Razvoj multirezidualne metode za određivanje pesticida u vinima vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa

Pelajić, Maja

Doctoral thesis / Disertacija

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:553837

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Maja Pelajić

DEVELOPMENT OF MULTIRESIDUE METHOD FOR THE DETERMINATION OF PESTICIDES IN WINE BY GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2016

Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Maja Pelajić

RAZVOJ MULTIREZIDUALNE METODE ZA ODREĐIVANJE PESTICIDA U VINIMA VEZANIM SUSTAVOM PLINSKA KROMATOGRAFIJA-SPEKTROMETRIJA MASA

DOKTORSKI RAD

Mentor:
izv. prof. dr. sc. Dubravka Vitali Čepo

Zagreb, 2016.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Maja Pelajić

DEVELOPMENT OF MULTIRESIDUE METHOD FOR THE DETERMINATION OF PESTICIDES IN WINE BY GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY

DOCTORAL THESIS

Supervisor:
Dr. Dubravka Vitali Čepo, Associate Professor

Zagreb, 2016

Riječima ne mogu opisati zahvalnost koju osjećam prema mentorici izv. prof. dr. sc. Dubravki Vitali Čepo. Bez njenog vodstva, ideja, uloženog vremena i truda, strpljenja, a ponajviše povjerenja koje mi je pružila ne bih uspjela. Uz njeno mentorstvo izrada ovog rada bilo je predivno iskustvo. Hvala joj na podršci i što je bila uz mene u najtežim trenucima.

Hvala mojoj obitelji koja je uz mene od prvog dana školovanja i bez čije podrške ovaj rad ne bi bio ostvaren.

Mom suprugu Izidoru

Sadržaj

SAŽETAK ..... *XIII*

ABSTRACT ..... *XV*

§ 1. UVOD *1*

§ 2. LITERATURNI PREGLED *4*

2.1. Kemija vina **4**

2.1.1. Organske kiseline 8

2.1.2. Fenolni spojevi 9

2.1.3. Hlapljivi spojevi 12

2.1.4. Spojevi dušika, vitamini i minerali 13

2.2. Pesticidi **15**

2.2.1. Kemijska klasifikacija pesticida 17

2.2.2. Fizikalno – kemijska svojstva pesticida 24

2.2.3. Istraživanja pesticida u vinu 25

2.2.4. Analitičke metode za određivanje pesticida u vinu 26

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO *36*

3.1. Materijali **36**

3.1.1. Radne otopine 39

3.2. Metode **40**

3.2.1. Plinska kromatografija vezana sa spektrometrijom masa 40

3.2.2. Postupci priprave uzorka 42

3.2.3. Validacija metode 43

3.2.4. Mjerna nesigurnost 44

3.2.5. Utjecaj matrice uzorka 47

3.2.6. Primjena multirezidualnih metoda na uzorke vina 49

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA *50*

4.1. Optimizacija kromatografskih uvjeta za odjeljivanje pesticida **50**

4.1.1. Optimizacija instrumentnih uvjeta 61

4.2. Postupci ekstrakcije pesticida iz uzoraka vina **63**

4.2.1. Ekstrakcija pesticida iz vina na čvrstoj fazi 63

4.2.2. Ekstrakcija pesticida iz vina postupkom QuEChERS 73

4.3. Validacija metoda **81**

4.3.1. Validacija metode određivanja pesticida u vinu ekstrakcijom na čvrstoj fazi 81

4.3.2. Validacija QuEChERS metode 88

4.3.3. Usporedba ekstrakcije pesticida iz vina na čvrstoj fazi ipostupkom QuEChERS 94

4.4. Utjecaj matrice uzorka na djelotvornost određivanja pesticida u vinu **98**

4.4.1. Utjecaj matrice uzorka na djelotvornost određivanja pesticida u vinu uz primjenu ekstrakcije na čvrstoj fazi 99

4.4.2. Utjecaj matrice uzorka na djelotvornost određivanja pesticida u vinu uz primjenu postupka QuEChERS 103

4.4.3. Ovisnost utjecaja matrice uzorka i djelotvornosti ekstrakcije pesticida iz vina o topljivosti pesticida u vodi i njihovoj hidrofobnosti 108

4.5. Procjena mjerne nesigurnosti 116

4.6. Analize vina 123

§ 5. ZAKLJUČAK 132

§ 6. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ 136

§ 7. LITERATURNI IZVORI 138

§ 8. DODATAK XVI

§ 9. ŽIVOTOPIS LXVI

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

RAZVOJ MULTIREZIDUALNE METODE ZA ODREĐIVANJE PESTICIDA VEZANIM SUSTAVOM PLINSKA KROMATOGRAFIJA – SPEKTROMETRIJA MASA

Maja Pelajić
Hrvatski centar za poljoprivredu, hranu i selo, Zavod za zaštitu bilja
Rim 98, 10000 Zagreb, Hrvatska

Razvijena je multirezidualna metoda za određivanje 25 pesticida u vinima plinskom kromatografijom vezanom sa spektrometrijom masa. Optimirana je ekstrakcija na čvrstoj fazi uz sorbens OASIS HLB te postupak ekstrakcije QuEChERS s težištem na optimizaciji koncentracije dodanih soli radi podešavanja raspodjele analita između dviju faza. Za svaki postupak priprave uzorka provedena je validacija za crno i bijelo vino kao dvije zasebne matrice uzorka. Granice određivanja pesticida za oba postupka bile su u rasponu od 0,01 μg L^{-1} do 250 μg L^{-1}. Preciznost, izražena kao relativna standardna devijacija, bila je <20 %, dok je točnost, izražena kao analitički povrat, za većinu pesticida bila u rasponu od 70 % do 120 %. Ispitan je utjecaj matrice na određivanje pesticida pri čemu je izračunata djelotvornost postupaka priprave uzorka. U okviru validacije metoda procijenjena je mjerna nesigurnost koja je bila <50 % za većinu pesticida. Predloženim analitičkim postupcima analizirana su 63 uzorka različitih vina da bi se dobio prvi uvid u koncentracije ostataka pesticida u vinima s područja Hrvatske.

(145 stranica, 65 slika, 20 tablica, 128 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102a, Zagreb i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Ključne riječi: ekstrakcija na čvrstoj fazi/plinska kromatografija vezana sa spektrometrijom masa/pesticidi/QuEChERS/vina/

Mentor: izv. prof. dr. sc. Dubravka Vitali Čepo

Rad prihvaćen: 3.5.2016.

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Vlasta Drevenkar, zn. savj. u mirovini i nasl. red. prof., PMF
2. izv. prof. dr. sc. Dubravka Vitali Čepo, FBF
3. izv. prof. dr. sc. Dragana Mutavdžić Pavlović, FKIT

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF MULTIRESIDUES METHOD FOR THE DETERMINATION OF PESTICIDES IN WINE BY GAS CHROMATOGRAPHY – MASS SPECTROMETRY

Maja Pelajić
Croatian Centre for Agriculture, Food and Rural Affairs, Institute for Plant Protection
Rim 98, 10000 Zagreb, Croatia

A new multiresidue method was developed for determination of 25 pesticides in wines by gas chromatography – mass spectrometry. Two sample preparation procedures were optimized; solid phase extraction using OASIS HLB and QuEChERS procedure, where salt concentrations were optimised in order to adjust the distribution of pesticides between two immiscible phases. Method validation, including uncertainty estimation (<50 % for most pesticides), was performed independently for red and white wine as two different matrices and for each sample preparation procedure. Limits of quantification were between 0,01 μg L^{-1} and 250 μg L^{-1}. The recoveries of most pesticides were between 70 % and 120 % with relative standard deviations <20 %. The matrix effect was investigated and the quality of sample preparation procedures has been evaluated in terms of extraction efficiency. The proposed analytical procedures were applied to 63 Croatian wine samples of different varieties in order to provide the first insight into pesticide residue concentrations in Croatian wines.

(145 pages, 65 figures, 20 tables, 128 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102A, Zagreb, Croatia and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

Keywords: gas chromatography-mass spectrometry/pesticides/QuEChERS/solid phase extraction/wines

Supervisor: Dr. Dubravka Vitali Čepo, Associate Professor

Thesis accepted: 3.5.2016.

Reviewers:

1. Dr. Vlasta Drevenkar, Senior scientist, IMI and Hon. Full professor, PMF
2. Dr. Dubravka Vitali Čepo, Associate Professor, FBF
3. Dr. Dragana Mutavdžić Pavlović, Associate Professor, FKIT

§ 1. UVOD

Pesticidi su tvari namijenjene sprječavanju, suzbijanju i kontroli štetnih organizama te je njihova upotreba postala neizostavan dio poljoprivredne proizvodnje.[1] Nažalost, upotreba pesticida rezultira njihovim zaostajanjem u hrani i okolišu što može imati negativne učinke na ljudsko zdravlje i očuvanje okoliša.

