

**LC-MS/MS ODREĐIVANJE OSTATAKA PESTICIDA U VIŠNJAMA**

Vojislava Bursić<sup>1</sup>, Gorica Vuković<sup>2</sup>, Tijana Zeremski<sup>3</sup>, Sonja Gvozdenac<sup>3</sup>,  
Aleksandra Petrović<sup>1</sup>, Ivana Ivanović<sup>1</sup>, Aleksandra Popović<sup>1</sup>

**Izvod:** LC-MS/MS je korišćen u MRM određivanja ostataka acetamiprida, dimetoata, karbendazima, piraklostrobina, propikonazola i tebukonazola u uzorcima višanja. Propikonazol je detektovan u dva uzorka iznad MDK, dok su sve ostale detekcije bile ispod propisanih vrednosti.

**Ključne reči:** ostaci pesticida, QuEChERS, višnje, LC-MS/MS

**Uvod**

Otkrivene koštice višnje u pešćarama Amerike i na Skandinavskom poluostrvu ukazuju da je višnja jedna od najstarijih voćki koje je čovek uzgajao. Smatra se da je višnja, kao pratilac trešnje, poreklom iz Male Azije, koja se još pre naše ere preko Grčke i starog Rima, širila u druge zemlje Evrope. Višnja (*Prunus cerasus*) pripada familiji *Rosaceae*. Kao voćna vrsta, sadrži C vitamin (8-43 mg), značajne količine vitamina P, manje količine A, B1, B2 i različitih bioaktivnih materija (Blagojević i sar., 2012). Plod višnje ima veliku upotrebnu vrednost, od kojeg se prave kvalitetni proizvodi poput sirupa, sokova, kompota, marmelade, rakije, liker i drugih. Može se koristiti u konditorskoj industriji, a može se i sušiti (Mratinić, 2010). Danas se višnja gaji svuda u svetu. Uz dobru agrotehniku, redovno i obilno rađa. Prinosi se kreću u zavisnosti od primenjene agrotehlike i do 20 t/ha (Blagojević i sar., 2012). Pod višnjom se u Srbiji nalazi 13.990 ha, te je po tim površinama Srbija četvrta zemlja u Evropi. Višegodišnji proseki proizvodnje iznosi 82.436 tona, što Srbiju stavlja na četvrto mesto u Evropi po obimu proizvodnje. Keserović i sar. (2014) navode da je prinos višnje u Srbiji nešto ispod 6 t/ha.

Za razliku od drugih voćnih vrsta, višnju ne napada veliki broj bolesti, međutim, u nepovoljnim godinama, neki paraziti mogu naneti veće ekonomske štete i umanjiti rod. Svakako treba spomenuti moniliozu višnje koju izaziva gljiva *Sclerotinia cinerea* konidijski stadijum *Monillia laxa* i koja prouzrokuje ogromne gubitke. Napada lastare, cvetove i plodove. Obično posle cvetanja, lastari počnu da se suše, na njemu se istovremeno suše i svi cvetovi i lišće (Kremić i sar., 2013). Suzbijanje monilije počinje u fazi mirovanja vegetacije kada se obavljaju agrotehničke mere, orezivanje zaraženih grančica i grana te uklanjanje zaraženih plodova (Blagojević i sar., 2012). Hemijske mere zaštite se obavljaju preventivno, pre ostvarenja zaraze. Prvo tretiranje se izvodi pre otvaranja cveta, u fazi belih balona, zatim u fazi punog cvetanja. Ako dođe do ostvarenja zaraze i hemijski tretmani ne mogu da je zaustave, mehanički odstraniti zaražene grančice se mora izvršiti pri čemu se zahvata i deo zdravog tkiva zbog mogućnosti širenja micelije. Šupljikavost lišća višnje se pojavljuje u vlažnim godinama, a prouzrokuje ga gljiva

<sup>1</sup>Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Trg Dositeja Obradovića 8, Novi Sad, Srbija (bursicv@polj.uns.ac.rs);

<sup>2</sup>Zavod za javno zdravlje Beograd, Bulevar despota Stefana 54 a, Beograd, Srbija

<sup>3</sup>Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Maksima Gorkog 30, Novi Sad, Srbija

