9,91
	Ponovljivost, %	19,74	8,13	1,25	0,21	2,29
5,00	Tačnost, %	39,69	32,55	51,60	42,84	12,86
	Ponovljivost, %	10,97	11,00	2,10	3,23	2,45
Srednja tačnost, %*		37,31	34,35	44,61	41,24	10,44
Srednja ponovljivost, %**		7,42	14,84	20,91	4,10	21,17
		Ajdared				
0,10	Tačnost, %	18,32	16,32	46,41	32,25	8,30
	Ponovljivost, %	8,95	22,90	4,94	9,54	10,09
1,00	Tačnost, %	12,56	15,96	24,14	24,53	5,88
	Ponovljivost, %	5,20	6,15	2,54	8,23	5,24
5,00	Tačnost, %	22,65	16,63	21,77	22,77	8,85
	Ponovljivost, %	11,42	7,84	5,38	20,36	10,37
Srednja tačnost, %		17,84	16,30	30,77	26,52	7,68
Srednja ponovljivost, %		26,23	2,07	44,18	19,03	20,57
		Greni Smit				
0,10	Tačnost, %	45,15	35,58	67,58	45,24	4,65
	Ponovljivost, %	21,67	18,21	16,47	15,13	8,96
1,00	Tačnost, %	85,44	53,87	64,72	58,51	6,26
	Ponovljivost, %	10,74	19,88	6,36	8,95	12,13

5,00	Tačnost, %	59,88	48,28	54,90	42,31	19,66
	Ponovljivost, %	9,40	10,06	11,45	10,90	1,53
	Srednja tačnost, %	63,49	45,91	62,40	48,69	10,19
	Srednja ponovljivost, %	32,11	20,42	10,66	17,73	80,83

*Suma tačnosti za 3 koncentracije podeljena sa brojem koncentracija

** Koefficient varijacije tačnosti za 3 koncentracije

Granica detekcije i granica kvantifikacije. Granice detekcije pirimetanila metodom ekstrakcije acetonitrilom kreću se od 0,003 mgkg⁻¹ u CRM režimu za matriks Ajdareda odnosno SRM režimu za matriks Greni Smita do 0,008 mgkg⁻¹ u SRM režimu za matriks Ajdareda (Tabela 4.2-14). Granice detekcije ciprodinila metodom ekstrakcije acetonitrilom kreću se od 0,9 µgkg⁻¹ za matriks Greni Smita u SRM režimu do 0,009 mgkg⁻¹ za matriks Zlatnog Delišesa u SRM režimu (Tabela 4.2-14). Granice detekcije boskalida metodom ekstrakcije acetonitrilom kreću se od 0,006 mgkg⁻¹ za više matriksa do 0,033 mgkg⁻¹ za matriks Delišesa u CRM režimu (Tabela 4.2-14). Granice detekcije trifloksistrobina metodom ekstrakcije acetonitrilom kreću se od 0,001 mgkg⁻¹ za matriks Ajdareda u CRM režimu do 0,009 mgkg⁻¹ za matriks Greni Smita u SRM režimu (Tabela 4.2-14). Granice detekcije bifentrina metodom ekstrakcije acetonitrilom kreću se od 0,004 mgkg⁻¹ za matrikse Ajdareda i Greni Smita u SRM režimu do 0,010 mgkg⁻¹ za matriks Ajdareda u SRM režimu (Tabela 4.2-14).

Tabela 4.2-14 Granice detekcije i granice kvantifikacije metode (mgkg⁻¹) sa postupkom ekstrakcije acetonitrilom u zavisnosti od režima rada analizatora

	Pirimetanil	Ciprodinil	Boskalid	Trifloksistrobin	Bifentrin
Ajdared					
<i>SRM režim</i>					
LOD	0,008	0,002	0,006	0,003	0,010
LOQ	0,026	0,008	0,019	0,010	0,036
<i>CRM režim</i>					
LOD	0,003	0,006	0,006	0,001	0,004
LOQ	0,010	0,020	0,020	0,005	0,014
Zlatni Delišes					
<i>SRM režim</i>					
LOD	0,006	0,009	0,025	0,008	0,009
LOQ	0,022	0,030	0,086	0,027	0,031
<i>CRM režim</i>					
LOD	0,005	0,003	0,033	0,008	0,005
LOQ	0,016	0,009	0,111	0,028	0,017
Greni Smit					
<i>SRM režim</i>					
LOD	0,003	0,0009	0,007	0,009	0,005
LOQ	0,013	0,003	0,021	0,032	0,018
<i>CRM režim</i>					
LOD	0,006	0,002	0,006	0,005	0,004
LOQ	0,020	0,007	0,018	0,016	0,015

Granice detekcije pirimetanila metodom ekstrakcije metanolom kreću se od 0,008 mgkg⁻¹ u CRM režimu za matriks Delišesa 0,016 mgkg⁻¹ u SRM režimu za matriks Greni Smita (Tabela 4.2-15). Granice detekcije ciprodinila metodom ekstrakcije metanolom kreću se od 0,011 mgkg⁻¹ u CRM režimu za matriks Ajdareda do 0,016 mgkg⁻¹ u CRM režimu za matriks Zlatnog Delišesa (Tabela 4.2-15). Granice detekcije boskalida metodom ekstrakcije metanolom kreću se od 0,010 mgkg⁻¹ u SRM režimu za matriks Greni Smita do 0,037 mgkg⁻¹ u CRM režimu za matriks Ajdareda (Tabela 4.2-15). Granice detekcije trifloksistrobina metodom ekstrakcije metanolom kreću se od 0,003 mgkg⁻¹ u SRM režimu do 0,021 mgkg⁻¹ u CRM režimu za matriks Ajdareda (Tabela 4.2-15). Granice detekcije bifentrina metodom ekstrakcije metanolom kreću se od 0,011 mgkg⁻¹ u CRM režimu za matriks Greni Smita do 0,021 mgkg⁻¹ u SRM režimu za matriks Ajdareda (Tabela 4.2-15).

Tabela 4.2-15 Granice detekcije i granice kvantifikacije metode (mgkg⁻¹) sa postupkom ekstrakcije metanolom u zavisnosti od režima rada analizatora

	Pirimetamil	Ciprodinil	Boskalid	Trifloksistrobin	Bifentrin
Ajdared					
<i>SRM režim</i>					
LOD	0,015	0,014	0,024	0,003	0,021
LOQ	0,050	0,047	0,081	0,010	0,070
<i>CRM režim</i>					
LOD	0,009	0,011	0,037	0,021	0,013
LOQ	0,031	0,036	0,122	0,071	0,042
Zlatni Delišes					
<i>SRM režim</i>					
LOD	0,009	0,015	0,017	0,005	0,020
LOQ	0,030	0,050	0,056	0,017	0,066
<i>CRM režim</i>					
LOD	0,008	0,016	0,024	0,009	0,018
LOQ	0,026	0,053	0,080	0,030	0,060
Greni Smit					
<i>SRM režim</i>					
LOD	0,016	0,012	0,010	0,007	0,015
LOQ	0,053	0,040	0,033	0,023	0,050
<i>CRM režim</i>					
LOD	0,011	0,014	0,013	0,006	0,011
LOQ	0,036	0,046	0,043	0,020	0,036

4.2.2.3 Rezultati ispitivanja jabuka sa tržišta metodom MET-LC-R1

Targetirani pesticidi nisu detektovani u većini ispitivanih uzoraka odnosno njihove količine su ispod granice detekcije metode (Tabela 4.2-16).

Pirimetanil i ciprodinil nisu detektovani ni u jednom segmentu nijednog ispitivanog uzorka.

Trifloksistrobin je detektovan ukupno 4 puta, jednom u kori Greni Smita i Zlatnog Delišesa, i jednom u kori i plodu Ajdareda, na 2 od 5 mesta uzorkovanja. Količina trifloksistrobina prelazi granice kvantifikacije metode u 3 slučaja i kreće se od 0,010 mgkg⁻¹ ploda do 0,020 mgkg⁻¹ kore. Najveća količina trifloksistrobina je izmerena u kori Ajdareda i iznosi 0,17 mgkg⁻¹. Ni u jednom slučaju izmerena količina ne prelazi MDK od 0,70 mgkg⁻¹ ploda.

Bifentrin je detektovan ukupno 3 puta, u kori Zlatnog Delišesa i u plodu i kori Ajdareda. Količina bifentrina kreće se od 0,004 mgkg⁻¹ ploda do 0,026 mgkg⁻¹ kore. Ni u jednom slučaju izmerena količina ne prelazi MDK od 0,10 mgkg⁻¹ ploda.

Boskalid je detektovan ukupno 4 puta u uzorcima sa dva mesta uzorkovanja, u plodu i kori Zlatnog Delišesa i plodu i kori Ajdareda. Izmerene količine kreću se od 0,012 mgkg⁻¹ ploda do 0,23 mgkg⁻¹ kore. Ni u jednom slučaju izmerena količina ne prelazi MDK od 2 mgkg⁻¹ ploda.

Uzimajući u obzir samo plod, pesticidi su detektovani u Ajdaredu i Zlatnom Delišesu, ali je u svakom slučaju njihova količina značajno ispod MDK i ne predstavlja zdravstveni rizik po konzumente.

Tabela 4.2-16 Količina ispitivanih pesticida u mgkg⁻¹ izmerena u plodu, kori i pulpi jabuka sa tržišta

		Pirimetanil	Ciprodinil	Trifloksistrobin	Bifentrin	Boskalid	
Market 1, Niš	Greni Smit	Plod	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	
		Kora	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOQ (0,015)	< _m LOD	< _m LOD
		Pulpa	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD
	Zlatni Delišes	Plod	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD
		Kora	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD
		Pulpa	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD
	Ajdared	Plod	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD
		Kora	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD
		Pulpa	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD
Market 2, Niš	Greni Smit	Plod	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	
		Kora	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD
		Pulpa	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD
	Zlatni Delišes	Plod	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD
		Kora	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOQ (0,007)	< _m LOD
		Pulpa	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD
	Ajdared	Plod	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD
		Kora	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD
		Pulpa	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD

		Pirimetaniil	Ciprodinil	Trifloksistrobin	Bifentrin	Boskalid	
Pijaca 1 (pijaca Durlan)	Greni Smit	Plod	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	
		Kora	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	
		Pulpa	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	
	Zlatni Delišes	Plod	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOQ (0,078)
		Kora	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	0,23
		Pulpa	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD
	Ajared	Plod	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOQ (0,004)	< _m LOD
		Kora	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	0,026	< _m LOD
		Pulpa	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD
		Pirimetaniil	Ciprodinil	Trifloksistrobin	Bifentrin	Boskalid	
Pijaca 2 (pijaca Pantelej)	Greni Smit	Plod	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD
		Kora	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD
		Pulpa	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD
	Zlatni Delišes	Plod	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD
		Kora	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOQ (0,020)	< _m LOD	< _m LOD
		Pulpa	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD
	Ajared	Plod	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOQ (0,010)	< _m LOD	< _m LOQ (0,012)
		Kora	< _m LOD	< _m LOD	0,17	< _m LOD	0,18
		Pulpa	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD
		Pirimetaniil	Ciprodinil	Trifloksistrobin	Bifentrin	Boskalid	
Pijaca 3 (pijaca Tvrđava)	Greni Smit	Plod	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD
		Kora	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD
		Pulpa	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD
	Zlatni Delišes	Plod	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD
		Kora	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD
		Pulpa	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD
	Ajared	Plod	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD
		Kora	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD
		Pulpa	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD	< _m LOD

4.2.2.4 Rezultati komparativne analize uzoraka metodama MET-LC-R1 i MET-LC-Q

Spajkovani uzorci kore, ploda i pulpe su uporedno analizirani razvijenom metodom (MET-LC-R1) i zvaničnom, sertifikovanom metodom (MET-LC-Q), odnosno citratnom verzijom *QuEChERSa*, kao referentnom metodom koja ima prihvaćen nivo tačnosti i preciznosti. Tačnost razvijene metode je procenjena međusobnim poređenjem površina hromatogramskih pikova analita, koje proizvodi proceduralni standard sa 50 mgkg⁻¹ pesticida, analiziran dvema metodama.

Posmatrajući u okviru istog matriksa, površine hromatogramskih pikova pesticida izmerene metodom MET-LC-R1 i metodom MET-LC-Q su uporedive (Tabela 4.2-17). Površine pikova pirimetanila, ciprodinila i bifentirna merene u kori analiziranoj metodom MET-LC-R1 se razlikuju za 13-15% od površine pikova merene u kori analiziranoj metodom MET-LC-Q. Procentualna razlika za boskalid iznosi oko 6 %, a za trifloksistrobin oko 0,6 %. Procentualne razlike u matriksu pulpe se kreću od 14-20 %, a u matriksu ploda od 4-13 %. Preciznost (RSD, %) izračunata na bazi 5 replikata je odlična; kreće se od 2,08 do 7,96 % za uzorke analizirane razvijenom, odnosno od 1,76 do 7,63 % za uzorke analizirane zvaničnom metodom.

Može se zaključiti da je razvijena metoda podjednako pouzdana u analizi realnih uzoraka, kao i zvanična metoda.

Tabela 4.2-17 Površine hromatogramskih pikova pesticida u spajkovanim uzorcima kore, pulpe i ploda sorte Greni Smit (50 mgkg⁻¹, n=5), analiziranih razvojnom (MET-LC-R1) i zvaničnom metodom (MET-LC-Q)

Matriks	Kora	Pulpa	Plod
Metoda		MET-LC-R1	
Pirimetanil	6,54×10 ⁷ (4,36)*	6,85×10 ⁷ (5,38)	7,13×10 ⁷ (3,86)
Ciprodinil	9,60×10 ⁷ (7,96)	1,11×10 ⁸ (6,65)	1,10×10 ⁸ (4,35)
Boskalid	2,49×10 ⁶ (2,85)	2,61×10 ⁶ (2,24)	2,62×10 ⁶ (3,55)
Trifloksistrobin	2,94×10 ⁷ (2,08)	3,04×10 ⁷ (4,06)	3,06×10 ⁷ (2,64)
Bifentrin	7,37×10 ⁶ (2,88)	6,97×10 ⁶ (7,52)	7,26×10 ⁶ (4,13)
Metoda		MET-LC-Q	
Pirimetanil	7,74×10 ⁷ (2,27)	8,73×10 ⁷ (1,76)	8,27×10 ⁷ (3,16)
Ciprodinil	1,15×10 ⁸ (2,84)	1,33×10 ⁸ (2,16)	1,23×10 ⁸ (3,02)
Boskalid	2,64×10 ⁶ (4,53)	3,15×10 ⁶ (2,45)	2,93×10 ⁶ (4,74)
Trifloksistrobin	2,96×10 ⁷ (3,45)	3,54×10 ⁷ (1,92)	3,18×10 ⁷ (1,86)
Bifentrin	8,54×10 ⁶ (7,63)	8,70×10 ⁶ (3,53)	8,09×10 ⁶ (4,47)

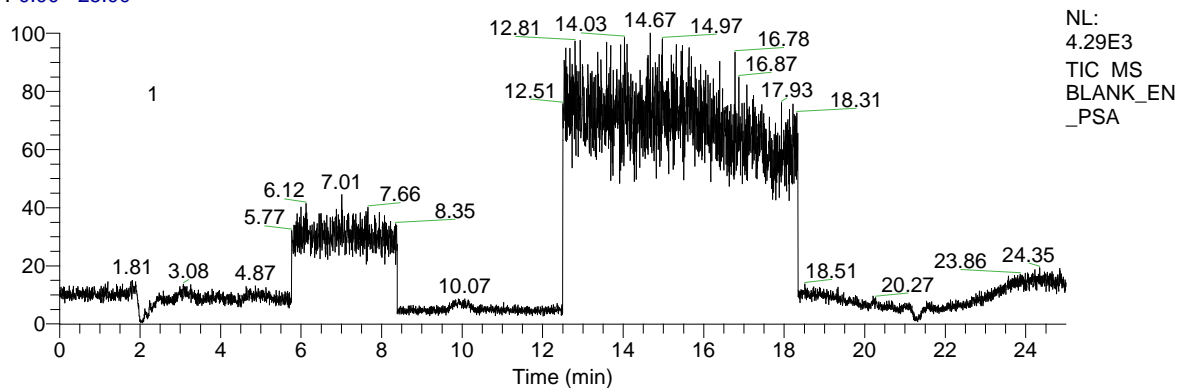
*(relativna standardna devijacija (RSD, %) na bazi 5 replikata)

4.2.3 Rezultati razvoja metode MET-LC-Q

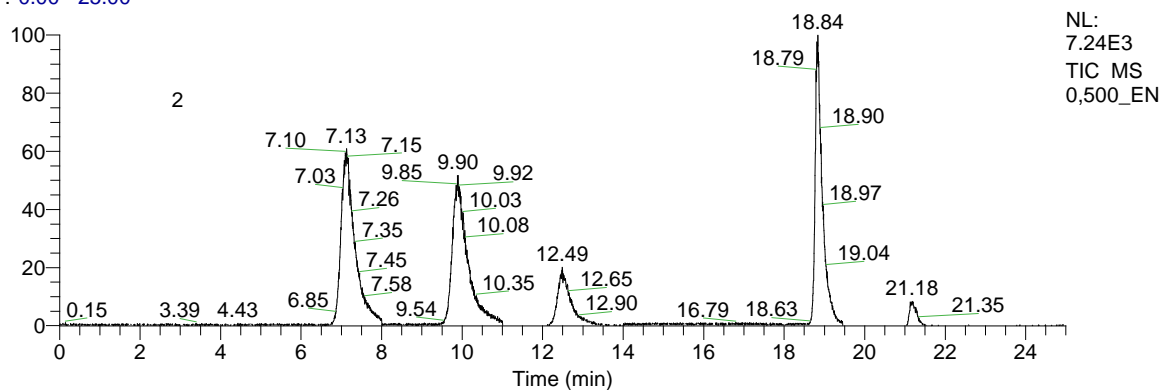
4.2.3.1 Rezultati ispitivanja parametara validacije

Selektivnost. U hromatogramima blank ekstrakata ploda Greni Smita dobijenih metodom MET-LC-Q po varijanti 1 (Slika 4.2-38) i varijanti 2 (Slika 4.2-39), na retencionim vremenima targetiranih pesticida ne uočavaju se pikovi, na osnovu čega se može zaključiti da je metoda MET-LC-Q selektivna.

RT: 0.00 - 25.00

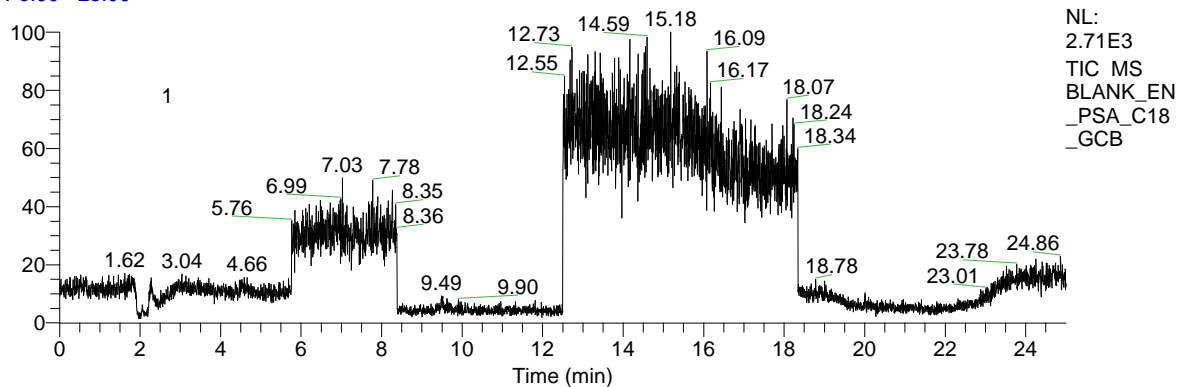


RT: 0.00 - 25.00

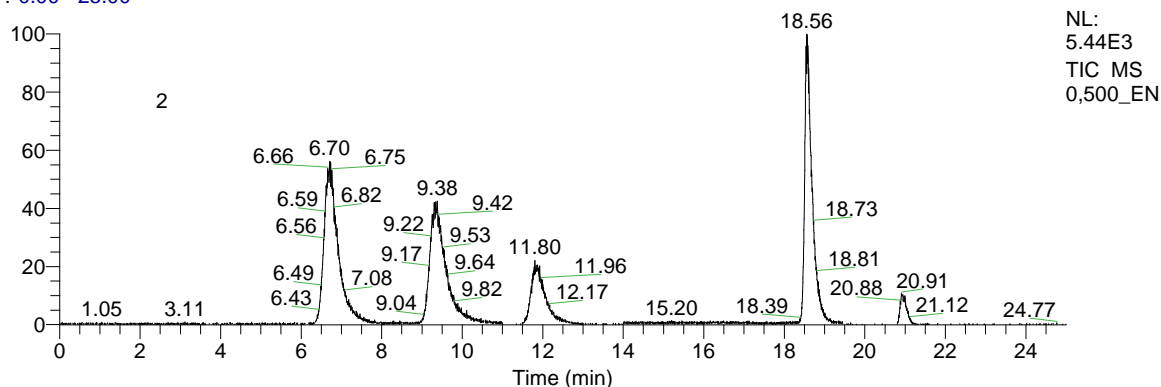


Slika 4.2-38 Hromatogrami nespajkovanog – 1 i spajkovanog – 2 ($0,50 \mu\text{g mL}^{-1}$) blank ekstrakta ploda Greni Smita pripremljenog po metodi MET-LC-Q (varijanta 1)

RT: 0.00 - 25.00

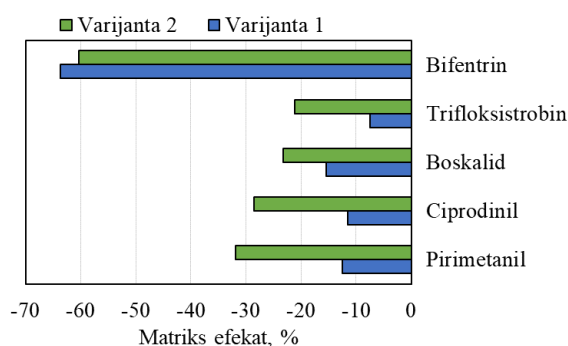


RT: 0.00 - 25.00



Slika 4.2-39 Hromatogrami nespajkovano – 1 i spajkovano – 2 ($0,50 \mu\text{g mL}^{-1}$) blank ekstrakta ploda Greni Smita pripremljenog po metodi MET-LC-Q (varijanta 2)

Matriks efekat. Matriks efekat u ekstraktima ploda tretiranim sa PSA (Varijanta 1) je zanemarljiv u odnosu na 4 od 5 pesticida i kreće se od $-7,52\%$ (trifloksistrobin) do $-15,49\%$ (boskalid) (Slika 4.2-40). Matriks efekat u odnosu na bifentrin je jako negativan i iznosi $-63,76\%$. U ekstraktima ploda tretiranim kombinacijom sorbenata (Varijanta 2), matriks efekat u odnosu na bifentrin ima sličnu vrednost ($-60,39\%$). U odnosu na ostale analite matriks efekat je skoro zanemarljiv i kreće se od $-21,10\%$ (trifloksistrobin) do $-31,89\%$ (pirimetanil) (Slika 4.2-40).



Slika 4.2-40 Matriks efekat u ekstraktima ploda Greni Smita pripremljenog po metodi MET-LC-Q (varijante 1 i 2)

Tačnost metode. Prinos ekstrakcije pesticida u uzorcima pripremljenim metodom MET-LC-Q sa korakom dSPE sa PSA (Varijanta 1) je visok i u okviru je prihvatljivih granica (Tabela 4.2-18). Srednja tačnost metode kroz opseg koncentracija pesticida od $0,10$ do $5,00 \text{ mg kg}^{-1}$ je iznad 84% . Srednja preciznost, koja ukazuje na eventualne varijacije u prinosu ekstrakcije sa promenom koncentracije pesticida, je dobra za 4 od 5 analita; za pirimetanil ova vrednost iznosi 32% , jer postoje merljive razlike u prinosu ekstrakcije ovog pesticida sa promenom koncentracije. Prinos ekstrakcije pirimetanila se kreće od 69% ($0,10 \text{ mg kg}^{-1}$) do 128% ($1,00 \text{ mg kg}^{-1}$).

Prinos ekstrakcije pesticida u uzorcima pripremljenim metodom MET-LC-Q sa korakom dSPE sa PSA, C18 i GCB (Varijanta 2) je u okviru je prihvatljivih granica. Srednja tačnost metode kroz opseg koncentracija pesticida od 0,10 do 5,00 mgkg⁻¹ je iznad 74 %. Srednja preciznost je dobra za 3 od 5 analita; za pirimetanil i ciprodinil ove vrednosti iznose 35 i 55 %, respektivno, jer postoje merljive razlike u prinosu ekstrakcije pesticida sa promenom koncentracije. Prinos ekstrakcije pirimetanila se kreće od 50 % (0,10 mgkg⁻¹) do 102 % (1,00 mgkg⁻¹). Prinos ekstrakcije ciprodinila se kreće od 58 % (5,00 mgkg⁻¹) do 141 % (0,10 mgkg⁻¹). Za oko 20 % niži prinos ekstrakcije pirimetanila i ciprodinila po varijanti 2 u odnosu na varijantu 1 može biti posledica korišćenja GCB u koraku ekstrakcije, koji ima veći afinitet za sorpciju planarnih jedinjenja; u ovom slučaju planarnost ima veći udeo u strukturi anilinopirimidina, zbog dva benzenova jezgra u odnosu na strukture ostala tri pesticida.

Tabela 4.2-18 Tačnost i preciznost MET-LC-Q metode

Koncentracioni nivo, mg kg ⁻¹		Pirimetanil	Ciprodinil	Boskalid	Trifloksistrobin	Bifentrin
Varijanta 1						
0,10	Tačnost, %	69,34	114,57	100,09	117,65	82,72
	Repetabilnost, %	2,56	3,99	4,37	4,50	6,39
1,00	Tačnost, %	128,13	80,93	91,34	79,95	87,29
	Repetabilnost, %	5,50	4,20	5,72	7,42	7,42
5,00	Tačnost, %	86,48	84,00	89,78	89,78	82,83
	Repetabilnost, %	3,72	3,66	4,68	6,38	6,25
Srednja tačnost, %*		94,65	93,17	93,73	95,80	84,28
Srednja preciznost, %**		31,94	19,97	5,93	20,41	3,09
Varijanta 2						
0,10	Tačnost, %	50,40	141,53	73,45	118,18	95,96
	Repetabilnost, %	2,28	7,20	1,24	2,33	4,13
1,00	Tačnost, %	102,41	59,60	89,17	84,44	114,95
	Repetabilnost, %	5,53	3,38	6,29	7,96	6,87
5,00	Tačnost, %	69,76	58,73	77,46	86,60	84,80
	Repetabilnost, %	3,34	1,62	0,06	3,29	3,49
Srednja tačnost, %		74,19	86,62	80,03	96,41	98,57
Srednja preciznost, %		35,43	54,90	10,21	19,59	15,47

*Suma tačnosti za 3 koncentracije podeljena sa brojem koncentracija

** Koeficijent varijacije tačnosti za 3 koncentracije

Linearnost metode. Metoda MET-LC-Q je linearna u opsegu nekoliko redova veličine za sve analite (Tabela 4.2-19). Najširi neprekidni linearni opseg za varijantu 1 metode utvrđen je za bifentrin i obuhvata koncentracije od 0,010 do 2,50 mgkg⁻¹ ploda. Linearni opseg trifloksistrobina obuhvata dva uža opsega, opseg u oblasti nižih i opseg u oblasti viših koncentracija. Najširi neprekidni linearni opseg za varijantu 2 metode utvrđen je za boskalid i bifentrin i obuhvata koncentracije od 0,010 do 1,00 mgkg⁻¹ ploda. Koeficijenti korelacije za varijantu 1 metode kreću se od 0,9914 do 0,9999, a za varijantu 2 metode od 0,9972 do 0,9999.

Tabela 4.2-19 Parametri kalibracionih krivi pesticida u okviru linearnog opsega metode MET-LC-Q

Analit	Opseg, mgkg ⁻¹	Broj standarda	Nagib	Odsečak	Koeficijent korelacije
Varijanta 1					
Pirimetanol	0,005 – 0,500	6	106495	288,46	0,9996
Ciprodinil	0,025 – 2,500	8	88688	11986	0,9999
Boskalid	0,025 – 2,500	8	60681	-506,86	0,9999
Trifloksistrobin	0,005 – 0,100	6	125474	820	0,9914
	0,100 – 2,500	5	106401	6667	0,9987
Bifentrin	0,010 – 2,500	9	12053	11,26	0,9998
Varijanta 2					
Pirimetanol	0,005 – 1,000	7	65554	-114,13	0,9999
Ciprodinil	0,025 – 0,500	5	46424	4652	0,9988
Boskalid	0,010 – 1,000	8	47869	-114	0,9994
Trifloksistrobin	0,005 – 0,250	7	104107	583	0,9972
Bifentrin	0,010 – 1,000	8	14560	24	0,9993

Granica detekcije i granica kvantifikacije metode. Granice detekcije pesticida su međusobno uporedive i ispod korespondirajućih MDK vrednosti za plod jabuke i kreću se od 0,004 do 0,010 mgkg⁻¹ (varijanta 1) odnosno od 0,002 do 0,017 mgkg⁻¹ (varijanta 2) (Tabela 4.2-20).

Tabela 4.2-20 Granice detekcije i granice kvantifikacije (mgkg⁻¹) metode MET-LC-Q

	Pirimetanol	Ciprodinil	Boskalid	Trifloksistrobin	Bifentrin
Varijanta 1					
mLOD	0,004	0,004	0,004	0,005	0,010
mLOQ	0,014	0,013	0,015	0,016	0,035
Varijanta 2					
mLOD	0,003	0,017	0,005	0,002	0,007
mLOQ	0,009	0,058	0,017	0,008	0,024

4.3 Ispitivanja na instrumentalnoj konfiguraciji CONF-3

Poglavlje sadrži rezultate ispitivanja performansi instrumentalne konfiguracije CONF-3 u odnosu na targetirane pesticide i rezultate razvoja i primene metoda koje uključuju ovu instrumentalnu konfiguraciju.

4.3.1 Performanse instrumenta u odnosu na ispitivane analite

Karakterizacija analita. U ESI/MS spektru pirimetanila, ciprodinila, boskalida i trifloksistrobina dominantni joni su protonovani molekularni joni [M+H⁺] ovih pesticida (Slika 4.3-1a - Slika 4.3-4a). U spektru bifentrina, bilo da je u pitanju rastvor ovog pesticida u metanolu ili u rastvoru amonijum-formijata u metanolu, dominantan jon je adukt molekula bifentrina i amonijum jona na *m/z* 439,7 pri čemu se protonovani molekularni jon se ne uočava

(Slika 4.3-5a1 i a2). Očigledno je da postoji jaka tendencija bifentrina ka građenju adukta sa amonijum-jonom s obzirom da je ovaj adukt prisutan i u metanolnom rastvoru bifentrina (tragovi amonijum jona verovatno potiču iz HPLC/MS sistema). Slika 4.3-6 prikazuje spektar rastvora smeše svih pesticida; najuočljiviji joni su $[M+H^+]$ odnosno $[M+NH_4^+]$ adukti. U odnosu na sve ostale spektre u ovom spektru se uočavaju i novi joni na m/z 359,5 i m/z 387,7.

MS^2 eksperimenti pokazuju da se ponašanje pesticida prilikom fragmentisanja razlikuje; uočava se nešto drugačiji fragmentacioni ishod za pirimetanil i ciprodinil u odnosu na ostale pesticide. Razlika se pre svega uočava u kolizionoj energiji (CE, %) koju je potrebno zadati da bi se pseudomolekularni joni pesticida fragmentisali. Za pirimetanil i ciprodinil ta vrednost CE je iznad 50 %, tačnije 54 i 55 %, respektivno. MS^2 spektar boskalida pokazuje da je $[M+H^+]$ jon ovog pesticida u potpunosti fragmentisan na CE = 45 %. $[M+H^+]$ jon trifloksistrobina je pretežno fragmentisan na CE = 40 %, a $[M+NH_4^+]$ jon bifentrina fragmentacijom na CE = 50 % pored MS^2 fragmenta m/z 181 daje u malom procentu i MS^3 fragment m/z 166.

Razlika se uočava i u brojnosti MS^2 fragmenata. Fragmentacija $[M+H^+]$ jona pirimetanila ishoduje karakterističnim fragmentima na m/z 183,3 i 107,4; a ciprodinila karakterističnim fragmentom na m/z 210,3. Pored ovih fragmetata uočava se i veći broj fragmenata uporedive zastupljenosti. Fragmentacija $[M+H^+]$ jona boskalida i bifentrina ishoduje jednim karakterističnim fragmentom na m/z 307,1 i m/z 181,2; respektivno; fragmentacija $[M+H^+]$ jona trifloksistrobina ishoduje karakterističnim fragmentima na m/z 186,3 i m/z 206,1 uporedive zastupljenosti. Sem navedenih jona ne uočavaju se drugi fragmenti.

Fragmentacija protonovanog molekulskog jona pirimetanila rezultuje većim brojem MS^2 fragmenata od kojih su najzastupljeniji m/z 107 i 183 (Slika 4.3-1b). Prema predloženom mehanizmu fragmentacije pirimetanila (Slika 8.5-1, str. 314) fragment m/z 107 strukturne formule $C_6H_7N_2^+$ predstavlja pirimidinsko jezgro nastalo gubitkom anilinskog dela pesticida. Fragment m/z 183 strukturne formule $C_{12}H_{11}N_2^+$ nastaje gubitkom molekula amonijaka. Sukcesivna fragmentacija MS^2 fragmenta m/z 183 rezultuje MS^3 fragmentima m/z 156 i 142 (Slika 4.3-1c); pretpostavka je da m/z 156 strukturne formule $C_{11}H_{10}N^+$ nastaje gubitkom molekula cijanovodonika. Fragmentacija MS^2 fragmenta m/z 107 rezultuje MS^3 fragmentom m/z 80 (Slika 4.3-1c1); pretpostavka je da MS^3 fragment strukturne formule $C_5H_6N^+$ takođe nastaje gubitkom molekula cijanovodonika iz fragmenta roditelja.

Fragmentacija protonovanog molekulskog jona ciprodinila rezultuje većim brojem fragmenata slične zastupljenosti, od kojih je najzastupljeniji MS^2 fragment m/z 210, a sledi ga m/z 185 (Slika 4.3-2b). Prema predloženom mehanizmu fragmentacije ciprodinila (Slika 8.5-2, str. 314), fragment m/z 210 strukturne formule $C_{13}H_{12}N_3^+$ nastaje gubitkom molekula metana, a fragment m/z 185 strukturne formule $C_{12}H_{13}N_2^+$ gubitkom molekula acetonitrila iz protonovanog molekulskog jona pesticida. Fragmentacija MS^2 fragmenta m/z 210 rezultuje MS^3 fragmentima m/z 195 i 183 (Slika 4.3-2c). Prema predloženom mehanizmu fragmentacije ciprodinila fragment m/z 195 ima strukturnu formulu $C_{12}H_9N_3^+$ i nastaje gubitkom metilradikala iz roditeljskog jona.

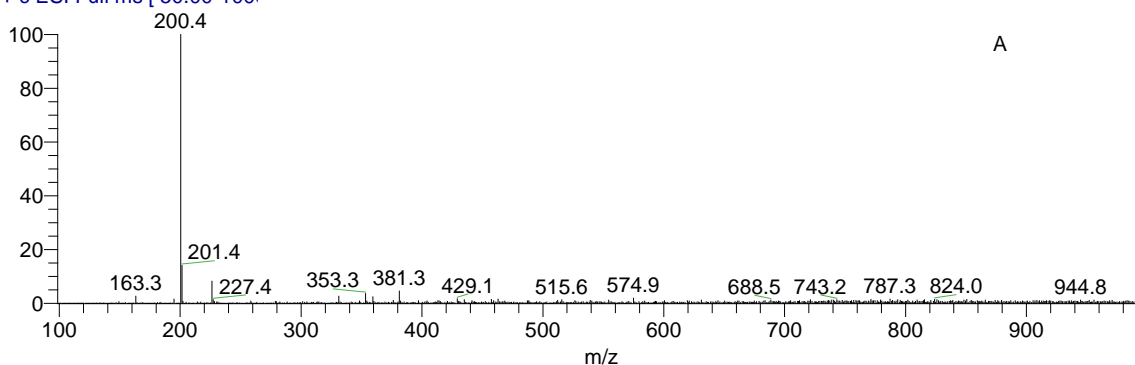
Fragmentacija protonovanog molekulskog jona boskalida rezultuje MS^2 fragmentom m/z 307 (Slika 4.3-3b). Prema predloženom mehanizmu fragmentacije boskalida (Slika 8.5-3, str. 315) ovaj fragment strukturne formule $C_{18}H_{12}ClN_2O^+$ nastaje gubitkom molekula HCl iz protonovanog molekulskog jona m/z 343. Sukcesivna fragmentacija m/z 307 rezultuje MS^3 fragmentom m/z 271 (Slika 4.3-3c). Prema predloženom mehanizmu fragmentacije boskalida

ovaj fragment strukturne formule $C_{18}H_{11}N_2O^+$ nastaje gubitkom molekula HCl iz MS^2 fragmenta m/z 307.

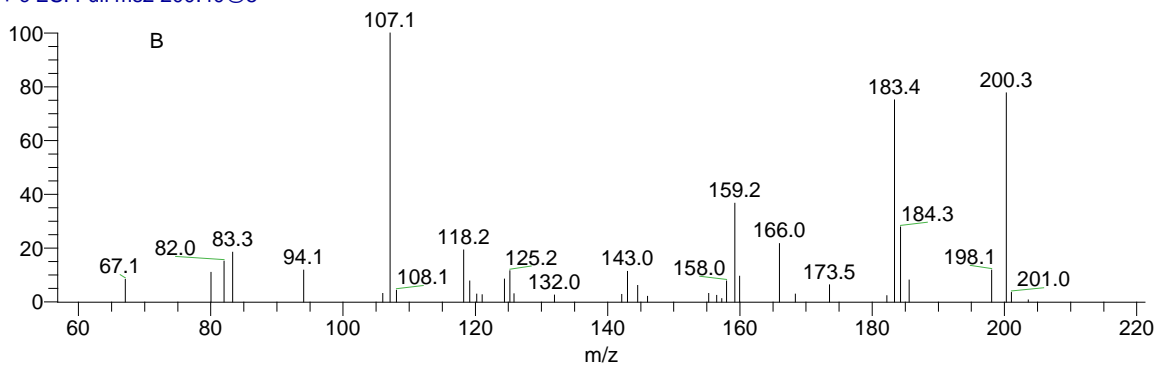
Fragmentacija protonovanog molekulskog jona trifloksistrobina rezultuje MS^2 fragmentima m/z 186 i 206 uporedive zastupljenosti (Slika 4.3-4b). Prema predloženom mehanizmu fragmentacije trifloksistrobina (Slika 8.5-4, str. 315) fragment m/z 186 ima strukturnu formulu $C_9H_7F_3N^+$ i nastaje cepanjem O-N veze između dva prstena. Sukcesivna fragmentacija m/z 186 rezultuje MS^3 fragmentima m/z 163, 145 i 172 (Slika 4.3-4c1). Prema predloženom mehanizmu fragmentacije pretpostavljeno je da fragment m/z 145 strukturne formule $C_7H_4F_3^+$ nastaje gubitkom CH_3CN molekula iz fragmenta m/z 186. MS^2 fragment m/z 206 strukturne formule $C_{11}H_{12}NO_3^+$ nastaje cepanjem veze između kiseonika i benzilnog ugljenika sa jednog od prstenova u molekulu trifloksistrobina. Sukcesivna fragmentacija m/z 206 rezultuje MS^3 fragmentima m/z 146, 175 i 116 (Slika 4.3-4c2).

Fragmentacija pseudomolekulskog jona bifentrina rezultuje MS^2 fragmentom m/z 181 (Slika 4.3-5b). Sukcesivna fragmentacija m/z 181 rezultuje MS^3 fragmentom m/z 166 (Slika 4.3-5c). Prema predloženom mehanizmu fragmentacije bifentrina (Slika 8.5-5, str. 316) MS^2 fragment strukturne formule $C_{14}H_{13}^+$ nastaje cepanjem veze između kiseonika i benzilnog ugljenika. Pretpostavka je da MS^3 fragment nastaje gubitkom metil radikala iz MS^2 fragmenta i da predstavlja monomernu radikal-katjon vrstu strukturne formule $C_{13}H_{10}^+$ ili dimernu dvostrukonaelektrisanu vrstu strukturne formule $C_{26}H_{20}^{2+}$ i mase 332.

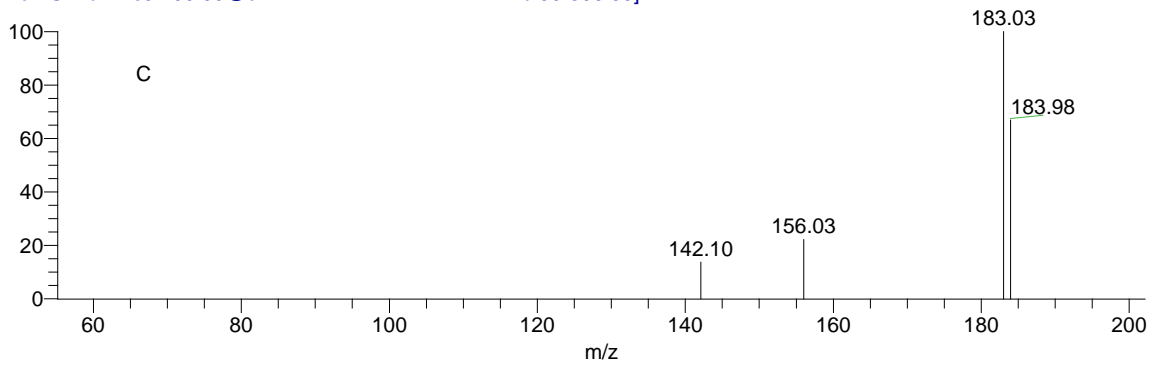
Pirimetaniil #1 RT: 0.01 AV: 1 NL: 9.50E6
T: + c ESI Full ms [50.00-100]



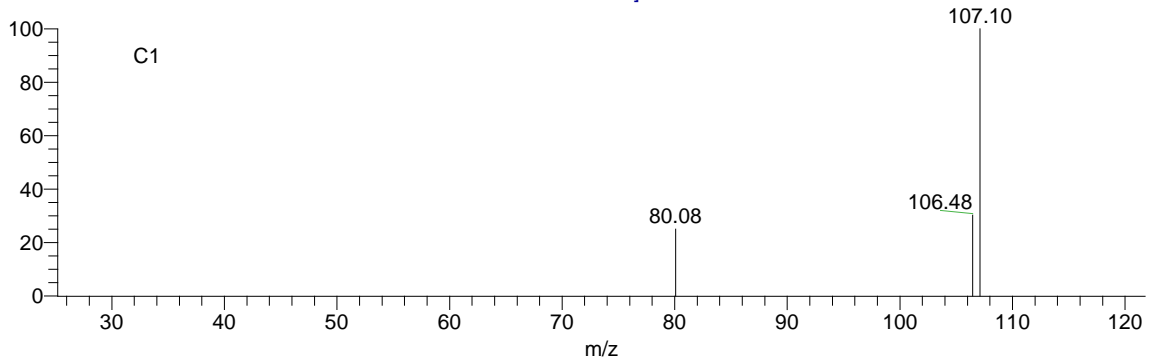
Pirimetaniil MS2 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 3.20E4
T: + c ESI Full ms2 200.40@5



5,00 #724 RT: 14.15 AV: 1 NL: 3.94E3
T: + c ESI Full ms3 200.00@c

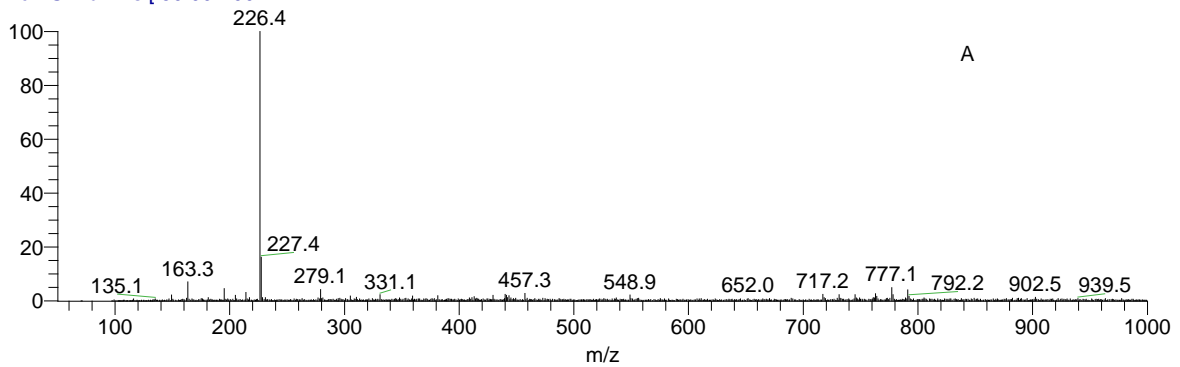


5,00 #878 RT: 17.36 AV: 1 NL: 6.58E2
T: + c ESI Full ms3 200.00@c

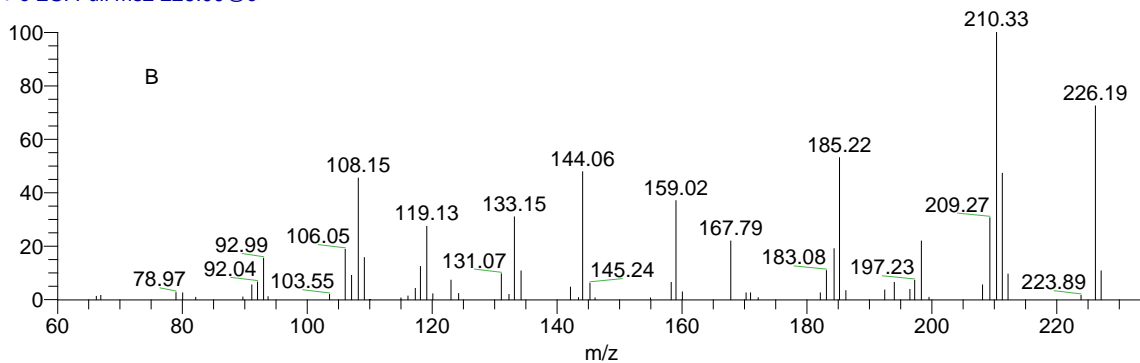


Slika 4.3-1 Direct injection ESI MS¹ (A), ESI MS² (B) I ESI MS³ (C i C1) full scan spektri rastvora pirimetanila (molekulska masa – 199,26) koncentracije 5,00 µg mL⁻¹ u metanolu; pozitivan jonizacijski mode

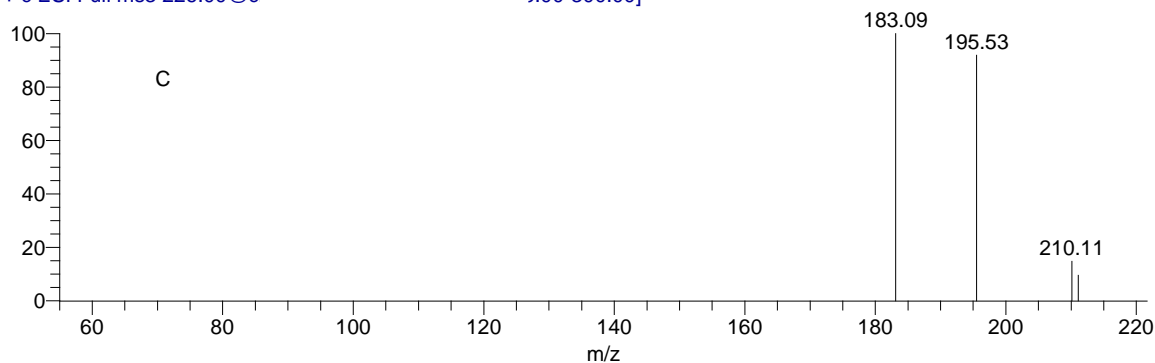
Ciprodinil #1 RT: 0.01 AV: 1 NL: 1.01E7
T: + c ESI Full ms [50.00-1000]



5,00 #899 RT: 17.69 AV: 1 NL: 8.74E4
T: + c ESI Full ms2 226.00@c

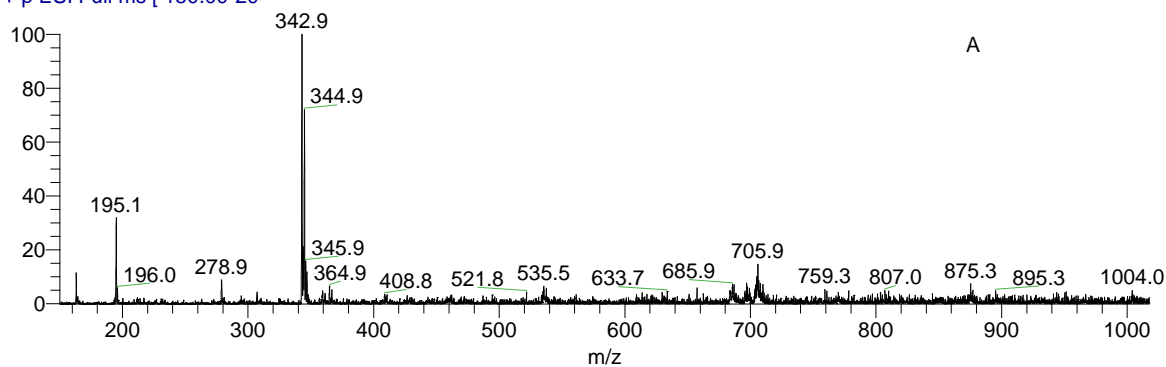


5,00 #1014 RT: 19.55 AV: 1 NL: 1.03E3
T: + c ESI Full ms3 226.00@c

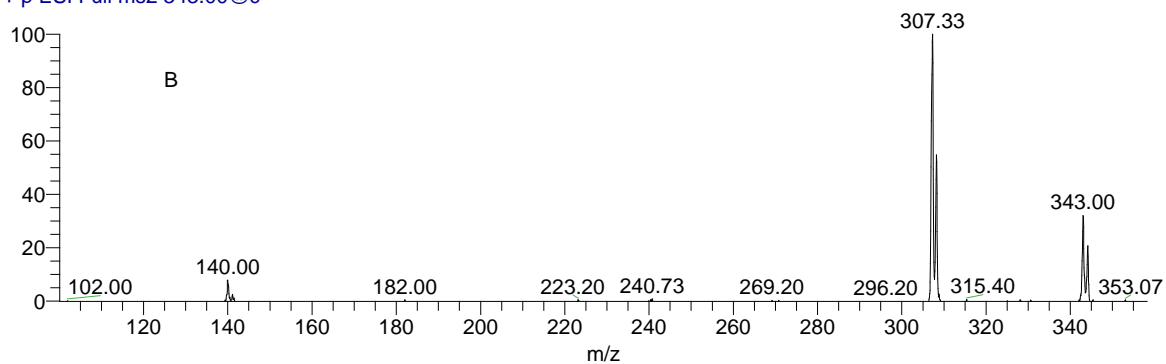


Slika 4.3-2 Direct injection ESI MS¹ (A), ESI MS² (B) i ESI MS³ (C) full scan spektri rastvora ciprodinila (molekulska masa – 225,30) koncentracije 5,00 µg mL⁻¹ u metanolu; pozitivan jonizacioni mode

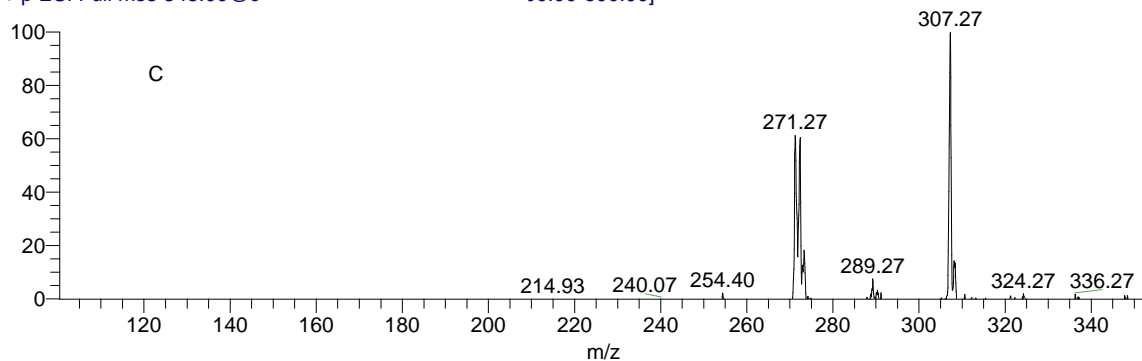
343 #21 RT: 0.57 AV: 1 NL: 4.21E5
T: + p ESI Full ms [150.00-20



5,00 #334 RT: 5.76 AV: 1 NL: 8.02E4
T: + p ESI Full ms2 343.00@c

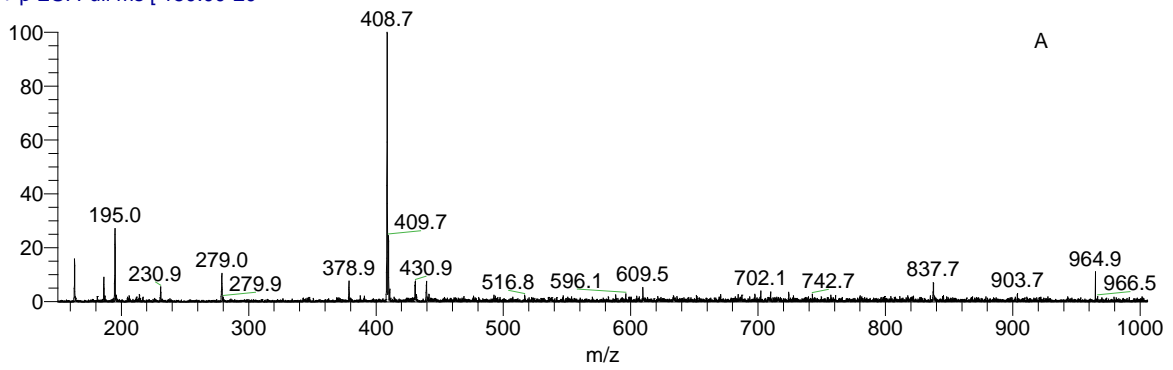


5,00 #401 RT: 7.57 AV: 1 NL: 1.36E4
T: + p ESI Full ms3 343.00@c

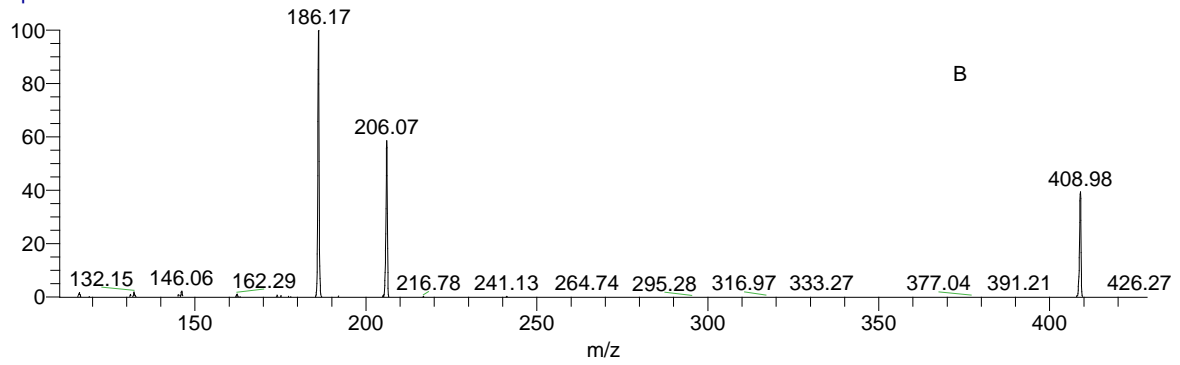


Slika 4.3-3 Direct injection ESI MS¹ (A), ESI MS² (B) i ESI MS³ (C) full scan spektri rastvora boskalisida (molekulska masa – 343,10) koncentracije 5,00 µg mL⁻¹ u metanolu; pozitivan jonizacioni mode

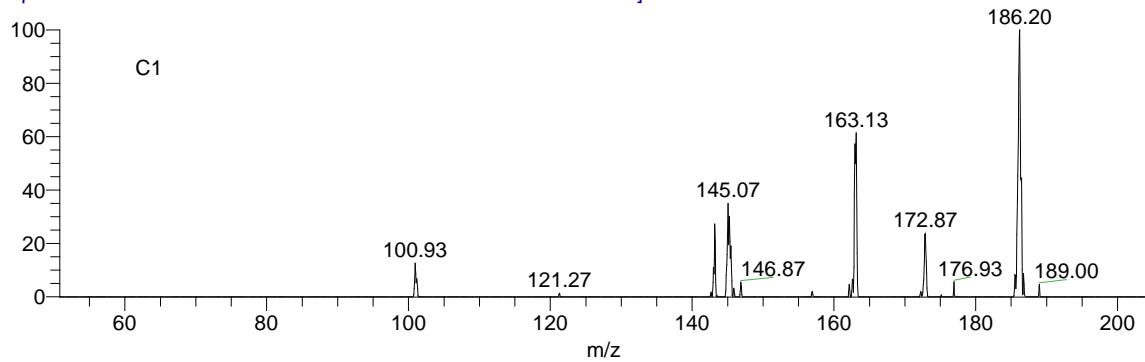
409 #18 RT: 0.51 AV: 1 NL: 3.26E5
T: + p ESI Full ms [150.00-20



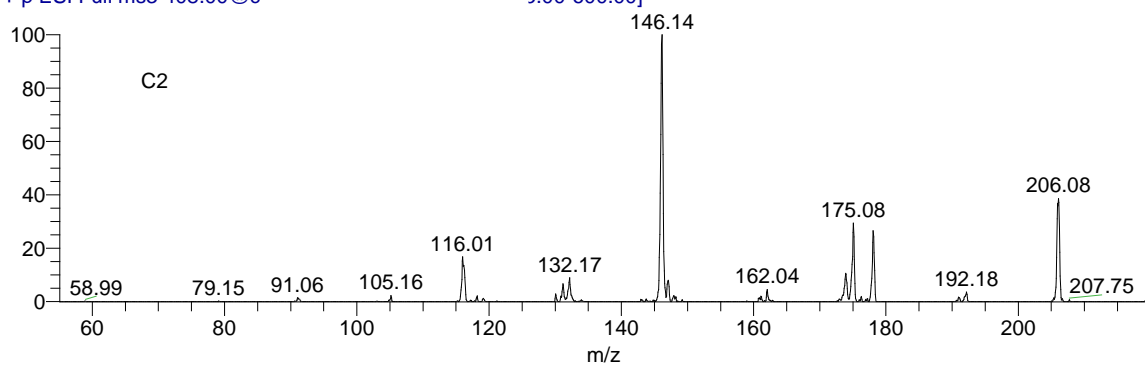
5,00 #433 RT: 8.28 AV: 1 NL: 1.28E6
T: + p ESI Full ms2 408.00@c



5,00 #480 RT: 9.19 AV: 1 NL: 2.61E4
T: + p ESI Full ms3 408.00@c

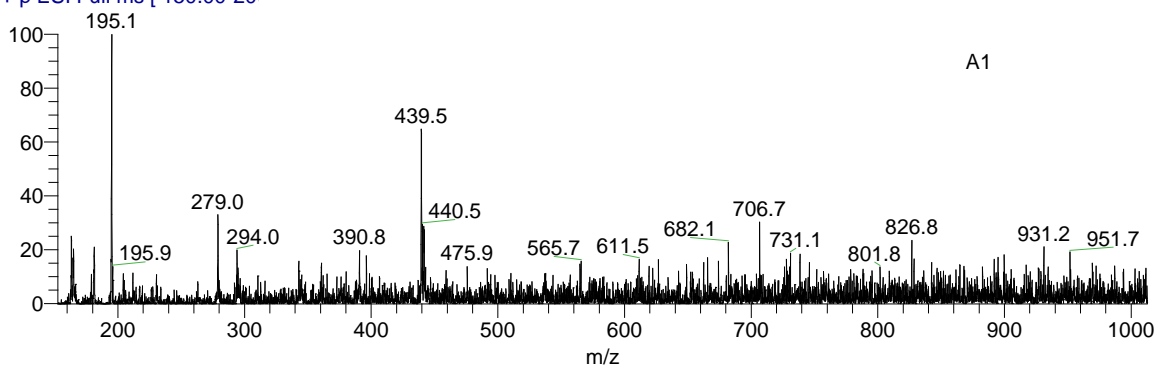


5,00 #499 RT: 9.58 AV: 1 NL: 2.07E5
T: + p ESI Full ms3 408.00@c

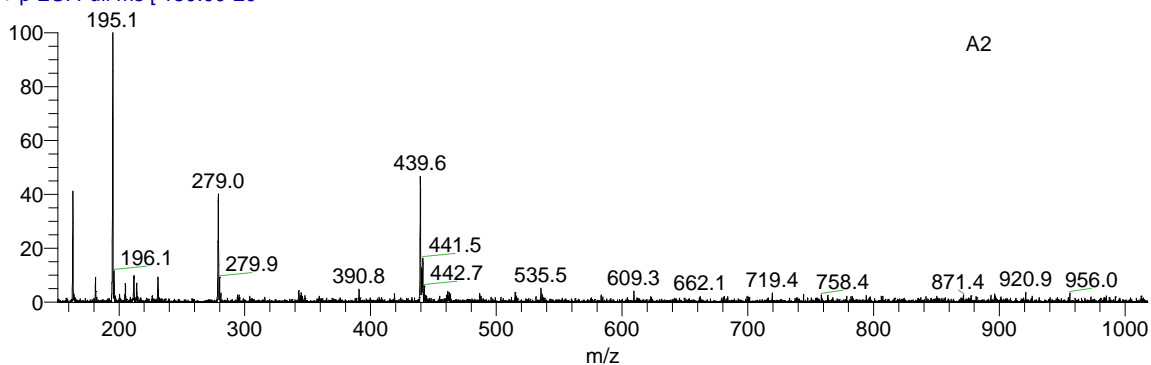


Slika 4.3-4 Direct injection ESI MS¹ (A), ESI MS² (B) i ESI MS³ (C1 i C2) full scan spektri rastvora trifloksistrobina (molekulska masa – 408,38) koncentracije 5,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ u metanolu; pozitivan jonizacioni mode

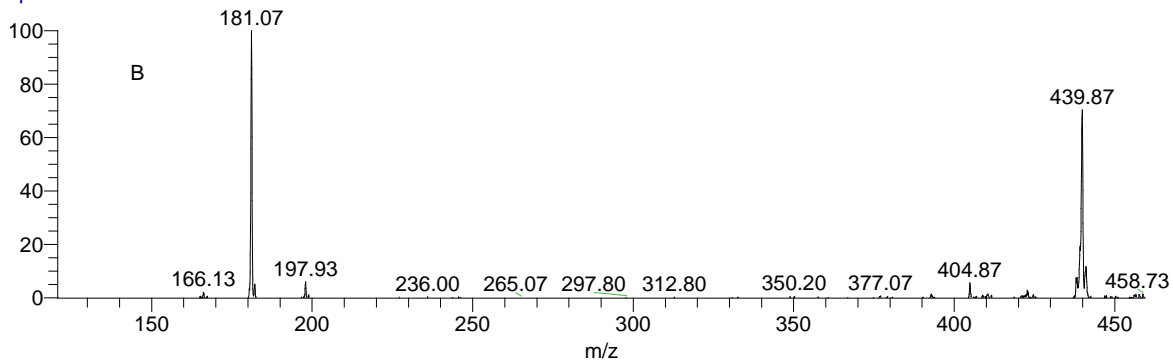
439 #6 RT: 0.14 AV: 1 NL: 1.15E5
T: + p ESI Full ms [150.00-20



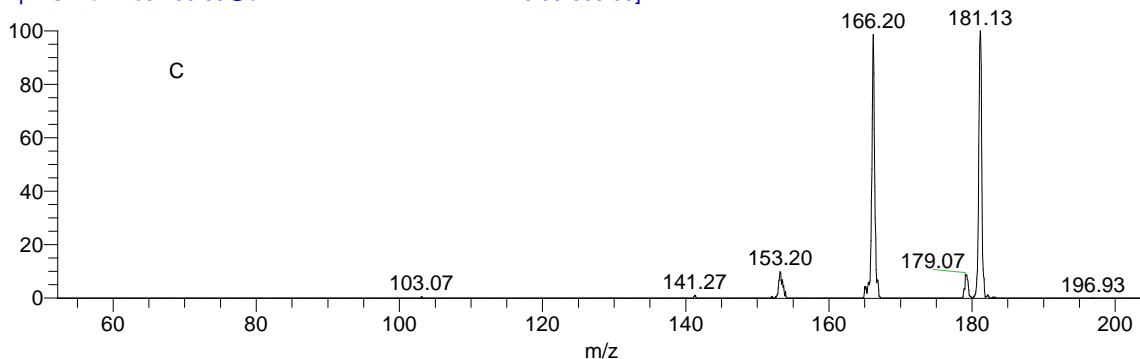
439a #30 RT: 0.89 AV: 1 NL: 1.66E5
T: + p ESI Full ms [150.00-20



5,00 #535 RT: 10.42 AV: 1 NL: 8.13E4
T: + p ESI Full ms2 439.00@c

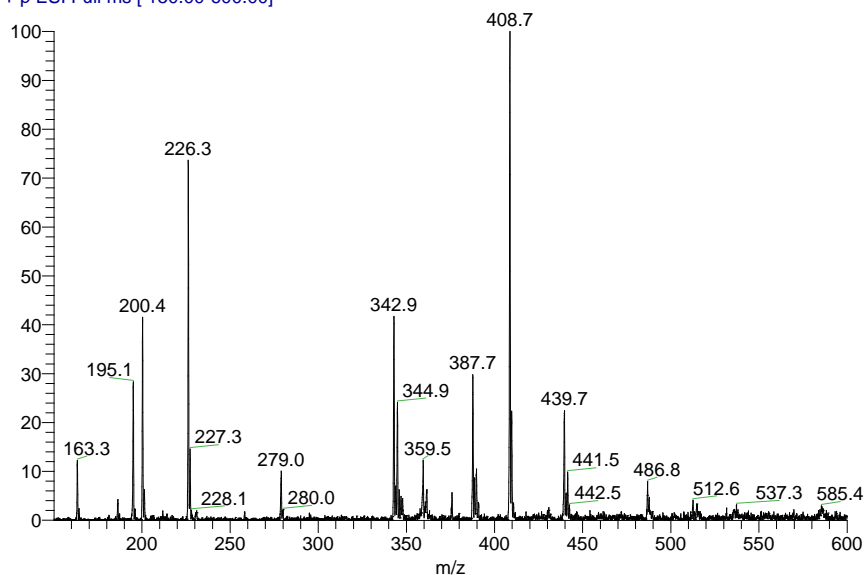


5,00 #561 RT: 11.13 AV: 1 NL: 2.20E4
T: + p ESI Full ms3 439.00@c



Slika 4.3-5 *Direct injection* ESI MS¹ full scan spektar rastvora bifentrina (molekulska masa – 422,87) koncentracije 5,00 µgmL⁻¹ u metanolu (A1), u 0,050 % rastvoru amonijum-formijata u metanolu (A2), ESI MS² (B) i ESI MS³ (C) full scan spektri; pozitivan jonizacioni mode

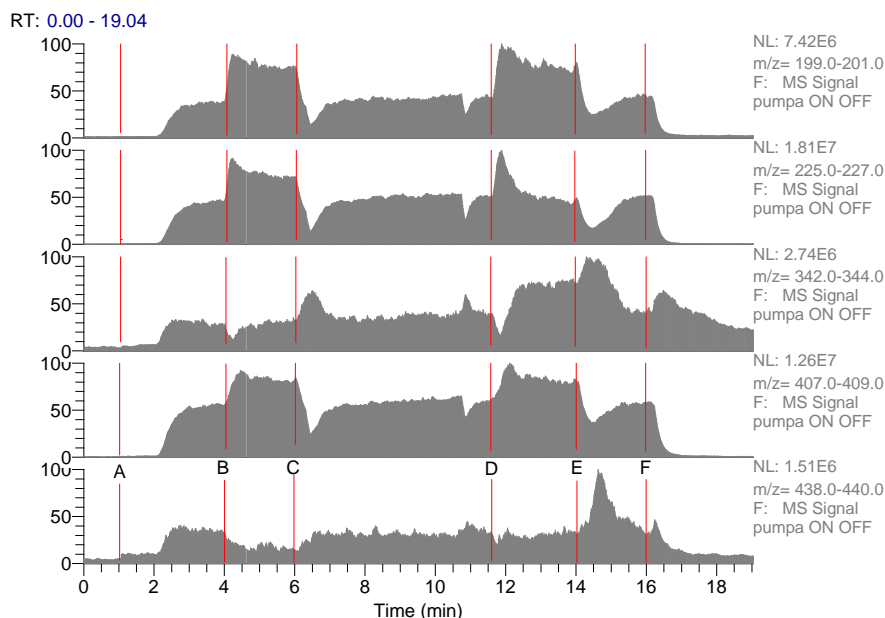
Signal pumpa ON OFF #1329 RT: 14.68 AV: 1 NL: 7.19E5
T: + p ESI Full ms [150.00-600.00]



Slika 4.3-6 *Direct injection MS¹ full scan* spektar rastvora smeše pirimetanila, ciprodinila, boskalida, trifloksistrobina i bifentrina koncentracije 5,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ u 0,050 % rastvoru amonijum-formijata u metanolu; pozitivan jonizacioni *mode*

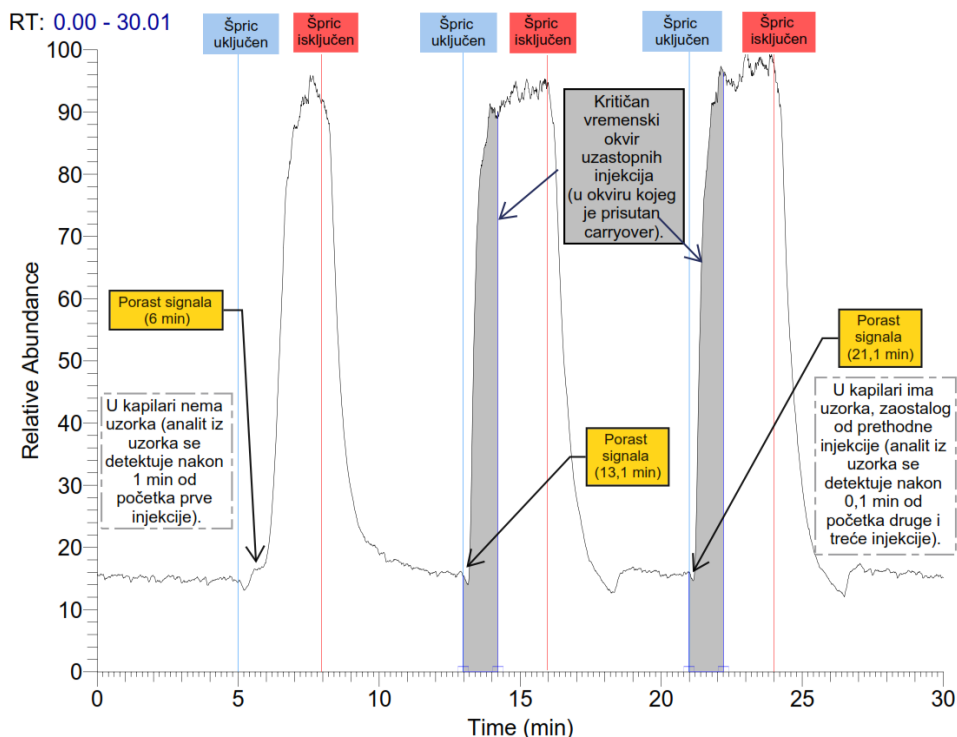
4.3.1.1 Rezultati ispitivanja sa *direct injection* metodom unošenja uzoraka

Ispitivanje uticaja vrste mobilne faze na osetljivost. Slika 4.3-7 prikazuje uticaj HPLC eluenata - eluenta B (metanola) i eluenta A (smeše 0,3 % mravlje kiseline i 0,01 % amonijum-formijata) - na signale pesticida, pri protoku od 50 $\mu\text{L min}^{-1}$ paralelno sa protokom rastvora pesticida iz šprica (25 $\mu\text{L min}^{-1}$). Negativan uticaj paralelnog protoka metanola se ispoljava za boskalid i bifentrin, jer dovodi do određenog stepena supresije signala u odnosu na signal koji se beleži bez ubrizgavanja metanola u ESI izvor. Sa prestankom ubrizgavanja metanola signal ovih pesticida se vraća približno na prethodni nivo. Paralelni protok pufera ne utiče na signal bifentrina, dok signal boskalida pospešuje. Hronogrami pirimetanila, ciprodinila i trifloksistrobina pokazuju da paralelni protok oba eluenta pospešuje signale ovih pesticida. U dalja ispitivanja uvrštena je metoda snimanja sa puferom, zbog negativnog efekta paralelnog protoka metanola na osetljivost instrumenta prema boskalidu i bifentrinu.



Slika 4.3-7 *Extract ion* hronogrami rastvora smeše ciprodinila (m/z 226), pirimetanila (m/z 200), boskalida (m/z 343), trifloksistrobina (m/z 409) i bifentrina (m/z 440) koncentracije $5,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ u $0,050\%$ rastvoru amonijum-formijata u metanolu; A – špric uključen; B – protok eluenta B uključen; C – protok eluenta B isključen; D – protok eluenta A uključen; E – protok eluenta A isključen; F – špric isključen.

Ispitivanje *carryover*-a. Na bazi nekoliko uzastopnih injekcija rastvora pesticida može se ustanoviti vreme potrebno da se sistem kapilara koji vodi uzorak od šprica do ESI izvora ispuni novim uzorkom ili očisti od prethodno analiziranog uzorka i time zaobiđe *carryover*. Razlika u vremenskom intervalu pojave signala nakon početka prve i svake naredne injekcije (Slika 4.3-8) pokazuje da vreme potrebno da se sistem kapilara ispuni uzorkom i analiti detektuju iznosi 1 minut od uključivanja šprica. To znači da je, da bi se izbegao *carryover*, potrebno pre svake naredne analize minimum 1 minut ispirati sistem kapilara, bilo mobilnom fazom sa HPLC-a ili rastvorom sledećeg uzorka.



Slika 4.3-8 *Total ion* hronogram rastvora smeše pesticida koncentracije $10,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ u $0,050\%$ rastvoru amonijum-formijata u metanolu

Instrumentalna osetljivost i granice detekcije. U MS^1 *full scan* režimu osetljivost u oblasti nižih i viših koncentracija raste u sledećem nizu bifentrin < boskalid < pirimetanil < ciprodinil < trifloksistrobin (Tabela 4.3-1). Koeficijenti korelacije u oblasti nižih koncentracija se kreću od 0,8375 za bifentrin do 0,9764 za ciprodinil, a u oblasti viših koncentracija od 0,8287 za bifentrin do 0,9888 za ciprodinil.

Tabela 4.3-1 Parametri kalibracionih kriva za odziv protonovanih molekulskih jona (*full scan* režim, MS^1); integrisana površina u trajanju od 2 minuta

Parametri krive	Pirimetanil	Ciprodinil	Boskalid	Trifloksistrobin	Bifentrin
Oblast koncentracija $0,00 - 0,075 \mu\text{g mL}^{-1}$					
Nagib ($\times 10^8$)	3,776	7,586	2,990	11,472	1,058
Odsečak ($\times 10^6$)	6,970	6,162	6,825	33,399	8,426
Koeficijent korelacije	0,9418	0,9764	0,9529	0,9493	0,8375
Oblast koncentracija $0,10 - 5,00 \mu\text{g mL}^{-1}$					
Nagib ($\times 10^8$)	0,982	3,365	0,543	3,702	0,203
Odsečak ($\times 10^6$)	50,847	87,244	56,506	312,532	29,345
Koeficijent korelacije	0,9859	0,9888	0,8838	0,9051	0,8287

U MS^2 *full scan* režimu osetljivost u oblasti nižih koncentracija raste u sledećem nizu pirimetanil < ciprodinil < bifentrin < trifloksistrobin < boskalid, a u oblasti viših koncentracija u nizu pirimetanil < ciprodinil < bifentrin < boskalid < trifloksistrobin (Tabela 4.3-2). Koeficijenti korelacije u oblasti nižih koncentracija se kreću od 0,9028 za pirimetanil do 0,9799 za boskalid, a u oblasti viših koncentracija od 0,7808 za bifentrin do 0,9905 za ciprodinil.

Instrumentalne granice detekcije u MS¹ *full scan* režimu su međusobno ujednačene i kreću se od 0,010 µgmL⁻¹ za ciprodinil do 0,028 µgmL⁻¹ za bifentrin (Tabela 4.3-3). Instrumentalne granice detekcije u MS² *full scan* režimu se kreću od 0,009 µgmL⁻¹ za boskalid do 0,021 µgmL⁻¹ za pirimetanil.

Tabela 4.3-2 Parametri kalibracionih kriva za odziv fragmenata pesticida (*full scan* režim, MS²); integrisana površina u trajanju od 2 minuta

Parametri krive	Pirimetanil	Ciprodinil	Boskalid	Trifloksistrobin	Bifentrin
Oblast koncentracija 0,00 - 0,075 µgmL ⁻¹					
Nagib (×10 ⁶)	1,217	5,808	147,35	114,70	98,38
Odsečak (×10 ⁵)	4,49	4,23	105,52	1,80	27,33
Koeficijent korelacije	0,9028	0,9381	0,9799	0,9158	0,9778
Oblast koncentracija 0,10 - 5,00 µgmL ⁻¹					
Nagib (×10 ⁶)	0,117	2,32	73,62	149,90	16,65
Odsečak (×10 ⁵)	2,09	6,93	565,67	959,50	289,24
Koeficijent korelacije	0,8895	0,9905	0,8804	0,8671	0,7808

Tabela 4.3-3 Instrumentalne granice detekcije i kvantifikacije (µgmL⁻¹) u *full scan* režimu u MS¹ i MS²

	Pirimetanil	Ciprodinil	Boskalid	Trifloksistrobin	Bifentrin
MS ¹					
iLOD	0,016	0,010	0,014	0,015	0,028
iLOQ	0,048	0,030	0,043	0,045	0,085
MS ²					
iLOD	0,021	0,016	0,009	0,019	0,010
iLOQ	0,064	0,050	0,028	0,059	0,029

4.3.1.2 Rezultati ispitivanja sa *LOOP injection* metodom unošenja uzoraka

Za uvođenje mobilne faze u *LOOP* koja nosi uzorak ka ESI izvoru, najčešće se koriste MS pumpa ili špric pumpa koja je sastavni deo masenog spektrometra. U ispitivanje performansi *LOOP injection* analize uvršteno je uvođenje mobilne faze preko špric pumpe u oba režima rada i preko MS pumpe sa brzinom protoka koja iznosi 50 µLmin⁻¹.

Špric pumpa ima normalan režim rada sa brzinom protoka koja iznosi 1 % i *purge* režim rada sa brzinom protoka koja iznosi 5 % zapremine korišćenog šprica po minutu. To znači da ako se koristi špric zapremine 500 µL, brzina protoka u normalnom režimu iznosi 5 µLmin⁻¹, a u *purge* režimu 25 µLmin⁻¹. Kada se radi sa MS pumpom moguće je proizvoljnije menjati brzine protoka počevši od 10 µLmin⁻¹ pa naviše.