S proizvodnjom od 250 milijuna hektolitara godišnje, vino je jedan od najkonzumiranijih proizvoda u svijetu.[2] Ujedno je i poznata činjenica da crno vino ima pozitivne učinke na ljudsko zdravlje.[3] Obzirom na poznate štetne učinke pesticida, njihovu postojanost i mogućnost akumulacije u okolišu i u organizmu te veliku popularnost i učestalu konzumaciju vina, kontinuirano praćenje ostataka pesticida u vinu od presudne je važnosti. Konvencionalan uzgoj vinove loze karakterizira značajna upotreba većeg broja različitih vrsta pesticida od kojih su mnogi otporni na procese fermentacije te ih posljedično nalazimo i u vinu.[4,5] Najzastupljenija skupina pesticida koja se upotrebljava u konvencionalnom uzgoju vinove loze su fungicidi, koji se apliciraju izravno na zrno grožđa i/ili list te se ovisno o primijenjenoj dozi, karenci, tehnološkom postupku te fizikalno – kemijskim svojstvima pesticida mogu pronaći i u vinima za komercijalnu upotrebu. Pojava značajnijih količina toksičnih ostataka u vinima predstavlja veliki problem za proizvođače, ali i za konzumente. Bitno je napomenuti da ne postoje relevantni podaci o količinama i vrsti ostataka pesticida u vinima s područja Hrvatske. Naime, prema dostupnoj literaturi, dosadašnja istraživanja toksičnih ostataka u vinu uglavnom su bila usmjerena na određivanje teških metala.[6-8]

U Europskoj uniji propisani su maksimalno dopušteni maseni udjeli pesticida u grožđu i u rasponu su od 0,01 mg kg^{-1} do 10 mg kg^{-1}, ovisno o pesticidu. Navedene maksimalno dopuštene vrijednosti primjenjive su i na vino uz upotrebu korekcijskih faktora koji se odnose na tehnološku obradu hrane. Unatoč pretpostavci da se tijekom tehnološke obrade grožđa i fermentacije koncentracija pesticida u vinu snižava do ispod granica detekcije, u novije vrijeme mnoge studije upućuju na kontaminaciju vina pesticidima u značajno visokim masenim koncentracijama.[9-13]

Zbog kompleksnosti kemijske prirode vina, niskih masenih koncentracija zaostalih pesticida te konstantnih promjena broja i vrste registriranih pesticida, analitičke metode za određivanje ostataka pesticida u vinima zahtijevaju stalnu optimizaciju što se prvenstveno

odnosi na postizanje bolje osjetljivosti i selektivnosti te nižih granica detekcije i određivanja. Prisutnost mnogobrojnih spojeva različitih kemijskih klasa u vinu predstavlja veliki problem pri ekstrakciji pesticida iz matrice uzorka zbog mogućih interferencija. Iako je primjenom kromatografskih metoda utjecaj matrice uzorka pri analizama pesticida moguće svesti na najmanju moguću mjeru, vrlo često te metode nisu dovoljne pri analizi složenijih uzoraka kao što je vino. Postupci priprave uzorka ključni su dio razvoja analitičkih metoda. Prema literaturnim podacima, ekstrakcija na čvrstoj fazi pokazala se učinkovitom za selektivno akumuliranje pesticida iz uzoraka vina.[4,5,9-11,14-16] Međutim, sa sve intenzivnijom upotrebom pesticida, razvijeni su i novi postupci priprave uzoraka. Jedan od takvih postupaka je i QuEChERS (eng. „*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*“) čija primjenjivost za određivanje ostataka pesticida u vinima još nije istražena.

Obzirom na činjenicu da do danas nije provedeno ni jedno sustavno istraživanje ostataka pesticida u vinima s područja Hrvatske, vrlo je bitno istražiti kolika je njihova zastupljenost u različitim vinima (obzirom na vinorodne regije, vrste i sorte), koji se pesticidi u vinima nalaze najčešće ili u najvišim masenim koncentracijama, koliko način uzgoja (konvencionalni ili ekološki) utječe na koncentracije njihovih ostataka te jesu li postojeće koncentracije pesticida u vinima niže od trenutno važećih maksimalno dopuštenih vrijednosti propisanih za grožđe.

Svrha rada

Cilj ovog rada bio je razviti djelotvornu, selektivnu i osjetljivu analitičku metodu za određivanje ostataka pesticida u vinima plinskom kromatografijom uz spektrometar masa kao detektor. U tu je svrhu odabrano 25 pesticida na temelju učestalosti njihove primjene na vinovoj lozi u Hrvatskoj. Prema literaturnim podacima, do sada nije razvijena multirezidualna analitička metoda koja bi obuhvatila istovremenu analizu odabranih 25 pesticida u vinima. Težište istraživanja u ovom radu bila je optimizacija priprave uzorka ekstrakcijom na čvrstoj fazi da bi se postigla maksimalna djelotvornost akumuliranja odabranih pesticida iz vina te optimizacija postupka QuEChERS koji do sada nije bio primijenjen za određivanje ostataka pesticida u vinima. Ispitan je utjecaj matrice uzorka na djelotvornost priprave uzorka. U tu svrhu razmotrene su dvije zasebne matrice uzorka vina obzirom na različitost kemijske prirode vina (crno i bijelo vino). Podaci prikupljeni u okviru validacije dviju metoda koja je provedena za dvije reprezentativne matrice uzorka vina statistički su obrađeni s ciljem procjene mjerne nesigurnosti cjelokupnog analitičkog postupka. Predložena metoda

primijenjena je na ukupno 63 uzorka vina prikupljenih iz svih regija Hrvatske s ciljem dokazivanja i usporedbe koncentracija pesticida u različitim sortama te ovisno o načinu proizvodnje vina što se prvenstveno odnosi na ekološku i konvencionalnu proizvodnju. Predloženi analitički postupak dao je prvi uvid o prisutnosti i koncentracijama pesticida u vinima s područja Hrvatske.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Kemija vina

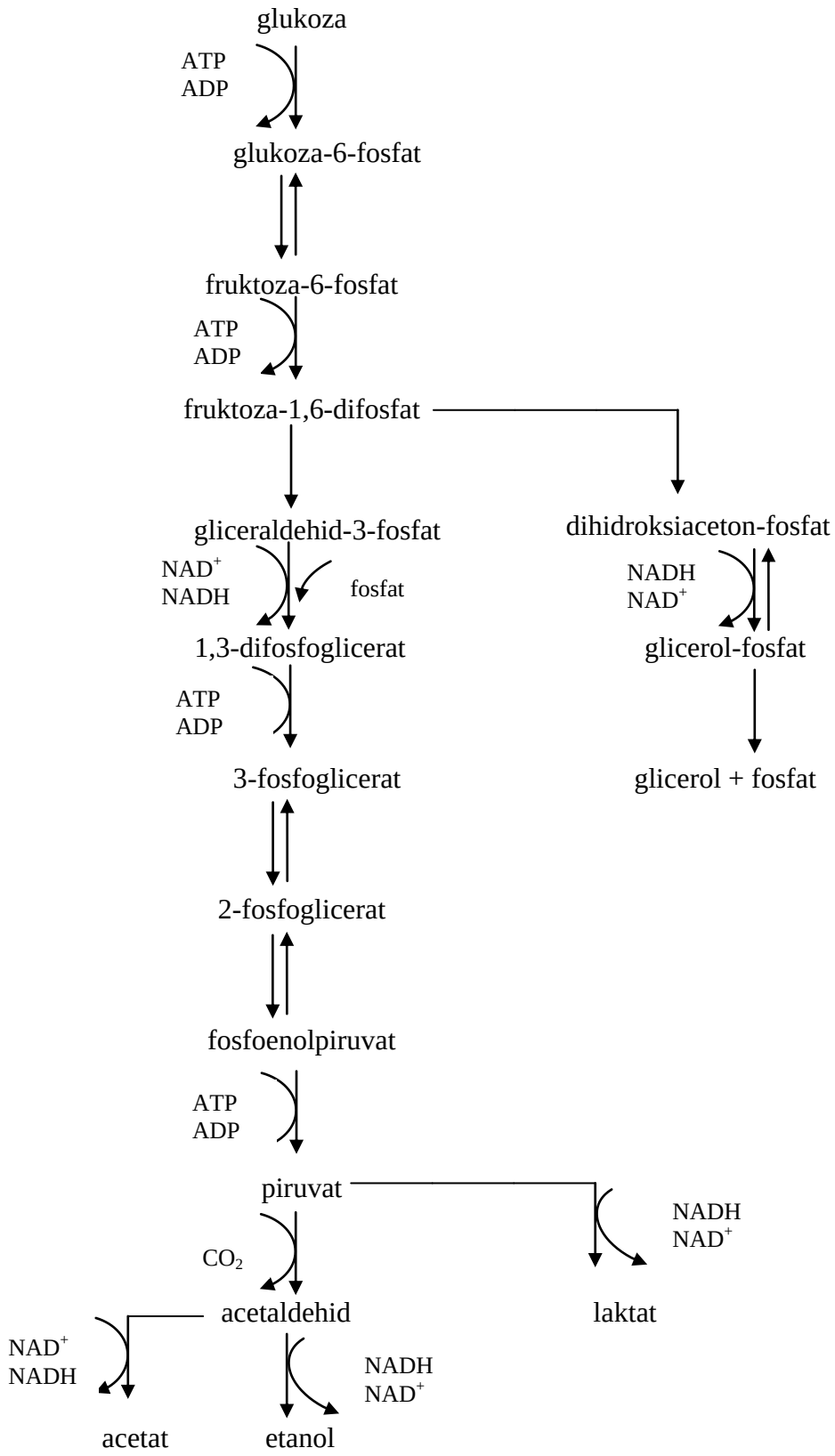
Vino ima važnu ulogu u mnogim sociološkim i religijskim aspektima društva i tako je već tisućama godina. Prvi arheološki nalazi vina datiraju iz doba 6000 godina prije nove ere i nađeni su u Gruziji, zatim u Iranu (5000 godina prije nove ere), Grčkoj (4500 godina prije nove ere) te u Armeniji (4100 godina prije nove ere). Kultura proizvodnje i konzumacije vina bila je vrlo bitna u antičkom svijetu, gdje je ujedno bila i sastavni dio religijskog slavlja. Vrlo brzo kultura proizvodnje vina širi se do Europe. Tako u Španjolsku dolazi preko antičke Grčke, u Njemačku preko Rimskog carstva, a u SAD ju donosi Kolumbo.[17] U današnje vrijeme proizvodi se nebrojeno mnogo vrsta vina napravljenih od oko 5000 različitih sorti jedne vrste grožđa – *Vitis vinifera*. U proizvodnji vina, a posebice radi postizanja što bolje kvalitete, ključno je poznavanje kemije vina i složenosti koje proizlaze iz interakcija tvari prisutnih u vinu.

