

**SRPSKO VETERINARSKO DRUŠTVO
SEKCIJA ZA DDD
KATEDRA ZA ZOOHIGIJENU
FAKULTETA VETERINARSKE MEDICINE
UNIVERZITETA U BEOGRADU**



ZBORNİK RADOVA

33. SAVETOVANJE

DEZINFEKCIJA, DEZINSEKCIJA I DERATIZACIJA

- Jedan svet jedno zdravlje -



**BAJINA BAŠTA, Hotel „Zepter Drina 4*“
26 – 29. maja 2022. godine**

**SRPSKO VETERINARSKO DRUŠTVO
SEKCIJA ZA DDD
KATEDRA ZA ZOOHIGIJENU
FAKULTETA VETERINARSKE MEDICINE
UNIVERZITETA U BEOGRADU**



SRPSKO VETERINARSKO DRUŠTVO



ZBORNİK RADOVA

33. SAVETOVANJE

DEZINFEKCIJA, DEZINSEKCIJA I DERATIZACIJA

– Jedan svet jedno zdravlje –



**BAJINA BAŠTA, Hotel „Zepter Drina 4*“
26 – 29. maja 2022. godine**

**33. SAVETOVANJE
DEZINFEKCIJA, DEZINSEKCIJA I DERATIZACIJA**

Organizatori:

SRPSKO VETERINARSKO DRUŠTVO, SEKCIJA ZA DDD
KATEDRA ZA ZOOHIGIJENU
FAKULTETA VETERINARSKE MEDICINE UNIVERZITETA U BEOGRADU

Organizacioni odbor:

Predsednik: Prof. dr Ljiljana Janković
Počasni predsednik: Mr Miodrag Rajković, vet. spec.
Potpredsednici: Prof. dr Radislava Teodorović
Prof. dr Milutin Đorđević
Sekretar: Dr sci. vet. Vladimir Drašković
Tehnički sekretar: Spec. sanit. ekol. inž. Tamara Petrović

Programski i naučni odbor:

Milorad Mirilović, Miodrag Rajković, Mišo Kolarević, Novica Stajković, Nenad Budimović,
Vitomir Čupić, Zoran Kulišić, Jakov Nišavić, Neđeljko Karabasil, Ljiljana Janković,
Radislava Teodorović, Milutin Đorđević, Saša Trailović, Katarina Nenadović, Vladimir Drašković,
Marijana Vučinić, Nada Plavša, Nevenka Aleksić, Tamara Ilić, Tanja Antić,
Olivera Vukićević-Radić, Dobrila Jakić-Dimić, Sobodan Marić, Renata Reljić, Milena Krstić,
Marko Nadaškić, Armin Tomašić, Zoran Jovanović, Božidar Ljubić, Zoran Đerić, Vladimir Vuković,
Štefan Pintarić, Svetozar Milošević, Jovanka Bodiroga, Živan Dejanović, Predrag Čurčić, Zoran
Dunderski, Jovan Ivačković, Ivan Pavlović, Saša Maričić, Dragan Banjac, Snežana Radivojević,
Branislav Mauković, Tanja Antić, Radoslava Savić Radovanović, Laslo Matković

Pokrovitelj Simpozijuma:

VETERINARSKA KOMORA SRBIJE

Sponzori:

AVENIJA MBNS1
VISAN
EKOSAN
EKO SISTEM CO.
VSI KRALJEVO
PANAGRO N&G
EKOZAŠTITA
SANUS-M

Izdavač:

SRPSKO VETERINARSKO DRUŠTVO, BEOGRAD

Urednici:

Prof. dr Ljiljana Janković
Dr sci. vet. Vladimir Drašković

Tehnički urednici:

Dr sci. vet. Vladimir Drašković
Spec. sanit. ekol. inž. Tamara Petrović

Priprema teksta za štampu: Gordana Lazarević

Štampa: Naučna KMD, Beograd, 2022.

Tiraž: 100

ISBN-978-86-83115-46-4

Uz manje dopune i izmene koje nisu uticale na stručni deo teksta, a sa lektorskom korekcijom i tehničkim uređenjem u skladu sa zahtevima izdavača, u Zborniku radova su štampani originalni tekstovi autora.

RASPROSTRANJENOST OSTATAKA ORGANOHLORNIH PESTICIDA U HRANI ŽIVOTINJSKOG POREKLA

OCCURRENCE OF ORGANOCHLORINE PESTICIDES RESIDUES IN FOODS OF ANIMAL ORIGIN

Aleksandra Tasić¹, Ivan Pavlović¹, Tatjana Šolević Knudsen²

¹Dr sc. vet. med. Aleksandra Tasić, naučni saradnik, Akademik dr sc. vet. med. Ivan Pavlović, naučni savetnik, Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Beograd, R. Srbija

²Dr sc. Tatjana Šolević Knudsen, naučni savetnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju - Centar za hemiju, Beograd, R. Srbija