*Stigmina carpophila*. Simptomi se javljaju na listu, gde se prvo obrazuju smeđe crvenkaste pege oivičene tamnijim rubom. Tkivo iz pega ispada, list je šupljikav i izgleda kao da je izrešetan. Obolelo lišće opada i često dolazi do prevremene defolijacije. Na plodovima se pojavljuju brojne pege koje prekrivaju plod kao navlaka, a nekad se pojavljuju izlučevine-smole. Suzbijanje počinje uklanjanjem zaraženih grančica rezidbom i njihovim spaljivanjem. Hemijske mere su neizostavne i to od početka vegetacije. Pegavost lista višnje prouzrokuje fitopatogena gljiva *Blumeriella Jaapii* i predstavlja veoma opasnu bolest trešnje i višnje. Na lišću se u maju i junu pojavljuju najpre svetle, a zatim tamne pege nepravilnog oblika. Pege na listu se spajaju tako da skoro cela lisna površina dobija tamne pege. Zbog smanjenja hlorofila obolelo lišće ne može da vrši fotosintezu, ne stvara organske materije i na kraju opada pre vremena, te krajem jula i avgusta stablo ostaje bez lišća. Ako je jesen topla i sa dosta vlage, stabla višnje procvetaju, čime se iznuruju, što se negativno odražava na otpornost prema zimskim mrazovima. Naredne godine je znatno smanjen prinos i vegetativni porast višanja.

Da bi se zadovoljile potrebe stalno rastuće, globalne populcije, savremenu poljoprivrednu proizvodnju ne možemo zamisliti bez uvođenja novih tehnologija i dalje podrazumevaju primenu pesticida.

U Srbiji je za zaštitu višanja registrovano četrnaest insekticidnih preparata, pet akaricidnih, pedeset jedan fungicidni preparat i šesnaest herbicida (Savčić-Perić, 2015). Ovako velik broj registrovanih sredstava koja se mogu koristiti u višnjama, neminovno postavlja pitanje zdravstvene bezbednosti ovog voća po pitanju ostataka pesticida. Ostaci pesticida u hrani moraju biti praćeni usled pooštavanja regulativa koje propisuju maksimalno dozvoljene količine (MDK). Sve zemlje članice EU su dužne da sprovedu zvaničnu kontrolu prisustva ostataka pesticida u hrani, u saglasnosti sa Regulativom EC 396/2005, dok su u Srbiji MDK vrednosti definisane Pravilnikom o maksimalno dozvoljenim količinama ostataka sredstava za zaštitu bilja u hrani i hrani za životinje i o hrani za životinje za koju se utvrđuju maksimalno dozvoljene količine ostataka sredstava za zaštitu bilja (Službeni glasnik RS 29/2014).

Postoje različiti načini razdvajanja i kvantitativnog određivanja ostataka pesticida u hrani od kojih su najpogodnije savremene hromatografske metode, uz različite pripreme uzoraka. Najefikasniji pristup analizi pesticida je upotreba multirezidualnih metoda (MRM). Mnoge multirezidualne metode koje se koriste u analizi su komplikovane, naporne, dugotrajne, zahtevaju velike količine rastvarača i stoga su skupe. QuEChERS (**Q**uick, **E**asy, **C**heap, **E**ffective, **R**ugged, **S**afe) metoda koja u velikoj meri pojednostavljuje analizu ostataka pesticide, nastala je iz potrebe da se uštedi vreme pripreme uzorka, smanji količina toksičnih organskih rastvarača i sa tim u vezi doprinese očuvanju životne sredine. Ekstrakt višnje, kao izuetno pigmentisan, zahteva upotrebu sorbenta, koji ima jak finitet prema planarnim molekulima i time dovodi do njegovog obezbojavanja, uklanjajući pigmente iz ekstrakta.

Usled različitih fizičko-hemijskih karakteristika pesticida, njihovo određivanje može biti izvedeno tečnom (LC) ili gasnom (GC) hromatografijom. Evropski propisi sugerišu određivanje ostataka pesticida upotrebom masene detekcije (MS). Zato je cilj rada da se multirezidualnom metodom tečne hromatografije sa tandem masenom spektrometrijom (LC-MS/MS), odredi sadržaj acetamiprida, dimetoata, karbendazima, piraklostrobina, propikonazola i tebukonazola u uzorcima višanja, uz karbofuran-D3 kao interni standard.

## Materijal i metode rada

**Hemikalije.** Analitički standardi acetamiprida, dimetoata, karbendazima, piraklostrobina, propikonazola i tebukonazola su proizvodi Sigma-Aldrich. Osnovni i radni rastvori su pripremani rastvaranjem pesticida u metanolu (HPLC čistoće, J.T. Baker). Radni rastvor smeše pesticida masene koncentracije 10 µg/mL, dobijen je odmeravanjem odgovarajućih zapremina osnovnog rastvora. Kao interni standard (IS) korišćen je karbofuran-D3 (99,7%, Sigma-Aldrich) masene koncentracije 10 µg/mL.