Sažeto opisano, vino nastaje fermentacijskim postupkom pri čemu alkohol nastaje iz šećera prisutnih u vinu prema reakciji:

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2$$

Alkoholna fermentacija anaerobna je transformacija šećera (glukoza i fruktoza) u alkohol i ugljikov dioksid. Reakcija se odvija uz prisustvo gljivica (kvasaca) i nekih bakterija kao što je *Zymomonas mobilis*. U aerobnim uvjetima reakcija se odvija dalje pri čemu se etanol raspada na vodu i ugljikov dioksid. Međutim, proces pretvaranja šećera u alkohol mnogo je kompleksniji od navedene reakcije te uključuje biokemijske i fizikalno – kemijske procese. Uz etanol nastaju i drugi produkti reakcije od kojih valja spomenuti alkohole s većim brojem ugljikovih atoma (C_4 – C_{10}), estere, glicerol, butandion, 3-hidroksibutanon i 2,3-butandiol.

Kvasac kao anaeroban mikroorganizam koristi energiju dobivenu iz šećera putem dvaju tipova metabolizma; aerobnog (respiracija) i anaerobnog (fermentacija). Respiracijom kvasac razlaže šećer u prisustvu kisika i to koristi prilikom svog razmnožavanja. Fermentacijom, koja se odvija bez prisustva kisika, kvasac koristi samo šećer i energiju.[18] Oba metabolizma počinju glikolizom koja je prikazana na Slici 1.



Slika 1. Glikoliza i alkoholna fermentacija.

Tijekom glikolize nastaje piruvat kao krajnji produkt. Piruvat se dalje može razložiti na etanal i ugljikov dioksid uz prisustvo enzima piruvat dekarboksilaze nakon čega se etanal može reducirati u etanol. Ovaj proces naziva se alkoholna fermentacija i odvija se u citoplazmi. Alkoholnom fermentacijom regenerira se NAD^+ potrošen tijekom glikolize te daje kvascu energiju od dvije molekule ATP. Piruvat se također može razložiti u acetil – koenzim A i ugljikov dioksid uz prisustvo enzima piruvat dehidrogenaze. NAD^+ se reducira u NADH. Acetil – koenzim A se dalje uključuje u Krebsov ciklus gdje se razlaže na ugljikov dioksid i nekoliko reduciranih koenzima (NADH i $FADH_2$). Reducirani koenzimi kasnije se reoksidiraju pri čemu se molekularni kisik reducira u vodu. Ovaj proces poznat je pod nazivom respiracija pri čemu se dobije ukupno 36 do 38 molekula ATP. U odnosu na alkoholnu fermentaciju respiracijom kvasac dobije mnogo više energije. Razlaganje piruvata u etanal ili acetil – koenzim A ključni su koraci u regulaciji metabolizma kvasca.

Na proces alkoholne fermentacije utječe nekoliko vanjskih čimbenika od kojih valja izdvojiti temperaturu. Porastom temperature alkoholna fermentacija će biti intenzivnija, ali popratno i kraćeg vijeka, što znači da će udio etanola biti manji. Uz navedeno, kvasac je osjetljiv na promjene temperature, osobito na temperature više od 40 °C koje uzrokuju ugibanje kvasca i prekid alkoholne fermentacije.

Vino se sastoji od 70 % do 90 % vode, 1 % organskih kiselina, pektina, proteina, šećera i fenola (i polifenola) koji vinu daju okus, boju, aromu i trpkost te vitamina, minerala i spojeva dušika u tragovima koji su zaslužni za sazrijevanje i fermentaciju vina. Udio alkohola u vinu varira ovisno o sorti grožđa i u rasponu je od 6 % do 23 %. Većina navedenih tvari nalazi se u grožđu u nešto drugačijem omjeru nego u vinu, zbog interakcija tih tvari i nastajanja novih tijekom tehnološke obrade grožđa. Osim navedenih tvari, vino sadrži i tvari koje nisu od velikog značaja za kvalitetu vina. Iznimka je udio kalija u obliku kalijevih soli organskih kiselina koji doprinosi kiselosti vina. U vinu se često mogu naći željezo i bakar koji s vinom dolaze u kontakt preko metalnih površina koje sadrže navedene metale. Za vina se često kaže da imaju metalni okus koji je posljedica prisutnosti željeza i bakra. U vinu se u tragovima nalaze i mnoge druge tvari koje mu daju specifičnu aromu i karakter. Osim interakcija između tvari sadržanih u vinu, na kemijski sastav vina utječu i vanjski čimbenici kao što su sorta grožđa, klimatski uvjeti i geografsko podrijetlo.[19-22]

Kemijski sastav grožđa (izražen u obliku soka) i vina prikazan je u Tablici 1.[23]

Tablica 1. Masena koncentracija tvari u grožđu (u obliku soka) i vinu.

Tvar	Grožđe, sok / g L^{-1}	Vino / g L^{-1}
Voda	700 – 850	800-900
Ugljikohidrati	150 – 270	1 – 10
Glukoza	80 – 130	0,5 – 5
Fruktoza	70 – 120	0,5 – 5
Pektini	0,1 - 0,8	T
Kiseline	3 – 15	4,5 – 11
Vinska kiselina	3 – 12	1 – 6
Jabučna kiselina	1 – 8	0 – 8
Mliječna kiselina	T	1 – 5
Limunska kiselina	T	0,2 –1,5
Etanol	T	80 – 150
Glicerol	T	3 – 14
Fenoli	0,1 – 1	T – 5
Jednostavni fenoli	T - 0,2	T – 0,2
Antocijanini	0 - 0,5	0 – 0,5
Tanini	T – 5	T – 5
Spojevi dušika	0,2 – 2	0,1 – 1
Anorganski kationi (Fe, Cu)	3 – 5	1,5 – 4
Kalij	1 – 3	0,5 – 2
Drugi kationi	0,2 - 1	0,1 – 2
Anioni	0,2 - 1	0,1 – 3

T – u tragovima.

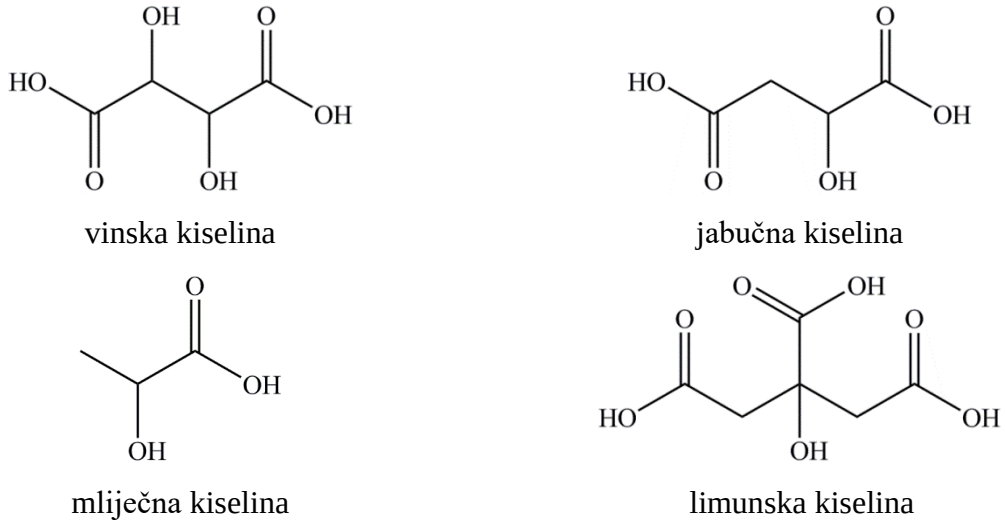
Valja napomenuti da udio tvari u vinu nije nužno povezan s doprinosom kvaliteti vina. Tvari koje su prisutne u niskim koncentracijama kao što fenoli, neophodne su za okus, aromu i boju vina što direktno utječe i na kvalitetu vina.

Hlapljive tvari u vinu pripadaju također i skupini alifatskih alkohola, etil – estera i acetata koji nastaju tijekom procesa fermentacije. Acetati vinu daju voćni okus, dok su etilni esteri masnih kiselina $C_4 – C_{10}$ zaslužni za voćni miris vina. Od ostalih tvari koji vinu daju aromu valja spomenuti C_6 – alkohole, kao što su 1-heksanol, te *cis*- i *trans*- 3-heksen-1-ol, 2-feniletanol i 2-feniletil-acetat. Koncentracija tih tvari u vinu ovisi o tehnološkoj obradi grožđa (temperatura fermentacije, udio dušika).[24]

Međutim, najvažnije tvari sadržane u vinu su fenoli, organske kiseline, ugljikohidrati, vitamini, minerali, spojevi dušika, te ostale tvari koje utječu na aromu vina (glikozidi, terpeni). U sljedećem dijelu teksta sažeto su opisani navedeni spojevi.

2.1.1. Organske kiseline

Grožđe i vino sadrže tri glavne organske kiseline: vinsku, jabučnu i limunsku. Od navedenih vinska se kiselina rijetko može naći u ostalim voćnim biljnim vrstama. Uz glavne kiseline, postoji nekoliko kiselina koje imaju važnu ulogu tijekom nastajanja vina: maslačna, mliječna, octena i jantarna. Jantarna kiselina nastaje metabolizmom kvasca i nalazi se u vinu, ali ne i u grožđu. Organske kiseline zaslužne su za kiselost te imaju ulogu pufera održavajući pH stabilnim pri vrijednostima između 3,2 i 3,3. Također utječu na boju, okus i aromu vina. Organske kiseline sadržane u vinu prikazane su na Slici 2.



Slika 2. Organske kiseline u vinu.