Kratak sadržaj

Organohlorni pesticidi (OHP) sveprisutni zagađivači životne sredine i svakako hrane, koji su se široko koristili i u nekim zemljama se i dalje koriste. Komercijalna proizvodnja organohlornih pesticida počela je sredinom dvadesetog veka. Široko su primenjivani u prošlosti, ali su sada zabranjeni u mnogim zemljama i uvršteni u Stokholmsku konvenciju o dugotrajnim organskim zagađivačima (POPs). Ovi insekticidi spadaju u pesticide koji se dugo zadržavaju u životnoj sredini jer imaju veliku stabilnost, a zbog lipofilnog ponašanja se zadržavaju u tkivima. Iz tog razlog, monitoring rezidua OHP u masnoj hrani je postao rutinska analiza svih monitoring laboratorija. DDT i njegovi metaboliti su najzastupljenija organohlorna jedinjenja u životnoj sredini. Ciljevi ovog rada bili su razvoj metode za ekstrakciju i određivanje ostataka OHP u masnoj hrani. Takođe, u radu su prikazani rezultati istraživanja pesticida u uzorcima mesa, ribe, mleka i njihovih proizvoda. Dobijeni procenti za spajk ispitivanih pesticida u svim masnim matriksima u dve različite koncentracije kretali su se od 71 do 106% sa relativnom standardnom devijacijom ispod 15%. Metoda je pokazala dobru linearost sa koeficijentima korelacije ($R_2 \geq 0,99$). Granice kvantifikacije (LOQ) bile su niže od maksimalnih dozvoljenih količina (MDK) utvrđenih Uredbom Republike Srbije. Shodno tome, primena razvijene metode na uzorke životinjskih proizvoda pokazala je da je ova metoda pogodna za rutinsku analizu pesticida u smislu visoke tačnosti, preciznosti i efikasnosti.

Ključne reči: životna sredina, pesticidi, masna hrana, DDT

Abstract

Organochlorine pesticides (OCPs) are ubiquitous environmental pollutants that have been widely used and are still used in some countries. Commercial production of organochlorine pesticides began in the middle of the twentieth century. They have been widely used in the past, but are now banned in many countries and included in the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants (POPs). These insecti-

*e-mail kontakt osobe: alekstasic79@gmail.com

cides are pesticides that stay in the environment for a long time because they have high stability, and because of their lipophilic behavior, they stay in the tissues. For this reason, monitoring of OCPs residues in fatty foods has become a routine analysis of all monitoring laboratories. DDT and its metabolites are the most abundant organochlorine compounds in the environment. The aims of present work were to develop method for the extraction and determination of OCPs residues in the fatty food. Also, the paper presents the results of investigated pesticides in samples of meat, fish, milk and their products. The percentages obtained for the spike of the tested pesticides in all fat matrices in two different concentrations ranged from 71 to 106% with a relative standard deviation below 15%. The method exhibited good linearity with coefficients of correlation (R^2) ≥ 0.99 . The limits of quantification (LOQ) were lower than the maximum residue limits (MRLs) set by Republic Serbia Regulation. Consequently, application of the developed method to animal products samples revealed that this method is suitable for routine pesticides analysis in terms of high accuracy, precision and efficient.

Key words: *environment, pesticides, fatty food, DDT*

UVOD

Analiza pesticida primarno je fokusirana na ispitivanju prisustva pesticida u voću, povrću i njihovim proizvodima (Jin i sar, 2012; Sun i sar, 2019). Iz tog razloga se metode unapređenja ispitivanja prisustva pesticida u proizvodima biljnog porekla sve više usavršavaju i njima se u naučnoj literaturi sve više daje na značaju (Narendaran i sar, 2020). Otkriće QuEChERS pripreme za određivanje pesticida od strane Anastasiadis 2003. godine, ali i uvođenje standardne metode EN 15662, kao i AOAC 2007.01 međunarodne metode dali su mnoge pogodnosti. Pre svega, to je brz, efikasan i siguran način pripreme koji omogućava ekstrakciju širokog spektra pesticida različitih grupa i polarnosti (Rahman i sar, 2018). Metode su predviđene za ispitivanje voća, povrća i cerealijskih, ali su vremenom i uz niz modifikacija primenjene i za ispitivanje rezidua pesticida u hrani animalnog porekla i među (Oliveira i sar, 2019; a Gawel i sar, 2019). Zagađena životna sredina, pre svega voda i zemljište, a potom i hrana biljnog porekla, odnosno hrana za životinje jesu putevi lanca ishrane i zagađenja hrane animalnog porekla. Takođe, dezinfekcija, deratizacija i dezinsekcija kao putevi efikasnog uništenja štetnih mikroorganizama, glodara i insekata mogu usled nesmotrenosti dovesti do kontaminacije hrane animalnog porekla. Mnoge decenije unazad sprovodi se praćenje akumulacije trajnih organskih zagađivača, kao što su DDT i polihlorovanih bifenila pod specijalnim uslovima i kroz različite monitoringe. Razlog je njihova i dalja postojanost, ali i rezultati mnogobrojnih nalaženja. Direktna upotreba pesticida, pre svega u lečenju insekata prilikom tretmana na životinjama, ali i različiti izvori mogu pesticide preneti na hranu životinjskog porekla i dovesti do njene kontaminacije. Kao posledica kontaminacije, hrana životinjskog porekla je zakonski neispravna i kao takva se svrstava u animalni otpad, koji je potrebno adekvatno ukolniti. Da bi se sproveli principi dobre poljoprivredne prakse i u cilju zaštite ljudskog zdravlja potrošača Evrop-