Dinamika *LOOP injection* analize. Na osnovu hronograma serije standarda u rastvaraču (0,10 – 5,00 µgmL⁻¹) analiziranih pri različitim brzinama protoka mobilne faze kroz petlju, utvrđeno je sledeće:

- kada je brzina protoka pufera 50 µLmin⁻¹ porast signala analita se javlja nakon 2 do 7 sekundi od trenutka injekcije, a bazna linija se uspostavlja nakon 30 – 50 sekundi, u zavisnosti od koncentracije standarda. Ukoliko se za formiranje bazne linije na početku i kraju analize predodredi po 30 sekundi i ukoliko je vreme analize pika minimum 60 sekundi, minimalno vreme trajanja ukupne analize bi bilo $1 \text{ min} + N \times 1 \text{ min}$, pri čemu je N broj *LOOP* injekcija (Tabela 4.3-4).

- kada je brzina protoka pufera $25 \mu\text{Lmin}^{-1}$ porast signala analita se javlja nakon 18 do 24 sekundi od trenutka injekcije, a bazna linija se uspostavlja nakon 36 – 90 sekundi, u zavisnosti od koncentracije standarda. Za minimalno vreme analize pika od 90 sekundi, minimalno vreme trajanja ukupne analize bi bilo $1 \text{ min} + N \times 1,5 \text{ min}$.
- kada je brzina protoka pufera $5 \mu\text{Lmin}^{-1}$ porast signala analita se javlja nakon 102 do 108 sekundi od trenutka injekcije, a bazna linija se uspostavlja nakon 160 – 180 sekundi u zavisnosti od koncentracije standarda (prosečne vrednosti za injekcije 6 standarda su date u tabeli). Za minimalno vreme analize pika od 180 sekundi, minimalno vreme trajanja ukupne analize bi bilo $1 \text{ min} + N \times 3 \text{ min}$.

Ukoliko se analiza radi sa špric pumpom u normalnom režimu, ukupno trajanje analize npr. 10 uzoraka bi iznosilo 31 minut, a u *purge* režimu sa $5 \times$ većom brzinom protoka bi iznosilo 16 min odnosno bilo bi redukovano za oko 50 %. Ukoliko se analiza radi sa brzinom protoka $50 \mu\text{L}/\text{min}$ zadatom od strane MS pumpe, njeno ukupno trajanje bi iznosilo 11 minuta.

Tabela 4.3-4 Parametri *LOOP injection* analize i njena dinamika u zavisnosti od varijabilnosti u brzini protoka mobilne faze

Vrsta pumpe za uvođenje mobilne faze	Brzina protoka mobilne faze, $\mu\text{L}/\text{min}$	V1, sek*	V2, sek**	Procenjeno minimalno vreme trajanja ukupne analize, min
LC pumpa	50	4,3	36	$1,0 + N \times 1,0$
Syringe pumpa – <i>purge</i> režim	25	23	70	$1,0 + N \times 1,5$
Syringe pumpa – normalan režim	5	106	169	$1,0 + N \times 3,0$

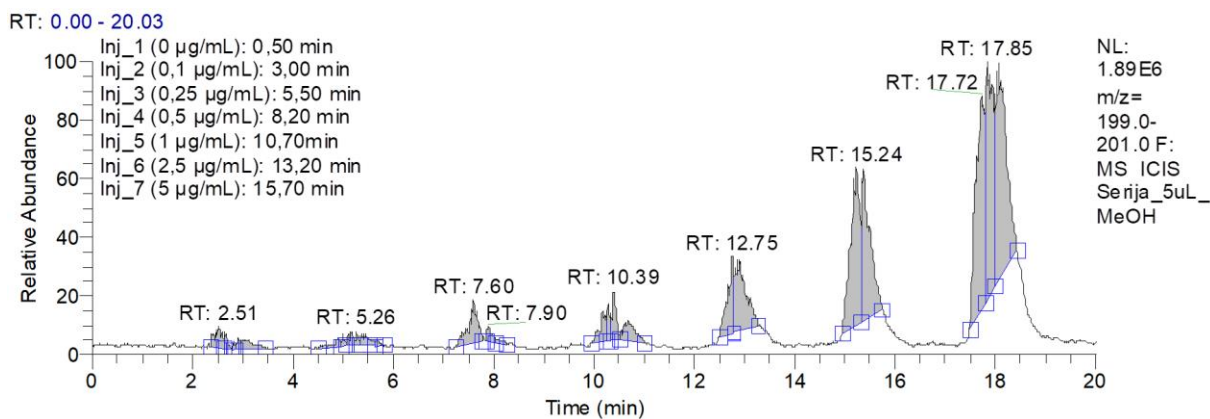
*V1 – vreme koje prođe od trenutka LOOP injekcije standarda do porasta signala analita (početak pika)

**V2 – vreme koje prođe od trenutka LOOP injekcije standarda do ponovnog uspostavljanja bazne linije (kraj pika). V1 i V2 su izračunati kao prosečna vrednost perioda za 6 injekcija serije standarda ($0,10 - 5,00 \mu\text{g}/\text{mL}$)

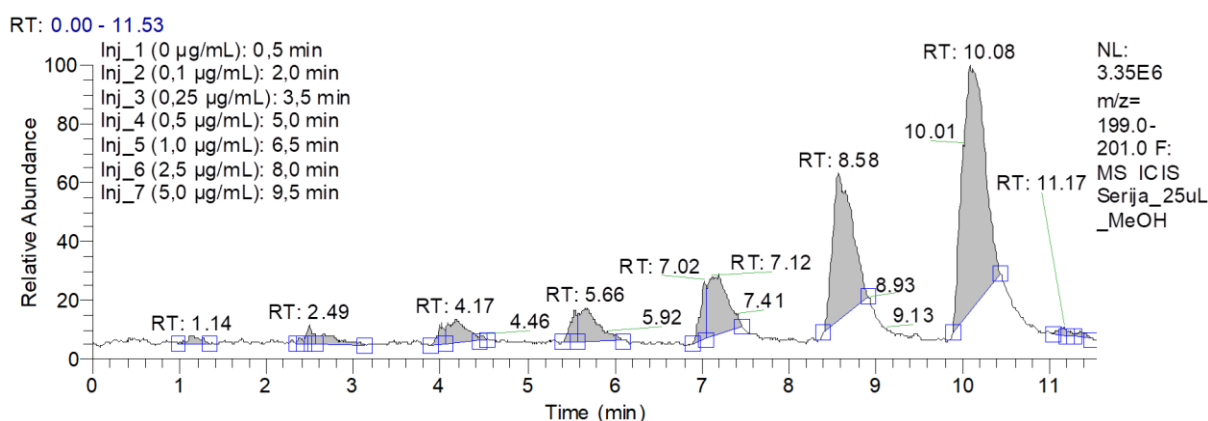
N – broj LOOP injekcija

Integritet pikova. Na slikama 4.3-9 – 4.3-11 prikazani su hronogrami sa nekoliko uzastopnih injekcija standarda, dobijeni nakon ekstrakcije protonovanog molekuskog jona pirimetanila m/z 200 iz skeniranog opsega m/z 197-500. Pikovi su autointegrisani sa default parametrima integracije koji postoje u okviru programa *Xcalibur*.

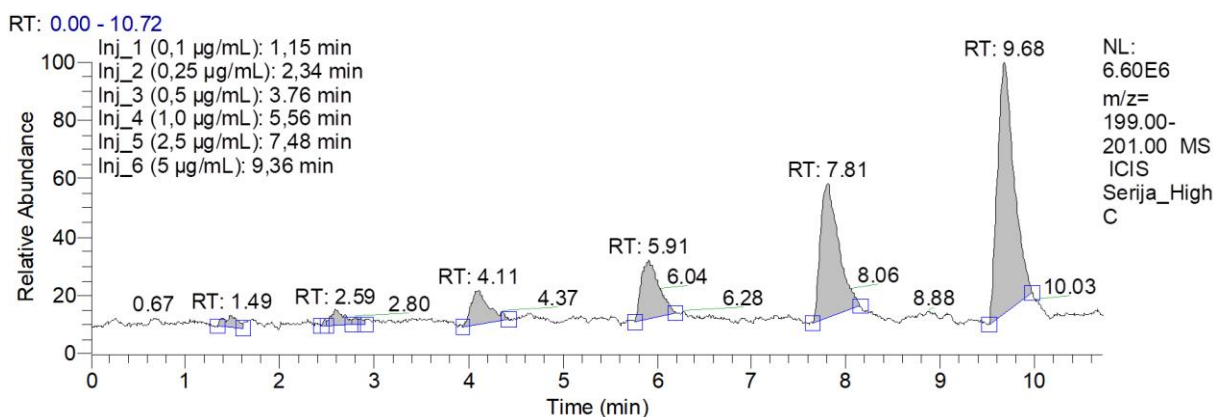
Najbolji integritet pikova se uočava za *LOOP* injekcije sa protokom mobilne faze od $50 \mu\text{Lmin}^{-1}$ (Slika 4.3-11). Pikovi su najuži i pokazuju najstabilniji signal u oblasti maksimuma, što rezultuje najefikasnijom autointegracijom – sa jednom integrisanom površinom koja zahvata najveći procenat pika. Pikovi sa slike 1 i 2 bi radi postizanja efikasnije autointegracije zahtevali prethodnu obradu u smislu *smoothing*-a, ili bi integracija trebalo da bude prilagođena svakom piku.



Slika 4.3-9 *Extract ion LOOP* hronogram serije standarda pirimetanila, protok pufera 5 µLmin⁻¹



Slika 4.3-10 *Extract ion LOOP* hronogram serije standarda pirimetanila, protok pufera 25 µLmin⁻¹



Slika 4.3-11 *Extract ion LOOP* hronogram serije standarda pirimetanila, protok pufera 50 µLmin⁻¹

Osetljivost. U tabelama 4.3-5 – 4.3-7 su prikazani parametri dobijeni linearnim fitovanjem merenih odziva pesticida u metanolu sa njihovim koncentracijama, pri različitim brzinama protoka pufera. Analiza je vršena u *full scan* režimu u opsegu *m/z* 197-500, kao najužem opsegu koji omogućava istovremenu analizu svih testiranih pesticida. Korelacija odziva sa koncentracijama analita je dobra; koeficijent korelacije se kreće od 0,8146 za bifentrin (protok pufera 50 µLmin⁻¹) do 0,9962 za boskalid (protok pufera 5 µLmin⁻¹). Sa porastom brzine protoka mobilne faze, uočava se pad osetljivosti za većinu analita.

Tabela 4.3-5 Parametri kalibracione krive u rastvaraču, protok pufera sa šprica 5 μLmin^{-1} (*linear fit*; opseg 0,10 – 5,00 μgmL^{-1})

Parametar	Pirimetamil	Ciprodinil	Boskalid	Trifloksistrobin	Bifentrin
Nagib	15323914	35437801	19303954	70644452	7200287
Odsečak	978335	1667573	7761273	72565865	31976583
Koeficijent korelacije	0,9929	0,9877	0,9962	0,9873	0,9083

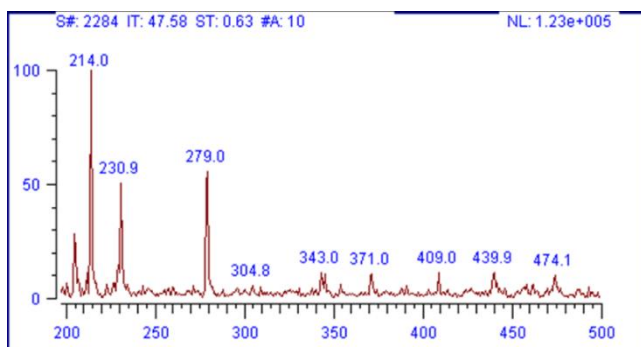
Tabela 4.3-6 Parametri kalibracione krive u rastvaraču, protok pufera sa šprica 25 μLmin^{-1} (*linear fit*; opseg 0,10 – 5,00 μgmL^{-1})

Parametar	Pirimetamil	Ciprodinil	Boskalid	Trifloksistrobin	Bifentrin
Nagib	14051004	22927603	5783542	36214381	3207061
Odsečak	2951100	7505084	2194320	18407925	4861483
Koeficijent korelacije	0,9954	0,9946	0,9926	0,9943	0,9464

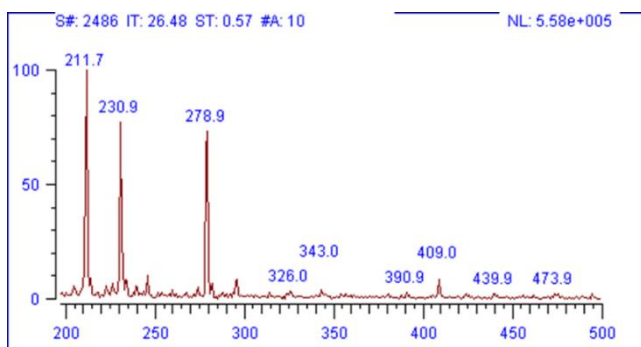
Tabela 4.3-7 Parametri kalibracione krive u rastvaraču, protok pufera sa pumpe hromatografa 50 μLmin^{-1} (*linear fit*; opseg 0,10 – 5,00 μgmL^{-1})

Parametar	Pirimetamil	Ciprodinil	Boskalid	Trifloksistrobin	Bifentrin
Nagib	16307229	23575498	3485636	26018452	954070
Odsečak	3156261	2694413	1519859	5129374	1306074
Koeficijent korelacije	0,9877	0,9947	0,9593	0,9825	0,8146

Pad osetljivosti se može objasniti prisustvom primesnih jona iz sistema (m/z 211, 231, 280) koji u ESI izvor ulaze zajedno sa mobilnom fazom – što je veća brzina protoka mobilne faze, veća je zastupljenost ovih jona (Slika 4.3-13 - Slika 4.3-15, NL vrednosti). Dominacija primesnih jona loše utiče na osetljivost analize jer se u relativno kratkom intervalu dostiže podešena AGC vrednost broja jona u trapu (Slika 4.3-14) i time skraćuje vreme punjenja trapa (*injection time* – *IT*) sa *default* vrednosti od 50 ms na 7,51 ms (50 μLmin^{-1}), 26 ms (25 μLmin^{-1}) i 48 ms (5 μLmin^{-1}) (Slika 4.3-13 - Slika 4.3-15, IT vrednosti). Ovo se dešava jer trap prestaje sa punjenjem kad se dostigne zadata vrednost bilo kog od dva parametra (IT ili AGC vrednost). Situacija je skoro identična ako se promeni sastav mobilne faze koja se koristi u *LOOP* analizi. Kada se koristi miks pufera i metanola u odnosu 50:50 % vol ponovo se uočavaju joni m/z 211 i 280 nešto



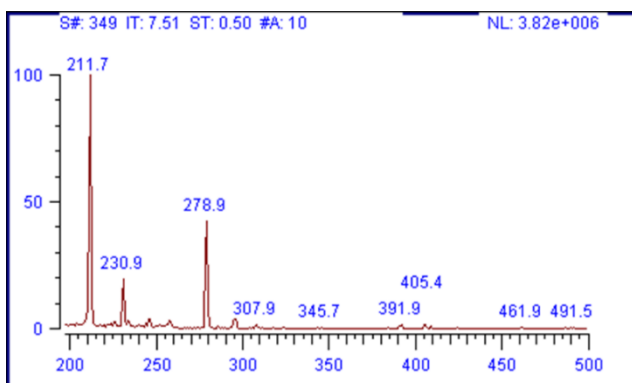
Slika 4.3-13 Joni koji se beleže u *scan* režimu (m/z 197-500) pri dotoku pufera brzinom od 5 μLmin^{-1} bez *LOOP* injekcije



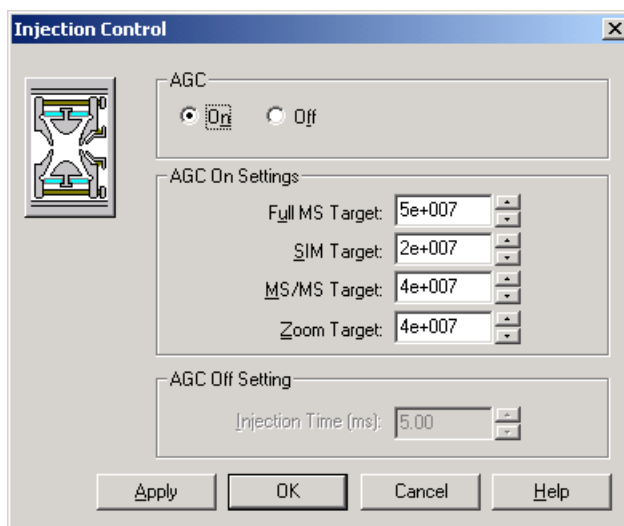
Slika 4.3-12 Joni koji se beleže u *scan* režimu (m/z 197-500) pri dotoku pufera brzinom od 25 μLmin^{-1} bez *LOOP* injekcije

manjeg intenziteta, ali se javlja jon m/z 332 koji nije zanemarljivog intenziteta i potiče iz metanola, a IT se sa 50 ms smanjuje na 8,18 ms pri protoku 50 μLmin^{-1} (Slika 4.3-16).

Jedna od opcija za povećanje osjetljivosti je manipulacija zadatih AGC vrednosti, međutim u tom slučaju treba biti obazriv zbog moguće pojave *space charge* efekta. Druga opcija je sužavanje opsega skeniranja čime se zaobilaze primesni joni. Početni opseg bi mogao da se podeli na dva opsega – opseg m/z 197-230 koji pokriva jone pirimetanila i ciprodinila i opseg m/z 340-450 koji pokriva jone boskalida, trifloksistrobina i bifentrina. Suženjem opsega skeniranja na oblast m/z 340-450 postiže se zadato vreme punjenja trapa (Slika 4.3-17), ali se u opsegu m/z 197-230 i dalje ne postiže zadato vreme, zbog primesnih jona (Slika 4.3-18). Moguće rešenje problema je analiza pirimetanila i ciprodinila u SIM režimu, pri čemu se izolacijom željenih jona eliminiše uticaj dominantnih primesnih jona.

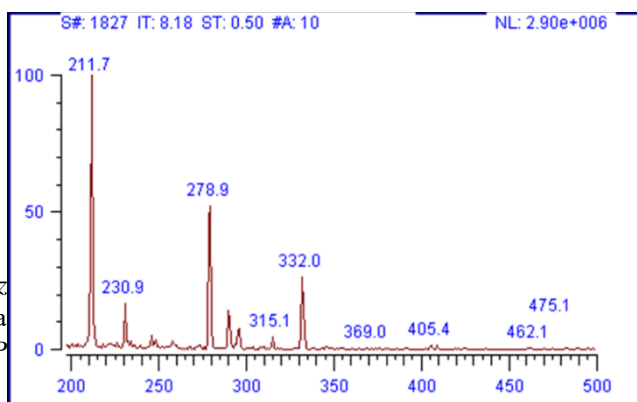


Slika 4.3-15 Joni koji se beleže u *scan* režimu (m/z 197-500) pri dotoku pufera brzinom od 50 μLmin^{-1} bez *LOOP* injekcije

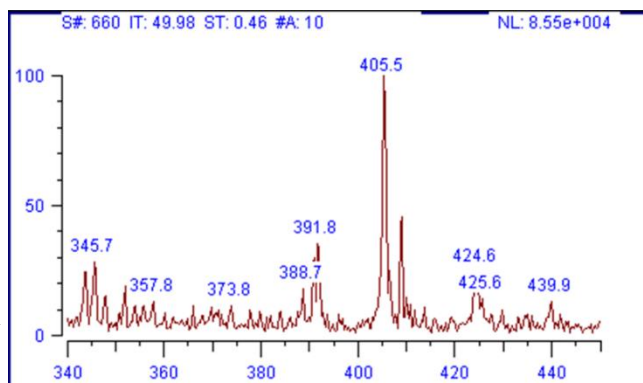


Slika 4.3-14 Default target AGC vrednosti za različite režime rada analizatora

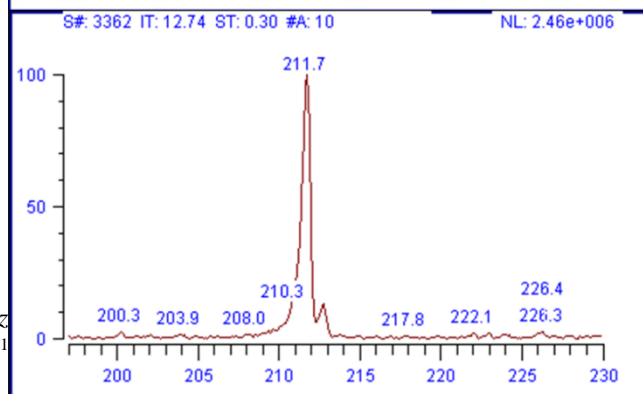
Slika 4.3-16 Joni koji se beleže u *scan* režimu (m/z 197-500) pri dotoku smeše pufera i metanola (50:50, % vol) brzinom od 50 μLmin^{-1} bez *LOOP* injekcije



Slika 4.3-17 Joni koji se beleže u *scan* režimu (m/z 340-450) pri dotoku pufera brzinom od $50 \mu\text{Lmin}^{-1}$ bez *LOOP* injekcije



Slika 4.3-18 Joni koji se beleže u *scan* režimu (m/z 197-230) pri dotoku pufera brzinom od $50 \mu\text{Lmin}^{-1}$ bez *LOOP* injekcije.



Granica detekcije. Granice detekcije pesticida za različite brzine protoka mobilne faze su međusobno uporedive i pretežno su istog reda veličine (Tabela 4.3-8). Granice detekcije pirimetanila se kreću od $0,035$ do $0,103 \mu\text{g mL}^{-1}$; ciprodinila od $0,024$ do $0,088 \mu\text{g mL}^{-1}$; boskalida od $0,051$ do $0,235 \mu\text{g mL}^{-1}$; trifloksistrobina od $0,051$ do $0,358 \mu\text{g mL}^{-1}$, bifentrina od $0,398$ do $0,527 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Tabela 4.3-8 Instrumentalne granice detekcije i kvantifikacije pesticida za različite brzine dotoka pufera

	Granica detekcije, $\mu\text{g mL}^{-1}$	Granica kvantifikacije, $\mu\text{g mL}^{-1}$
Brzina dotoka pufera = $5 \mu\text{Lmin}^{-1}$		
Pirimetanol	0,103	0,344
Ciprodinil	0,069	0,229
Boskalid	0,195	0,650
Trifloksistrobin	0,358	1,195
Bifentrin	0,527	1,757
Brzina dotoka pufera = $25 \mu\text{Lmin}^{-1}$		
Pirimetanol	0,102	0,340
Ciprodinil	0,024	0,079
Boskalid	0,051	0,170
Trifloksistrobin	0,225	0,750
Bifentrin	0,398	1,326
Brzina dotoka pufera = $50 \mu\text{Lmin}^{-1}$		
Pirimetanol	0,035	0,118
Ciprodinil	0,088	0,292
Boskalid	0,235	0,785
Trifloksistrobin	0,051	0,170
Bifentrin	0,485	1,618

4.3.2 Rezultati razvoja metode MET-DI-R

Metoda se može koristiti za preliminarnu kvalitativnu analizu jabuka. Ukoliko se ovom metodom potvrdi prisustvo pesticida, pristupa se njihovoj kvantifikaciji drugim razvijenim metodama. Parametri značajni za ovakvu vrstu analize, ispitani prilikom razvoja metode su čistoća finalnog ekstrakta, način injektovanja uzorka i prenos uzorka iz jedne injekcije u narednu (*carryover*).

4.3.2.1 Analiza ekstrakata kore

Određivanje količine suvog ostatka u finalnom ekstraktu. Primarna ekstrakcija matriksa kore je vršena vodom, s ciljem da se izbegne ekstrakcija visoko zastupljenih voskova. Pre postupka tečno-tečno ekstrakcije sa heksanom, vodeni ekstrakt je oslobođen komadića kore ceđenjem kroz filter papir da bi se sukcesivni heksanski ekstrakt rasteretio od voskova; ovo je optimalni postupak s obzirom da se njime ne uklanja 100 % čestica kore, ali takođe nije vremenski zahtevan, kao što je npr. ceđenje kroz mikrofilter.

Cilj izmene nosača matriksa kore voda – heksan je bio da se izbegne ekstrakcija neorganskih soli iz primarnog ekstrakta. Korak izmene nosača heksan – metanol uparavanjem je obezbedio niže granice detekcije pesticida i uobičajenu tečnu fazu za rad sa ESI/MS sistemima.

Krajnji cilj pripreme uzorka je bio da se obezbedi ekstrakt koji je u dovoljnoj meri ili u potpunosti oslobođen komponenti iz hemijskog profila kore (voskovi, soli i slično) koji bi doveli do eventualnog zapušavanja sistema kapilara ili zaprljanja ESI izvora usled formiranja depozita.

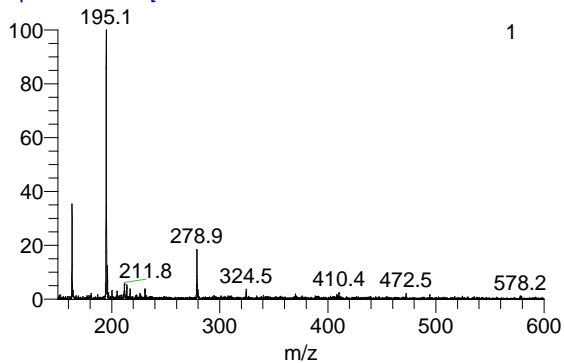
Količina suvog ostatka u finalnom ekstraktu izmerena je nakon 24h uparavanja ekstrakta do suva na sobnoj temperaturi i sukcesivnog dogrevanja suvog ostatka po pola sata na 50 °C i na 100 °C. Rezultati pokazuju da količina suvog ostatka koja potiče od 50 g kore, nakon uparavanja na sobnoj temperaturi iznosi oko 1 mg, tačnije 1,15±0,12 mg u ekstraktu Zlatnog Delišesa, 0,98±0,11 mg u ekstraktu Ajdareda i 1,12±0,17 mg u ekstraktu Greni Smita. Nakon pola sata dogrevanja na 50 °C količina suvog ostatka se smanjuje na oko 0,2 mg, a daljim dogrevanjem na 100 °C postaje praktično nemerljiva. Rezultati merenja količine suvog ostatka sugerišu da je njegova akumulacija u ESI izvoru pri analizi ekstrakata malo verovatna, s obzirom da masa kore koja se uzima za analizu iznosi 10 g i da je najniža temperatura u ESI izvoru obično 200 °C što bi obezbedilo isparavanje eventualno prisutnog suvog ostatka.

MS¹ analiza. Analiza ekstrakata kore jabuka je vršena preko sistema prikazanog na slici 3.4-3 (str. 94) u *purge* režimu rada špric pumpe (za špric zapremine 500 µL brzina protoka je 25 µLmin⁻¹) uz paralelni protok eluenta (vodeni rastvor 0,30 % mravlje kiseline i 0,01 % amonijum-formijata) preko MS pumpe (50 µLmin⁻¹). Slika 4.3-19 prikazuje ESI/MS spektar neposredno pre snimanja ekstrakata kore (reflektuje pozadinski signal) i ESI/MS spektre ekstrakata kore tri sorte jabuka bez dodatnih pesticida (tzv. blank ekstrakti). Joni koji potiču iz ekstrakta kore se uočavaju uglavnom na m/z vrednostima većim od 290. Pozadinski spektar i spektri blank ekstrakata kore se razlikuju u 5-6 dodatnih jona veće zastupljenosti.

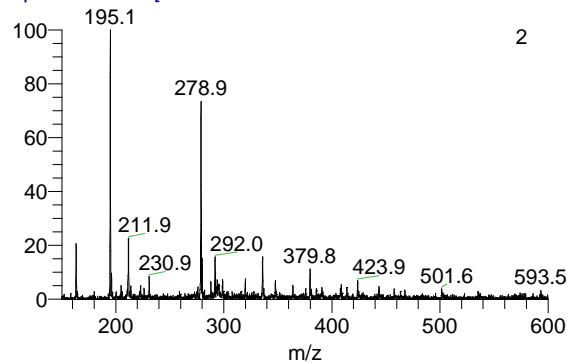
Slika 4.3-20 prikazuje ESI/MS spektre spajkovane kore Zlatnog Delišesa. U masenim spektrima spajkovane kore gde je koncentracija pesticida 0,50 mgkg⁻¹ i 0,75 mgkg⁻¹ jasno se uočavaju pseudomolekulski joni (protonovani molekularni joni) pirimetanila, ciprodinila i

trifloksistrobina na m/z 200,3; 226,3 i 408,7; joni boskalida (protonovani molekularni jon) i bifentrina (adukt sa amonijum-jonom) se na ovim koncentracijama ne uočavaju jasno. Iz ovog razloga vizuelna identifikacija jona pesticida sama po sebi nije kriterijum dovoljan za potvrdu prisustva/odsustva pesticida, već kvalitativna analiza treba da se sastoji iz koraka ekstrakcije jona pesticida iz opsega skeniranja (m/z 150 – 600) i poređenja signala koji oni proizvode sa pozadinskim signalom. MS¹ spektri spajkovane kore sorte Ajdared i Greni Smit su dati u prilogu (Slika 8.7-1 i Slika 8.7-2, str. 318 i 319).

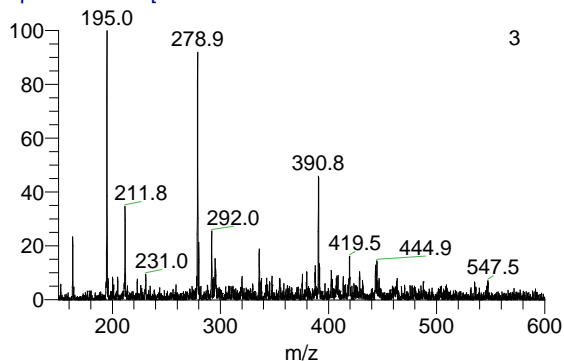
ID blank #69 RT: 0.87 AV: 1 NL: 6.16E5
T: + p ESI Full ms [150.00-60



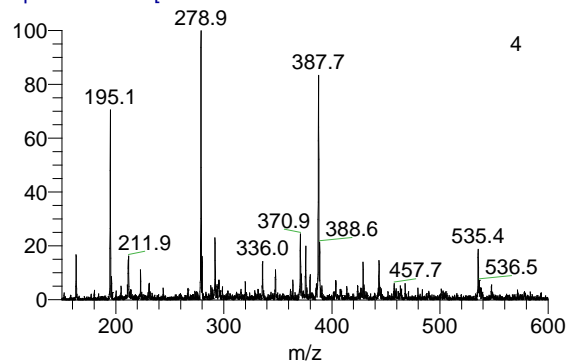
ID blank #447 RT: 7.23 AV: 1 NL: 8.10E5
T: + p ESI Full ms [150.00-60



GD blank #117 RT: 3.27 AV: 1 NL: 5.17E5
T: + p ESI Full ms [150.00-60

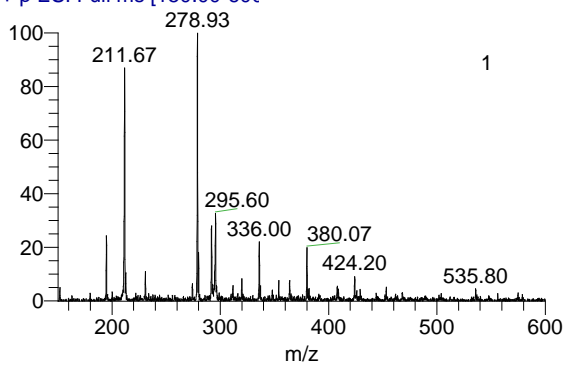


GS blank #545 RT: 11.79 AV: 1 NL: 1.02E6
T: + p ESI Full ms [150.00-60

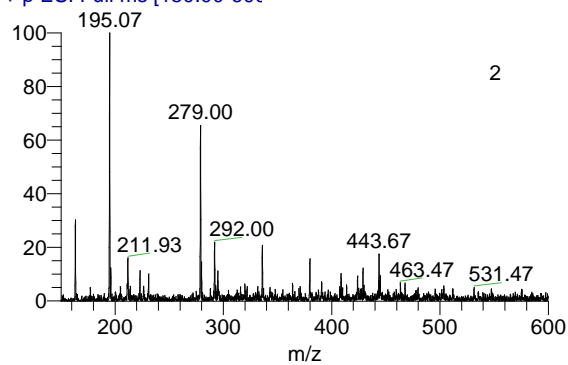


Slika 4.3-19 Full scan MS¹ spektar rastvora 0,30 % mravlje kiseline i 0,01 % amonijum-formijata u vodi neposredno pre injektovanja ekstrakata kore (1), full scan MS¹ spektar blank ekstrakata kore sorte Ajdared (2), sorte Zlatni Delišeš (3) i sorte Greni Smit (4)

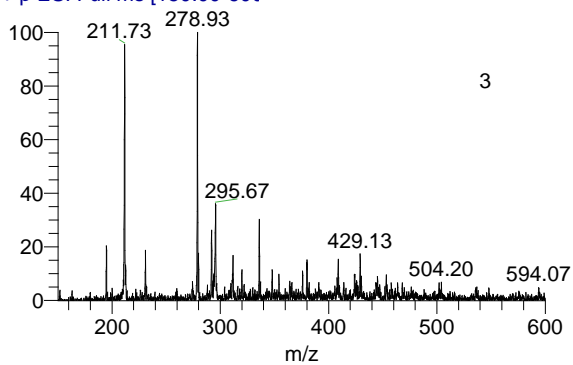
0,05 #59 RT: 0.62 AV: 1 NL: 1.59E6
T: + p ESI Full ms [150.00-600]



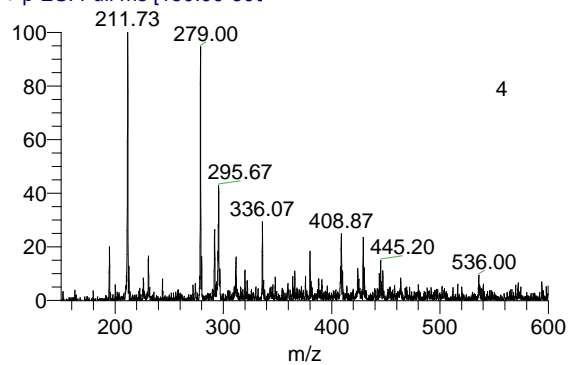
0,10 mgkg #344 RT: 6.29 AV: 1 NL: 5.34E5
T: + p ESI Full ms [150.00-600]



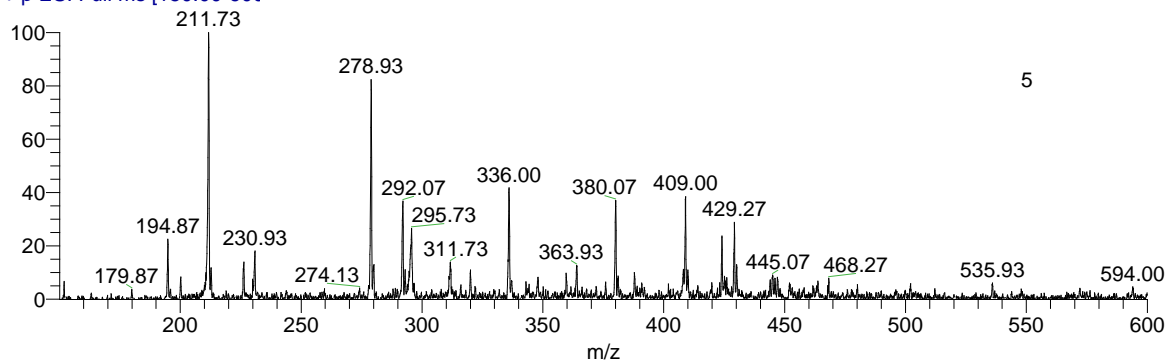
GD_0,20 #192 RT: 1.98 AV: 1 NL: 1.02E6
T: + p ESI Full ms [150.00-600]



GD_0,50 #194 RT: 1.99 AV: 1 NL: 1.09E6
T: + p ESI Full ms [150.00-600]



GD_0,75 #186 RT: 1.91 AV: 1 NL: 1.33E6
T: + p ESI Full ms [150.00-600]



Slika 4.3-20 Full scan MS¹ spektar ekstrakta spajkovane kore sorte Zlatni Delišes 1 - 0,05 mgkg⁻¹; 2 - 0,10 mgkg⁻¹; 3 - 0,25 mgkg⁻¹; 4 - 0,50 mgkg⁻¹; 5 - 0,75 mgkg⁻¹

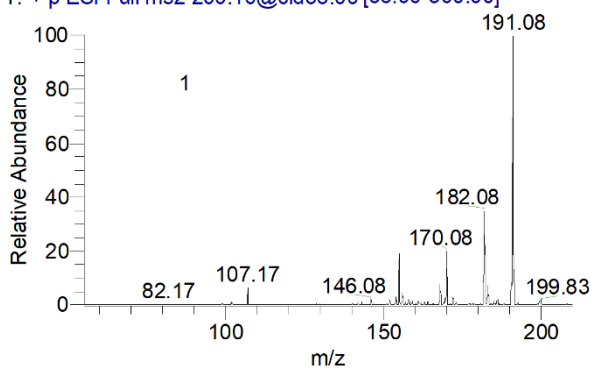
MS² analiza. Pseudomolekulski joni pesticida koji su detektovani u ekstraktima kore su fragmentisani uz primenu kolizionalne energije optimalne za svaki pesticid. Poređenje fragmentacije pesticida u proceduralnom standardu Zlatnog Delišesa (Slika 4.3-22) sa fragmentacijom u neproceduralnom analogu za istu sortu (Slika 8.7-18, str. 335) ukazuje na sledeće:

- Fragmentacija pirimetanila ishoduje jonima m/z 183, 173, 131 i 85, od kojih jon m/z 183 i verovatno jon m/z 173 mogu biti povezani sa pesticidom; jon m/z 107 se ne uočava. Na većoj vrednosti kolizionalne energije (55 %) jon m/z 183 postaje dominantan. U ekstraktu kore spajkovane sa $0,75 \text{ mg kg}^{-1}$ (Slika 4.3-23) mogu se uočiti 3 karakteristična fragmenta pirimetanila (m/z 183, 107 i 125) koji potvrđuju prisustvo pesticida. Na osnovu MS² spektara rastvora pirimetanila (u rastvaraču ili ekstraktu jabuke) može se zaključiti da je pri većim koncentracijama pesticida nakon fragmentacije dominantan fragment m/z 107, a pri manjim fragment m/z 183.
- Prisustvo ciprodinila u kori može se pouzdano utvrditi, jer se uočava minimum 4 karakteristična fragmenta ovog pesticida i to m/z 210, 133, 159 i 108 (Slika 4.3-22).
- Prisustvo boskalida, trifloksistrobina i bifentrina se takođe može pouzdano utvrditi uočavanjem karakterističnih jona ovih pesticida (Slika 4.3-22).

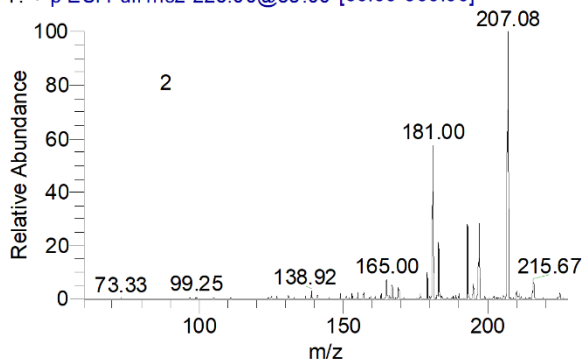
U blank ekstraktima kore Zlatnog Delišesa, Ajdareda i Greni Smita, nakon fragmentacije pseudomolekulskih jona ispitivanih pesticida ne uočavaju se fragmenti karakteristični za pesticide (Slika 4.3-21; Slika 8.7-3 i Slika 8.7-6).

Kvalifikacija boskalida, trifloksistrobina i bifentrina u ekstraktima kore je pouzdana, jer je obrazac fragmentacije ovih pesticida očuvan i uglavnom nepromenjen pri različitim koncentracijama pesticida u kori. Fragmentacija pirimetanila i ciprodinila je izmenjena u odnosu na fragmentaciju u rastvaraču, jer se uočava manji diverzitet fragmenata. Ova pojava je izraženija za pirimetanil, posebno pri niskim koncentracijama, što može otežati identifikaciju ovog pesticida. Isti zaključci se mogu izvesti i za sortu Ajdared i Greni Smit (Poglavlje 8.7, prilog).

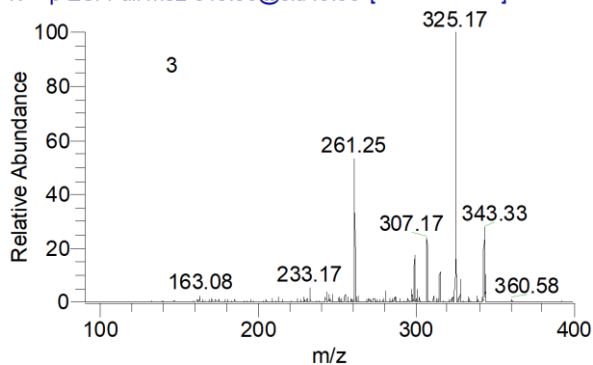
GD blank #227 RT: 2.67 AV: 1 NL: 4.40E2
T: + p ESI Full ms2 200.10@cid55.00 [55.00-300.00]



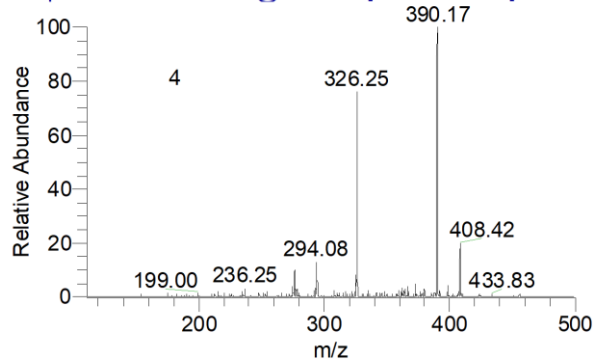
GD blank #197 RT: 4.84 AV: 1 NL: 2.27E2
T: + p ESI Full ms2 226.00@55.00 [60.00-300.00]



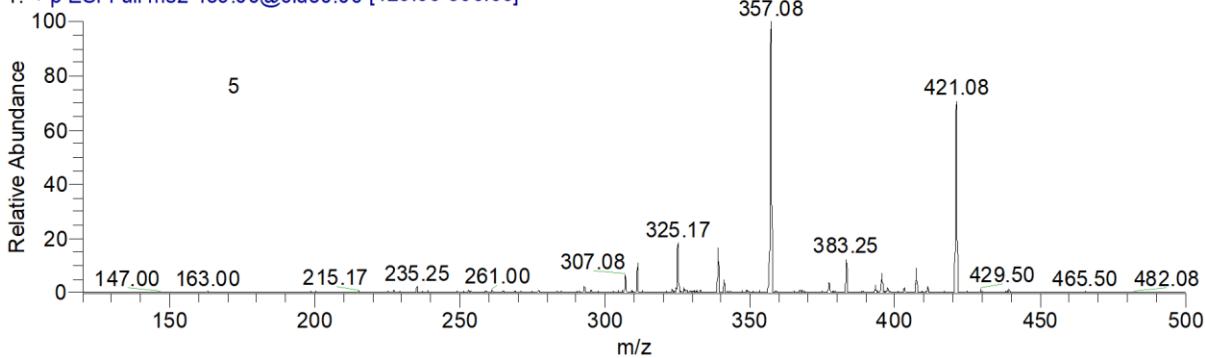
GD blank #406 RT: 6.42 AV: 1 NL: 4.94E3
T: + p ESI Full ms2 343.00@cid45.00 [90.00-400.00]



GD blank #479 RT: 8.18 AV: 1 NL: 2.18E4
T: + p ESI Full ms2 408.00@cid40.00 [110.00-500.00]

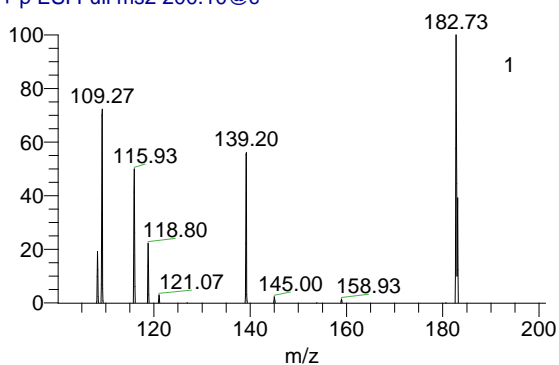


GD blank #564 RT: 10.22 AV: 1 NL: 4.35E3
T: + p ESI Full ms2 439.00@cid50.00 [120.00-500.00]

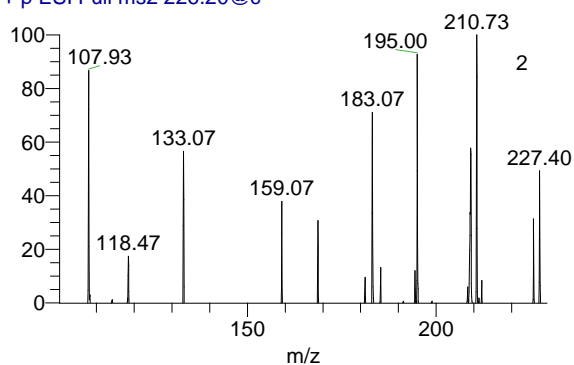


Slika 4.3-21 Full scan MS² spektar (1) pirimetanila, (2) ciprodinila, (3) boskalida, (4) trifloksistrobina i (5) bifentrina u blank ekstraktu kore sorte Zlatni Delišes

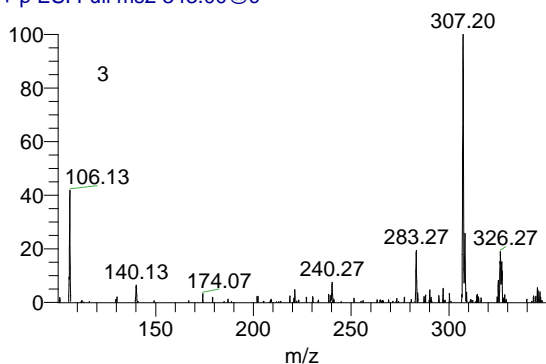
0,05 #283 RT: 3.89 AV: 1 NL: 1.30E2
T: + p ESI Full ms2 200.10@c



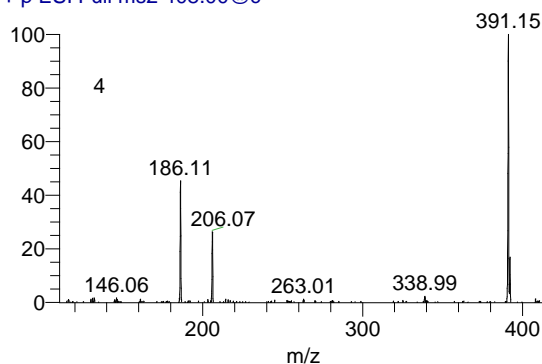
0,05 #363 RT: 5.55 AV: 1 NL: 1.66E2
T: + p ESI Full ms2 226.20@c



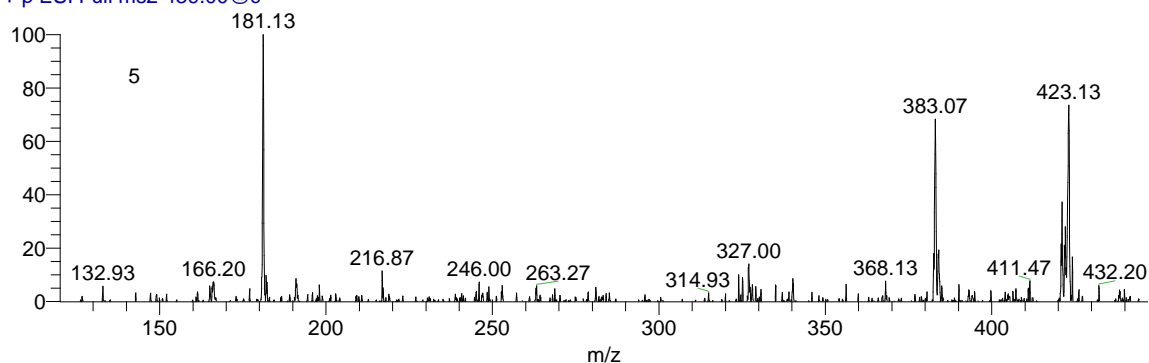
0,05 #420 RT: 6.85 AV: 1 NL: 6.88E3
T: + p ESI Full ms2 343.00@c



0,05 #484 RT: 8.39 AV: 1 NL: 5.53E4
T: + p ESI Full ms2 408.00@c

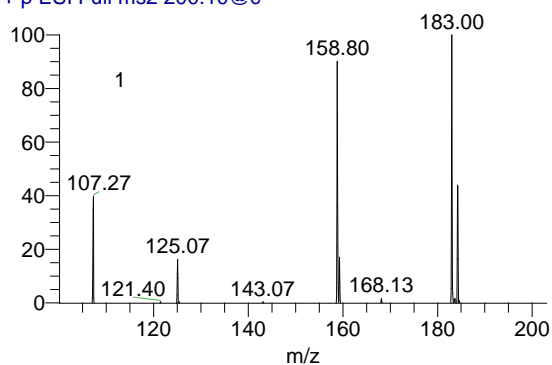


0,05 #640 RT: 12.13 AV: 1 NL: 5.35E3
T: + p ESI Full ms2 439.00@c

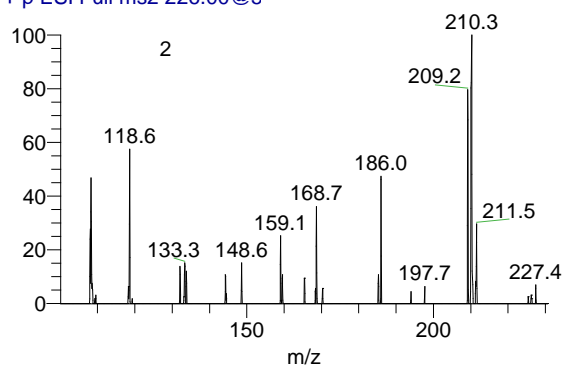


Slika 4.3-22 Full scan MS² spektar (1) pirimetanila, (2) ciprodinila, (3) boskalida, (4) trifloksistrobina i (5) bifentrina u ekstraktu spajkovane kore sorte Zlatni Delišeš (0,050 mgkg⁻¹)

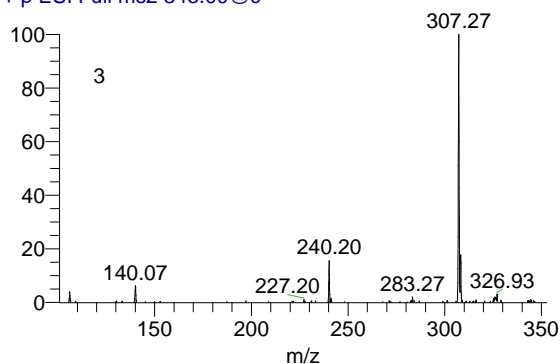
GD_0,75 #287 RT: 3.86 AV: 1 NL: 2.34E2
T: + p ESI Full ms2 200.10@c



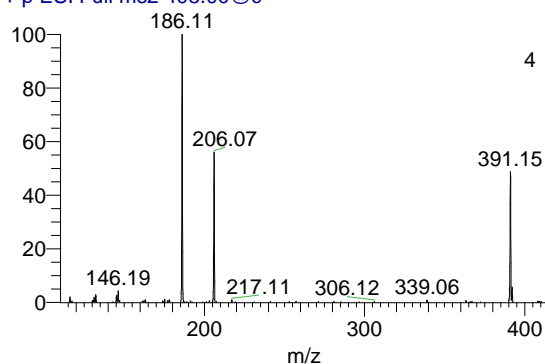
0,75 mgkg #358 RT: 8.02 AV: 1 NL: 1.58E2
T: + p ESI Full ms2 226.00@5



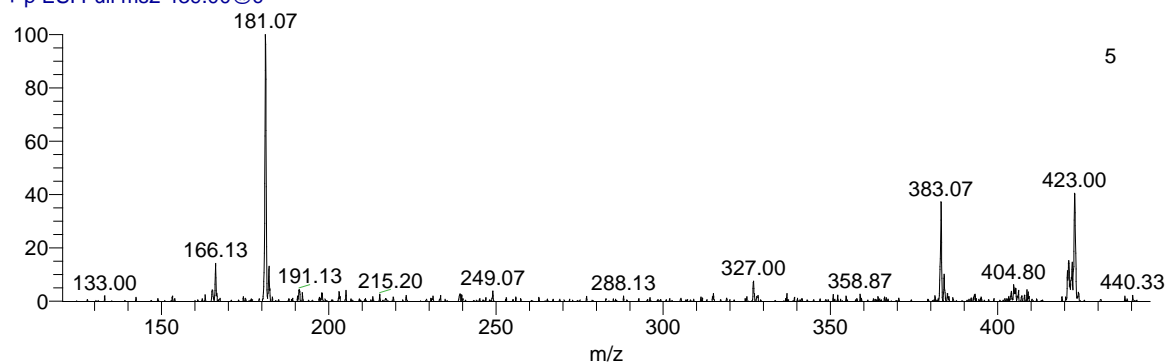
GD_0,75 #451 RT: 7.46 AV: 1 NL: 4.32E4
T: + p ESI Full ms2 343.00@c



GD_0,75 #530 RT: 9.32 AV: 1 NL: 1.77E5
T: + p ESI Full ms2 408.00@c



GD_0,75 #627 RT: 11.62 AV: 1 NL: 1.69E4
T: + p ESI Full ms2 439.00@c

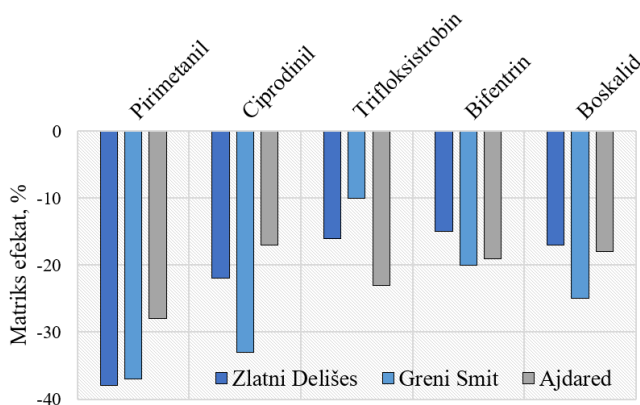


Slika 4.3-23 Full scan MS² spektar (1) pirimetanila, (2) ciprodinila, (3) boskalida, (4) trifloksistrobina i (5) bifentrina u ekstraktu spajkovane kore sorte Zlatni Delišeš (0,75 mgkg⁻¹)

4.3.2.2 Rezultati ispitivanja parametara validacije

Selektivnost. Metoda MET-DI-R je selektivna prema svim ispitivanim analitima. U MS² spektrima blank ekstrakata kore sve tri ispitivane sorte jabuka ne uočavaju se fragmenti karakteristični za ispitivane analite.

Matriks efekat. Matriks efekat u finalnom ekstraktu može se klasifikovati kao umereno negativan. Matriks efekat se u ekstraktima kore Zlatnog Delišesa se kreće od -15 % za bifentrin do -38 % za pirimetanil; u ekstraktima kore Greni Smita matriks efekat se kreće od -10 % za trifloksistrobin do -37 % za pirimetanil, dok se u ekstraktima kore Ajdareda kreće od -18 % za boskalid do -28 % za pirimetanil. Zaključak je da matriks efekat nije značajnije izražen za 4 od 5 analita i može se zanemariti. Za pirimetanil matriks efekat spada u kategoriju izraženog (>±20 %), tako da bi ga trebalo uzeti u obzir.



4.3-24 Matriks efekat u ekstraktima kore Zlatnog Delišesa, Ajdareda i Greni Smita pripremljenim prema metodi MET-DI-R

Linearnost metode. Metoda je linearna u testiranom analitičkom opsegu (0,00 – 0,75 mgkg⁻¹). Mereni odziv pesticida dobro koreliše sa koncentracijom pesticida u ekstraktima kore. Izmereni su odzivi pseudomolekulskih jona pesticida (MS¹ analiza) i odzivi najzastupljenijih fragmenata pesticida (MS² analiza). Integrisana je površina u trajanju od 2 min; parametri linearnog fitovanja su prikazani u tabeli 4.3-9. Osetljivost u MS¹ režimu u svim matriksima se smanjuje u nizu trifloksistrobin>ciprodinil>pirimetanil>boskalid>bifentrin. Koeficijenti korelacije se kreću od 0,9442 za pirimetanil u matriksu Greni Smita do 0,9985 za boskalid u matriksu Ajdareda. Osetljivost u MS² režimu u svim matriksima se smanjuje u nizu trifloksistrobin>boskalid >bifentrin >pirimetanil> ciprodinil. Koeficijenti korelacije se kreću od 0,8269 za pirimetanil u matriksu Zlatnog Delišesa do 0,9849 za boskalid u istom matriksu.

Najveća osetljivost postoji je prema trifloksistrobinu. Na istom MS nivou, osetljivost je uporediva za parove pirimetanil/ciprodinil i boskalid/bifentrin. Posmatrajući kroz različite MS nivoe, osetljivost je uporediva za boskalid, bifentrin i trifloksistrobin tj. osetljivost prema boskalidu i bifentrinu u MS² režimu je otprilike upola manja nego osetljivost u MS¹ režimu, dok je osetljivost prema trifloksistrobinu u MS² režimu skoro ¾ manja od osetljivosti u MS¹ režimu. Za razliku od njih osetljivost prema pirimetanilu tj. ciprodinilu je oko 1000, tj. 2000 manja od osetljivosti u MS¹ režimu.

Korelacija između odziva pesticida i njihove koncentracije u kori otvara mogućnost za (semi)kvantitativnu analizu kore; zbog veće osetljivosti, pogodnije je da se analiza vrši u MS¹ režimu.

Tabela 4.3-9 Parametri linearnosti između odziva pesticida i njihove koncentracije u kori (koncentracioni opseg 0,00 – 0,75 mgkg⁻¹)

	Pirimetamil	Ciprodinil	Boskalid	Trifloksistrobin	Bifentrin
Matriks: Zlatni Delišes					
Parametar krive	Kriva u MS ¹ režimu				
Nagib ($\times 10^8$)	1,185	2,083	0,831	7,219	0,303
Odsečak ($\times 10^7$)	2,011	1,415	1,234	7,655	1,342
Koeficijent korelacije, R ²	0,9488	0,9729	0,9968	0,9826	0,9854
Parametar krive	Kriva u MS ² režimu				
Nagib ($\times 10^5$)	1,204	1,059	453,33	1800,02	156,96
Odsečak ($\times 10^4$)	2,93	3,30	392,36	1196,4	252,31
Koeficijent korelacije, R ²	0,8269	0,8948	0,9849	0,9589	0,9356
Matriks: Ajdared					
Parametar krive	Kriva u MS ¹ režimu				
Nagib ($\times 10^8$)	1,855	2,535	0,935	7,852	0,508
Odsečak ($\times 10^7$)	1,018	1,151	1,008	6,525	0,995
Koeficijent korelacije, R ²	0,9778	0,9785	0,9985	0,9889	0,9896
Parametar krive	Kriva u MS ² režimu				
Nagib ($\times 10^5$)	1,315	1,254	389,95	1545,28	183,56
Odsečak ($\times 10^4$)	2,05	2,58	286,14	1068,5	182,34
Koeficijent korelacije, R ²	0,8558	0,9056	0,9779	0,9626	0,9450
Matriks: Greni Smit					
Parametar krive	Kriva u MS ¹ režimu				
Nagib ($\times 10^8$)	2,056	2,996	1,018	7,565	0,785
Odsečak ($\times 10^7$)	0,988	1,544	0,996	6,028	0,554
Koeficijent korelacije, R ²	0,9442	0,9625	0,9896	0,9956	0,9874
Parametar krive	Kriva u MS ² režimu				
Nagib ($\times 10^5$)	1,954	1,899	486,63	2053	172,55
Odsečak ($\times 10^4$)	0,912	1,216	288,11	1154,21	118,04
Koeficijent korelacije, R ²	0,8998	0,9141	0,9784	0,9799	0,9553

Tačnost i preciznost. Tačnost metode MET-DI-R za testirane analite u kori Zlatnog Delišesa, Ajdareda i Greni Smita je između 45 i 90 % (Tabela 4.3-10). Nema značajnije promene u tačnosti sa promenom testirane koncentracije analita. Tačnost metode za koru Zlatnog Delišesa se kreće od 46 % za bifentrin do 88 % za trifloksistrobin, za koru Ajdareda se kreće od 50 % za bifentrin do 83 % za trifloksistrobin, a za koru Greni Smita od 54 % za bifentrin do 78 % za boskalid. Uočava se manji prinos bifentrina iz svakog matriksa, što se može objasniti upotrebom vode kao primarnog ekstrakcionog sredstva pesticida iz kore. Zbog najmanje polarnosti, u odnosu na ostale analite, bifentrin se u najmanjoj meri ekstrahuje. Ponovljivost metode je prihvatljiva i kreće se u opsegu RSD od 9 do 21 %.

Tabela 4.3-10 Tačnost metode MET-DI-R za koru Zlatnog Delišesa, Ajdareda i Greni Smita

Koncentracija, mg kg ⁻¹		Pirimetanil	Ciprodinil	Boskalid	Trifloksistrobin	Bifentrin
		Zlatni Delišes				
0,05	Tačnost, %	68,00	74,25	77,56	72,53	46,84
	Ponovljivost, %	14,53	13,87	11,88	14,44	16,90
0,75	Tačnost, %	74,36	63,20	62,00	88,56	58,52
	Ponovljivost, %	11,85	9,57	15,55	11,18	12,55
Srednja tačnost, %*		71,18	68,73	69,78	80,55	52,68
Srednja ponovljivost, %**		0,06	0,11	0,16	0,14	0,16
		Ajdared				
0,05	Tačnost, %	69,55	59,00	78,65	83,25	50,55
	Ponovljivost, %	17,36	13,36	9,98	13,38	11,18
0,75	Tačnost, %	66,28	65,05	82,43	71,22	58,52
	Ponovljivost, %	12,22	18,00	14,42	10,89	9,63
Srednja tačnost, %		67,92	62,03	80,54	77,24	54,54
Srednja ponovljivost, %		0,03	0,07	0,03	0,11	0,10
		Greni Smit				
0,05	Tačnost, %	59,36	62,38	78,00	69,37	53,85
	Ponovljivost, %	15,55	10,11	12,22	18,35	21,36
0,75	Tačnost, %	67,55	75,82	70,05	66,58	63,12
	Ponovljivost, %	12,28	8,88	15,89	12,54	12,12
Srednja tačnost, %		63,46	69,10	74,03	67,98	58,49
Srednja ponovljivost, %		0,09	0,14	0,08	0,03	0,11

*Suma tačnosti za 3 koncentracije podeljena sa brojem koncentracija

** Koeficijent varijacije tačnosti za 3 koncentracije

Granice detekcije metode. Uzorci kore su spajkovani sledećim koncentracijama: 0,05; 0,10; 0,20; 0,50 i 0,75 mg po kg kore, koje korespondiraju koncentracijama od 0,005; 0,010; 0,020; 0,050 i 0,075 mg po kg ploda, s obzirom da kora doprinosi masi ploda sa oko 10 %. S obzirom da se pesticidi mogu pouzdano identifikovati i u spajkovanom standardu sa najmanjom koncentracijom pesticida (0,05 mgkg⁻¹ kore), ova koncentracija se može usvojiti kao granica detekcije metode MET-DI-R.

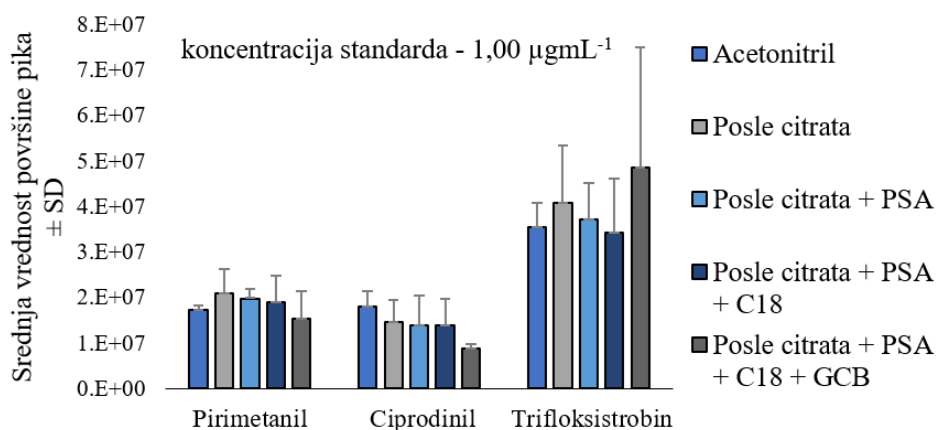
4.3.3 Rezultati razvoja metode MET-LI-R

4.3.3.1 Analiza analitičkih standarda pesticida tretiranih citratnim *QuEChERS*-om

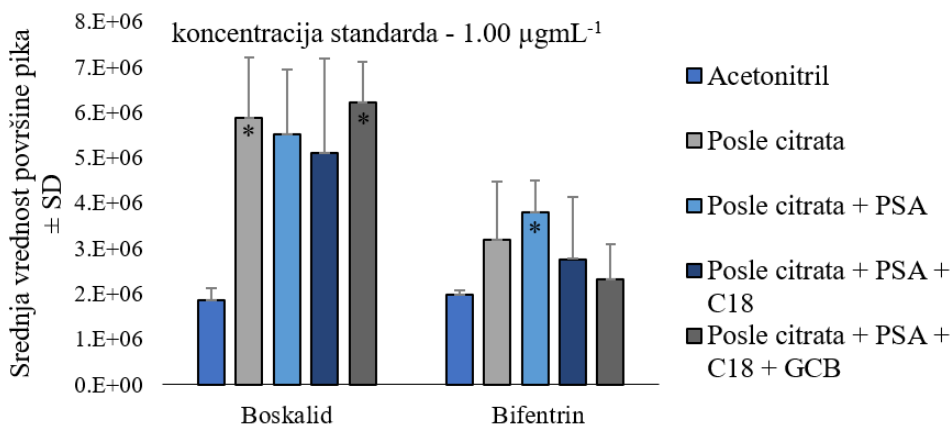
Statističko poređenje odziva pirimetanila, ciprodinila i trifloksistrobina u netretiranim standardima i standardima tretiranim *QuEChERS*-om koncentracije $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Slika 4.3-25 i Slika 4.3-26) pokazuje da značajne razlike ne postoje, odnosno da pri ovoj koncentraciji *QuEChERS* procedura nema uticaja na polaznu količinu datih pesticida.

Poređenje merenih odziva standarda boskalida koncentracije $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ pokazuje da postoji statistički značajno povećanje odziva ovog pesticida u standardu nakon tretiranja citratnim solima i standardu nakon celokupne procedure sa dSPE sa PSA+C18+GCB, u odnosu na netretirani standard (Slika 4.3-26). Statistički značajno povećanje odziva bifentrina, pri istoj koncentraciji, uočava se u standardu tretiranom celokupnom *QuEChERS* procedurom kada se za korak dSPE koristi PSA.

U svim standardima boskalida se uočava porast odziva u odnosu na netretirani standard, s tim što povećanje odziva nije statistički značajno kod svih *QuEChERS* procedura. S obzirom da se povećan odziv javlja odmah nakon tretiranja standarda citratnim solima, bez tretiranja sorbentima za prečišćavanje, može se zaključiti da uzrok promenjenog odziva leži u prvom koraku *QuEChERS* procedure. Za bifentrin se takođe uočava porast odziva u odnosu na netretirani standard, ali pretežno on nije statistički značajan, tako da se može zaključiti da *QuEChERS* procedura u manjoj meri utiče na polaznu količinu bifentrina.



Slika 4.3-25 Izmereni odzivi pirimetanila, ciprodinila i trifloksistrobina u analitičkom standardu koncentracije $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ pre i nakon tretiranja citratnim *QuEChERS*-om

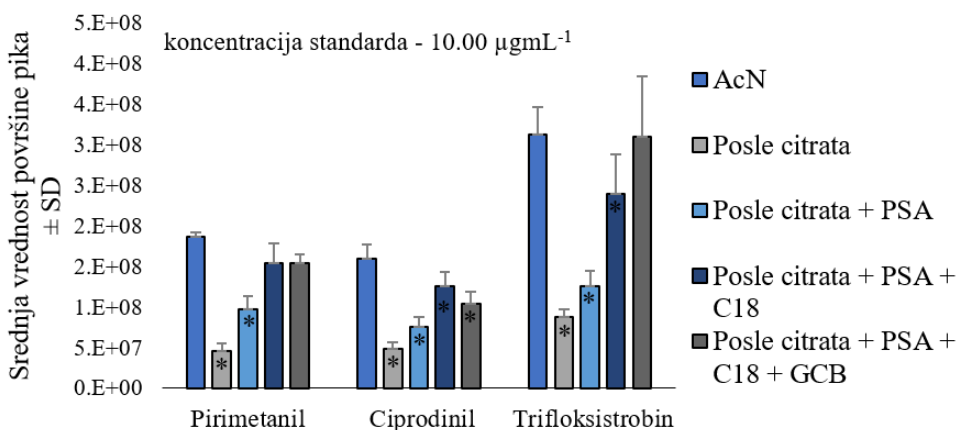


Slika 4.3-26 Izmereni odzivi boskalida i bifentrina u analitičkom standardu koncentracije 1,00 µg mL⁻¹ pre i nakon tretiranja citratnim *QuEChERS*-om; *statistički značajna razlika između odziva tretiranog i netretiranog standarda

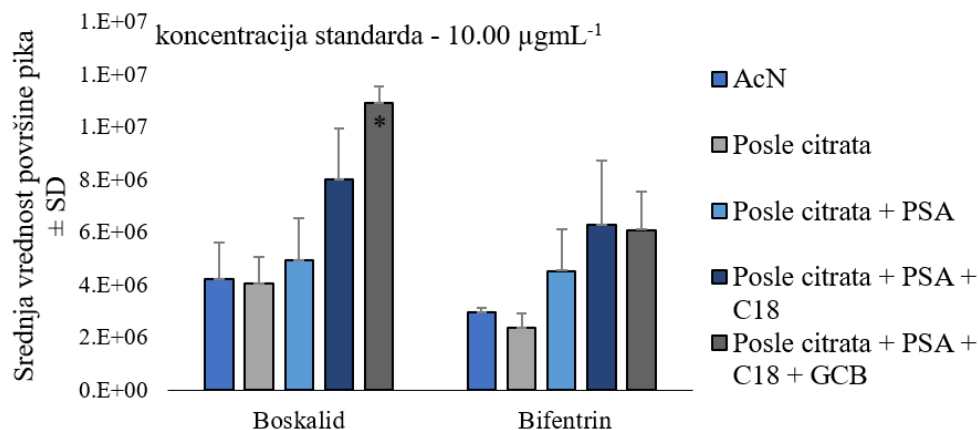
Statističko poređenje odziva pirimetanila, ciprodinila i trifloksistrobina u netretiranim standardima i standardima tretiranim *QuEChERS*-om koncentracije 10,00 µg mL⁻¹ (Slika 4.3-27 i Slika 4.3-28) pokazuje da značajne razlike postoje. Uočava se statistički značajno smanjenje odziva pirimetanila u standardima tretiranim citratnim solima i celokupnom *QuEChERS* procedurom (PSA varijanta), ciprodinila u standardima tretiranim svim varijantama *QuEChERS*-a i trifloksistrobina u standardima tretiranim većinom varijanti (Slika 4.3-27).

Što se tiče standarda boskalida, statistički značajan porast signala uočava se u standardu tretiranom celokupnom *QuEChERS* procedurom (varijanta PSA+C18+GCB), dok se odzivi standarda bifentrina statistički značajno ne menjaju (Slika 4.3-28).

Može se zaključiti da se nakon *QuEChERS* procedure manifestuje pozitivan matriks efekat na boskalid, negativan matriks efekat na pirimetanil, ciprodinil i trifloksistrobin i da praktično nema efekta na bifentrin.



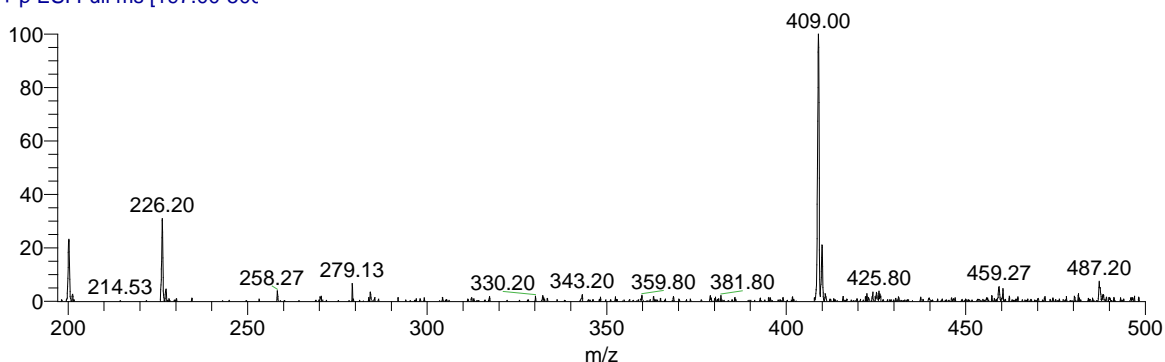
Slika 4.3-27 Izmereni odzivi pirimetanila, ciprodinila i trifloksistrobina u analitičkom standardu koncentracije 10,00 µg mL⁻¹ pre i nakon tretiranja citratnim *QuEChERS*-om; *statistički značajna razlika između odziva tretiranog i netretiranog standarda



Slika 4.3-28 Izmereni odzivi boskalida i bifentrina u analitičkom standardu koncentracije 10,00 µg mL⁻¹ pre i nakon tretiranja citratnim *QuEChERS*-om; *statistički značajna razlika između odziva tretiranog i netretiranog standarda

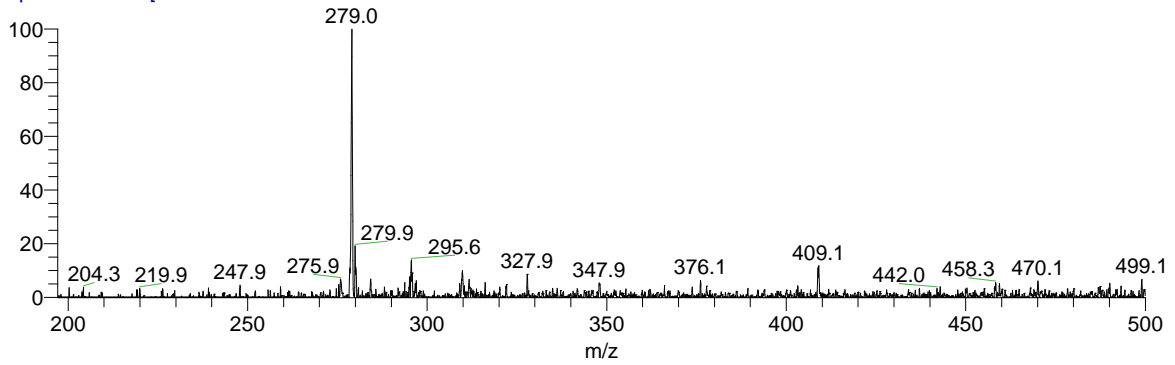
Eventualno objašnjenje za ovakve efekte može se dati posmatranjem LOOP spektara ispitivanih standarda, kao i LOOP spektara acetonitrila koji je tretiran *QuEChERS* procedurom (*reagent blank*). Poređenje spektra netretiranog standarda (Slika 4.3-29) sa spektrima tretiranih standarda ukazuje na prisustvo novih jona u spektrima tretiranih standarda (Slika 4.3-31, Slika 4.3-33, Slika 4.3-35, Slika 4.3-37). Ovi joni se pretežno javljaju na *m/z* vrednostima većim od 420. Posmatranjem spektara netretiranog i tretiranog acetonitrila (Slika 4.3-30, Slika 4.3-32, Slika 4.3-34, Slika 4.3-36, Slika 4.3-38) može se zaključiti da joni pretežno potiču iz sastavnih komponenti *QuEChERS*a, mada se u spektru standarda pesticida tretiranog citratnim solima (Slika 4.3-31) može uočiti jon *m/z* 431 koji predstavlja adukt trifloksistrobina i jona natrijuma. Takođe jon *m/z* 459, koji se najintenzivniji u spektru standarda tretiranog *QuEChERS* procedurom (varijanta PSA) (Slika 4.3-33), a ne javlja se u ostalim spektrima, može predstavljati adukt nekog od pesticida sa komponentama *QuEChERS*a.