**Aparatura.** Tečni hromatograf Agilent 110 sa Agilent 6410B masenim spektrometrom i MMI jonskim izvorom. Za jonizaciju je korišćen ES jonski izvor u pozitivnom modu jonizacije. Protok gasa za sušenje je bio 5 mL/min, na temperature od 325 °C. Energija fragmentacije (Frag) je bila u intervalu od 50 do 150 V, sa energijom kolizione ćelije (CE) od 5 do 50 V. Korišćen je autosempler model Agilent G1367D (zapreminom injektiovanja od 10 µl) i binarna pumpa BinPump-SL, model G1312B. Kao mobilna faza je korišćena kombinacija metanola i vode sa mravljom kiselinom (**A**: 0,1% HCOOH u MeOH, **B**: 0,1% HCOOH u vodi) pri protoku od 0,4 mL/min u gradijentnom modu (0 min - 90 % B; 2 min - 90 % B; 15 min - 10 % B; 20 min - 2 % B; 23 min - 2 % B; 25 min - 90 % B). Hromatografsko razdvajanje je izvedeno na Zorbax Eclipse XDB-C18 koloni. Vreme trajanja analize je bilo 25 min sa vremenom vraćanja na početno stanje od 5 min.

**Validacioni parametri.** Pre analize realnih uzoraka, neophodno je postaviti validacione parametre u skladu sa SANTE/11945/2015 regulativom. Osnovni parametri validacije se postavljaju korišćenjem kontrolnog (blank) uzorka višanja i obuhvataju tačnost, preciznost metode, linearnost odziva detektora, limit detekcije (LOD) i limit kvantifikacije (LOQ).

**Linearnost odziva detektora** je provera odgovora masenog spektrometra za kalibracione smeše pesticida u koncentracionom opsegu od 0,010 do 0,200 µg/mL, što odgovara koncentraciji pesticida u uzorku od 0,01 do 0,20 mg/kg.

**Određivanje prinosa ekstrakcije** je jedan od parametara određivanja tačnosti metode. Vrednosti za prinos ekstrakcije dobijene su obogaćivanjem blank uzorka višnje smešom standarda pesticida, tako da koncentracija u uzorku iznosi 0,01 i 0,10 mg/kg. Nakon izvršene ekstrakcije izvršena je LC-MS/MS analiza.

**Limit detekcije (LOD) i limit kvantifikacije (LOQ):** LOD analitičkog postupka predstavlja najmanju koncentraciju nekog analita koja može biti merena, ali ne i pouzdano kvantitativno određena. Granica detekcije se određuje na osnovu odnosa signala i šuma koja predstavlja koncentraciju analita koja na datom instrumentu daje signal 2,5- 5 puta veći od signala šuma. Vrednosti za LOD su izračunate pomoću softvera Mass Hunter (Agilent Technologies). LOQ je najmanja koncentracija analita u uzorku koja se može kvantitativno odrediti, unapred je postavljena u donosu na MDK vrednosti i potvrđena eksperimentalnim putem. Smatra se da vrednost LOD treba da iznosi 1/3 od postavljene MDK vrednosti datog pesticida.

**Ekstrakcija pesticida:** QuEChERS metoda pripreme uzoraka za određivanje ostataka pesticida podrazumeva da se odmeri 10±0,01 g homogenizovanog uzorka višnje u plastične kivete. Uzorku se doda 100 µL internog standarda karbofurana-D3 i 10 mL ACN. Kiveta se zatvori i snažno promućka 1 min na vorteksu. Zatim se u kivetu

doda puferska smeša soli (4 g  $MgSO_4$ , 1 g NaCl, 1 g natrijum citrata dihidrata i 0,5 g dinatrijum citrata seskvihidrata) i snažno promućka 1 min da bi se sprečilo zgrušavanje  $MgSO_4$ . Uzorak se centrifugira 5 min na 3000 obr/min. Nakon centrifugiranja odmeri se 6 mL ekstrakta i prenese u kivetu koja sadrži smešu 150 mg PSA, 150 mg GBC i 900 mg  $MgSO_4$  i snažno promućka 30 s na vortex mikseru, nakon čega se centrifugira 5 min na 3000 obr/min. Supernatant se zakiseli mravljom kiselinom i analizira LC-MS/MS.