Vinska kiselina je najvažnija kiselina u procesu nastajanja vina, jer održava stabilnost vina te boju. U voćnim biljnim vrstama ova kiselina je izrazito rijetka, ali je u vinu ima u višim koncentracijama. Koncentracija vinske kiseline u vinu ovisi o sorti grožđa te o kemijskom sastavu tla. Vinska kiselina ne ulazi u metabolizam respiracije kao jabučna kiselina tako da njene koncentracije ostaju konzistentne tijekom procesa nastajanja vina.[25-27]

Jabučna kiselina pripada, uz vinsku kiselinu, vrlo važnim kiselinama koje se nalaze u grožđu i u vinu. Može se naći gotovo u svim voćnim biljnim vrstama, ali je najviše ima u zelenim jabukama. U procesu nastajanja vina zaslužna je za stabilnost vina te ulazi u metabolizam respiracije. Ulaskom u metabolizam njena masena koncentracija se u vinu naglo snižava do vrijednosti od 1 g L^{-1} do 9 g L^{-1} (u početku procesa nastajanja vina koncentracija je oko 20 g L^{-1}). Koncentracija jabučne kiseline u procesu nastajanja vina može se dalje

reducirati procesom zvanim „malolaktična fermentacija“. Uz prisustvo bakterije, jabučna se kiselina pretvara u mliječnu kiselinu čime se povisuje pH vrijednost vina.[25-27]

Mliječna kiselina često se povezuje s „mliječnom“ aromom vina. Najviše je se može naći u mliječnim proizvodima, posebice u jogurtu. U vinu nastaje „malolaktičnom fermentacijom“ uz prisustvo bakterija *Oenococcus genera, Pediococcus genera* i *Lactobacillus genera* koje pretvaraju šećer i jabučnu kiselinu u mliječnu kiselinu.[27]

Limunska kiselina se u najvišim koncentracijama nalazi u citrusnom voću, dok je u vinu ima u vrlo niskim koncentracijama (1/20 koncentracije vinske kiseline). U vino se dodaje u obliku komercijalno dostupnih dodataka radi postizanja kiselosti. Limunska kiselina dodaje se nakon završene alkoholne fermentacije, jer se tijekom alkoholne fermentacije pretvara u octenu kiselinu.[27]

2.1.2. Fenolni spojevi

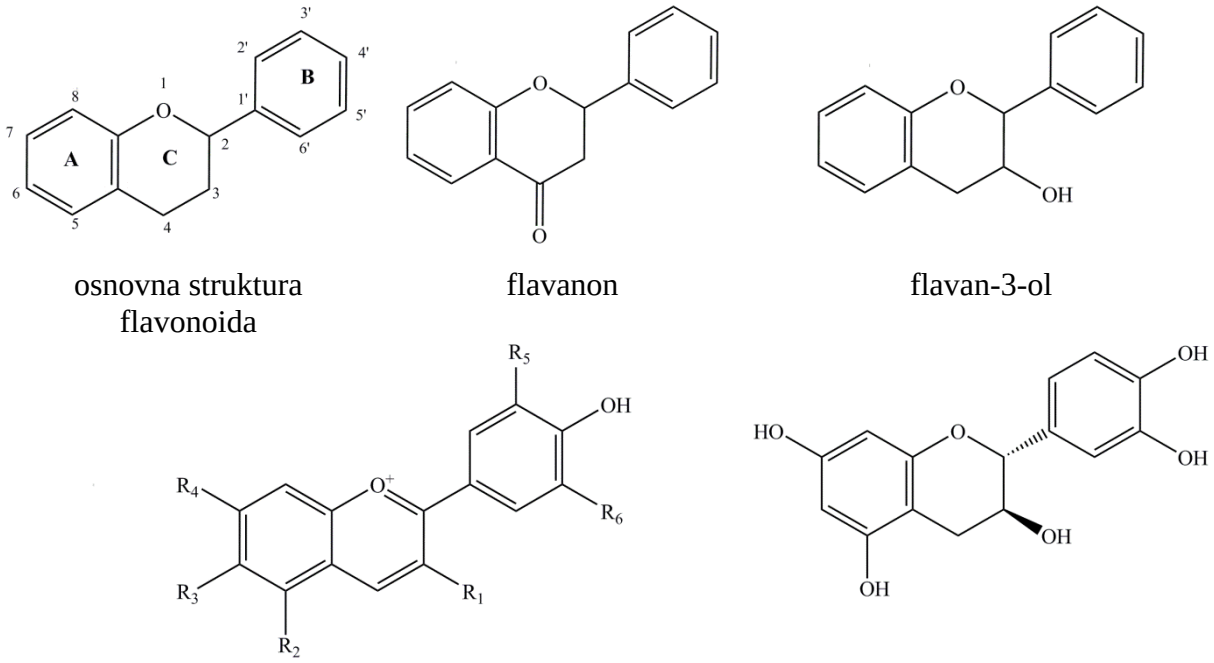
Fenolni i polifenolni spojevi skupina su kemijskih spojeva koji se nalaze u biljkama. To su organski spojevi koji nastaju spajanjem više jednostavnih fenolnih jedinica. Polifenolni spojevi zapravo su fenoli koji sadrže više od 12 fenolnih jedinica. Fenoli, jednostavniji spojevi (prirodni i sintetski), derivati su benzena u čijem prstenu je jedan ili više vodikovih atoma zamijenjen s OH skupinom. Sam fenol je najjednostavniji predstavnik te skupine. Mogu se naći u biljkama u obliku sekundarnih metabolita. Vanjski čimbenici kao što su mikrobiološke infekcije i ultraljubičasto zračenje induciraju njihovu sintezu. Biosinteza fenolnih spojeva u biljkama najčešće se odvija preko acikličkih međuprodukata koji nastaju u biosintetskom putu šikiminske i mliječne kiseline. Prekursor za njihovu biosintezu je fenilalanin. Mnogi prirodni fenoli ujedno su i kiralne molekule. Broj i kemijska struktura fenolnih jedinica u polifenolima karakterizira njihova fizikalna, kemijska i biološka svojstva. U biljkama su fenoli i polifenoli esterificirani ili su u obliku glikozida ili aglikona. Odlikuje ih velika reaktivnost. Lako se oksidiraju i reagiraju međusobno i/ili s drugim spojevima što se može vidjeti po pojavi smeđe boje u voću i povrću, hrani i piću. U posljednjih nekoliko godina fenolni i polifenolni spojevi postali su predmet istraživanja zbog njihovog pozitivnog učinka na ljudsko zdravlje iako je sam fenol, koji čini okosnicu polifenola, štetan za ljudsko zdravlje. Do sada je izolirano i opisano oko 8000 polifenolnih spojeva. Fenolni i polifenolni spojevi mogu se podijeliti u tri kategorije: *flavonoide, fenolne kiseline* i *stilbenoide*.[28] Većina do sada otkrivenih i izoliranih polifenolnih spojeva pripada skupini flavonoida.

Fenolni i polifenolni spojevi su grupa sekundarnih aromatskih metabolita biljke za koje se zna da posjeduju različita biološka djelovanja, između ostalog i antioksidacijsku aktivnost. Antioksidansi su molekule koje mogu donirati jedan elektron ili vodikov atom nekom reaktivnom radikalu. Imaju ulogu neutralizacije radikala i na taj način štite ljudski organizam od mogućih bolesti, ali i usporavaju kvarenje hrane bogate lipidima. Antioksidacijska svojstva fenolnih i polifenolnih spojeva služe u prevenciji mnogih bolesti među kojima valja napomenuti bolesti srca, koronarnih žila te upalne procese. Dosadašnja istraživanja su pokazala da su bolesti srca i koronarnih žila manje učestale u zemljama gdje se više konzumira crno vino.[29] Od svih fenolnih i polifenolnih spojeva, flavonoidi imaju ključnu ulogu za zdravlje ljudi i farmakološku aktivnost. Međutim, nađeni su i negativni primjeri djelovanja flavonoida, primjerice ovi spojevi inhibiraju hormon rasta auksin u biljkama.[30]

Polifenoli u vinima su od velike važnosti obzirom da značajno utječu na njihova organoleptička svojstva te na njihovu nutritivnu kvalitetu i ljekovitu učinkovitost. Crna vina najviše sadrže polifenole koji se nalaze u kožici i sjemenki (antocijanini, proantocijanini i flavonoli), za razliku od bijelih vina u kojima su više zastupljeni polifenoli iz pulpe (fenolne kiseline, manji udjeli katehina i stilbena). U crnom grožđu, kao i u crnom vinu fenolnih i polifenolnih spojeva je više nego u grožđu i vinu bijelih kultivara te je razumljiv i njihov utjecaj na kakvoću vina.