Rastvor 1 #310-313 RT: 2.91-2.93 AV: 4 SB: 22 0.07-0.26 NL: 2.81E6
T: + p ESI Full ms [197.00-500]



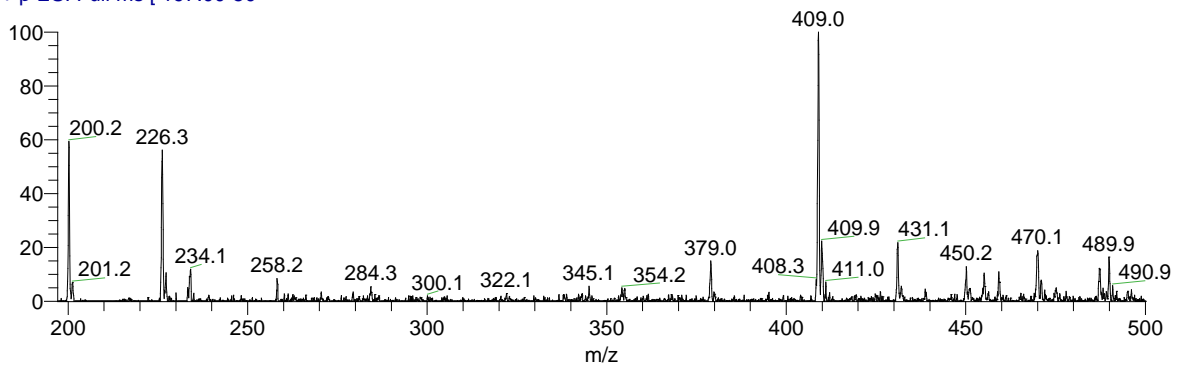
Slika 4.3-29 *LOOP* spektar netretiranog acetonitrilnog standarda smeše 5 pesticida (10 µg mL⁻¹) kao rezultat oduzimanja spektra pozadine; protok formijantnog pufera=25 µLmin⁻¹

Blank AcN_0 #100-105 RT: 0.88-0.92 AV: 6 SB: 6 0.01-0.06 NL: 5.04E5
T: + p ESI Full ms [197.00-50



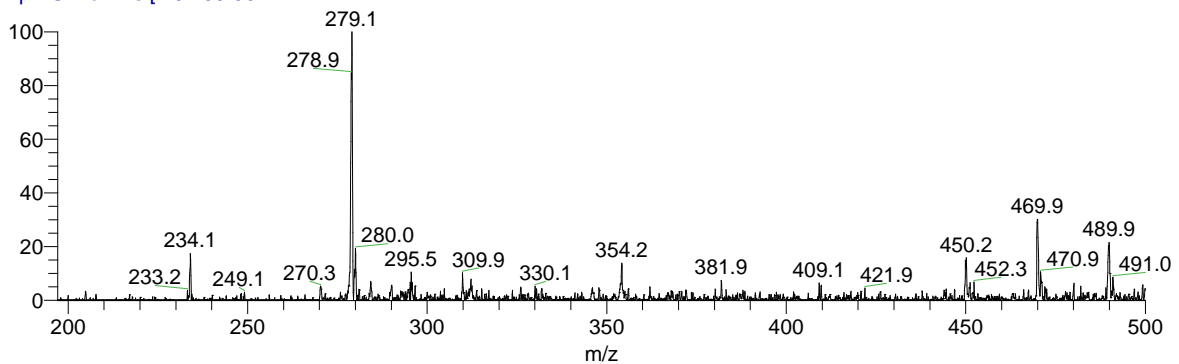
Slika 4.3-30 LOOP spektar netretiranog acetonitrila kao rezultat oduzimanja spektra pozadine; protok formijatnog pufera=25 μLmin^{-1}

10,00_5 #270-274 RT: 2.41-2.45 AV: 5 SB: 10 0.03-0.11 NL: 1.18E6
T: + p ESI Full ms [197.00-50



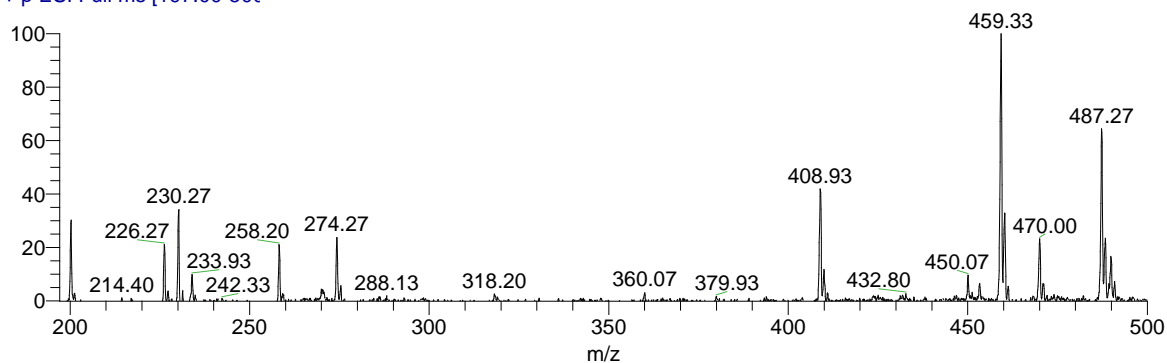
Slika 4.3-31 LOOP spektar acetonitrilnog standarda smeše 5 pesticida ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) kao rezultat oduzimanja spektra pozadine nakon tretiranja citratnim solima; protok formijatnog pufera=25 μLmin^{-1}

Blank AcN_1 #100-102 RT: 0.88-0.90 AV: 3 SB: 6 0.01-0.05 NL: 1.20E6
T: + p ESI Full ms [197.00-50



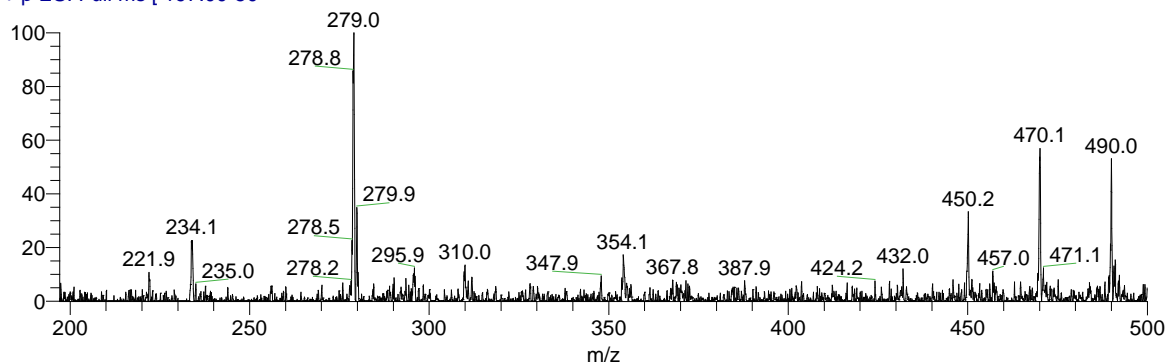
Slika 4.3-32 LOOP spektar acetonitrila kao rezultat oduzimanja spektra pozadine nakon tretiranja citratnim solima; protok formijatnog pufera=25 μLmin^{-1}

Rastvor 2 #336-345 RT: 2.99-3.07 AV: 10 SB: 18 0.06-0.21 NL: 2.42E6
T: + p ESI Full ms [197.00-500]



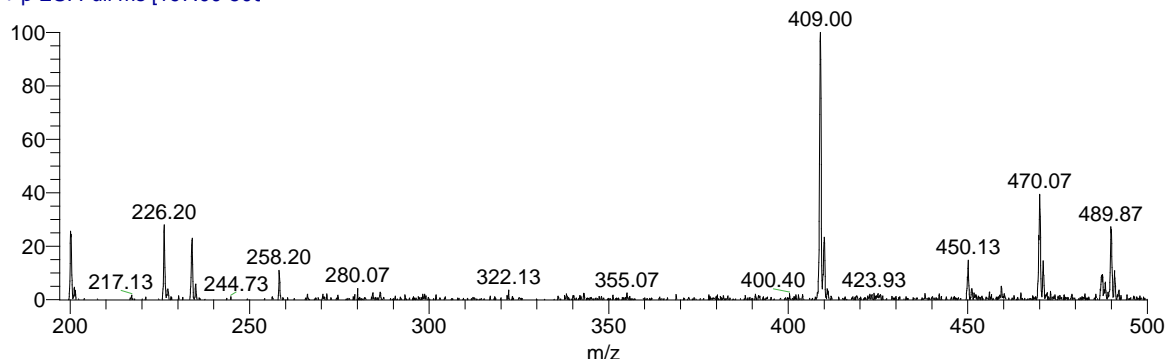
Slika 4.3-33 LOOP spektar acetonitrilnog standarda smeše 5 pesticida ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) kao rezultat oduzimanja spektra pozadine nakon tretiranja *QuEChERS* procedurom (varijanta PSA); protok formijalnog pufera= $25 \mu\text{L min}^{-1}$

Blank AcN_2 #95-97 RT: 0.84-0.85 AV: 3 SB: 4 0.02-0.04 NL: 6.60E5
T: + p ESI Full ms [197.00-500]



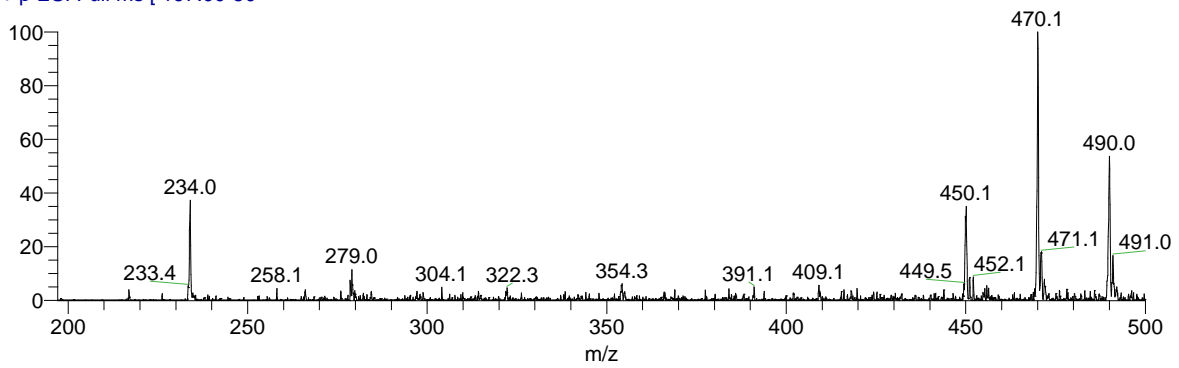
Slika 4.3-34 LOOP spektar acetonitrila kao rezultat oduzimanja spektra pozadine nakon tretiranja *QuEChERS* procedurom (varijanta PSA); protok formijalnog pufera= $25 \mu\text{L min}^{-1}$

Rastvor 3 #324-330 RT: 2.89-2.94 AV: 7 SB: 20 0.04-0.21 NL: 2.91E6
T: + p ESI Full ms [197.00-500]



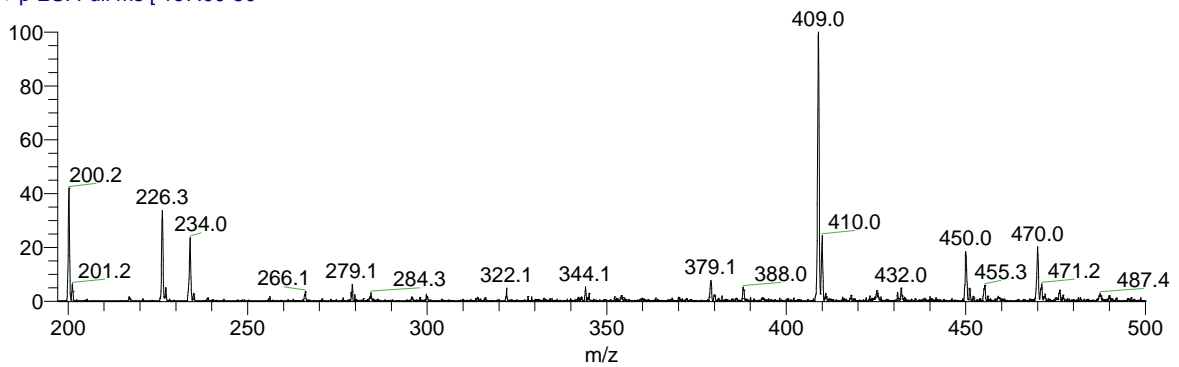
Slika 4.3-35 LOOP spektar acetonitrilnog standarda smeše 5 pesticida ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) kao rezultat oduzimanja spektra pozadine nakon tretiranja *QuEChERS* procedurom (varijanta PSA+C18); protok formijalnog pufera= $25 \mu\text{L min}^{-1}$

Blank AcN_3 #105-108 RT: 0.92-0.95 AV: 4 SB: 4 0.02-0.05 NL: 2.66E6
T: + p ESI Full ms [197.00-50



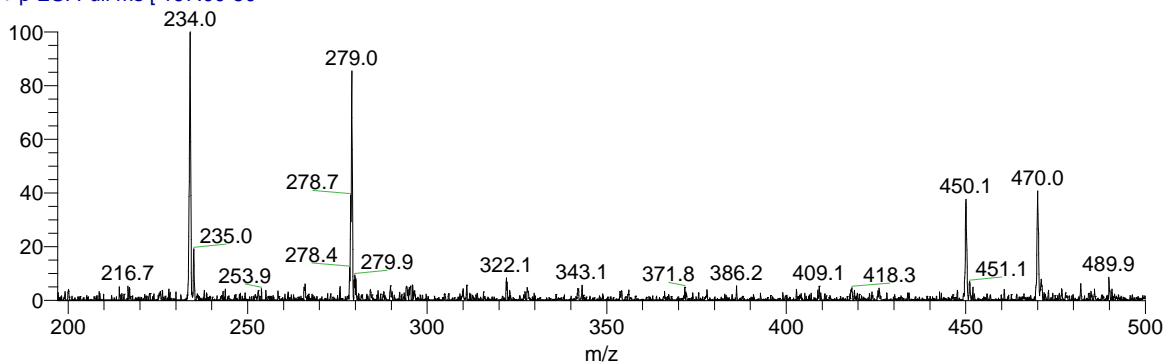
Slika 4.3-36 LOOP spektar acetonitrila kao rezultat oduzimanja spektra pozadine nakon tretiranja *QuEChERS* procedurom (varijanta PSA+C18); protok formijatnog pufera=25 μLmin^{-1}

10,00_4a #274-278 RT: 2.41-2.45 AV: 5 SB: 5 0.05-0.08 NL: 3.73E6
T: + p ESI Full ms [197.00-50



Slika 4.3-37 LOOP spektar acetonitrilnog standarda smeše 5 pesticida (10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) kao rezultat oduzimanja spektra pozadine nakon tretiranja *QuEChERS* procedurom (varijanta PSA+C18+GCB); protok formijatnog pufera=25 μLmin^{-1}

Blank AcN_4 #93-96 RT: 0.82-0.85 AV: 4 SB: 5 0.01-0.04 NL: 6.00E5
T: + p ESI Full ms [197.00-50



Slika 4.3-38 LOOP spektar acetonitrila kao rezultat oduzimanja spektra pozadine nakon tretiranja *QuEChERS* procedurom (varijanta PSA+C18+GCB); protok formijatnog pufera=25 μLmin^{-1}

4.3.3.2 Analiza ekstrakata jabuke – opšta zapažanja

Slika 4.3-39 ilustruje EN15662 proceduru na primeru kore Zlatnog Delišesa, Ajdareda i Greni Smita. Nakon koraka ekstrakcije acetonitrilom (1) i dodata citratnih soli (2) dolazi do jasnog izdvajanja acetonitrilne faze iznad čvrste faze ekstrakta. Najočiglednija razlika među ekstraktima kore je njihova obojenost, koja potiče od različitog udela antocijana i karotenoida u različitim sortama jabuka (prilog, Poglavlje 8.1, str. 297). Nakon koraka *dSPE* sa PSA kao sorbentom dolazi do gubitka crvene boje ekstrakta kore Ajdareda, verovatno zbog promene pH vrednosti ekstrakta i promene hemijske forme prisutnih antocijana. Uočava se da dolazi do delimične sorpcije pigmentata na PSA (4).

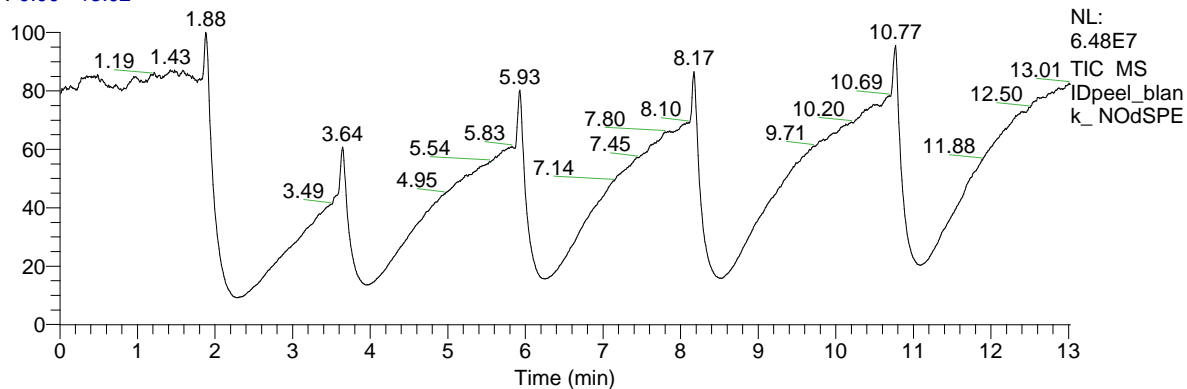


Slika 4.3-39 QuEChERS procedura (EN 15662) kroz korake: kora nakon ekstrakcije acetonitrilom (1); kora nakon sukcesivnog dodatka citratnih soli i mućkanja (2); ekstrakti kore nakon centrifugiranja (ekstrakt spreman za *dSPE*) (3); ekstrakti kore nakon koraka *dSPE* sa PSA (4); ZD – Zlatni Delišes; ID – Ajdared; GS – Greni Smit

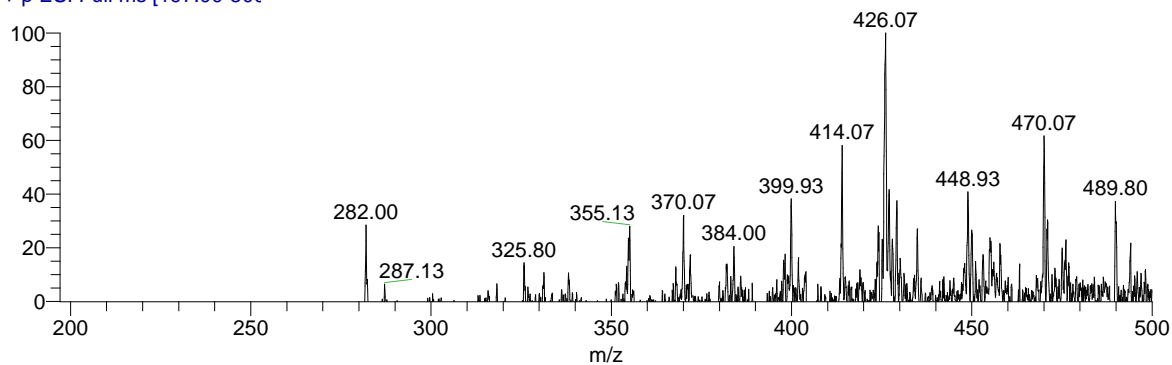
Blank ekstrakti kore bez koraka prečišćavanja postupkom *dSPE*. Slika 4.3-40 - Slika 4.3-42 prikazuju *total ion* hronograme (m/z 197-500) sa 5 uzastopnih injekcija blank ekstrakta kore Ajdareda, Zlatnog Delišesa i Greni Smita, pripremljenog prema EN 15662 proceduri bez koraka *dSPE*. S obzirom da pri protoku pufera brzinom od $50 \mu\text{Lmin}^{-1}$ postoji veća zastupljenost primesnih jona iz sistema (*background* joni), na svim hronogramima se uočava visoka bazna linija. Maksimumi pikova koji potiču od injekcija ekstrakta su praktično najniže tačke na hronogramu. Inverzija u obliku pikova postoji, jer se nakon injekcije ekstrakta kore zastupljenost *background* jona postepeno smanjuje, a zastupljenost jona iz ekstrakta postepeno raste do maksimalne vrednosti koja odgovara minimalnoj zastupljenosti *background* jona (minimum na hronogramu).

Maseni spektri koji su prikazani na slikama 4.3-40 – 4.3-42 predstavljaju prosek od nekoliko *scan*-a u oblasti maksimuma poslednjeg pika (ret.vreme \approx 11-12 min) od kojeg je oduzet uprosečen spektar pozadine sa početka analize (bazna linija, ret.vreme \approx 0,5 min). Rezultujući spektri sadrže jone koji potiču isključivo iz ekstrakta jabuke. Spektri ekstrakata svih sorti pokazuju da su joni iz ekstrakta pretežno prisutni u oblasti iznad m/z 280 i da najveća zastupljenost ovih jona postoji u ekstraktu kore Zlatnog Delišesa (Slika 4.3-41), a najmanja u ekstraktu kore Greni Smita (Slika 4.3-42).

RT: 0.00 - 13.02

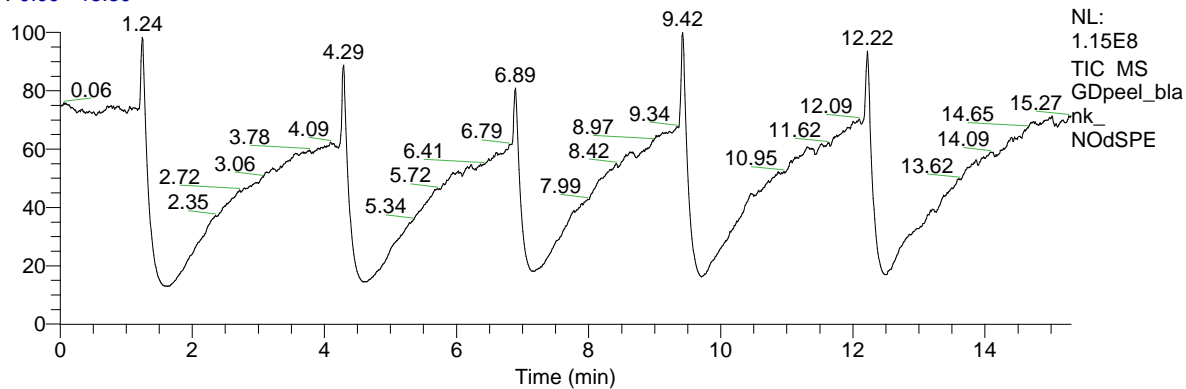


IDpeel_blank_NOdSPE #856-868 RT: 8.45-8.58 AV: 13 SB: 109 0.05-1.04 NL: 3.39E4
T: + p ESI Full ms [197.00-500]



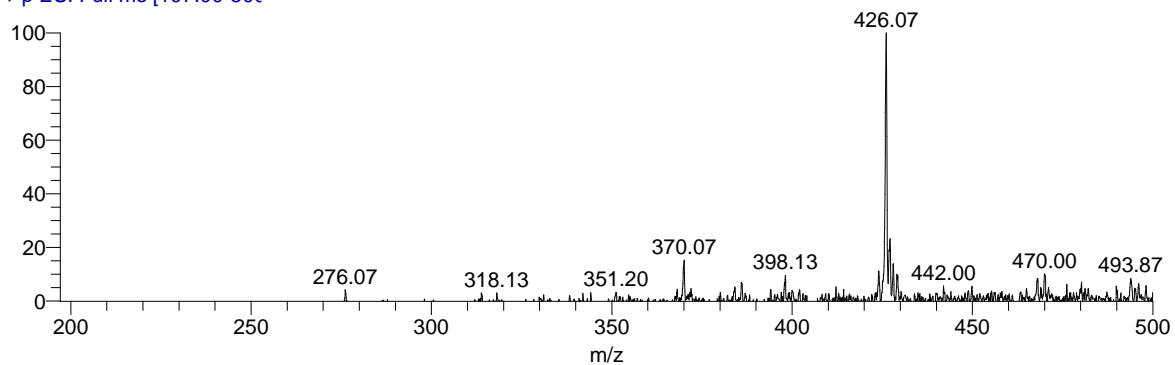
Slika 4.3-40 Total ion hronogram sa 5 uzastopnih injekcija (slika gore) i background subtracted maseni spektar (prosek 13 scan-a) (slika dole) blank ekstrakta kore Ajdareda prema EN15662 proceduri bez koraka dSPE; protok pufera $50 \mu\text{Lmin}^{-1}$

RT: 0.00 - 15.30



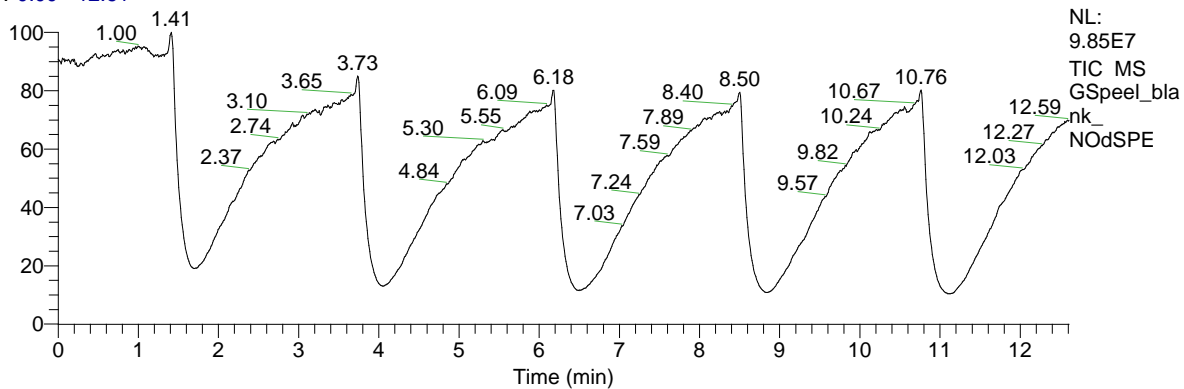
GDpeel_blank_NodSPE #1331-1341 RT: 12.45-12.55 AV: 11 SB: 22 0.10-0.28 NL: 2.23E5

T: + p ESI Full ms [197.00-500]



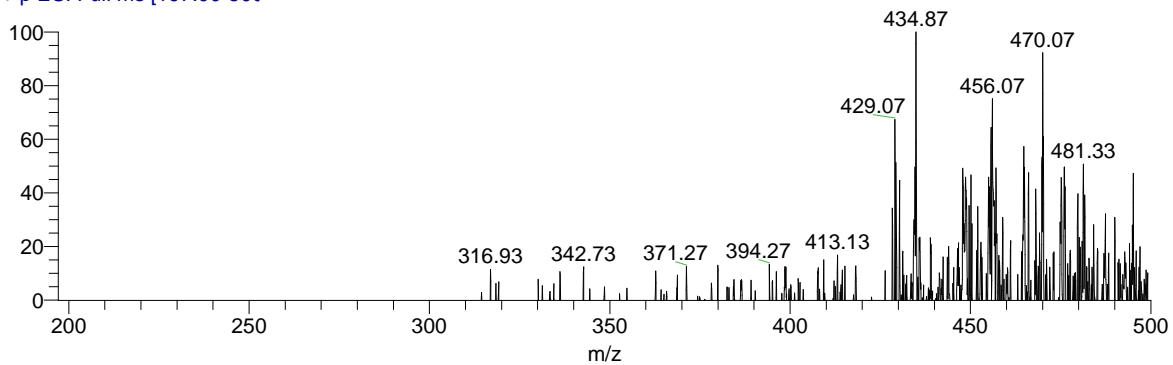
Slika 4.3-41 Total ion hronogram sa 5 uzastopnih injekcija (slika gore) i background subtracted maseni spektar (prosek 11 scan-a) (slika dole) blank ekstrakta kore Zlatnog Delišesa prema EN15662 proceduri bez koraka dSPE; protok pufera 50 μLmin^{-1}

RT: 0.00 - 12.61



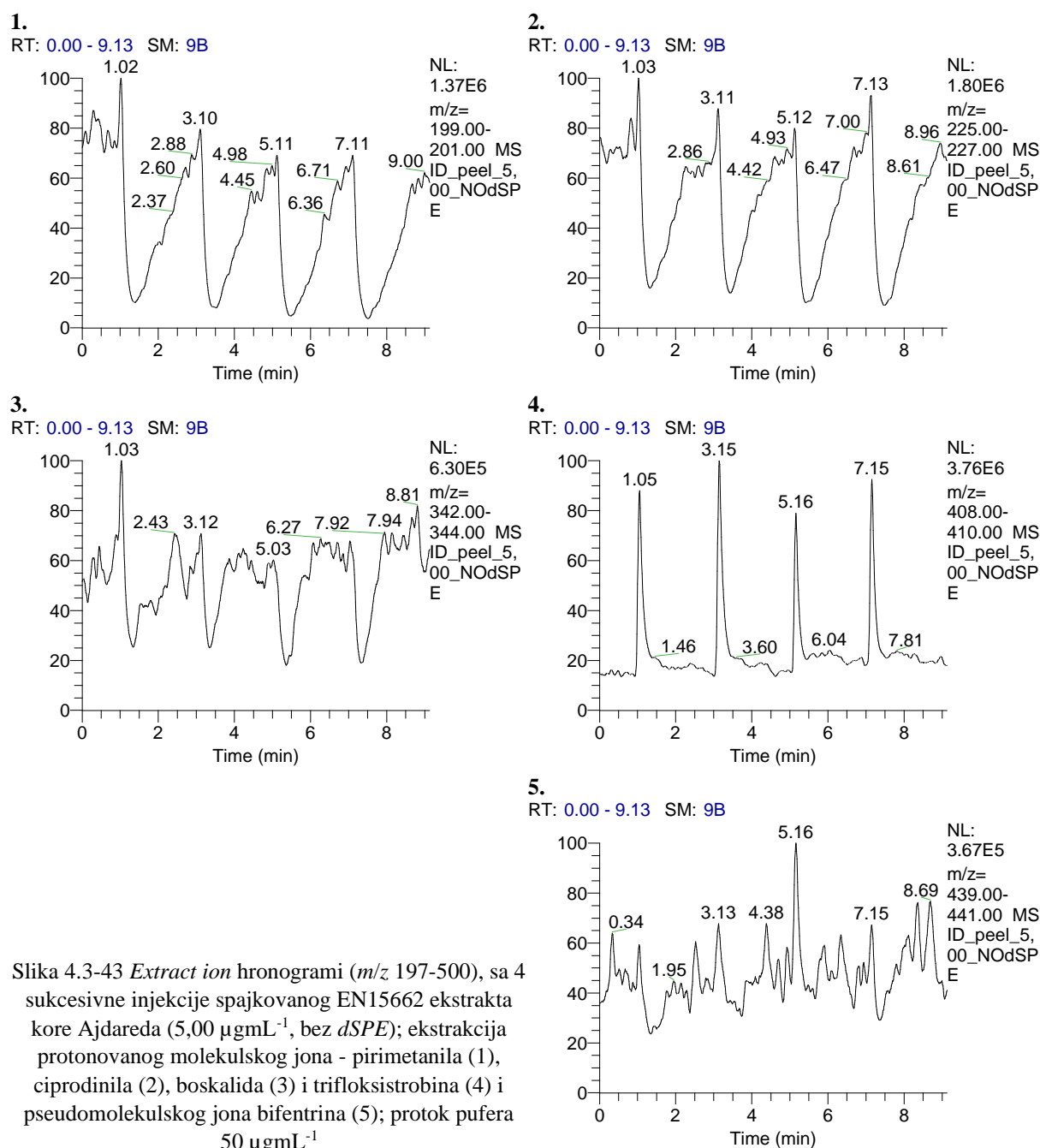
GS peel_blank_NOdSPE #1173-1187 RT: 11.04-11.19 AV: 15 SB: 35 0.06-0.37 NL: 9.55E3

T: + p ESI Full ms [197.00-500]



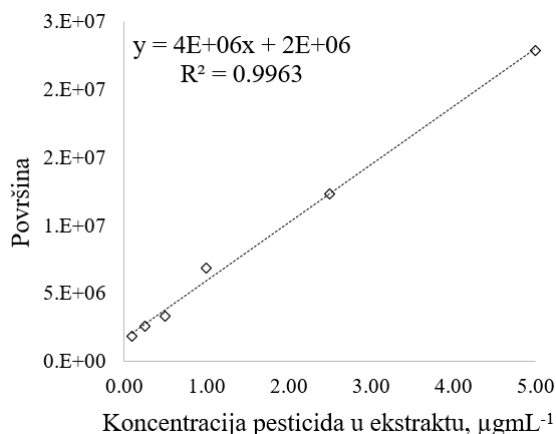
Slika 4.3-42 *Total ion* hronogram sa 5 uzastopnih injekcija (slika gore) i *background subtracted* maseni spektar (prosek 15 *scan*-a) (slika dole) blank ekstrakta kore Greni Smita prema EN15662 proceduri bez koraka dSPE; protok pufera 50 μLmin^{-1}

Post-extraction fortification standardi bez koraka prečišćavanja postupkom *dSPE*. Analiza spajkovanih ekstrakata kora (Slika 4.3-43) pokazuje da je u neprečišćenom ekstraktu moguće jasno identifikovati jedino pikove trifloksistrobina. Pikovi pirimetanila, ciprodinila, boskalida i bifentrina nije moguće identifikovati ni u ekstraktima sa manjom koncentracijom pesticida, a pikovi trifloksistrobina su jasno vidljivi kroz čitav opseg koncentracija. Površine pikova pesticida vrlo dobro korelišu sa njegovom koncentracijom (Slika 4.3-44).



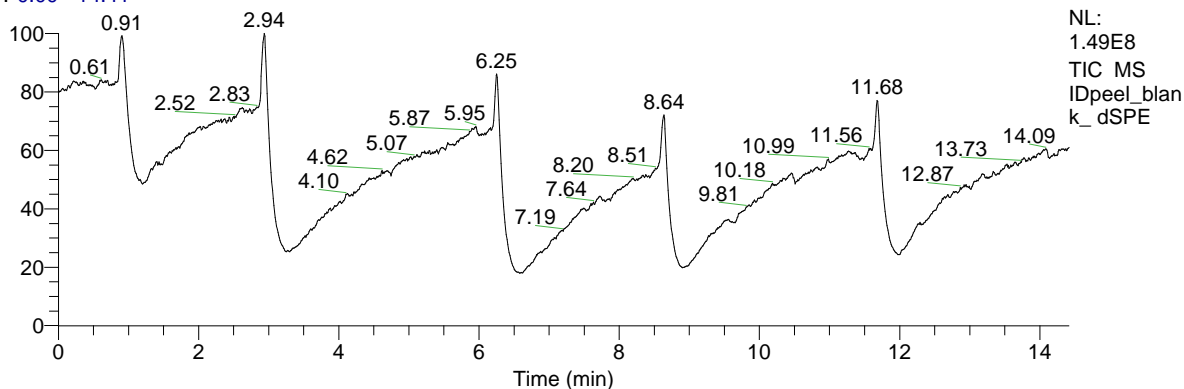
Slika 4.3-43 Extract ion hronogrami (*m/z* 197-500), sa 4 sukcesivne injekcije spajkovanog EN15662 ekstrakta kore Ajdareda ($5,00 \mu\text{g mL}^{-1}$, bez *dSPE*); ekstrakcija protonovanog molekuskog jona - pirimetanila (1), ciprodinila (2), boskalida (3) i trifloksistrobina (4) i pseudomolekuskog jona bifentrina (5); protok pufera $50 \mu\text{g mL}^{-1}$

Slika 4.3-44 Korelacija između odziva trifloksistrobina u ekstraktu kore Ajdareda (EN15662 procedura bez koraka *dSPE*) kroz opseg koncentracija 0,10 – 5,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$

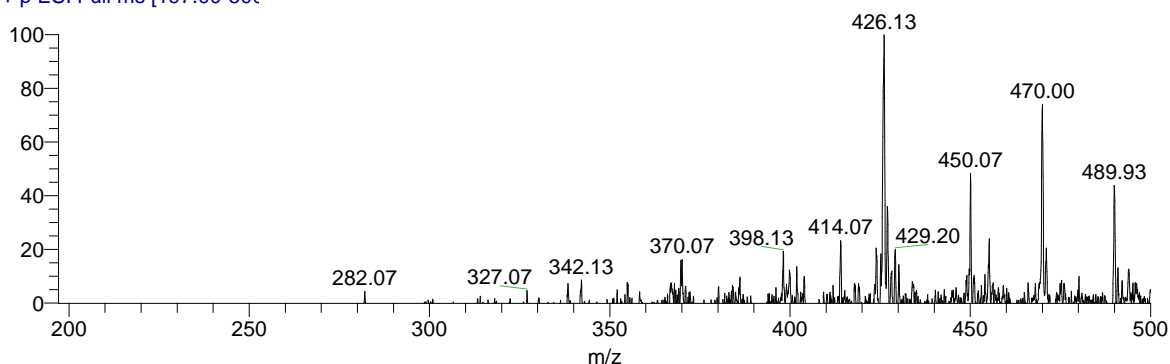


Blank ekstrakti kore sa korakom prečišćavanja postupkom *dSPE*. Maseni spektri sa slika 4.3-45 – 4.3-47 pokazuju da se i u ekstraktu prečišćenom disperznom ekstrakcijom sa PSA joni matriksa javljaju pretežno iznad m/z 280 i da su prisutni praktično isti joni kao u neprečišćenom ekstraktu. Zastupljenost jona je veća u ekstraktu kore Zlatnog Delišeša (Slika 4.3-46) u odnosu na ekstrakte ostale dve sorte (Slika 4.3-45 i Slika 4.3-47).

RT: 0.00 - 14.41

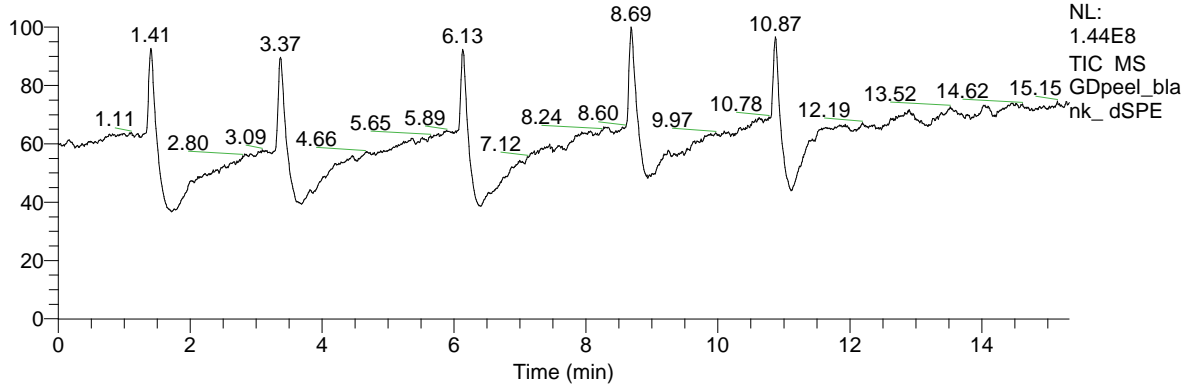


IDpeel_blank_dSPE #976-995 RT: 8.84-9.03 AV: 20 SB: 69 0.10-0.70 NL: 9.98E4
T: + p ESI Full ms [197.00-500]

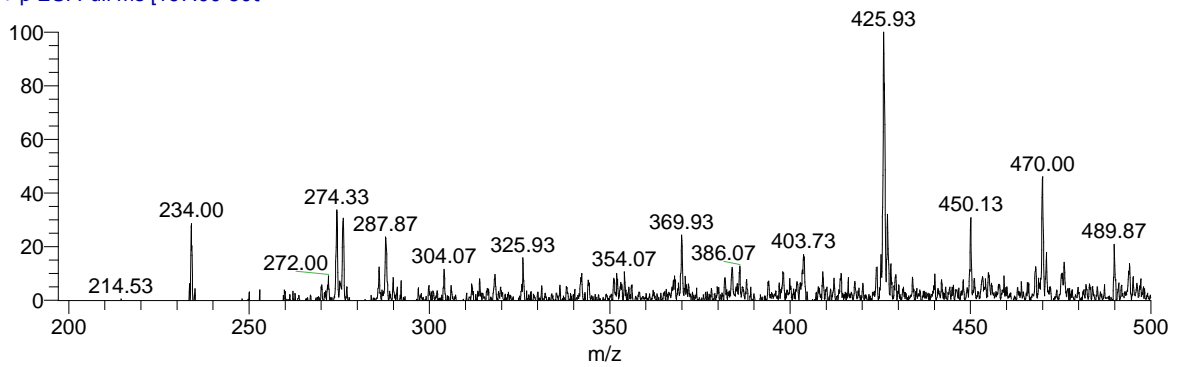


Slika 4.3-45 Total ion hronogram sa 5 uzastopnih injekcija (slika gore) i *background subtracted* maseni spektar (prosek 20 *scan*-a, RT 8,84-9,03) (slika dole) blank ekstrakta kore Ajdareda prema EN15662 proceduri sa korakom *dSPE* (PSA)

RT: 0.00 - 15.32

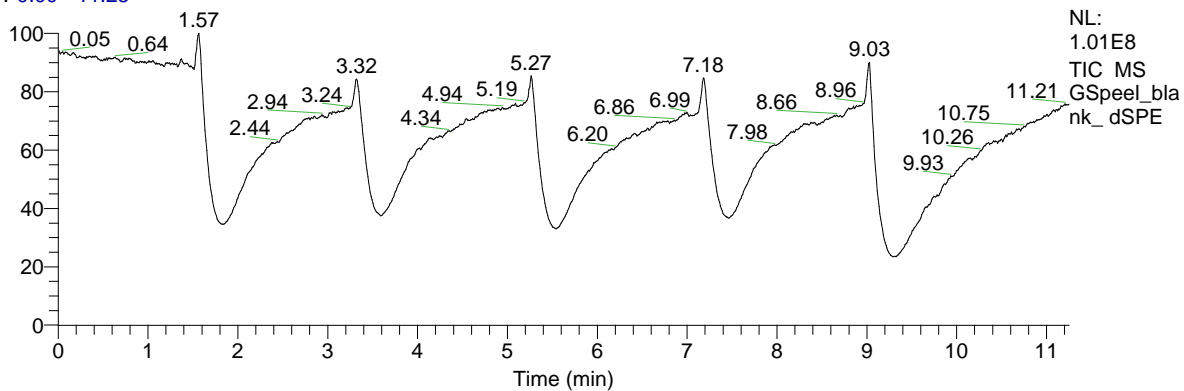


GDpeel_blank_dSPE #1242-1247 RT: 11.08-11.13 AV: 6 SB: 27 0.05-0.28 NL: 3.33E5
T: + p ESI Full ms [197.00-500]



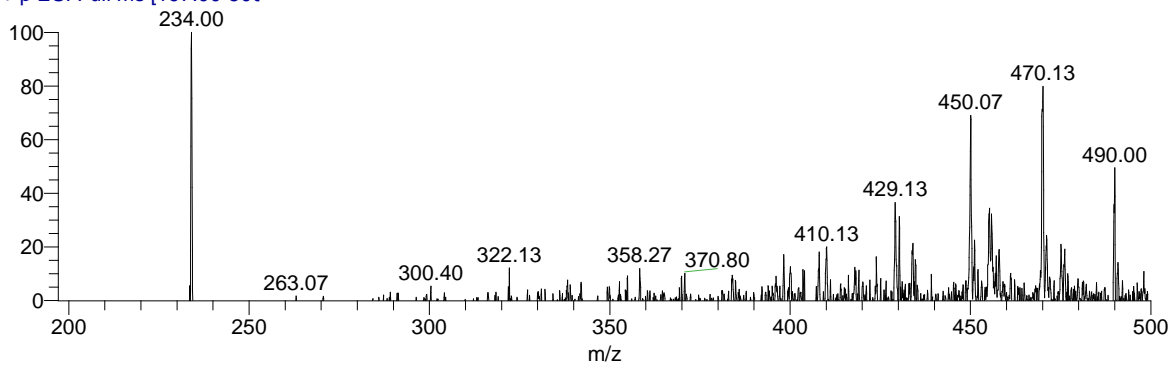
Slika 4.3-46 Total ion hronogram sa 5 uzastopnih injekcija (slika gore) i *background subtracted* maseni spektar (prosek 20 *scan*-a, RT 8,84-9,03) (slika dole) blank ekstrakta kore Zlatnog Delišesa prema EN15662 proceduri sa korakom *dSPE* (PSA)

RT: 0.00 - 11.25



GSpeel_blank_dSPE #1018-1030 RT: 9.24-9.37 AV: 13 SB: 50 0.05-0.49 NL: 5.89E4

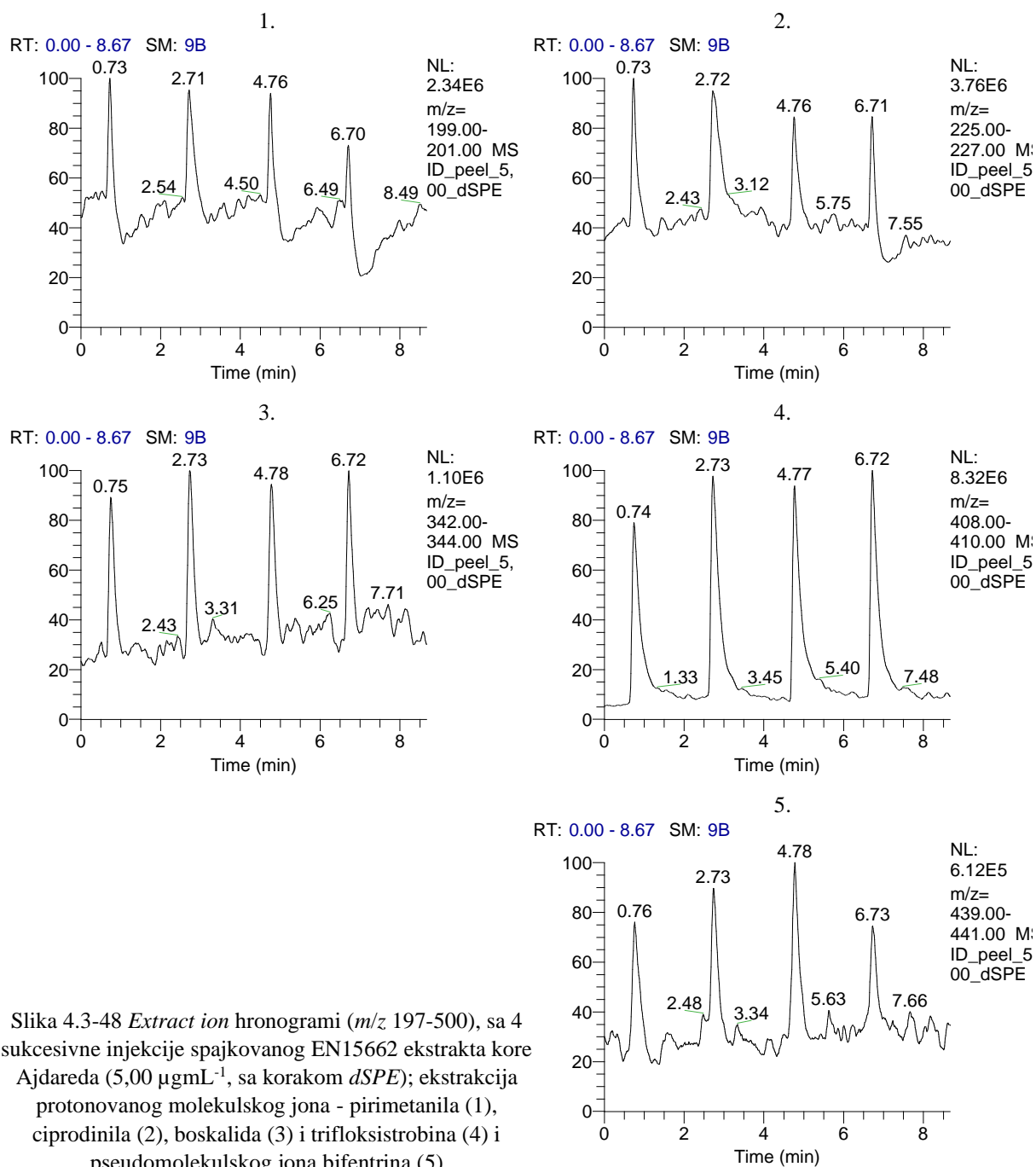
T: + p ESI Full ms [197.00-500]



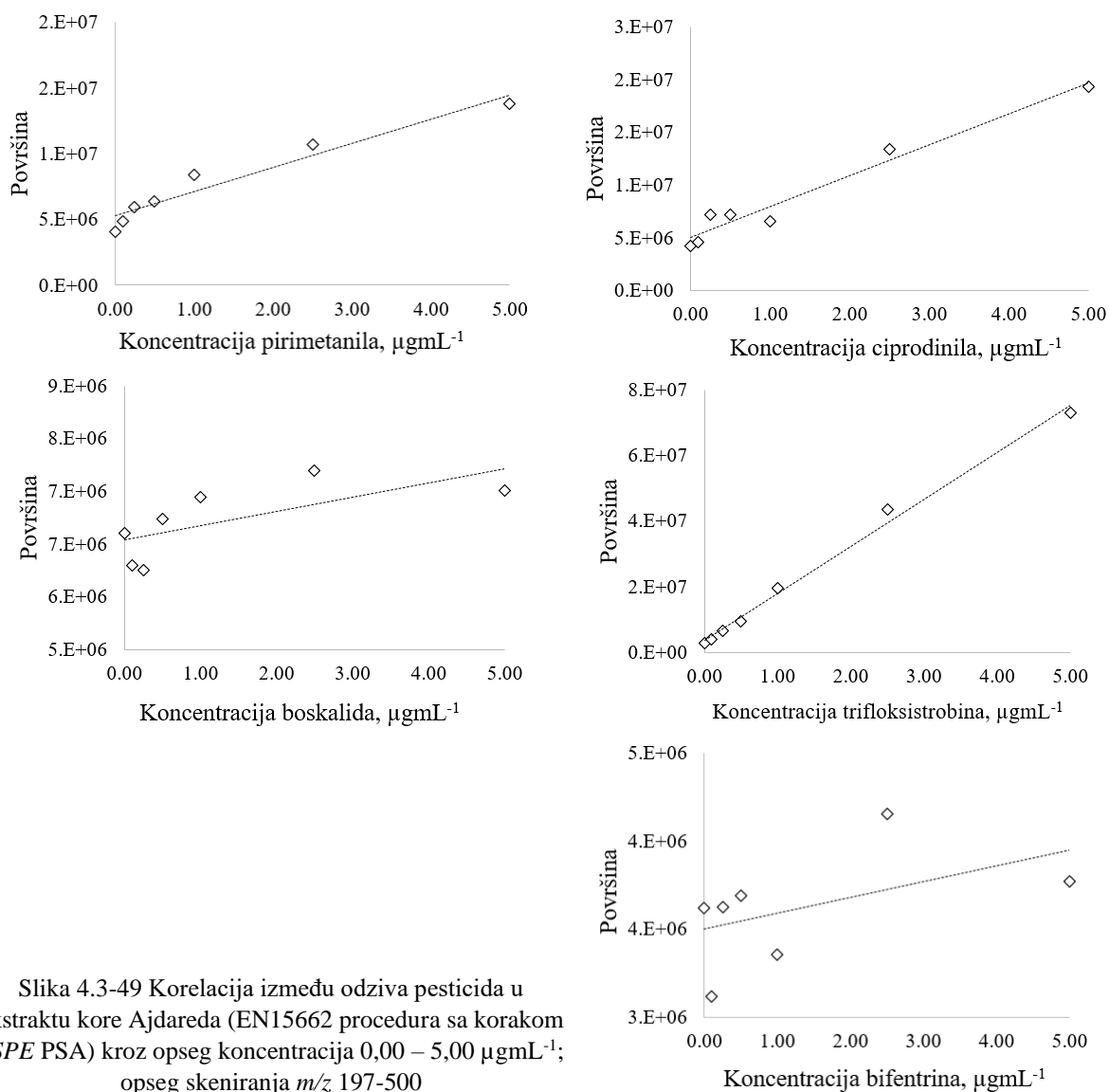
Slika 4.3-47 Total ion hronogram sa 5 uzastopnih injekcija (gore) i *background subtracted* maseni spektar (prosek 20 *scan*-a, RT 8,84-9,03) (dole) blank ekstrakta kore Greni Smita prema EN15662 proceduri sa korakom *dSPE* (PSA)

Post-extraction fortification standardi sa korakom prečišćavanja postupkom *dSPE*.

Hronogrami saslke 4.3-48 pokazuju da se pikovi svih pesticida mogu jasno identifikovati. Pikovi boskalida, trifloksistrobina i bifentrina se mogu identifikovati kroz čitav opseg koncentracija, dok uočavanje i integracija pikova pirimetanila i ciprodinila postaju teški počevši od koncentracije $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ pa prema nižim koncentracijama. Zbog toga su pikovi boskalida, trifloksistrobina i bifentrina autointegrisani (ICIS autointegracija sa *default* parametrima), a pikovi pirimetanila i ciprodinila su integrisani prema prilagođenoj integraciji. Tako dobijene površine pirimetanila, ciprodinila i trifloksistrobina dobro korelišu sa koncentracijom ovih pesticida, dok je korelacija slaba za boskalid i bifentrin (Slika 4.3-49).



Slika 4.3-48 Extract ion hronogrami (*m/z* 197-500), sa 4 sukcesivne injekcije spajkovanog EN15662 ekstrakta kore Ajdareda ($5,00 \mu\text{g mL}^{-1}$, sa korakom *dSPE*); ekstrakcija protonovanog molekuskog jona - pirimetanila (1), ciprodinila (2), boskalida (3) i trifloksistrobina (4) i pseudomolekuskog jona bifentrina (5)



Slika 4.3-49 Korelacija između odziva pesticida u ekstraktu kore Ajdareda (EN15662 procedura sa korakom *dSPE* PSA) kroz opseg koncentracija 0,00 – 5,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$; opseg skeniranja *m/z* 197-500

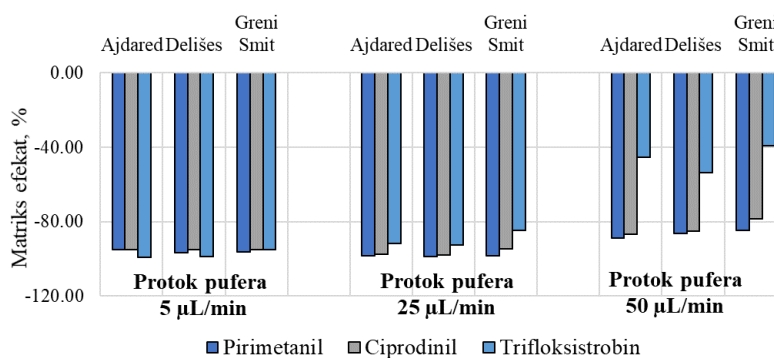
4.3.3.3 Rezultati ispitivanja parametara validacije

Selektivnost. Metoda MET-LI-R je selektivna prema svim ispitivanim analitima. U MS^2 spektrima blank ekstrakata kore sve tri ispitivane sorte jabuka ne uočavaju se fragmenti karakteristični za ispitivane analite.

Odzivi pesticida u ekstraktima i matriks efekat. U tabelama 4.3-11 – 4.3-13 su prikazani parametri dobijeni linearnim fitovanjem merenih odziva pesticida i njihove koncentracije u spajkovanim ekstraktima kore Ajdareda, Zlatnog Delišesa i Greni Smita za merenja sa različitim brzinama protoka pufera.

Dobre karakteristike linearne zavisnosti dve varijable se mogu uočiti preko vrednosti odsečka i nagiba, pri čemu u slučaju dobre korelacije nagib treba da ima veću vrednost od odsečka koji treba da teži nuli, pri tome koeficijent korelacije treba da bude što bliži jedinici. Određivanje boskalida i bifentrina nije moguće, jer se ne uočava praktično nikakva veza između koncentracije ovih pesticida sa odzivom merenim u EN 15662 ekstraktu. Korelacija između odziva i koncentracije pirimetanila, ciprodinila i trifloksistrobina je dobra u ekstraktima svih sorti pri protoku pufera brzinom od $50 \mu\text{L min}^{-1}$, sa koeficijentom korelacije iznad 0,9263. Pri

promeni brzine protoka pufera na 25 ili 5 μLmin^{-1} korelacija za pirimetanil i trifloksistrobin postaje lošija u ekstraktima pojedinih sorti. Međutim, najbolja korelacija, prema parametrima definisanim na početku, uočava se za trifloksistrobin pri protoku pufera od 50 μLmin^{-1} . Kako se linearna zavisnost



Slika 4.3-50 Matriks efekat u ekstraktima kore Ajdareda, Delišeša i Greni Smita pri različitim brzinama protoka pufera

postepeno degradira, tako vrednosti odsečka i nagiba postaju bliske ili čak dolazi do inverzije, a koeficijent korelacije se smanjuje. U slučajevima potpunog odsustva linearnosti (boskalid i bifentrin) odsečak je značajno veći od nagiba, a koeficijent korelacije je znatno ispod 1. Najveća osetljivost prema pesticidima se uočava za *LOOP* analizu sa protokom pufera brzinom od 50 μLmin^{-1} , što je praktično suprotno od zaključka dobijenih analizom standarda u rastvaraču. Pri brzini protoka pufera od 50 i 25 μLmin^{-1} , osetljivost prema pesticidima opada u nizu trifloksistrobin>ciprodinil>pirimetanil. Pri brzini protoka pufera od 5 μLmin^{-1} osetljivost je najveća prema ciprodinilu u ekstraktima Ajdareda i Zlatnog Delišeša.

Poredeći nagibe kalibracionih krivi pesticida u rastvaraču i ekstraktima kore (*full scan* analiza m/z 197-500), uočava se jako negativan matriks efekat (Slika 4.3-50). Najmanje izražen matriks efekat se javlja za trifloksistrobin u ekstraktima sve tri sorte, pri protoku pufera brzinom od 50 μLmin^{-1} i kreće se od 39 do 53 %. Matriks efekat u svim ostalim varijantama se kreće od 78 do 99 %.

Tabela 4.3-11 Parametri kalibracione krive u EN15662 ekstraktima kore Ajdareda, Delišeša i Greni Smita, LC protok pufera 50 μLmin^{-1} (*linear fit*; opseg 0,10 – 5,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$)

Parametar	Pirimetani	Ciprodinil	Boskalid	Trifloksistrobin	Bifentrin
Ajdared					
Nagib	1728914	2881674	224611	14258247	121051
Odsečak	5648365	5223891	6635560	3833943	3555156
Koeficijent korelacije	0,9504	0,9617	0,4662	0,9922	0,2907
Zlatni Delišeš					
Nagib	2142690	3259918	-29547	12065959	329258
Odsečak	3329873	2287444	9217662	5007004	4374288
Koeficijent korelacije	0,9263	0,9827	0,0018	0,9906	0,3124
Greni Smit					
Nagib	2376437*	4695709*	-103113	15837479	19699
Odsečak	2382286	-658201	4935546	4684946	1279605
Koeficijent korelacije	0,9395	0,9340	0,0088	0,9994	0,0272

*Prikazani su parametri za suženi opseg koncentracija 0,50 – 5,00 (pirimetanil) i 1,00 – 5,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (ciprodinil) zbog nemogućnosti identifikacije pikova pri nižim koncentracijama pesticida.

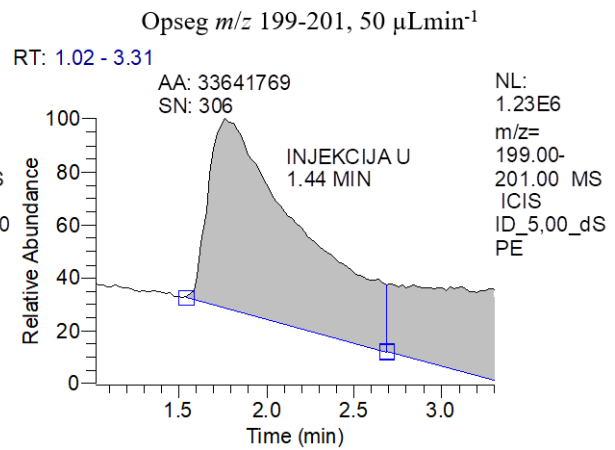
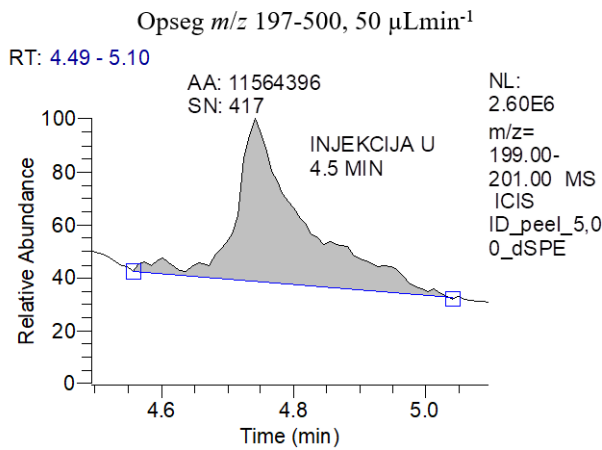
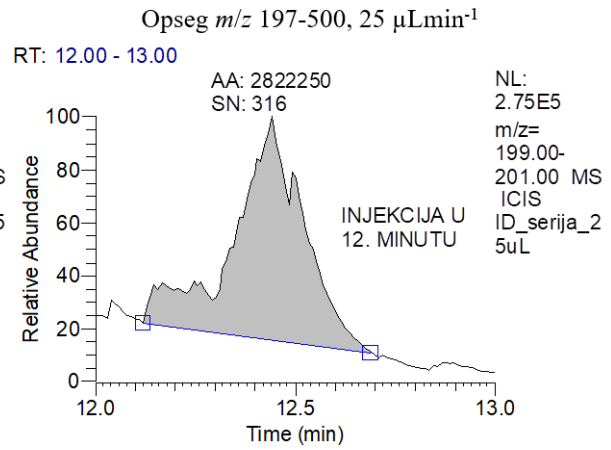
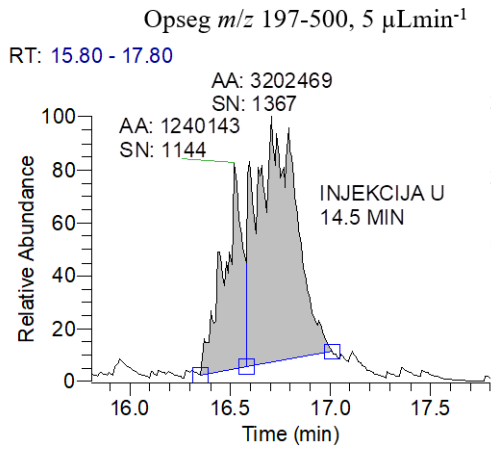
Tabela 4.3-12 Parametri kalibracione krive u EN15662 ekstraktima kore Ajdareda, Delišesa i Greni Smita, protok pufera 25 μLmin^{-1} (*linear fit*; opseg 0,10 – 5,00 μgmL^{-1})

Parametar	Pirimetanol	Ciprodinil	Boskalid	Trifloksistrobin	Bifentrin
	Ajdared				
Nagib	248258	562632	-3834	2992181	200129
Odsečak	1536403	1269694	4072777	3497179	2709019
Koeficijent korelacije	0,9511	0,9939	0,0000	0,9532	0,3890
	Zlatni Delišes				
Nagib	197337	479872	135014	2671648	163270
Odsečak	1361112	2487349	3735836	4918750	2997649
Koeficijent korelacije	0,3334	0,8224	0,4786	0,9564	0,1532
	Greni Smit				
Nagib	205714	1246470	122546	5548066	131723
Odsečak	1532619	1368731	2561183	4387990	1528463
Koeficijent korelacije	0,6768	0,9638	0,1780	0,9767	0,4444

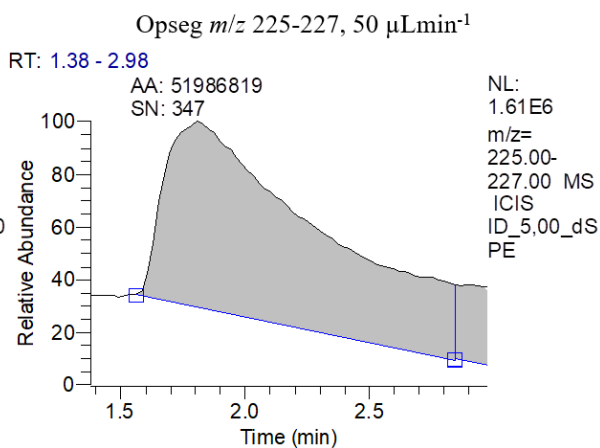
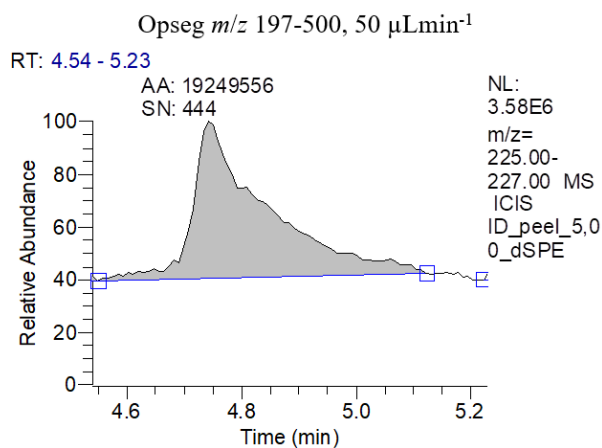
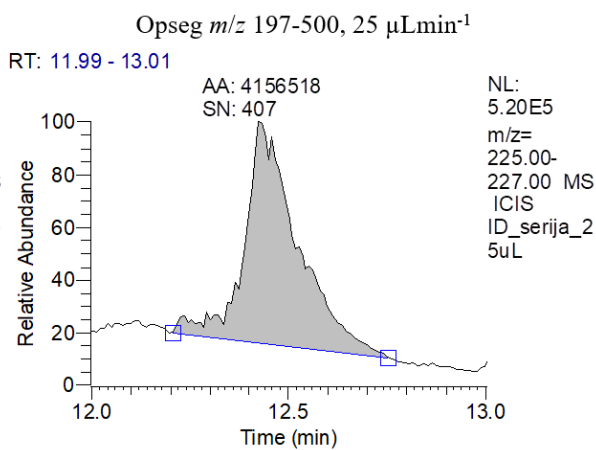
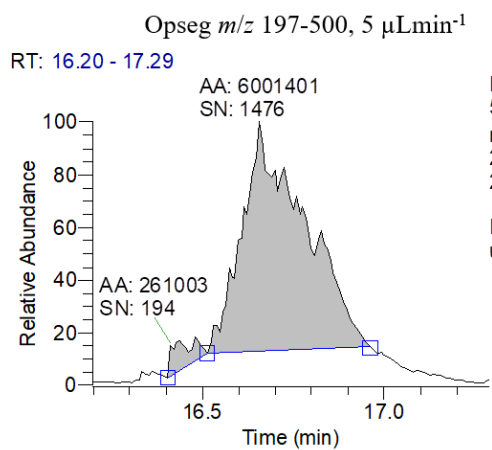
Tabela 4.3-13 Parametri kalibracione krive u EN15662 ekstraktima kore Ajdareda, Delišesa i Greni Smita, protok pufera 5 μLmin^{-1} (*linear fit*; opseg 0,10 – 5,00 μgmL^{-1})

Parametar	Pirimetanol	Ciprodinil	Boskalid	Trifloksistrobin	Bifentrin
	Ajdared				
Nagib	776803	1777051	-308015	686327	430464
Odsečak	250087	1140523	3670689	7458736	3525524
Koeficijent korelacije	0,9517	0,8468	0,9165	0,5203	0,5014
	Zlatni Delišes				
Nagib	506978	1814224	-42555	964339	433093
Odsečak	641362	-120918	3055337	19803011	9451371
Koeficijent korelacije	0,9472	0,9721	0,0240	0,1468	0,0927
	Greni Smit				
Nagib	561085	1686512	-73506	3423765	326057
Odsečak	159735	80986	2513874	4386981	2677209
Koeficijent korelacije	0,9396	0,9301	0,0061	0,9596	0,3140

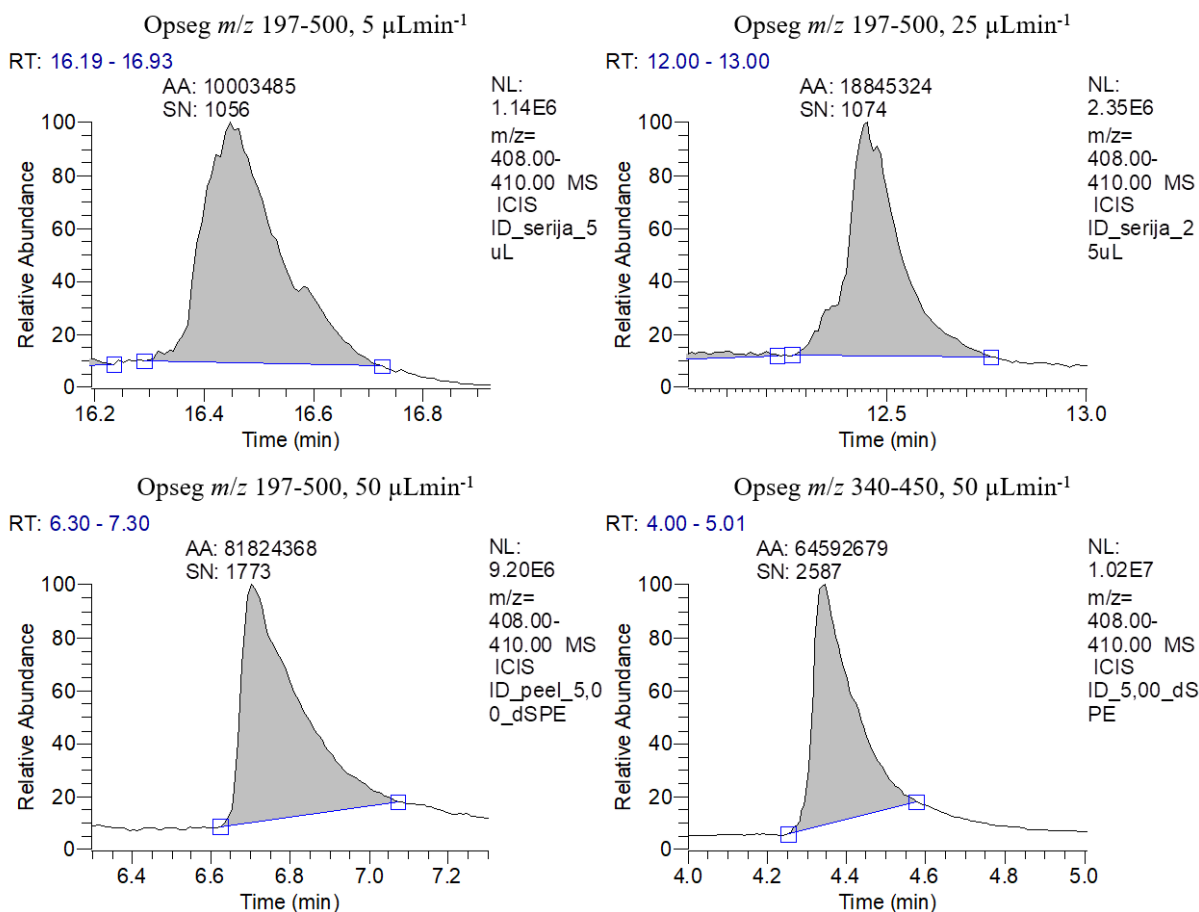
U slučaju pirimetanila i ciprodinila porast brzine protoka pufera pogoršava odnos signala i šuma, ali vodi nešto boljoj detektabilnosti i boljem integritetu pikova (Slika 4.3-51 i Slika 4.3-52). Najstabilniji signal, najbolji integritet pika i najbolja detektabilnost odnosno najveća osetljivost postoje pri analizi ova dva pesticida u SIM režimu, pri protoku pufera od 50 μLmin^{-1} . Na primeru trifloksistrobina zaključuje se da porast brzine protoka pufera poboljšava odnos signala i šuma i detektabilnost. Najbolji odnos signala i šuma se dobija kada se suzi opseg analiziranja (Slika 4.3-53).



Slika 4.3-51 *Extract ion* hronogrami pirimetanila u spajkovanom ekstraktu kore Ajdareda ($5,00 \mu\text{g mL}^{-1}$) snimljeni sa varijacijama u protoku pufera i opsegu skeniranja; pikovi su autointegrisani (*default* parametri integracije)



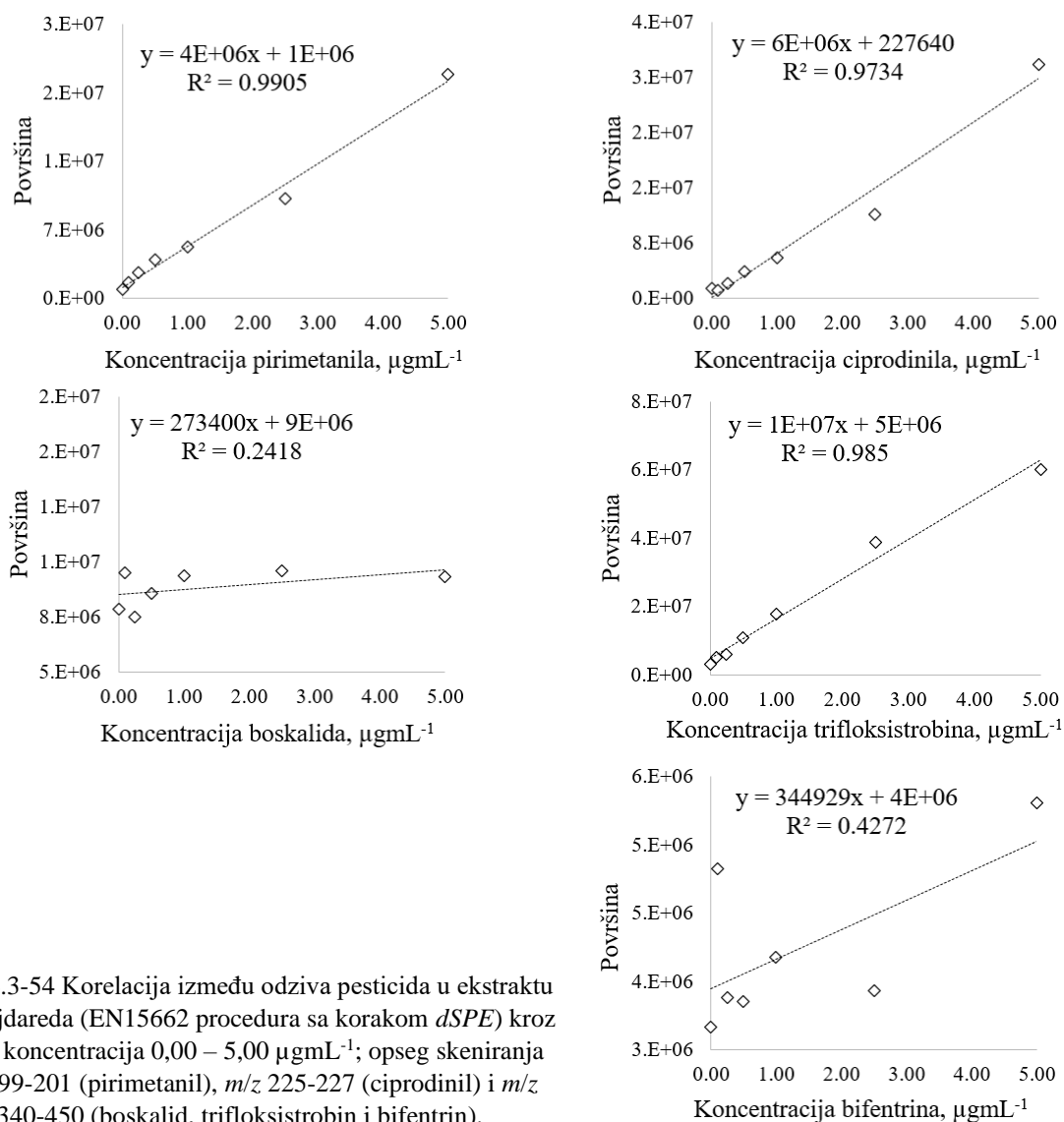
Slika 4.3-52 *Extract ion* hronogrami ciprodinila u spajkovanom ekstraktu kore Ajdareda ($5,00 \mu\text{g mL}^{-1}$) snimljeni sa varijacijama u protoku pufera i opsegu skeniranja; pikovi su autointegrisani (*default* parametri integracije)



Slika 4.3-53 *Extract ion* hronogrami trifloksistrobina u spajkovanom ekstraktu kore Ajdareda ($5,00 \mu\text{g mL}^{-1}$) snimljeni sa varijacijama u protoku pufera i opsegu skeniranja; pikovi su autointegrirani (*default* parametri integracije)

Slika 4.3-54 prikazuje korelaciju između odziva pesticida i njihovih koncentracija u ekstraktu kore Ajdareda, sa parametrima kalibracionih pravi dobijenih linearnim fitovanjem, kada se odziv pirimetanila i ciprodinila beleži u SIM režimu, a odziv ostala tri pesticida u full scan režimu suženog opsega. Osetljivost prema pirimetanilu je dvostruko veća u SIM režimu u odnosu na full scan režim, što pokazuju nagibi prava pirimetanila u ova dva režima (Slika 4.3-49 i Slika 4.3-54). Isto se može zaključiti i za ciprodinil. Pored toga korelacija odziva i koncentracije ova dva pesticida u ekstraktu je poboljšana analizom u SIM režimu. Suženje opsega skeniranja vodi većoj osetljivosti prema boskalidu; nagibi prava se ne mogu porediti s obzirom da korelacija između odziva i koncentracije boskalida praktično ne postoji, ali se uočava da se odziv boskalida u standardima povećava sa $\approx 6-7 \times 10^6$ (Slika 4.3-49) na $\approx 7-10 \times 10^6$, kada se opseg skeniranja suzi sa m/z 197-500 na m/z 340-450 (Slika 4.3-54). Osetljivost prema bifentrinu i trifloksistrobinu je nepromenjena.

Tabela 4.3-14 prikazuje parametre kalibracionih krivi pesticida u optimizovanim režimima detekcije i sa optimizovanom brzinom protoka pufera.



Slika 4.3-54 Korelacija između odziva pesticida u ekstraktu kore Ajdareda (EN15662 procedura sa korakom *dSPE*) kroz opseg koncentracija 0,00 – 5,00 µg mL⁻¹; opseg skeniranja *m/z* 199-201 (pirimetanil), *m/z* 225-227 (ciprodinil) i *m/z* 340-450 (boskalid, trifloksistrobin i bifentrin).

Tabela 4.3-14 Parametri kalibracione krive u EN15662 ekstraktima kore Ajdareda, Delišesa i Greni Smita, LC protok pufera 50 µL min⁻¹ (*linear fit*; opseg 0,10 – 5,00 µg mL⁻¹)

Parametar	Pirimetani*	Ciprodinil*	Boskalid**	Trifloksistrobin**	Bifentrin**
Ajdared					
Odsečak	1154946	227640	9211360	4642179	3712869
Nagib	4201395	6317467	273400	11629074	344929
Koeficijent korelacije	0,9905	0,9734	0,2418	0,9850	0,4272
Zlatni Delišes					
Odsečak	1903719	886999	9836216	5555620	4678864
Nagib	5755864	8097510	-429390	10833846	-67227
Koeficijent korelacije	0,9960	0,9990	0,1239	0,9932	0,0071
Greni Smit					
Odsečak	1430023	1,283,996	6123383	5561301	1577453
Nagib	4457376	8793901	-444204	13371703	42420
Koeficijent korelacije	0,9764	0,9938	0,0891	0,9903	0,0309

*Analiza u SIM režimu (*m/z* 199-201; *m/z* 225-227)

** Analiza u *full scan* režimu (*m/z* 340-450)

Linearnost. Metoda je linearna u testiranom opsegu koncentracija od 0,01 do 5,00 mgkg⁻¹ kore, koji pokriva preko dva reda veličine koncentracija. Koeficijenti korelacije se kreću od 0,9825 za ciprodinil u matriksu Zlatnog Delišesa do 0,9989 za trifloksistrobin u matriksu Ajdareda (Tabela 4.3-15).

Tabela 4.3-15 Parametri linearnosti odziva pesticida u proceduralnim standardima sa opsegom koncentracije 0,01 – 5,00 mgkg⁻¹

Parametar	Pirimetanol	Ciprodinil	Trifloksistrobin
		Zlatni Delišes	
Nagib (×10 ⁶)	2,12	2,34	4,72
Odsečak (×10 ⁵)	6,08	8,24	17,38
Koeficijent korelacije, R ²	0,9887	0,9825	0,9896
		Ajdared	
Nagib (×10 ⁶)	3,08	2,85	5,12
Odsečak (×10 ⁵)	5,54	7,36	15,36
Koeficijent korelacije, R ²	0,9923	0,9905	0,9989
		Greni Smit	
Nagib (×10 ⁶)	2,39	2,52	4,44
Odsečak (×10 ⁵)	6,57	8,91	18,29
Koeficijent korelacije, R ²	0,9891	0,9857	0,9925

Tačnost i preciznost. Tačnost metode MET-LI-R za pirimetanol, ciprodinil i trifloksistrobin u korama sve tri sorte jabuka je zadovoljavajuća (Tabela 4.3-16). Prinos ekstrakcije za koru Zlatnog Delišesa se kreće od 69 % za proceduralni standard trifloksistrobina koncentracije 5,00 mgkg⁻¹ do 112 % za proceduralni standard ciprodinila iste koncentracije (Tabela 4.3-16). Srednja tačnost metode za koru Zlatnog Delišesa se kreće od 74 % za pirimetanol do 92 % za ciprodinil. Ponovljivost metode sa vrednošću RSD<10% je zadovoljavajuća. Srednja ponovljivost metode koja svedoči o eventualnoj promeni prinosa ekstrakcije sa koncentracijom analita iznosi oko 20 %, odnosno ukazuje da određeni stepen varijacije u prinosu postoji.

Prinos ekstrakcije za koru Ajdareda se kreće od 68 % za proceduralni standard pirimetanila koncentracije 1,00 mgkg⁻¹ do 118 % za proceduralni standard trifloksistrobina koncentracije 5,00 mgkg⁻¹ (Tabela 4.3-16). Srednja tačnost metode za koru Ajdareda se kreće od 77 % za pirimetanol do 98 % za ciprodinil. Ponovljivost metode sa vrednošću RSD < 9% je zadovoljavajuća. Srednja ponovljivost metode za pirimetanol i ciprodinil iznosi oko 12 %, odnosno ukazuje da ne postoji značajniji stepen varijacije u prinosu, dok za trifloksistrobin iznosi 26 % i svedoči u konkretnom slučaju, o porastu prinosa ekstrakcije sa porastom koncentracije ovog pesticida.