skom regulativom (EC) broj 396/2005 i Pravilnikom o maksimalno dozvoljenim količinama pesticida u hrani i hrani za životinje regulisane su maksimalno dozvoljene vrednosti pesticida u svakom matriksu hrane za svaki pojedinačni pesticid ili sumu pesticida i njegovih metabolita. MDK vrednosti se primenjuju na 315 svežih proizvoda i na iste proizvode nakon obrade, prilagođene tako da se kod oni rastvorljivih u mastima uzima u obzir i količina pesticida izražena na količinu masti. Opšta zadata vrednost za maksimalno dozvoljene vrednosti prisustva pesticida je 0,01 mg/kg i primenjuje se za pesticide koji nisu posebno pomenuti ili definisani, kao i mešoviti hranu. Zbog ranije primene u celom svetu, organohlorni pesticidi su najčešći zagađivači životne sredine pre svega zbog njihove stabilnosti, mobilnosti i dugoročno nepovoljnog efekta na žive organizme i zdravlje ljudi. Iz ovih razloga je neophodno pratiti i kontrolisati prisustvo pesticida u svim sferama životne sredine, jer su istraživanja potvrdila da u snegu na Antarktiku (Djermati i sar, 2007) ima tragova polihlorobifenila (PCB) i dihlorodifeniltrihloroetana (DDT). Analiza prisustva i sadržaja pesticida u životnoj sredini ima i poteškoća tokom ispitivanja, a to su pre svega potrebe razmatranja specifičnih uzoraka čija priprema zahteva veliki broj koraka u određivanju i detekciji. Analiza pesticida je neophodna jer su pesticidi u svakodnevnoj komercijalnoj upotrebi, naročito u poljoprivredi, šumarstvu, hemijskoj i farmaceutskoj industriji. Takođe, veliki broj novih pesticida se pojavi svake godine. Kratkotrajna izloženost pesticidima nema značajan štetni efekat, dok dugotrajna izloženost može dovesti do razvoja raznih alergija, kancerogenih oboljenja, kardiovaskularnih bolesti i oštećenja vitalnih organa (Keswani i sar, 2021). Zbog navedenih neželjenih efekata Stokholmskom konvencijom organohlorni pesticidi uvršćeni su u dugotrajne organske zagađivače i njihova upotreba je zabranjena. Izomeri DDD su akumulirani u znatnim količinama u sardinama ispitivanim u Brazilu, gde je upotreba DDT zabranjena 2009. godine. A znatne količine prisutnih izomera DDE ukazuju na biotransformaciju u ribi iz nativnog oblika DDT (Ferreira i sar, 2019).

Najveći izazov u analizi pesticida je svakako validacija metode ispitivanja. Proizvodi animalnog porekla zbog prisustva masti predstavljaju veliki izazov u analizi pesticida i to kako polarnih tako i nepolarnih analita. Nepolarni pesticidi, kao što su organohlorini imaju tendenciju akumulacije u masnim tkivima, pa su kao takvi veliki izazov kako za postupak ekstrakcije tako i postupak detekcije i kvantifikacije rezidua pesticida. Takođe, sve je veći broj radova i ispitivanja prisustva polarnih pesticida koji do hrane animalnog porekla dolaze putem ishrane. Lipidni matriks koji je osnovni sastav hrane animalnog porekla je kompleksan matriks koji je potrebno što potpunije i adekvatnije ukloniti. Zato je potrebno pronaći odgovarajuću metodu ekstrakcije i prečišćavanja da bi se tokom određivanja i kvantifikacije dobili zadovoljavajući rezultati pre svega prilikom spajk određivanja, a potom i rutinskom analizom. Iz tog razloga je najvažnije pronaći proceduru priprema sa najvećim stepenom efikasnosti. Pri tom izboru važan je korak izbora pogodnog rastvarača i ekstrakcione metode za odgovarajući matriks ispitivanja. Svakako je najvažnije da nakon pripreme uzorka sadrži

minimum ko-ekstrahovanih supstanci, jer je u tom slučaju i određivanje i kvantifikacija jednostavnija i pogodnija. Supstance koje se ko-ekstrahuju mogu interferirati sa analitom, jer se mogu adsorbovati i desorbovati sa kolone. Zbog toga se pri određivanju uzoraka masne hrane koriste dodatni procesi prečišćavanja i to: zamrzavanje, centrifugiranje na niskoj temperaturi, tečno-tečno razdvajanje, gel permeabilna hromatografija, kao i čvrsto-tečna ekstrakcija ili čvrsto-tečna mikroekstrakcija kako bi se uklonile masne kiseline i estri masnih kiselina iz ekstrakta. Masne kiseline imaju nisku temperaturu topljenja, tako da je jedan od najpogodnijih načina zamrzavanje, tako da se zamrzavanjem i centrifugiranjem masti mogu efikasno ukloniti.