**Formiranje uzoraka.** Metodom slučajnog izbora, tokom 2016. godine, uzorkovano je devet uzoraka višanja sa pijace u Novom Sadu. Uzorkovanje je izvedeno u skladu sa odredbama Pravilnika o metodama uzorkovanja i ispitivanja hrane radi utvrđivanja ostataka sredstava za zaštitu bilja u hrani (Sl. glasnik RS 110/2012). Uzorci su na pijaci obeleženi i stavljeni u polietilenske kese. Odmah su transportovani do laboratorije, gde je svaki uzorak homogenizovan i čuvan u zamrzivaču na temperaturi  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  do momenta analize (SANCO/12571/2013).

### Rezultati istraživanja i diskusija

**Parametri validacije.** Matematički izračunate vrednosti LOD ispitivanih pesticida su bile u intervalu od 0,001-0,002 mg/kg. LOQ je eksperimentalnim putem određena za nivo od 0,010 mg/kg. Ova vrednost je pretpostavljena na osnovu MDK vrednosti ispitivanih pesticida ili kao najniži nivo analitičkog određivanja.

Za određivanje tačnosti, ispitani su prinos ekstrakcije, obogaćivanjem blank uzorka višanja na dva nivoa u pet ponavljanja (0,01 i 0,1 mg/kg), u okviru kalibracionog opsega. Sve dobijene srednje vrednosti ispitivanih pesticida su se kretale u intervalu od 70 do 120%, dok su relativne standardne devijacije (RSD) bile ispod 20% (SANTE/11945/2015).

Linearnost je ispitivana kao odgovor MS/MS-a za kalibracione standarde smeše pesticida u koncentracionom opsegu od 0,01 do 0,20  $\mu\text{g/mL}$  što odgovara koncentraciji pesticida u uzorku od 0,01 do 0,20 mg/kg. Za sve ispitivane pesticide, koeficijent korelacije je bio iznad 0,99. Za pojedine pesticide uticaj matriksa je bio preko 15%, što ne čudi jer je višnja bogata planarnim molekulima koji mogu uticati na jonizaciju molekula pesticida tako da je očitavanje rezultata realnih uzoraka izvršeno na osnovu kalibracione krive pripremljene u matriksu za sve ispitivane analite (MMC).

Pre nego što se pristupi kalibraciji i kvantifikaciji pesticida, neophodno je postaviti akvizicione parametre masenog spektrometra - odrediti reakcije za praćenje jona (MRM) i naći energiju kolizione ćelije (CE), energiju fragmentacije (Frag) pri kojoj će odgovor ispitivanog pesticida biti najveći za date uslove (Tabela 1).

Validovana metoda koja je ispunila sve kriterijume propisane SANTE/11945/2015 dokumentom, korišćena je za analizu uzoraka. Rezultati LC-MS/MS analize devet uzoraka višanja tabelarno su prikazani (Tabela 2).

Tabela 1. MRM prelazi (m/z) sa retencionim vremenima (Rt) ispitivanih analita  
 Table 1. MRM transitions (m/z) with the retention times (Rt) of investigated pesticides

Pesticid <i>Pesticide</i>	MRM (m/z)		Frag (V)	CE (V)	Rt (min)
	Prekursor jon	Produkt jon			
Acetamidrid <i>Acetamidride</i>	223,1	125,8	80	15	11,45
	223,1	55,7		15	
Dimetoat <i>Dimethoate</i>	230,0	125,0	92	17	4,55
	230,0	199,0		5	
Karbendazim <i>Carbendazim</i>	192,1	160,1	110	15	8,05
	192,1	132,0		30	
Piraklostrobin <i>Pyraclostrobin</i>	388,1	132,0	100	20	17,98
	388,1	194,0		10	
Propikonazol <i>Propiconazole</i>	342,1	159,0	120	20	17,92
	342,1	69,0		20	
Tebukonazol <i>Tebuconazole</i>	308,2	151,0	120	20	9,36
	308,2	70,0		20	
Karbofuran-D3 <i>Carbofuran-D3</i>	225,1	165,0			14,08
	225,1	123,0			

Tabela 2. Ostaci pesticida u uzorcima višanja  
 Table 2. Pesticide residues in sour cherries samples