Prinos ekstrakcije za koru Greni Smita se kreće od 69 % za proceduralni standard trifloksistrobina koncentracije 1,00 mgkg⁻¹ do 111 % za proceduralni standard ciprodinila koncentracije 5,00 mgkg⁻¹ (Tabela 4.3-16). Srednja tačnost metode za koru Greni Smita se kreće od 73 % za trifloksistrobin do 98 % za ciprodinil. Ponovljivost metode sa vrednošću RSD<12%

je zadovoljavajuća. Srednja ponovljivost metode se kreće od 6 do 23 %. Nešto veća varijacija u prinosu sa promenom koncentracije analita se uočava za pirimetanil.

Tabela 4.3-16 Tačnost metode MET-LI-R za koru Zlatnog Delišesa, Ajdareda i Greni Smita

Koncentracija, mg kg ⁻¹		Pirimetanil	Ciprodinil Zlatni Delišes	Trifloksistrobin
0,20	Tačnost, %	74,40	88,56	106,18
	Ponovljivost, %	2,12	9,36	7,45
1,00	Tačnost, %	107,25	76,51	81,54
	Ponovljivost, %	3,46	9,50	4,48
5,00	Tačnost, %	83,12	112,83	69,73
	Ponovljivost, %	8,36	5,55	8,01
Srednja tačnost, %*		74,40	92,63	85,82
Srednja ponovljivost, %**		19,28	19,97	21,67
Koncentracija, mg kg ⁻¹		Ajdared		
0,20	Tačnost, %	79,00	109,69	74,05
	Ponovljivost, %	6,63	7,08	8,56
1,00	Tačnost, %	68,25	98,95	80,93
	Ponovljivost, %	5,25	5,00	4,38
5,00	Tačnost, %	85,58	86,13	118,50
	Ponovljivost, %	7,72	3,28	4,05
Srednja tačnost, %		77,61	98,26	91,16
Srednja ponovljivost, %		11,27	12,00	26,25
Koncentracija, mg kg ⁻¹		Greni Smit		
0,20	Tačnost, %	70,84	89,25	73,91
	Ponovljivost, %	6,80	7,77	4,53
1,00	Tačnost, %	77,45	93,00	69,34
	Ponovljivost, %	8,93	5,26	4,08
5,00	Tačnost, %	107,55	111,56	78,00
	Ponovljivost, %	4,44	11,56	8,97
Srednja tačnost, %		85,28	97,94	73,75
Srednja ponovljivost, %		22,95	12,20	5,87

*Suma tačnosti za 3 koncentracije podeljena sa brojem koncentracija

** Koeficijent varijacije tačnosti za 3 koncentracije

Granice detekcije i granice kvantifikacije metode sa najpovoljnijim parametrima. Granice su procenjene analizom proceduralnih standarda pesticida 0,00 – 1,00 mgkg⁻¹ u *SIM* režimu (pirimetanil i ciprodinil) i suženom *full scan* režimu (trifloksistrobin) pri brzini protoka pufera od 50 µLmin⁻¹. Granice detekcije se kreću od 0,017 mg po kilogramu kore za ciprodinil u matriksu Greni Smita, do 0,303 mg po kilogramu kore za trifloksistrobin u istom matriksu (Tabela 4.3-17).

Tabela 4.3-17 Granice detekcije i kvantifikacije pesticida metode MET-LI-R u odabranim režimima

Analit	1. Granica detekcije, mgkg ⁻¹	2. Granica kvantifikacije, mgkg ⁻¹
	kore	kore
Greni Smit		
Pirimetanil	0,120	0,364
Ciprodinil	0,017	0,052
Trifloksistrobin	0,303	0,917
Zlatni Delišes		
Pirimetanil	0,152	0,461
Ciprodinil	0,025	0,076
Trifloksistrobin	0,227	0,688
Ajdared		
Pirimetanil	0,096	0,291
Ciprodinil	0,019	0,058
Trifloksistrobin	0,185	0,561

Analiza boskalida i bifentrina u kori svih testiranih sorti jabuka nije moguća metodom MET-LI-R. Očigledno je da u prisustvu matriksa ovi joni podležu interakcijama koje se odražavaju na zastupljenost pseudomolekulskih jona ovih pesticida i čine kvantitativnu analizu praktično nemogućom. Parametri metode MET-LI-R za pirimetanil, ciprodinil i trifloksistrobin su najbolji kada se pirimetanil i ciprodinil analiziraju u *SIM* režimu, dok je analiza trifloksistrobina pouzdana u *full scan* režimu bilo da se radi sa širim ili užim opsegom skeniranja. Analiza ovog pesticida je moguća i u *QuEChERS* ekstraktima koji nisu prečišćeni postupkom *dSPE*.

Ukoliko se pri analizi stavi akcenat na osetljivost, onda se analiza mora sastojati od dve injekcije po uzorku, pri čemu se pri jednoj analiziraju pirimetanil i ciprodinil, a pri drugoj trifloksistrobin; ukoliko to nije slučaj analiza se može završiti nakon jedne *LOOP* injekcije uz primenu *scan* režima koji opsegom pokriva sve analite.

4.4 Ispitivanja na instrumentalnoj konfiguraciji CONF-4

Poglavlje sadrži rezultate ispitivanja performansi instrumentalne konfiguracije CONF-4 u odnosu na targetirane pesticide i rezultate razvoja i primene metoda koje uključuju ovu instrumentalnu konfiguraciju.

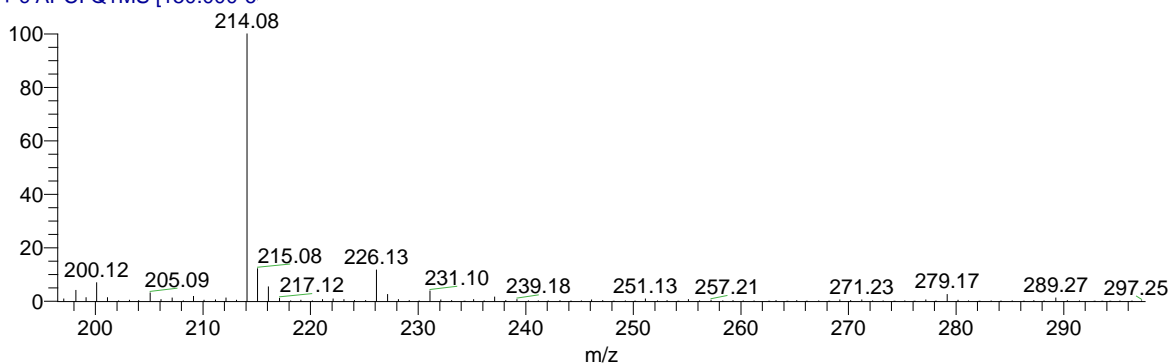
4.4.1 Performanse instrumenta u odnosu na ispitivane analite

Karakterizacija analita. MS¹ analiza rastvora analita koncentracije 1,00 µg mL⁻¹ na APCI proba, pokazuje da je ishod jonizacije isti kao i sa upotrebom ESI proba ili (Heated) ESI proba (HESI), odnosno pokazuje da su glavni joni u spektru protonovani molekularni joni odnosno adukti molekularnih jona sa određenim katjonima.

U spektrima pirimetanila, ciprodinila, boskalida i trifloksistrobina uočavaju se protonovani molekularni joni m/z 200,12; 226,13; 343,12 i 409,16 (Slika 4.4-1, Slika 4.4-2 i Slika 4.4-4). U spektrima pirimetanila i ciprodinila se uočava jon većeg intenziteta m/z 214,08, za koji se pretpostavlja da je primesni jon. Međutim, za jon m/z 371,12 koji je najvećeg intenziteta u spektru boskalida, se može pretpostaviti da je adukt molekula boskalida, molekula azota i protona (Slika 4.4-3). Ova pretpostavka izvesno je ispravna, ako se uzme u obzir drugačija priroda APCI u odnosu na ESI jonizaciju.

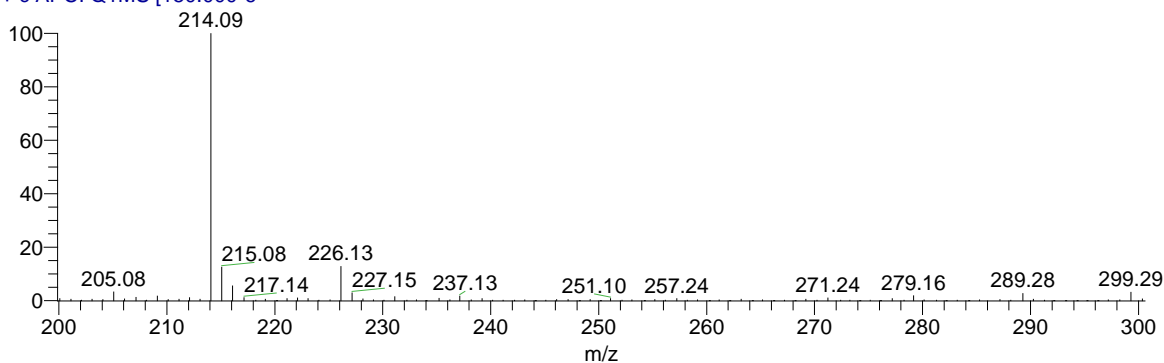
U spektru bifentrina se uočava postojanje nekoliko adukata (Slika 4.4-5). Pretpostavka je da jon m/z 440,18 predstavlja adukt bifentrina sa amonijum jonom, jon m/z 445,16 adukt sa jonom natrijuma, jon m/z 461,16 adukt sa jonom kalijuma i jon m/z 477,24 adukt sa molekulom metanola i jonom natrijuma.

Pyr_MeOH #55 RT: 1.84 AV: 1 NL: 3.84E6
T: + c APCI Q1MS [150.000-6]



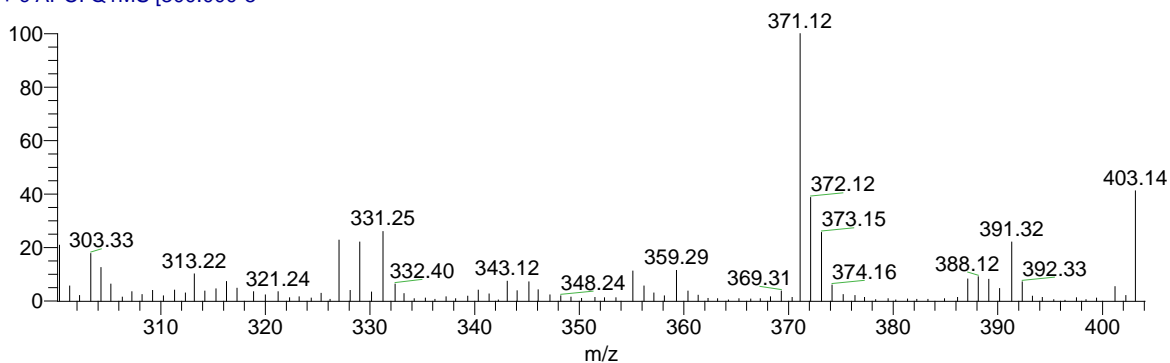
Slika 4.4-1 *Direct injection* APCI MS¹ spektar rastvora pirimetanila koncentracije 1,00 µg mL⁻¹ u metanolu; pozitivan jonizacioni režim

Cyp_MeOH #54 RT: 1.81 AV: 1 NL: 4.05E6
T: + c APCI Q1MS [150.000-6]



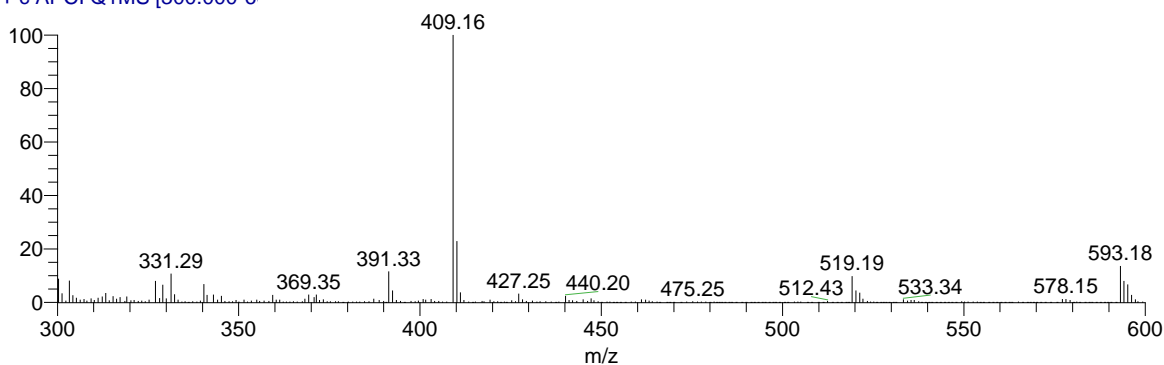
Slika 4.4-2 *Direct injection* APCI MS¹ spektar rastvora ciprodinila koncentracije 1,00 µg mL⁻¹ u metanolu; pozitivan jonizacioni režim

Boscalid_MeOH #181 RT: 3.08 AV: 1 NL: 1.92E5
T: + c APCI Q1MS [300.000-5]



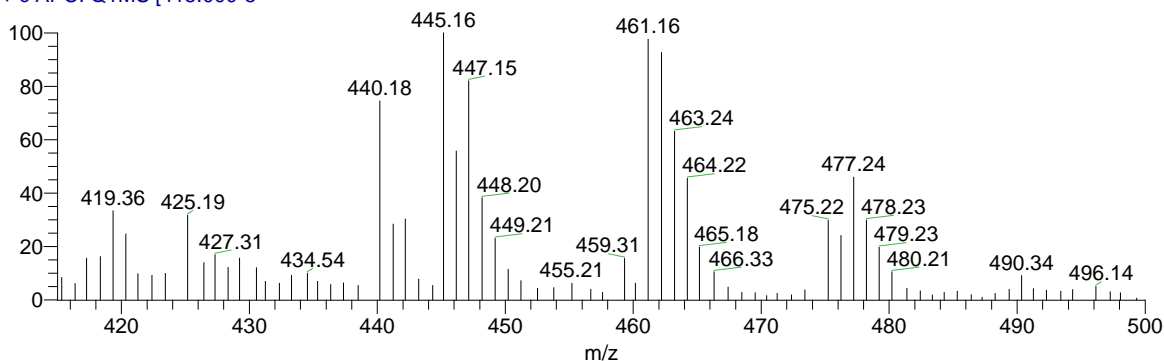
Slika 4.4-3 *Direct injection* APCI MS¹ spektar rastvora boskalida koncentracije 1,00 µg mL⁻¹ u metanolu; pozitivan jonizacioni režim

TFX_MeOH #78 RT: 2.66 AV: 1 NL: 2.43E5
T: + c APCI Q1MS [300.000-6]



Slika 4.4-4 *Direct injection* APCI MS¹ spektar rastvora trifloksistrobina koncentracije 1,00 µg mL⁻¹ u metanolu; pozitivan jonizacioni režim

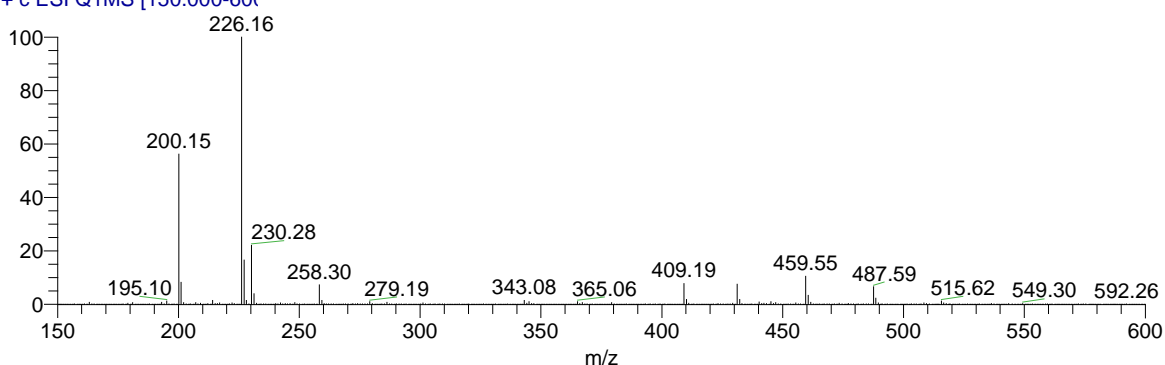
Bifentrin_MeOH #117 RT: 1.96 AV: 1 NL: 1.01E4
T: + c APCI Q1MS [415.000-5]



Slika 4.4-5 *Direct injection* APCI MS¹ spektar rastvora bifentrina koncentracije 1,00 µg mL⁻¹ u metanolu; pozitivan jonizacioni režim

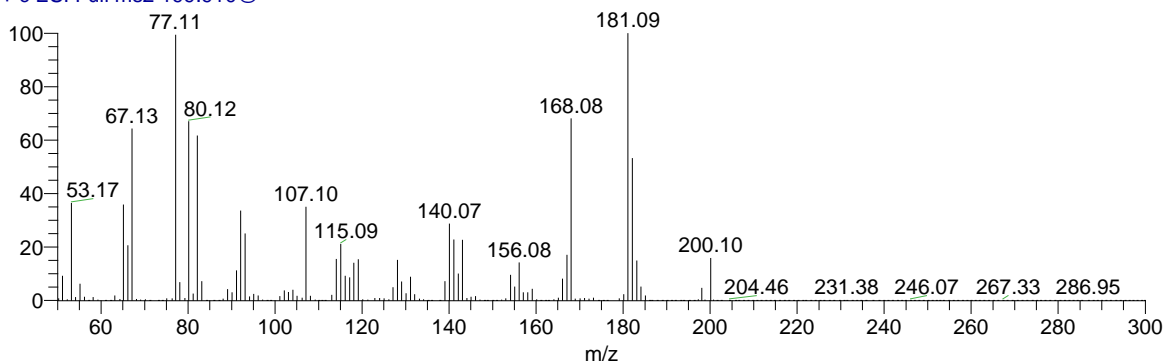
MS¹ analiza pesticida na Heated ESI proba II (HESI II) (Slika 4.4-6) pokazuje da analiti daju iste jone kao i na ostalim tipovima ESI proba. MS² analiza pesticida na spektrometru Maseni spektrometar *TSQ Quantum Ultra* (Thermo Electron Corporation, USA) koji se snabdeva argonom kao kolizionim gasom, pokazuje da je fragmentacioni ishod određenih analita nešto drugačiji nego na spektrometrima poput Maseni spektrometar *LCQ Advantage* (Thermo Finnigan, USA) i Maseni spektrometar *LTQ XL/LTQ Orbitrap* (Thermo Electron Corporation, USA), koji kao kolizioni gas koriste helijum. Razlika se uočava za fragmentaciju pirimetanila i ciprodinila. Dok kolizijom sa helijumom kao najzastupljeniji fragmenti pirimetanila nastaju joni m/z 107 i 183 (Slika 4.3-1, str.190), a ciprodinila joni m/z 210 i 185 (Slika 4.3-2, str.191), prilikom kolizije sa argonom najzastupljeniji fragmenti pirimetanila su joni m/z 181 i 77 (Slika 4.4-7), a ciprodinila jon m/z 93 (Slika 4.4-8). Fragmentacija boskalida, trifloksistrobina i bifentrina (Slika 4.4-9 - Slika 4.4-11) pretežno je ista za oba kolizionna gasa, s tim što se kod fragmentisanja boskalida kolizijom sa argonom u maloj meri uočava i jon m/z 271, koga nema u MS² spektru nakon kolizije sa helijumom, već je glavni proizvod MS³ fragmentacije (Slika 4.3-3, str.191).

MSn spektri #543 RT: 10.78 AV: 1 NL: 8.95E7
T: + c ESI Q1MS [150.000-600]



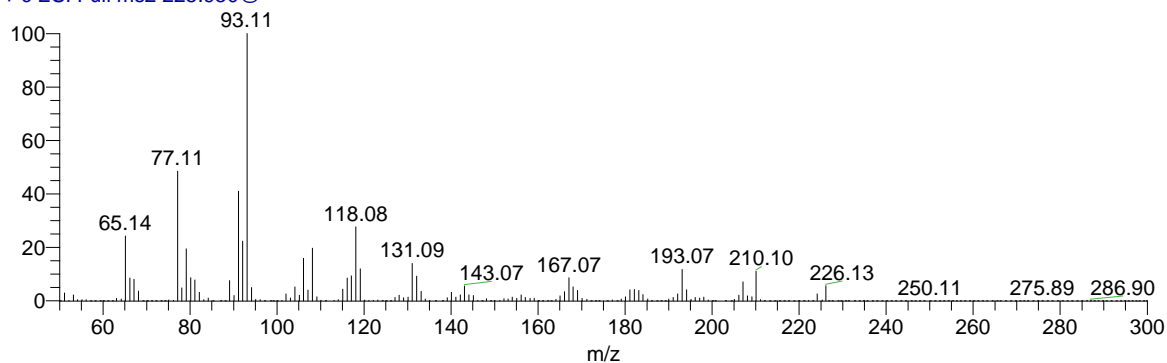
Slika 4.4-6 Direct injection HESI II MS¹ spektar rastvora smeše pet pesticida koncentracije 5,00 µg mL⁻¹ u metanolu; pozitivan jonizacioni režim

MSn spektri #104 RT: 2.00 AV: 1 NL: 8.17E6
T: + c ESI Full ms2 199.910@



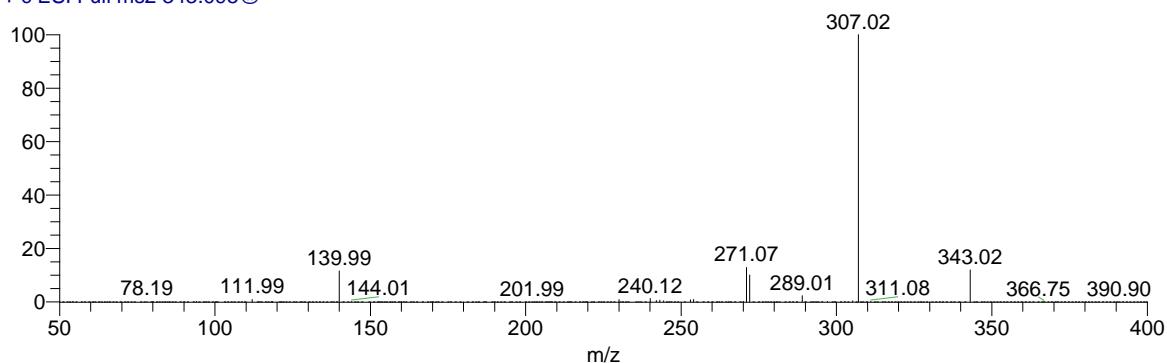
Slika 4.4-7 Direct injection HESI II MS² spektar pirimetanila koncentracije 5,00 µg mL⁻¹ u metanolu; pozitivan jonizacioni režim

MSn spektri #214 RT: 4.14 AV: 1 NL: 2.48E7
T: + c ESI Full ms2 225.950@



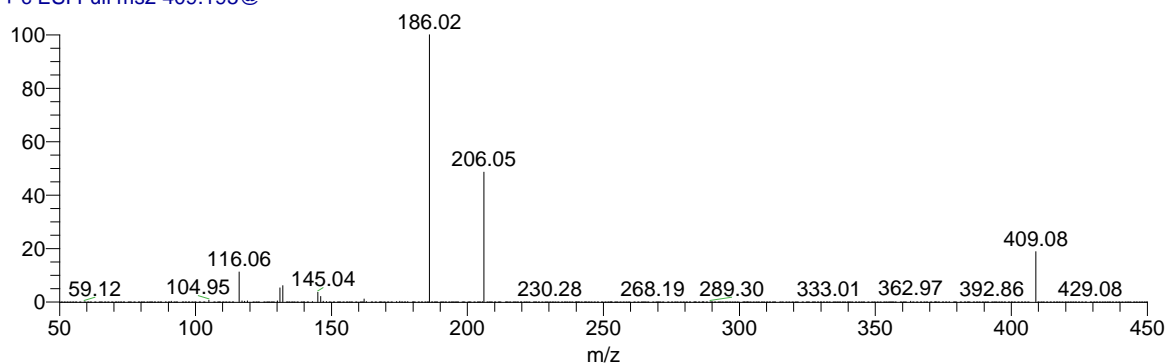
Slika 4.4-8 *Direct injection* HESI II MS² spektar ciprofloxacin koncentracije 5,00 µg mL⁻¹ u metanolu; pozitivan jonizacioni režim

MSn spektri #352 RT: 6.78 AV: 1 NL: 3.38E6
T: + c ESI Full ms2 343.095@



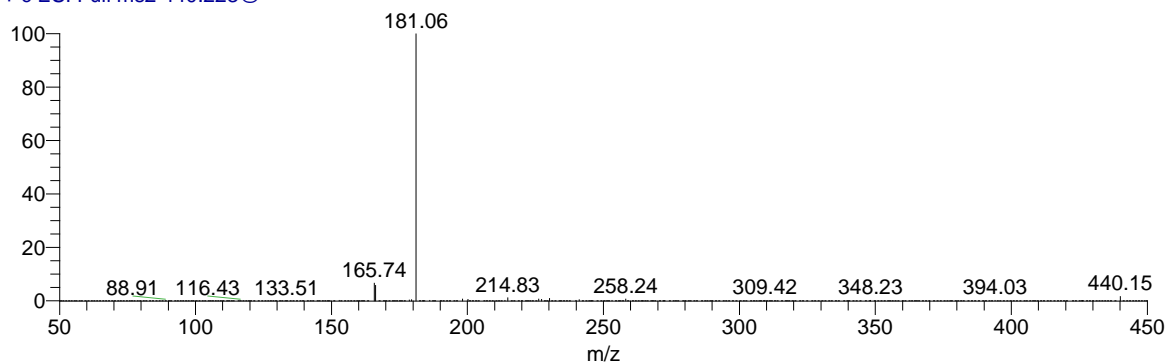
Slika 4.4-9 *Direct injection* HESI II MS² spektar boskalida koncentracije 5,00 µg mL⁻¹ u metanolu; pozitivan jonizacioni režim

MSn spektri #434 RT: 8.39 AV: 1 NL: 1.03E7
T: + c ESI Full ms2 409.195@



Slika 4.4-10 *Direct injection* HESI II MS² spektar trifloksistrobina koncentracije 5,00 µg mL⁻¹ u metanolu; pozitivan jonizacioni režim

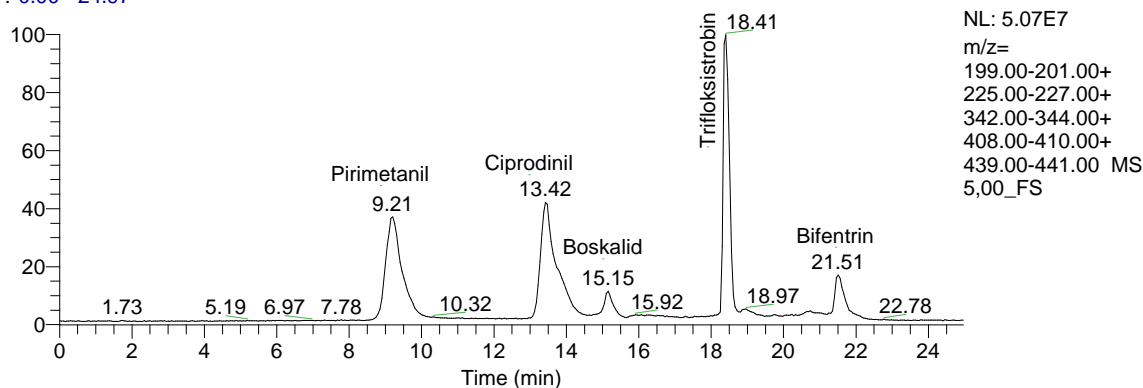
MSn spektri #597 RT: 11.81 AV: 1 NL: 1.49E6
T: + c ESI Full ms2 440.223@



Slika 4.4-11 *Direct injection* HESI II MS² spektar bifentrina koncentracije 5,00 µg mL⁻¹ u metanolu; pozitivan jonizacioni režim

Parametri hromatografskog razdvajanja. Eluenti i gradijent sastava eluenata preuzeti su iz metode 27 (Tabela 3.4-6, str.89) koja je razvijena na HPLC koloni 2 (Tabela 3.3-5, str.84) i primenjeni su na HPLC kolonu 4 (Tabela 3.3-5, str.84). Uz smanjenje brzine protoka eluenata sa 300 na 200 µLmin⁻¹, a s ciljem rada pri optimalnim HPLC pritiscima, postignuto je uspešno razdvajanje analita na HPLC koloni 4 (Slika 4.4-12).

RT: 0.00 - 24.97



Slika 4.4-12 *Extract ion* hromatogram rastvora smeše pesticida koncentracije 5,00 µg mL⁻¹ u metanolu nakon prolaska analita kroz HPLC kolonu 4

Optimizacija parametara za MSⁿ analize. Finalni parametri SRM analize prikazani su u Tabela 4.4-1. Za razliku od SRM analize pirimetanila i ciprodinila na Maseni spektrometar *LTQ XL/LTQ Orbitrap* (Thermo Electron Corporation, USA), koja uključuje tranzicije 200 → 183 (107), SRM analiza ovih pesticida na Maseni spektrometar *TSQ Quantum Ultra* (Thermo Electron Corporation, USA) uključuje tranzicije 200 → 181 (77). Tranzicije za ostale analite su iste na oba instrumenta. Rezultat autooptimizacije kolizione energije, prikazan je na slici Slika 4.4-13 na primeru pirimetanila.

Tabela 4.4-1 Optimizovani parametri SRM tranzicija pesticida

Parametri	Pirimetamil	Ciprodinil	Boskalid	Trifloksistrobin	Bifentrin
Kvalifikacioni prelaz	200→77	226→210	343→140	409→206	440→166
Kvantifikacioni prelaz	200→181	226→93	343→307	409→186	440→181
Koliziona energija, %	36	33	20	19	15
<i>Tube lens</i> voltaža, V	120	120	166	140	140
Pritisak kolizionog gasa, mmTor	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50
Širina izolacije <i>parent</i> jona, <i>m/z</i>	1	1	1	1	1
Vreme skeniranja, s	1	1	1	1	1

Instrumentalna osetljivost sa ESI i APCI načinom jonizacije. Osetljivost prema analitima je značajno veća kada se koristi ESI tip jonizacije (Tabela 4.4-2). Osetljivost prema pirimetanilu je oko 20 puta veća, prema ciprodinilu oko 40 puta, a prema trifloksistrobinu 100 puta veća pri ESI nego pri APCI jonizaciji. Osetljivost prema boskalidu i bifentrinu pri APCI jonizaciji u datom koncentracionom opsegu nije bilo moguće proceniti, jer se signali ovih pesticida ne detektuju, zbog nisko efikasne jonizacije.

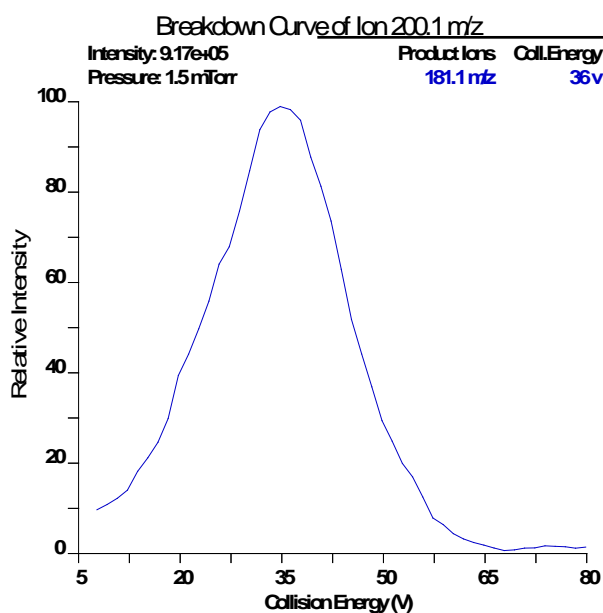
Tabela 4.4-2 Osetljivost prema pesticidima u rastvaraču u opsegu koncentracija 0,10 – 5,00 µg mL⁻¹ sa upotrebom različitih vrsta jonskih izvora

	Pirimetamil	Ciprodinil	Boskalid	Trifloksistrobin	Bifentrin
Vrsta jonizacije: ESI					
Osetljivost (nagib krive), ×10 ⁶	62,35	79,57	5,66	73,00	5,50
Vrsta jonizacije: APCI					
Osetljivost (nagib krive), ×10 ⁶	3,04	2,27	n.d.	0,76	n.d.

n.d. – nije detektovan

Instrumentalna osetljivost sa ESI i HESI načinom jonizacije. Osetljivost prema pirimetanilu i ciprodinilu je praktično ista u ESI i HESI režimu sa temperaturom isparivača 200 °C; osetljivost se malo povećava kada se način jonizacije promeni sa ESI na HESI sa temperaturom isparivača 350 °C (Tabela 4.4-3). Procenat povećanja nagiba iznosi 13 % (pirimetamil) i 29 % (ciprodinil).

Osetljivost prema boskalidu progresivno raste pri primeni HESI jonizacije; osetljivost je veća za oko 50 % (HESI, 200 °C) i 200 % (HESI, 350 °C). Slično se može zaključiti za osetljivost prema trifloksistrobinu, gde se, pri promeni režima sa ESI na HESI (200 °C) osetljivost povećava za oko 65 %, a sa ESI na HESI (350 °C) za 200 %.



Slika 4.4-13 Rezultat autooptimizacije koliziono energije pri fragmentaciji pirimetanila na instrumentu sa trosstrukim kvadrupolom kao analizatorom

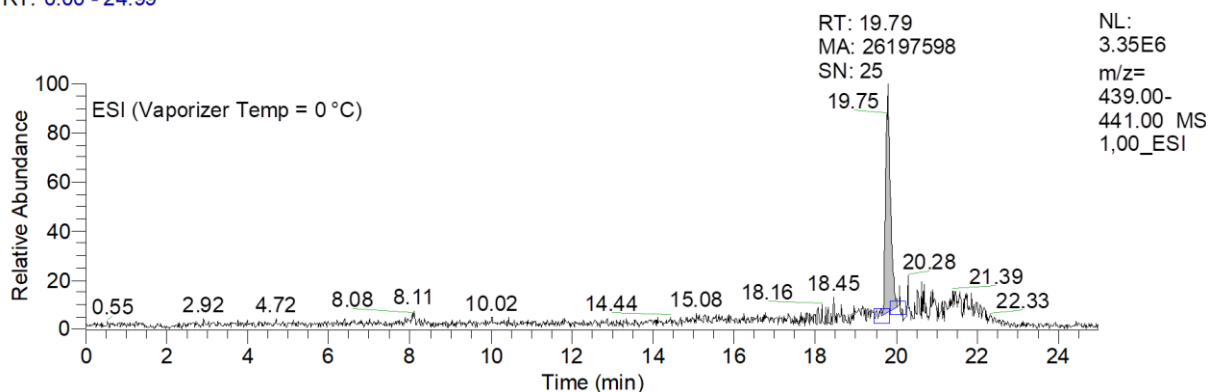
Nagib krive bifentrina je određen u opsegu koncentracija 1,00 – 5,00 µg mL⁻¹, jer se pri HESI uslovima jonizacije u standardima manjih koncentracija pik bifentrina ne uočava, odnosno odziv jona *m/z* 440 na datom retencionom vremenu je blizak odzivu šuma. Poređenje osetljivosti u suženom opsegu, pokazuje da zagrevanje elektrospreja dovodi do smanjenja odziva bifentrina koji proizvodi adukt *m/z* 440; osetljivost se kroz opseg koncentracija smanjuje za oko 21 % pri zagrevanju spreja na 200 °C i za 35 % pri zagrevanju spreja na 350 °C (Tabela 4.4-3).

Tabela 4.4-3 Osetljivost prema pesticidima u rastvaraču u opsegu koncentracija 0,10 – 5,00 µg mL⁻¹ pri različitim temperaturama zagrevanja elektrospreja

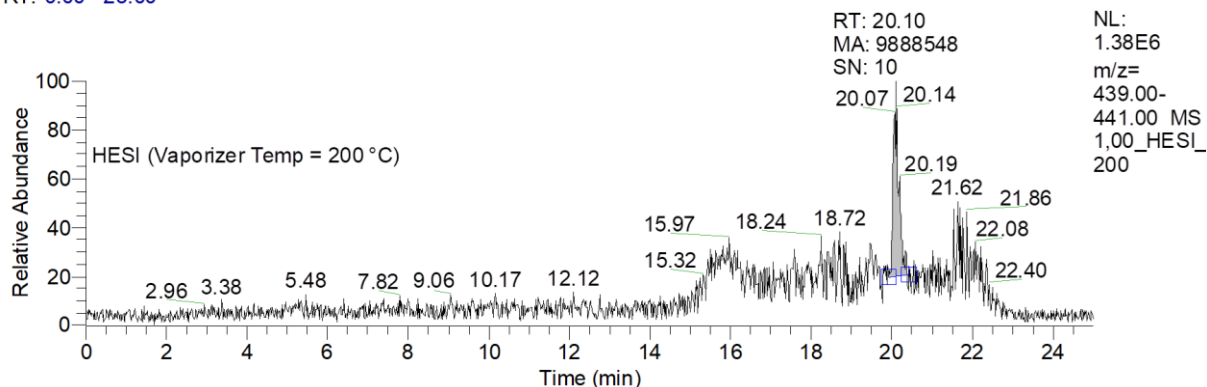
	Pirimetamil	Ciprodinil	Boskalid	Trifloksistrobin	Bifentrin
Uslovi pri jonizaciji: ESI; Vaporizer Temp. = 0 °C					
Osetljivost (nagib krive), ×10 ⁹	1,076	0,856	0,067	0,327	0,014
Uslovi pri jonizaciji: HESI; Vaporizer Temp. = 200 °C					
Osetljivost (nagib krive), ×10 ⁹	1,039	0,942	0,119	0,547	0,011
Uslovi pri jonizaciji: HESI; Vaporizer Temp. = 350 °C					
Osetljivost (nagib krive), ×10 ⁹	1,221	1,104	0,212	0,980	0,009

Slika 4.4-14 ilustruje degradaciju hromatogramskog signala bifentrina (retenciono vreme 19,83-20,10 min), koji proizvodi rastvor bifentrina koncentracije 1,00 µg mL⁻¹ pri porastu temperature zagrevanja elektrospreja.

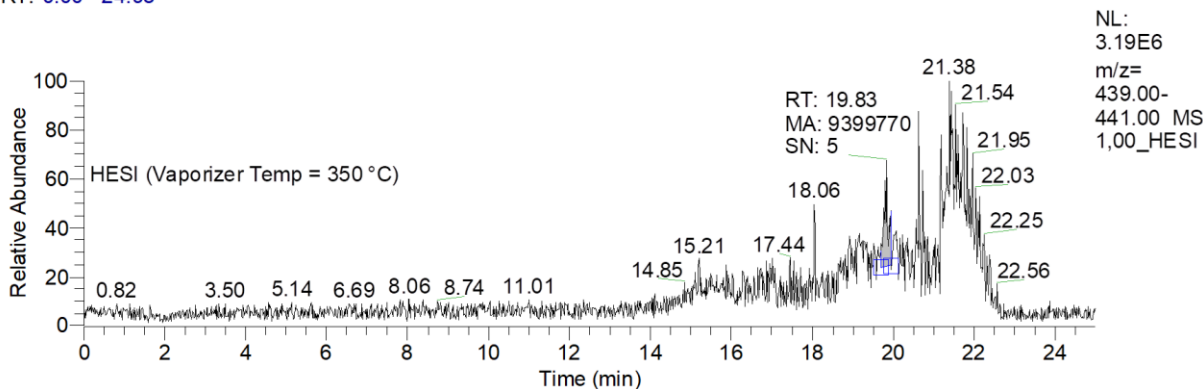
RT: 0.00 - 24.99



RT: 0.00 - 25.00



RT: 0.00 - 24.98



Slika 4.4-14 Extract ion hromatogrami standarda bifentrina (m/z 440) koncentracije $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ u ESI režimu (temp. isparivača 0°C) i HESI režimu jonizacije sa temperaturama isparivača 200°C i 350°C .

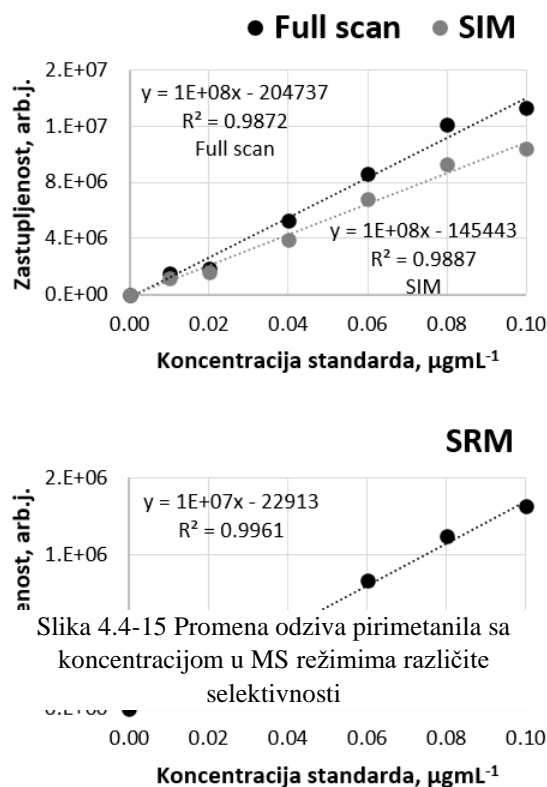
Instrumentalna osetljivost, granice detekcije i granice kvantifikacije u različitim režimima rada analizatora. Sistematizovane vrednosti granica detekcije i granica kvantifikacije pesticida se nalaze u tabeli 4.4-4. Granice detekcije pirimetanila se kreću od $0,005 \mu\text{g mL}^{-1}$ u SRM do $0,009 \mu\text{g mL}^{-1}$ u *full scan* režimu rada. Osetljivost prema pirimetanilu je najveća u *full scan* odnosno SIM režimu, dok je osetljivost u SRM režimu oko 10 puta niža od prethodne dve.

Granice detekcije ciprodinila se kreću od $0,004 \mu\text{g mL}^{-1}$ u SRM režimu rada do $0,014 \mu\text{g mL}^{-1}$ u SIM režimu rada. Osetljivost prema ciprodinilu je najveća u *full scan* odnosno SIM režimu rada, dok je osetljivost u SRM režimu oko 6 puta niža od prethodne dve (Slika 4.4-16).

Granice detekcije boskalida kroz različite režime su međusobno uporedive i iznose oko $0,020 \mu\text{g mL}^{-1}$. Osetljivost je najveća u *full scan* odnosno SIM režimu, ali je osetljivost u SRM režimu svega upola niža (Slika 4.4-17); najbolja diskriminacija niskih koncentracija ($0,00 - 0,04 \mu\text{g mL}^{-1}$) se uočava za SRM režim.

Granice detekcije trifloksistrobina se kreću od $0,015 \mu\text{g mL}^{-1}$ u SRM režimu do $0,038 \mu\text{g mL}^{-1}$ u *full scan* režimu rada. Osetljivost prema trifloksistrobinu je uporediva među režimima (Slika 4.4-18).

Granice detekcije bifentrina u SIM režimu je najniža procenjena i iznosi $0,021 \mu\text{g mL}^{-1}$; granica detekcije se kreće do $0,627 \mu\text{g mL}^{-1}$ u SRM režimu. Pri niskim koncentracijama ($0,00 - 0,10 \mu\text{g mL}^{-1}$) najbolja diskriminacija odziva koji proizvode ove koncentracije analita postoji u SIM režimu, dok je u *full scan* i SRM režimima ona slaba (Slika 4.4-19). U SRM režimu dobra diskriminacija se javlja počevši od približno $0,50 \mu\text{g mL}^{-1}$, a u *full scan* režimu počevši od $0,10$

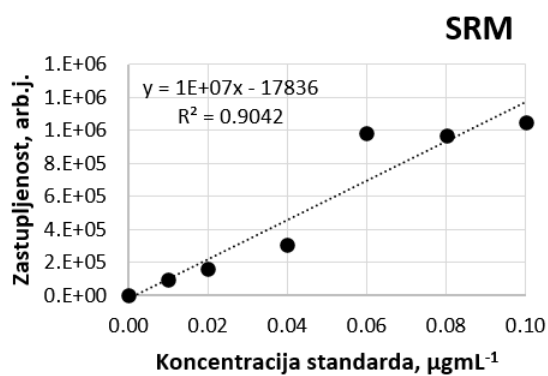
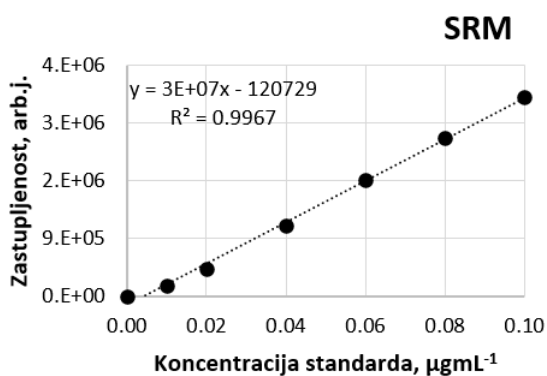
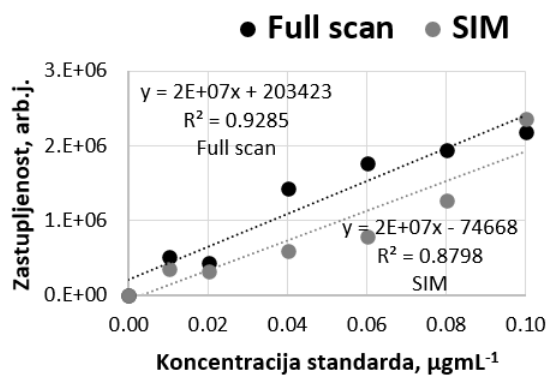
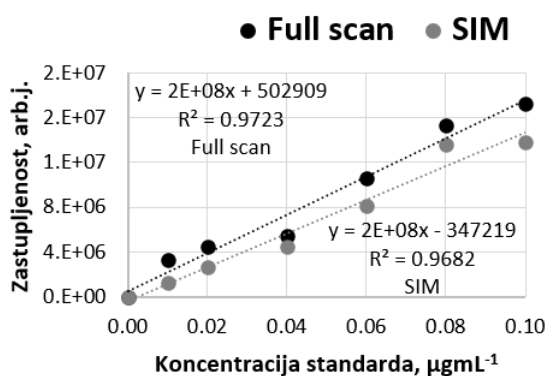


Slika 4.4-15 Promena odziva pirimetanila sa koncentracijom u MS režimima različite selektivnosti

$\mu\text{g mL}^{-1}$. Mogući razlog za relativno stalan odziv bifentrina sa promenom koncentracije je trošenje molekula bifentrina na formiranje adukata sa nekim drugim jonima, a ne samo sa amonijum jonom.

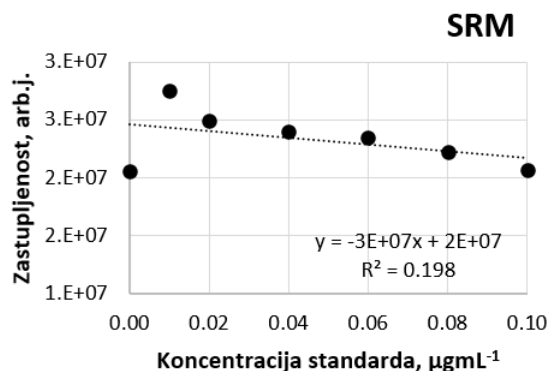
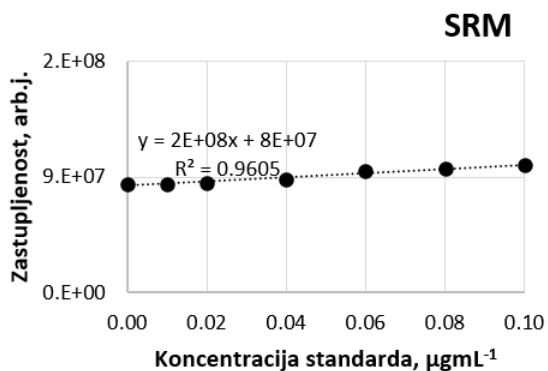
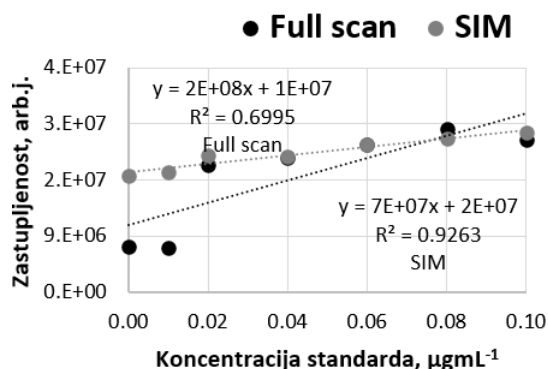
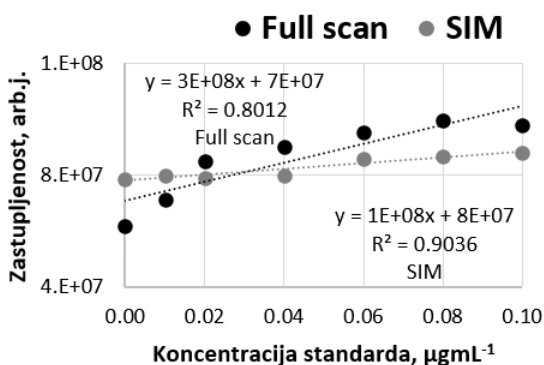
Tabela 4.4-4 Instrumentalne granice detekcije i granice kvantifikacije u MS režimima različite selektivnosti

	Pirimetamil	Ciprodinil	Boskalid	Trifloksistrobin	Bifentrin
Full scan režim					
LOD	0,009	0,013	0,021	0,038	0,049
LOQ	0,029	0,042	0,070	0,125	0,165
SIM režim					
LOD	0,008	0,014	0,028	0,025	0,021
LOQ	0,027	0,046	0,093	0,082	0,071
SRM režim					
LOD	0,005	0,004	0,025	0,015	0,627
LOQ	0,016	0,014	0,082	0,051	2,091



Slika 4.4-16 Promena odziva ciprodinila u MS režimima različite selektivnosti

Slika 4.4-17 Promena odziva boskalida u MS režimima različite selektivnosti



Slika 4.4-18 Promena odziva trifloksistrobina u MS režimima različite selektivnosti

Slika 4.4-19 Promena odziva bifentrina u MS režimima različite selektivnosti

4.4.2 Rezultati razvoja metode MET-LC-R2

Osetljivost u ekstraktima kore sa ESI i HESI načinom jonizacije. Osetljivost prema pirimetanilu i ciprodinilu blago raste, kada se način jonizacije promeni sa ESI na HESI. Procenat povećanja osetljivosti pri promeni temperature zagrevanja elektrospreja na 350 °C iznosi 18 % (pirimetanil) i 28 % (ciprodinil).

Osetljivost prema boskalidu i trifloksistrobinu značajnije raste pri primeni HESI načina jonizacije; pri temperaturi od 200 °C osetljivost u odnosu na osetljivost pri ESI jonizaciji raste za 51 % (boskalid) i za 49 % (trifloksistrobin), a pri temperaturi od 350 °C za 72 % (boskalid) i za 63 % (trifloksistrobin).

Osetljivost prema bifentrinu za ESI uslove jonizacije je procenjena za opseg koncentracija 1,00 – 5,00 µg mL⁻¹, zbog degradacije signala pesticida pri zagrevanju elektrospreja; osetljivost za HESI uslove jonizacije kada je temperatura zagrevanja elektrospreja 350 °C nije moguće proceniti, jer se kroz čitav opseg koncentracija ne može identifikovati pik bifentrina. Pretpostavka je da udruženi negativan efekat matriksa i HESI uslova jonizacije dovode do značajne supresije odziva bifentrina.

Tabela 4.4-5 Osetljivost u acetonitrilnom ekstraktu kore Greni Smita u opsegu koncentracija 0,10 – 5,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ pri različitim temperaturama zagrevanja elektrospreja

	Pirimetamil	Ciprodinil	Boskalid	Trifloksistrobin	Bifentrin
Uslovi pri jonizaciji: ESI; Vaporizer Temp. = 0 °C					
Osetljivost (nagib krive), $\times 10^9$	0,801	0,634	0,052	0,222	0,006
Uslovi pri jonizaciji: HESI; Vaporizer Temp. = 200 °C					
Osetljivost (nagib krive), $\times 10^9$	0,893	0,771	0,107	0,437	0,010
Uslovi pri jonizaciji: HESI; Vaporizer Temp. = 350 °C					
Osetljivost (nagib krive), $\times 10^9$	0,975	0,881	0,189	0,595	n.a.

Osetljivost u ekstraktima kore sa APCI i ESI načinom jonizacije. Osetljivost prema analitima je značajno veća kada se koristi ESI tip jonizacije (Tabela 4.4-6). Osetljivost prema pirimetanilu je oko 20 puta veća, prema ciprodinilu oko 40 puta, a prema trifloksistrobinu oko 50 puta veća pri ESI nego pri APCI jonizaciji. Osetljivost prema boskalidu i bifentrinu pri APCI jonizaciji u datom koncentracionom opsegu nije bilo moguće proceniti, jer se signali ovih pesticida ne detektuju, zbog nisko efikasne jonizacije.

Tabela 4.4-6 Osetljivost u acetonitrilnom ekstraktu kore Greni Smita u opsegu koncentracija 0,10 – 5,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ sa upotrebom različitih vrsta jonskih izvora

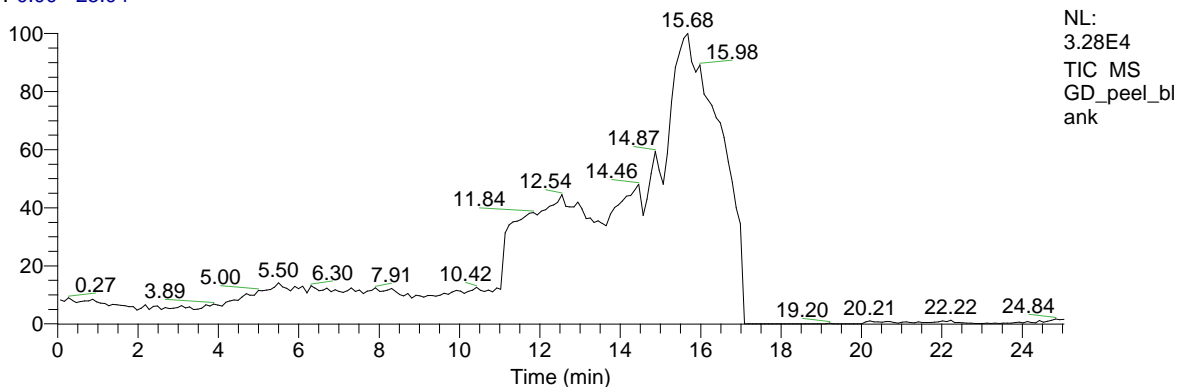
	Pirimetamil	Ciprodinil	Boskalid	Trifloksistrobin	Bifentrin
ESI jonizacija					
Osetljivost (nagib krive), $\times 10^6$	67,67	88,50	6,15	79,19	5,35
APCI jonizacija					
Osetljivost (nagib krive), $\times 10^6$	2,86	1,93	n.d.	1,60	n.d.

n.d. – nije detektovan

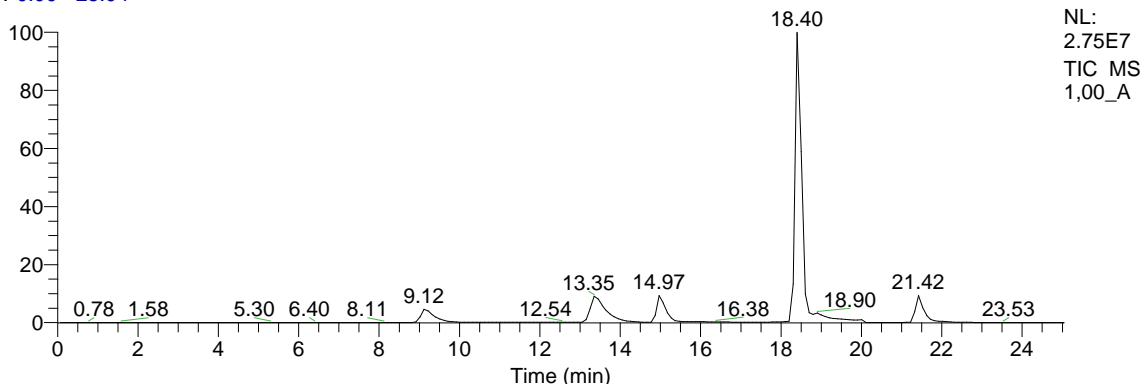
4.4.2.1 Rezultati ispitivanja parametara validacije

Selektivnost. Slika 4.4-20 i Slika 4.4-21 prikazuju SRM hromatograme blank acetonitrilnih ekstrakata kore Zlatnog Delišesa, Ajdareda i Greni Smita. Poređenjem sa spajkovanim ekstraktom kore Zlatnog Delišesa (Slika 4.4-20, donji hromatogram) može se zaključiti da je razvijena metoda selektivna, odnosno da se ne uočavaju interferencije sa signalima analita.

RT: 0.00 - 25.04

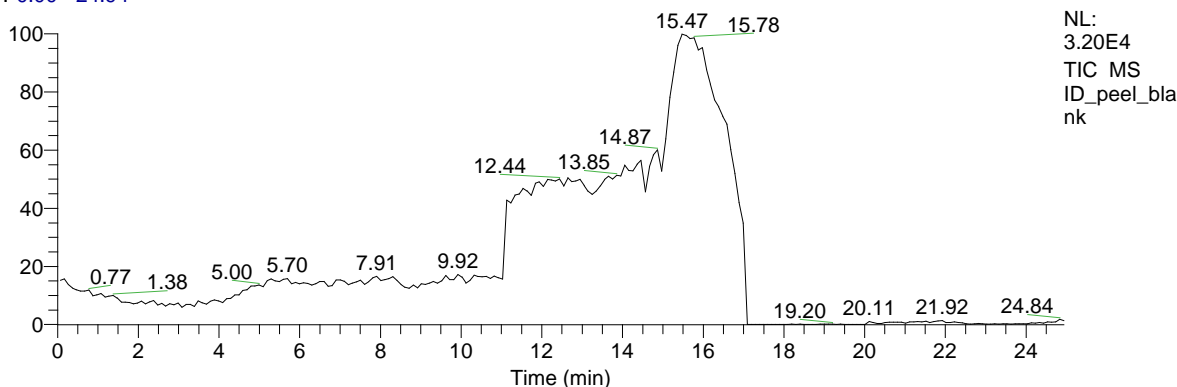


RT: 0.00 - 25.04

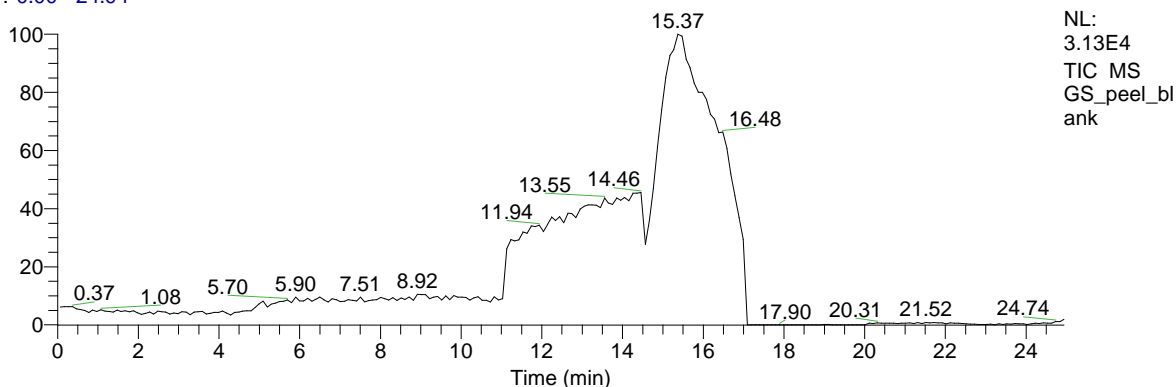


Slika 4.4-20 Hromatogrami acetonitrilnih ekstrakata kore Zlatnog Delišesa u SRM režimu: bez dodatih pesticida – blank (gornji hromatogram) i standard u matriksu - 1,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (donji hromatogram)

RT: 0.00 - 24.94



RT: 0.00 - 24.94



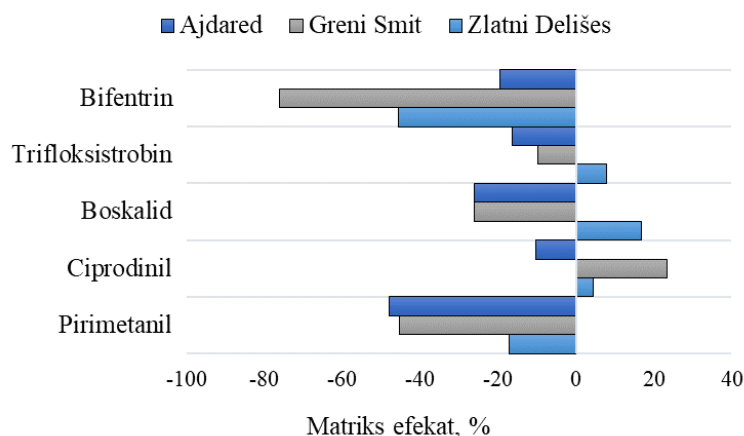
Slika 4.4-21 SRM hromatogrami blank acetonitrilnih ekstrakata kore Ajdareda (gornji hromatogram) i Greni Smita (donji hromatogram)

Odzivi u ekstraktima kore i matriks efekat. Razlika u osetljivosti prema analitima u matriksu Zlatnog Delišesa prati trend trifloksistrobin > ciprodinil > boskalid > bifentrin > pirimetanil (Tabela 4.4-7). Koeficijenti korelacije kalibracione krive u ovom matriksu kreću se od 0,9904 do 1,0000. U matriksu Greni Smita trend je skoro identičan, sa razlikom u nešto većoj osetljivosti prema pirimetanilu u odnosu na bifentrin; koeficijenti korelacije se kreću od 0,9863 do 0,9985. U matriksu Ajdareda razlika u osetljivosti prema analitima je drugačija; najveća osetljivost je uočena za trifloksistrobin, a prate ga ciprodinil, bifentrin, boskalid i pirimetanil. Koeficijenti korelacije se kreću od 0,9932 do 0,9990.

Tabela 4.4-7 Parametri kalibracionih kriva pesticida (0,10 – 5,00 µg mL⁻¹) u SRM režimu u acetonitrilu i acetonitrilnim ekstraktima kore Zlatnog Delišesa, Greni Smita i Ajdareda

Parametri krive	Pirimetanil	Ciprodinil	Boskalid	Trifloksistrobin	Bifentrin
Acetonitril					
Nagib	16830500	43395385	26859038	120245082	34189895
Odsečak	1725134	5732745	-1390126	116760888	32184579
Koeficijent korelacije	0,9974	0,9946	0,9997	0,9933	0,9777
Zlatni Delišes					
Nagib	13931503	45316873	31369606	129819193	18627802
Odsečak	1379408	5171216	569572	96381732	15227341
Koeficijent korelacije	0,9992	0,9983	1,0000	0,9971	0,9904
Greni Smit					
Nagib	9211069	58535877	20854007	108438600	8411247
Odsečak	922069	8107089	360221	85507411	6675112
Koeficijent korelacije	0,9899	0,9912	0,9903	0,9985	0,9863
Ajdared					
Nagib	8455016	38945100	19845996	100685440	27521551
Odsečak	851064	4455588	354221	73744175	23477080
Koeficijent korelacije	0,9982	0,9988	0,9955	0,9990	0,9932

Razlike u osetljivosti prema analitima potiču od matriks efekta različitog intenziteta. U acetonitrilnim ekstraktima kore, uočen je pretežno negativan i pretežno srednje izražen matriks efekat. U kori Zlatnog Delišesa matriks efekat se kreće od oko 4 % za pirimetanil do -45 % za bifentrin. U kori Greni Smita matriks efekat je negativan i kreće se od -10 % za trifloksistrobin do -76% za bifentrin. U kori Ajdareda matriks efekat je takođe negativan; najizraženiji matriks efekat je uočen za pirimetanil i iznosi -48 %; najmanje izražen matriks efekat je uočen za ciprodinil i iznosi -10 %. Analiti čiji je odziv značajnije izmenjen u acetonitrilnim ekstraktima kore (ME>50 %) su pirimetanil i bifentrin, dok se za ostale analite matriks efekat može zanemariti (Slika 4.4-22).



Slika 4.4-22 Matriks efekat u acetonitrilnim ekstraktima kore Zlatnog Delišesa, Ajdareda i Greni Smita analiziranih na instrumentu sa konfiguracijom 4

Linearnost. U okviru testiranog analitičkog opsega koji obuhvata tri reda veličine koncentracija (0,005 – 5,00 mgkg⁻¹), najširi neprekidni linearni opseg metode MET-LC-R2 u matriksu Ajdareda utvrđen je za pirimetanil i obuhvata raspon koncentracija od 0,005 do 1,00 mgkg⁻¹. Za boskalid i bifentrin analitički opseg je podeljen u dva linearna podopsega, koji obuhvataju oblast nižih i viših koncentracija (Tabela 4.4-8). Za trifloksistrobin je utvrđena linearnost metode u opsegu od 0,010 do 0,25 mgkg⁻¹. Najširi neprekidni linearni opseg metode MET-LC-R2 u matriksu Zlatnog Delišesa utvrđen je za pirimetanil sa rasponom koncentracija od 0,010 do 2,50 mgkg⁻¹ i za boskalid sa rasponom koncentracija od 0,020 do 5,00 mgkg⁻¹. Za ciprodinil, trifloksistrobin i bifentrin, analitički opseg je podeljen u dva podopsega koji obuhvataju oblast viših i nižih koncentracija (Tabela 4.4-8). Za analite u matriksu Greni Smita, analitički opseg je podeljen u dva podopsega koji obuhvataju oblast nižih i viših koncentracija. Sumarno, najširi linearni opseg u matriksu Greni Smita utvrđen je za pirimetanil (0,005 – 2,50 mgkg⁻¹) i za boskalid (0,010 – 5,00 mgkg⁻¹) (Tabela 4.4-8).

Tabela 4.4-8 Parametri linearne regersije i linearni analitički opseg metode MET-LC-R2 u kori Ajdareda, Zlatnog Delišesa i Greni Smita

Anali	Opseg, mgkg ⁻¹	Broj standarda	Nagib	Odsečak	Koeficijent korelacije
Ajdared					
Pirimetanil	0,005 – 1,00	9	25343006	168513	0,9990
Ciprodinil	0,005 – 0,50	8	38862888	36744	0,9991
Boskalid	0,01 – 0,10	5	13180303	303245	0,9873
	0,10 – 2,50	5	22291639	-525482	1,0000
Trifloksistrobin	0,01 – 0,25	6	172216955	59158565	0,9949
Bifentrin	0,025 – 1,00	6	25623632	14424904	0,9968
	0,10 – 2,50	5	21307183	16404709	0,9955

Zlatni Delišeš					
Pirimetanol	0,01 – 2,50	10	28990865	185028	0,9987
Ciprodinil	0,01 – 0,10	6	35181264	-105608	0,9946
	0,10 – 2,50	5	26595198	840758	0,9984
Boskalid	0,02 – 5,00	9	18705612	94102	0,9998
Trifloksistrobin	0,01 – 0,10	6	504975698	17108212	0,9877
	0,10 – 5,00	7	84420256	61901324	0,9800
Bifentrin	0,01 – 0,10	5	57227612	1987400	0,9919
	0,10 – 2,50	5	17630817	7501442	0,9857
Greni Smit					
Pirimetanol	0,005 – 0,25	7	24804430	33668	0,9992
	0,10 – 2,50	5	19210056	1714960	0,9979
Ciprodinil	0,005 – 0,075	5	35982071	36086	0,9987
	0,075 – 1,00	5	35700657	967493	0,9952
Boskalid	0,01 – 0,075	5	8714520	9025460	0,9898
	0,10 – 5,00	6	17615878	4620244	0,9996
Trifloksistrobin	0,01 – 0,25	6	170351889	63492392	0,9920
	0,10 – 2,50	5	184894908	55008196	0,9937
Bifentrin	0,005 – 0,075	5	83469740	10595484	0,9445
	0,05 – 1,00	6	22950862	14501857	0,9856

Tačnost i preciznost. Tačnost metode MET-LC-R2, izražena kao prinos analita, u matriksu Zlatnog delišesa kreće se od 62 % za koncentraciju bifentrina 5,00 mgkg⁻¹ do 94 % za koncentraciju trifloksistrobina 1,00 mgkg⁻¹ (Tabela 4.4-9). Srednja tačnost metode kreće se od 72 % za bifentrin do 86 % za trifloksistrobin. Preciznost metode je dobra i kreće se od 2 do 7 %. Srednja preciznost metode koja svedoči o eventualnoj varijaciji prinosa ekstrakcije sa koncentracijom analita je zadovoljavajuća za sve analite i kreće se od 3 do 14 %, što praktično znači da koncentracija analita ne utiče na prinos ekstrakcije.

Tačnost metode MET-LC-R2, izražena kao prinos analita, u matriksu Ajdareda kreće se od 49% za koncentraciju bifentrina 0,10 mgkg⁻¹ do 98 % za koncentraciju pirimetanila 1,00 mgkg⁻¹ (Tabela 4.4-9). Srednja tačnost metode kreće se od 54 % za bifentrin do 88 % za boskalid. Preciznost metode je dobra i kreće se od 1 do 15 %. Srednja preciznost metode koja svedoči o eventualnoj varijaciji prinosa ekstrakcije sa koncentracijom analita je zadovoljavajuća za većinu analita i kreće se od 9 do 23 %.

Tačnost metode MET-LC-R2, izražena kao prinos analita, u matriksu Greni Smita kreće se od 52 % za koncentraciju boskalida i trifloksistrobina 1,00 mgkg⁻¹ do 93 % za koncentraciju bifentrina 0,10 mgkg⁻¹ (Tabela 4.4-9). Srednja tačnost metode iznosi 64-65 % za pirimetanol, ciprodinil, trifloksistrobin i boskalid, i 87 % za bifentrin. Preciznost metode je dobra i kreće se od 1,55 do 12,15 %. Srednja preciznost metode koja svedoči o eventualnoj varijaciji prinosa ekstrakcije sa koncentracijom analita je zadovoljavajuća za većinu analita i kreće se od 8 do 20 %.

Poređenje srednje tačnosti metode za različite sorte, zaključuje se da nema značajne razlike u prinosu ekstrakcije sa promenom matriksa. Srednja tačnost metode je najmanje ujednačena za

bifentrin, jer se kreće od 54 % za koru Ajdareda do 87 % za koru Greni Smita. Tačnost metode MET-LC-R2 je prihvatljiva prema definisanim kriterijumima SANTE direktive za validaciju.

Tabela 4.4-9 Tačnost metode MET-LC-R2 za koru Zlatnog Delišesa, Ajdareda i Greni Smita

		Pirimetaniil	Ciprodinil	Boskalid	Trifloksistrobin	Bifentrin
Koncentracija, mg kg ⁻¹		Zlatni Delišes				
0,10	Tačnost, %	80,37	82,91	84,87	87,46	82,67
	Ponovljivost, %	1,97	13,35	19,64	0,45	2,53
1,00	Tačnost, %	78,56	84,08	72,62	94,50	71,54
	Ponovljivost, %	3,50	0,30	0,58	1,50	2,08
5,00	Tačnost, %	67,12	71,20	69,34	77,35	62,36
	Ponovljivost, %	2,82	7,44	3,78	2,04	4,55
Srednja tačnost, %*		75,35	79,40	75,61	86,44	72,19
Srednja ponovljivost, %**		9,53	8,97	10,83	9,97	14,09
Koncentracija, mg kg ⁻¹		Ajdared				
0,10	Tačnost, %	68,14	78,00	78,66	71,22	49,00
	Ponovljivost, %	1,05	2,18	15,06	4,37	12,55
1,00	Tačnost, %	98,79	89,21	89,85	76,50	55,75
	Ponovljivost, %	6,93	2,56	7,58	10,24	6,69
5,00	Tačnost, %	67,13	65,52	95,20	72,80	58,43
	Ponovljivost, %	5,08	7,75	3,05	1,45	2,03
Srednja tačnost, %		78,02	77,58	87,90	73,51	54,39
Srednja ponovljivost, %		23,06	15,28	9,60	3,69	8,93
Koncentracija, mg kg ⁻¹		Greni Smit				
0,10	Tačnost, %	65,25	72,44	65,66	75,48	93,00
	Ponovljivost, %	2,54	5,63	8,52	9,35	8,22
1,00	Tačnost, %	69,57	58,45	52,12	52,45	78,45
	Ponovljivost, %	10,05	4,88	5,21	5,12	1,55
5,00	Tačnost, %	58,92	62,36	78,31	65,43	89,81
	Ponovljivost, %	2,01	3,87	2,36	6,16	12,15
Srednja tačnost, %		64,58	64,42	65,36	64,45	87,09
Srednja ponovljivost, %		8,29	11,21	20,04	17,91	8,78

*Suma tačnosti za 3 koncentracije podeljena sa brojem koncentracija

** Koeficijent varijacije tačnosti za 3 koncentracije

Granice detekcije i kvantifikacije. Granice detekcije i granice kvantifikacije metode MET-LC-R2 su prikazane u tabeli 4.4-10. Granice detekcije pirimetanila kreću se od 0,002 mgkg⁻¹ za matriks Greni Smita do 0,008 mgkg⁻¹ za matriks Ajdareda i Zlatnog Delišesa. Granice detekcije ciprodinila kreću se od 0,003 mgkg⁻¹ za matriks Greni Smita do 0,008 mgkg⁻¹ za matriks Zlatnog Delišesa. Granice detekcije boskalida su ujednačene kroz sva tri matriksa i kreću se od 0,007 do 0,009 mgkg⁻¹. Granice detekcije trifloksistrobina su više u odnosu na pirimetanil, ciprodinil i boskalid kreću se od 0,012 mgkg⁻¹ za matriks Ajdareda do 0,021 mgkg⁻¹ za matriks Greni Smita. Granice detekcije bifentrina su više u odnosu na granice detekcije ostalih analita i kreću se od 0,014 mgkg⁻¹ za matriks Greni Smita do 0,039 mgkg⁻¹ za matriks Ajdareda.

Tabela 4.4-10 Granice detekcije i granice kvantifikacije metode MET-LC-R2 (mgkg⁻¹)

	Pirimetanil	Ciprodinil	Boskalid	Trifloksistrobin	Bifentrin
Ajdared					
LOD	0,008	0,005	0,007	0,012	0,039
LOQ	0,024	0,015	0,021	0,036	0,12
Zlatni Delišes					
LOD	0,008	0,008	0,008	0,013	0,025
LOQ	0,024	0,024	0,024	0,039	0,075
Greni Smit					
LOD	0,002	0,003	0,009	0,021	0,014
LOQ	0,006	0,009	0,027	0,063	0,042

5 DISKUSIJA

5.1 Hemijsko-tehnički aspekt razvijenih metoda

Razvijeno je ukupno 7 metoda, koje se razlikuju u proceduri pripreme uzoraka i instrumentalnoj tehnici analize (Tabela 5.1-1). Od 7 metoda, kod 4 metode je razvijena nova priprema uzorka, a kod 3 metode priprema uzorka uključuje QuEChERS varijante.

Metode MET-GC-R i MET-GC-Q uključuju zasnivaju se na analizi uzoraka instrumentalnom tehnikom gasne hromatografije kuplovane sa masenom spektrometrijom, a razlikuju se u proceduri pripreme uzoraka. Metoda MET-GC-Q implementira acetatnu verziju QuEChERS procedure za pripremu uzoraka, dok se metoda MET-GC-R zasniva na tečno-čvrsto ekstrakciji kore heksanom i sukcesivnoj izmeni heksanskog ekstrakta u metanolni ekstrakt metodom uparavanja do suva i rekonstitucije suvog ostatka u metanolu. S obzirom da se heksanom iz kore pretežno ekstraktuju voskovi i ostala jedinjenja nepolarne prirode, ovaj postupak omogućava njihovo uklanjanje iz finalnog ekstrakta, a time i zaštitu analitičkog instrumenta, prevashodno inleta i kolone gasnog hromatografa. Uzorci pripremljeni prema procedurama obeju metoda su analizirani u SIM režimu masenog spektrometra u trajanju od 15,50 minuta.

Metode MET-LC-R1, MET-LC-Q i MET-LC-R2 zasnivaju se na analizi uzoraka instrumentalnom tehnikom tečne hromatografije kuplovane sa masenom spektrometrijom. Metode MET-LC-R1 i MET-LC-Q se razlikuju u proceduri pripreme uzoraka, dok se metode MET-LC-R1 i MET-LC-R2 razlikuju u tipu masene detekcije, odnosno implementiraju masene spektrometre različitih karakteristika i performansi (Tabela 5.1-1). Metoda MET-LC-Q implementira citratnu verziju QuEChERS procedure za pripremu uzoraka, dok se metode MET-LC-R1 i MET-LC-R2 zasnivaju na tečno-čvrsto ekstrakciji kore acetonitrilom. U postupku razvoja metode MET-LC-R1 upoređene su karakteristike metanola i acetonitrila kao ekstrakcionog sredstva, pri čemu se je acetonitril pokazao kao bolje ekstrakciono sredstvo, jer rezultuje većim prinosom analita. Posledično, acetonitril je kao ekstrakciono sredstvo uvršten u postupak pripreme uzorka u metodi MET-LC-R2, bez prethodnog upoređivanja sa ostalim rastvaračima. Uzorci pripremljeni prema procedurama sve tri metode su analizirani u SRM i CRM režimima masenih spektrometara u trajanju od 25 min.

Metode MET-DI-R i MET-LI-R međusobno se razlikuju u proceduri pripreme uzorka i načinu injekcije uzorka. U odnosu na ostale metode, pored pripreme i načina injekcije uzorka, metode se razlikuju po tome što ne obuhvataju hromatografsko razdvajanje analita pre ulaska u maseni spektrometar. Metode uključuju direktno ubrizgavanje uzorka u maseni spektrometar, putem špric pumpe masenog spektrometra (metoda MET-DI-R) ili direktno ubrizgavanje uzorka u maseni spektrometar putem *LOOP* sistema masenog spektrometra (metoda MET-LI-R), odnosno ubrizgavanje unapred definisane zapremine uzorka (određene zapreminom petlje) u struju mobilne faze koja se kreće prema jonskom izvoru masenog spektrometra. S obzirom na prirodu unošenja uzorka metoda sa direktnim ubrizgavanjem bi trebalo da pokaže veću osetljivost i niže granice detekcije od metode sa *LOOP* ubrizgavanjem.

S obzirom da metoda sa direktnim ubrizgavanjem uzorka podrazumeva unos uzorka u većoj zapremini i dužem trajanju u maseni spektrometar, procedura pripreme uzorka za analizu mora rezultovati krajnjim ekstraktom zadovoljavajuće čistoće, kako bi se sprečila akumulacija koekstrakata iz kore jabuka u jonskom izvoru i posledični štetni efekti. Iz tog razloga procedura pripreme uzorka u okviru metode MET-DI-R uključuje ekstrakciju analita iz kore vodom, sukcesivnu ekstrakciju analita iz vodenog ekstrakta heksanom i krajnju izmenu noseće faze ekstrakta iz heksana u metanol. Svrha prvog koraka pripreme uzorka je da se omogući ekstrakcija analita ekstrakcionim sredstvom koje ne dovodi do istovremene ekstrakcije voskova, a ujedno pruža mogućnost za izvođenje ekstrakcije po principu simultane homogenizacije kore i ekstrakcije, odnosno ekstrakciju kore vodom usitnjavanjem u blenderu. S obzirom da voda kao ekstrakciono sredstvo iz kore povlači i rastvorne soli, naredni korak tečno-tečno ekstrakcije sa heksanom ima za cilj da iz kranjeg ekstrakta eliminiše soli, koje se ako se unesu u ESI jonski izvor u kratkom vremenu mogu deponovati na njegovim delovima i dovesti do problema u radu. Lako isparljivi heksan ujedno omogućava brže uparavanje sekundarnog ekstrakta do suva, radi izmene noseće faze. Izmena noseće faze iz nepolarnog heksana u neki polarniji rastvarač je poželjna, radi povećanja efikasnosti jonizacije analita u izvorima na principu ESI jonizacije. Metoda MET-LI-R implementira citratnu verziju QuEChERS procedure za pripremu uzoraka.