Za detekciju i kvantifikaciju pesticida koristi se gasna hromatografija koja je analitička tehnika odvajanja zasnovana na isparljivosti ispitivanih jedinjenja. Detekcija sa zahvatom elektrona (ECD) je od uvođenja, tačnije 1957. godine bila neprikosnovena za halogena jedinjenja, odnosno komponente koje apsorbuju elektrone, takozvana visoko elektronegativna jedinjenja. Ali se zbog lažno pozitivnih signala od prisutnih organskih jedinjenja (Panseri i sar., 2013), pre svega aromatičnih ugljovodonika uvedena potvrda tehnikom masene spektrometrije (MS). Određivanje pesticida obuhvata tri najvažnija koraka, a to su ekstrakcija pesticida iz odgovarajućeg matriksa, prečišćavanje sa ciljem da se otklone interferirajuće nečistoće i identifikacija i kvantifikacija prisutnih analita u ispitivanom uzorku (Chau i sar, 2020).

Glavni cilj ovog rada je bio da se razvije i optimizuje brza i jednostavna metoda ekstrakcije i prečišćavanja za određivanje nepolarnih organohlornih pesticida. Za određivanje i analizu rezidua pesticida ispitani su uzorci animalnog porekla sa značajnom količinu prisutnih masti. Validacija istovremenog određivanja organohlornih pesticida korišćenjem gasne hromatografije sa masenom detekcijom je sprovedena kroz linearnost, ponovljivost, preciznost i limit kvantifikacije.

MATERIJALI I METODE

Standard organohlornih pesticida je kupljen od proizvođača AccuStandard, Inc. (USA), kataloški broj: M-8080-ASL sastavljen od 17 komponenata. Čistoća pesticida je bila veća od 98.0%. Osnovni standard pesticida je pripremljen u smeši heksan:toluen (50:50, v/v) i čuvan je na temperaturi od -20°C u zamrzivaču u koncentraciji od 10 µg/ml. Radni standardni rastvori su pripremljeni u koncentraciji od 0,1-0,5 µg/ml u heksanu i korišćeni za kalibraciju. Za ekstrakciju i analizu rezidua pesticida korišćeni su acetonitril i heksan nabavljeni od proizvođača PanReacAppliChem (ITW Reagents, Milano, Italija) sa čistoćom za analizu rezidua pesticida. Ekstrakcioni kitovi, odnosno QuEChERS ekstrakciono sredstva korišćeni za faze ekstrakcije i prečišćavanja su bili od proizvođača Phenomenex (Nemačka). Na tehničkoj vagi u ekstrakcionim tubama odmereno je po 10 g homogenizovanog uzoraka za analizu i dodato je 10 ml acetonitrila. U smeši je dodato 4 g anhidrovanog magnezijum sulfata i 1 g natrijum hlorida.

U cilju povećanja ekstrakcione efikasnosti nakon svakog ekstrakcionog koraka korišćena je vorteks mešalica u trajanju od 3 minuta. Nakon toga slojevi su razdvojeni korišćenjem centrifuge sa brzinom od 3500 rpm u toku 5 minuta. Za drugu fazu pripreme modifikovanom QuEChERS metodom korišćena je disperzivna čvrsta fazna ekstrakcija za prečišćavanje pri čemu je gornji sloj organske faze acetonitrila korišćen u drugoj fazi. Ekstrakcioni kit druge faze je sadržao 150 mg primarnog sekundarnog amina (PSA), 150 mg sorbenta C18 i 900 mg anhidrovanog magnezijum sulfata. Ova kombinacija sorbenata je korišćena za uklanjanje neželjenih komponenata u uzorku za ispitivanje. Prilikom dodavanja eluata tube su bile uronjene u ledu. Konačni ekstrakti acetonitrila su upareni u stuji azota, potom su rekonstituisani u heksanu i kao takvi spremni za GC/MS određivanje.

Optimizacija metode je sprovedena na gasnom hromatografiju sa mase-
nom spektrometrijskom detekcijom (GC-MS), odnosno GC Clarus 680 (Perkin-
Elmer) sistemu koji sadrži autosampler i gasni hromatograf povezan sa MS
Clarus SK8T instrumentom. Korišćena je kapilarna kolona je Elite-5MS (30 x
0.25 mm ID x 0.25 μ m df, sastavljena od 95% dimetil polisiloksana i 5% fenila),
a injektovana zapremina od 1 μ l uzorka. Za noseći gas je korišćen helijum visoke
čistoće (6,00 p.a.) pri konstantnom protoku od 1 ml/min. Program temperature
pećnice je podešen na 90 °C u trajanju od 1 minuta, zatim je brzinom od 30 °C/
min povećan na 180 °C i zadržan 0,5 minuta, a zatim na 280 °C brzinom grejanja
od 5 °C/min je zadržan 5 minuta i na kraju na brzinom od 30 °C/min do 320 °C
zadržano još 10 min.