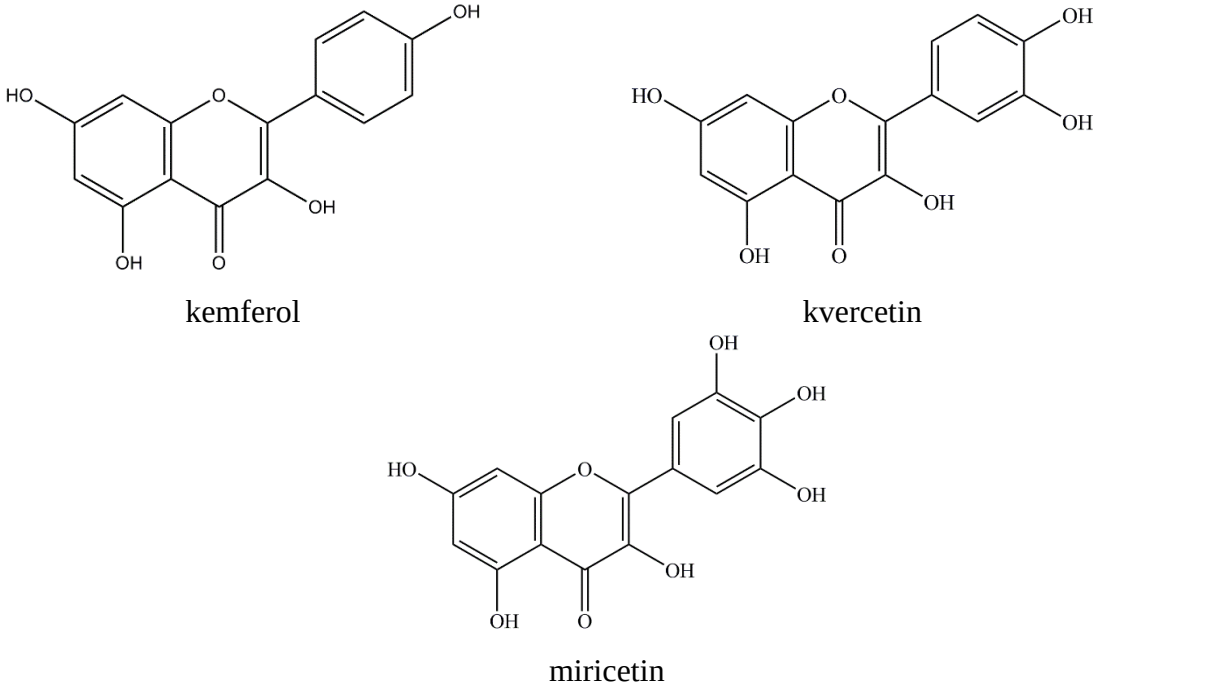
Flavonoidi su skupina polifenolnih spojeva koji se nalaze u mnogim biljkama, koncentrirani u sjemenkama, koži ili kori voća, kori drveća, lišću i cvijeću. Velik broj ljekovitih biljaka sadrži flavonoide koji imaju izraženu antioksidacijsku i antiradikalnu aktivnost. Zato se flavonoidima pripisuju i mnoga terapijska djelovanja, npr. antibakterijsko, protuupalno, antialergijsko, antimutageno, antiviralno i antikancerogeno, a znatno utječu na boju i okus hrane. Do danas je identificirano više od 6400 flavonoida. Osnovna se struktura sastoji od flavonskog kostura C_{15} ($C_6 – C_3 – C_6$), odnosno dva benzenska prstena (A i B) povezana piranskim prstenom (C) koji sadrži kisik. Flavonoidi se međusobno razlikuju prema stupnju oksidacije centralnog piranskog prstena, izuzev halkona kod kojih je piranski prsten otvoren. Prema topljivosti dijele se na lipofilne i hidrofilne flavonoide, a najčešće su prisutni u obliku O- i C- glikozida.

Osnovna struktura i primjeri flavonoida prikazani su na Slici 3.



Slika 3. Osnovna struktura i primjeri flavonoida.

Flavonoidi čine najveću skupinu polifenola u vinima (pogotovo crnim), a među njima valja izdvojiti flavonole. Flavonoli daju grožđu žutu boju. Predstavnici te skupine su kemferol, kvercetin i miricetin (Slika 4) te *O* – metilirani derivati (kvercetin-3'-metil-eter).[32]



Slika 4. Flavonoli u vinima.

Antocijani su drugi po važnosti od flavonoida prisutnih u vinima, koji su odgovorni za tamnu boju grožđa. Kako se udio šećera u vinu povećava, tako raste i koncentracija antocijanina. Vina s niskim pH imat će veći udio ioniziranih antocijanina koji će vinu dati svijetlocrvenu boju. Sa starenjem vina, antocijanini reagiraju s ostalim kiselinama i spojevima kao što su tanini, pirogrožđana kiselina i acetaldehid. Reakcije će rezultirati promjenom u boji vina. Polimeri nastali reakcijama kondenzacije s vremenom se talože na dnu boce što je vidljivo okom.

Tanini su polifenoli koji utječu na boju, stabilnost i teksturu vina. Vinu daju okus gorčine, koji nastaje zbog reakcije tanina s proteinima prisutnim u vinu. Tanini u grožđu poznati su kao proantocijanidini zbog mogućnosti da pod utjecajem povišene temperature u kiselom mediju oslobađaju antocijanin. Tanini nastaju metaboličkim putem. Sa starenjem vina tanini tvore polimerizirane lance koji uzrokuju blag i „nježan“ okus.

Katehini (flavan-3-oli) su flavanoidi koji pridonose okusu gorčine u vinima. Katehini imaju značajnu ulogu u mikrobiološkoj obrani vina. Zajedno s antocijaninima i taninima pridonose postojanosti boje vina.

Osim flavanoida, u vinu su značajni i drugi polifenoli kao što je *hidroksicimetna kiselina*. Hidroksicimetna kiselina je najzastupljeniji polifenol u vinima poslije flavanoida. Osim hidroksicimetne kiseline bitnu ulogu imaju i stilbenoidi od kojih je najznačajniji resveratrol. Crna vina sadrže oko 10 puta više resveratrola od bijelih vina. Resveratrol ima ulogu u obrani vina od bolesti slično kao i katehin. Od fenolnih kiselina u vinima, važno je spomenuti vanilinsku kiselinu koja daje vinu miris po vaniliji.

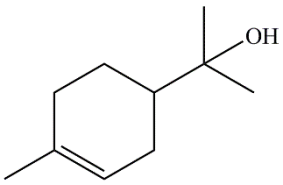
2.1.3. Hlapljivi spojevi

Hlapljivi spojevi u vinu zaslužni su za aromu vina. Do sada je identificirano preko 1000 hlapljivih spojeva koji su u vinima prisutni u izrazito niskim koncentracijama.

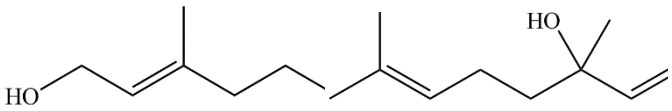
Terpeni su skupina organskih spojeva koji se mogu naći u mnogim biljkama, iako ih mogu proizvesti i neki insekti. Osnovna jedinica terpena je izopren $(C_5H_8)_n$ gdje je n broj povezanih izoprenskih jedinica. *Monoterpeni* (molekulska formula $C_{10}H_{16}$) se sastoje od dvije izoprenske jedinice te čine najvažniju skupinu hlapljivih spojeva u vinu čiji maseni udjel ne prelazi 4 mg kg^{-1}. Zajedno s terpenoidima primarni su sastojci esencijalnih ulja mnogih biljaka. U vinu su prisutni u slobodnom obliku ili u obliku glikozida. Glikozidi ne spadaju u skupinu hlapljivih spojeva te ne pridonose aromi vina. U kiselim se uvjetima postepeno

hidroliziraju, a s vremenom se pretvaraju u kompleksnije hlapljive spojeve kao što su 1,1,6-trimetil-1,2-dihidronaftalen (TDN) i vitispiran. Terpeni prisutni u vinu prikazani su na Slici 5.

monoterpeni

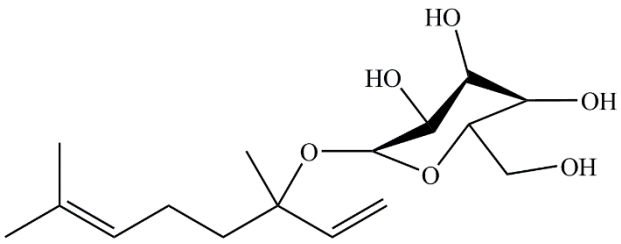


α-terpineol



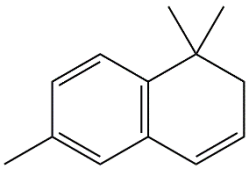
geraniol linalol

glikozidi

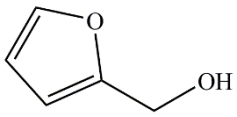


linalol – glikozid

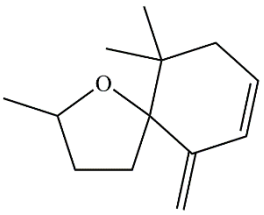
ostali hlapljivi spojevi



1,1,6-trimetil-1,2-dihidronaftalen (TDN)



furfuril – alkohol



vitispiran

Slika 5. Hlapljivi spojevi u vinima.

2.1.4. Spojevi dušika, vitamini i minerali

Spojevi dušika u vino dolaze iz različitih izvora (DNA, enzimi, anorganski dušik), uglavnom kao metabolički produkti razgradnje aminokiselina.[32] Spojevi dušika od iznimne su važnosti za rast i razvoj kvasca tijekom alkoholne fermentacije. Udio ovih spojeva utječe na kinetiku fermentacije pri čemu niske koncentracije uzrokuju prekidanje fermentacije.

Vitamini su u vinu prisutni u tragovima. Najzastupljeniji su inozitol, nikotinamid, pantotenat, piridoksin, riboflavin i kobalamin. Ni grožđe, niti vino, ne sadrže vitamin C.

Minerali u grožđe, a kasnije i u vino dolaze iz tla, a njihov sastav i udio varira ovisno o geografskom području. Općenito, udio minerala u vinu je do 0,4 %. Najvažniji minerali su magnezij i kalij, koji aktivno sudjeluju u alkoholnoj fermentaciji, te fosfat koji je potreban za razvoj kvasca.