Metode MET-DI-R i MET-LI-R obuhvataju analizu na masenom spektrometru sa 3D jonskom zamkom u *full scan* režimu, u trajanju od 13 odnosno 2 minuta po uzorku, respektivno (Tabela 5.1-1).

Tabela 5.1-1 Pregled razvijenih metoda i njihovih osnovnih karakteristika

Oznaka metode	Priprema uzorka	Način injekcije uzorka	Hrom. tehnika	Tehnika mas. spektr. (jonizacija/analizat or/režim)	Komercijalni naziv mas. spektr.	Trajanje instr. dela analize po uzorku, min
MET-GC-R	1.tečno-čvrsto ekstrakcija heksanom 2.izmena rastvarača uparavanjem	Automatizovana injekcija	Gasna hrom.	EI/transmisioni kvadрупol/SIM	HP MSD 5973	15,50
MET-GC-Q	Oficijelna metoda AOAC 2007.1	Automatizovana injekcija	Gasna hrom.	EI/transmisioni kvadрупol/SIM	HP MSD 5973	15,50

MET-LC-R1	Ekstrakcija acetonitrilom	Automatizovana injekcija	Tečna hrom.	ESI/2D jonska zamka/SRM+CRM	LTQ XL	25,00
MET-LC-Q	Oficijelna metoda EN15662	Automatizovana injekcija	Tečna hrom.	ESI/2D jonska zamka/SRM+CRM	LTQ XL	25,00
MET-DI-R	1. tečno-čvrsto ekstrakcija vodom 2. tečno-tečno ekstrakcija heksanom 3. izmena rastvarača uparavanjem	Delimično automatizovana direktna injekcija preko špric pumpe	nema	ESI/3D jonska zamka/full scan (MS ¹ i MS ²)	LCQ Advantage	13,00
MET-LI-R	Oficijelna metoda EN15662	Delimično automatizovana injekcija preko LOOP-a	nema	ESI/3D jonska zamka/full scan	LCQ Advantage	2,00
MET-LC-R2	Ekstrakcija acetonitrilom	Automatizovana injekcija	Tečna hrom.	ESI/trostruki kvadrupol/SRM	TSQ Quantum Ultra	25,00

Razvijene metode implementiraju različite instrumentalne tehnike odnosno različite načine jonizacije analita, različite režime analize masa i principe detekcije. Samim tim, one pružaju širok spektar varijacija na polju instrumentalne analize, što može biti od značaja ukoliko se uzme u obzir različit nivo opremljenosti laboratorija u Srbiji u pogledu kapitalne opreme.

Razvijene metode pokazuju zadovoljavajuće performanse analize na instrumentima starije generacije poput *HP MSD 5973* ili *LCQ Advantage* masenog spektrometra i na instrumentima novije generacije poput *LTQ XL* ili *TSQ Quantum Ultra* masenog spektrometra. Dve od 7 metoda pružaju mogućnost skrininga tehnikama bez hromatografskog razdvajanja, što je značajno u slučajevima kada su hromatografski delovi analitičke opreme na servisu ili su nedostupni iz drugih razloga.

Različitost u načinima pripreme uzoraka i dužini trajanja instrumentalne analize po uzorku, pruža fleksibilnost na polju hemijskih reagenasa koji se troše i brzine skrininga.

5.2 Hemijsko-analitički aspekt razvijenih metoda

Selektivnost. Kriterijum za potvrdu selektivnosti metoda je odsustvo signala analita na datom vremenu eluiranja analita sa kolone ili na datom vremenu injektovanja uzorka. Vizuelizacija kriterijuma za potvrdu selektivnosti metode kod metoda koje uključuju primenu hromatografije podrazumeva odsustvo hromatogramskog pika na retencionom vremenu analita u hromatogramu blank ekstrakta kore jabuke. Kod razvijenih gasno-hromatografskih metoda, odsustvo hromatogramskog pika znači da na datom retencionom vremenu nema detekcije ciljanih analita, odnosno jona zadatih prilikom definisanja parametara SIM režima masenog

spektrometra. Kod razvijenih tečno-hromatografskih metoda, odsustvo hromatogramskog pika znači da na datom retencionom vremenu nema detekcije ciljanih analita, odnosno *daughter* jona zadatih prilikom definisanja parametara SRM ili CRM režima masenih spektrometara. S obzirom da razvijene tečno-hromatografske metode uključuju instrumentalnu analizu na višem MS nivou (MS² nivo – SRM ili MS³ nivo – CRM) u odnosu na gasno-hromatografske metode (MS¹ nivo – SIM), može se reći da su razvijene tečno-hromatografske metode selektivnije.

Vizuelizacija kriterijuma za potvrdu selektivnosti metode kod razvijenih metoda koje ne uključuju primenu hromatografije podrazumeva odsustvo hromogramskog pika na vremenu injektovanja uzorka u MS² hronogramu blank ekstrakta kore jabuke. Odsustvo hronogramskog pika znači da na datom vremenu injektovanja nema detekcije MS² karakterističnih fragmenata analita. Kod ovih metoda, posle implementacije *full scan* detekcije, ukoliko je prisutan jon na *m/z* ciljanog analita, potrebno je naknadno MSⁿ eksperimentom potvrditi prisustvo/odsustvo analita.

Tabela 5.2-1 prikazuje pregled ishoda validacije razvijenih metoda prema selektivnosti kao validacionom parametru.

Tabela 5.2-1 Pregled ishoda validacije razvijenih metoda prema selektivnosti kao validacionom parametru

Metoda	Kriterijum za potvrdu selektivnosti	Ishod procene selektivnosti
MET-GC-R		Selektivna za 4 analita*
MET-GC-Q	Odsustvo hromatogramskog pika na retencionom vremenu analita u hromatogramu blank ekstrakta kore	Selektivna
MET-LC-R1		Selektivna
MET-LC-Q		Selektivna
MET-DI-R	Odsustvo hronogramskog pika na vremenu injektovanja uzorka u MS ² hronogramu blank ekstrakta kore	Selektivna
MET-LI-R		Selektivna za 3 analita**
MET-LC-R2	Odsustvo hromatogramskog pika na retencionom vremenu analita u hromatogramu blank ekstrakta kore	Selektivna

*delimično selektivna za trifloksistrobin; **nije selektivna za boskalid i bifentrin

Matriks efekat. Metoda čija priprema uzorka rezultuje u neznatnom matriks efektu je metoda MET-GC-R, gde matriks efekat, nezavisno od sorte jabuke, ima maksimalnu vrednost do 4% (poglavlje 4.1.2.2, str. 119). Priprema uzorka metode MET-GC-Q rezultuje u jako izraženom pozitivnom matriks efektu za sve analite, koji se kreće i do 450 % za pirimetanil i ciprodinil, u zavisnosti od koncentracije ovih pesticida (poglavlje 4.1.2.2, str. 119). U metodama koje se zasnivaju na ESI/MS detekciji, matriks efekat je pretežno negativan, što je i očekivano s obzirom na drugačiji mehanizam manifestacije matriks efekta u odnosu na manifestaciju kod GC/MS metoda. Matriks efekat se kreće od -30 do -90 % za metodu MET-LC-R1, od -10 do -30 za četiri analita i oko -70 % za bifentrin za metodu MET-LC-Q, od +5 do -70 % za metodu MET-LC-R2 i od -40 do -89 % za metodu MET-LI-R. Najmanje izražen negativan matriks efekat je procenjen za metodu MET-DI-R i kreće se od -10 do -38 %.

Za većinu metoda, i razvijenih i oficijelnih, uočen je jako izražen matriks efekat. Ukoliko se ovakav matriks efekat ne uzme u obzir, može predstavljati problem prilikom kvantifikacije analita. Uzimanje u obzir u praksi podrazumeva kvantifikaciju standardima pripremljenim u blank ekstraktima kore, jer kvantifikacija standardima na bazi rastvarača ne daje zadovoljavajuće rezultate, zbog značajno promenjenog odziva analita u ekstraktima uzorka.

Linearni opseg. Razvijene metode su linearne u testiranom analitičkom opsegu koji pokriva jedan ili više redova veličine koncentracija analita (Tabela 5.2-2). Utvrđeni linearni opseg metoda zadovoljava potrebe skrininga. Najširi linearni opseg metode MET-GC-R obuhvata koncentracije od 0,01 do 5,00 mgkg⁻¹ i utvrđen je za pirimetanil u kori Greni Smita, za ciprodinil u kori Zlatnog Delišesa i Greni Smita, za trifloksistrobin u kori Ajdareda i Zlatnog Delišesa, za boskalid u kori Zlatnog Delišesa i za bifentrin u kori Ajdareda. Najuži linearni opseg ove metode obuhvata koncentracije od 0,01 do 0,25 mgkg⁻¹ i utvrđen je za boskalid u kori Ajdareda. U zavisnosti od toga da li osetljivost (nagib krive) varira sa koncentracijom pesticida, linearne oblasti predstavljaju jednu neprekidnu oblast (u tabeli označene superskriptom *a*) ili su podeljene u dve i više podoblasti koncentracija (u tabeli označene superskriptima *b* i *c*).

Najširi linearni opseg metode MET-GC-Q obuhvata koncentracije od 0,025 do 5,00 mgkg⁻¹ i utvrđen je za pirimetanil, ciprodinil i trifloksistrobin. Dok je za pirimetanil i ciprodinil ovaj opseg neprekidan, za trifloksistrobin je podeljen u tri podopsega zbog različitog nagiba krive u oblasti viših, srednjih i nižih koncentracija. Različit nagib potiče od varijacije prinosa trifloksistrobina sa promenom koncentracije ovog pesticida, što potvrđuje visok koeficijent varijacije prinosa (Slika 5.2-1). Najuži linearni opseg ove metode obuhvata koncentracije od 0,05 do 1,50 mgkg⁻¹ i utvrđen je za bifentrin. Poredeći linearne opsege metoda MET-GC-R i MET-GC-Q u okviru matriksa Greni Smita može se zaključiti da metoda MET-GC-R sa novorazvijenom metodom pripreme uzoraka pokazuje nešto bolje performanse u odnosu na metodu MET-GC-Q sa QuEChERS metodom pripreme uzoraka, za pirimetanil, ciprodinil, boskalid i trifloksistrobin, dok su im za bifentrin performanse u pogledu linearnosti izjednačene.

Najširi linearni opseg metode MET-LC-R1 obuhvata koncentracije od 0,005 do 5,00 mgkg⁻¹ i utvrđen je za pirimetanil u kori Zlatnog Delišesa i Greni Smita, za ciprodinil u kori Ajdareda i za bifentrin u kori Greni Smita. Najuži linearni opseg ove metode obuhvata koncentracije od 0,075 do 5,00 mgkg⁻¹ i utvrđen je za ciprodinil u kori Greni Smita. Najširi linearni opseg metode MET-LC-R2 obuhvata koncentracije od 0,005 do 2,50 mgkg⁻¹ i utvrđen je za pirimetanil u kori Greni Smita. Najuži linearni opseg ove metode obuhvata koncentracije od 0,01 do 0,25 mgkg⁻¹ i utvrđen je za trifloksistrobin u kori Ajdareda.

Najširi linearni opseg metode MET-LC-Q obuhvata koncentracije od 0,005 do 2,50 mgkg⁻¹ i utvrđen je za trifloksistrobin za varijantu 1 metode koja uključuje korak dSPE sa PSA. Najuži linearni opseg ove metode obuhvata koncentracije od 0,025 do 0,50 mgkg⁻¹ i utvrđen je za ciprodinil. Poredeći linearne opsege metoda MET-LC-R1, MET-LC-R2 i MET-LC-Q u okviru matriksa Greni Smita može se zaključiti da metode MET-LC-R1 i MET-LC-R2 sa novorazvijenom metodom pripreme uzoraka pokazuju nešto bolje performanse u odnosu na metodu MET-LC-Q sa QuEChERS metodom pripreme uzoraka za pirimetanil, boskalid i bifentrin, dok su im performanse za ciprodinil i trifloksistrobin u pogledu linearnosti izjednačene.

Najširi linearni opseg metoda MET-DI-R i MET-LI-R jednak je testiranim analitičkim oblastima u okviru ovih metoda. Ovaj linearni opseg isti je za sve analite i matrikse.

Tabela 5.2-2 Oblasti koncentracija pesticida u kori jabuka (mgkg⁻¹) u okviru kojih je potvrđena linearnost metoda

Metoda	Matriks	Pirimetanil	Ciprodinil	Trifloksistrobin	Boskalid	Bifentrin
MET-GC-R	Ajdared	0,01-1,00 ^b	0,01-1,00 ^b	0,01-5,00 ^b	0,01-0,25 ^a	0,01-5,00 ^b
	Zlatni Delišeš	0,01-1,00 ^b	0,01-5,00 ^b	0,01-5,00 ^c	0,01-5,00 ^b	0,01-1,00 ^b
	Greni Smit	0,01-5,00 ^c	0,01-5,00 ^b	0,015-5,00 ^b	0,025-5,00 ^b	0,02-1,00 ^a
MET-GC-Q	Greni Smit	0,025-5,00 ^a	0,025-5,00 ^a	0,025-5,00 ^c	0,075-5,00 ^a	0,05-1,50 ^a
MET-LC-R1	Ajdared	0,005-1,00 ^a	0,005-5,00 ^b	0,01-5,00 ^a	0,005-2,50 ^b	0,025-5,00 ^b
	Zlatni Delišeš	0,005-5,00 ^a	0,025-2,50 ^a	0,025-5,00 ^a	0,025-2,50 ^a	0,005-1,00 ^a
	Greni Smit	0,005-5,00 ^a	0,075-5,00 ^a	0,005-2,50 ^b	0,01-2,50 ^b	0,005-5,00 ^a
MET-LC-Q	Greni Smit, Var.1	0,005-0,50 ^a	0,025-2,50 ^a	0,005-2,50 ^b	0,025-2,50 ^a	0,01-2,50 ^a
	Greni Smit, Var.2	0,005-1,00 ^a	0,025-0,50 ^a	0,005-0,25 ^a	0,01-1,00 ^a	0,01-1,00 ^a
MET-LC-R2	Ajdared	0,005-1,00 ^a	0,005-0,50 ^a	0,01-0,25 ^a	0,01-2,50 ^b	0,025-2,50 ^b
	Zlatni Delišeš	0,01-2,50 ^a	0,01-2,50 ^b	0,01-5,00 ^b	0,02-5,00 ^a	0,01-2,50 ^b
	Greni Smit	0,005-2,50 ^b	0,005-1,00 ^b	0,01-2,50 ^b	0,01-5,00 ^b	0,005-1,00 ^b
MET-DI-R	Ajdared, Zlatni Delišeš, Greni Smit			0,05-0,75 ^a		
MET-LI-R	Ajdared, Zlatni Delišeš, Greni Smit			0,01-5,00 ^a		

^ajedan neprekidni linearni opseg; ^bsastoji se iz 2 linearna podopsega; ^csastoji se iz 3 linearna podopsega

Tačnost. Tačnost razvijenih metoda je procenjena postupkom spajkovanja uzoraka kore analitima u najranijoj fazi analize, kompletnom obradom uzoraka po datoj metodi i kvantifikacijom analita u spajkovanom uzorku, uzimajući u obzir efekat matriksa. Izračunati prinosi analita izraženi u procentima, upoređeni su sa kriterijumom za prihvatljivu tačnost metode SANTE direktive za validaciju. Tačnost metode je prihvatljiva ukoliko metoda rezultuje prinosima ekstrakcije analita u granicama od 70 – 120 % sa varijacijom u određivanju <20 %. To u praksi znači da rezultate kvantifikacije analita nije potrebno korigovati u skladu sa prinosom ekstrakcije karakterističnim za datu metodu. Prema SANTE direktivi prihvatljiva tačnost se može proširiti na opseg 30 – 140 %, ukoliko je varijacija u određivanju i dalje <20 %. U slučajevima kada metoda rezultuje prinosima izvan definisanih granica, potrebno je pri kvantifikaciji analita uzeti u obzir činjenicu da metoda ima nizak prinos, odnosno u kvantifikaciju analita treba da se uvrste proceduralni standardi.

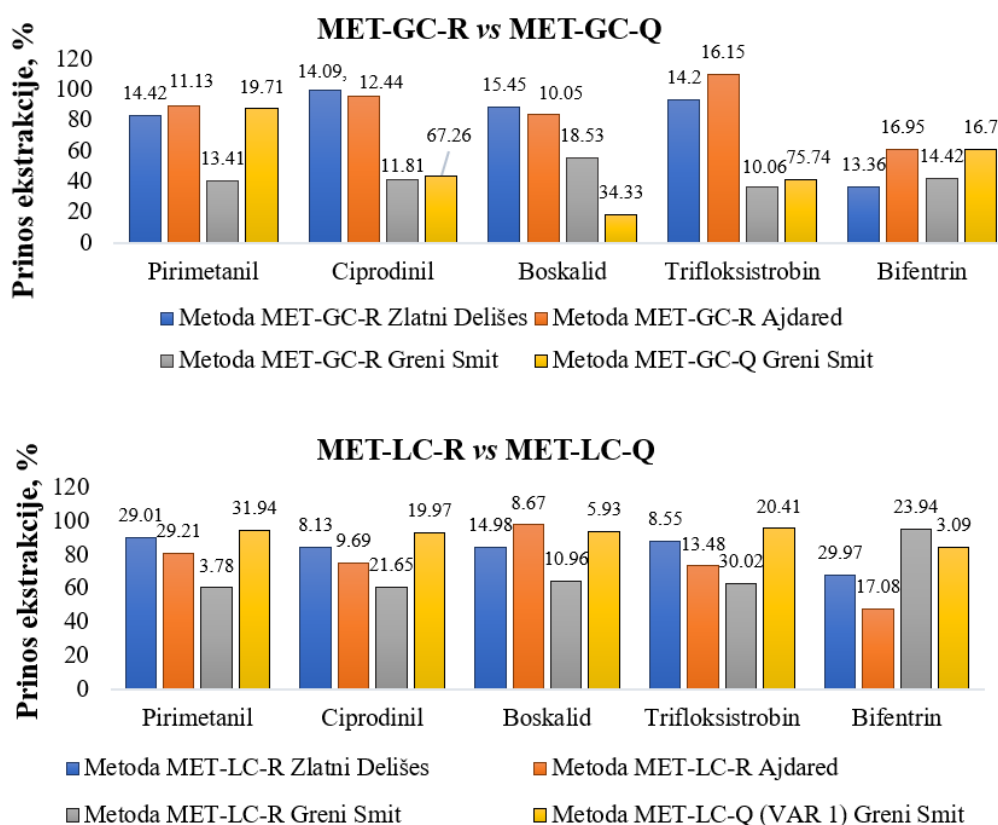
Na slikama 5.2-1 i 5.2-2 prikazani su prinosi ekstrakcije pesticida izraženi kao srednja vrednost prinosa ekstrakcije za 3 nivoa spajkovanja. Brojevi prikazani iznad svake od kolona predstavljaju koeficijent varijacije prinosa ekstrakcije za 3 nivoa spajkovanja, odnosno ovi procenti reprezentuju eventualnu zavisnost prinosa ekstrakcije analita sa promenom njegove koncentracije u uzorku. Gornja granica koeficijenta varijacije nije definisana, ali se može smatrati da varijacije do oko 20 % nisu značajne, odnosno da se prinos ekstrakcije analita ne menja sa promenom njegove koncentracije u uzorku.

Prinosi ekstrakcije analita po metodi MET-GC-R se kreću od 37 % (bifentrin u kori Zlatnog Delišeša) do 110 % (trifloksistrobin u kori Ajdareda). Prinosi ekstrakcije analita po metodi MET-GC-Q kreću se od 18 % za boskalid do 87 % za pirimetanil. Prema navedenim koeficijentima varijacije može se tvrditi da prinosi ekstrakcije većine analita ne zavise od

njihove koncentracije u uzorku. Znatno veća varijacija u prinosima ciprodinila i trifloksistrobina javlja se za metodu MET-GC-Q. Ova varijacija potiče od niskog prinosa pesticida za koncentraciju 0,10 mgkg⁻¹ u odnosu na prinos za ostale dve veće koncentracije (Tabela 4.1-17, str. 145).

Prema kriterijumu SANTE direktive metoda MET-GC-R ima prihvatljivu tačnost. Metoda MET-GC-Q, koja implementira QuEChERS pripremu uzoraka ima prinos ekstrakcije boskalida znatno izvan šire definisane granice (30 – 140 %), dok su prinosi ekstrakcije ciprodinila, trifloksistrobina i bifentrina izvan granice 70 – 120 %. Na slici Slika 5.2-1 se uočava da su prinosi analita iz kore Greni Smita slični, nezavisno od metode i uvek niži od prinosa iz kore Ajdareda i Delišesa, što ukazuje na uticaj sastava kore različitih sorti na prinos analita. Metoda MET-GC-R pokazuje prihvatljive performanse u pogledu tačnosti i ujednačenosti u prinosu analita. Performanse ove metode su uporedive, a u slučaju boskalida i bolje u odnosu na performanse metode MET-GC-Q.

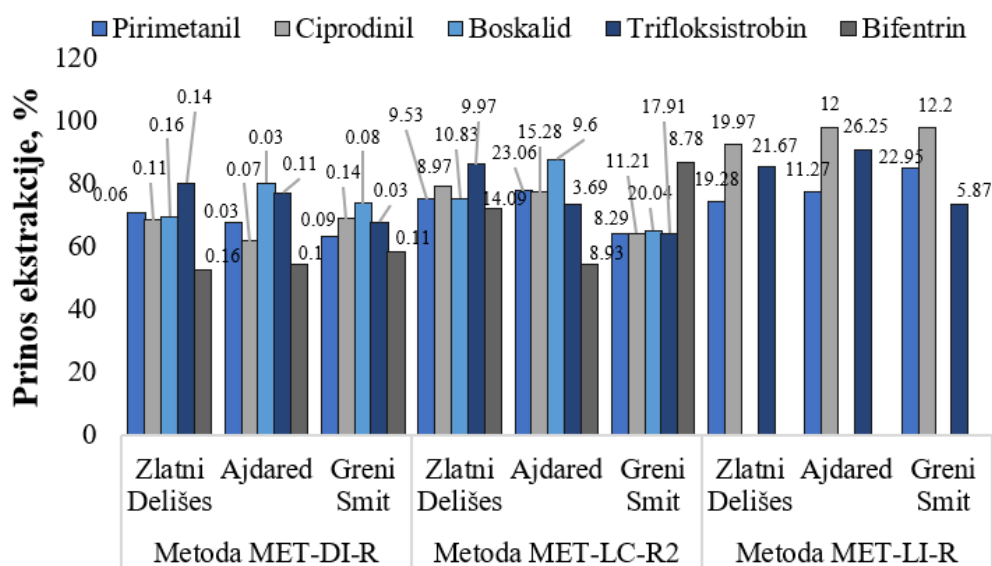
Prinosi ekstrakcije analita po metodi MET-LC-R1 se kreću od 47 % (bifentrin u kori Ajdareda) do 95 % (bifentrin u kori Greni Smita). Prinosi ekstrakcije analita po metodi MET-LC-Q kreću se od 84 % za bifentrin do 96 % za trifloksistrobin. Prema navedenim koeficijentima varijacije, može se tvrditi da prinosi ekstrakcije analita ne zavise od njihove koncentracije u uzorku. Nešto veća varijacija (~30 %) uočava se za prinos pirimetanila po obe metode i za prinos trifloksistrobina i bifentrina po metodi MET-LC-R1. Kada se uporede prinosi ekstrakcije metoda za kore Greni Smita, uočava se za oko 30 % bolji prinos ekstrakcije 4 od 5 analita po metodi koja implementira QuEChERS pripremu uzorka. Prema kriterijumu SANTE direktive obe metode imaju prihvatljivu tačnost.



Slika 5.2-1 Prinosi ekstrakcije analita iz uzoraka obrađenih po razvijenim metodama pripreme uzoraka (metode MET-GC-R i MET-LC-R1) i iz uzoraka obrađenih oficijelnim metodama pripreme uzoraka (metode MET-GC-Q

i MET-LC-Q); prinos ekstrakcije je izražen kao srednja vrednost prinosa za 3 nivoa koncentracije analita; brojevi iznad kolona predstavljaju koeficijent varijacije prinosa za 3 nivoa koncentracije

Prinosi ekstrakcije analita po metodi MET-DI-R kreću se od 53 % (bifentrin u kori Delišesa) do 80 % (boskalid u kori Ajdareda). Prinosi ekstrakcije analita po metodi MET-LI-R kreću se od 73 % (trifloksistrobin u kori Greni Smita) do 98 % (ciprodinil u kori Ajdareda). Prinosi ekstrakcije analita po metodi MET-LC-R2 kreću se od 54 % (bifentrin u kori Ajdareda) do 88 % (boskalid u kori Ajdareda). Maksimalni koeficijent varijacije prinosa ekstrakcije sa koncentracijom analita iznosi 26 %, tako da se može smatrati da sve metode pružaju ujednačenost u prinosu analita, nezavisno od njihove koncentracije. Prema kriterijumu SANTE direktive sve tri metode imaju prihvatljivu tačnost. Nezavisno od metode, prinos za 4 od 5 analita približno spada u granice 70 – 120 %. Prinos za bifentrin spada u šire definisane granice prinosa 30 – 140 %, jer se njegov prinos ekstrakcije iz različitih sorti po metodi MET-DI-R kreće oko 55 %. Nešto niži prinos bifentrina po ovoj metodi u odnosu na ostale dve može se objasniti drugačijom pripremom uzorka, koja u okviru metode MET-DI-R startuje ekstrakcijom kore vodom. Voda kao polarno ekstrakciono sredstvo manje efikasno ekstrahuje najnepolarniji bifentrin, u odnosu na acetonitril koji je početno ekstrakciono sredstvo kod ostale dve metode.



Slika 5.2-2 Prinosi ekstrakcije analita iz uzoraka obrađenih po razvijenim metodama pripreme uzorka (metode MET-DI-R, MET-LI-R i MET-LC-R2) izraženi kao srednja vrednost prinosa za 3 nivoa koncentracije analita; brojevi iznad kolona predstavljaju koeficijent varijacije prinosa za 3 nivoa koncentracije

Granice detekcije. Kada se procenjene granice detekcije razvijenih metoda (mg po kg kore) preračunaju na masu ploda (mg po kg ploda), uzimajući u obzir da kora doprinosi sa oko 10 % celokupnoj masi ploda, moguće ih je porediti sa maksimalno dozvoljenim količinama ispitivanih pesticida u jabukama, koje se, prema pravilnicima, uvek izražavaju u odnosu na celokupnu masu ploda (Tabela 5.2-3). Granice detekcije pesticida svim razvijenim metodama su ispod kritičnih vrednosti ispitivanih pesticida u jabukama.

Granice detekcije pesticida metodom MET-GC-R su od 25 do 50000 puta niže, a metodom MET-GC-Q od 3 do 10000 puta niže od propisanih MDK.

Granice detekcije pesticida metodama MET-LC-R1 i MET-LC-R2 su od 25 do 50000 i od 7 do 75000 puta niže od propisanih MDK. Granice detekcije pirimetanila su od 18000 do 50000 puta niže od MDK granice pirimetanila, u zavisnosti od sorte; granice detekcije ciprodinila su od 2000 do 22000 puta niže od MDK vrednosti za ciprodinil, a boskalida od 600 do 3000 puta niže od MDK granice ovaj pesticid; granice detekcije trifloksistrobina su od nekoliko stotina do nekoliko hiljada puta niže od MDK granice za trifloksistrobin, dok su granice detekcije bifentrina za oko 20 puta niže od propisane MDK vrednosti za bifentrin.

Granice detekcije pirimetanila metodom MET-LC-R2 su i do 75000 puta niže od MDK granice pirimetanila; granice detekcije ciprodinila i boskalida su do nekoliko hiljada puta niže od MDK granica za ove pesticide; granice detekcije trifloksistrobina su nekoliko stotina puta niže od MDK granice za trifloksistrobin, dok su granice detekcije bifentrina od 4 do 7 puta niže od propisane MDK vrednosti za bifentrin. Granice detekcije pesticida varijantom 1 metode MET-LC-Q su od 10 do 37500 puta niže, a varijantom 2 iste metode su od 14 do 50000 niže od propisanih MDK graničnih vrednosti.

Metoda MET-DI-R ima zadovoljavajuće niske granice detekcije, s obzirom da pruža mogućnost detekcije pesticida u uzorku kore sa najmanjom koncentracijom pesticida, koja je dva puta niža od MDK bifentrina, nekoliko hiljada puta niža od MDK ciprodinila, trifloksistrobina i boskalida i 3000 puta niža od MDK pirimetanila.

Metodom MET-LI-R je moguće detektovati količinu pirimetanila i ciprodinila koja je od 1000 do 2000 puta niža i količinu trifloksistrobina koja je od 20 do 30 puta niža od MDK vrednosti utvrđenih za ove pesticide.

Tabela 5.2-3 Granice detekcije pesticida razvijenim metodama izražene na masu kore i na masu ploda i njihovo poređenje sa MDK graničnim vrednostima za pesticide

Metoda	Analit	1. Granica detekcije, mgkg ⁻¹ kore	2. Granica detekcije preračunata na masu ploda, mgkg ⁻¹ ploda	3. MDK, mgkg ⁻¹ ploda	Odnos 3. / 2.	
MET-GC-R	Zlatni Delišes					
		Pirimetanil	0,0052	0,0005	15,00	30000
		Ciprodinil	0,0073	0,0007	2,00	2857
		Trifloksistrobin	0,0004	0,00004	0,70	17500
		Bifentrin	0,0039	0,0004	0,01	25
		Boskalid	0,0037	0,0004	2,00	5000
		Ajdared				
		Pirimetanil	0,0050	0,0005	15,00	30000
		Ciprodinil	0,0082	0,0008	2,00	2500
		Trifloksistrobin	0,0102	0,0010	0,70	700
		Bifentrin	0,0081	0,0008	0,01	12,5
		Boskalid	0,0006	0,00006	2,00	33333
		Greni Smit				
		Pirimetanil	0,0112	0,0011	15,00	13636
		Ciprodinil	0,0056	0,0005	2,00	4000
		Trifloksistrobin	0,0095	0,0009	0,70	777
		Bifentrin	0,0105	0,0010	0,01	10
		Boskalid	0,0096	0,0009	2,00	2222

Metoda	Analit	1. Granica detekcije, mgkg ⁻¹ kore	2. Granica detekcije preračunata na masu ploda, mgkg ⁻¹ ploda	3. MDK, mgkg ⁻¹ ploda	Odnos 3. / 2.	
MET-GC-Q	Greni Smit					
	Pirimetaniil	0,015	0,0015	15,00	10000	
	Ciprodinil	0,013	0,0013	2,00	1538	
	Trifloksistrobin	0,027	0,0027	0,70	260	
	Bifentrin	0,030	0,0030	0,01	3,33	
	Boskalid	0,126	0,012	2,00	166	
MET-LC-R1	Zlatni Delišes					
	Pirimetaniil	0,006	0,0006	15,00	25000	
	Ciprodinil	0,009	0,0009	2,00	2222	
	Boskalid	0,033	0,0033	2,00	606	
	Trifloksistrobin	0,008	0,0008	0,70	875	
	Bifentrin	0,005	0,0005	0,01	20	
	Ajdared					
	Pirimetaniil	0,008	0,0008	15,00	18750	
	Ciprodinil	0,002	0,0002	2,00	10000	
	Boskalid	0,006	0,0006	2,00	3333	
	Trifloksistrobin	0,003	0,0003	0,70	2333	
	Bifentrin	0,004	0,0004	0,01	25	
	Greni Smit					
	Pirimetaniil	0,003	0,0003	15,00	50000	
	Ciprodinil	0,0009	0,00009	2,00	22222	
Boskalid	0,006	0,0006	2,00	3333		
Trifloksistrobin	0,009	0,0009	0,70	777		
Bifentrin	0,004	0,0004	0,01	25		
MET-LC-Q (VAR 1)	Greni Smit					
	Pirimetaniil	0,004	0,0004	15,00	37500	
	Ciprodinil	0,004	0,0004	2,00	5000	
	Boskalid	0,004	0,0004	2,00	5000	
	Trifloksistrobin	0,005	0,0005	0,70	1400	
	Bifentrin	0,010	0,0010	0,01	10	
	MET-LC-Q (VAR 2)	Pirimetaniil	0,003	0,0003	15,00	50000
		Ciprodinil	0,017	0,0017	2,00	1176
		Boskalid	0,005	0,0005	2,00	4000
		Trifloksistrobin	0,002	0,0002	0,70	3500
Bifentrin	0,007	0,0007	0,01	14		
MET-LC-R2	Zlatni Delišes					
	Pirimetaniil	0,008	0,0008	15,00	18750	
	Ciprodinil	0,008	0,0008	2,00	2500	
	Boskalid	0,008	0,0008	2,00	2500	
	Trifloksistrobin	0,013	0,0013	0,70	538	
	Bifentrin	0,025	0,0025	0,01	4	
	Ajdared					
	Pirimetaniil	0,008	0,0008	15,00	18750	
	Ciprodinil	0,005	0,0005	2,00	4000	
	Boskalid	0,007	0,0007	2,00	2857	
	Trifloksistrobin	0,012	0,0012	0,70	583	
	Bifentrin	0,039	0,0039	0,01	2,56	
	Greni Smit					
	Pirimetaniil	0,002	0,0002	15,00	75000	
	Ciprodinil	0,003	0,0003	2,00	6666	
Boskalid	0,009	0,0009	2,00	2222		
Trifloksistrobin	0,021	0,0021	0,70	333		
Bifentrin	0,014	0,0014	0,01	7,14		

Metoda	Analit	1. Granica detekcije, mgkg ⁻¹ kore	2. Granica detekcije preračunata na masu ploda, mgkg ⁻¹ ploda	3. MDK, mgkg ⁻¹ ploda	Odnos 3. / 2.	
Zlatni Delišeš						
MET-LJ-R	Pirimetamil	0,152	0,015	15,00	1000	
	Ciprodinil	0,025	0,002	2,00	1000	
	Trifloksistrobin	0,227	0,023	0,70	30,43	
	Ajdared					
	Pirimetamil	0,096	0,010	15,00	1500	
	Ciprodinil	0,019	0,002	2,00	1000	
	Trifloksistrobin	0,185	0,018	0,70	38,88	
	Greni Smit					
	Pirimetamil	0,120	0,012	15,00	1250	
Ciprodinil	0,017	0,001	2,00	2000		
Trifloksistrobin	0,303	0,030	0,70	23,33		
Zlatni Delišeš/Ajdared/Greni Smit						
MET-DI-R	Pirimetamil	0,05	0,005	15,00	3000	
	Ciprodinil	0,05	0,005	2,00	400	
	Boskalid	0,05	0,005	2,00	400	
	Trifloksistrobin	0,05	0,005	0,70	140	
	Bifentrin	0,05	0,005	0,01	2	

Pregled validacionih parametara razvijenih metoda potvrđuje da metode koje se zasnivaju na tehničkim masenoj spektrometriji poseduju zadovoljavajuću selektivnost i osetljivost koje su potrebne za analizu pesticida u jabukama i opravdava činjenicu da tehnika masene spektrometrije i dalje predstavlja prvi izbor za tu namenu. Uz eventualne modifikacije metode se mogu primeniti i u analizi sličnih matriksa.

Pouzdana detekcija i identifikacija analita je moguća upotrebom bilo kog od ispitivanih režima masene detekcije, počevši od najmanje selektivnog *full scan* režima do najselektivnijeg CRM režima. Iako je stepen selektivnosti implementiranih režima različit, oni rezultuju zadovoljavajućom selektivnošću analize prema targetiranim analitima i zbog toga pružaju mogućnost izbora režima u zavisnosti od aktuelnih mogućnosti i potreba.

Upotreba *full scan* režima uz naknadnu potvrdu prisustva analita MSⁿ monitoringom je vrlo korisna u slučajevima kada je potreban brzi skrining većeg broja uzoraka na veći broj ciljanih analita, kao i u slučajevima *non-target* analiza, jer ne zahteva definisanje parametara karakterističnih za svaki analit, kao ostali režimi. Ukoliko se analit kvalifikuje u uzorku na ovaj način, može se pristupiti njegovoj kvantifikaciji u istom ili u selektivnijem režimu.

Zadovoljavajuća tačnost razvijenih metoda i linearnost koja je potvrđena u domenu targetiranih koncentracija osnovni su faktori koji doprinose niskim granicama detekcije i pouzdanoj kvantifikaciji pesticida u jabukama. Utvrđene granice detekcije pesticida u kori odnosno plodu jabuke, značajno su niže od propisanih MDK vrednosti za pesticide, tako da se razvijene metode mogu uspešno koristiti u domenu preliminarnog skrininga za utvrđivanje koncentracije pesticida u jabukama i procene kvaliteta plodova u odnosu na MDK.

GC/MS analiza heksanskih ekstrakata i UV/VIS analiza vodenih, metanolnih i acetonitrilnih ekstrakata kore ispitivanih sorti jabuka, pokazale su da postoje razlike u sortama. Kora sorte Greni Smit se ističe po većem sadržaju voskova, a kora sorte Zlatni Delišes po većem sadržaju pigmentata. Imajući u vidu da je povećan udeo voskova Greni Smita pokazao uticaj na prinos ekstrakcije bifentrina, kao i na manifestaciju matriks efekta (metoda MET-GC-R), opravdano je u pojedinim slučajevima ispitivane sorte posmatrati kao različite matrikse.

5.3 Ekonomski aspekt razvijenih metoda

U okviru ovog istraživanja sagledane su finansijske komponente razvijenih metoda i prikazana je metodologija obračuna približne cene skrininga na primeru jedne metode. Izvršena je komparativna analiza ekonomičnosti razvijenih i oficijelnih metoda.

5.3.1 Finansijska analiza skrining metoda i metodologija obračuna cene skrininga

5.3.1.1 Kategorizacija finansijskih troškova

Za razvijene metode izvršeno je poređenje ukupnih troškova skrininga po uzorku u zavisnosti od broja obrađenih uzoraka u datom periodu (jedna godina). Najveći udeo u ukupnom trošku skrininga se odnosi na fiksni deo troškova, koji je zajednički za obe metode u okviru jednog para, a odnosi se na troškove vezane za potrošnju struje, održavanje analitičkih i pomoćnih instrumenata i na režijske troškove koji uključuju naknade za rad drugih sektora u okviru institucije (Tabela 5.3-1). Varijabilni troškovi kao deo ukupnih troškova skrininga uključuju troškove vezane za angažovanje analitičara, za potrošnju materijala i uključuju amortizaciju za korišćenje analitičkih instrumenata.

Troškovi su kategorisani prema svojoj prirodi i prema prirodi operacija na koje se odnose. **Fiksni troškovi** su podeljeni na ukupno 4 kategorije (Tabela 5.3-1). U kategoriju 1 spada iznos za utrošak električne energije na godišnjem nivou potreban za funkcionisanje hemijske laboratorije i za obradu i analizu uzoraka, u kategoriju 2 spada iznos za trošak godišnjeg održavanja instrumenata, u kategoriju 3 spada iznos za trošak godišnjeg održavanja pomoćnih instrumenata, poput analitičkih vaga, blendera, ultrazvučnih kupatila, automatskih pipeta, vakuum isparivača, isparivača na principu zagrevanja itd. Kategorija 4 obuhvata godišnje režijske troškove poput naknada za obračun i isplatu zarada, održavanje higijene prostorija i majstorske usluge itd.

Varijabilni troškovi su podeljeni na narednih 5 kategorija (Tabela 5.3-1). Prva kategorija varijabilnih troškova (kategorija 5) uključuje naknadu za angažovanje analitičara/tehničara. Procenjene cene radne snage se odnose na Republiku Srbiju; procenjena cena rada analitičara je za oko 33 % viša u odnosu na cenu rada tehničara. U zemljama zapadne Evrope najčešće postoji jasna razlika u opisu posla tehničara i analitičara, pri čemu se tehničar striktno bavi segmentima analize poput pripreme uzoraka, kondicioniranja analitičkih instrumenata i instrumentalne analize, a analitičar se bavi segmentima obrade, tumačenja i izdavanja rezultata. U naučno-istraživačkim sektorima fakulteta i namenskim laboratorijama u Republici Srbiji poslovi tehničara i analitičara su neretko objedinjeni i obavljaju se od strane analitičara, tako da je u procenu ukupnih troškova analize uključena naknada isključivo za rad analitičara.

Naredna kategorija (kategorija 6) obuhvata naknade za amortizaciju za korišćenje analitičkih instrumenata. Amortizacije za korišćenje različitih instrumentalnih konfiguracija implementiranih u razvoj metoda su procenjene za radni vek instrumenata jednak 100000 uzoraka. Osnovna razlika u ceni amortizacije za različite konfiguracije potiče od različitih tržišnih cena samih instrumenata i različitog broja obrađenih uzoraka u okviru jednog radnog sata, što zavisi od trajanja instrumentalne analize kao karakteristike analitičke metode i od drugih faktora. S obzirom da se raspon cena za instrumentalne konfiguracije kreće od približno 200000 € (CONF-1) do približno 450000 € (CONF-2) i da se broj obrađenih uzoraka u radnom satu instrumenta kreće od 2,4 (metode MET-LC-R1, MET-LC-Q i MET-LC-R2) do 30 uzoraka (metoda MET-LI-R), cene za amortizaciju se kreću od 14 do 148 RSD po radnom minutu instrumentalne konfiguracije (Tabela 5.3-1).

Kategorije 7, 8 i 9 se odnose na troškove vezane za potrošnju hemijskih resursa. Ovi troškovi su podeljeni u različite kategorije da bi se ukazalo na različitu prirodu njihovog obračuna, koja zavisi od prirode operacija koje prate. U kategoriju 7 svrstani su resursi čija potrošnja raste linearno sa porastom broja obrađenih uzoraka, a vezana je za segment instrumentalne analize (helijum se koristi kao noseći gas u GC/MS analizi i kao kolizionni i *damping* gas u LC/MS/MS analizi; azot se koristi kao *sheath/aux* gas u ESI/MS analizi; metanol, voda i formijadni pufer se koriste kao mobilne faze u LC/MS analizi itd.).

Kategorija 8 obuhvata resurse koji se u okviru jedne analize, bilo da ona uključuje jedan ili veći broj uzoraka, koriste samo jednom i to za pripremu reagenasa. Tako se 1 mg svakog analitičkog standarda pesticida upotrebljava za pripremu primarnog *stock* rastvora, koji se dalje koristi za pripremu sekundarnih *stock* rastvora, neophodnih u kvantifikaciji količine pesticida u uzorcima ili u validacionim procedurama. Kalibranti se upotrebljavaju za regularne periodične kalibracije analitičkih instrumenata. Glacijalna sirćetna kiselina se upotrebljava za pravljenje ekstrakci-onog sredstva za metodu MET-GC-Q, dok se mravlja kiselina i amonijum-formijat koriste za pravljenje mobilne faze za metode koje uključuju upotrebu HPLC-a.

Kategorija 9 obuhvata hemijske resurse čija potrošnja raste linearno sa porastom broja obrađenih uzoraka, a vezana je za segment pripreme uzoraka. Azot i metanol su svrstani u kategorije 7 i 9, za šta je pojašnjenje dato u zaglavlju tabele Tabela 5.3-1.

Tabela 5.3-1 Pregled i specifikacija troškova uključenih u finalnu cenu analize svih razvijenih metoda

Troškovi	Kategorija troškova**	Iznos, RSD
Fiksni troškovi*		
Cena struje ^a	1	100000
Održavanje instrumentalne konfiguracije 1 ^b	2	50000
Održavanje instrumentalne konfiguracije 2, 3 ili 4 ^b	2	150000
Amortizacija za pomoćne instrumente	3	40000
Režijski troškovi ^c	4	25000
Varijabilni troškovi		
Radni sat hemičara analitičara (bruto)	5	600
Amortizacija za instr. konf. 4/radni min.***	6	14
Amortizacija za instr. konf. 2/radni min.***	6	22
Amortizacija za instr. konf. 3/radni min. (MET-DI-R)***	6	25

Amortizacija za instr. konf. 3/radni min. (MET-LI-R)***	6	148
Amortizacija za instr. konf. 1/radni min.***	6	16
Helijum čistoće 5.0 (8 000 L)	7	32000
Azot čistoće 5.0 (8 000 L)	7, 9	2900
Argon čistoće 5.0 (8 000 L)	7	3600
Analitički standard pirimetanila (100 mg)	8	9272
Analitički standard ciprodinila (100 mg)	8	9272
Analitički standard boskalida (100 mg)	8	9272
Analitički standard trifloksistrobina (100 mg)	8	9272
Analitički standard bifentrina (100 mg)	8	9272
ProteoMass LTQ/FT ESI+ CalMix (10 mL)	8	28000
Heksan HPLC čistoće (2 500 mL)	9	3000
Acetonitril HPLC čistoće (2 500 mL)	9	3282
Metanol HPLC čistoće (2 500 mL)	7, 9	1162
Voda HPLC čistoće (2 500 mL)	7	1188
Glacijalna sirćetna kiselina, (500 mL)	8	4673
Mravlja kiselina (1 000 mL)	8	4814
Formirana cena za formijatni pufer (1 000 mL)	7	490
QuEChERS paket 1 (50 kom.)	9	5900
QuEChERS paket 2 (100 kom.)	9	8903
QuEChERS paket 3 (50 kom.)	9	6490
QuEChERS paket 4 (50 kom.)	9	6782
QuEChERS paket 5 (50 kom.)	9	8330
QuEChERS paket 6 (50 kom.)	9	15930
Nastavci za automatsku pipetu (500 kom.)	9	1340
Mikrofiltri (100 kom.)	9	4000
Viale za instrumentalu analizu (100 kom.)	9	1800
Konusne viala za ekstrakciju (50 kom.)	9	1404
Amonijum-formijat (250 g)	8	1660

*Troškovi na godišnjem nivou (a Cena kWh za pravna lica; b Godišnji servis instrumenta od strane ovlašćenog servisa; c Troškovi uključuju usluge drugih sektora unutar institucije)

**Troškovi su kategorisani prema prirodni operacije koju prate (redni broj kategorije je nasumično dodeljen i nema veze za iznosom troška); u kategoriju 8 spadaju troškovi za hemikalije koje se u okviru analize upotrebe jednom za pravljenje reagenasa; u kategoriju 7 spadaju troškovi za hemikalije čija potrošnja raste linearno sa porastom broja analiziranih uzoraka, ali se ne koriste u okviru postupka pripreme uzorka, već kao resursi za instrumentalnu analizu; u kategoriju 9 spadaju troškovi za hemikalije čija potrošnja raste linearno sa porastom broja analiziranih uzoraka i koriste se u okviru postupka pripreme uzorka. Troškovi za azot i metanol se svrstavaju u dve kategorije, jer se troše u dve različite operacije u zavisnosti od metode – azot se troši kao gas za uparavanje do suva kod MET-GC-R metode i kao *sheath/aux* gas kod metoda sa instrumentalnim konfiguracijama 2-4, dok se metanol troši kao sekundarno ekstrakciono sredstvo kod MET-GC-R metode i kao mobilna faza kod metoda sa instrumentalnim konfiguracijama 2-4.

***Amortizacija (A, RSD/min) je izračunata za radni vek instrumenta od 100000 uzoraka:

$$A = \frac{\text{cena instrumenta u evrima}}{\text{radni vek}} \times \frac{60 \text{ min}}{\text{trajanje instrum. analize}} \times \frac{1}{60 \text{ min}} \times 119 \text{ RSD}$$

Cena od 25 RSD za amortizaciju za instrumentalnu konfiguraciju 3 se odnosi na metodu MET-DI-R, a cena od 148 RSD se odnosi na metodu MET-LI-R

5.3.1.2 Radne operacije u okviru metoda i metodologija obračuna cene skrininga

Radne operacije i njihova klasifikacija prema promeni njihovog trajanja sa porastom broja obrađenih uzoraka na primeru metode MET-GC-R prikazani su u tabeli Tabela 5.3-2. Tabela takođe prikazuje koja radna operacija zahteva angažovanje analitičara i ukupan utrošak vremena analitičara po operaciji po jednom uzorku.

U kategoriju 1 radnih operacija spadaju one operacije čije je trajanje fiksno i ne zavisi od broja obrađenih uzoraka. Tako će se samo jednom, u određenom trajanju, izvršiti priprema hemikalija i pribora za analizu, priprema kalibranta i kalibracija instrumenta, priprema serije kvantifikacionih standarda koja će pokriti kvantitativnu analizu kako jednog tako i većeg broja uzoraka, izrada kvantifikacione metode, kao i automatska softverska obrada rezultata, čije je trajanje zbog računarske automatizacije približno isto i za jedan i za veći broj uzoraka.

U kategoriju 2 radnih operacija spadaju operacije čije trajanje zavisi od broja obrađenih uzoraka i raste linearno sa porastom broja obrađenih uzoraka.

U kategoriju 3 spadaju radne operacije koje su automatizovane, kao ekstrakcija mućkanjem upotrebom šejkera, centrifugiranje ili uparavanje uzoraka na uparivaču. Trajanje ovih operacija ne raste u celom toku linearno sa porastom broja obrađenih uzoraka, jer se istovremeno može izvršiti ekstrakcija ili centrifugirati do 50 uzoraka, odnosno istovremeno se može upariti do 20 uzoraka, sve zavisno od kapaciteta pomoćnih instrumenata.

Ukupno trajanje angažovanja radne snage tokom analize je ~55 minuta i kraće je od celokupnog trajanja analize, jer postoje radne operacije koje ne zahtevaju angažovanje analitičara, poput automatizovanih radnih operacija, trajanja same instrumentalne analize, kao i softverske obrade rezultata. Trajanje angažovanja radne snage sa brojem obrađenih uzoraka (parametar **S**, Tabela 5.3-3), a time i naknada za rad, ne prati prostu linearnu zavisnost, zbog postojanja radnih operacija koje uključuju rad analitičara, ali se ne menjaju sa porastom broja obrađenih uzoraka. Iz sličnog razloga se i varijabilni deo naknade za utrošene resurse (parametar **B**, Tabela 5.3-3) ne menja po prostoj linearnoj zavisnosti. U okviru metode MET-GC-R postoji fiksni trošak od 463 RSD koji se ne menja sa porastom broja obrađenih uzoraka, a obuhvata naknadu za utrošak analitičkih standarda pesticida pri pravljenju kvantifikacionih standarda.

Krajnja formula (Tabela 5.3-3) po kojoj je vršen proračun ukupne cene analize po uzorku (y -ose grafika, poglavlje 5.3.2) obuhvata naknade za rad analitičara i za utrošeni materijal za **N** broj obrađenih uzoraka i fiksne troškove.

Tabela 5.3-2 Radne operacije, angažovanje opreme i utrošak materijala prema kategorijama na primeru metode MET-GC-R

Redni broj operacije	Radna operacija	Utrošeno vreme za jedan uzorak, min	Zahteva utrošak iz kategorije
1.	Priprema hemikalija i pribora za rad ¹	10,00	5
Faza pripreme uzorka			
2.	Merenje mase uzorka (1 kg jabuka) ²	0,50	1,3,5
3.	Ljuštenje kore (1 kg jabuka) ²	3,00	5
4.	Homogenizacija kore ²	2,00	1,3,5
5.	Odmeravanje alikvota uzorka za analizu ²	0,30	1,3,5
6.	Ekstrakcija – dodavanje heksana ²	0,20	3,5,9
7.	Ekstrakcija – mućkanje/mešanje ³	10,00	1,3
8.	Centrifugiranje ³	10,00	1,3
9.	Uparavanje do suva ³	12,00	1,9
10.	Izmena rastvarača (dodavanje metanola+vorteksiranje) ²	1,20	1,3,5,9
11.	Mikrofiltriranje ²	0,50	5,9
12.	Odmeravanje u viala za analizu ²	0,10	3,5,9
13.	Obeležavanje viala ²	0,10	5,9
Faza instrumentalne analize			
14.	Priprema kalibranta ¹	2,00	5,8
15.	Kalibracija instrumenta ¹	10,00	1,5,6,7,8
16.	Priprema kvantifikacionih standarda ¹	7,00	3,5,8
17.	Formiranje sekvence ²	0,30	1,5
18.	Trajanje instrumentalne analize ²	15,00	1,6,7
Faza obrade rezultata			
19.	Izrada kvantifikacione metode ¹	15,00	1,5
20.	Softverska obrada rezultata ¹	2,00	1
21.	Tumačenje rezultata ²	3,00	1,5
Ukupni utrošak vremena analitičara po uzorku, min - s*		55,20	/

¹Trajanje operacije se ne menja sa porastom broja obrađenih uzoraka; ²Trajanje operacije raste linearno sa porastom broja obrađenih uzoraka;

³Trajanje operacije ne raste u celom toku linearno sa porastom broja obrađenih uzoraka;

* Suma trajanja svih operacija izuzev operacija 7, 8, 9, 18 i 20 (zbir trajanja svih operacija koje zahtevaju utrošak iz kategorije 5).

Tabela 5.3-3 Formule za izračunavanje ukupnog troška analize po uzorku na primeru metode MET-GC-R

Parametar	Formula	Napomena
Cena analize po uzorku, RSD	$\frac{A + B}{N} + \frac{C}{N}$	y-osa na graficima, poglavlje 5.3.2
N – broj obrađenih uzoraka	/	/
A – naknada za rad analitičara, RSD	$A = \frac{S \times \text{radni sat analitičara (bruto)}}{60 \text{ min}}$	/
S – utrošeno vreme analitičara za N uzoraka, min	$S = 11,2 \text{ min} \times N + 44 \text{ min}$	44 min je ukupno trajanje operacija koje zahtevaju angažovanje analitičara i čije trajanje se ne menja sa porastom broja obrađenih uzoraka (operacije obeležene gornjim indeksom 1 izuzev operacije 20, Tabela 5.3-2) 11,2 min je ukupno trajanje operacija koje zahtevaju angažovanje analitičara i čije trajanje raste linearno sa porastom broja obrađenih uzoraka (operacije obeležene gornjim indeksom 2 izuzev operacije br. 18, Tabela 5.3-2)
B – naknada za utrošene resurse (varijabilni troškovi), RSD	$B = 413 \text{ RSD} \times N + 463 \text{ RSD}$ odnosno $B = N \times \Sigma$ (jedinična cena materijala × utrošena količina)	463 RSD je ukupni trošak za materijal čija se potrošnja ne menja sa brojem obrađenih uzoraka (cena za po 1 mg svakog od analitičkih standarda pesticida); 413 RSD je ukupni trošak za materijal čija potrošnja raste linearno sa porastom broja obrađenih uzoraka
C – naknada za utrošene resurse na godišnjem nivou (fiksni troškovi), RSD	Σ fiksnih troškova	Suma troškova iz kat. 1, 2 (instr. konf. 1), 3 i 4 (215000 RSD)

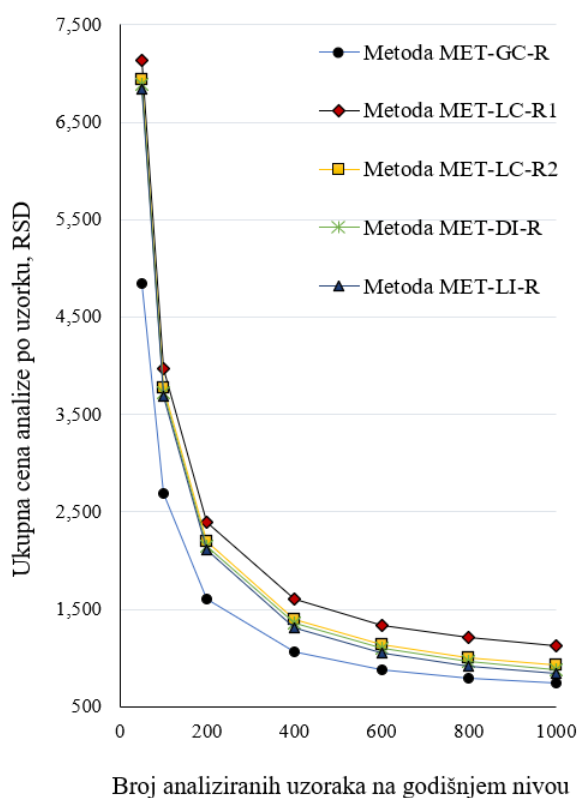
5.3.2 Komparativna analiza ekonomičnosti skrining metoda

Sa porastom broja uzoraka u seriji datih na skrining isplativost postupka skrininga raste (Slika 5.3-1). Sa porastom broja analiziranih uzoraka sa 50 na 100 na godišnjem nivou, prosečna cena skrininga po uzorku se smanjuje za 2000 do 3000 dinara; sa porastom broja analiziranih uzoraka sa 100 na 200 cena skrininga se smanjuje za još 1000 do 1500 dinara u zavisnosti od metode. Cena skrininga po uzorku postaje manje zavisna od broja uzoraka ako on prelazi 600 godišnje. Sa porastom broja uzoraka sa 600 na 800 cena analize po uzorku se smanjuje za 180 do 260 dinara, a sa porastom broja uzoraka sa 800 na 1,000 cena se smanjuje za 50 do 80 dinara u zavisnosti od metode. Kao i u drugim komercijalnim oblastima, velikoserijske analize obično donose uštedu, te je i ovde najisplativije vršiti skrining na 800 do 1000 uzoraka godišnje, odnosno sa kontingentom na mesečnom nivou od najmanje 60-80 uzoraka.

Kada se cene skrininga razvijenim metodama sa pojednostavljenom pripremom uzorka međusobno uporede, uočava se da najjeftiniji skrining pruža metoda MET-GC-R (Slika 5.3-1). Za skrining serije $N = 50$ uzoraka ovom metodom potrebno je izdvojiti sredstva u iznosu od 4845 dinara po uzorku, dok je za skrining istog broja uzoraka npr. metodom MET-LC-R1 potrebno izdvojiti 7135 dinara po uzorku.

Cena skrininga po uzorku metodom MET-GC-R, nezavisno od broja obrađenih uzoraka je u proseku za 20 % niža od cene skrininga metodom MET-LI-R, za oko 23 % niža od cene skrininga metodama MET-DI-R i MET-LC-R2 i za oko 34 % niža od cene skrininga metodom MET-LC-R1. Niža cena skrininga metodom MET-GC-R u odnosu na ostale metode, pretežno potiče od niže cene nabavke i održavanja instrumentalne konfiguracije CONF-1 koju ova metoda implementira u odnosu na cenu nabavke i održavanja ostalih konfiguracija.

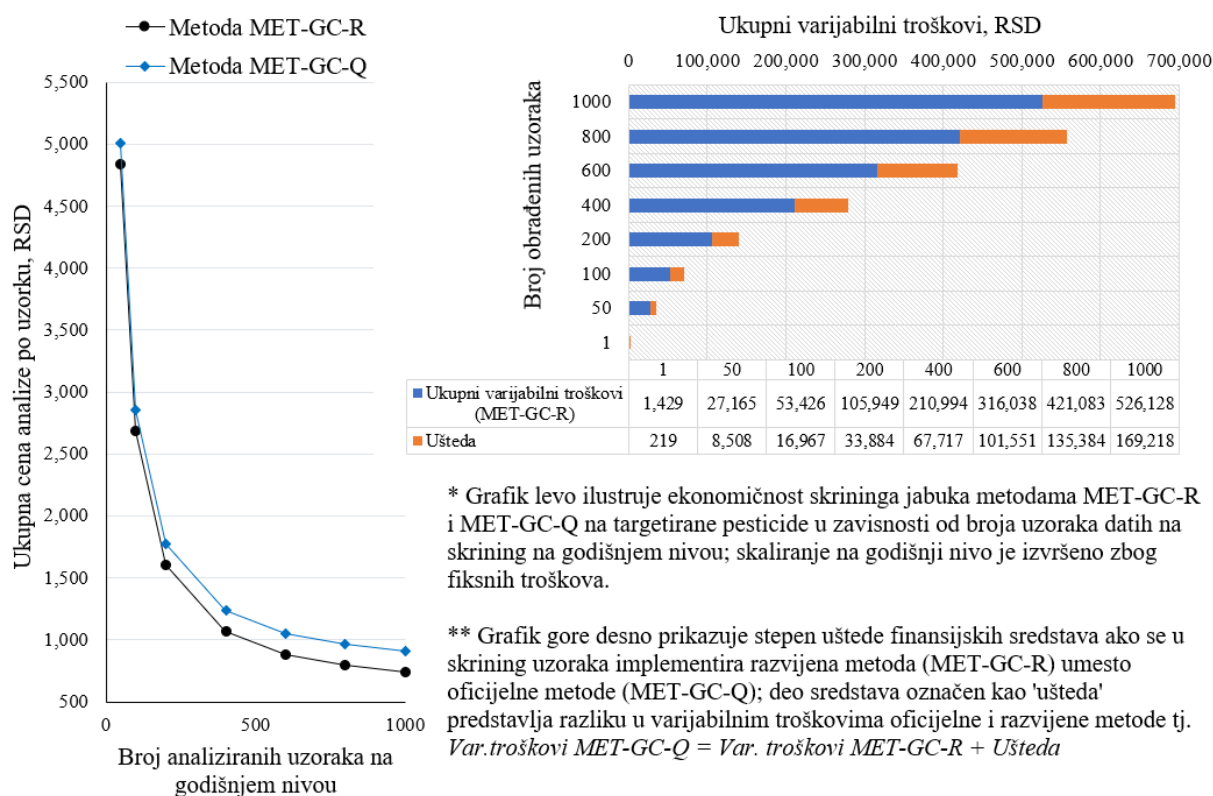
Varijacija u cenama skrininga (50 uzoraka) za metode MET-LC-R1, MET-LC-R2, MET-DI-R i MET-LI-R, koje implementiraju ostale instrumentalne konfiguracije iznosi oko 2 %. Ujednačenost u cenama skrininga potiče od uporedivih troškova održavanja instrumentalnih konfiguracija CONF-2, CONF-3 i CONF-4.



Slika 5.3-1 Ekonomičnost skrininga metodama sa razvijenom pripremom uzorka u zavisnosti od broja uzoraka obuhvaćenog planom skrininga na godišnjem nivou

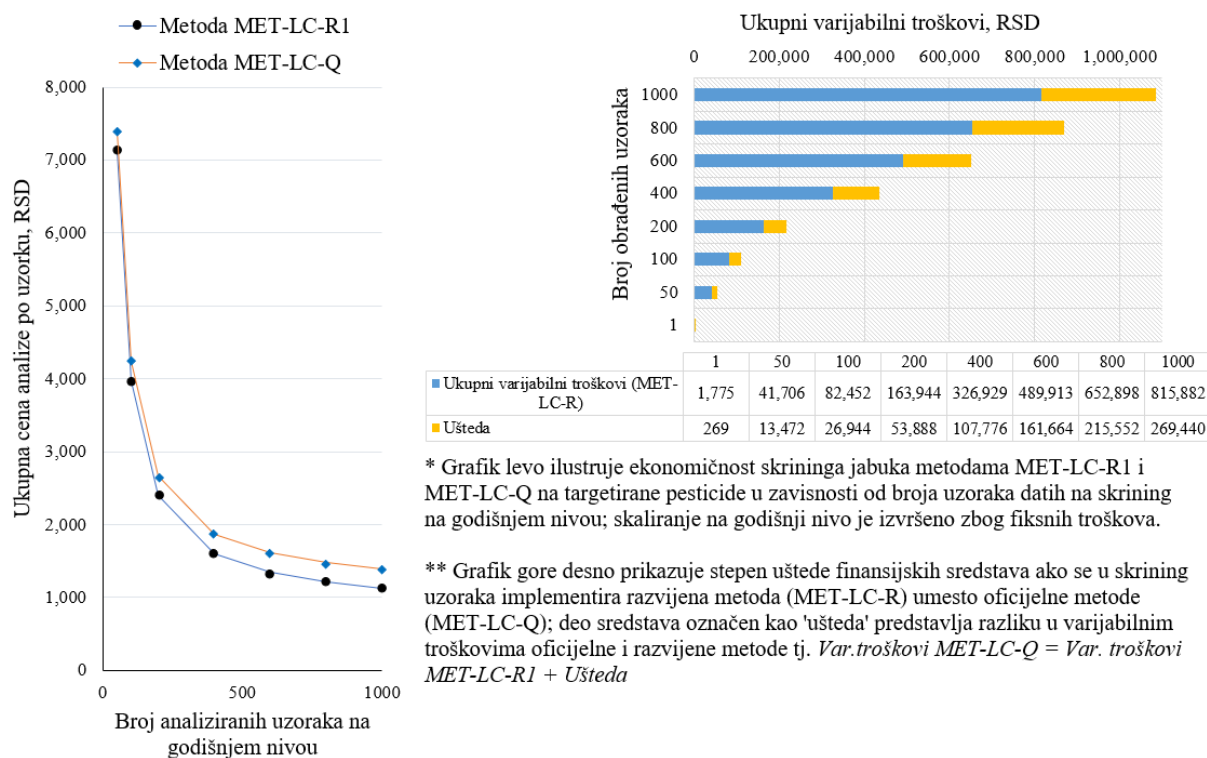
Ekonomičnost metoda MET-GC-R i MET-LC-R1 procenjena je takođe i u odnosu na troškove skrininga metodama MET-GC-Q i MET-LC-Q koje predstavljaju zvanične metode, ali su i analogne metode sa metodama MET-GC-R i MET-LC-R1 u pogledu implementiranih instrumentalnih konfiguracija.

Metoda MET-GC-R je isplativija od metode MET-GC-Q (Slika 5.3-2). Ukupna cena skrininga metodom MET-GC-R je za 3,5 % (50 uzoraka) odnosno 19 % (1000 uzoraka) niža od cene skrininga metodom MET-GC-Q. Apsolutna ušteda u finansijskim sredstvima koja se ostvaruje implementacijom razvijene u odnosu na zvaničnu metodu, procenjena je na bazi varijabilnog dela troškova, po kome se ovaj par metoda najviše i razlikuje. Iako varijabilni trošak za jedan uzorak obrađen metodom MET-GC-R iznosi 1430 dinara, a metodom MET-GC-Q 1648 dinara, ukupna ušteda na godišnjem nivou za nije zanemarljiva (za npr. 1000 obrađenih uzoraka iznosi 169000 dinara odnosno oko 1420 €).



Slika 5.3-2 Poređenje ekonomičnosti skrininga razvijenom i zvaničnom metodom (instr. konf. CONF-1) u zavisnosti od broja uzoraka obuhvaćenog planom skrininga na godišnjem nivou i ušteda u finansijskim sredstvima koja se ostvaruje implementacijom razvijene metode

Metoda MET-LC-R1 je isplativija od metode MET-LC-Q (Slika 5.3-3). Ukupna cena skrininga metodom MET-LC-R1 je za 3,6 % (50 uzoraka) odnosno 19 % (1000 uzoraka) niža od cene skrininga metodom MET-LC-Q. Ušteda u finansijskim sredstvima koja se ostvaruje implementacijom razvijene u odnosu na zvaničnu metodu, procenjena je na bazi varijabilnog dela troškova, po kome se ovaj par metoda najviše i razlikuje. Iako varijabilni trošak za jedan uzorak obrađen metodom MET-LC-R1 iznosi 1775 dinara, a metodom MET-LC-Q 2044 dinara, ukupna ušteda na godišnjem nivou je značajna (za npr. 1000 obrađenih uzoraka iznosi 269000 dinara odnosno oko 2250 €).



Slika 5.3-3 Poređenje ekonomičnosti skrininga razvijenom i zvaničnom metodom (instr. konf. CONF-2) u zavisnosti od broja uzoraka obuhvaćenog planom skrininga na godišnjem nivou i ušteda u finansijskim sredstvima koja se ostvaruje implementacijom razvijene metode

Cena skrininga implementiranim metodama pretežno zavisi od instrumentalne konfiguracije koja se angažuje tokom skrininga. Skrining je isplativiji ukoliko obuhvata veći broj uzoraka na godišnjem nivou; ukoliko se planirani broj uzoraka poveća sa 50 na 1000 uzoraka na godišnjem nivou, cena skrininga po uzorku se smanjuje za oko 85 %.

Implementacija metoda sa razvijenom pripremom uzoraka umesto zvaničnih metoda doprinosi značajnoj uštedi finansijskih sredstava. Za planirani skrining do 1000 uzoraka godišnje apsolutna ušteda iznosi i više od dve hiljade evra.

U cenu skrining metoda razvijenih u okviru ovog istraživanja nije uključen trošak akreditacije metoda i obezbeđivanje ovlašćenja od nadležnih organa za rad laboratorije u smislu izdavanja potvrda o zdravstvenoj ispravnosti namirnica. S obzirom da razvijene skrining metode imaju zadovoljavajuće i uporedive performanse sa zvaničnim metodama, može se zaključiti da one u krajnjem ishodu predstavljaju dobru preliminarnu alternativu i dopunu zvaničnim metodama koje se primenjuju u akreditovanim laboratorijama. To u praksi znači da razvijene metode mogu biti prvi izbor skrininga količine pesticida u voću za potrebe planske interne kontrole od strane malih i srednjih proizvođača, dobavljača ili prerađivača voća ili za potrebe preliminarne procene pred upućivanje uzoraka na zvaničnu analizu u neku od akreditovanih laboratorija.

Ekonomičnost razvijenih metoda posebno dolazi do izražaja u slučaju zahteva za većim brojem niskoserijskih analiza (sa manjim brojem različitih tipova uzoraka u seriji), prema zahtevima tržišta/naručioca skrininga. Za npr. 5-10 uzoraka u seriji relativna ušteda po uzorku je znatno veća u odnosu na uštedu po uzorku u seriji od npr. 1000 analiza zvaničnim metodama. Zbog kraće pripreme uzoraka i same analitičke instrumentalne tehnike, kao i jednostavnije interpretacije rezultata, implementirane metode mogu imati prednost u pogledu fleksibilnosti utroška vremena i laboratorijskih resursa i time na jeftiniji i efikasniji način odgovoriti zahtevima u pogledu preliminarnog skrininga uzorkovanog materijala.

Pri aktuelnim uslovima jake globalne konkurencije u savremenoj poljoprivrednoj proizvodnji i plasmanu hrane, sa jedne strane i povećanim zahtevima za ispitivanje zdravstvene ispravnosti namirnica u pogledu reziduala pesticida, sa druge strane, rezultati sprovedenih istraživanja pokazuju da razvijene analitičke metode mogu imati primenu kod šireg spektra korisnika, od individualnih proizvođača do manjih i srednjih preduzeća, u pogledu podrške njihovim privrednim aktivnostima.

6 ZAKLJUČAK

- U okviru istraživanja razvijeno je i validovano 7 metoda za potrebe preliminarnog skrininga pesticida u jabukama, baziranih na masenoj spektrometriji. Metode su razvijene ispitivanjem pet pesticida koji se koriste u tretmanu zasada jabuka (ciprodinil, pirimetanil, trifloksistrobin, boskalida i bifentrin).
- Četiri metode implementiraju novorazvijene – pojednostavljene načine pripreme uzoraka, a tri implementiraju različite verzije QuEChERS pripreme uzoraka. Pet metoda implementiraju hromatografsko razdvajanje analita pre primene masene spektrometrije. Dve metode ne uključuju hromatografiju, već se uzorci unose direktno u maseni spektrometar *direct* i *LOOP injection* tehnikama unošenja uzoraka.
- Razvijene metode implementiraju 4 instrumentalne konfiguracije koje uključuju masene spektrometre različitih generacija, cene i različitih konstrukcija i performansi u domenu osetljivosti i selektivnosti. Primenjeni su maseni spektrometri sa transmissionim i trostrukim kvadrupolom i linearnim i 3D jonskim trapom kao analizatorom i EI i ESI tehnike jonizacije analita.
- Pet od 7 metoda je pokazalo dobru selektivnost; metoda MET-GC-R je delimično selektivna za trifloksistrobin; metoda MET-LI-R, koja uključuje analizu QuEChERS ekstrakata kore jabuke bez hromatografskog razdvajanja, nije selektivna za boskalid i bifentrin.
- Razvijene metode su linearne u opsegu koncentracija koji zadovoljava potrebe skrininga. Razvijene metode poseduju osetljivost zadovoljavajuću za potrebe skrininga, s obzirom da je detekcija analita u uzorcima moguća pri koncentracijama koje su od nekoliko puta do nekoliko desetina hiljada puta niže od propisanih MDK vrednosti za targetirane pesticide.
- Priprema uzoraka i razvijenim i zvaničnim zahtevanim metodama rezultuje zadovoljavajućim prinosom analita, ali ne eliminiše matriks efekat. Uzimajući u obzir ova dva ishoda validacije, kvantifikaciju analita u uzorcima treba vršiti prema standardima pripremljenim u blank testiranim matriksima. S obzirom da je zavisnost matriks efekta od matriksa (kore određene sorte jabuke) uočena za GC/MS metodu, kvantifikacija po ovoj metodi zahteva sagledavanje sorti kao zasebnih matriksa, dok se kvantifikacija po ostalim metodama može vršiti u odnosu na koru bilo koje sorte, koja u tom slučaju predstavlja reprezentativan matriks.

- Razvijene skrining metode imaju zadovoljavajuće i uporedive performanse sa zvaničnim metodama, pa predstavljaju dobru alternativu kao prvi izbor skrininga količine pesticida u jabukama.
- Precizne rezultate skrininga moguće je ostvariti i analizom kore, umesto ploda jabuke, s obzirom da su rezultati ispitivanja migracije targetiranih pesticida kroz koru potvrdili njen retencioni kapacitet. Ispitivanje migracije razvijenom metodom MET-GC-R, pokazalo je da 72 h nakon aplikacije pesticida značajan procenat aplicirane mase ostaje u kori jabuke ili se gubi usled isparavanja sa površine kore. Procenat zadržan u kori iznosi od 30 % (pirimetanil), 55 % (ciprodinil), >70 % (trifloksistrobin) do >80 % (boskalid). Procenat mase bifentrina zadržane u kori je 20 %, dok ostalih 80 % čini gubitak nastao evaporacijom ili degradacijom.
- Implementacija razvijenih skrining metoda umesto zvaničnih doprinosi značajnoj uštedi finansijskih sredstava. Ekonomičnost posebno dolazi do izražaja u slučaju potrebe za većim brojem niskoserijskih analiza, kada je relativna ušteda (ušteda po uzorku) znatno veća u odnosu na relativnu uštedu u visokoserijskim analizama zvaničnim metodama.
- Razvijene metode mogu biti od posebnog značaja za mala i srednja preduzeća i individualne poljoprivredne proizvođače, jer predstavljaju bržu i ekonomičniju alternativu za potrebe preliminarne procene kvaliteta plodova u pogledu reziduala pesticida, koju je poželjno obaviti pre zakonom propisane analize u ovlašćenim akreditovanim laboratorijama, izdavanja sertifikata o ispravnosti i plasmana proizvoda na tržište.
- Varijacije u načinima pripreme uzoraka i implementiranim instrumentalnim analitičkim tehnikama pružaju mogućnost izbora najadekvatnije metode za skrining u pogledu oseljivosti, brzine i isplativosti.
- Skrining targetiranih pesticida u jabukama sa tržišta vršen je metodama MET-GC-R i MET-LC-R1, koje implementiraju tehniku gasne i tačne hromatografije. Skrining koji je obuhvatio uzorke jabuka iz tri supermarketa i pet pijaca sa teritorije grada Niša i jedan zasad jabuka van gradske teritorije nije pokazao prisustvo targetiranih pesticida iznad MDK vrednosti.

7 LITERATURA

- Anastassiades, M., Lehotay, S. J., Štajnbaher, D., & Schenck, F. J. (2003). Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 86(2), 412–431. doi:10.1093/jaoac/86.2.412
- Araujo, P. (2009). Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 877(23), 2224–2234. doi: 10.1016/j.jchromb.2008.09.030
- Ayhan, E. A., & İnam, R. (2020). Square wave stripping voltammetric determination of cyprodinil fungicide in food samples by nanostructured multi walled carbon nanotube paste electrode. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14(3), 1333–1343. doi: 10.1007/s11694-020-00381-9
- Balasuriya, N., & Rupasinghe, H. P. (2012). Antihypertensive properties of flavonoid-rich apple peel extract. *Food Chem*, 135(4), 2320–2325. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.07.023
- Banerjee, K., Ligon, A. P., & Spiteller, M. (2005). Photoisomerization kinetics of trifloxystrobin. *Anal Bioanal Chem*, 382(7), 1527–1533. doi: 10.1007/s00216-005-3336-8
- Banerjee, K., Ligon, A. P., & Spiteller, M. (2007). Spectral elucidation of the acid metabolites of the four geometric isomers of trifloxystrobin. *Anal Bioanal Chem*, 388(8), 1831–1838. doi: 10.1007/s00216-007-1382-0
- Bartlett, D. W., Clough, J. o. M., Godwin, J. R., Hall, A. A., Hamer, M., & Parr-Dobrzanski, B. (2002). The strobilurin fungicides. *Pest Management Science*, 58, 649–662. doi: 10.1002/ps.520
- Bassi, M., Lubes, G., Bianchi, F., Agnolet, S., Ciesa, F., Brunner, K., . . . Oberhuber, M. (2018). Ascorbic acid content in apple pulp, peel, and monovarietal cloudy juices of 64 different cultivars. *International Journal of Food Properties*, 20(sup3), S2626–S2634. doi: 10.1080/10942912.2017.1381705
- Belding, R. D., Blankenship, S. M., Young, E., & Leidy, R. B. (1998). Composition and Variability of Epicuticular Waxes in Apple Cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 123(3), 348–356. doi: 10.21273/JASHS.123.3.348
- Belding, R. D., Sutton, T. B., Blankenship, S. M., & Young, E. (2000). Relationship Between Apple Fruit Epicuticular Wax and Growth of *Peltaster fructicola* and *Leptodontidium elatius*, Two Fungi that Cause Sooty Blotch Disease. *Plant Disease*, 84(7), 767–772. doi: 10.1094/PDIS.2000.84.7.767
- Berton, O., May-de Mio, L. L., & Arantes dos Santos, H. A. (2007). Cyprodinil, Pyrimethanil, Propineb and Trifloxystrobin on apple scab control. *Scientia Agraria*, 8(2), 173–178.
- Bester, K., Bordin, G., Rodriguez, A., Schimmel, H., Pauwels, J., & Van Vyncht, G. (2001). How to overcome matrix effects in the determination of pesticides in fruit by HPLC-ESI-MS-MS. *Fresenius J Anal Chem*, 371(4), 550–555. doi: 10.1007/s002160101020
- Branković, M., Anđelković, D., Kocić, H., & Kocić, G. (2019). Assessment of GC-MS response of selected pesticides in apple matrices related to matrix concentration. *J Environ Sci Health B*, 54(5), 376–386. doi: 10.1080/03601234.2019.1571367.
- Campeanu, G., Neata, G., & Darjanschi, G. (2009). Chemical Composition of the Fruits of

- Several Apple Cultivars Growth as Biological Crop. *Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj*, 37(2), 161-164.
- Cervera, M. I., Portoles, T., Lopez, F. J., Beltran, J., & Hernandez, F. (2014). Screening and quantification of pesticide residues in fruits and vegetables making use of gas chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization. *Anal Bioanal Chem*, 406(27), 6843-6855. doi: 10.1007/s00216-014-7853-1
- Chan, C. C. (2008). Analytical method validation: Principles and practices. In S. C. Gad (Ed.), *Pharmaceutical Manufacturing Handbook, Regulations and Quality* (pp. 727-742): John Wiley & Sons, Inc.
- Chandran, S., & Singh, R. S. P. (2007). Comparison of various international guidelines for analytical method validation. *Pharmazie*, 62, 4-14. doi: 10.1691/ph.2007.1.5064
- Chen, G., Zhang, L.-K., & Pramanik, B. N. (2007). LC/MS: Theory, Instrumentation, and Applications to Small Molecules. In Yuri Kazakevich & R. LoBrutto (Eds.), *HPLC for pharmaceutical scientists* (pp. 281-346): John Wiley & Sons, Inc.
- Cheng, J., Xia, Y., Zhou, Y., Guo, F., & Chen, G. (2011). Application of an ultrasound-assisted surfactant-enhanced emulsification microextraction method for the analysis of diethofencarb and pyrimethanil fungicides in water and fruit juice samples. *Anal Chim Acta*, 701(1), 86-91. doi: 10.1016/j.aca.2011.04.058
- Chernushevich, I. V., Loboda, A. V., & Thomson, B. A. (2001). An introduction to quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *J Mass Spectrom*, 36(8), 849-865. doi: 10.1002/jms.207
- Christia, C., Bizani, E., Christophoridis, C., & Fytianos, K. (2015). Pesticide residues in fruit samples: comparison of different QuEChERS methods using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Environ Sci Pollut Res Int*, 22(17), 13167-13178. doi: 10.1007/s11356-015-4456-0
- Coleman, M. D., O'Neil, J. D., Woehrling, E. K., Ndunge, O. B., Hill, E. J., Menache, A., & Reiss, C. J. (2012). A preliminary investigation into the impact of a pesticide combination on human neuronal and glial cell lines in vitro. *PLoS One*, 7(8), e42768. doi: 10.1371/journal.pone.0042768
- de Sousa, F. A., Costa, A. I. G., de Queiroz, M. E. L. R., Teófilo, R. F., de Pinho, G. P., & Neves, A. A. (2013). Influence of pH and Matrix Components in the Chromatographic Response of Pesticides. *Chromatographia*, 76(1-2), 67-73. doi: 10.1007/s10337-012-2365-7
- Delgado-Pelayo, R., Gallardo-Guerrero, L., & Hornero-Méndez, D. (2014). Chlorophyll and carotenoid pigments in the peel and flesh of commercial apple fruit varieties. *Food Research International*, 65, 272-281. doi: 10.1016/j.foodres.2014.03.025
- Djordjevic, T., & Djurovic-Pejcev, R. (2016). Food processing as a means for pesticide residue dissipation. *Pesticidi i fitomedicina*, 31(3-4), 89-105. doi: 10.2298/pif1604089d
- Douglas, D. J., Frank, A. J., & Mao, D. (2005). Linear ion traps in mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev*, 24(1), 1-29. doi: 10.1002/mas.20004
- Downard, K. (2004a). The Mass Spectrum. *Mass Spectrometry: A Foundation Course* (pp. 10-21): Royal Society of Chemistry.