REZULTATI I DISKUSIJA

Linarnost između površine signala pika i koncentracije pesticida je posti-
gnuta za dva seta koncentracionih krivih, i to za kalibraciju u rastvaraču i kali-
braciju u matriksu koji je postignut iz miksa ispitivanih matriksa, odnosno ribe,
mleka i mesa. Linearne regresione prave su prikazane u Tabeli 1. i koeficijent
korelacije (r^2) koji je za sve ispitivane pesticide bio veći od 0,99. U Tabeli 1. pri-
kazane su kalibracione krive koje su dobijene kalibracijom u matriksu. Limit
kvantifikacije je postignut za svaki ispitivani pesticid analizom šest spajkovanih
uzoraka miksa matriksa na nivou od 10 μ g/kg tako što je standardna devijacija
pomnožena sa brojem 10. Uticaj matriks efekta je praćen tokom kvantifikaci-
je spajk uzoraka. Matriks efekat je računat iz odnosa koncentracije pesticida u
standardu i matriksu. Srednja vrednost matriks efekta je bila u opsegu od 80 %
do 120% ukazujući da je uticaj matriksa nije značajan. Tačnost je izračunata na
osnovu srednje vrednosti spajk uzorka na koncentracionom nivou od 10 μ g/kg i
20 μ g/kg. Ponovljivost je procenjena na osnovu relativne standardne devijacije
RSD analitičke metode na osnovu šest repilkata spajkovana uzorka od 10 μ g/kg.
Prihvatljiv opseg srednje vrednosti dobijenih spajk uzoraka je u opsegu od 80
do 120 %, a prihvatljiva RSD manja od 20 % po smernicama vodiča za validaci-

ju metode SANTE/12682/2019. Zadovoljavajući rezultati validacije metode su prikazani u Tabeli 2.

Potrebno je naglasiti da su limiti kvantifikacije izraženi na količinu celokupnog uzorka (Tabela 1). U slučaju proračuna na količinu masti dobijene vrednosti su manje 10 do 25 puta. Kada se rezultati izdaju na ukupnu količinu prisutnog pesticida u uzorku tada je potrebno i definisane MDK vrednosti prilagoditi u odnosu na procenat masti kao što propisuje zakonska regulativa.

Tabela 1. Linearne regresione prave, koeficijenti korelacije, retenciono vreme i limit kvantifikacije ispitivanih organohlornih pesticida

| ANALIT | RETENCIONO VREME, min | REGRESIONE PRAVE | KOEFICIJENT KORELACIJE, R ² | LOQ (µg/kg) |
|-------------------|-----------------------|---------------------|--|-------------|
| α-HCH | 11,95 | y=0,779090x-16,1263 | 0,999069 | 8,6 |
| β-HCH | 13,27 | y=1,2156x-28,7541 | 0,998865 | 8,9 |
| γ-HCH | 13,37 | y=1,29476x-30,9652 | 0,998865 | 9,5 |
| δ-HCH | 14,85 | y=0,588992x-12,4665 | 0,997828 | 6,6 |
| Heptahlor | 16,70 | y=0,649995x-8,81829 | 0,996210 | 7,9 |
| Aldrin | 18,57 | y=0,988342x-36,9880 | 0,997865 | 7,4 |
| Heptahlor epoksid | 20,99 | y=0,942668x-30,2775 | 0,998391 | 5,6 |
| α- Endosulfan | 22,68 | y=0,320570x-2,38763 | 0,999774 | 5,8 |
| Dieldrin | 23,94 | y=1,26829x-27,2813 | 0,999110 | 7,5 |
| p,p' - DDE | 23,98 | y=1,00430x-12,6365 | 0,999612 | 6,5 |
| Endrin | 24,79 | y=0,149064x-7,33786 | 0,999988 | 7,8 |
| β- Endosulfan | 25,33 | y=0,176657x-3,90685 | 0,999937 | 9,5 |
| p,p' - DDD | 25,74 | y=2,3471x-56,0340 | 0,999389 | 5,6 |
| Endrin aldehid | 25,89 | y=0,403931x-11,8097 | 0,996402 | 6,3 |
| Endosulfan sulfat | 26,70 | y=0,198631x-5,71123 | 0,999348 | 5,3 |
| p,p' - DDT | 26,93 | y=0,645032x-45,0174 | 0,997647 | 6,5 |
| Metoksihlor | 28,75 | y=1,33045x-157,086 | 0,998477 | 8,5 |

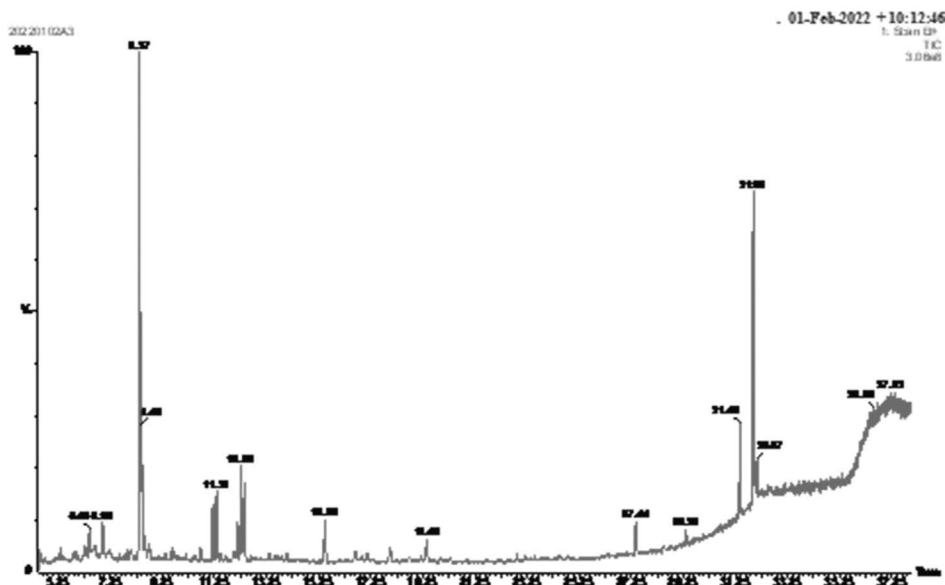
Opseg tačnosti, odnosno efikasnosti određivanja se organohlornih pesticida na nivou 10 µg/kg je u opsegu od 71,0% do 106,0 %, dok je vrednost RSD u opsegu od 2,7% do 14,8 % (Tabela 2). Takođe, na nivou od 20 µg/kg dobijena je zadovoljavajuća tačnost sa opsegom od 75,2 % do 106,2 % i RSD manjim od 15%. Uspešnost ukljanjanja i minimalizacije masti i ko-ekstrahovanih supstanci