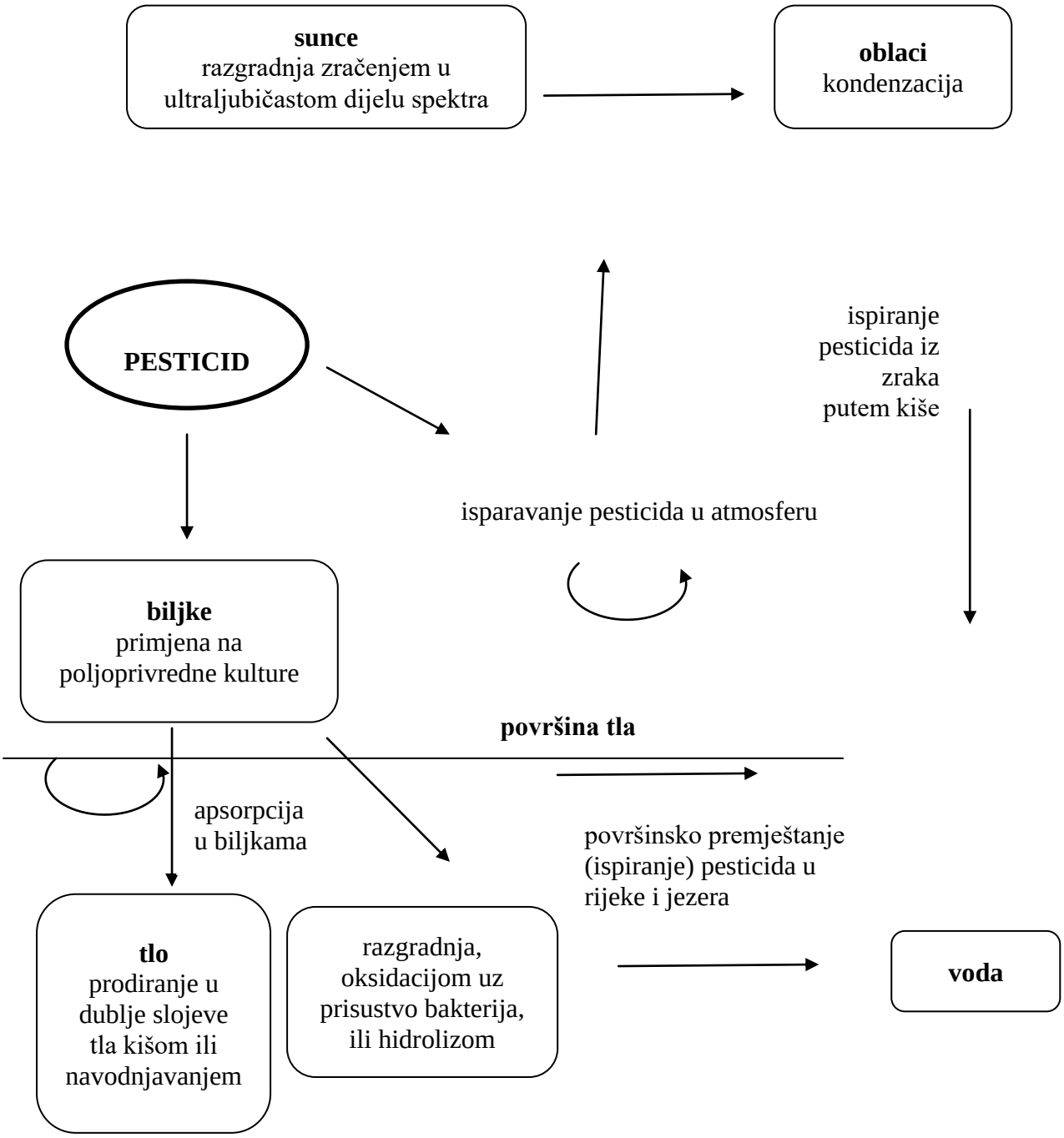
2.2. Pesticidi

Prema definiciji Organizacije za hranu i poljoprivredu Ujedinjenih naroda (FAO) pesticid je bilo koja tvar namijenjena za sprječavanje, kontrolu i suzbijanje štetnih organizama.

Upotreba pesticida postoji otkad čovjek obrađuje zemlju. Međutim, značajnija upotreba pesticida započinje u 19. stoljeću s uvođenjem visoko toksičnih kemikalija, spojeva arsena (kalcijev arsenat i olovov arsenat) te cijanida. Navedene kemikalije koristile su se za suzbijanje insekata, bakterija i gljivica. Poznata je i upotreba spojeva sumpora (bordoške smjese). Intenzivnija upotreba pesticida započinje u doba Drugog svjetskog rata s otkrićem diklordifeniltrikloretana poznatijeg kao DDT. Prvi ga je sintetizirao njemački znanstvenik Ziedler 1873. godine, dok je biološku aktivnost kao insekticida prvi otkrio švicarski kemičar Paul Müller 1939. godine. Prvotno je DDT bio hvaljen zbog svog širokog spektra djelovanja, perzistentnosti, netopljivosti u vodi, niske cijene i jednostavne primjene. Uz DDT sintetizirani su i drugi organoklorovi pesticidi sličnog spektra djelovanja kao što su aldrin, dieldrin, endrin i heksaklorbenzen. Šezdesetih godina 20. stoljeća prvi se put postavilo pitanje toksičnosti i sigurnosti primjene organoklorovih pesticida, posebice njihovog učinka na ljudsko zdravlje. Godine 1972. u SAD – u je upotreba DDT – a zabranjena, nakon čega je uslijedila zabrana ili ograničenje proizvodnje i primjene tog pesticida, kao i drugih organoklorovih pesticida sličnih karakteristika u mnogim, u prvome redu razvijenim, zemljama uključujući i Hrvatsku. Stockholmskom konvencijom o postojanim organskim zagađivalima usvojenom 2001. godine i ratificiranom 2004. godine propisani su uvjeti koje zemlje potpisnice moraju ispuniti kako bi se prestalo s proizvodnjom, uporabom, uvozom i izvozom postojanih organskih zagađivala, među kojima i organoklorovih pesticida, na globalnoj razini.[33]

Današnji oblik poljoprivredne proizvodnje gotovo je nemoguće zamisliti bez upotrebe pesticida. Njihova upotreba u zaštiti poljoprivrednih kultura ima mnogo prednosti kao što su povećanje količine i kvalitete proizvodnje, učinkovitosti i ekonomske isplativosti. Međutim, uz prednosti mnogo je i negativnih učinaka, posebice na okoliš. Upotreba pesticida rezultira njihovim zaostajanjem u hrani te onečišćenjem okoliša. Pesticidi mogu, ovisno o vrsti i primijenjenoj dozi, zaostajati u hrani i okolišu čak i po nekoliko mjeseci. Od trenutka kad dospiju u okoliš postaju sastavni dio ciklusa prirodne izmjene tvari (Slika 6) te se mogu detektirati ne samo u područjima gdje su korišteni već i daleko izvan njih. Raspodjela i interakcija pesticida u okolišu vrlo je složen proces koji ovisi o mnogo čimbenika kao što su fizikalno – kemijska svojstva spoja, kinetika njegove razgradnje te sklonost sorpciji u tlu.

Sorpcija, desorpcija i biorazgradnja neki su od važnijih procesa koji utječu na zaostajanje i raspodjelu pesticida u okolišu. Učinkovitost sorpcije ovisi o tipu pesticida i tla, udjelu vlage u tlu te o pH i kemijskom sastavu tla. Obzirom na njihovu sve veću opterećenost okoliša pesticidima, potrebno je zakonskim aktima regulirati i smanjiti prekomjernu i nepotrebnu upotrebu pesticida. Tako je u Europskoj uniji (EU) stavljanje pesticida na tržište regulirano Uredbom (EU) 1107/2009.[34]



Slika 6. Ciklus pesticida.

2.2.1. Kemijska klasifikacija pesticida

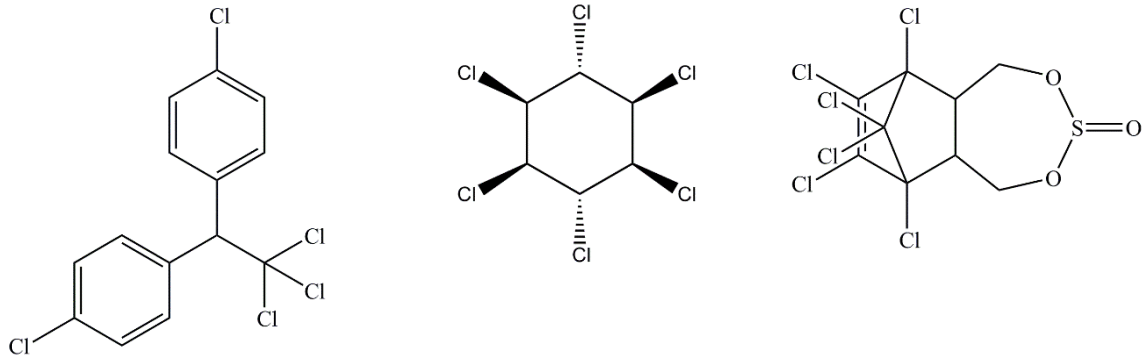
Pesticidi mogu biti organske i anorganske tvari, sintetske ili izolirane iz prirodnih izvora (bakterije, gljive, biljke). Razvrstavaju se u različite skupine ovisno o kemijskoj strukturi i fizikalno – kemijskim svojstvima. Općenito se klasificiraju u različite skupine ovisno o:

- načinu djelovanja (insekticidi, fungicidi, herbicidi...)
- vrsti štetnog organizma kojeg suzbija (akaricidi, botriticidi...)
- kemijskoj strukturi (organoklorovi, organofosforni, piretroidi..)

Obzirom na kemijsku strukturu pesticidi se razvrstavaju u različite kemijske skupine. Do sada je poznato oko 130 različitih kemijskih skupina pesticida u koje je razvrstano oko 1000 aktivnih tvari.[35] Pesticidi u svojoj kemijskoj strukturi često sadrže heteroatome od kojih valja spomenuti atome halogenih elemenata, fosfor, dušik i sumpor. U praksi se pesticidi najčešće svrstavaju u skupine obzirom na heteroatom kojeg sadrže u svojoj strukturi, npr.:

- organoklorovi spojevi
- organofosforni spojevi
- piretroidi
- karbamati i piretrini itd.