- Downard, K. (2004b). Tandem Mass Spectrometry. *Mass Spectrometry: A Foundation Course* (pp. 67-83): Royal Society of Chemistry.
- Durkin, P. R. (2015). Bifenthrin: Human Health and Ecological Risk Assessment.
- Đurović Rada, & Đorđević Tijana. (2011). Modern Extraction Techniques for Pesticide Residues Determination in Plant and Soil Samples. In M. Stoytcheva (Ed.), *Pesticides in the Modern World - Trends in Pesticides Analysis* (pp. 221-246): InTech.
- Edison, S. E., Lin, L. A., & Parrales, L. (2011). Practical considerations for the rapid screening for pesticides using ambient pressure desorption ionisation with high-resolution mass spectrometry. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 28(10), 1393-1404. doi: 10.1080/19440049.2011.596165
- Electron ionization – Wikipedia. Pristupljeno 01. Decembra 2021 preko linka: https://en.wikipedia.org/wiki/Electron_ionization
- Erney, D.R., Gillespie, A.M., Gilvydis, D.M., & Poole, C.F. (1993). Explanation of the matrix-induced chromatographic response enhancement of organophosphorus pesticides during open tubular column gas chromatography with splitless or hot on-column injection and flame photometric detection. *J Chrom A*, 638 (1), 57-63. doi: 10.1016/0021-9673(93)85007-T.
- Escarpa, A. & González, M.C. (1998). High performance liquid chromatography with diode-array detection for the determination of phenolic compounds in peel and pulp from different apple varieties. *Journal of Chromatography A* 823, 331–337. doi: 10.1016/S0021-9673(98)00294-5
- Espley R., & Martens. S. (2013). Health Properties of Apple and Pear. In D. H. Margot Skinner (Ed.), *Bioactives in Fruit, Health Benefits and Functional Foods* (pp. 81-100): JohnWiley & Sons, Ltd.
- European Commission. Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed: SANTE/12682/2019; dokument se može naći na linku: <https://www.eurl-pesticides.eu/docs/public/tmpl article.asp?CntID=727>
- Farre, M., Pico, Y., & Barcelo, D. (2013). Direct peel monitoring of xenobiotics in fruit by direct analysis in real time coupled to a linear quadrupole ion trap-orbitrap mass spectrometer. *Anal Chem*, 85(5), 2638-2644. doi: 10.1021/ac3026702
- Fernandes, C., Encarnação, I., Gaspar, A., Garrido, J., Borges, F., & Garrido, E. M. (2014). Influence of Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin on the Photostability of Fungicide Pyrimethanil. *International Journal of Photoenergy*, 2014, 1-8. doi: 10.1155/2014/489873
- Fornstedt, T., Forssén, P., & Westerlund, D. (2015). Basic HPLC Theory and Definitions: Retention, Thermodynamics, Selectivity, Zone Spreading, Kinetics, and Resolution. In Jared L. Anderson, Alain Berthod, Verónica Pino Estévez, & A. M. Stalcup (Eds.), *Analytical Separation Science* (pp. 1-24): Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- FRAC Code List ©*2019: Fungal control agents sorted by cross resistance pattern and mode of action (including FRAC Code numbering). (2019): Fungicide resistance action committee.
- Fraternale D., Ricci D., Flamini G., & Giomaro, G. (2011). Volatiles Profile of Red Apple from Marche Region (Italy). *Records of Natural Products*, 5(3), 202-207.

- Gajendiran, A., & Abraham, J. (2018). An overview of pyrethroid insecticides. *Frontiers in Biology*, 13(2), 79-90. doi: 10.1007/s11515-018-1489-z
- Garrido, J. M. P. J., Rahemi, V., Borges, F., Brett, C. M. A., & Garrido, E. M. P. J. (2016). Carbon nanotube β -cyclodextrin modified electrode as enhanced sensing platform for the determination of fungicide pyrimethanil. *Food Control*, 60, 7-11. doi: 10.1016/j.foodcont.2015.07.001
- Giacinti, G., Raynaud, C., & Simon, V. (2020). Pesticide Interactions with Foodstuffs: Case study of Apple. In P. K. Srivastava, V. Pratap Singh, A. Singh, S. Singh, S. M. Prasad, & D. K. Tripathi (Eds.), *Pesticides in Crop Production: Physiological and Biochemical Action* (pp. 195-214): John Wiley & Sons Canada, Limited.
- Giza, I., & Sztwiertnia, U. (2003). Gas chromatographic determination of azoxystrobin and tifloxystrobin residues in apples. *Acta Chromatographica*, 13, 226-229.
- Grahovac, M., Indjic, D., Tanovic, B., Lazic, S., Vukovic, S., Hrustic, J., & Gvozdenac, S. (2011). Integrated management of causal agents of postharvest fruit rot of apple. *Pesticidi i fitomedicina*, 26(4), 289-299. doi: 10.2298/pif1104289g
- Grotte, M., Duprat, F., Loonis, D., & Piétri, E. (2001). Mechanical Properties of the Skin and the Flesh of Apples. *International Journal of Food Properties*, 4(1), 149-161. doi: 10.1081/jfp-100002193
- Gupta, R. C., & Milatovic, D. (2014). Insecticides. 389-407. doi: 10.1016/b978-0-12-404630-6.00023-3
- Gustavo González, A., & Ángeles Herrador, M. (2007). A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 26(3), 227-238. doi: 10.1016/j.trac.2007.01.009
- He X., & Liu R. H. (2008). Phytochemicals of Apple Peels: Isolation, Structure Elucidation, and Their Antiproliferative and Antioxidant Activities. *J. Agric. Food Chem.*, 56, 9905-9910. doi: 10.1021/jf8015255
- Hecht, E. S., Scigelova, M., Eliuk, S., & Makarov, A. (2019). Fundamentals and Advances of Orbitrap Mass Spectrometry. 1-40. doi: 10.1002/9780470027318.a9309.pub2
- Hercegova, A., Domotorova, M., Kruzlicova, D., & Matisova, E. (2006). Comparison of sample preparation methods combined with fast gas chromatography-mass spectrometry for ultratrace analysis of pesticide residues in baby food. *J Sep Sci*, 29(8), 1102-1109. doi: 10.1002/jssc.200500422
- Heye, U. J., Speich, J., Siegle, H., Steinemann, A., Forster, B., Knauf-Beiter, G., . . . Hubele, A. (1994). CGA 219417: a novel broad-spectrum fungicide. *Crop Protection*, 13(7), 541-549.
- Homutová I., & Blažek J. (2006). Differences in fruit skin thickness between selected apple (*Malus domestica* Borkh.) cultivars assessed by histological and sensory methods. *HORT. SCI. (PRAGUE)*, 33(3), 108-113. doi: 10.17221/3747-HORTSCI
- Hrouzková, S., & Páleníková, A. (2016). Present-day challenges in isolation/preconcentration and determination of endocrine disrupting pesticides by chromatography combined with mass spectrometry. In S. Johnston (Ed.), *Endocrine Disrupting Chemicals* (pp. 1-60): Nova Science Publishers, Inc.
- Hu, Q., Noll, R. J., Li, H., Makarov, A., Hardman, M., & Graham Cooks, R. (2005). The

- Orbitrap: a new mass spectrometer. *J Mass Spectrom*, 40(4), 430-443. doi: 10.1002/jms.856
- Hůšková, R., Matisová, E., & Kirchner, M. (2008). Fast GC–MS Pesticide Multiresidue Analysis of Apples. *Chromatographia*, 68(S1), 49-55. doi: 10.1365/s10337-008-0562-1
- Ishwar, Y., & Ningombam, D. (2017). Pesticides Classification and Its Impact on Human and Environment. In Anil Kumar, J C Singhal, Kuaanan Techato, Luisa T. Molina, Neetu Singh, Prashant Kumar, Pravinder Kumar, Ram Chandra, Santiago Caprio, Seema Upadhye, Seiichiro Yonemura, Surampalli Y Rao, Tian C Zhang, U C Sharma, & Y. P. Abrol (Eds.), *ENVIRONMENTAL SCIENCE AND ENGINEERING* (Vol 6: Toxicology ed., pp. 140-158): Studium Press LLC, USA.
- Jurado, J. M., Alcazar, A., Muniz-Valencia, R., Ceballos-Magana, S. G., & Raposo, F. (2017). Some practical considerations for linearity assessment of calibration curves as function of concentration levels according to the fitness-for-purpose approach. *Talanta*, 172, 221-229. doi: 10.1016/j.talanta.2017.05.049
- Južni Banat - Fruits. Pristupljeno 01. Decembra 2021, preko linka: juznibanat.com
- Kalinowska, M., Bielawska, A., Lewandowska-Siwkiewicz, H., Priebe, W., & Lewandowski, W. (2014). Apples: content of phenolic compounds vs. variety, part of apple and cultivation model, extraction of phenolic compounds, biological properties. *Plant Physiol Biochem*, 84, 169-188. doi: 10.1016/j.plaphy.2014.09.006
- Kern, S. E., Lin, L. A., & Fricke, F. L. (2014). Accurate mass fragment library for rapid analysis of pesticides on produce using ambient pressure desorption ionization with high-resolution mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom*, 25(8), 1482-1488. doi: 10.1007/s13361-014-0912-1
- Khanal, B. P., & Knoche, M. (2014). Mechanical Properties of Apple Skin Are Determined by Epidermis and Hypodermis. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 139(2), 139-147. doi: 10.21273/jashs.139.2.139
- Khanizadeh, S., Tsao, R., Rekika, D., Yang, R., Clarles, M. & Rupasinghe, V. (2008). Polyphenol composition and total antioxidant capacity of selected apple genotype for processing. *Journal of Food Composition Analysis* 21, 396–401. doi: 10.1016/j.jfca.2008.03.004
- Kim, J.-H., Kim, Y.-J., Kwon, Y.-S., & Seo, J.-S. (2016). Development of Multi-residue Analysis of 320 Pesticides in Apple and Rice Using LC-MS/MS and GC-MS/MS. *The Korean Journal of Pesticide Science*, 20(2), 104-127. doi: 10.7585/kjps.2016.20.2.104
- Klein, B., Thewes, F. R., Rogerio De Oliveira, A., Brackmann, A., Barin, J. S., Cichoski, A. J., & Wagner, R. (2018). Development of dispersive solvent extraction method to determine the chemical composition of apple peel wax. *Food Res. Int.*, 116, 611-619. doi: 10.1016/j.foodres.2018.08.080
- Konarska, A. (2012). Differences in the fruit peel structures between two apple cultivars during storage. *Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus*, 11(2), 105-116.
- Kong, Z., Shan, W., Dong, F., Liu, X., Xu, J., Li, M., & Zheng, Y. (2012). Effect of home processing on the distribution and reduction of pesticide residues in apples. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 29(8), 1280-1287. doi: 10.1080/19440049.2012.690347

- Kruve, A., & Leito, I. (2013). Comparison of different methods aiming to account for/overcome matrix effects in LC/ESI/MS on the example of pesticide analyses. *Analytical Methods*, 5(12), 3035. doi: 10.1039/c3ay26551j
- Kruve, A., Leito, I., & Herodes, K. (2009). Combating matrix effects in LC/ESI/MS: The extrapolative dilution approach, *Analytica Chimica Acta*, 651 (1), 75-80. doi:10.1016/j.aca.2009.07.060.
- Lacassie, E., Dreyfuss, M.-F., Daguët, J. L., Vignaud, M., Vignaud, M., & Lachatre, G. (1998). Multiresidue determination of pesticides in apples and pears by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 805, 319-326.
- Lagunas-Allué, L., Sanz-Asensio, J., & Martínez-Soria, M. T. (2015). Mobility and distribution of eight fungicides in surface, skin and pulp in grapes. An application to pyraclostrobin and boscalid. *Food Control*, 51, 85-93. doi: 10.1016/j.foodcont.2014.10.028
- Łata, B., Trampczynska, A., & Paczesna, J. (2009). Cultivar variation in apple peel and whole fruit phenolic composition. *Scientia Horticulturae*, 121(2), 176-181. doi: 10.1016/j.scienta.2009.01.038
- Leide, J., Xavier de Souza, A., Papp, I., & Riederer, M. (2018). Specific characteristics of the apple fruit cuticle: Investigation of early and late season cultivars ‘Prima’ and ‘Florina’ (*Malus domestica* Borkh.). *Scientia Horticulturae*, 229, 137-147. doi: 10.1016/j.scienta.2017.10.042
- Li, F., Min, D., Song, B., Shao, S., & Zhang, X. (2017). Ethylene effects on apple fruit cuticular wax composition and content during cold storage. *Postharvest Biology and Technology*, 134, 98-105. doi: 10.1016/j.postharvbio.2017.08.011
- Liang, X., Liu, X., Dong, F., Xu, J., Qin, D., Li, Y., . . . Zheng, Y. (2013). Simultaneous determination of pyrimethanil, cyprodinil, mepanipyrim and its metabolite in fresh and home-processed fruit and vegetables by a QuEChERS method coupled with UPLC-MS/MS. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 30(4), 713-721. doi: 10.1080/19440049.2013.768777
- Liu, X., Dong, F., Qin, D., & Zheng, Y. (2010). Residue analysis of kresoxim-methyl and boscalid in fruits, vegetables and soil using liquid-liquid extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Biomed Chromatogr*, 24(4), 367-373. doi: 10.1002/bmc.1301
- Macherone, A. (2013). The Future of GC/Q-TOF in Environmental Analysis. In I. Ferrer & E. Michael Thurman (Eds.), *Comprehensive Analytical Chemistry* (Vol. 61, pp. 471-490). Amsterdam, The Netherlands.
- Madej, K., Kalenik, T. K., & Piekoszewski, W. (2018). Sample preparation and determination of pesticides in fat-containing foods. *Food Chem*, 269, 527-541. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.07.007
- Makarov, A., Denisov, E., Kholomeev, A., Balschun, W., Lange, O., Strupat, K., & Horning, S. (2006). Performance Evaluation of a Hybrid Linear Ion Trap/Orbitrap Mass Spectrometer. *Anal Chem*, 78(7), 2113-2120.
- Maragò, E., Michelozzi, M., Calamai, L., Camangi, F., & Sebastiani, L. (2016). Antioxidant properties, sensory characteristics and volatile compounds profile of apple juices from ancient Tuscany (Italy) apple varieties. *European Journal of Horticultural Science*, 81(5), 255-263. doi: 10.17660/eJHS.2016/81.5.4

- Medjakovic, S., Zoechling, A., Gerster, P., Ivanova, M. M., Teng, Y., Klinge, C. M., . . . Jungbauer, A. (2014). Effect of nonpersistent pesticides on estrogen receptor, androgen receptor, and aryl hydrocarbon receptor. *Environ Toxicol*, 29(10), 1201-1216. doi: 10.1002/tox.21852
- Mikulic Petkovsek, M., Slatnar, A., Stampar, F., & Veberic, R. (2010). The influence of organic/integrated production on the content of phenolic compounds in apple leaves and fruits in four different varieties over a 2-year period. *J Sci Food Agric*, 90(14), 2366-2378. doi: 10.1002/jsfa.4093
- Mohammed, A. (2012). Pesticides: Individual To Ecosystem Level Effects. In A. Abrego Gomez & E. L. d. Ortega (Eds.), *Pesticides: Characteristics, Uses and Health Implications* (pp. 103-117): Nova Science Publishers, Inc.
- MPŠV. (2018). *Lista sredstava za zaštitu bilja na osnovu izdatih rešenja o registraciji sredstava za zaštitu bilja*. (110-00-109/2018-09). Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede.
- Navickiene, S., & Ribeiro, M. L. (2001). Asimplified method for the gas chromatographic determination of pyrimethanil residues in fruits. *J. Sep. Sci.*, 24, 470-472.
- Obradović A., Radivojević D., Vajgand D., & Rekanović E. (2013). Priručnik za integralnu proizvodnju i zaštitu jabuke. Beograd: Institut za primenu nauke u poljoprivredi.
- Persic, M., Mikulic-Petkovsek, M., Slatnar, A., & Veberic, R. (2017). Chemical composition of apple fruit, juice and pomace and the correlation between phenolic content, enzymatic activity and browning. *LWT - Food Science and Technology*, 82, 23-31. doi: 10.1016/j.lwt.2017.04.017
- Peters, F. T., Drummer, O. H., & Musshoff, F. (2007). Validation of new methods. *Forensic Sci Int*, 165(2-3), 216-224. doi: 10.1016/j.forsciint.2006.05.021
- Piechowicz, B., Sadlo, S., Szpyrka, E., Stawarczyk, K., Stawarczyk, M., & Grodzicki, P. (2016). Disappearance of some fungicides in mature apples immediately before supplying fruit to the consumer. *Fresenius Environmental Bulletin*, 25(10), 4246-4252.
- Podbielska, M., Szpyrka, E., Piechowicz, B., Sadlo, S., & Sudol, M. (2018). Assessment of boscalid and pyraclostrobin disappearance and behavior following application of effective microorganisms on apples. *J Environ Sci Health B*, 53(10), 652-660. doi: 10.1080/03601234.2018.1474554
- Podbielska, M., Szpyrka, E., Piechowicz, B., Zwolak, A., & Sadlo, S. (2017). Behavior of fluopyram and tebuconazole and some selected pesticides in ripe apples and consumer exposure assessment in the applied crop protection framework. *Environ Monit Assess*, 189(7), 350. doi: 10.1007/s10661-017-6057-5
- Poirier, B. C., Buchanan, D. A., Rudell, D. R., & Mattheis, J. P. (2018). Differential partitioning of triterpenes and triterpene esters in apple peel. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66, 1800-1806. Doi:10.1021/acs.jafc.7b04509
- Poole, C. F. (2007). Matrix-induced response enhancement in pesticide residue analysis by gas chromatography. *J Chromatogr A*, 1158(1-2), 241-250. doi: 10.1016/j.chroma.2007.01.018
- Quechers.com. Pristupljeno 01. Decembra, 2019, preko linka: <https://www.quechers.com/index.php?nav1o=2&nav2o=1&nav3o=0>

- Rasmussen, R. R., Poulsen, M. E., & Hansen, H. C. (2003). Distribution of multiple pesticide residues in apple segments after home processing. *Food Addit Contam*, 20(11), 1044-1063. doi: 10.1080/02652030310001615221
- Reis, E. M., & Carmona, M. A. (2013). Classification of fungicides. In M.N. Wheeler & B.R. Johnston (Eds.), *Fungicides* (pp. 91-104): Nova Science Publishers, Inc.
- Riccio, R., Trevisan, M., & Capri, E. (2006). Effect of surface waxes on the persistence of chlorpyrifos-methyl in apples, strawberries and grapefruits. *Food Addit Contam*, 23(7), 683-692. doi: 10.1080/02652030600627248
- Sadlo, S., Walorczyk, S., Grodzicki, P., & Piechowicz, B. (2016a). Disappearance of captan, boscalid, pyraclostrobin and trifloxystrobin residues in ripe apples during cold storage under controlled atmosphere. *Fresenius Environmental Bulletin*, 25(6), 1959-1965.
- Sadło, S., Walorczyk, S., Grodzicki, P., & Piechowicz, B. (2016b). Usage of the relationship between the application rates of the active ingredient of fungicides and their residue levels in mature apples to creating a coherent system of MRLs. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 123(3), 101-108. doi: 10.1007/s41348-016-0015-2
- Schönherr, J. & Baur, P. (1994). Modelling penetration of plant cuticles by crop protecting agents (CPA) and effects of adjuvants on rates of penetration. *Pesticide Science*, 42(3), 185 - 208. doi: 10.1002/ps.2780420308
- Shimadzu.com_01. Pristupljeno 01. Decembra 2021 preko linka: <https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/lcms-tips/60lab.html>
- Shimadzu.com_02. Pristupljeno 01. Decembra 2021 preko linka: https://www.shimadzu.com/an/lcms/support/fundamental/mass_analyzers.html
- Silvestro, L., Tarcomnicu, I., & Rizea, S. (2013). Matrix Effects in Mass Spectrometry Combined with Separation Methods — Comparison HPLC, GC and Discussion on Methods to Control these Effects. In Ana Varela Coelho & Catarina De Matos Ferraz Franco (Eds.), *Tandem Mass Spectrometry - Molecular Characterization* (pp. 3-37): IntechOpen.
- Simmonds, M. S. J., & Howes, M.-J. R. (2015). Profile of Compounds in Different Cultivars of Apple (*Malus x domestica*). In Monique S.J. Simmonds & Victor R. Preedy (Eds.), *Nutritional composition of fruit cultivars* (pp. 1-18): Elsevier.
- Sleno, L., & Volmer, D. A. (2004). Ion activation methods for tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom*, 39(10), 1091-1112. doi: 10.1002/jms.703
- Soderlund, D. M. (2010). Toxicology and Mode of Action of Pyrethroid Insecticides *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology* (pp. 1665-1686): Elsevier.
- Spengler, R. N. (2019). Origins of the Apple: The Role of Megafaunal Mutualism in the Domestication of *Malus* and Rosaceous Trees. *Front Plant Sci*, 10, 617. doi: 10.3389/fpls.2019.00617
- Stammler, G., Brix, H. D., Nave, B., Gold, R., & Schoefl, U. (2008). Studies on the Biological Performance of Boscalid and its Mode of Action *Modern Fungicides and Antifungal Compounds V*: Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft, Braunschweig, Germany.
- Stevic, M., Tamas, N., Miletic, N., & Vuksa, P. (2015). Different toxicity of the strobilurin fungicides kresoxim-methyl and trifloxystrobin to *Venturia inaequalis* isolates from

- Serbia. *J Environ Sci Health B*, 50(9), 633-637. doi: 10.1080/03601234.2015.1038952
- Tienpont, B., David, F., & Sandra, P. (2006). Fast Screening of Apple Flavor Compounds by SPME in Combination with Fast Capillary GC–MS using a Modular Accelerated Column Heater (MACH) and Quadrupole Mass Spectrometric Detector (qMSD): GERSTEL GmbH & Co. KG.
- Tsao, R. (2016). Apples. 239-248. doi: 10.1016/b978-0-12-384947-2.00040-4
- Tuşa, F. D., Moldovan, Z., Schmutzer, G., Magdaş, D. A., Dehelean, A., Vlassa, M., & Lazar, M. D. (2012). Analysis of flavor compounds by GC/MS after liquid-liquid extraction from fruit juices. 53-57. doi: 10.1063/1.3681965
- van Nocker, S., Berry, G., Najdowski, J., Michelutti, R., Luffman, M., Forsline, P., . . . Ordidge, M. (2012). Genetic diversity of red-fleshed apples (*Malus*). *Euphytica*, 185(2), 281-293. doi: 10.1007/s10681-011-0579-7
- Vieira, F. G. K., Borges, G. D. S. C., Copetti, C., Di Pietro, P. F., Nunes, E. d. C., & Fett, R. (2011). Phenolic compounds and antioxidant activity of the apple flesh and peel of eleven cultivars grown in Brazil. *Scientia Horticulturae*, 128(3), 261-266. doi: 10.1016/j.scienta.2011.01.032
- Wang, J., Cui, Q., Li, H., & Liu, Y. (2016). Mechanical properties and microstructure of apple peels during storage. *International Journal of Food Properties*, 20(5), 1159-1173. doi: 10.1080/10942912.2016.1203934
- Wang, N., Jiang, S., Zhang, Z., Fang, H., Xu, H., Wang, Y., & Chen, X. (2018). *Malus sieversii*: the origin, flavonoid synthesis mechanism, and breeding of red-skinned and red-fleshed apples. *Hortic Res*, 5, 70. doi: 10.1038/s41438-018-0084-4
- Wells, M. J. M. (2003). Principles of extraction and the extraction of semivolatiles from liquids. In S. Mitra (Ed.), *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry* (pp. 37-138): John Wiley & Sons, Inc.
- Whitaker Bruce D., Solomos Theophanes, & Harrison Dawn J. (1997). Quantification of alpha-Farnesene and Its Conjugated Trienol Oxidation Products from Apple Peel by C18-HPLC with UV Detection. *J. Agric. Food Chem*, 45, 760-765.
- Wiest, L., & Olivé, C. C. (2012). Analytical methods for pesticides determination in biological matrices: A review. In A. Abrego Gomez & E. Lugo de Ortega (Eds.), *Pesticides: Characteristics, Uses and Health Implications* (pp. 25-44): Nova Science Publishers, Inc.
- Wojdylo, A., Oszmianski, J., & Laskowski, P. (2008). Polyphenolic Compounds and Antioxidant Activity of New and Old Apple Varieties. *J. Agric. Food Chem.*, 56, 6520-6530. doi: 10.1021/jf800510j CCC: \$40.75
- Wolfe K. L., & Liu R. H. (2003). Apple Peels as a Value-Added Food Ingredient. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 1676–1683. doi: 10.1021/jf025916z
- Wu, J., Gao, H., Zhao, L., Liao, X., Chen, F., Wang, Z., & Hu, X. (2007). Chemical compositional characterization of some apple cultivars. *Food. Chem.*, 103, 88–93. doi: 10.1016/j.foodchem.2006.07.030.
- Wu, J., Gao, H., Zhao, L., Liao, X., Chen, F., Wang, Z., & Hu, X. (2007). Chemical compositional characterization of some apple cultivars. *Food Chemistry*, 103(1), 88-93. doi: 10.1016/j.foodchem.2006.07.030

- Yang, T., Doherty, J., Zhao, B., Kinchla, A. J., Clark, J. M., & He, L. (2017). Effectiveness of Commercial and Homemade Washing Agents in Removing Pesticide Residues on and in Apples. *J Agric Food Chem*, 65(44), 9744-9752. doi: 10.1021/acs.jafc.7b03118
- Zhou, Y., Han, L., Cheng, J., Guo, F., Zhi, X., Hu, H., & Chen, G. (2011). Dispersive liquid-liquid microextraction based on the solidification of a floating organic droplet for simultaneous analysis of diethofencarb and pyrimethanil in apple pulp and peel. *Anal Bioanal Chem*, 399(5), 1901-1906. doi: 10.1007/s00216-010-4567-x

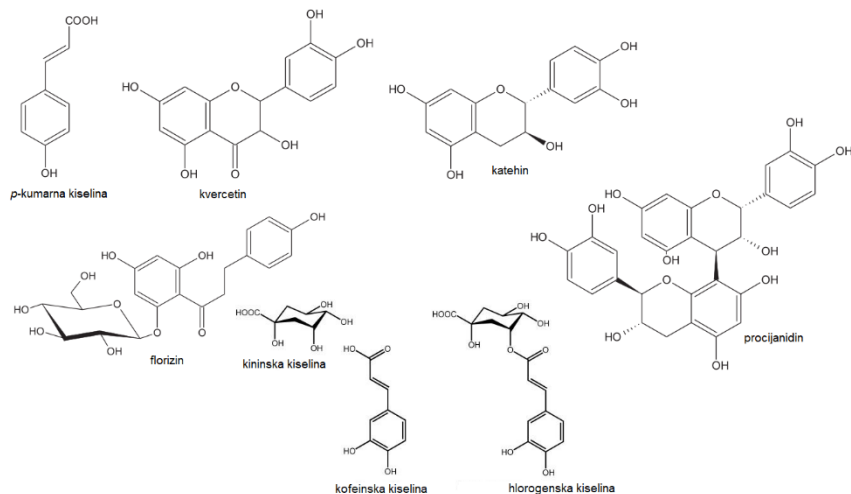
8 PRILOG

8.1 Profil bioaktivnih jedinjenja jabuke

Polifenolna jedinjenja čine glavni deo profila bioaktivnih jedinjenja jabuke (Slika 8.1-1). Osnovne klase ovih jedinjenja koja se mogu naći u jabukama su:

- hidroksi benzojeve kiseline - *p*-hidroksi benzojeva kiselina, protokatehinska, galna, siringinska kiselina;
- hidroksicinaminska kiselina i njeni derivati: *p*-kumarna, kafeinska, ferulinska, hlorogenska kiselina;
- flavonoli - kvercetin i prateći glikozidi; dihidrohalkoni (florizin) i derivati;
- antocijanidini - cijanidini i odgovarajući glikozidi;
- flavanoli – monomerni (epikatehin, katehin); oligomerni (procijanidini).

Flavanoli i prateći oligomeri čine i do 90 % ukupnih polifenola, fenolne kiseline do 31 %, flavonoli do 10 %, a dihidrohalkoni i do 5 % (Wojdylo *et al.*, 2008). Polifenolna jedinjenja su glavni nosioci antioksidativne aktivnosti, a pokazalo se da je njihov ukupni sadržaj u jakoj korelaciji sa stepenom izraženosti enzimskog tamnjenja (Persic *et al.*, 2017).



Slika 8.1-1 Struktura odabranih polifenolnih jedinjenja iz hemijskog profila jabuke

Derivati dihidrohalkona, kao što je florizin (florelin 2'-*O*-glukozid) i florelin 2'-*O*-ksilozilglukozid mogu se naći u svim delovima ploda jabuke (kori, pulpi i srži) te se smatraju karakterističnim jedinjenjima za rod *Malus × domestica*. Poznata je akumulacija ovih jedinjenja u kori jabuke; količine mogu biti i do 10 puta veće nego u pulpi, a često su u korelaciji sa sadržajem flavanola i flavonola (Espley i Martens, 2013). Njihov sadržaj, kao i sadržaj drugih polifenola može varirati u zavisnosti od sorte jabuke. Primer je ekstrakt ploda Zlatnog Delišesa koji sadrži manje florelin 2'-*O*-glukozida (146,8 mgkg⁻¹ suve mase) i florelin 2'-*O*-ksilozilglukozida (7,3 mgkg⁻¹ suve mase), od ekstrakta ploda novije sorte Mekfri (231,3 mgkg⁻¹ suve mase florelin 2'-*O*-glukozida i 203 mgkg⁻¹ suve mase florelin 2'-*O*-ksilozilglukozida). (Simmonds & Howes, 2015).

Od flavonola u jabukama se mogu naći kvercetin-3-*O*-glikozidi i to galaktozid (izokvercitrin), glukozid (izokvercitrin), ramnozid (kvercitrin), rutinozid (rutin), ksilozid (reinoutrin), arabinopiranozid (guiajaverin) i arabinofuranozid (avikularin), dok su glavni predstavnici flavanola (-) Epikatehin i procijanidin B2 (Espley i Martens, 2013).

Prisustvo antocijana u jabukama, a prvenstveno u kori jabuka, varira u zavisnosti od sorte. Kod sorti zelene ili žute boje antocijani se obično nalaze u malim (kora Greni Smita ili Zlatnog Delišesa), a kod sorti crvene boje u znatno većim količinama. Iako se prisustvo antocijana obično vezuje za koru, postoje sorte jabuka sa izraženim sadržajem antocijana u pulpi – sorte sa crvenom pulpom (van Nocker *et al.*, 2012). Među antocijanima koji su identifikovani u sortama crvene boje najzastupljeniji su cijanidin-3-*O*-galaktozidi, dok su u manjim količinama prisutni i cijanidin-3-*O*-arabinozid, cijanidin-3-*O*-glukozid i cijanidin-7-*O*-arabinozid (Espley i Martens, 2013).

Karotenoidi su u komercijalnim sortama jabuke prisutni u mnogo manjim količinama (<2,50 μgg⁻¹) nego kod ostalih vrsta voća, kao što su citrusi (25 μgg⁻¹) ili papaja (60 μgg⁻¹); prisutni su i u kori i u pulpi, pri čemu je glavni karotenoid kore lutein, a pulpe beta-karoten ili neoksantin (Espley i Martens, 2013). Jedna studija je otkrila sadržaj 25 jedinjenja na bazi hlorofila i karotenoida u 13 različitih sorti; u najvećoj količini u pulpi su identifikovani dvostruko esterifikovani ksantofili sa opsegom koncentracija od 3,90 μgg⁻¹ suvog voća (Greni Smit) do 25 μgg⁻¹ suvog voća (Zlatna Montana) i hlorofil *a*, koji je varirao između 0,80 μgg⁻¹ suvog voća (Fudži) i 47 μgg⁻¹ suvog voća (Greni Smit) (Delgado-Pelayo *et al.*, 2014). Rezultati iste studije su pokazali da se sorte zelene boje, kao što je Greni Smit ističu u visokom sadržaju pigmenta i to pogotovo u kori.

Karakterističan predstavnik fenolnih kiselina u jabukama je hlorogenska kiselina, dok je druga po zastupljenosti je *p*-kumaroilkininska kiselina. Sadržaj hlorogenske kiseline, prema rezultatima jedne studije varira među sortama između 118,30 mgkg⁻¹ suvog voća (sorta Ambrozja) i 431,60 mgkg⁻¹ suvog voća (sorta Fudži) (Simmonds & Howes, 2015). Fenolne kiseline dominiraju u srži jabuke, dok im je sadržaj u kori zanemarljiv (Wojdylo *et al.*, 2008).

Jedinjenja koja ne pripadaju klasi polifenola, a sastavni su deo bioaktivnog profila su askorbinska kiselina i šećeri, koja takođe daju doprinos antioksidativnoj aktivnosti i nutritivnoj vrednosti jabuka. Među sortama sadržaj šećera može varirati od 9,53 do 12,34 %, a sadržaj askorbinske kiseline od 25,75 do 77 mg/100g jabuke (Campeanu *et al.*, 2009). Studija koja je obuhvatila ispitivanje 64 sorti jabuka, među kojima su komercijalne i stare sorte, sorte otporne na krastavost, kao i sorte sa crvenom pulpom, pokazala je da je sadržaj askorbinske kiseline po pravilu veći u kori, kao i u starim sortama, dok su komercijalne sorte znatno slabiji izvor

askorbinske kiseline (Bassi *et al.*, 2018). Šećer koji dominira u sortama je fruktoza, a prate je glukoza i sukroza (Wu *et al.*, 2007).

Hemijskoj raznolikosti jabuke značajno doprinosi i spektar isparljivih jedinjenja, koja su odgovorna za karakterističan privlačan miris jabuka. GC/MS analiza organskih ekstrakata jabuke, kao i ekstrakata sokova jabuke otkriva na desetine ovih jedinjenja, koja pripadaju klasama estara, ketona, aldehida, alkohola i terpenoida (Tienpont *et al.*, 2006; Tusa *et al.*, 2012). Sorte se kao i po pitanju sadržaja ostalih jedinjenja, razlikuju i po sadržaju isparljivih jedinjenja. Jedna studija identifikuje estere kao glavnu klasu, sa pratećim alkoholima i aldehydima (Maragò *et al.*, 2016). Specifičan egzotični ukus koje poseduju pojedine sorte crvenih jabuka pripisuju se prisustvu etil-heksanoata (Fraternale *et al.*, 2011).

U sastav jabuka ulaze i zasićene i nezasićene masne kiseline sa 16 i 18 ugljenika u ugljovodoničnom lancu, s tim što više od 70 % ukupnih masnih kiselina čine one sa 18 ugljenika; glavne aminokiseline su serin i asparagin (Wu *et al.*, 2007).

Hemijski i nutritivni profil jabuka nije ujednačen, tj. zavisi od mnogo faktora poput načina uzgajanja, agronomskih uslova pre i posle berbe kao i lokacije uzgajanja, vremenskih uslova, sorte jabuke, zrelosti plodova, uslova skladištenja, pretrpljenih oboljenja ili načina pripreme jabučnih prerađevina (Mikulic Petkovsek *et al.*, 2010), (Espley & Martens, 2013; Kalinowska *et al.*, 2014).

8.2 Bolesti jabuke i zaštita

Efikasna proizvodnja jabuka podrazumeva primenu tretmana i agrotehničkih mera tokom čitavog razvoja jabuke. Na slici Slika 8.2-1 su prikazane osnovne faze u razvoju ploda jabuke.



Slika 8.2-1 Fenofaze u razvoju jabuke (preuzeto iz Obradović *et al.*, 2013)

Najzastupljenija i ekonomski najznačajnija oboljenja stabla ili ploda jabuke pripadaju grupi mikoza i pseudomikoza. Uzročnici ovih oboljenja se aktiviraju u pogodnim uslovima, a to su visoka vlažnost i srednje temperature, koje su karakteristične za kišovito vreme. Da bi se delovalo preventivno po pitanju ovih infekcija, neophodno je znati način prodora patogena u biljku, optimalne uslove razvoja patogena, kao i način odražavanja oboljenja.

Ekonomski najznačajnija mikoza je čađava pegavost i krastavost plodova, čiji je uzročnik *Venturia inaequalis*. Ovo oboljenje je posebno izraženo kada su zastupljena hladnija i vlažna proleća i leta. Oboljenje se manifestuje slabim obrazovanjem pupoljaka, opadanjem nedovoljno zrelih plodova, kao i gubitkom lišća. Suzbijanje oboljenja hemijskim tretmanima se vrši u specifičnim intervalima tokom čitave vegetacije. Vrlo je bitno da se suzbijanju pristupi na samom početku vegetacije, u proleće, odnosno od fenofaze pucanja pupoljaka pa do precvetavanja. Za suzbijanje se koriste sredstva iz klase fungicida. Poznato je da od ukupne potrošnje hemijskih sredstava pri proizvodnji jabuke 75 % čini upotreba fungicida, a od toga 70 % u cilju suzbijanja čađave pegavosti i krastavosti ploda (Obradović *et al.*, 2013). Od fungicida se najčešće koriste nesistemični fungicidi, koji se karakterišu nespecifičnim mehanizmom delovanja i protektivnim dejstvom, iz različitih klasa kao što su ditiokarbamati, ftalimidi ili hinoni. Od sistemskih fungicida, koji se karakterišu specifičnim načinom delovanja i protektivnim, ali i kurativnim dejstvom, koriste se triazoli, strobilurini, anilinopirimidini, piridinkarboksamidi.

Važno je naglasiti da gljivice teško razvijaju otpornost na nesistemične, a znatno lakše na sistemski fungicide; razlog tome je različit način delovanja. Nesistemični fungicidi ne prodiru u biljku, a zaštitnu ulogu ispunjavaju obrazovanjem depozita na površini biljke; stoga je važno da se nanose u više navrata u cilju obnavljanja depozita. Sistemski fungicidi prodiru u biljku i kreću se kroz nju; glavna odlika je specifičan mehanizam delovanja što podrazumeva da predstavljaju interference sa reakcijama u metabolizmu patogena. Rezultati jednog ispitivanja su pokazali da su izolati *V. inaequalis* sa zasada koji je decenijski tretiran strobilurinima, koji pripadaju grupi sistemskih fungicida, manje osetljivi na krezoksim metil i trifloksistrobin od izolata sa zasada koji nijednom nisu bili tretirani tim fungicidima (Stevic *et al.*, 2015).

Od većine sistemskih fungicida, u suzbijanju *V. inaequalis* najefikasniji su fungicidi iz grupe strobilurina. U poređenju sa anilinopirimidinima i triazolima efikasno suzbijaju patogena u najranijoj fazi i to u malim količinama, pa ih je najbolje upotrebiti preventivno dok se bolest nije razvila. Iz ove klase fungicida u Srbiji su za zaštitu jabuke registrovani preparati na bazi trifloksistrobina, krezoksim metila i piraklostrobina (Obradović *et al.*, 2013). Anilinopirimidini se lako usvajaju preko kutikula i lako prolaze voštani sloj listova ili plodova. Jaki su inhibitori rasta micelije. Na nižim temperaturama su efikasniji od na primer triazola, pa su čest izbor za tretmane na početku vegetacije, kada je temperatura niža. U Srbiji su za zaštitu useva jabuke iz ove grupe fungicida registrovani preparati na bazi pirimetanila i ciprodinila (Obradović *et al.*, 2013). Sistemski fungicidi - Inhibitori sukcinat dehidrogenaze predstavljaju relativno novu grupu fungicida. U Srbiji su iz ove grupe za zaštitu jabuke registrovani preparati na bazi boskalida i fluopirama (Obradović *et al.*, 2013).

Pepelnica jabuke je drugo ekonomski najznačajnije oboljenje jabuka, a izazivač je *P. leucotricha*. Jedan od načina suzbijanja ovog oboljenja je i odabir sorti za uzgajanje koje su otpornije na izazivača bolesti. Međutim, pošto su najzastupljenije sorte poput Zlatnog Delišesa, Greni Smita i Ajdareda umereno otporne na *P. Leucotricha*, pomoć u suzbijanju u vidu

hemijskih preparata je neophodna. Od fungicida se koriste triazoli poput penkonazola, tebukonazola, strobilurini (krezoksim metil), sulfamidi (tolilfluanid), hidrokspirimidini i mnogi drugi (Obradović *et al.*, 2013). Oni se primenjuju u intervalima od desetak dana počevši od faze razvijenih cvetnih pupoljaka pa do punog razvijanja ploda. Zlatni Delišes je osetljiv na ovaj patogen, što znači da se fungicidi primenjuju uobičajeno kada se utvrdi prisustvo patogena, dok Ajdared i Greni Smit spadaju u visoko osetljive sorte, koje u svakom slučaju traže primenu fungicida.









Od bolesti iz grupe bakterioza najznačajnija je bakteriozna plamenjača jabuke koja se javlja u skoro svim sadnim regionima. Bolest je izuzetno česta, a suzbijanje je teško, jer patogen pored proizvodnje voća ugrožava i proizvodnju sadnica, kao i podizanje novih zasada. Sam parazit napada sve delove biljke, ali su simptomi najizraženiji na cvastima; mladi plodovi se brzo smežuraju, crne, ali ostaju na granama. Efikasna zaštita se postiže jedino kombinacijom mera, a pre svega u cilju uklanjanja izvora infekcije. Najbolja preventivna mera je sadnja i uzgajanje otpornih sorti. Zlatni Delišes je srednje otporan, dok su Jonatan i Ajdared izuzetno osetljive sorte, ali se ipak uzgajaju. Ukoliko nije moguć odabir otpornih sorti, preventivno se mogu primenjivati baktericidi na bazi bakra u manjim dozama pre i tokom cvetanja. Najveću ulogu u kontroli i suzbijanju plamenjače imaju fizičke mere zaštite, koje podrazumevaju rezidbu delova ili uklanjanje čitavih obolelih stabala sa sadne površine.









Mere zaštite jabuka koje se primenjuju u voćnjaku su značajne za zaštitu voća tokom uzgajanja, ali i zbog naknadne zaštite plodova u skladištima, jer su oboljenja uskladištenog voća identifikovana kao značajan faktor gubitaka u proizvodnji. Takvi gubici mogu se pojaviti ukoliko proizvodi nisu tretirani efikasnim inhibitorima razvoja patogena, ili uskladišteni u uslovima nepovoljnim za njihov razvoj (Grahovac *et al.*, 2011).



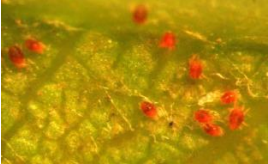






Dva osnovna problema koji se javljaju kod uskladištenih plodova jabuke su gljivične bolesti i fiziološki poremećaji. Klasične skladišne gljivične bolesti su sve vrste truleži, kao i zelena plesan i efiksano se eliminišu primenom fungicida u fazi uzgajanja, posebno poslednjim tretmanima pred berbu. Bolesti skladišnog voća koje su ishod fizioloških poremećaja su skald, plutaste i gorke pege i unutrašnje tamnjenje. Sorta posebno osetljiva na skald je Greni Smit, dok je na pojavu pega osetljiv Zlatni i Crveni Delišes.










Ostale vrste bolesti i štetočina koje se javljaju na jabuci su dati u Tabela 8.2-1.






Tabela 8.2-1 Pregled oboljenja i štetočina jabuke

Oboljenje	Uzročnik	Osetljive sorte	Zaštita	Promene na jabuci/izazivač
Mikoze i pseudomikoze				
Čađava pegavost i krastavost ploda	<i>Venturia inaequalis</i>	Zlatni Delišeš, Ajdared, Jonagold, Greni Smit, Crveni Delišeš, Fudži	Sadnja otpornih sorti; fungicidi iz grupe ditiokarbamata, hinona, strobilurina	
Pepelnica	<i>Podosphaera leucotricha</i>	Zlatni Delišeš, Greni Smit, Jonatan, Jonagold, Ajdared	Fungicidi iz grupe triazola i strobilurina	
Crna trulež	<i>Botryosphaeria obtusa</i>	Većina sorti	Fungicidi iz grupe ditiokarbamata, hinona, strobilurina, ftalimida	
Smeđa trulež plodova	<i>Monilinia fructigena</i> ; <i>monilinia fructicola</i>	/	Fizičke mere; fungicidi (ciprodinil+fludioksonil, boskalid+piraklostrobin, trifloksistrobin)	
Čađava mrljavost i tačkasta zonalna pegavost plodova	Kompleks patogena	Većina sorti	Kombinacija hemijskih i agrotehničkih mera	
Gorka trulež	<i>Glomerella cingulata</i>	/	Agrotehničke, fizičke i hemijske mere (fungicidi iz grupe ftalimida i strobilurina)	
Zelena plesan	<i>Penicilium expansum</i>	/	Pre berbe – fungicidi iz grupe strobilurina, boskalid, ciprodinil+fludioksonil; u skladištu – dezinfekcija skladišta i opreme za pakovanje	
Bela trulež	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	Zlatni Delišeš, Jonatan, Crveni Delišeš	Fungicidi iz grupe ftalimida	

Oboljenje	Uzročnik	Osetljive sorte	Zaštita	Promene na jabuci/izazivač
Vlažna trulež korenovog vrata	Phytophthora cactorum	Zlatni Delišeš, Jonatan i Mekintoš	Kombinacija preventivnih, agrotehničkih i hemijskih mera (odabir otpornih sorti i podloga, preparati na bazi metalaksila)	
Alternarijska lisna pegavost	Alternaria mali	Sorte iz grupe Delišesa	Preventivne mere – praćenje zastupljenosti grinja; fizičke mere – uklanjanje zaraženog lišća; fungicidi – krezosim-metil, trifloksistrobin	
Bakterioze				
Rak korena i korenovog vrata	Agrobacterium tumefaciens	/	Agrotehničke i fizičke mere – upotreba zdravog sadnog materijala, dezinfekcija sadnog pribora, potapanje korena u rastvor baktericida	
Bakteriozna plamenjača	Erwinia amylovora	Zlatni Delišeš, Jonatan, Ajdared, Greni Smit, Gala, Fudži, Jonagold	Kombinacija nekoliko mera, blagovremeno primenjenih	
Fitoplazmoze				
Proliferacija jabuke	Candidatus phytoplasma mali	/	Preventivne mere – upotreba zdravog materijala; fizičke mere – uklanjanje mladih zaraženih stabala	
Viroze				
Hlorotična lisna pegavost jabuke	Virus hlorotične lisne pegavosti	/	Preventivne mere - poštovanje fitosanitarnih mera pri proizvodnji sadnog materijala	
Brazdavost stabla	Virus brazdavosti stabla	/	Preventivne mere - poštovanje fitosanitarnih mera pri proizvodnji sadnog materijala	
Jamičavost stabla	Virus jamičavosti stabla	/	Preventivne mere - poštovanje fitosanitarnih mera pri proizvodnji sadnog materijala	

Oboljenje	Uzročnik	Osetljive sorte	Zaštita	Promene na jabuci/izazivač
Mozaik jabuke	Virus mozaika jabuke	Jonatan, Zlatni Delišeš, Greni Smit	Preventivne mere - poštovanje fitosanitarnih mera pri proizvodnji sadnog materijala	
Insekti i grinje				
Breskvin smotavac	C. Molesta	/	Praćenje brojnosti štetočine	
Crveni pauk	Panonychus ulmi	/	Upotreba akaricida iznad praga štetnosti, a u zavisnosti od fenofaze razvoja jabuke	
Drvotočac	Cossus cossus	/	Organofosforni insekticidi i piretroidi	
Dudovac	Hyphantria cunea	/	Insekticidi na bazi bacillus thuringiensis	
Granotočac	Zeuzera pyrina	/	Organofosforni insekticidi i piretroidi	
Jabučni cvetojed	Anthonomus pomorum	/	Upotreba insekticida iznad praga štetnosti	
Jabučni moljac	Hyponomeuta malinellus	/	/	
Jabučni smotavac	Cydia (carpocapsa) pomonella	/	Preventivne mere – praćenje insekta putem feromonske klopke; insekticidi različitog načina delovanja	

Oboljenje	Uzročnik	Osetljive sorte	Zaštita	Promene na jabuci/izazivač
Kalifornijska štitasta vaš	<i>Quadraspidiotus perniciosus</i>	/	Preventivne mere – vizuelno praćenje; suzbijanje insekticidima	
Krvava vaš	<i>Eriosoma lanigerum</i>	/	Preventivne mere – vizuelno praćenje, metoda otresanja, lepljivi pojasevi; suzbijanje insekticidima	
Lisne pipe	<i>Phyllobius</i> sp., <i>polydrosus</i> sp., <i>peritelus</i> sp.	/	Preventivne mere – vizuelno praćenje, metoda otresanja, lepljivi pojasevi; hemijsko suzbijanje - retko	
Mrki savijač	<i>Archips podana</i>	/	Preventivne mere – vizuelno praćenje	
Obični paučinar	<i>Tetranychus urticae</i>	/	Upotreba akaricida iznad praga štetnosti, a u zavisnosti od fenofaze razvoja jabuke	
Osa jabuke	<i>Hoplocampa testudinea</i>	/	Preventivne mere – vizuelno praćenje, metoda otresanja, obojene klopke	
Pepeljasta lisna vaš	<i>Dysaphis plantaginea</i>	/	Preventivne mere – vizuelno praćenje, metoda otresanja	
Rđasta grinja	<i>Aculus schlechtendali</i>	/	Preventivne mere – vizuelno praćenje; suzbijanje – prirodni neprijatelji i akaricidi	
Rutava buba	<i>Epicometis hirta</i>	/	Preventivne mere – vizuelno praćenje, metoda otresanja, mirisne klopke	

Oboljenje	Uzročnik	Osetljive sorte	Zaštita	Promene na jabuci/izazivač
Savijač pupoljka	Archips rosana	/	Preventivne mere – vizuelno praćenje	
Smotavac pokožice ploda	Adoxophyes orana	/	Preventivne mere – vizuelno praćenje	
Jabukov staklokrilac	Synantredon myopaeformis	Crveni Delišes i klonovi	Organosfosforni insekticidi u kombinaciji sa uljima	
Uvijač lista	Pandemis heparana	/	Preventivne mere – vizuelno praćenje, feromonske klopke	
Zelena vaš jabuke	Aphis pomii	/	Preventivne mere – vizuelno praćenje, metoda otresanja; insekticidi različitog mehanizma delovanja iznad praga štetnosti	

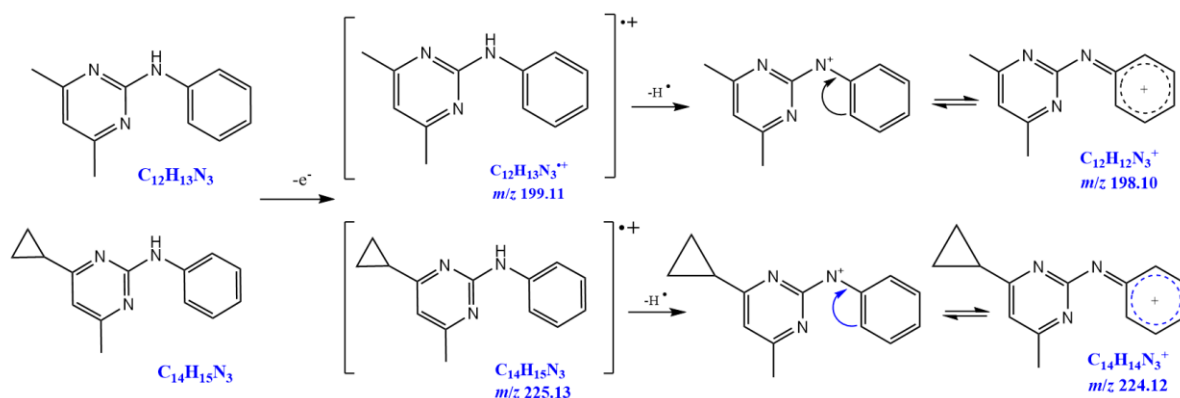
8.3 Identifikacija masenih fragmenata nastalih EI jonizacijom molekula pesticida

Pirimetamil i ciprodinil su 2,4,6 supstituisani pirimidini koji kao naintenzivnije fragmente u EI spektru imaju $[M-H]^+$ vrste na m/z 198 i m/z 224, respektivno. Po intenzitetu ih slede molekularni radikal-katjoni $[M]^+$ nastali jednostrukom jonizacijom molekula (Slika 8.3-1). S obzirom na odsustvo složenijih grupa u molekulu, najverovatniji način nastajanja najintenzivnijih fragmenata je uklanjanje radikala vodonika iz molekularnih radikal-katjona sa azota anilino grupe. Ovako nastali katjon može biti stabilizovan delokalizacijom u benzenskom delu molekula (Slika 8.3-1).

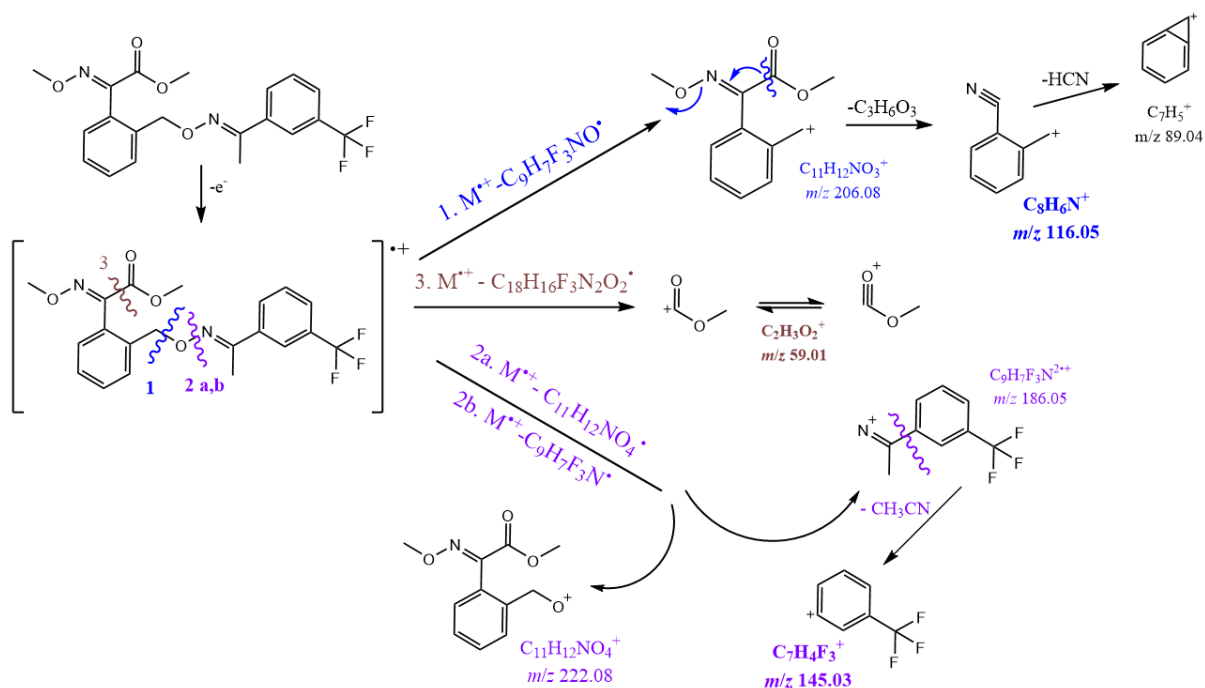
Tri najintenzivnija jona u EI spektru trifloksistrobina su m/z 116, m/z 131 i m/z 59. Četvrti po zastupljenosti je jon m/z 145. Pretpostavka je da se prve fragmentacije molekularnog radikal-katjona trifloksistrobina $[M]^+$ dešavaju kidanjem C—O i O—N veza koje spajaju aromatične delove molekula (Slika 8.3-2). Cepanjem C—O veze nastaje katjon $C_{11}H_{12}NO_3^+$ (m/z 206) koji je intermedijer u nastajanju najintenzivnijeg jona u spektru (m/z 116). Cepanjem O—N veze mogu nastati fragmenti $C_9H_7F_3N^+$ (m/z 186) i $C_{11}H_{12}NO_4^+$ (m/z 222); intenzitet ovih jona u spektru je praktično isti (21 % i 20,50 %). Pretpostavka je da je fragment m/z 186 intermedijer u nastanku jona četvrtog po zastupljenosti (m/z 145) formule $C_7H_4F_3^+$.

Najintenzivniji fragment u EI spektru bifentrina (m/z 181) nastaje cepanjem C—O veze u molekulskom radikal-katjonu $[M]^{\bullet+}$ (Slika 8.3-3). Nastali katjon strukturne formule $C_{14}H_{13}^+$ je stabilizovan delokalizacijom u okviru dela benzilne strukture. Pretpostavka je da fragment uočen na m/z 165 ima strukturnu formulu $C_{13}H_9^+$ i da nastaje od fragmenta m/z 181 preko intermedijernog radikal-katjona formule $C_{13}H_{10}^{\bullet+}$ (m/z 166).

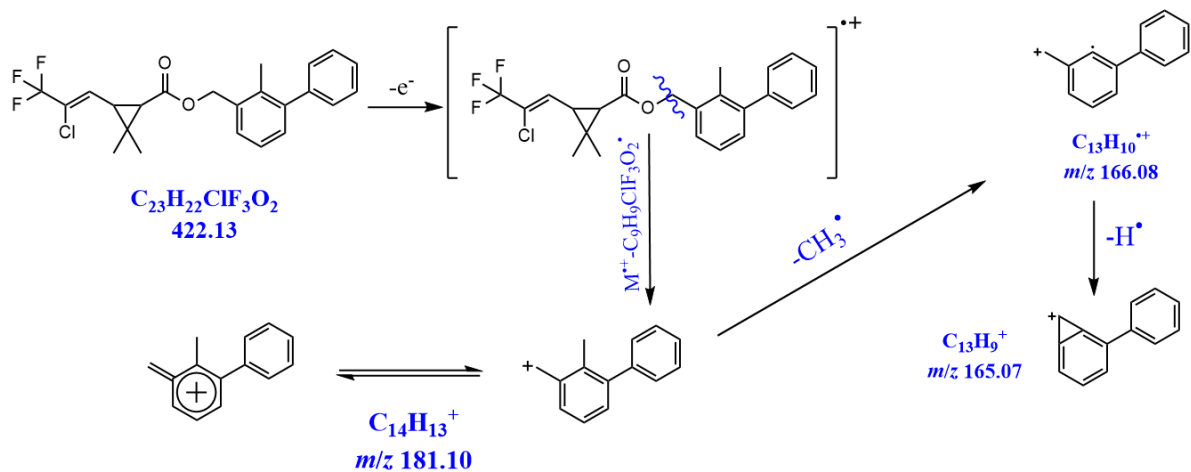
Najintenzivniji fragment u EI spektru boskalida uočen na m/z 140, strukturne formule $C_6H_3ClNO^+$ nastaje cepanjem heterogene C—N veze u molekulskom radikal katjonu $[M]^{\bullet+}$, dok fragment drugi po intenzitetu nastaje iz m/z 140 fragmentacijom C—C veze van prstena uz gubitak ugljen-monoksida (Slika 8.3-4). Fragment treći po intenzitetu je molekulski radikal-katjon $[M]^{\bullet+}$.



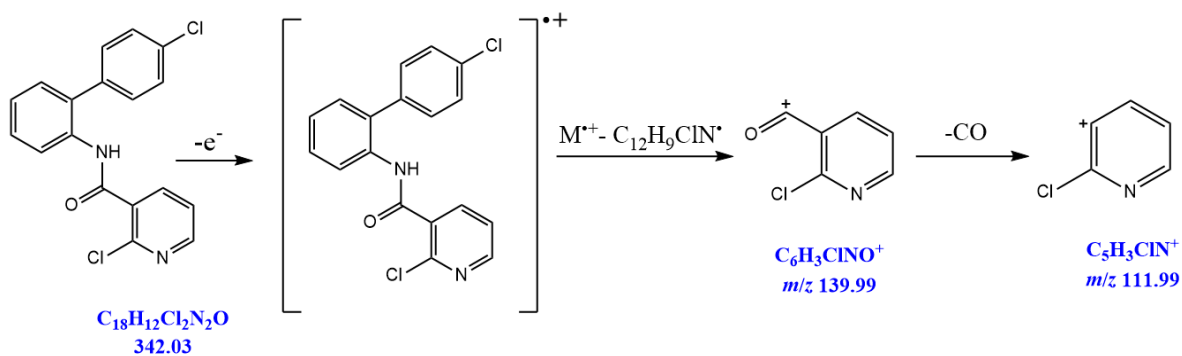
Slika 8.3-1 Predloženi mehanizam nastajanja EI fragmenata ciprodinila i pirimetanila



Slika 8.3-2 Predloženi mehanizam nastajanja EI fragmenata trifloksistrobina

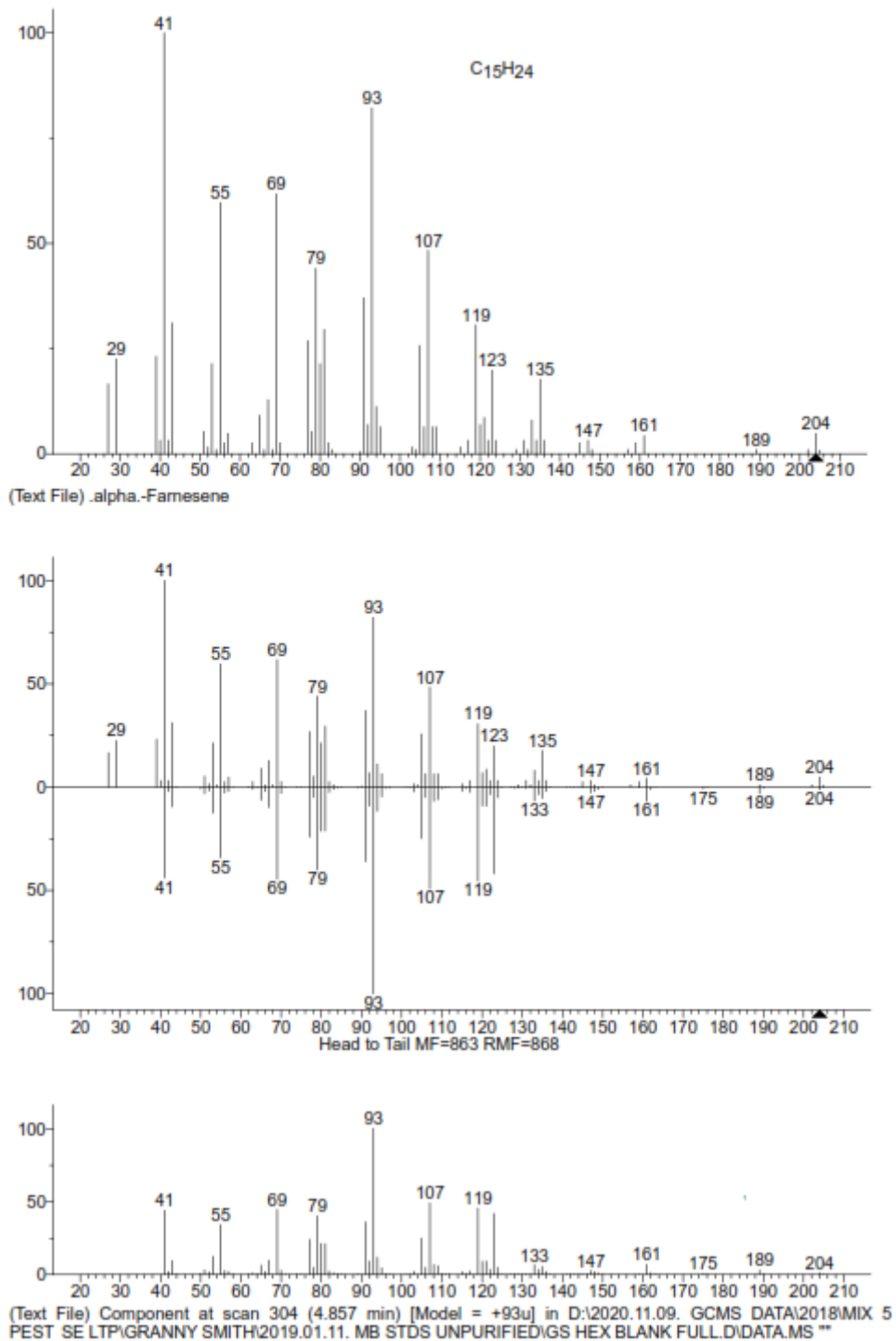


Slika 8.3-3 Predloženi mehanizam nastajanja EI fragmenata bifentrina

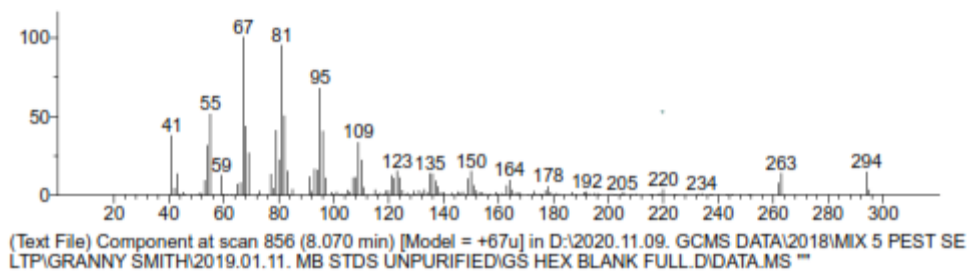
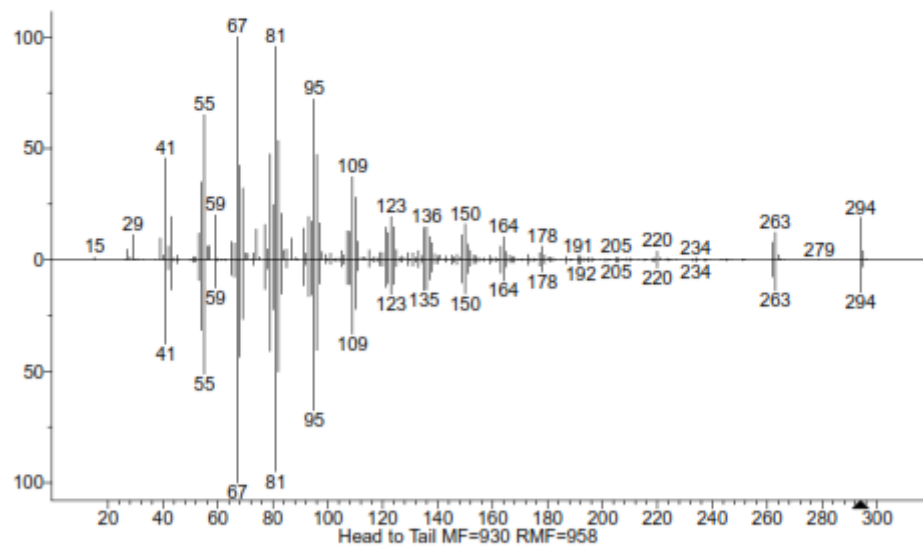
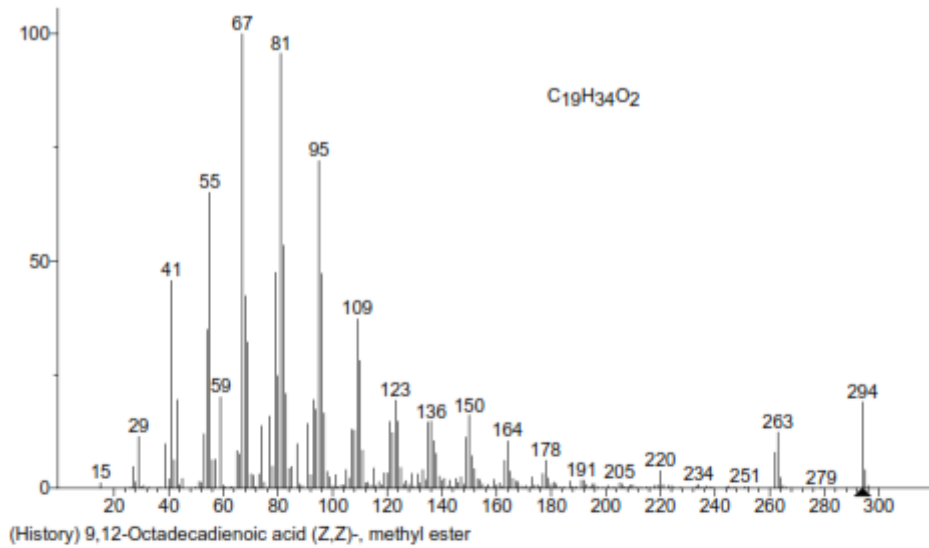


Slika 8.3-4 Predloženi mehanizam nastajanja EI fragmenata boskalida

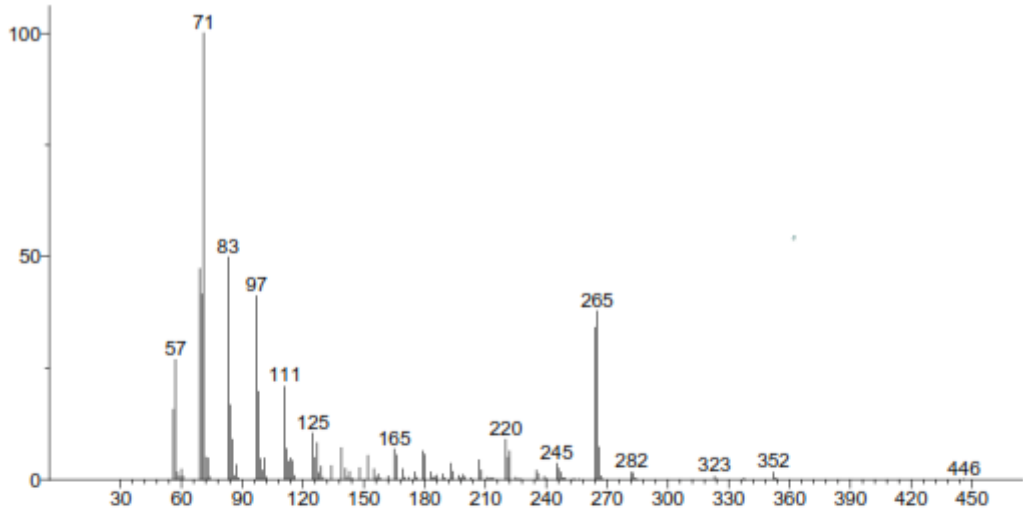
8.4 Identifikacija jedinjenja u heksanskim ekstraktima kora (GC/MS analiza)



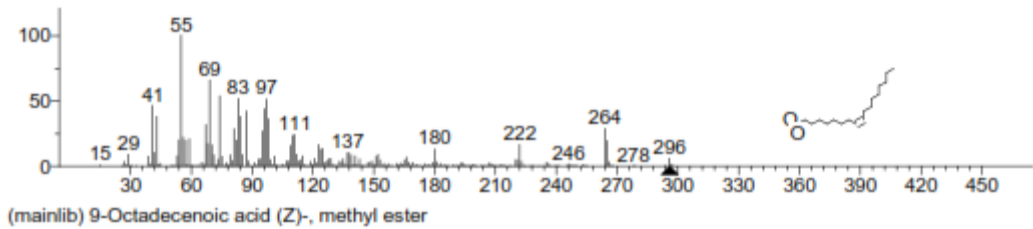
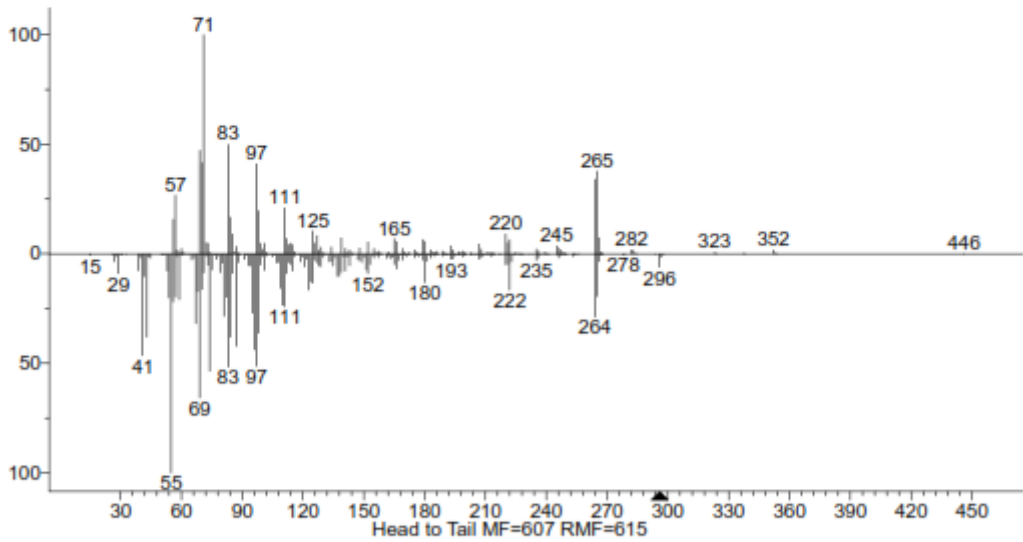
Slika 8.4-1 Rezultat pretrage NIST MS baze spektara za jedinjenje na Rt = 4,857 min iz hromatograma heksanskog ekstrakta kore sorte Greni Smit



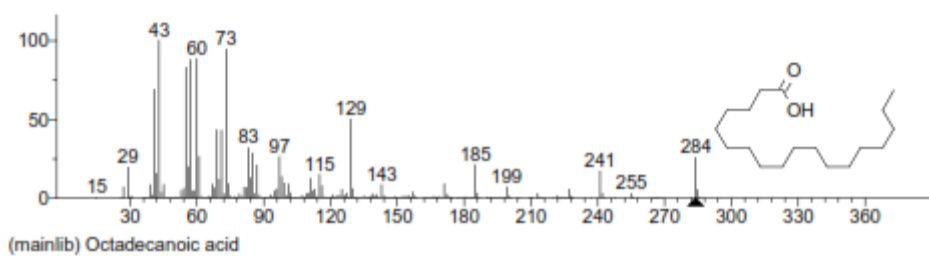
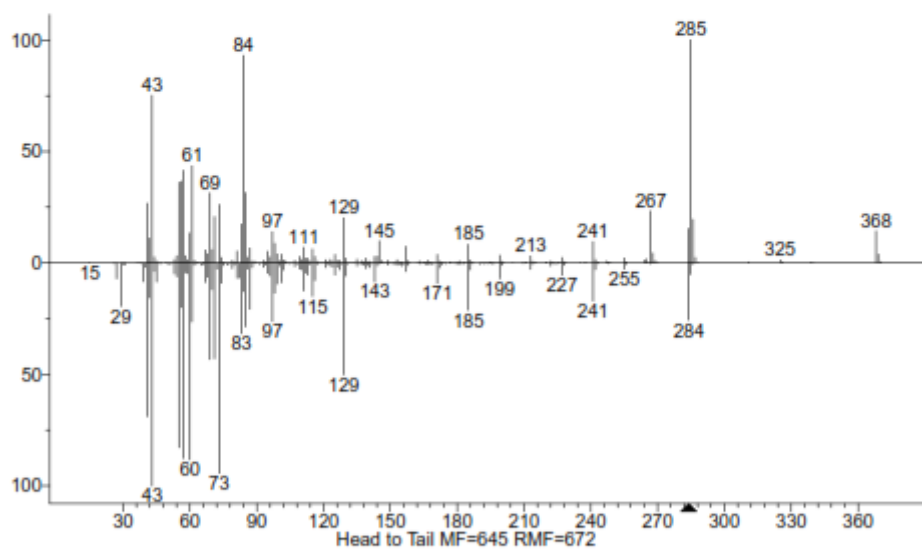
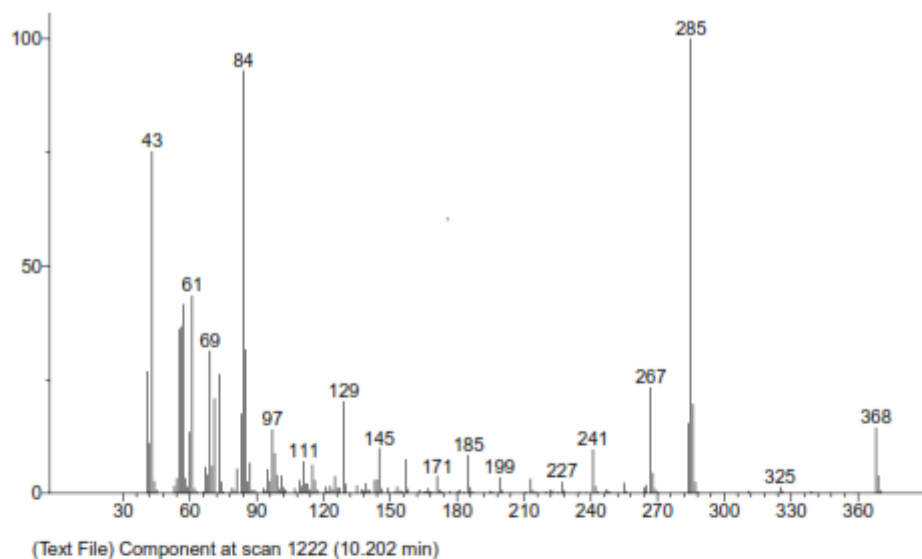
Slika 8.4-2 Rezultat pretrage NIST MS baze spektara za jedinjenje na $R_t = 8,07$ min iz hromatograma heksanskog ekstrakta kore sorte Greni Smit