potvrđena je i izlegom hromatograma za uzorak sterilisanog mleka na slici 1. Tačnost dobijenih spajk uzoraka i hromatogram potvrđuju da je izabrana optimalna količina uzorka za ekstrakciju. Mada se iz hromatograma mogu uočiti tragovi prisutnih masnih kiselina (Slika 1), koji nisu imali uticaja na određivanje i kvantifikaciju.

Tabela 2. Srednja vrednost recovery i (\pm) relativne standardne devijacije (RSD) 17 OHP spajkovananih na nivou 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ u uzorcima mesa, ribe i mleka

| Ispitivani matriks: | Spajk 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Svinjsko meso | | Spajk 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Riba - oslić | | Spajk 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Mleko | |
|-----------------------|---|-------------------------|--|-------------------------|---|-------------------------|
| | Recovery, % | RSD _r , % | Recovery, % | RSD _r , % | Recovery, % | RSD _r , % |
| α -HCH | 79,4 | 7,9 | 71,8 | 13,5 | 71,6 | 10,0 |
| β -HCH | 105,8 | 6,2 | 83,2 | 12,0 | 87,1 | 14,6 |
| γ -HCH | 98,2 | 7,0 | 84,2 | 10,2 | 81,1 | 10,6 |
| δ -HCH | 86,2 | 7,0 | 71,8 | 9,2 | 81,5 | 11,3 |
| Heptahlor | 90,0 | 13,7 | 87,8 | 13,3 | 79,1 | 14,8 |
| Aldrin | 106,0 | 7,8 | 77,4 | 11,7 | 88,8 | 12,7 |
| Heptahlor epoksid | 97,2 | 12,7 | 102,6 | 16,1 | 79,4 | 12,5 |
| α - Endosulfan | 103,6 | 10,5 | 84,0 | 10,6 | 103,9 | 12,7 |
| Dieldrin | 99,0 | 11,6 | 100,6 | 7,5 | 99,1 | 13,1 |
| p,p' - DDE | 104,4 | 14,3 | 75,4 | 13,5 | 101,4 | 13,5 |
| Endrin | 99,0 | 12,1 | 105,8 | 9,4 | 99,8 | 11,8 |
| β - Endosulfan | 83,0 | 2,7 | 105,2 | 14,0 | 94,6 | 6,3 |
| p,p' - DDD | 92,6 | 4,9 | 104,6 | 10,7 | 105,9 | 14,3 |
| Endrin aldehid | 81,8 | 7,5 | 105,4 | 7,2 | 98,9 | 9,3 |
| Endosulfan sulfat | 100,6 | 8,7 | 86,0 | 13,5 | 82,8 | 7,2 |
| p,p' - DDT | 71,0 | 5,5 | 106,0 | 14,3 | 82,3 | 9,4 |
| Metoksihlor | 101,0 | 12,4 | 106,0 | 13,8 | 83,9 | 9,2 |

Ispitano je 30 uzoraka ribe, 30 uzoraka svinjskog mesa i 10 uzoraka sterilizovanog mleka. Ispitivani uzorci su iz marketa u prodaju na teritoriji Republike Srbije. Dobijene koncentracije ispitanih organohlornih pesticida za izabrane uzorke hrane su prikazani su Tabeli 3.



Slika 1. Hromatogram realnog uzorka sterilizovanog mleka

Tabela 3. Rezultati pesticida dobijeni u realnim uzorcima animalnog porekla, izraženi u $\mu\text{g}/\text{kg}$

| Ispitani uzorci | Pesticidi | Broj uzoraka | Opseg pesticida, $\mu\text{g}/\text{kg}$ |
|---------------------|----------------------|--------------|--|
| Svinjsko meso | γ -Lindan | 3 | 10,9-25,6 |
| | β -HCH/Lindan | 4 | 32,3 -36,0 |
| Riba - oslić | p,p' DDT | 4 | 40,7-45,8 |
| | Endrin aldehid | 2 | 21,6-32,5 |
| | α -Endosulfan | 2 | 15,1-18,2 |
| | Endosulfan sulfat | 3 | 10,0-15,4 |
| Sterilizovano mleko | Heptahlor epoksid | 2 | 11,0-25,1 |
| | δ -HCH | 2 | 25,2-36,8 |