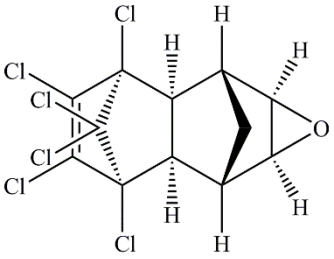
Organoklorovi pesticidi su organski spojevi sa 5 ili više atoma klora. To su bili prvi sintetski organski pesticidi čija je upotreba u većini razvijenih zemalja zabranjena sedamdesetih godina 20. stoljeća zbog utvrđenih toksičnih svojstava i perzistentnosti u okolišu. Koristili su se najviše za suzbijanje različitih vrsta insekata. Otporni su na kemijsku i mikrobiološku razgradnju te se mogu naći u proizvodima biljnog i životinjskog podrijetla vrlo dugo (godinama) nakon primjene. Imaju izražen lipofilni karakter te se najčešće akumuliraju u ljudskom organizmu u masnom tkivu. Zbog svog lipofilnog karaktera može ih se naći u masnoj hrani, ribi i mliječnim proizvodima. Njihova upotreba još uvijek nije regulirana, niti zabranjena u Africi gdje se koriste najčešće kao insekticidi i za suzbijanje malarije. Neki od važnih predstavnika ove skupine su 4,4'-DDT, γ-heksaklorcikloheksan (lindan), endosulfan, aldrin, i dieldrin čije su strukture prikazane na Slici 7.



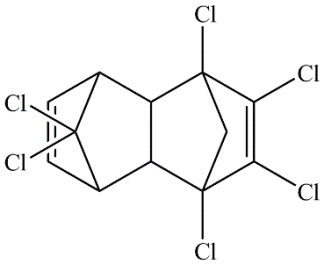
4,4'-DDT

γ-heksaklorcikloheksan (lindan)

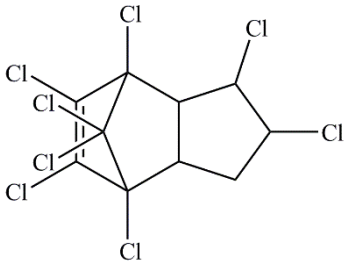
endosulfan



dieldrin



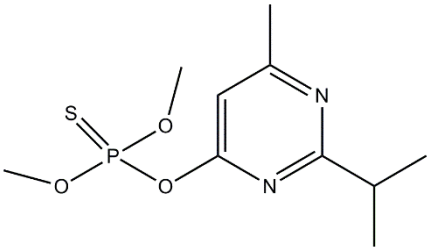
aldrin



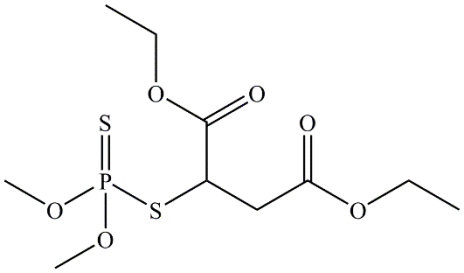
klordan

Slika 7. Strukture nekih oganoklorovih pesticida.

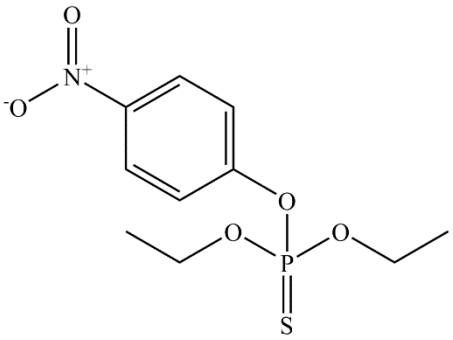
Organofosforni pesticidi su organski spojevi koji su po svojoj strukturi najčešće triesteri fosforne, tiofosforne i ditiofosforne kiseline (Slika 8). U skupinu organofosfornih pesticida ubrajaju se i fosforamidotioati poput acefata te glifosat koji je po svojoj strukturi fosfonat. Za razliku od organoklorovih pesticida, organofosforni pesticidi se lako razgrađuju u okolišu u različitim kemijskim i biokemijskim procesima te prema tome nisu perzistentni. Najčešće se koriste za suzbijanje insekata, a neki, npr. glifosat, za suzbijanje korova. Kao i u okolišu, u organizmu se također brzo razgrađuju na dialkilfosforne metabolite, dok je glavni razgradni produkt glifosata aminometilfosfonska kiselina. Strukture nekoliko organofosfornih pesticida prikazane su na Slici 8.



diazinon



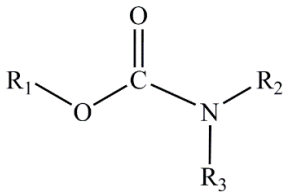
malation



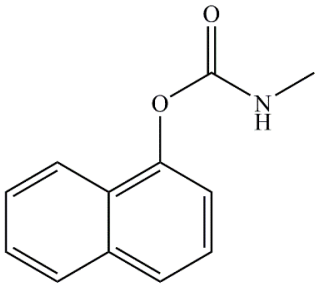
paration

Slika 8. Strukture nekih organofosfornih pesticida.

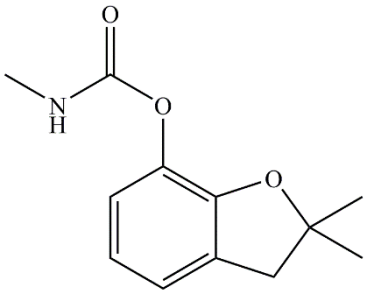
Karbamati su organski spojevi, izvedeni iz karbaminske kiseline strukturne formule prikazane na Slici 9.



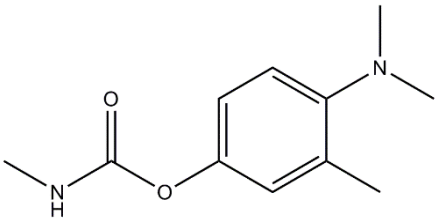
osnovna struktura



karbaril



karbofuran

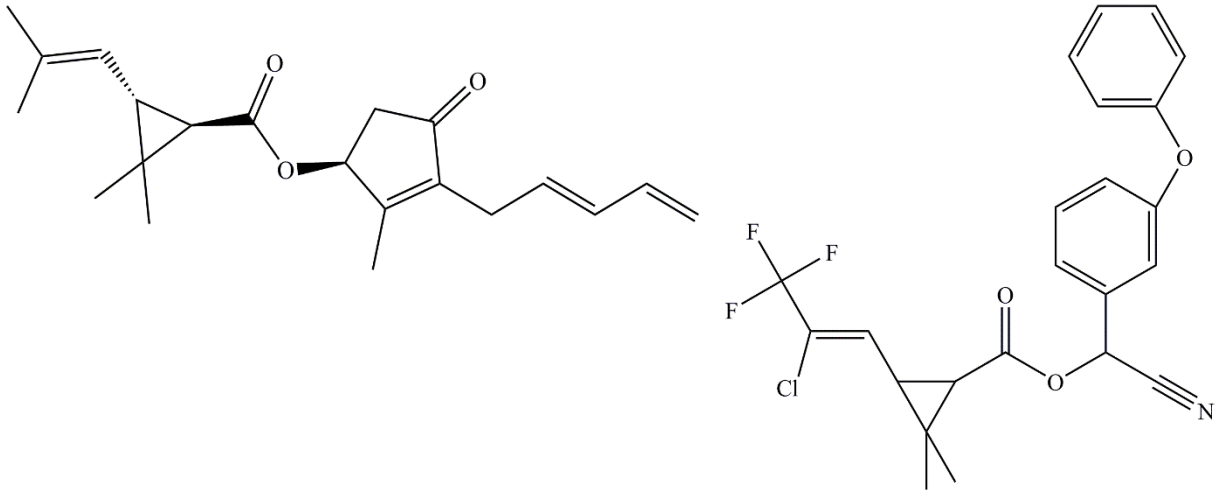


aminokarb

Slika 9. Strukture nekih karbamatnih pesticida.

R_1 je skupina specifična za pojedini spoj, R_2 je metilna grupa, a R_3 je obično vodikov atom. Najčešće se koriste kao insekticidi sličnog spektra djelovanja kao organofosforni pesticidi. Karbamati se također kao i organofosforni pesticidi u okolišu lako razgrađuju te nisu perzistentni. Predstavnici ove skupine su karbaril, karbofuran i aminokarb (Slika 9).

Piretroidi su sintetski analozi piretrina, prirodnih spojeva izoliranih iz biljke *Chrysanthemum cinerariaefolium*. Insekticidnu aktivnost piretrina imaju optički aktivni esteri pripravljeni iz (+)-*trans*-krizantemske kiseline i (+)-*trans*-piretrinske kiseline. Prirodni piretrini su učinkoviti insekticidi, međutim izrazito su fotosenzibilni te se razgrađuju toliko brzo da je njihova primjenjivost kao insekticida upitna. Piretroidi, sintetski analozi piretrina, uspješno su zamijenili piretrine kao insekticide. Struktura piretroida slična je piretrinskoj uz dodatak bifenoksi skupine te zamjenu nekoliko vodikovih atoma s atomima halogena da bi se postigla bolja stabilnost uz istodobno očuvanje osnovnih svojstava piretrina (Slika 10). Predstavnici ove skupine su lambda – cihalotrin (Slika 10), deltametrin i cipermetrin.



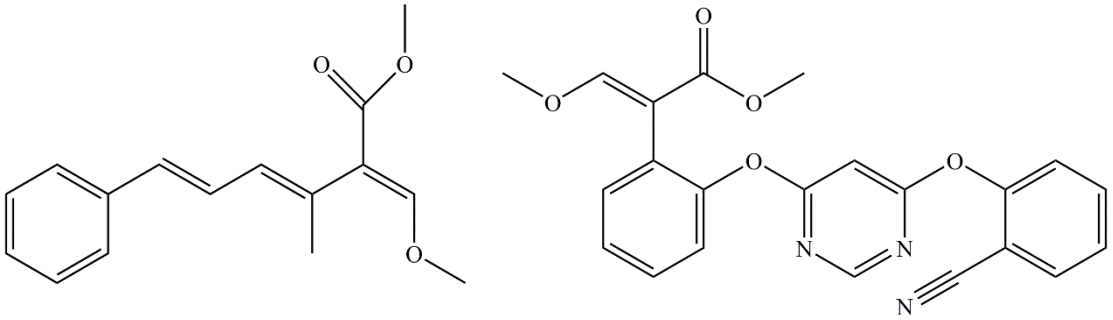
piretrin lambda – cihalotrin

Slika 10. Strukture piretrina i piretroida lambda – cihalotrin.