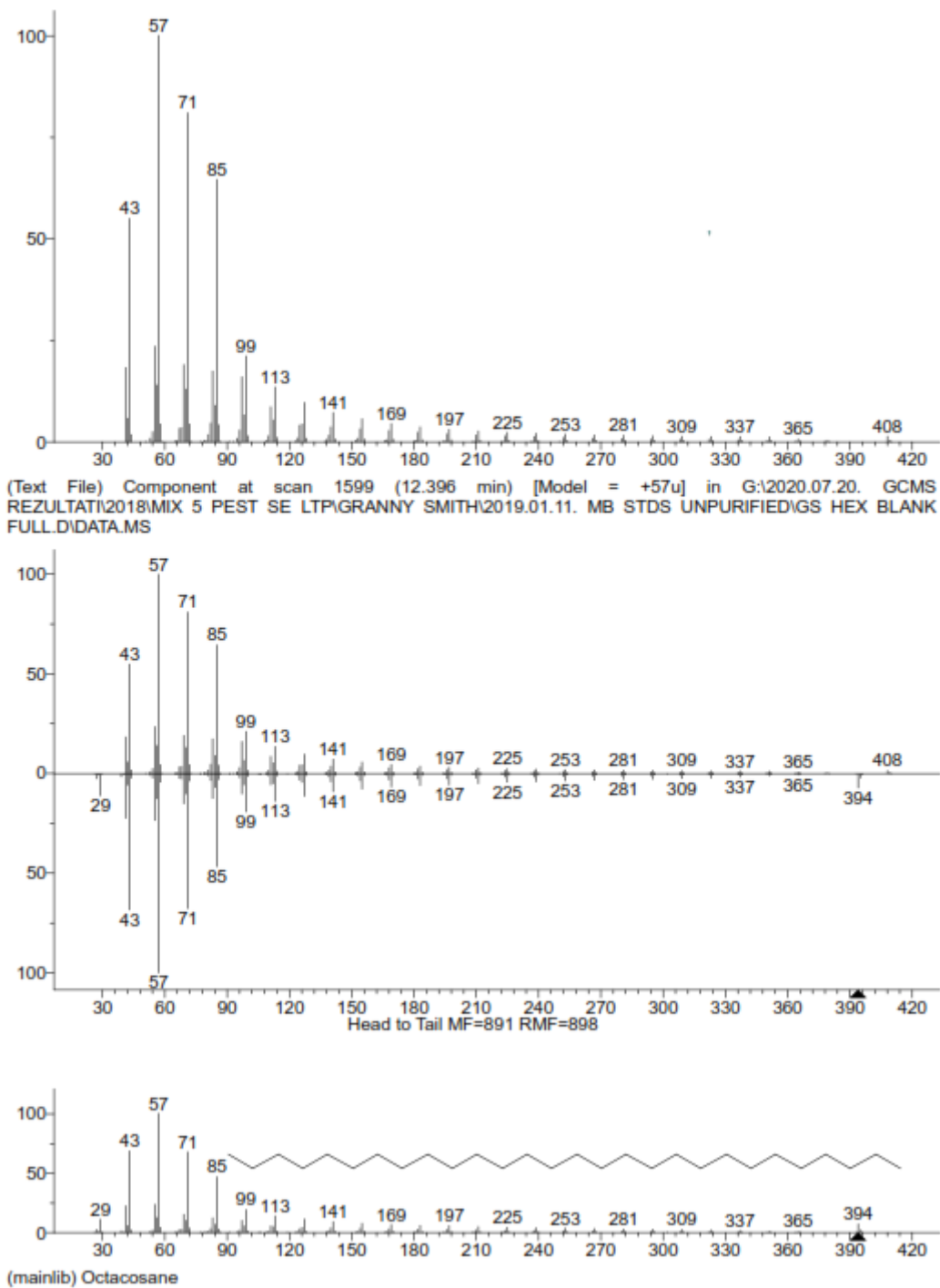
(Text File) Component at scan 1102 (9.502 min) [Model = +83u, -67u] in G:\2020.07.20. GCMS REZULTATI\2018\MIX 5 PEST SE LTP\GRANNY SMITH\2019.01.11. MB STDS UNPURIFIED\IGS HEX BLANK FULL.D\DATA.MS



Slika 8.4-3 Rezultat pretrage NIST MS baze spektara za jedinjenje na Rt = 9,50 min iz hromatograma heksanskog ekstrakta kore sorte Greni Smit

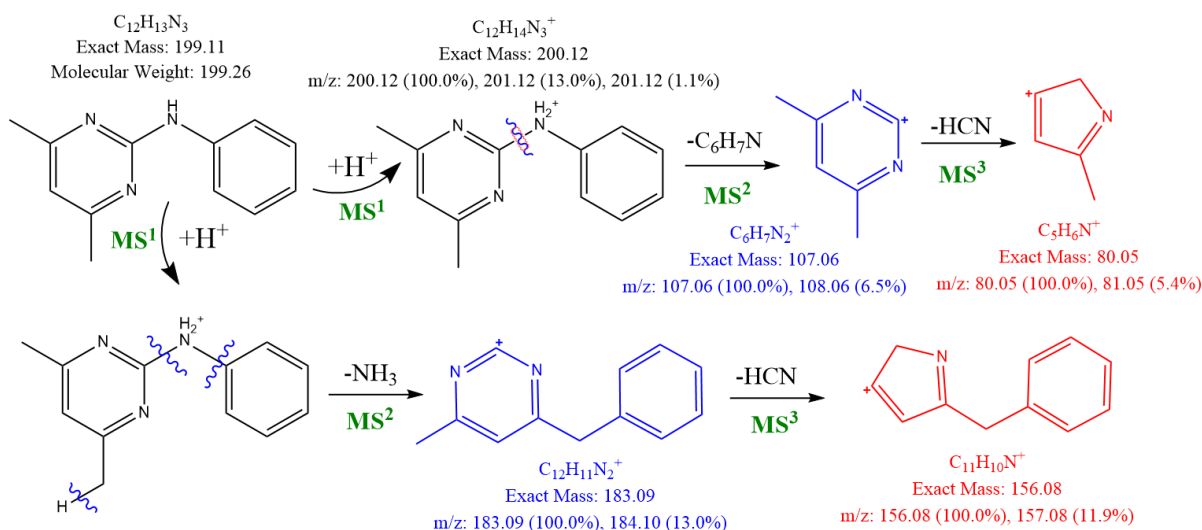


Slika 8.4-4 Rezultat pretrage NIST MS baze spektara za jedinjenje na $R_t = 10,20$ min iz hromatograma heksanskog ekstrakta kore sorte Greni Smit



Slika 8.4-5 Rezultat pretrage NIST MS baze spektara za jedinjenje na Rt = 12,39 min iz hromatograma heksanskog ekstrakta kore sorte Greni Smit

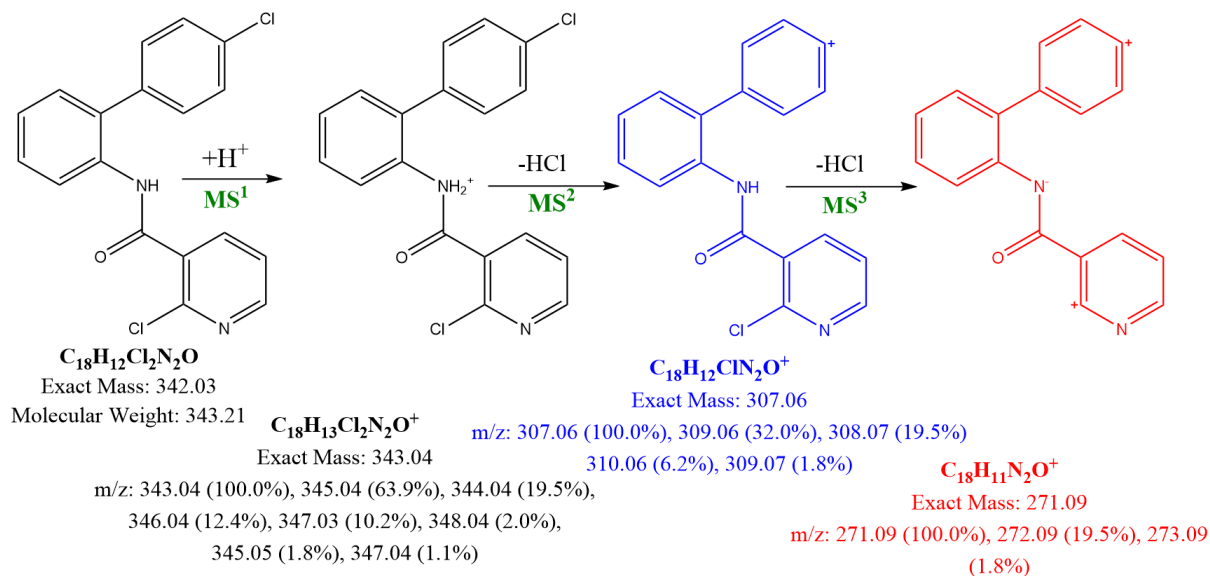
8.5 Identifikacija masenih fragmenata u okviru ESI/MSⁿ analize pesticida



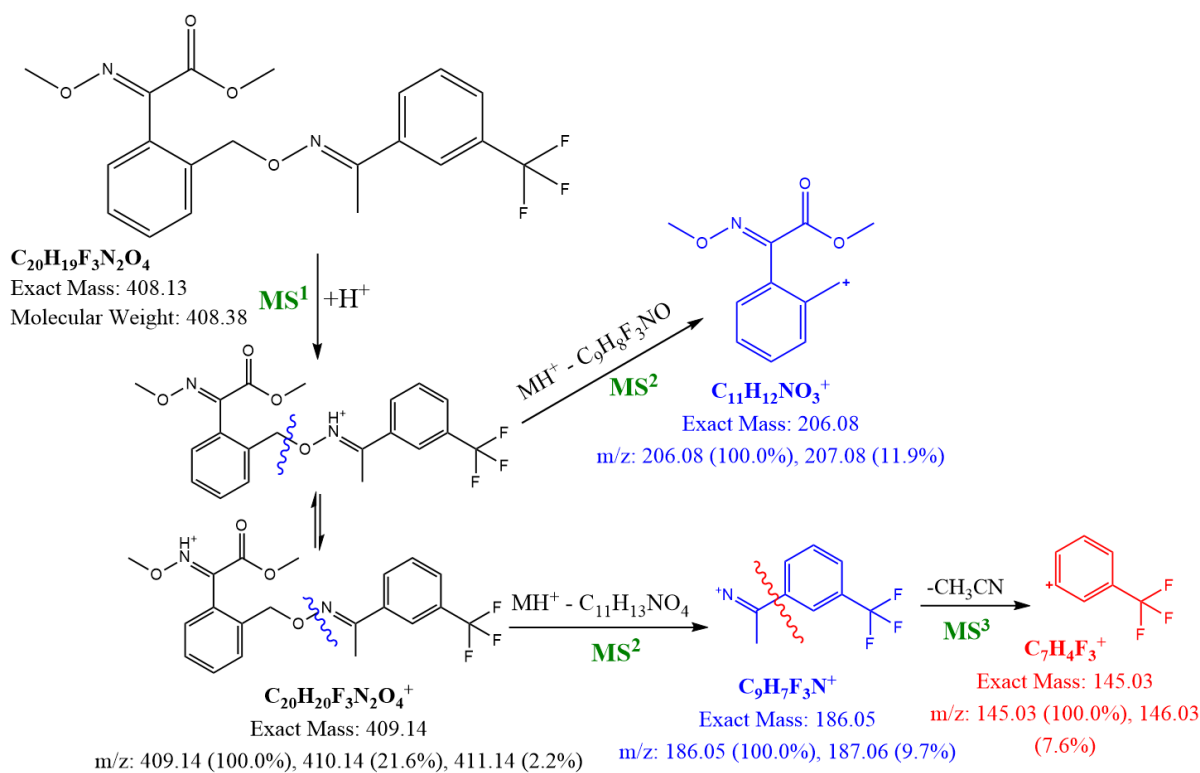
Slika 8.5-1 Predloženi mehanizam nastajanja ESI/MSⁿ fragmenata pirimetanila



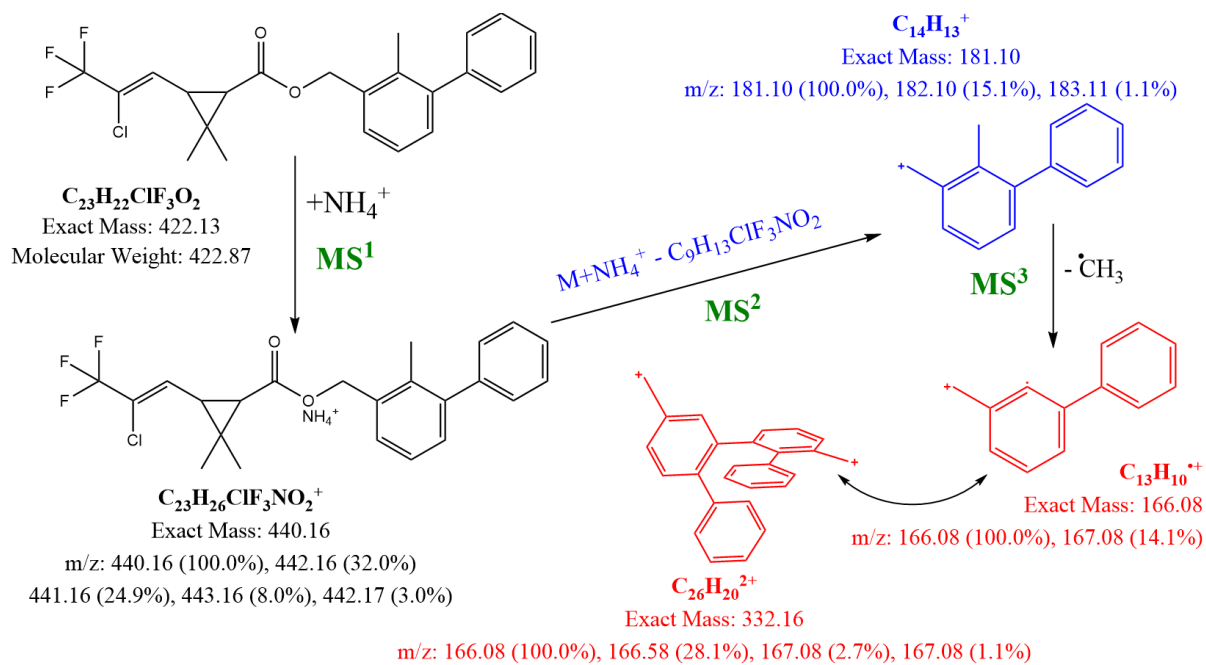
Slika 8.5-2 Predloženi mehanizam nastajanja ESI/MSⁿ fragmenata ciprodinila



Slika 8.5-3 Predloženi mehanizam nastajanja ESI/MSⁿ fragmenata boskalida



Slika 8.5-4 Predloženi mehanizam nastajanja ESI/MSⁿ fragmenata trifloksistrobina

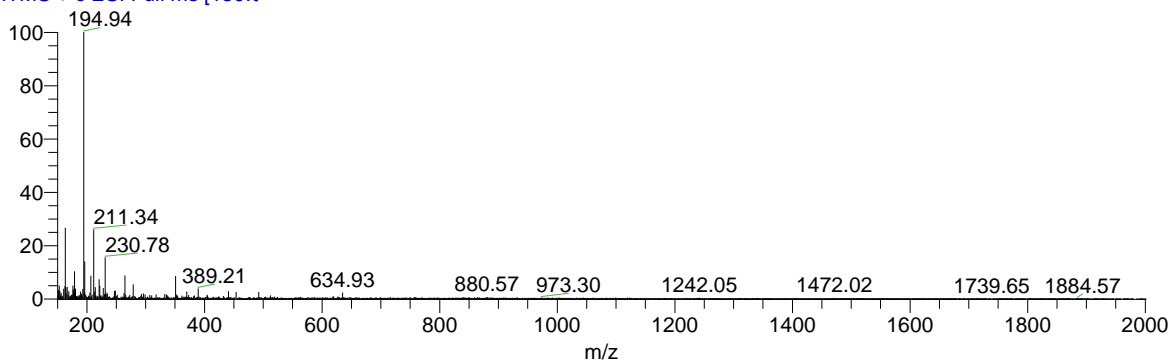


Slika 8.5-5 Predloženi mehanizam nastajanja ESI/MSⁿ fragmenata bifentrina

8.6 ESI/MS karakterizacija korišćenih reagenasa

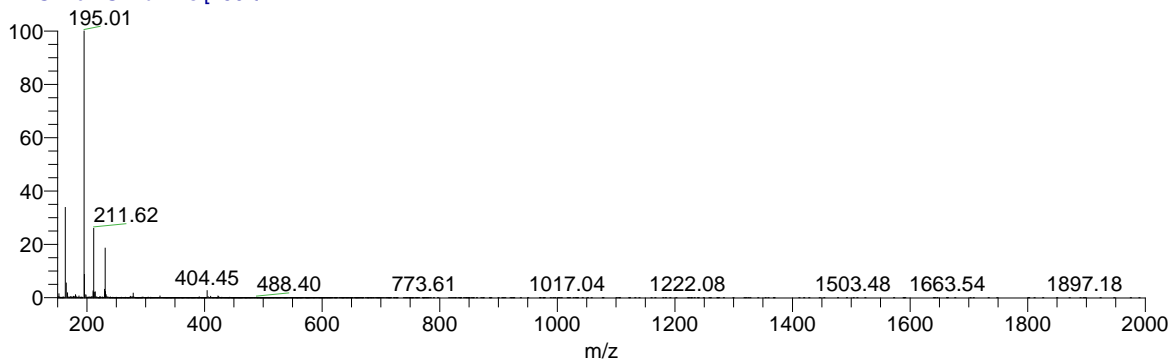
ESI/MS¹ spektri dejonizovane vode, pufera i metanola, snimljeni na instrumentu sa konfiguracijom 3 (Slika 8.6-1- Slika 8.6-3) pokazuju zadovoljavajuću čistoću reagenasa za potrebe ovog istraživanja. Tri najzastupljenija jona uočena u spektrima reagenasa (m/z 163,3 m/z 194,9 i m/z 278,5) najverovatnije potiču od sistema plastičnih kapilara koje vode mobilne faze od hromatografa do masenog spektrometra.

DEJONIZOVANA VODA #83 RT: 0.75 AV: 1 NL: 1.63E6
T: ITMS + c ESI Full ms [150.0]



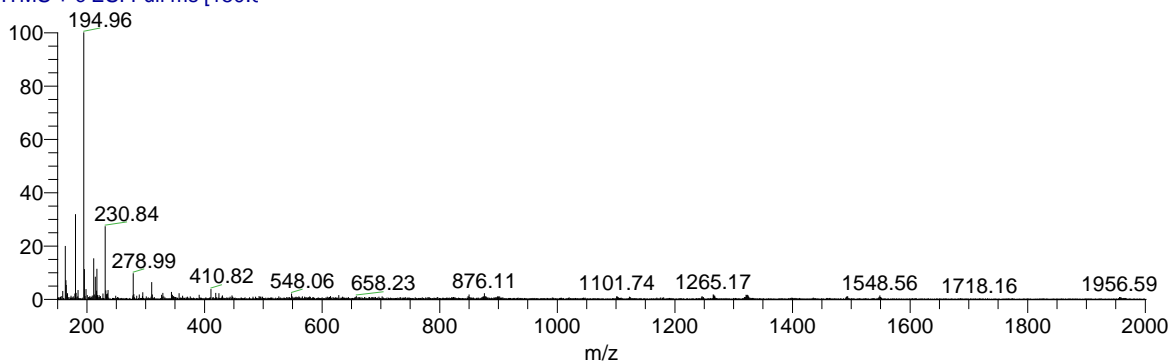
Slika 8.6-1 ESI/MS¹ full scan spektar dejonizovane vode; brzina protoka reagenasa sa MS pumpe 50 μLmin^{-1}

PUFER 0,3 % FA + 0,01 % AMF #56 RT: 0.51 AV: 1 NL: 2.30E6
T: ITMS + c ESI Full ms [150.0]



Slika 8.6-2 ESI/MS¹ full scan spektar pufera (0,30 % rastvor mravlje kiseline i 0,01 % rastvor AMF-a u vodi); brzina protoka reagenasa sa MS pumpe 50 μLmin^{-1}

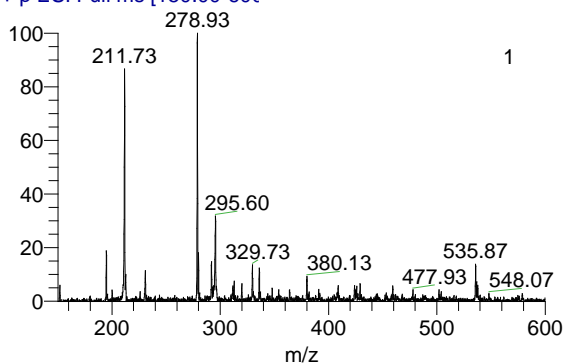
METANOL #65 RT: 0.62 AV: 1 NL: 1.97E5
T: ITMS + c ESI Full ms [150.0]



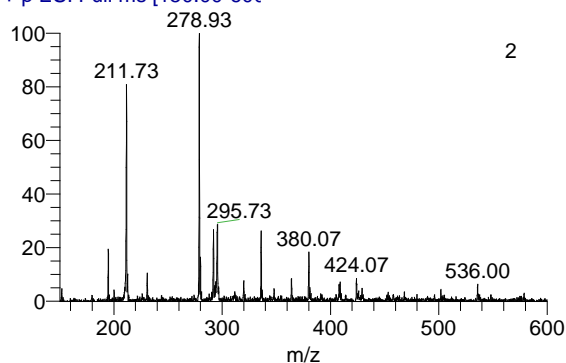
Slika 8.6-3 ESI MS¹ full scan spektar metanola HPLC čistoće; brzina protoka reagenasa sa MS pumpe 50 μLmin^{-1}

8.7 Metoda MET-DI-R– spektri ekstrakata kore

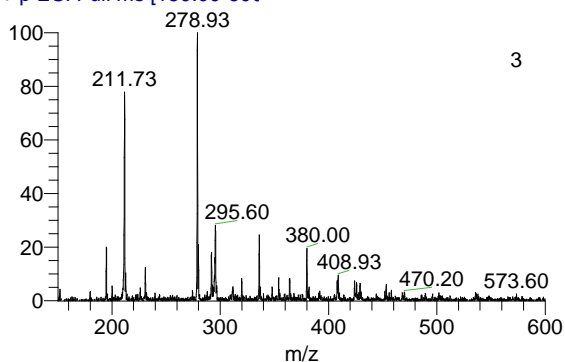
0,10 #180 RT: 1.89 AV: 1 NL: 1.33E6
T: + p ESI Full ms [150.00-600]



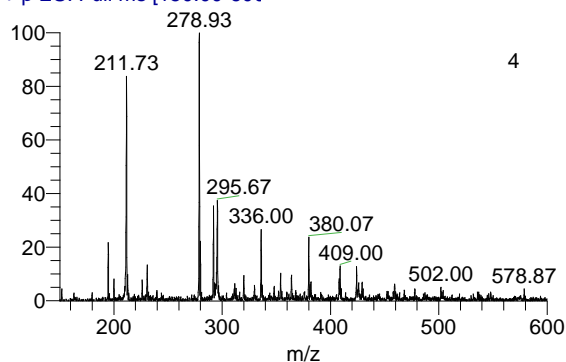
0,20 #175 RT: 1.84 AV: 1 NL: 1.45E6
T: + p ESI Full ms [150.00-600]



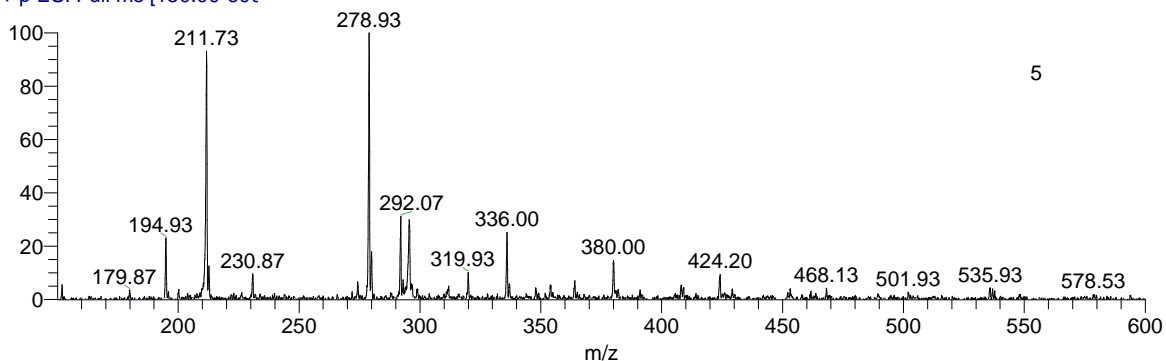
0,50 #196 RT: 2.05 AV: 1 NL: 1.50E6
T: + p ESI Full ms [150.00-600]



0,75 #187 RT: 1.94 AV: 1 NL: 1.70E6
T: + p ESI Full ms [150.00-600]

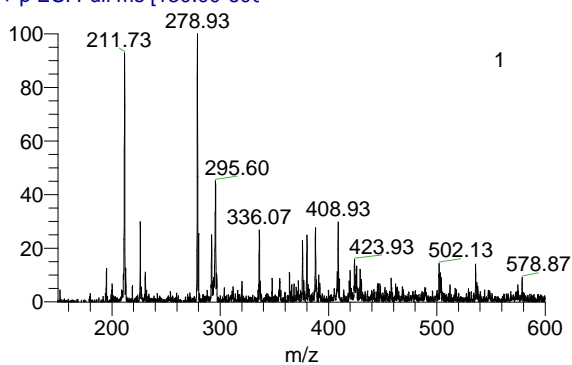


0,05 #86 RT: 0.90 AV: 1 NL: 1.59E6
T: + p ESI Full ms [150.00-600]

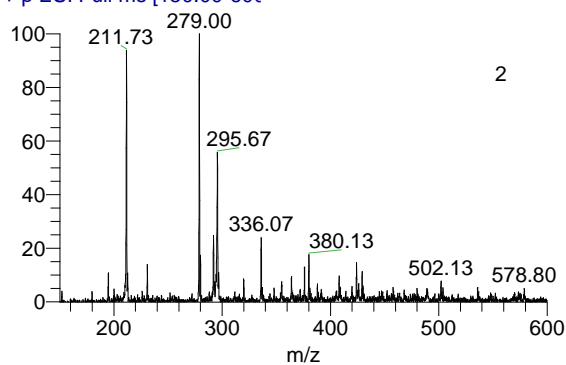


Slika 8.7-1 *Direct injection ESI MS¹ full scan* spektar ekstrakta spajkovane kore sorte Ajdared 1 - 0,10 mgkg⁻¹; 2 - 0,20 mgkg⁻¹; 3 - 0,50 mgkg⁻¹; 4 - 0,75 mgkg⁻¹; 5 - 0,05 mgkg⁻¹

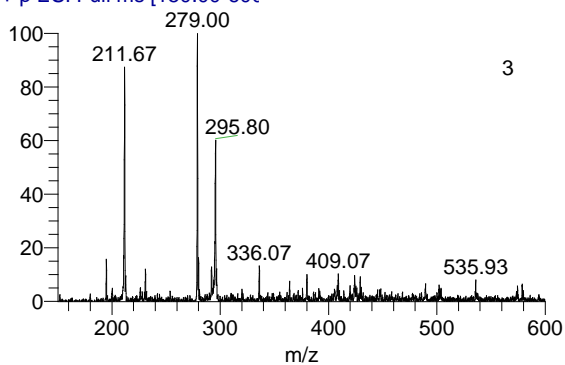
0,10 #184 RT: 1.96 AV: 1 NL: 4.49E5
T: + p ESI Full ms [150.00-600]



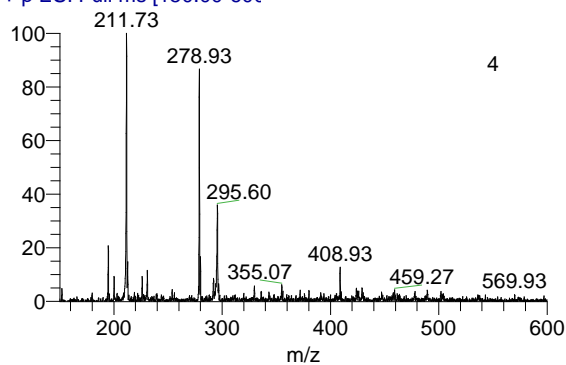
0,20 #184 RT: 1.98 AV: 1 NL: 5.85E5
T: + p ESI Full ms [150.00-600]



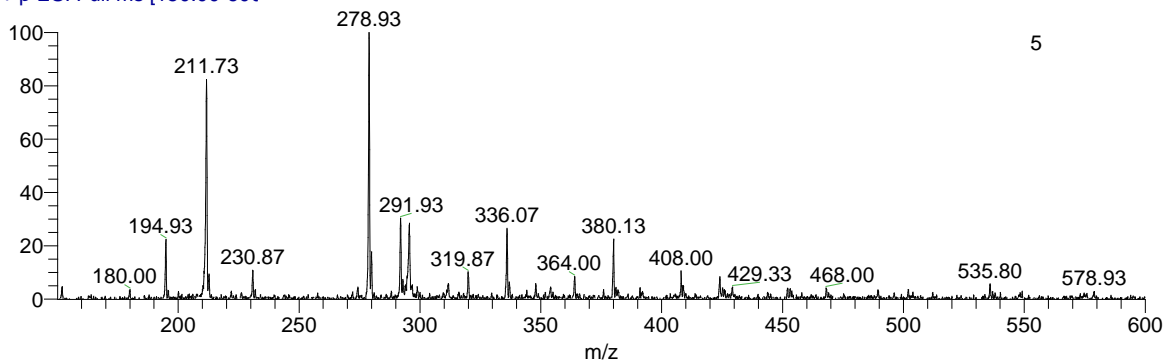
0,50 #168 RT: 1.85 AV: 1 NL: 4.19E5
T: + p ESI Full ms [150.00-600]



0,75 #39 RT: 0.42 AV: 1 NL: 7.65E5
T: + p ESI Full ms [150.00-600]

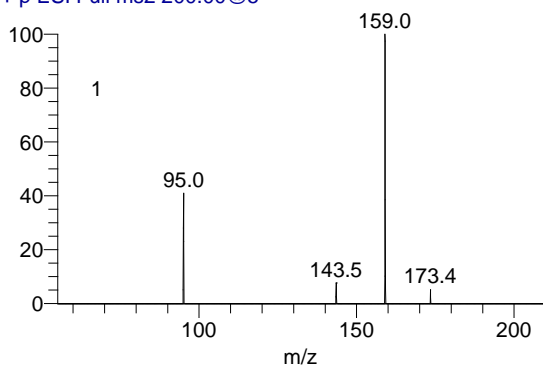


0,05 #182 RT: 1.91 AV: 1 NL: 1.40E6
T: + p ESI Full ms [150.00-600]

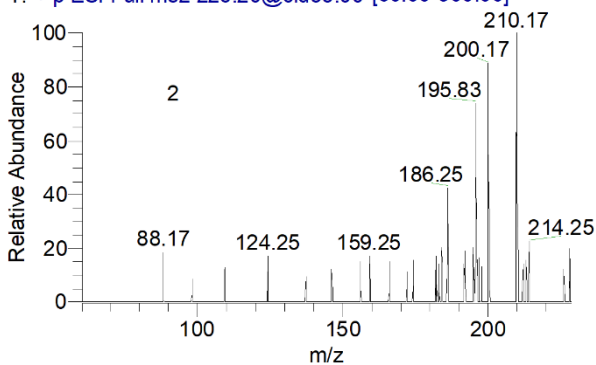


Slika 8.7-2 Direct injection full scan ESI MS¹ spektar ekstrakta spajkovane kore sorte Greni Smit 1 - 0,10 mgkg⁻¹; 2 - 0,20 mgkg⁻¹; 3 - 0,50 mgkg⁻¹; 4 - 0,75 mgkg⁻¹; 5 - 0,05 mgkg⁻¹

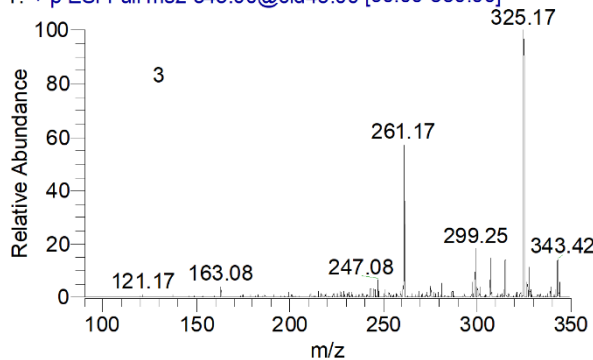
Blank #259 RT: 3.73 AV: 1 NL: 3.90E1
T: + p ESI Full ms2 200.00@5



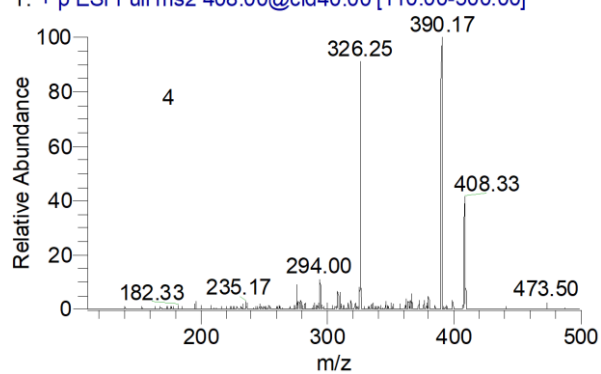
ID blank #343 RT: 5.07 AV: 1 NL: 4.88E2
T: + p ESI Full ms2 226.20@cid55.00 [60.00-300.00]



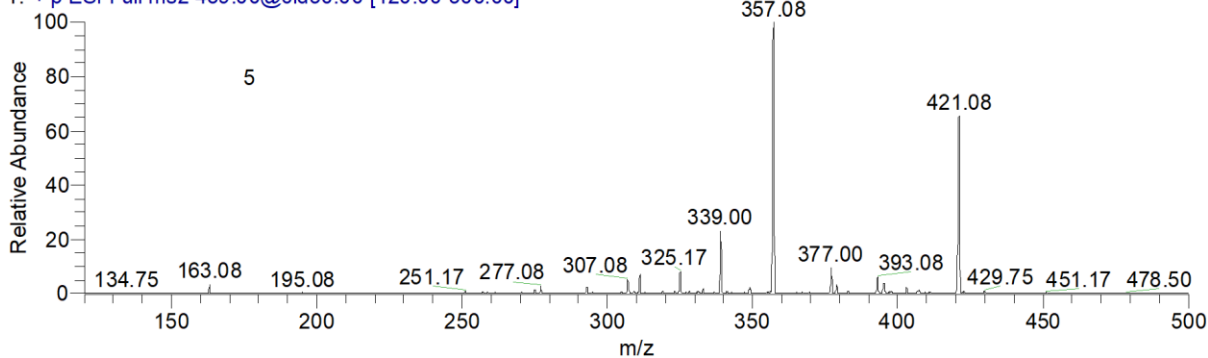
ID blank #430 RT: 6.99 AV: 1 NL: 5.29E3
T: + p ESI Full ms2 343.00@cid45.00 [90.00-350.00]



ID blank #517 RT: 9.09 AV: 1 NL: 2.55E4
T: + p ESI Full ms2 408.00@cid40.00 [110.00-500.00]

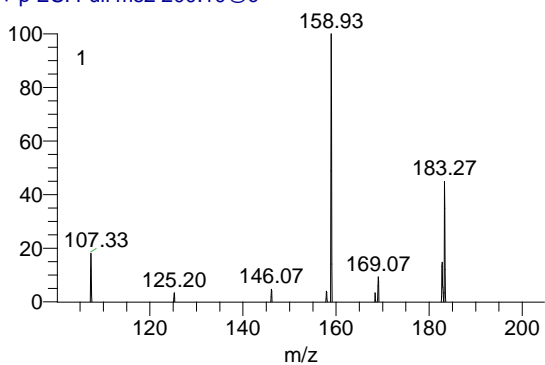


ID blank #598 RT: 11.04 AV: 1 NL: 2.94E3
T: + p ESI Full ms2 439.00@cid50.00 [120.00-500.00]

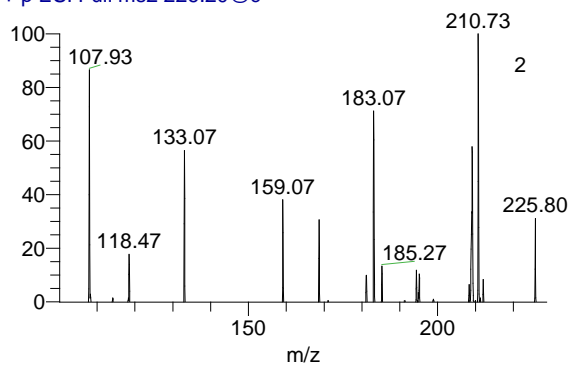


Slika 8.7-3 Direct injection full scan MS² spektar (1) pirimetanila, (2) ciprodinila, (3) boskalida, (4) trifloksistrobina i (5) bifentrina u blank ekstraktu kore sorte Ajdared

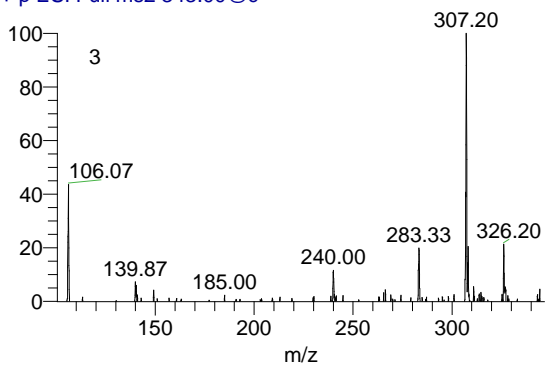
0,05 #242 RT: 3.05 AV: 1 NL: 1.49E2
T: + p ESI Full ms2 200.10@c



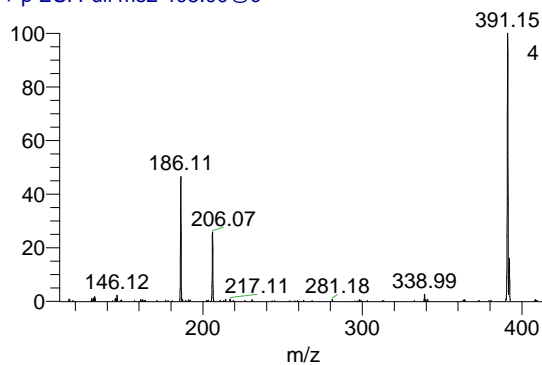
0,05 #361 RT: 5.51 AV: 1 NL: 2.02E2
T: + p ESI Full ms2 226.20@c



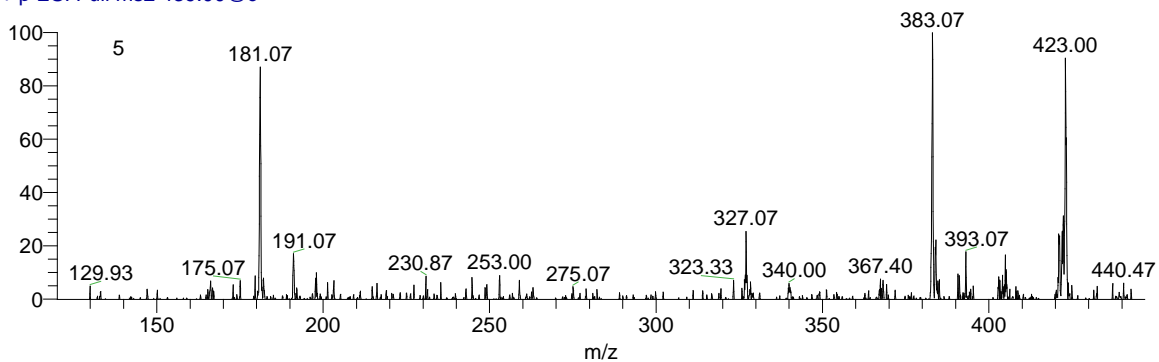
0,05 #400 RT: 6.36 AV: 1 NL: 7.94E3
T: + p ESI Full ms2 343.00@c



0,05 #504 RT: 8.87 AV: 1 NL: 5.69E4
T: + p ESI Full ms2 408.00@c

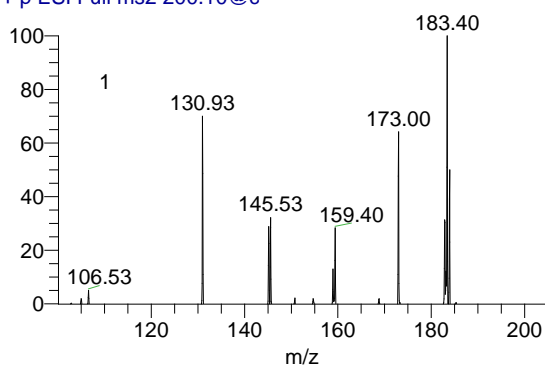


0,05 #610 RT: 11.41 AV: 1 NL: 4.68E3
T: + p ESI Full ms2 439.00@c

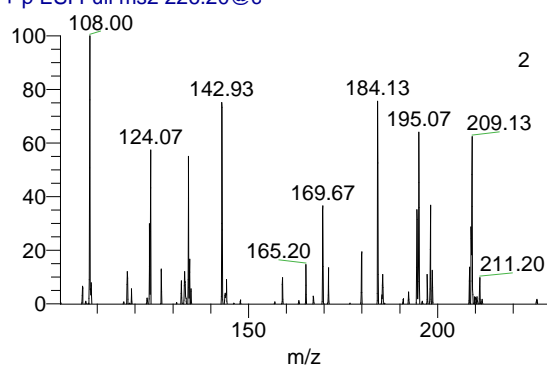


Slika 8.7-4 Direct injection full scan MS² spektr (1) pirimetanila, (2) ciprodinila, (3) boskalida, (4) trifloksistrobina i (5) bifentrina u ekstraktu spajkovane kore sorte Ajdared (0,050 mgkg⁻¹)

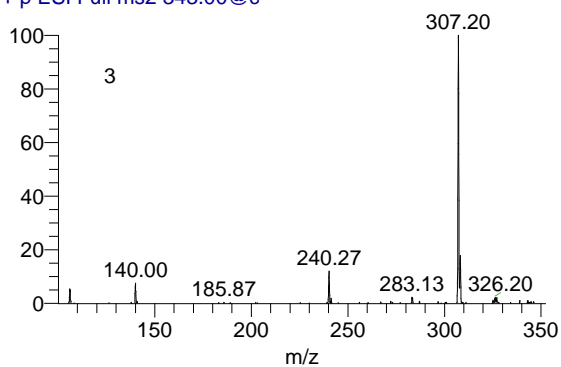
0,75 #274 RT: 3.65 AV: 1 NL: 3.60E2
T: + p ESI Full ms2 200.10@c



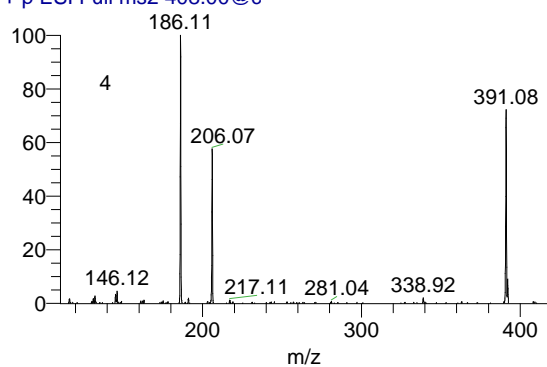
0,75 #376 RT: 5.76 AV: 1 NL: 4.07E2
T: + p ESI Full ms2 226.20@c



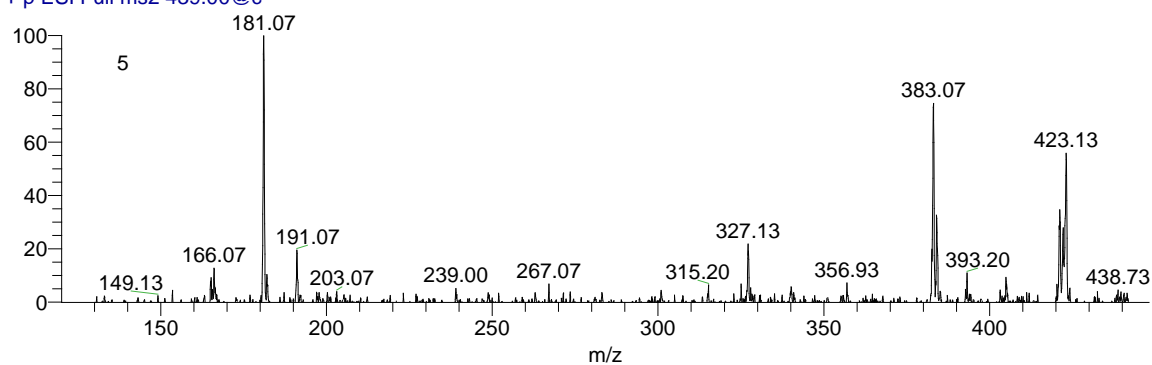
0,75 #461 RT: 7.77 AV: 1 NL: 5.04E4
T: + p ESI Full ms2 343.00@c



0,75 #546 RT: 9.80 AV: 1 NL: 1.07E5
T: + p ESI Full ms2 408.00@c

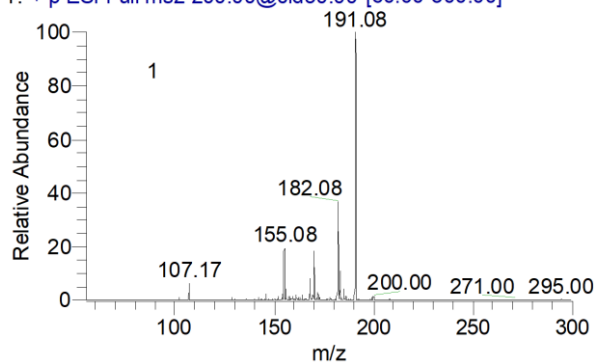


0,75 #623 RT: 11.65 AV: 1 NL: 9.11E3
T: + p ESI Full ms2 439.00@c

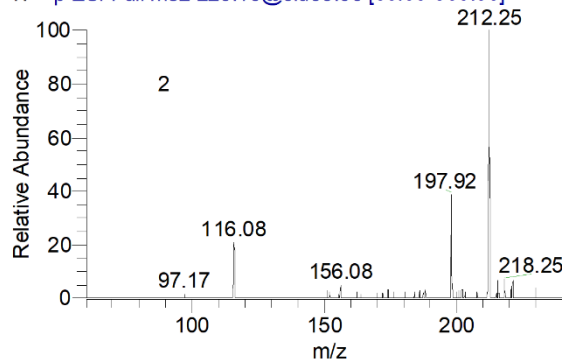


Slika 8.7-5 Direct injection full scan MS² spektar (1) pirimetanila, (2) ciprodinila, (3) boskalida, (4) trifloksistrobina i (5) bifentrina u ekstraktu spajkovane kore sorte Ajdared (0,75 mgkg⁻¹)

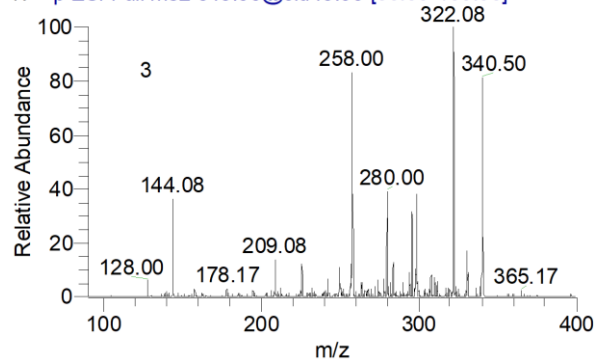
GS blank #302 RT: 6.33 AV: 1 NL: 1.59E2
T: + p ESI Full ms2 200.00@cid50.00 [60.00-300.00]



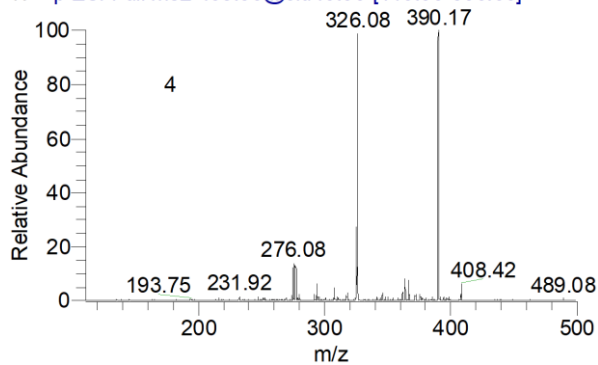
GS blank #350 RT: 5.88 AV: 1 NL: 1.80E2
T: + p ESI Full ms2 226.10@cid55.00 [60.00-300.00]



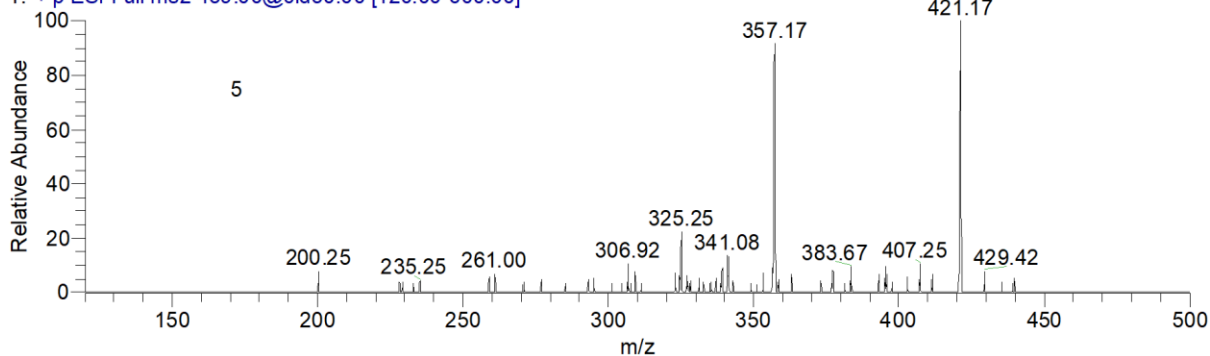
GS blank #421 RT: 7.56 AV: 1 NL: 5.50E2
T: + p ESI Full ms2 343.00@cid45.00 [90.00-400.00]



GS blank #516 RT: 9.85 AV: 1 NL: 9.39E3
T: + p ESI Full ms2 408.00@cid40.00 [110.00-500.00]

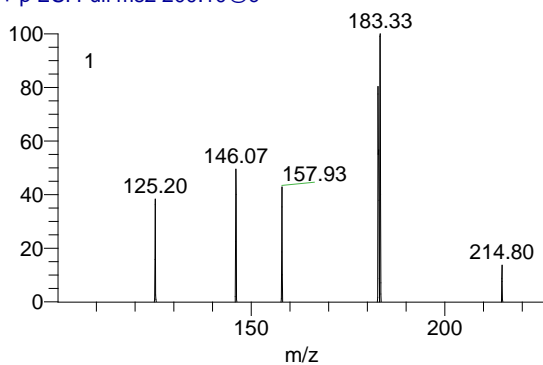


GS blank #594 RT: 11.73 AV: 1 NL: 1.22E4
T: + p ESI Full ms2 439.00@cid50.00 [120.00-600.00]

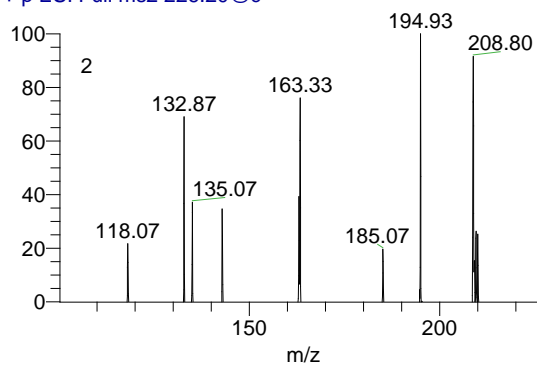


Slika 8.7-6 Direct injection full scan MS² spektar (1) pirimetanila, (2) ciprodinila, (3) boskalida, (4) trifloksistrobina i (5) bifentrina u blank ekstraktu kore sorte Greni Smit

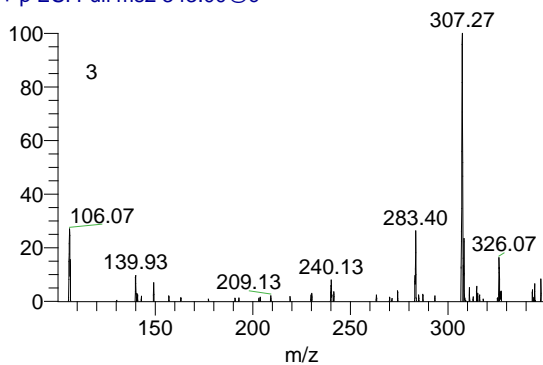
0,05 #214 RT: 2.47 AV: 1 NL: 2.40E2
T: + p ESI Full ms2 200.10@c



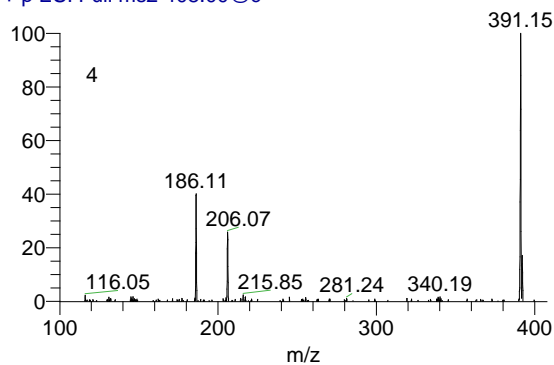
0,05 #304 RT: 4.33 AV: 1 NL: 2.85E2
T: + p ESI Full ms2 226.20@c



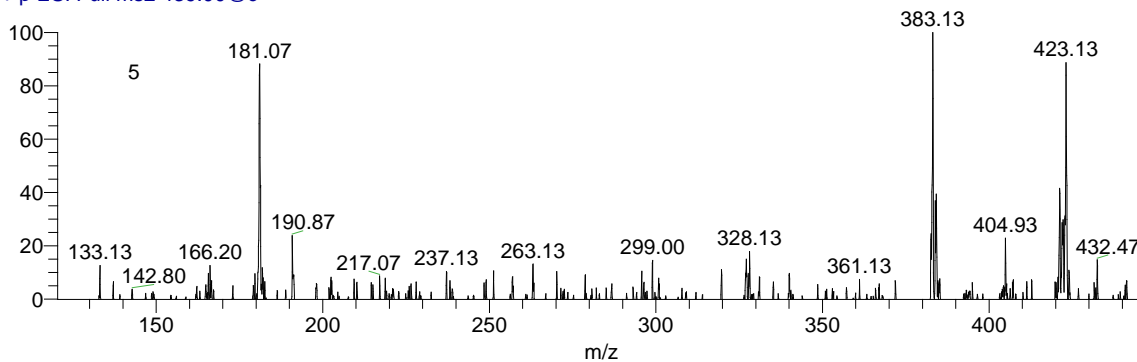
0,05 #393 RT: 6.19 AV: 1 NL: 9.68E3
T: + p ESI Full ms2 343.00@c



0,05 #476 RT: 8.20 AV: 1 NL: 5.99E4
T: + p ESI Full ms2 408.00@c

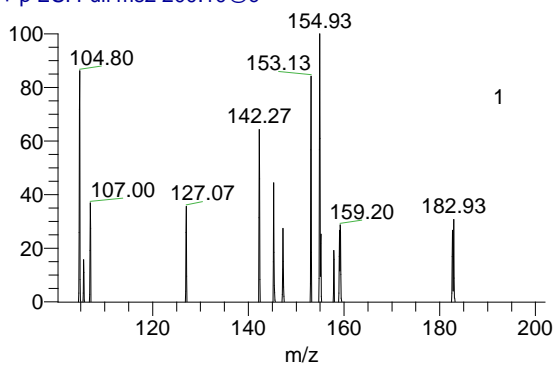


0,05 #575 RT: 10.58 AV: 1 NL: 3.76E3
T: + p ESI Full ms2 439.00@c

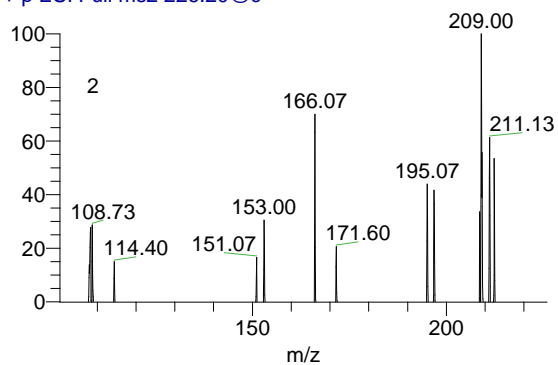


Slika 8.7-7 Direct injection full scan MS² spektar (1) pirimetanila, (2) ciprodinila, (3) boskalida, (4) trifloksistrobina i (5) bifentrina u ekstraktu spajkovane kore sorte Greni Smit (0,05 mgkg⁻¹)

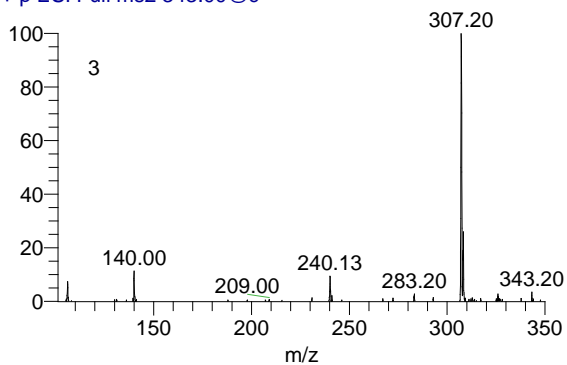
0,75 #217 RT: 2.47 AV: 1 NL: 1.46E2
T: + p ESI Full ms2 200.10@c



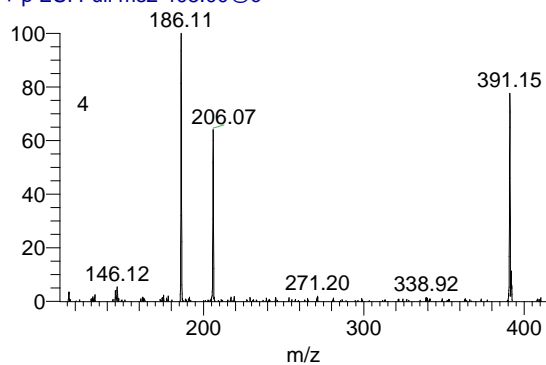
0,75 #301 RT: 4.21 AV: 1 NL: 5.18E2
T: + p ESI Full ms2 226.20@c



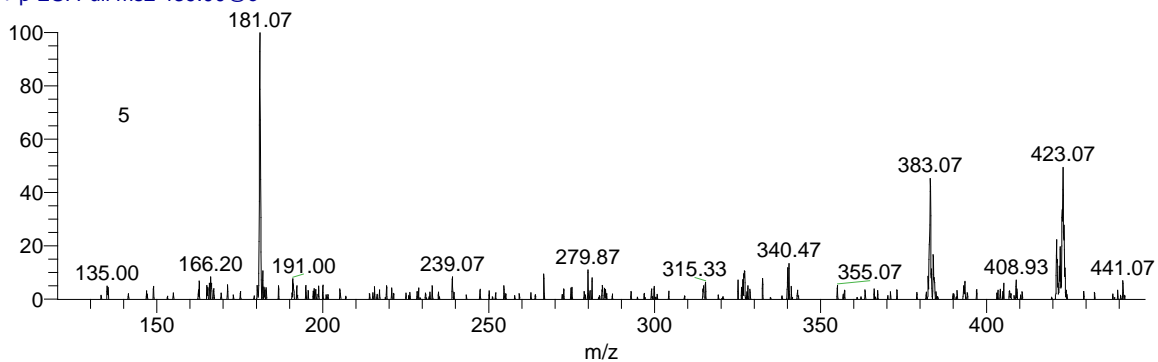
0,75 #393 RT: 6.13 AV: 1 NL: 4.71E4
T: + p ESI Full ms2 343.00@c



0,75 #478 RT: 8.18 AV: 1 NL: 9.79E4
T: + p ESI Full ms2 408.00@c

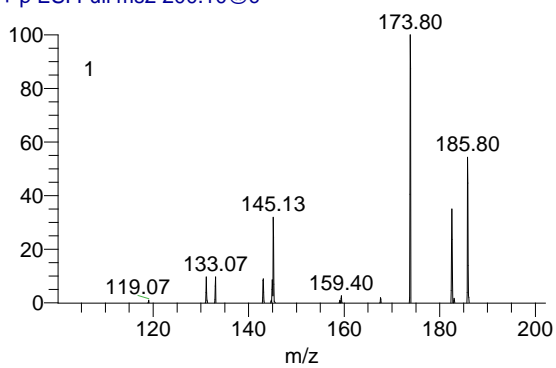


0,75 #563 RT: 10.21 AV: 1 NL: 1.18E4
T: + p ESI Full ms2 439.00@c

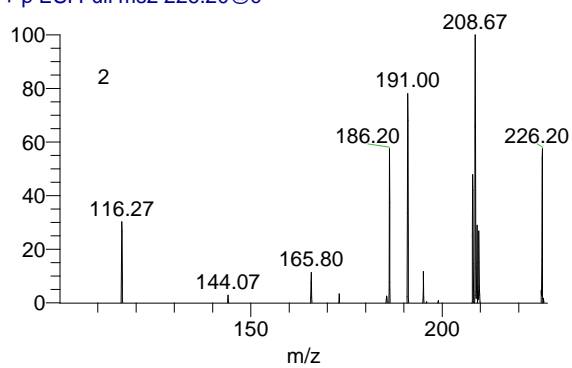


Slika 8.7-8 *Direct injection full scan MS²* spektr (1) pirimetanila, (2) ciprodinila, (3) boskalida, (4) trifloksistrobina i (5) bifentrina u ekstraktu spajkovane kore sorte Greni Smit (0,75 mgkg⁻¹)

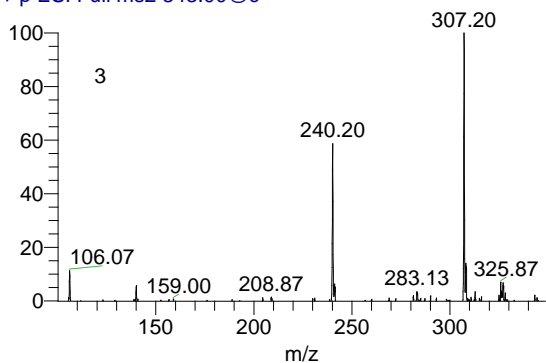
0,10 #264 RT: 3.50 AV: 1 NL: 3.00E2
T: + p ESI Full ms2 200.10@c



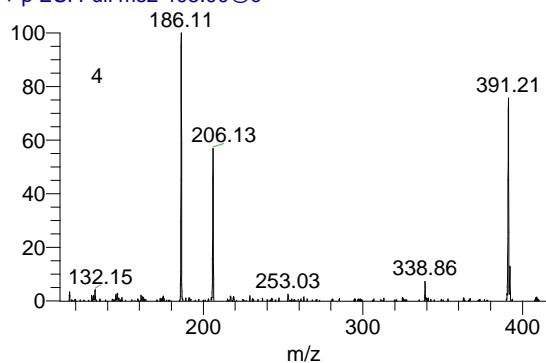
0,10 #341 RT: 5.10 AV: 1 NL: 2.38E2
T: + p ESI Full ms2 226.20@c



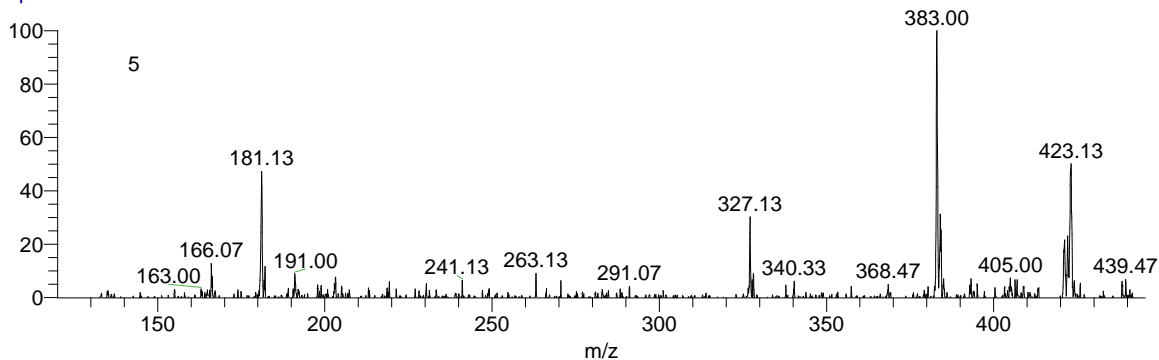
0,10 #446 RT: 7.48 AV: 1 NL: 1.48E4
T: + p ESI Full ms2 343.00@c



0,10 #504 RT: 8.88 AV: 1 NL: 3.72E4
T: + p ESI Full ms2 408.00@c

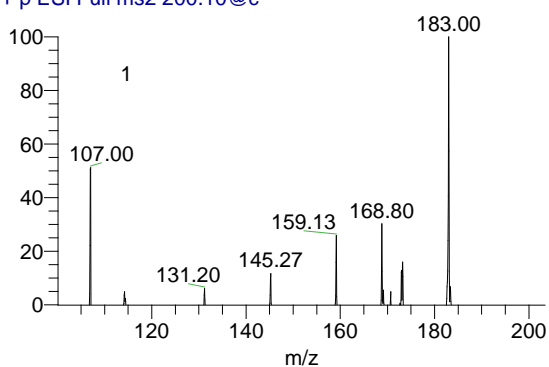


0,10 #633 RT: 11.97 AV: 1 NL: 7.77E3
T: + p ESI Full ms2 439.00@c

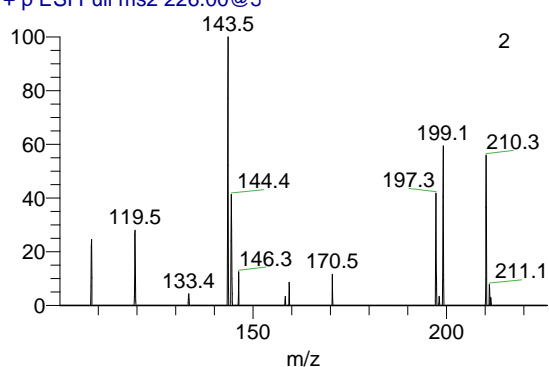


Slika 8.7-9 *Direct injection full scan MS²* spektar (1) pirimetanila, (2) ciprodinila, (3) boskalida, (4) trifloksistrobina i (5) bifentrina u ekstraktu spajkovane kore sorte Zlatni Delišeš (0,10 mgkg⁻¹)

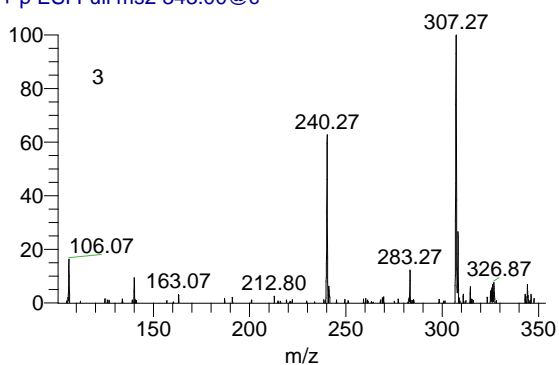
GD_0,20 #289 RT: 3.93 AV: 1 NL: 1.62E2
T: + p ESI Full ms2 200.10@c



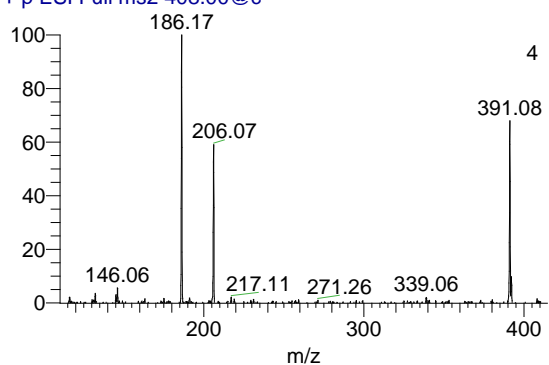
0,20 mgkg #396 RT: 8.88 AV: 1 NL: 2.32E2
T: + p ESI Full ms2 226.00@5



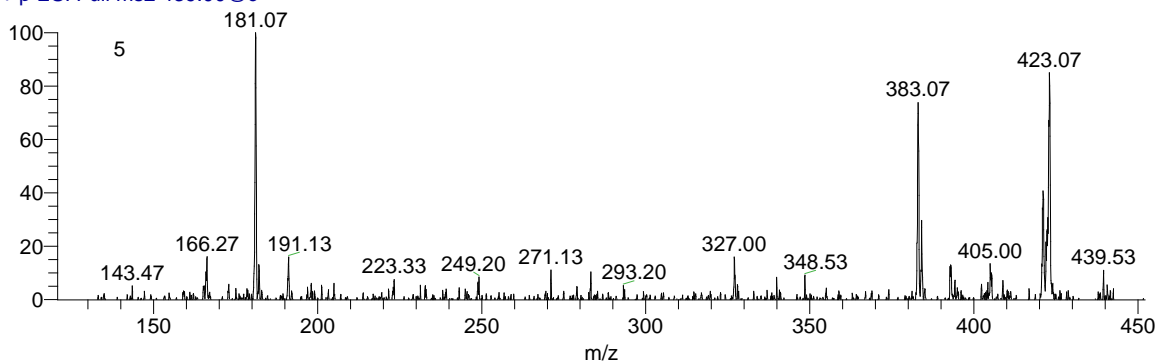
GD_0,20 #399 RT: 6.23 AV: 1 NL: 1.73E4
T: + p ESI Full ms2 343.00@c



GD_0,20 #534 RT: 9.49 AV: 1 NL: 5.64E4
T: + p ESI Full ms2 408.00@c

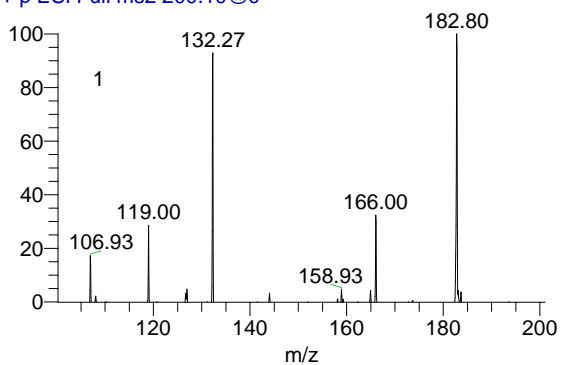


GD_0,20 #623 RT: 11.62 AV: 1 NL: 6.80E3
T: + p ESI Full ms2 439.00@c

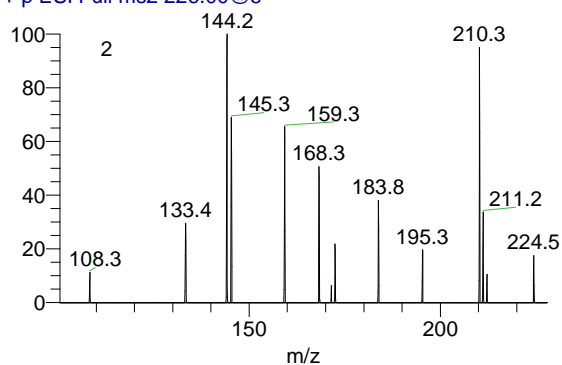


Slika 8.7-10 *Direct injection full scan MS²* spektar (1) pirimetanila, (2) ciprodinila, (3) boskalida, (4) trifloksistrobina i (5) bifentrina u ekstraktu spajkovane kore sorte Zlatni Delišeš (0,20 mgkg⁻¹)

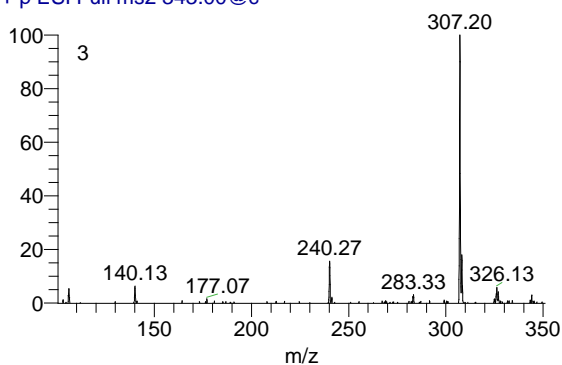
GD_0,50 #287 RT: 3.87 AV: 1 NL: 1.85E2
T: + p ESI Full ms2 200.10@c



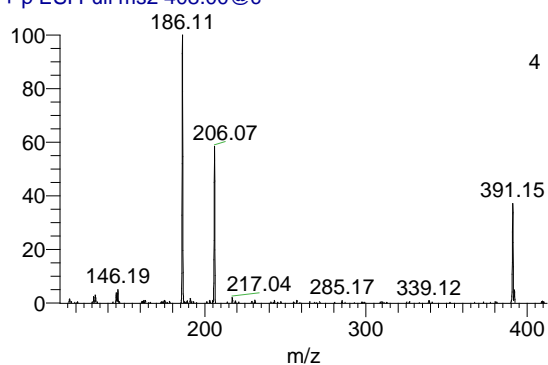
0,50 mgkg #338 RT: 7.39 AV: 1 NL: 1.42E2
T: + p ESI Full ms2 226.00@5



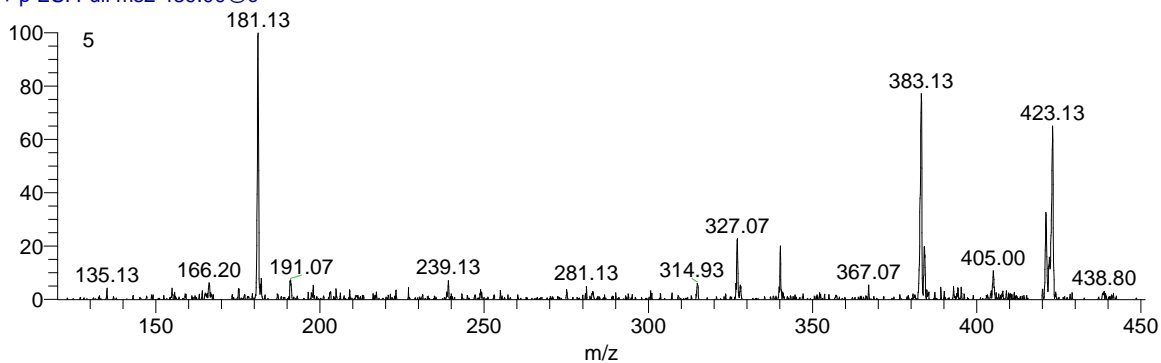
GD_0,50 #434 RT: 7.06 AV: 1 NL: 2.91E4
T: + p ESI Full ms2 343.00@c



GD_0,50 #532 RT: 9.39 AV: 1 NL: 1.41E5
T: + p ESI Full ms2 408.00@c

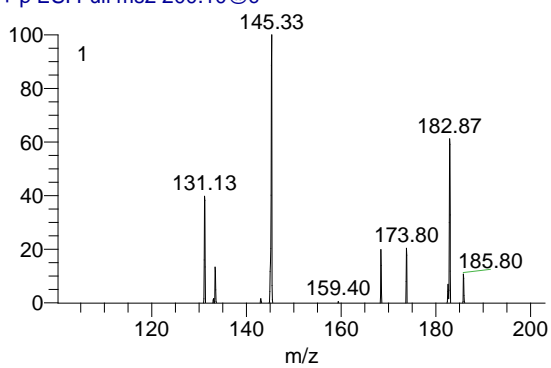


GD_0,50 #619 RT: 11.46 AV: 1 NL: 1.20E4
T: + p ESI Full ms2 439.00@c

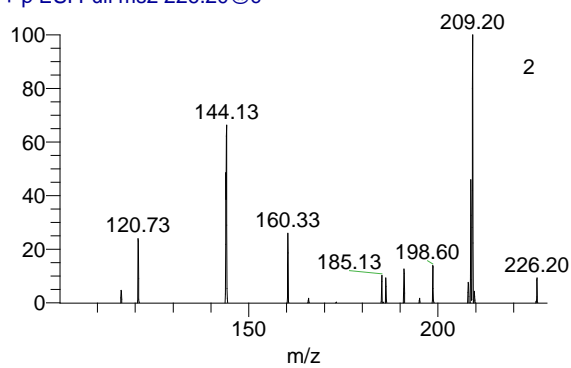


Slika 8.7-11 *Direct injection full scan MS²* spektar (1) pirimetanila, (2) ciprodinila, (3) boskalida, (4) trifloksistrobina i (5) bifentrina u ekstraktu spajkovane kore sorte Zlatni Delišeš (0,50 mgkg⁻¹)

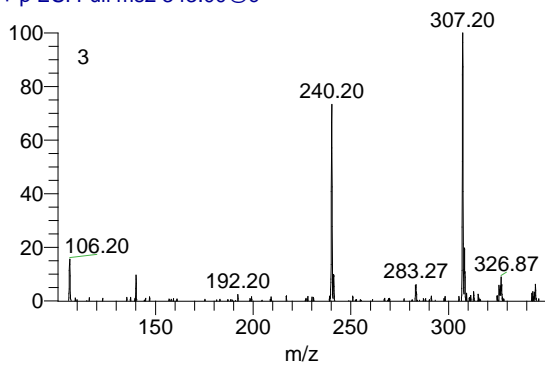
0,10 #285 RT: 3.93 AV: 1 NL: 1.86E2
T: + p ESI Full ms2 200.10@c



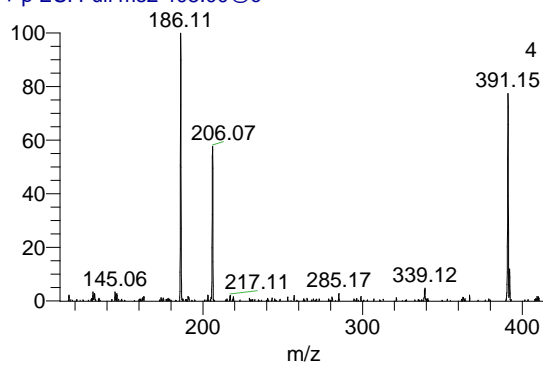
0,10 #357 RT: 5.43 AV: 1 NL: 3.00E2
T: + p ESI Full ms2 226.20@c



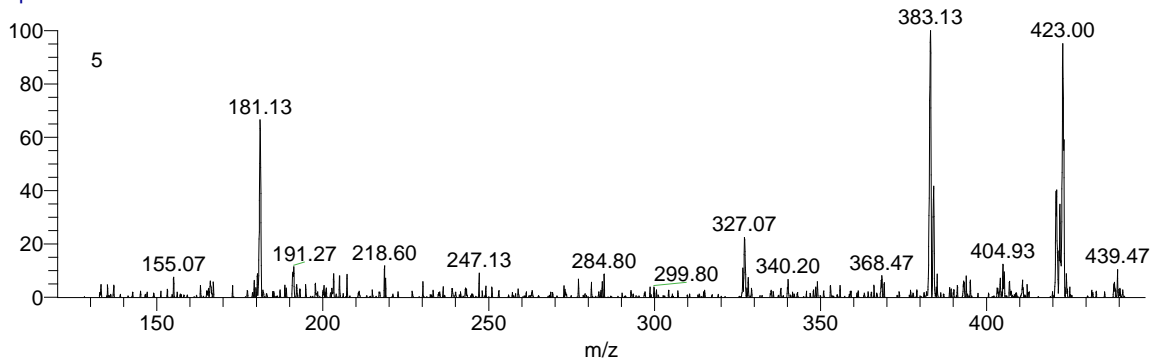
0,10 #462 RT: 7.86 AV: 1 NL: 1.21E4
T: + p ESI Full ms2 343.00@c