U uzorcima svinjskog mesa u tri, odnosno četiri uzoraka detektovani su Lindan i beta-Lindan u opsegu 10,9-25,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$, odnosno 32,3 -36,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respektivno. Dobijeni rezultati analiziranih uzoraka prikazanih u Tabeli 3 su ispod maksimalno dovoljenih koncentracija za odgovarajuće pesticide propisane Zakonskom regulativom Republike Srbije. Takođe, dobijeni rezultati su u skladu sa drugim autorima da su izomeri Lindana i DDT najčešće detektovani u uzorcima mesa (Panseri i sar, 2013). Objavljeni rezultati su najčešće izraženi na količinu

masti (računato na 10 % masti), tako da za crveno meso su bili u opsegu od 0,01 do 0,89 mg/kg izraženi na količinu masti prema istraživanjima drugih autora iz 2020. godine (Antary i sar, 2021). Modifikovanom QuEChERS metodom su ispitani uzorci mesa i na pesticide novije generacije, pri čemu su iznad limita kvantifikacije detektovani hlorspirifos i fenitrotion, dok ispitani uzorci mleka nisu sadržali pesticide (Kang i sar, 2020). U ispitanim uzorcima ribe, detektovani su p,p' DDT, Endrin aldehid, α -Endosulfan i Endosulfan sulfat u količini računatoj na celokupnu vlažnu masu od 10,0 do 45,8 $\mu\text{g}/\text{kg}$. U sterilizovanom mleku detektovani su heptahlor eposid i gama-Lindan (HCH) u dva od ispitanih deset uzoraka. U jednom od objavljenih ispitivanja pasterizovanog i sterilizovanog mleka HCH izomeri i metoksihlor nije detektovan ni u jednom od analiziranih uzoraka, dok je alfa-endosulfan određen u nekim UHT uzorcima mleka, ali njihova količina bila ispod granice kvantifikacije. S druge strane, različiti nivoi heptahlor (do 65,42 $\mu\text{g}/\text{kg}$), heptahlor epoksida (do 2,62 $\mu\text{g}/\text{kg}$), aldrin (do 3,86 $\mu\text{g}/\text{kg}$), p,p' -DDE (do 4,28 $\mu\text{g}/\text{kg}$) i dieldrina (do 4,85 mg/kg) su kvantifikovani u uzorcima mleka (Özdemir i sar, 2019). U izveštaju Evropske agencije za bezbednost hrane iz 2017. godine, a za 2015. godinu, u 616 uzoraka putera, iznad limita kvantifikacije je detektovano prisustvo DDT, heksahlorbenzena i dieldrina (EFSA, 2017). Od ispitanih uzoraka u 12,8 % je detektovan jedan ili više rezidua pesticida. Pomenuti pesticidi su detektovani ispod MDK vrednosti. Takođe, u izveštaju agencije za 2019. godinu najučestalije pojavljivanje u animalnim proizvodima je zabranjenih pesticida DDT i heksahlorbenzena, kada su u pitanju organohlorni pesticidi koji su i najveći zagađivači hrane životinjskog porekla. Od preostalih pesticida najzastupljenija je kontaminacija jaja insekticidom fipronilom i bubrega životinja organofosfatnim pesticidom hlorspirifosom (EFSA, 2021). Heksahlorbenzen je primenjivan u poljoprivredi za zaštitu biljaka, i to pšenice, ovasa, ječma i raži, dok u industriji nastaje u proizvodnji hlorovanih rastvarača. Kada su u pitanju rezultati ispitivanja riba, koje se najčešće smatraju indikatorima životne sredine, rezultati istraživanja riba iz reke Dunav (Srbija), odnosno krupatice i mreke potvrdili su prisustvo heksahlorbenzena, izomera DDT i polihlorovanih bifenila. Rezultati su za ukupnu količinu izomera DDT su od 2,57 ng/g za mreku, odnosno 13,80 ng/g za krupaticu, a evidentno najveći doprinos ukupnom DDT daje metabolit p,p'-DDT što je u saglasnosti sa istraživanjima i drugih autora (Đinović-Stojanović i sar, 2013).

U zaključku može se navesti, da je pojava organohlornih ostataka i dalje zastupljena i moguća u svežem mesu, ribi i mlečnim proizvodima, ali da je za unos ovih perzistentnih jedinjenja zabrinutost mala zbog niskih koncentracija nalaženja.

ZAKLJUČAK

U zaključku može se istaći da je poslednjih godina došlo je do značajnog napredka u analizi ostataka pesticida. Različite metode pripreme rezidua pesticida kao i primenjene tehnike detekcije u analizi pesticida se sve više usavr-

šavaju i daju zadovoljavajuće rezultate. Potreba za efikasnim, brzim i pouzdanim metodama određivanja pesticida se povećala i samim tim dala je uspešne rezultate. Postignuta su poboljšanja u koracima ekstrakcije i prečišćavanja, a takođe i u koracima detekcije korišćenjem gasne i tačne hromatografe sa masenom detekcijom. Na osnovu iznesenih rezultata, može se reći da i uprkos dugom vremenu zabranjene upotrebe organohlorinih pesticida, oni i dalje figuriraju u životnoj sredini i hrani. Sa tim u vezi, potrebno je i dalje sprovesti rigorozne mere kontrole pesticida, a zbog sve učestalijih kontaminacija i ostalim pesticidima neophodno je povećati obim ispitivanja rezidua pesticida u masnoj hrani.