Pesticid <i>Pesticide</i>	Uzorak / Sample								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Acetamidrid <i>Acetamidride</i>	0,041	0,028	0,017	0,047	< 0,010	0,0290	0,053	< 0,010	< 0,010
Dimetoat <i>Dimethoate</i>	0,019	< 0,010	< 0,010	0,020	< 0,010	< 0,010	< 0,010	0,015	0,012
Karbendazim <i>Carbendazim</i>	< 0,010	0,028	< 0,010	0,015	< 0,010	< 0,010	< 0,010	0,024	< 0,010
Piraklostrobin <i>Pyraclostrobin</i>	< 0,010	< 0,010	< 0,010	< 0,010	< 0,010	< 0,010	< 0,010	< 0,010	< 0,010
Propikonazol <i>Propiconazole</i>	<b>0,040</b>	< 0,010	< 0,010	<b>0,022</b>	< 0,010	< 0,010	< 0,010	< 0,010	< 0,010
Tebukonazol <i>Tebuconazole</i>	< 0,010	< 0,010	< 0,010	< 0,010	< 0,010	< 0,010	< 0,010	< 0,010	< 0,010

Najčešće detektovan pesticid je acetamidrid sa koncentracijama ispod MDK vrednosti od 1,5 mg/kg. Sve detektovane vredosti propikonazola su bile iznad MDK (0,01 mg/kg), dok je dimetoat u jednom uzorku imao vrednost na granici MDK, odnosno 0,02 mg/kg.

### Zaključak

Izuzetno osetljiva LC-MS/MS tehnika je korišćena u analizi ostataka pesticida u plodovima višanja. Analizom su obuhvaćeni acetamidrid, dimetoat, karbendazim, piraklostrobin i tebukonazol. Od ukupno devet analiziranih uzoraka, dva su sadržavala ostatke pesticida preko MDK. Iako se radi o malom broju uzoraka, rezultati ukazuju da neophodnost monitoringa zdravstvene ispravnosti ovog voća neophodna.

## Napomena

Istraživanja u ovom radu deo su projekta TR31038, koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

## Literatura

- Blagojević R., Božić V., Stanković M., (2012). Tehnologija proizvodnje višnje i marele, Kancelarija za program podrške u privatnom sektoru za podršku sektoru voćarstva i bobičastog voća u Južnoj Srbiji, Niš.
- Keserović Z., Magazin N., Kurjakov A., Dorić M., Gošić J. (2014). Poljoprivreda u Republici Srbiji: popis poljoprivrede 2012. Voćarstvo, Republički zavod za statistiku, Beograd.
- Kremić S., Milutinović H., Baba E., (2013). Bilten, 1
- Mratinić E. (2010). Višnja, Polja Partenona, Beograd.
- Pravilnik o maksimalno dozvoljenim količinama ostataka sredstava za zaštitu bilja u hrani i hrani za životinje za koju se utvrđuju maksimalno dozvoljene količine ostataka sredstava za zaštitu bilja (2014). Službeni glasnik RS broj 29/2014.
- Regulation EC No 396/2005 of the European parliament and of the Council on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of the plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC.
- SANTE/11945/2015, Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed.
- Savčić-Pertić S. (2015). Sredstva za zaštitu bilja u prometu u Srbiji (2015), Biljni lekar, 43, 1-2.

## PESTICIDE RESIDUES DETERMINATION IN SOUR CHERRIES BY LC-MS/MS

*Vojislava Bursić<sup>1</sup>, Gorica Vuković<sup>2</sup>, Tijana Zeremski<sup>3</sup>, Sonja Gvozdenac<sup>3</sup>, Aleksandra Petrović<sup>1</sup>, Ivana Ivanović<sup>1</sup>, Aleksandra Popović<sup>1</sup>*

### Abstract

The MRM for the determination of acetamiprid, dimethoate, carbendazim, pyraclostrobin, propiconazole and tebuconazole in sour cherries was done by LC-MS/MS. Propiconazole was detected in two samples above the MRL while all the other pesticide detections were below the established values.

**Key words:** pesticide residues, QuEChERS, sour cherries, LC-MS/MS

<sup>1</sup>University of Novi Sad, Faculty of Agriculture, Trg Dositeja Obradovića 8, Novi Sad, Serbia (name.lastname@kg.ac.rs)

<sup>2</sup>Institute for public Health Belgrade, Bul. despota Stefana 54 a, Belgrade, Serbia

<sup>3</sup>Institute of Field and Vegetable Crops, Maksima Gorkog 30, Novi Sad, Serbia