0,10 #542 RT: 9.79 AV: 1 NL: 3.85E4
T: + p ESI Full ms2 408.00@c

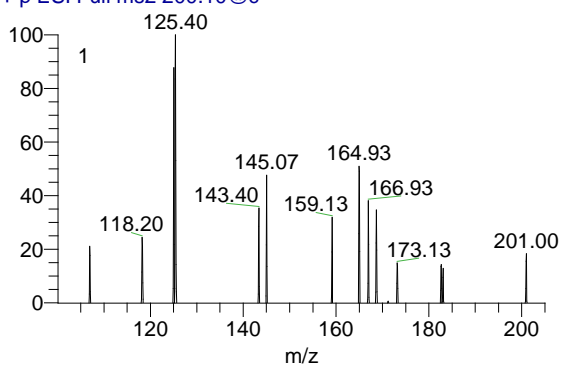


0,10 #625 RT: 11.78 AV: 1 NL: 5.18E3
T: + p ESI Full ms2 439.00@c

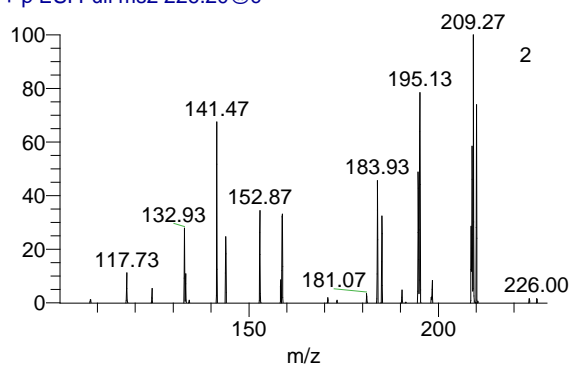


Slika 8.7-12 Direct injection full scan MS² spektar (1) pirimetanila, (2) ciprodinila, (3) boskalida, (4) trifloksistrobina i (5) bifentrina u ekstraktu spajkovane kore sorte Ajdared (0,10 mgkg⁻¹)

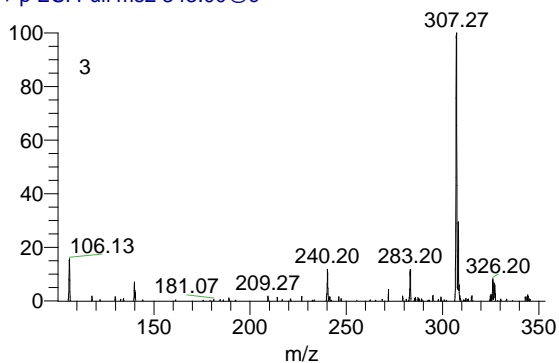
0,20 #259 RT: 3.38 AV: 1 NL: 1.47E2
T: + p ESI Full ms2 200.10@c



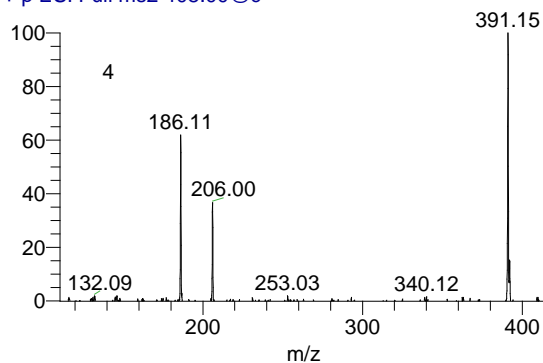
0,20 #381 RT: 5.90 AV: 1 NL: 3.11E2
T: + p ESI Full ms2 226.20@c



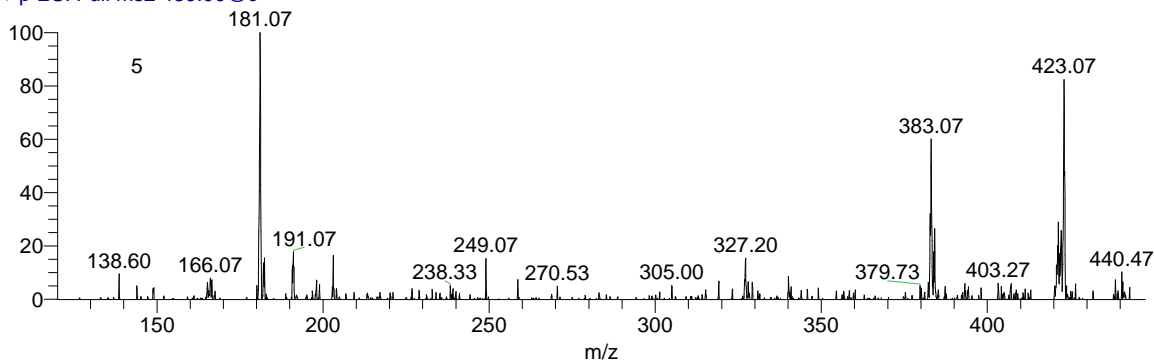
0,20 #424 RT: 6.93 AV: 1 NL: 9.91E3
T: + p ESI Full ms2 343.00@c



0,20 #541 RT: 9.74 AV: 1 NL: 5.13E4
T: + p ESI Full ms2 408.00@c

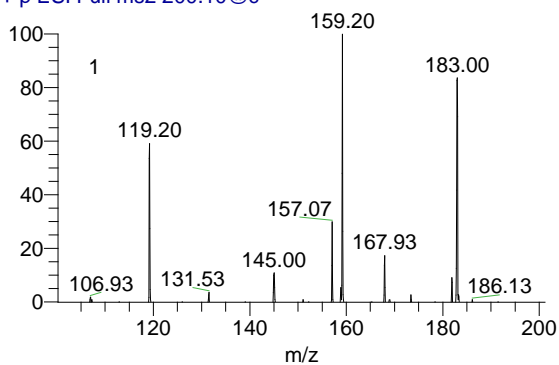


0,20 #622 RT: 11.69 AV: 1 NL: 4.39E3
T: + p ESI Full ms2 439.00@c

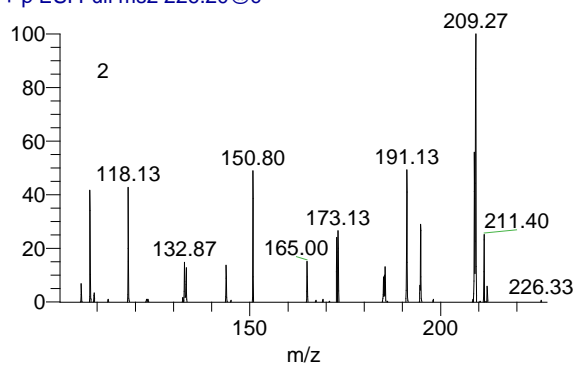


Slika 8.7-13 Direct injection full scan MS² spektar (1) pirimetanila, (2) ciprodinila, (3) boskalida, (4) trifloksistrobina i (5) bifentrina u ekstraktu spajkovane kore sorte Ajdared (0,20 mgkg⁻¹)

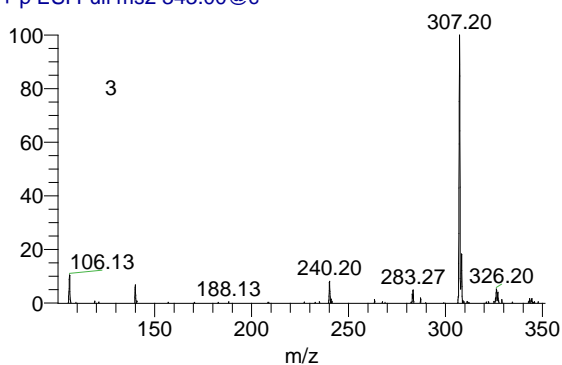
0,50 #262 RT: 3.36 AV: 1 NL: 1.10E2
T: + p ESI Full ms2 200.10@c



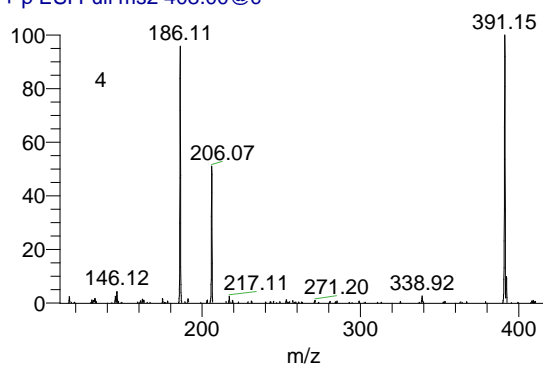
0,50 #379 RT: 5.78 AV: 1 NL: 2.90E2
T: + p ESI Full ms2 226.20@c



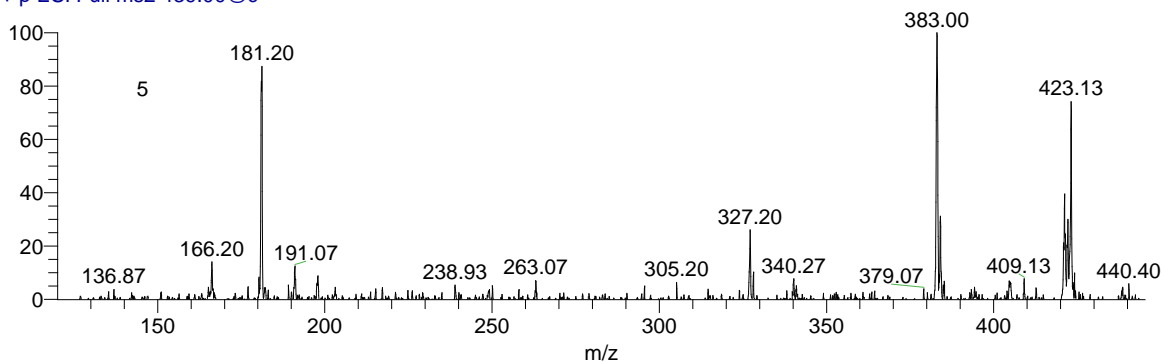
0,50 #468 RT: 7.87 AV: 1 NL: 3.42E4
T: + p ESI Full ms2 343.00@c



0,50 #553 RT: 9.91 AV: 1 NL: 9.83E4
T: + p ESI Full ms2 408.00@c

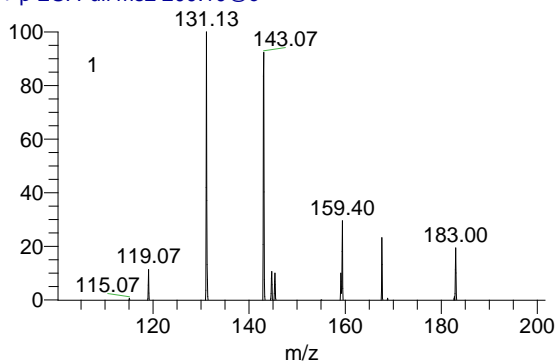


0,50 #635 RT: 11.88 AV: 1 NL: 8.10E3
T: + p ESI Full ms2 439.00@c

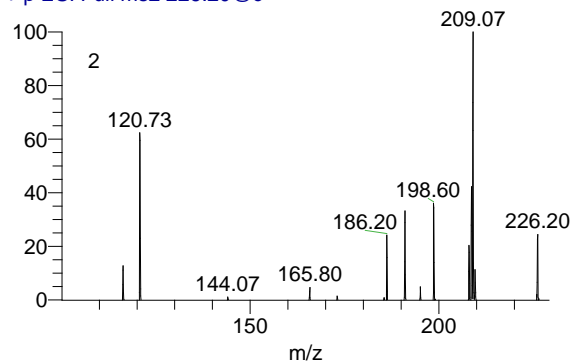


Slika 8.7-14 *Direct injection full scan MS²* spektar (1) pirimetanila, (2) ciprodinila, (3) boskalida, (4) trifloksistrobina i (5) bifentrina u ekstraktu spajkovane kore sorte Ajdared (0,50 mgkg⁻¹)

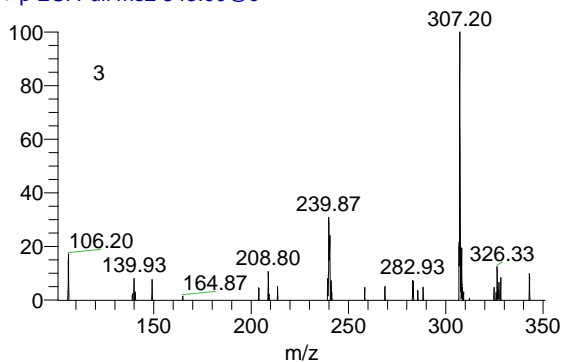
0,10 #247 RT: 3.15 AV: 1 NL: 1.59E2
T: + p ESI Full ms2 200.10@c



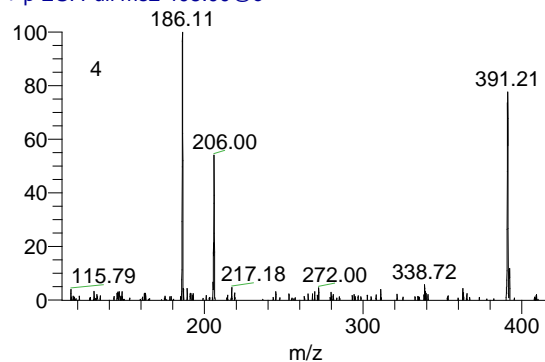
0,10 #346 RT: 5.20 AV: 1 NL: 3.43E2
T: + p ESI Full ms2 226.20@c



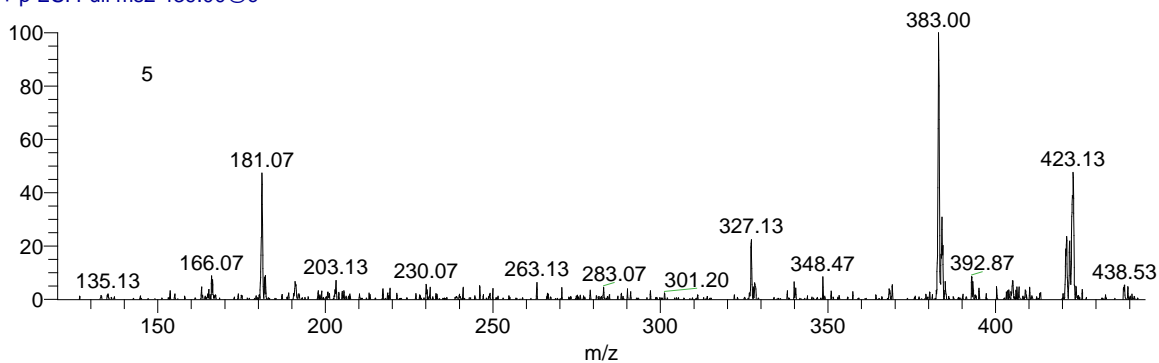
0,10 #388 RT: 6.08 AV: 1 NL: 1.43E4
T: + p ESI Full ms2 343.00@c



0,10 #473 RT: 8.13 AV: 1 NL: 3.61E4
T: + p ESI Full ms2 408.00@c

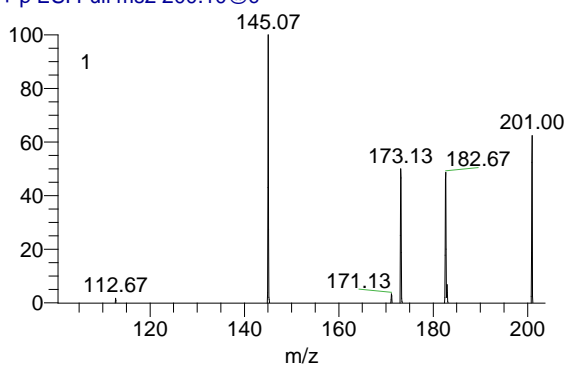


0,10 #637 RT: 12.07 AV: 1 NL: 7.58E3
T: + p ESI Full ms2 439.00@c

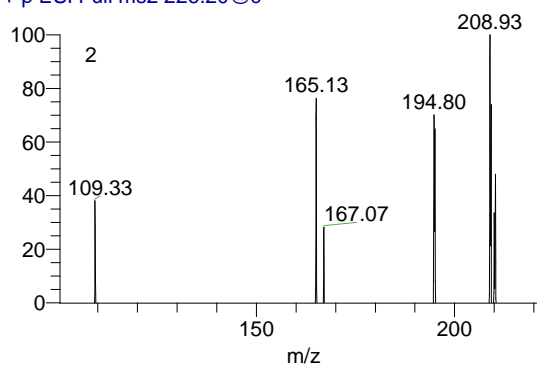


Slika 8.7-15 Direct injection full scan MS² spektrar (1) pirimetanila, (2) ciprodinila, (3) boskalida, (4) trifloksistrobina i (5) bifentrina u ekstraktu spajkovane kore sorte Greni Smit (0,10 mgkg⁻¹)

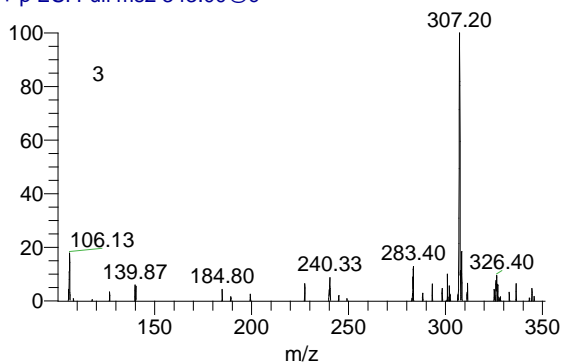
0,20 #242 RT: 3.03 AV: 1 NL: 2.34E2
T: + p ESI Full ms2 200.10@c



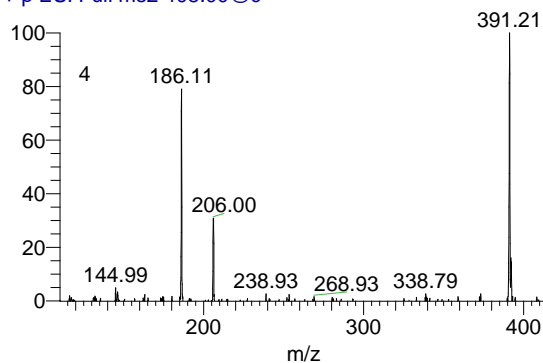
0,20 #306 RT: 4.36 AV: 1 NL: 1.31E2
T: + p ESI Full ms2 226.20@c



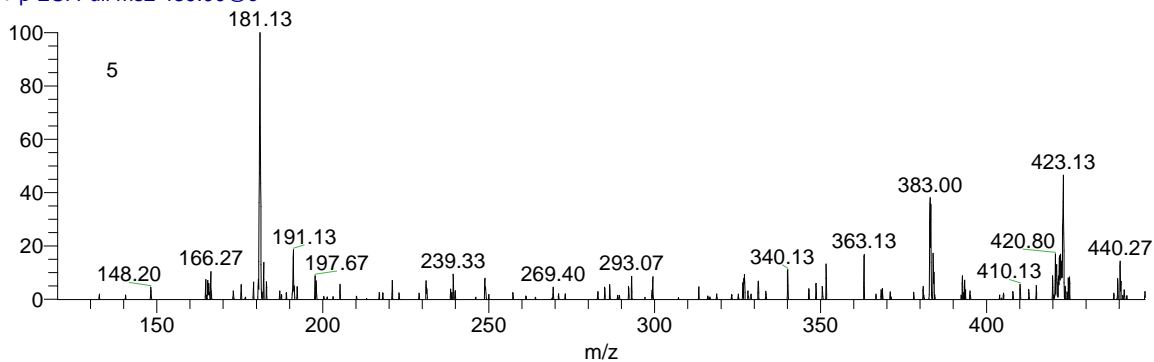
0,20 #392 RT: 6.15 AV: 1 NL: 1.21E4
T: + p ESI Full ms2 343.00@c



0,20 #475 RT: 8.16 AV: 1 NL: 4.21E4
T: + p ESI Full ms2 408.00@c

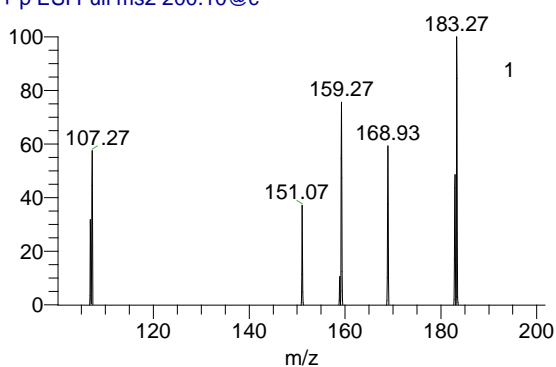


0,20 #561 RT: 10.23 AV: 1 NL: 6.51E3
T: + p ESI Full ms2 439.00@c

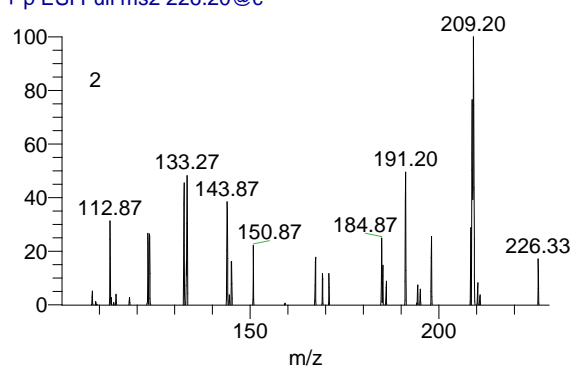


Slika 8.7-16 *Direct injection full scan MS²* spektr (1) pirimetanila, (2) ciprodinila, (3) boskalida, (4) trifloksistrobina i (5) bifentrina u ekstraktu spajkovane kore sorte Greni Smit (0,20 mgkg⁻¹)

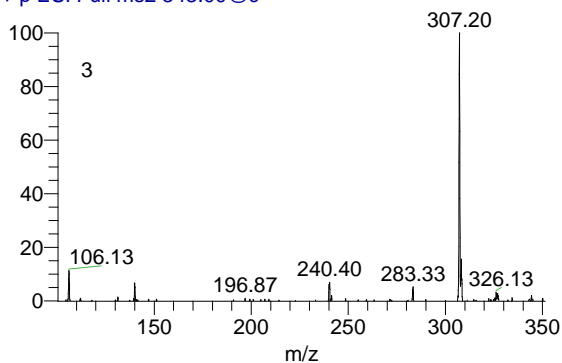
0,50 #218 RT: 2.45 AV: 1 NL: 2.26E2
T: + p ESI Full ms2 200.10@c



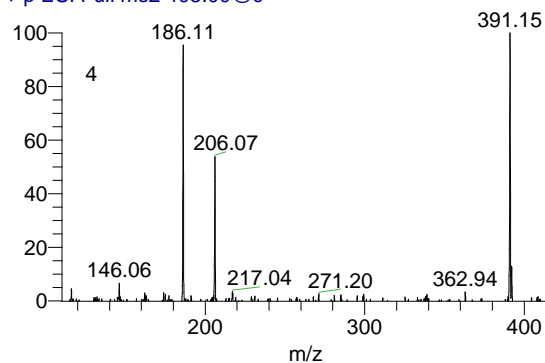
0,50 #346 RT: 5.10 AV: 1 NL: 3.25E2
T: + p ESI Full ms2 226.20@c



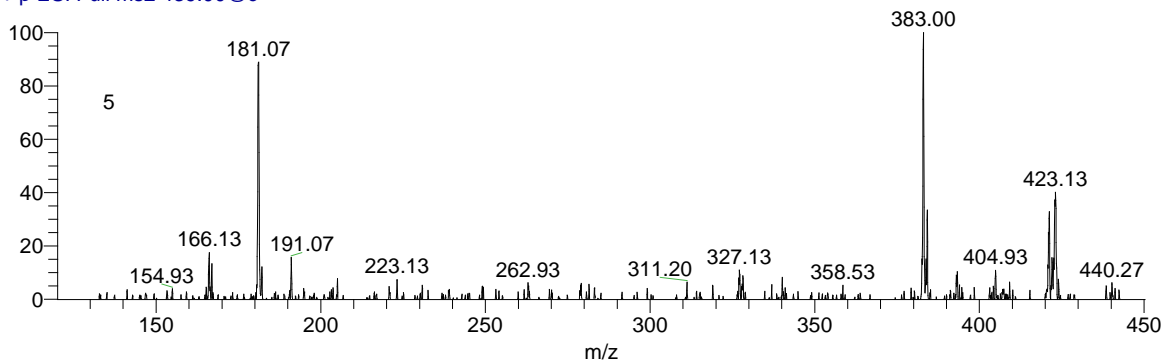
0,50 #441 RT: 7.22 AV: 1 NL: 3.48E4
T: + p ESI Full ms2 343.00@c



0,50 #481 RT: 8.19 AV: 1 NL: 9.64E4
T: + p ESI Full ms2 408.00@c

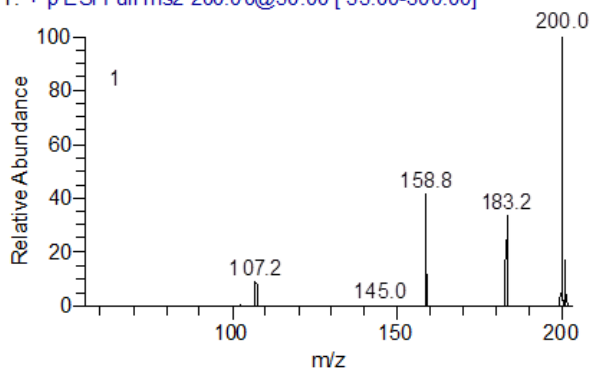


0,50 #573 RT: 10.39 AV: 1 NL: 8.91E3
T: + p ESI Full ms2 439.00@c

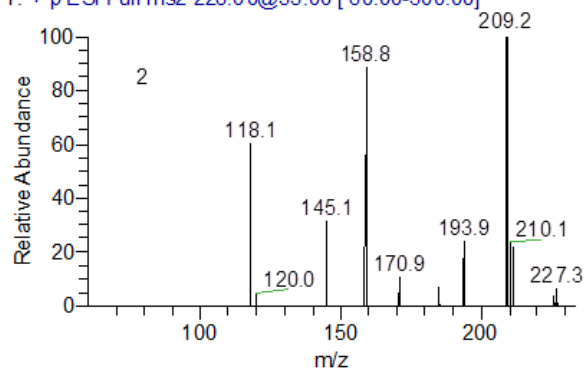


Slika 8.7-17 *Direct injection full scan MS²* spektrar (1) pirimetanila, (2) ciprodinila, (3) boskalida, (4) trifloksistrobina i (5) bifentrina u ekstraktu spajkovane kore sorte Greni Smit (0,50 mgkg⁻¹)

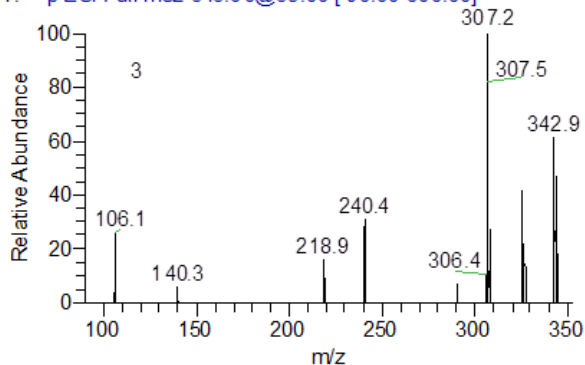
0,25_spajk #283 RT: 3.90 AV: 1 NL: 3.61E2
T: + p ESI Full ms2 200.00@50.00 [55.00-300.00]



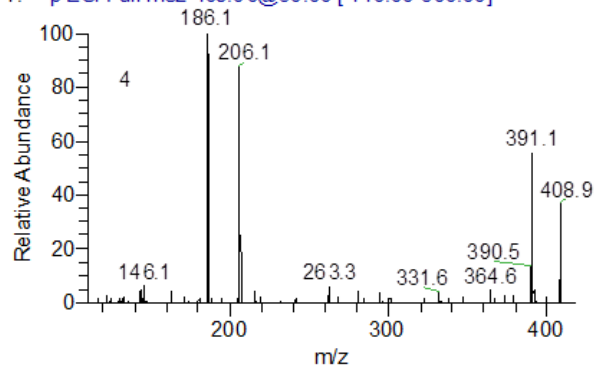
0,25_spajk #446 RT: 7.35 AV: 1 NL: 2.94E2
T: + p ESI Full ms2 226.00@55.00 [60.00-300.00]



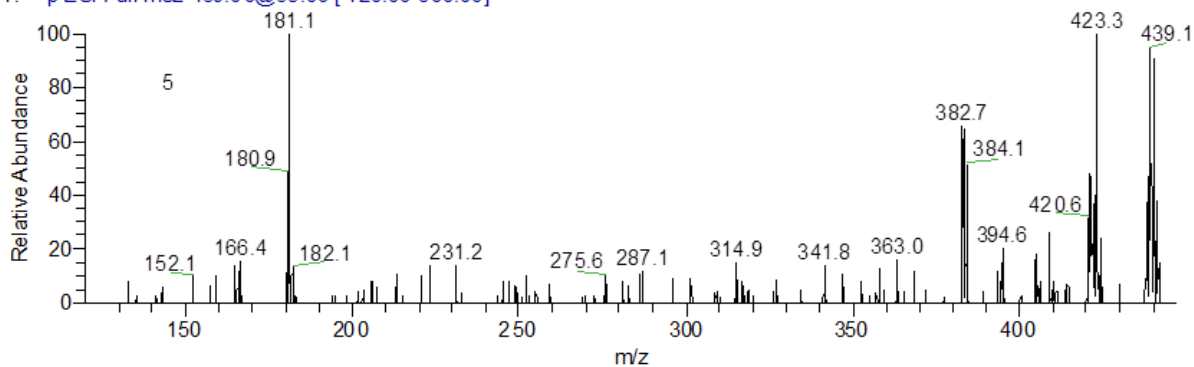
0,25_spajk #462 RT: 7.70 AV: 1 NL: 5.06E3
T: + p ESI Full ms2 343.00@35.00 [90.00-600.00]



0,25_spajk #522 RT: 9.16 AV: 1 NL: 2.12E4
T: + p ESI Full ms2 408.00@30.00 [110.00-600.00]

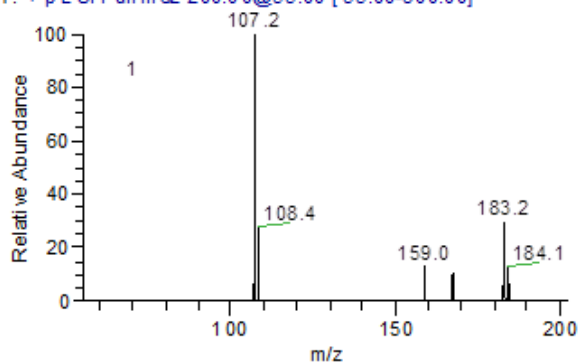


0,25_spajk #597 RT: 10.97 AV: 1 NL: 3.66E3
T: + p ESI Full ms2 439.00@35.00 [120.00-600.00]

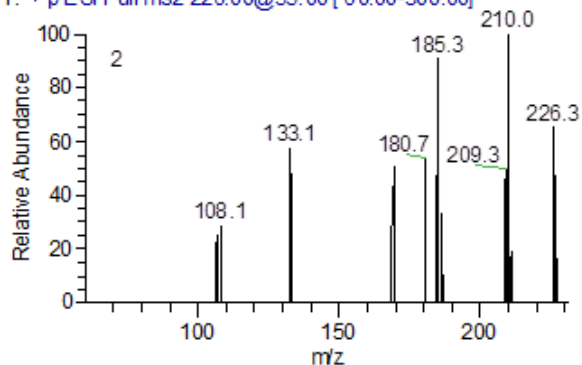


Slika 8.7-18 *Direct injection full scan MS²* spektar (1) pirimetanila, (2) ciprodinila, (3) boskalida, (4) trifloksistrobina i (5) bifentrina u spajkovanom blank ekstraktu kore Zlatnog Delišeša (0,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$)

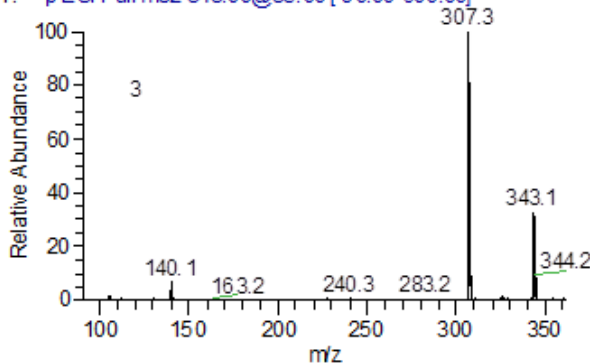
5,00_spajk #274 RT: 3.71 AV: 1 NL: 2.92E2
T: + p E SI Full ms2 200.00@55.00 [55.00-300.00]



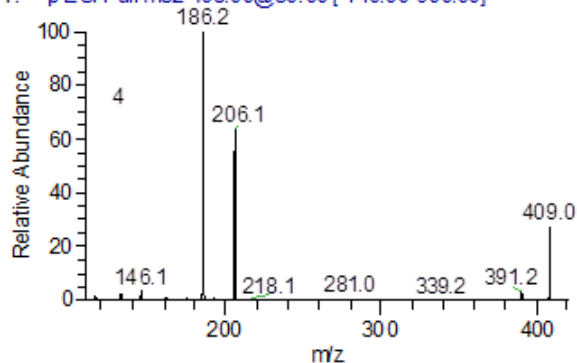
5,00_spajk #327 RT: 4.84 AV: 1 NL: 5.39E2
T: + p E SI Full ms2 226.00@55.00 [60.00-300.00]



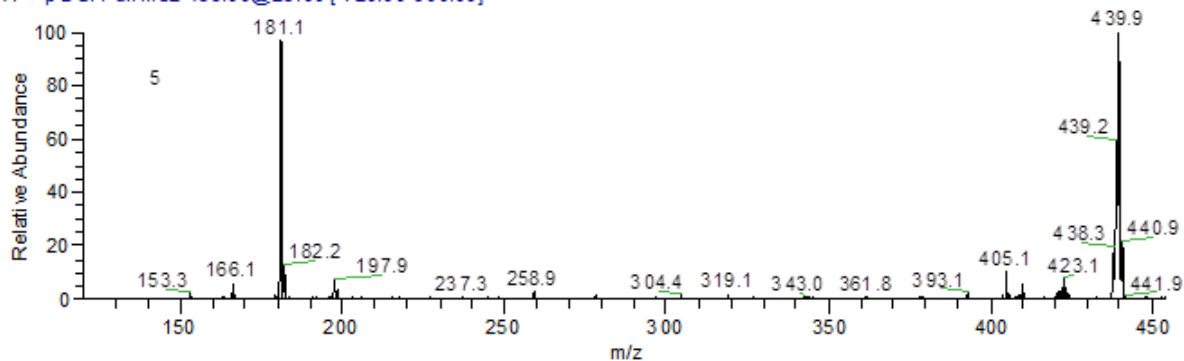
5,00_spajk #367 RT: 5.74 AV: 1 NL: 5.61E4
T: + p E SI Full ms2 343.00@35.00 [90.00-600.00]



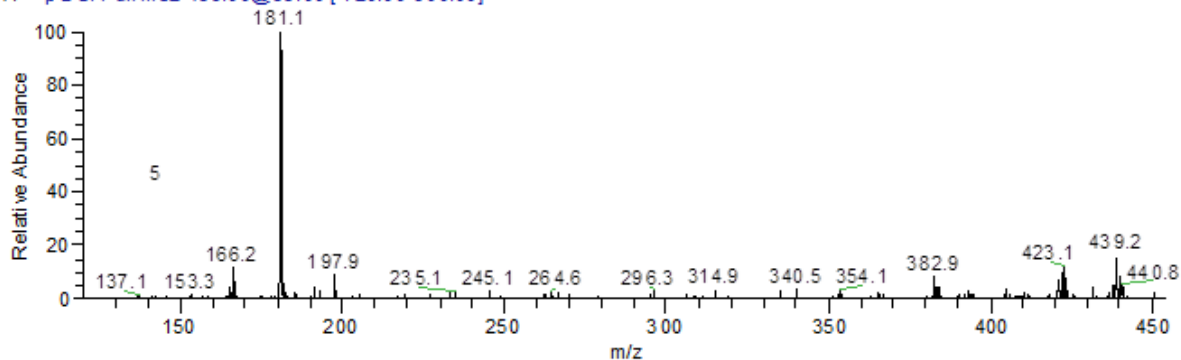
5,00_spajk #394 RT: 6.38 AV: 1 NL: 2.61E5
T: + p E SI Full ms2 408.00@30.00 [110.00-600.00]



5,00_spajk #471 RT: 8.28 AV: 1 NL: 1.38E4
T: + p E SI Full ms2 439.00@23.00 [120.00-600.00]



5,00_spajk #479 RT: 8.48 AV: 1 NL: 2.57E4
T: + p E SI Full ms2 439.00@35.00 [120.00-600.00]



Slika 8.7-19 *Direct injection full scan MS²* spektr (1) pirimetanila, (2) ciprodinila, (3) boskalida, (4) trifloksistrobina i (5) bifentrina u spajkovanom blank ekstraktu kore Zlatnog Delišesa (5,00 µgmL⁻¹)

8.8 Tune fajlovi LTQ/XL masenog spektrometra

Tabele Tabela 8.8-1 - Tabela 8.8-7 predstavljaju pregled *tune* fajlova, koji su primenjivani u okviru postupaka optimizacije parametara rada masenog spektrometra prema ispitivanim pesticidima.

Tabela 8.8-1 sadrži parametre u okviru opšteg *tune* fajla takozvanog *ESI tune* fajla koji je sistemski predefinisani i nije optimizovan prema pesticidima.

Tabele Tabela 8.8-2 - Tabela 8.8-6 sadrže parametre u okviru *tune* fajlova koji se u odnosu na opšti *tune* razlikuju u vrednostima parametara jonske optike, koja je optimizovana prema svakom od pesticida.

Tabela 8.8-7 sadrži parametre u okviru finalnog *tune* fajla, postignute nakon optimizacije voltaže spreja, jonske optike i protoka *sheath/aux* gasa; ovaj *tune* je odabran kao radni *tune*.

Tabela 8.8-1 Parametri opšteg *tune* fajla (tzv. *ESI tune*)

ESI Source		Ion Optics	
Spray Voltage (kV):	5.00	Multipole 00 Offset (V):	-4.25
Sheath Gas Flow Rate:	60.00	Lens 0 (V):	-5.00
Aux Gas Flow Rate:	20.00	Multipole 0 Offset (V):	-4.75
Sweep Gas Flow Rate:	0.00	Lens 1 (V):	-38.00
Capillary Voltage (V):	35.00	Gate Lens (V):	-34.00
Capillary Temp (°C):	275.00	Multipole 1 Offset (V):	-11.00
Tube Lens (V):	110.00	Multipole RF (Vp-p):	400.00
Ion Detection System		Front Lens (V):	-5.25
Conversion Dynode	On		
Dynode (kV):	-15.00		
Multiplier 1 (V):	-1000.00		
Multiplier 2 (V):	-960.00		

Tabela 8.8-2 Parametri *tune* fajla sa jonskom optikom optimizovanom prema jonu pirimetanila (m/z 200)

ESI Source		Ion Optics	
Spray Voltage (kV):	5.00	Multipole 00 Offset (V):	-3.50
Sheath Gas Flow Rate:	60.00	Lens 0 (V):	-4.00
Aux Gas Flow Rate:	20.00	Multipole 0 Offset (V):	-4.75
Sweep Gas Flow Rate:	0.00	Lens 1 (V):	-9.00
Capillary Voltage (V):	41.00	Gate Lens (V):	-64.00
Capillary Temp (°C):	275.00	Multipole 1 Offset (V):	-13.50
Tube Lens (V):	65.00	Multipole RF (Vp-p):	400.00
Ion Detection System		Front Lens (V):	-5.75
Conversion Dynode	On		
Dynode (kV):	-15.00		
Multiplier 1 (V):	-1000.00		
Multiplier 2 (V):	-960.00		

Tabela 8.8-3 Parametri *tune* fajla sa jonskom optikom optimizovanom prema jonu ciprodinila (m/z 226)

ESI Source		Ion Optics	
Spray Voltage (kV):	5.00	Multipole 00 Offset (V):	-3.75
Sheath Gas Flow Rate:	60.00	Lens 0 (V):	-4.50
Aux Gas Flow Rate:	20.00	Multipole 0 Offset (V):	-4.75
Sweep Gas Flow Rate:	0.00	Lens 1 (V):	-39.00
Capillary Voltage (V):	41.00	Gate Lens (V):	-28.00
Capillary Temp (°C):	275.00	Multipole 1 Offset (V):	-9.50
Tube Lens (V):	70.00	Multipole RF (Vp-p):	400.00
Ion Detection System		Front Lens (V):	-6.75
Conversion Dynode	On		
Dynode (kV):	-15.00		
Multiplier 1 (V):	-1000.00		
Multiplier 2 (V):	-960.00		

Tabela 8.8-4 Parametri *tune* fajla sa jonskom optikom optimizovanom prema jonu boskalida (m/z 343)

ESI Source		Ion Optics	
Spray Voltage (kV):	5.00	Multipole 00 Offset (V):	-2.00
Sheath Gas Flow Rate:	60.00	Lens 0 (V):	-2.50
Aux Gas Flow Rate:	20.00	Multipole 0 Offset (V):	-4.50
Sweep Gas Flow Rate:	0.00	Lens 1 (V):	-12.00
Capillary Voltage (V):	29.00	Gate Lens (V):	-48.00
Capillary Temp (°C):	275.00	Multipole 1 Offset (V):	-15.00
Tube Lens (V):	65.00	Multipole RF (Vp-p):	400.00
Ion Detection System		Front Lens (V):	-5.50
Conversion Dynode	On		
Dynode (kV):	-15.00		
Multiplier 1 (V):	-1000.00		
Multiplier 2 (V):	-960.00		

Tabela 8.8-5 Parametri *tune* fajla sa jonskom optikom optimizovanom prema jonu trifloksistrobina (m/z 409)

ESI Source		Ion Optics	
Spray Voltage (kV):	5.00	Multipole 00 Offset (V):	-3.25
Sheath Gas Flow Rate:	60.00	Lens 0 (V):	-4.00
Aux Gas Flow Rate:	20.00	Multipole 0 Offset (V):	-4.50
Sweep Gas Flow Rate:	0.00	Lens 1 (V):	-22.00
Capillary Voltage (V):	28.00	Gate Lens (V):	-22.00
Capillary Temp (°C):	275.00	Multipole 1 Offset (V):	-14.00
Tube Lens (V):	85.00	Multipole RF (Vp-p):	400.00
Ion Detection System		Front Lens (V):	-5.50
Conversion Dynode	On		
Dynode (kV):	-15.00		
Multiplier 1 (V):	-1000.00		
Multiplier 2 (V):	-960.00		

Tabela 8.8-6 Parametri *tune* fajla sa jonskom optikom optimizovanom prema jonu bifentrina (m/z 440)

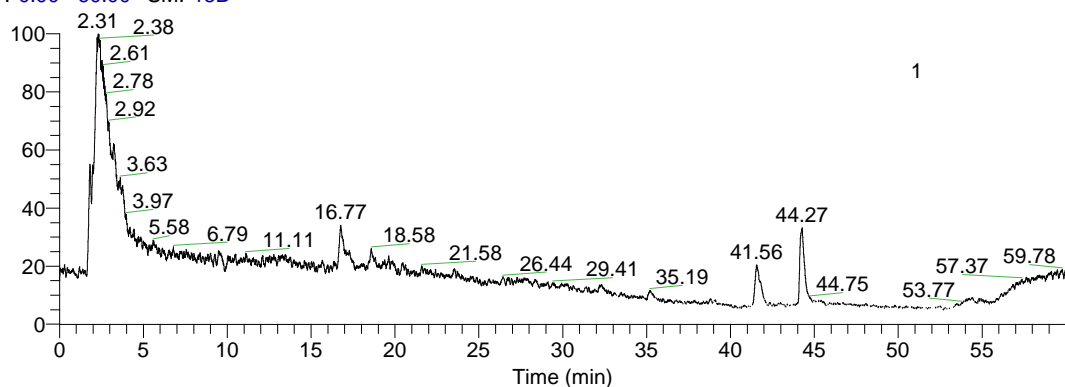
ESI Source		Ion Optics	
Spray Voltage (kV):	5.00	Multipole 00 Offset (V):	-1.00
Sheath Gas Flow Rate:	60.00	Lens 0 (V):	-2.50
Aux Gas Flow Rate:	20.00	Multipole 0 Offset (V):	-4.00
Sweep Gas Flow Rate:	0.00	Lens 1 (V):	-18.00
Capillary Voltage (V):	29.00	Gate Lens (V):	-50.00
Capillary Temp (°C):	275.00	Multipole 1 Offset (V):	-14.50
Tube Lens (V):	75.00	Multipole RF Amplitude (Vp-p):	400.00
Ion Detection System		Front Lens (V):	-5.75
Conversion Dynode	On		
Dynode (kV):	-15.00		
Multiplier 1 (V):	-1000.00		
Multiplier 2 (V):	-960.00		

Tabela 8.8-7 Parametri radnog *tune* fajla

ESI Source		Ion Optics	
Spray Voltage (kV):	5.00	Multipole 00 Offset (V):	-2.00
Sheath Gas Flow Rate:	21.00	Lens 0 (V):	-2.50
Aux Gas Flow Rate:	18.00	Multipole 0 Offset (V):	-4.50
Sweep Gas Flow Rate:	0.00	Lens 1 (V):	-12.00
Capillary Voltage (V):	29.00	Gate Lens (V):	-48.00
Capillary Temp (°C):	275.00	Multipole 1 Offset (V):	-15.00
Tube Lens (V):	65.00	Multipole RF (Vp-p):	400.00
Ion Detection System		Front Lens (V):	-5.50
Conversion Dynode	On		
Dynode (kV):	-15.00		
Multiplier 1 (V):	-1000.00		
Multiplier 2 (V):	-960.00		

8.9 LC/MS hromatogrami ekstrakata kore

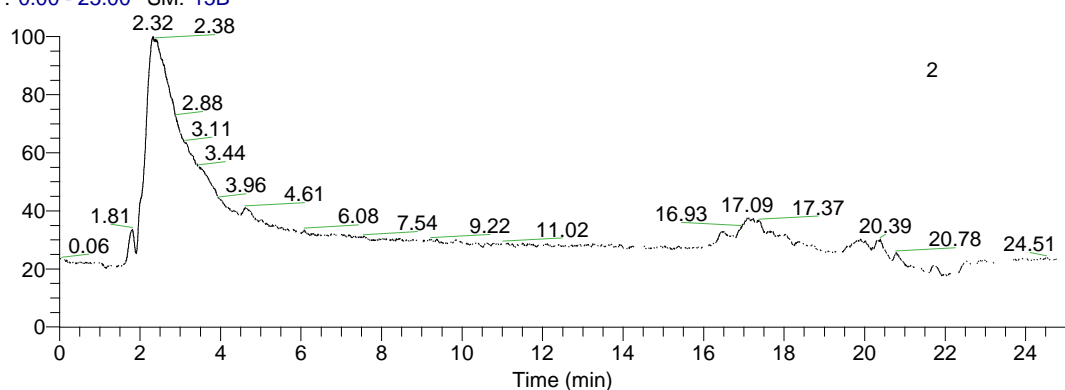
RT: 0.00 - 60.00 SM: 15B



NL:
1.46E6
TIC MS
RB_GS_M
EOH_FS60

1

RT: 0.00 - 25.00 SM: 15B

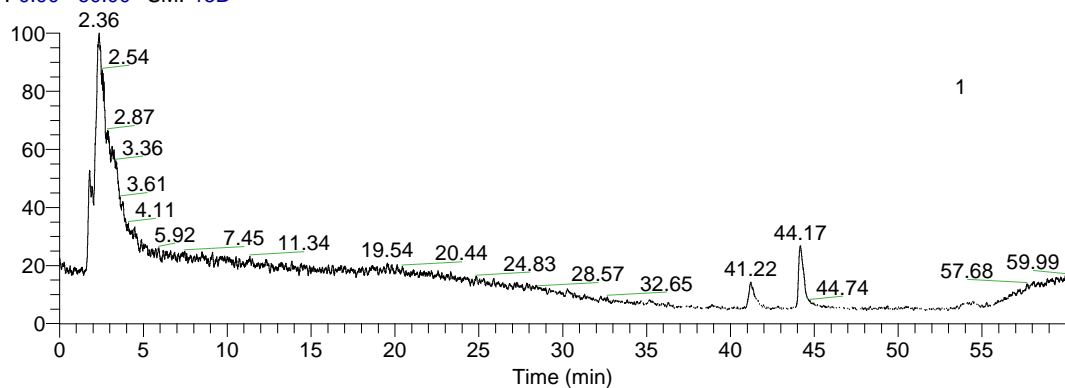


NL:
1.17E7
TIC MS
RB_GS_M
EOH_FS25

2

Slika 8.9-1 Hromatogrami metanalnog ekstrakta kore Greni Smita bez dodatih pesticida (blank) analiziranog u *full scan* režimu metodom 04 (1) i metodom 27 (2) (instrumentalna CONF-2)

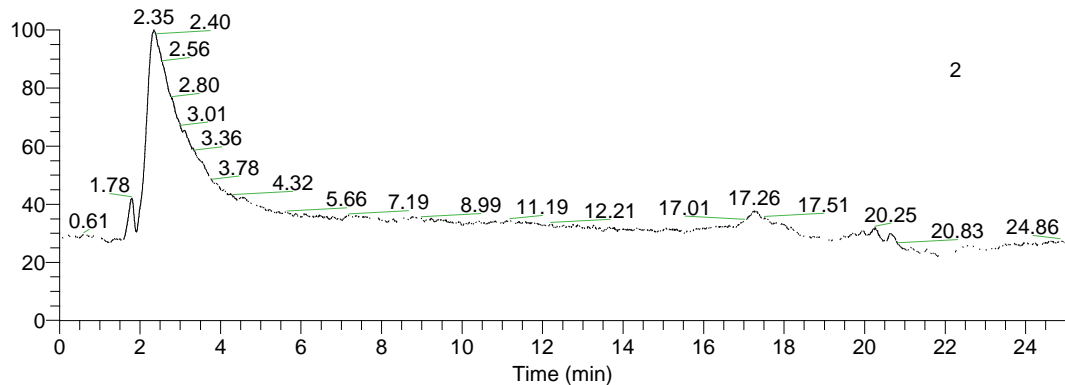
RT: 0.00 - 60.00 SM: 15B



NL:
1.57E6
TIC MS
RB_ID_ME
OH_FS60

1

RT: 0.00 - 25.00 SM: 15B

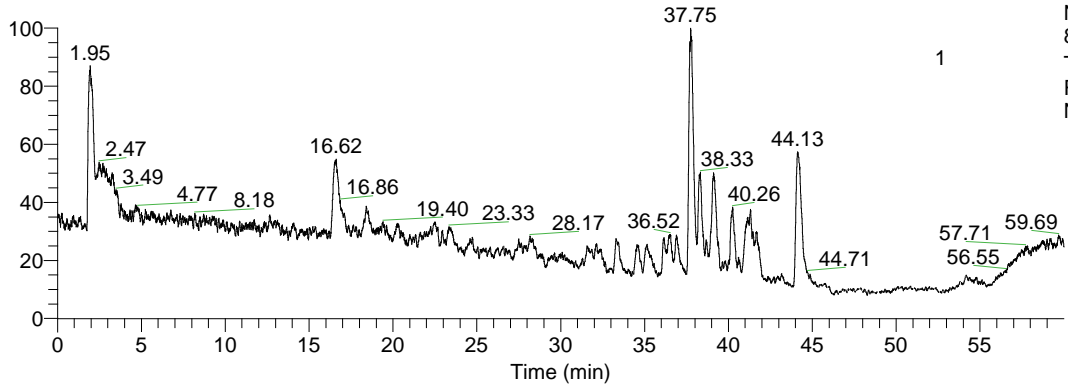


NL:
1.08E7
TIC MS
RB_ID_ME
OH_FS25

2

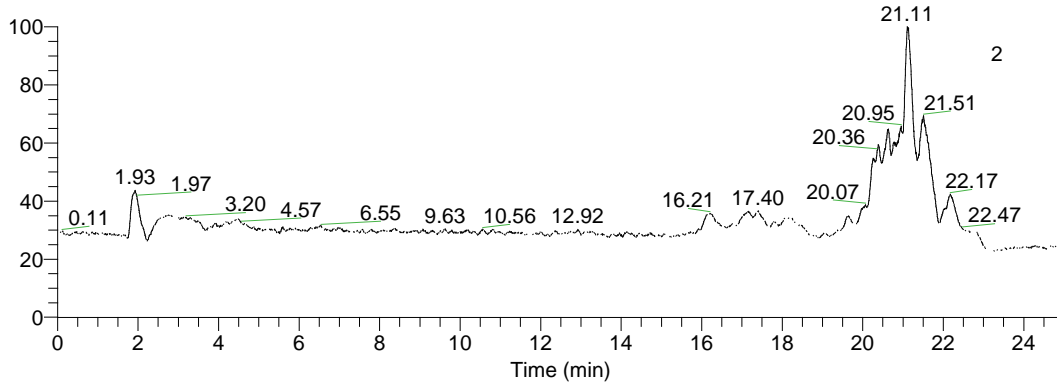
Slika 8.9-2 Hromatogrami metanolnog ekstrakta kore Ajdareda bez dodatih pesticida (blank) analiziranog u *full scan* režimu metodom 04 (1) i metodom 27 (2) (instrumentalna CONF-2)

RT: 0.00 - 60.00 SM: 15B



NL:
8.23E5
TIC MS
RB_GS_AC
N_FS60

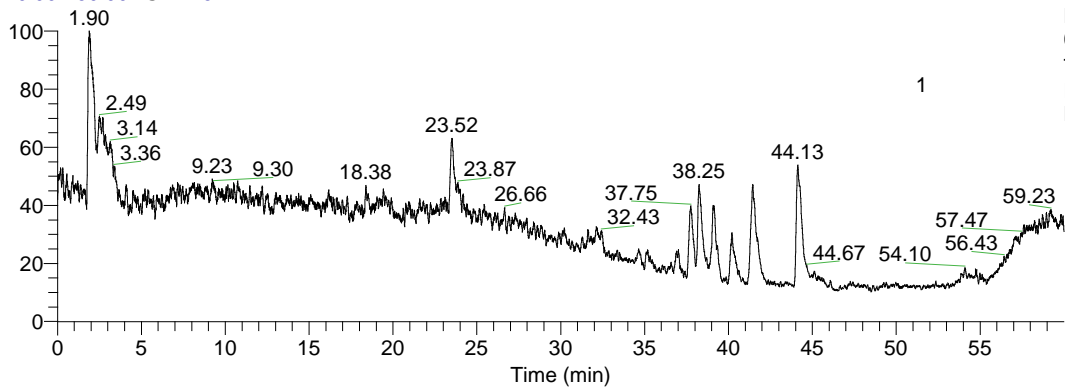
RT: 0.00 - 25.00 SM: 15B



NL:
1.06E7
TIC MS
RB_GS_AC
N_FS25

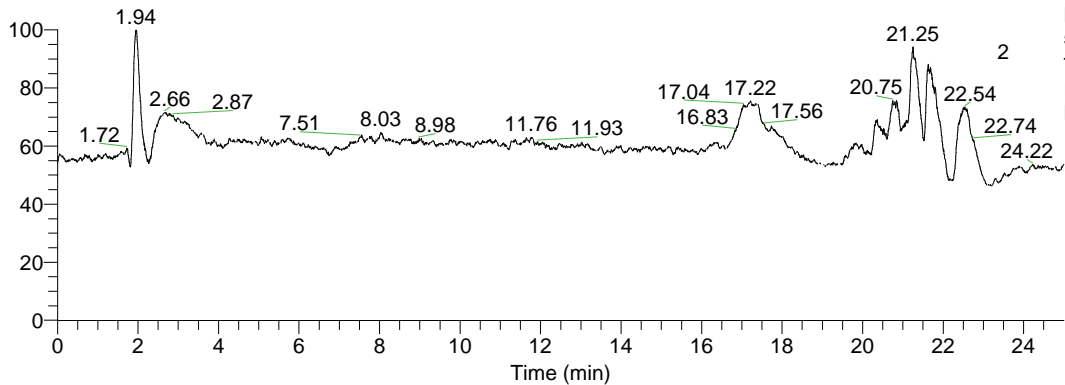
Slika 8.9-3 Hromatogrami acetonitrilnog ekstrakta kore Greni Smita bez dodatih pesticida (blank) analiziranog u *full scan* režimu metodom 04 (1) i metodom 27 (2) (instrumentalna CONF-2)

RT: 0.00 - 60.00 SM: 15B



NL:
6.77E5
TIC MS
RB_ID_AC
N_FS60

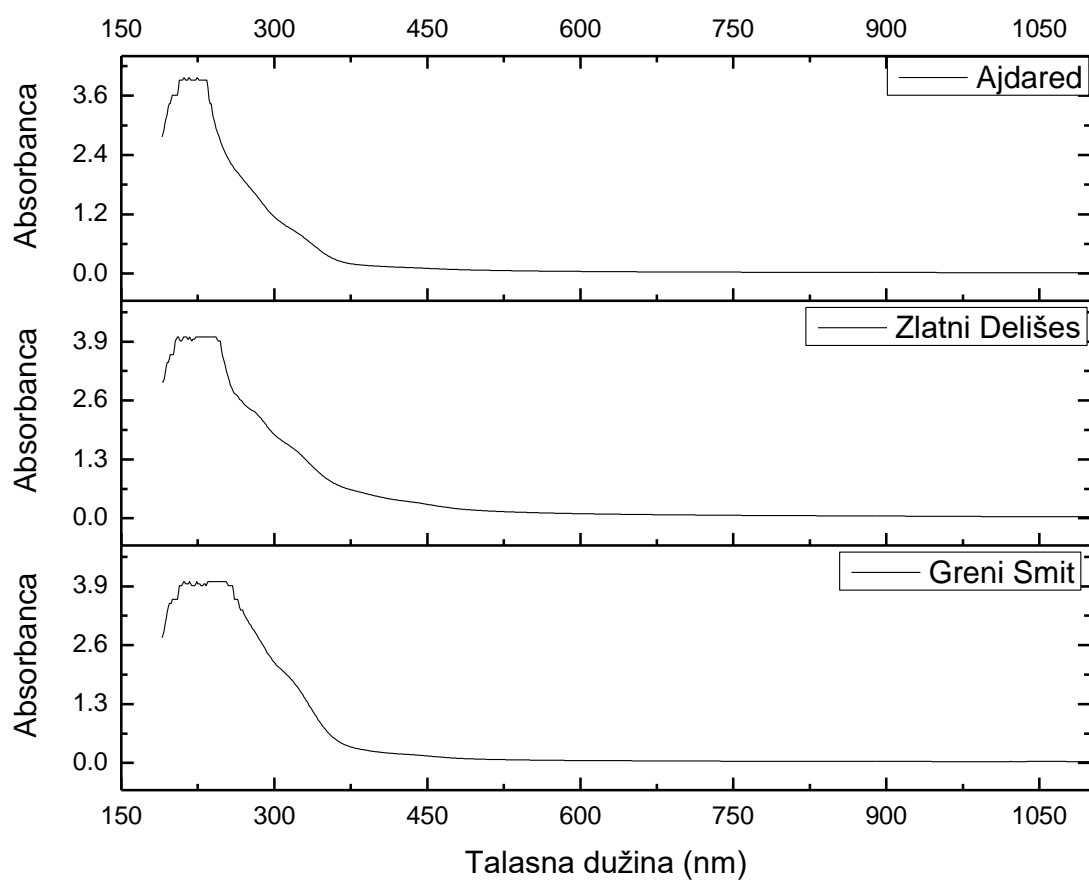
RT: 0.00 - 25.00 SM: 15B



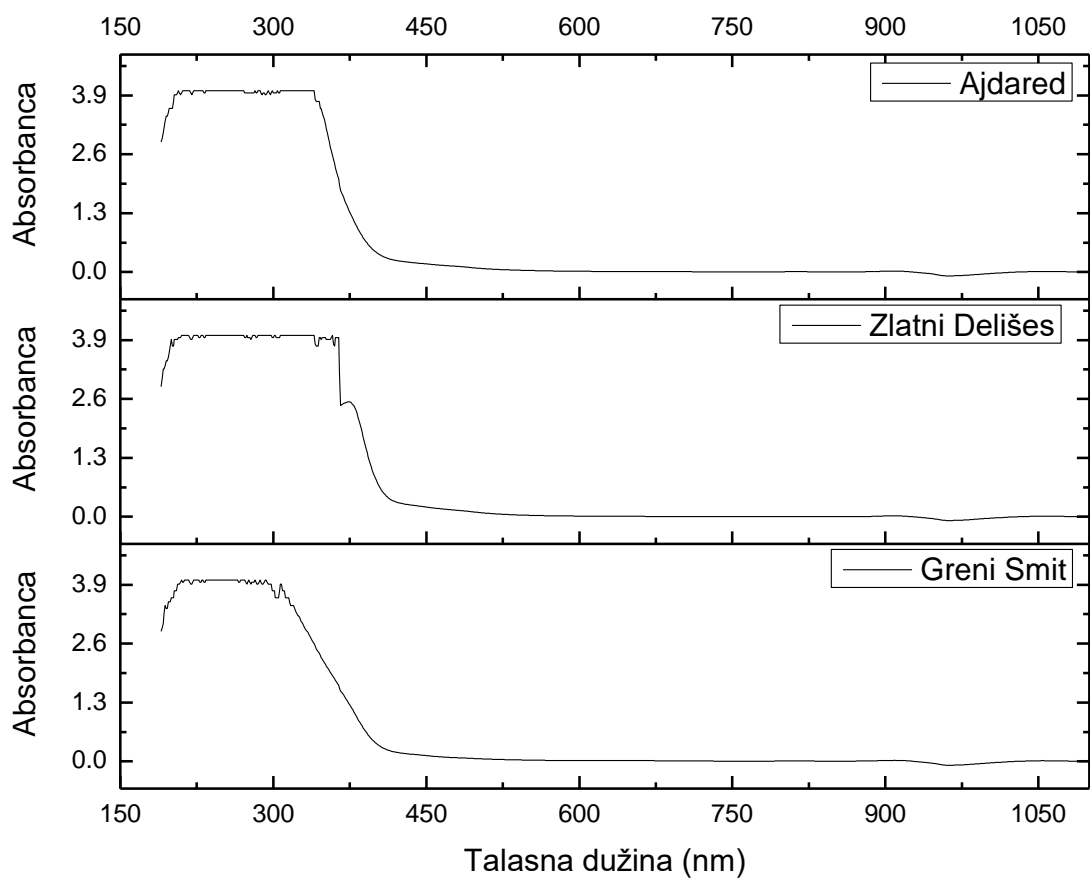
NL:
5.93E6
TIC MS
RB_ID_AC
N_FS25

Slika 8.9-4 Hromatogrami acetonitrilnog ekstrakta kore Ajdareda bez dodatih pesticida (blank) analiziranog u *full scan* režimu metodom 04 (1) i metodom 27 (2) (instrumentalna CONF-2)

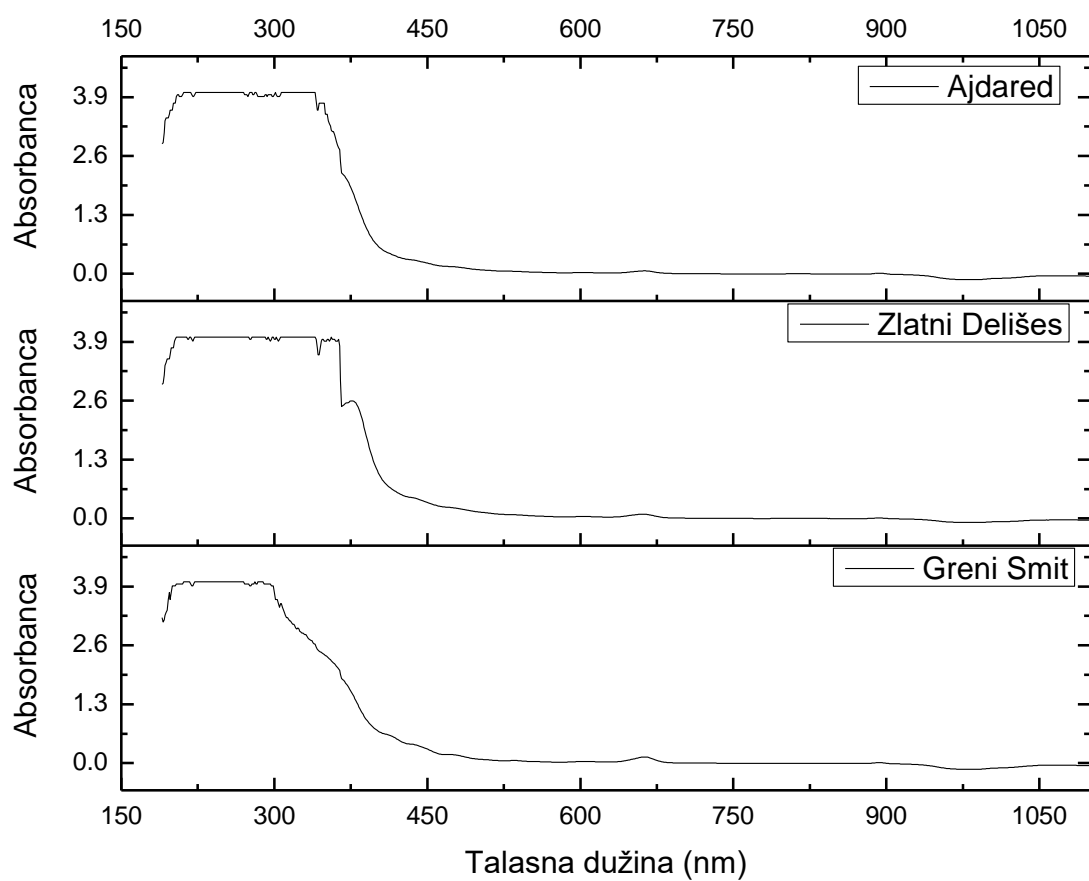
8.10 UV/VIS spektri ekstrakata kore



Slika 8.10-1 UV/VIS spektri vodenog ekstrakta kore Ajdareda, Zlatnog Delišesa i Greni Smita (1 g kore/1 mL vode)



Slika 8.10-2 UV/VIS spektri metanolnog ekstrakta kore Ajdareda, Zlatnog Delišesa i Greni Smita (1 g kore/1 mL metanola)



Slika 8.10-3 UV/VIS spektri acetonitrilnog ekstrakta kore Ajdareda, Zlatnog Delišesa i Greni Smita (1 g kore/1 mL acetonitrila)

BIOGRAFIJA

Milica Branković je rođena u Nišu 22.12.1991. godine. Osnovne studije na departmanu za hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu upisala je školske 2010/11, a diplomirala je školske 2012/13. Naredne školske godine 2013/14 upisala je master studije hemije na istom fakultetu, a diplomirala je školske 2014/15 odbranom master rada pod nazivom “Uticaj temperature čuvanja na sadržaj ukupnih flavonoida i monomernih antocijana u soku i sirupu od aronije”.

Doktorske akademske studije na departmanu za hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu upisala je školske 2015/16. U 2016. godini izabrana je u zvanje istraživača-pripravnika i počela rad na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja pod nazivom “Proizvodnja novih dijetetskih mlečnih proizvoda za rizične populacije zasnovana na kvalitativnoj i kvantitativnoj analizi markera zdravstvenog rizika konzumiranja mleka” (TR 31060). U školskoj 2016/17 i 2017/18 bila je angažovana kao saradnik u nastavi na predmetu Hemodinamika zagađujućih supstanci. U 2019. godini promovisana je u zvanje istraživač-saradnik.

Bavi se naučnim istraživanjima u oblasti hemije životne sredine sa akcentom na primeni masene spektrometrije u analizi ksenobiotika u hrani. Usavršava se učešćem na radionicama, seminarima i konferencijama u oblasti istraživanja (škola masene spektrometrije The Mass Spectrometry in Environmental and Biochemical Analysis” (2013); radionica “Annual Workshops with DSP Chromatography 2018” (2018); Seminar "Inteligentni GC" (2019); digitalna konferencija “Applications in a field of biomedicine and analytical science” (2020)). Registrovana je u E-CRIS.SR informacionom sistemu o istraživačkoj delatnosti u Srbiji pod brojem 11538 i u ORCID bazi istraživača pod brojem 0000-0002-8671-7066.

Bila je učesnik u realizaciji programa “Noć istraživača 2016.” u okviru projekta “The Road to Friday of Science – ReFocus”, finansiranog od strane Evropske Komisije u okviru “Horizon 2020” i učesnik na projektu Evropske Unije ERASMUS+ KA2 Capacity building in Higher Education „ICT Networking for Overcoming Technical and Social Barriers in Instrumental Analytical Chemistry Education“ – acronym NETCHEM, 573885-EPP-1-2016-1- RS-EPPKA2-CBHE-JP (2016-2020, aplikant organizacija Univerzitet u Nišu). Bila je član organizacionog odbora 10. i 11. škole masene spektrometrije, organizovanih u saradnji Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu i Univerziteta „Pjer i Marija Kiri“ iz Pariza, održanih 2016. i 2019. godine.

Nagrađena je stipendijom Fonda za mlade talente Republike Srbije (2012/13) i Grada Niša (2015). Dobitnik je Specijalnog priznanja Srpskog Hemijskog društva (2013), čiji je stalni član od 2014. godine.

Milica Branković je autor i koautor jednog rada objavljenog u vrhunskom međunarodnom časopisu (M21), dva rada objavljena u međunarodnim časopisima (M23), dva rada u vrhunskom časopisu nacionalnog značaja (M51), dva rada u istaknutom nacionalnom časopisu (M52), sedam radova saopštenih na skupovima međunarodnog značaja objavljeni u celini (M33), pet radova saopštenih na skupovima međunarodnog značaja objavljenih u izvodu (M34), dva rada saopštena na skupovima nacionalnog značaja objavljena u celini (M63) i jednog rada saopštenog na skupu nacionalnog značaja objavljeni u izvodu (M64).

BIBLIOGRAFIJA

M21 – radovi objavljeni u vrhunskom međunarodnom časopisu

1. Andjelkovic D., **Brankovic M.**, Milovanovic P., Kocic G., Development of a screening method for selected pesticides in apples by direct injection ESI/MS, *Food Control* (2022) 108620 (IF₂₀₂₀=5.498) <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108620>

M23 – radovi objavljeni u međunarodnom časopisu

2. Anđelković D, **Branković M**, Kocić G, Mitić S, Pavlović R., Sorbent-excluding sample preparation method for GC–MS pesticide analysis in apple peel, *Biomedical Chromatography* (2020) 34:e4720 (IF₂₀₂₀= 1.809) <https://doi.org/10.1002/bmc.4720>
3. **Branković M.**, Anđelković D., Kocić H., Kocić G., Assessment of GC–MS response of selected pesticides in apple matrices related to matrix concentration, *Journal of Environmental Science and Health, Part B* (2019) 54:5 376–386 (IF₂₀₁₉= 1.600) <https://doi.org/10.1080/03601234.2019.1571367>

M51 – rad objavljen u vrhunskom časopisu nacionalnog značaja

4. **Branković M.**, Anđelković D., Kocić H., Kocić G., The apple-matrix effect on GC/MS response of cyprodinil, pyrimethanil and trifloxystrobin standards, *Advanced technologies* (2018) 7:2, pp. 19–24 <https://scindeks-clanci.ceon.rs/data/pdf/2406-2979/2018/2406-29791802019B.pdf>
5. Anđelković D., **Branković M.**, Kostić I., A study of chromium interaction with N-donor ligands using electrospray-ionization mass spectrometry, *Advanced technologies* (2018) 7:1, pp. 47–55 <https://scindeks-clanci.ceon.rs/data/pdf/2406-2979/2018/2406-29791801047A.pdf>

M52 – rad objavljen u istaknutom nacionalnom časopisu

6. **Branković M.**, Bojić A., Anđelković D., Anđelković T., Application of membrane technology in the treatment and analysis of triazine pesticides in water, *Facta Universitatis, Series: Physics, Chemistry and Technology* (2018) 16:2, pp. 229–238 <http://casopisi.junis.ni.ac.rs/index.php/FUPhysChemTech/article/view/2624/2837>
7. **Branković M.**, Zarubica A., Anđelković T., Anđelković D., Mesoporous silica (MCM-41): synthesis/modification, characterization and removal of selected organic micro-pollutants from water, *Advanced technologies* (2017) 6:1, pp. 50–57 <https://scindeks-clanci.ceon.rs/data/pdf/2406-2979/2017/2406-29791701050B.pdf>

M33 – saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u celini

- 8.** Anđelković D., **Branković M.**, Zlatković B., Radović-Vučić M., Kocić G., *Pistia Stratiotes* heavy metal uptake potential: a study of multiply level cadmium polluted water, Proceedings *28th International Conference Ecological Truth And Environmental Research – EcoTER'20* (2020) pp. 77-81, 978-86-6305-104-1.
- 9.** Anđelković D., **Branković M.**, Kocić G., Suitability of procedural calibration standards after long-term storage for pesticide analysis in apple peel, Proceedings *28th International Conference Ecological Truth And Environmental Research – EcoTER'20* (2020) pp. 136-142, 978-86-6305-104-1.
- 10.** Anđelković D., **Branković M.**, Kocić G., Laboratory scaled evaluation of sorption behavior for five pesticides in apple peel: effect of contact time, Proceedings *28th International Conference Ecological Truth And Environmental Research – EcoTER'20* (2020) pp. 143-147, 978-86-6305-104-1.
- 11.** **Branković M.**, Anđelković D., Kocić G., Mitić S., GC-MS analysis of boscalid in apple orchard samples from the region of Jablanica – Vučje, Proceedings *27th International Conference Ecological Truth And Environmental Research – EcoTER'19* (2019) pp. 53-57, 978-86-6305-097-6.
- 12.** **Branković M.**, Anđelković D., Zlatković B., Anđelković T., Kostić I., Uptake of copper by water lettuce in multiply metal-contaminated water, Proceedings *27th International Conference Ecological Truth And Environmental Research – EcoTER'19* (2019) pp. 199-204, 978-86-6305-097-6.
- 13.** **Branković M.**, Anđelković D., Zlatković B., Anđelković T., Kostić I., Screening of seven anions in soil and water samples from the lalinac salt marsh, Proceedings *27th International Conference Ecological Truth And Environmental Research – EcoTER'19* (2019) pp. 58-63, 978-86-6305-097-6.
- 14.** **Branković M.**, Anđelković D., Kocić G., Anđelković T., Kostić I., Investigation on stability of commercial pesticide solution mixture, Proceedings *Physical Chemistry* (2018) 2, pp. 841–844, 978-86-82475-37-8.

M34 – saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u izvodu

15. Anđelković D., **Branković M.**, Zlatković B., Cadmium translocation efficiency in water lettuce, *Physical Chemistry* (2021), pp. 109
16. Anđelković D., **Branković M.**, Kocić G., Laboratory scaled evaluation of sorption behavior for five pesticides in apple peel: effect of pesticide concentration, *Physical Chemistry* (2021) pp.123
17. Anđelković D., **Branković M.**, GC/MS pesticides analysis in apple peel: A method for waxes elimination, *Physical Chemistry* (2021) pp. 128
18. Anđelković T., Anđelković D., Kostić I., **Branković M.**, Zlatković B., Concurrent accumulation of Ni(II) and Pb(II) ions by aquatic macrophyte *Pistia Stratiotes*, *13th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions, Stara planina Mt.* (2019) pp. 87.
19. Anđelković T., Anđelković D., Kostić I., **Branković M.**, Zlatković B., Investigation of *Pistia Stratiotes* potential for removing Cd(II) ions from water, *13th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions, Stara planina Mt.* (2019) pp. 88.

M63 – saopštenje sa skupa nacionalnog značaja štampano u celini

20. Anđelković D., **Branković M.**, Zlatković B., Anđelković T., Kostić I., *Pistia Stratiotes* Potential For The Removal Of Zinc(II) Ion From Water, *Zbornik Radova XII Simpozijum «Savremene Tehnologije i Privredni Razvoj»* (2017) pp. 123–128.
21. Kostić I., Anđelković D., Anđelković T., Kocić H., Kocić G., **Branković M.**, Di(2-ethylhexyl) phthalate extraction optimization from milk samples, *Zbornik Radova XII Simpozijum «Savremene Tehnologije i Privredni Razvoj»* (2017) pp. 42–47.

M64 – Saopštenje sa skupa nacionalnog značaja štampano u izvodu

22. Kostić I., Anđelković T., Anđelković D., Bogdanović D., **Branković M.**, Cvetković T., Kocić G., Investigation of ammonium hydroxide effect on di(2-ethylhexyl) phthalate extraction from milk samples, *Zbornik radova XIII Simpozijum 'Savremene tehnologije i privredni razvoj'* (2019)

IZJAVE AUTORA

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

РАЗВОЈ И ПРИМЕНА ПРЕЛИМИНАРНИХ СКРИНИНГ МЕТОДА ЗА ПРОЦЕНУ САДРЖАЈА РЕЗИДУАЛНИХ ПЕСТИЦИДА У ЈАБУКАМА ТЕХНИКАМА МАСЕНЕ СПЕКТРОМЕТРИЈЕ

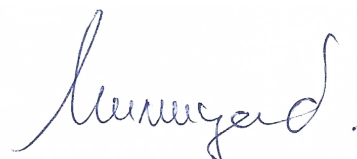
која је одбрањена на Природно-математичком факултету Универзитета у Нишу:

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивао/ла на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, 01.06.2022.

Потпис аутора дисертације:



Милица Д. Бранковић

ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ЕЛЕКТРОНСКОГ И ШТАМПАНОГ ОБЛИКА
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

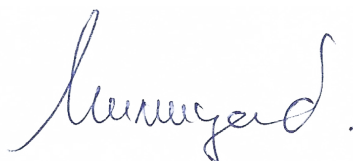
Наслов дисертације:

**РАЗВОЈ И ПРИМЕНА ПРЕЛИМИНАРНИХ СКРИНИНГ МЕТОДА ЗА ПРОЦЕНУ
САДРЖАЈА РЕЗИДУАЛНИХ ПЕСТИЦИДА У ЈАБУКАМА ТЕХНИКАМА
МАСЕНЕ СПЕКТРОМЕТРИЈЕ**

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам предао/ла за уношење у **Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу**, истоветан штампаном облику.

У Нишу, 01.06.2022.

Потпис аутора дисертације:



Милица Д. Бранковић

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

РАЗВОЈ И ПРИМЕНА ПРЕЛИМИНАРНИХ СКРИНИНГ МЕТОДА ЗА ПРОЦЕНУ САДРЖАЈА РЕЗИДУАЛНИХ ПЕСТИЦИДА У ЈАБУКАМА ТЕХНИКАМА МАСЕНЕ СПЕКТРОМЕТРИЈЕ

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

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде (CC BY-NC-ND)

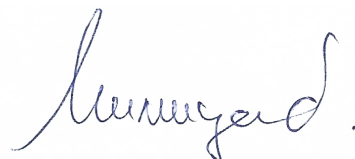
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

5. Ауторство – без прераде (CC BY-ND)

6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

У Нишу, 01.06.2022.

Потпис аутора дисертације:



Милица Д. Бранковић