Zahvalica

Studiju je finansiralo Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (Ugovor br. 451-03-68/2022-14/200030).

LITERATURA

1. Anastassiades, M., Lehotay, S. (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.
2. Antary, T., Alawi, M., Kiwan, R., Haddad, N. (2021) Residues of Organochlorine Pesticides in Food of Animal Origin from Northern Governorates of Jordan in 2019 and 2020. *Fresenius Environmental Bulletin* 30, 2326-2332.
3. AOAC Official Method 2007.01 Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate Gas Chromatography/Mass Spectrometry and Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry First Action 2007
4. Chau, N.D.G., Hop, N. V., Long, H.T., Duyen, N.T.M., Raber, G. (2020) Multi-residue analytical method for trace detection of new-generation pesticides in vegetables using gas chromatography -tandem mass spectrometry. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 55(5), 417-428. DOI:10.1080/03601234.2019.1707585.
5. Djermati, Š., Velelinović, D., Gržetić, I., Marković, D. Životna sredina i njena zaštita, Knjiga 1, *Životna sredina*, 2007.
6. Djinović-Stojanović, J., Spasić, J., Popović, A., Vranić, D., Nikčević, M., Hegediš, A., Nikolić, D. (2013) Distribucija organohlorinih pesticida i polihlorovanih bifenila u dve vrste riba iz Dunava. *Tehnologija hrane* 54 (1), 69-78.
7. Ferreira, V., Estrella, L., Alves, M., Gallistl, C., Vetter, V., Silva, T., Malm, O., Torres, J., Finco, F. (2019) Residues of legacy organochlorine pesticides and DDT metabolites in highly consumed fish from the polluted Guanabara Bay, Brazil: distribution and assessment of human health risk. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, <https://doi.org/10.1080/03601234.2019.1654808>
8. Gaweł, M., Kiljanek, T., Niewiadowska, A., Semeniuk, S., Goliszek, M., Burek, O., Poryniak, A. (2019) Determination of neonicotinoids and 199 other pesticide residues in honey by liquid and gas chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Food Chemistry* 282, 36-47. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.003>

9. Jin, B., Xie, L., Guo Y., Pang G. (2012) Multi-residue detection of pesticides in juice and fruit wine: A review of extraction and detection methods. *Food Research International*, 46, 399–409.
10. Kang, H.S., Kim, M., Kim, E.J., Choe, W. (2020) Determination of 66 pesticide residues in livestock products using QuEChERS and GC–MS/MS. *Food Science and Biotechnology*, 29, 1573–1586. <https://doi.org/10.1007/s10068-020-00798-4>
11. Keswani, C., Dilnashin, H., Birla, H., Roy, P., Tyagi, R., Singh, D., Rajput, V., Minkina, T., Narenderan, S.T. Meyyanathan, S.N. Babu, B. (2020) Review of pesticide residue analysis in fruits and vegetables. Pre-treatment, extraction and detection techniques. *Food Research International*, 133, 109141. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109141>
12. Oliveira, L., Kurz, M., Guimarães, M., Martins, M., Prestes, O., Zanella, R., Ribeiro, J., Gonçalves, F. (2019) Development and validation of a method for the analysis of pyrethroid residues in fish using GC–MS. *Food Chemistry* 297, 124944. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.06.011>
13. Özdemir, C., Salih Özdemir, S., Oz, E., Oz, F. (2019) Determination of organochlorine pesticide residues in pasteurized and sterilized milk using QuEChERS sample preparation followed by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Food Processing and Preservation*, <https://doi.org/10.1111/jfpp.14173>
14. Panseri, S., Biondi, P.A., Vigo, D., Communod, R., Chiesa, L.M. (2013) Occurrence of organochlorine pesticides residues in animal feed and fatty bovine tissue. *Food industry*, DOI: 10.5772/54182
15. Pravilnik o maksimalno dozvoljenim količinama ostataka sredstava za zaštitu bilja u hrani i hrani za životinje ("Sl. glasnik RS", br. 132/2020).
16. Rahman, M., El-Aty, A., Kabir, H., Chung H. S., Lee, H.S., Hacımuftuoğlu, F., Hoon Jeong, H., Chang, B., Shin, H., Shim, J. (2018) A quick and effective methodology for analyzing dinotefuran and its highly polar metabolites in plum using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chemistry* 239, 1235–1243. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.073>
17. Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC. *Official Journal of the European Union*, 70, 1-16. March 16, 2005.
18. SANTE/12682/2019 – Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed
19. Singh, S. (2021) Global footprints of organochlorine pesticides: a pan-global survey. *Environ Geochem Health*, <https://doi.org/10.1007/s10653-021-00946-7>
20. 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 disperznom SPE- Modularna QuEChERS metoda.
21. Sun, D., Wang, Y., Zhang, Q., Pang, J. (2019) Investigation of etoxazole metabolites in citrus, soil and earthworms by ultra-performance liquid chromatography with time-of-flight mass spectrometry. *Chemosphere*, 226, 782-790.
22. The 2015 European Union report on pesticide residues in food, (2017) *EFSA Journal*, 15(4), 4791.
23. The 2019 European Union report on pesticide residues in food, (2021) doi: 10.2903/j.efsa.2021.6491, www.efsa.europa.eu/efsajournal