Ostala kemijska klasifikacija pesticida obuhvaća relativno nove vrste pesticida iz skupina fungicida, herbicida, insekticida, regulatora rasta itd. Zajednička karakteristika novijih vrsta pesticida su manja toksičnost, brza razgradivost i visoka učinkovitost.

Strobilurinski pesticidi pripadaju novijoj skupini fungicida. Kao i kod piretroida, strobilurinski pesticidi sintetski su analozi prirodnog spoja strobilurina A (Slika 11) koji je izoliran iz gljivice *Strobilurus tenacellus*. Strobilurin A spada u skupinu prirodnih organskih spojeva β – metoksiakrilata koji su pokazali učinkovitu pesticidnu aktivnost. S druge strane,

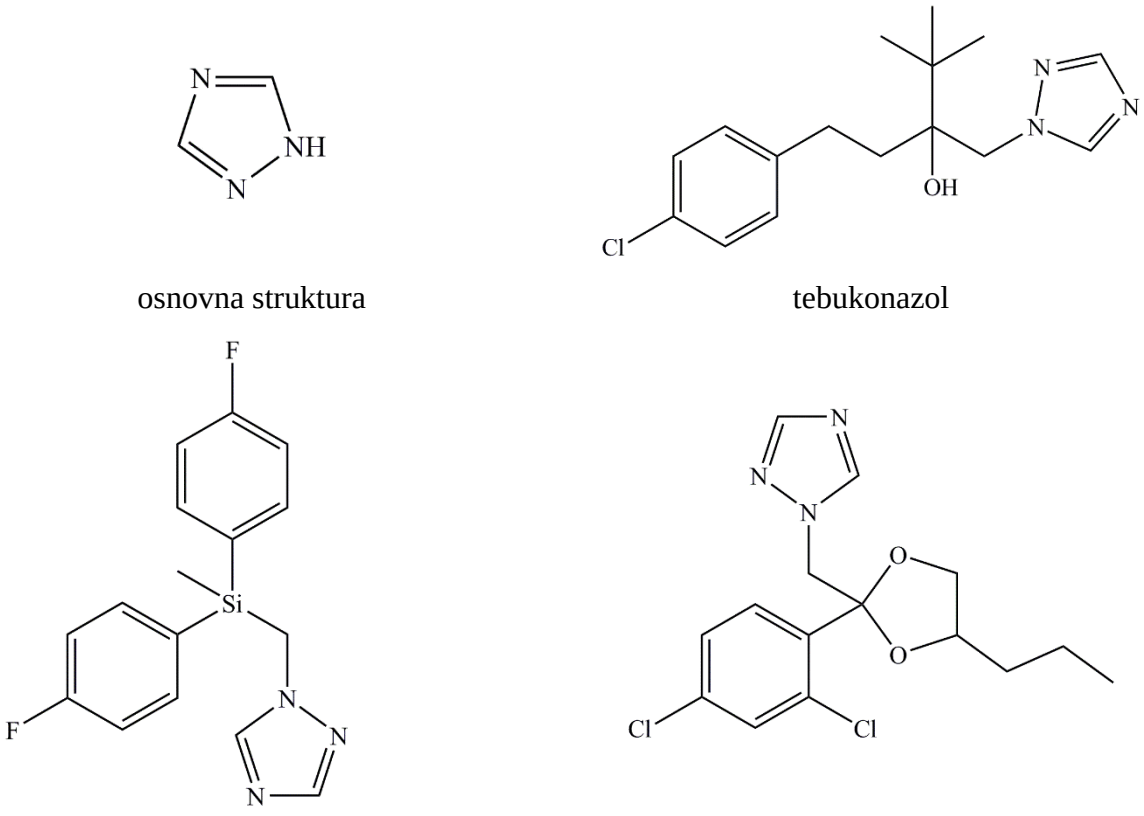
njihova fizikalno – kemijska svojstva te ponašanje u okolišu još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni. Prvi sintetizirani strobilurinski pesticid bio je azoksistrobin (Slika 11). Predstavnici ove skupine su uz azoksitrobin, triflokstrobin, piraklostrobin, krezoksim – metil.



strobilurin A azoksistrobin

Slika 11. Strukture strobilurinskih pesticida.

Triazolni pesticidi čine najveću skupinu fungicida. Predstavnici ove skupine tebukonazol, propikonazol i flusilazol prikazani su na Slici 12.



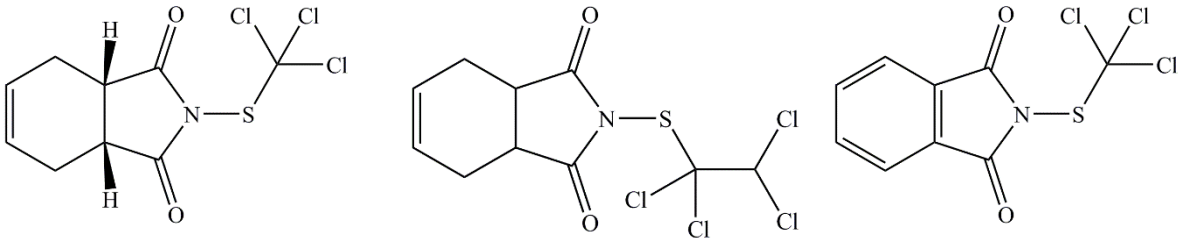
osnovna struktura tebukonazol

flusilazol propikonazol

Slika 12. Strukture triazolnih pesticida.

Osnovna kemijska struktura sastoji se 1,2,4-triazolne heterocikličke skupine, a modifikacije uključuju dodatak fenila na kojeg je vezan jedan ili više atoma klora ili nekog drugog halogenog atoma. Do sada je sintetizirano oko 40 triazolnih pesticida. Prvi sintetizirani triazolni pesticid je triadimefon.

Ftalimidi su jedna od najstarijih skupina fungicida. U svojoj kemijskoj strukturi sadrže tiolnu skupinu koja se veže na imidni prsten osnovne kemijske strukture. Vezivanjem tiolne skupine na imidni prsten dolazi do fungicidalne aktivnosti. Predstavnici ove skupine su kaptan, kaptafol, folpet (Slika 13).



kaptan kaptafol folpet

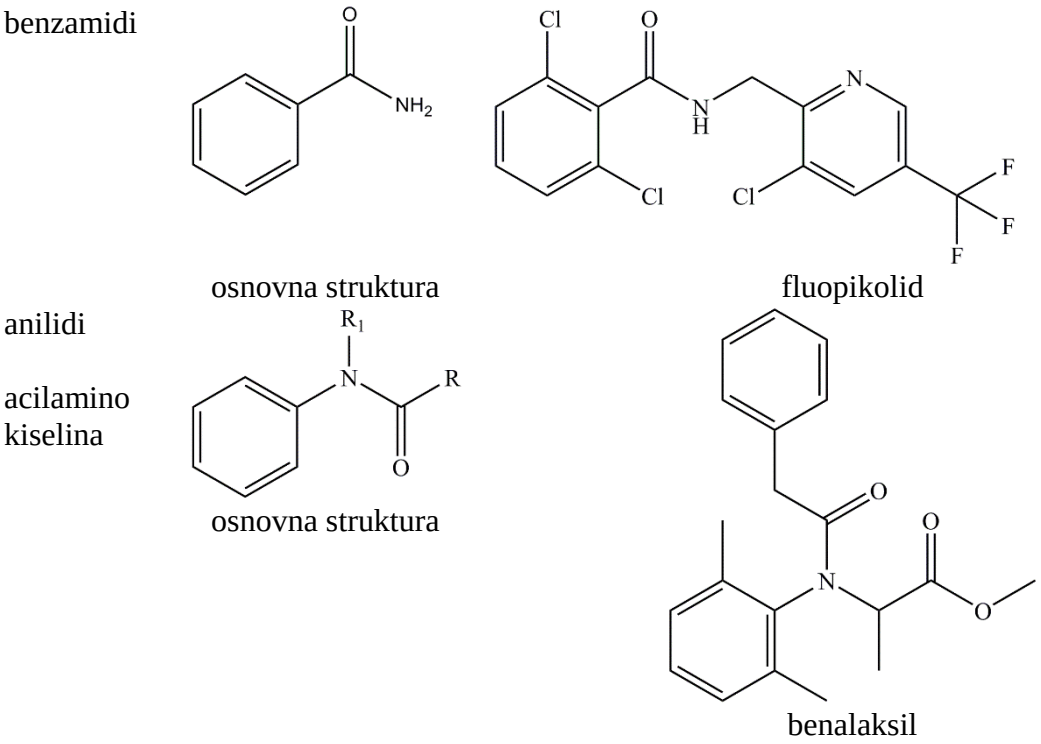
Slika 13. Strukture nekih ftalimida.

Benzamidi su relativno mala skupina fungicida čiji su predstavnici zoksamid, fluopikolid i fluopiram. Osnovna kemijska struktura se sastoji od benzamida koji je izveden iz benzojeve kiseline. Modifikacije osnovne benzamidske strukture uključuju supstituciju vodikovog atoma aminske skupine s različitim funkcionalnim skupinama. Primjer benzamida prikazan je na Slici 14.

Osnovna kemijska struktura *anilida* je aromatski amid pripravljen reakcijom acilacije anilina (Slika 14). Supstituenti R_1 i R_2 su različite funkcionalne skupine čime se ostvaruje varijabilnost fungicidnog djelovanja unutar ove skupine pesticida. Puno pripadnika ove skupine ujedno su i dio skupine pesticida *acilaminokiselina*.

Od ostalih skupina pesticida valja spomenuti *neonikotinske insekticide*, te *fenilpirolne* i *aromatske fungicide* sa širokim spektrom djelovanja. Prvi sintetizirani *neonikotinski* insekticid bio je imidakloprid. Obzirom da se radi o relativno novim spojevima, njihova svojstva još nisu do kraja istražena. Prema novijim istraživanjima pokazalo se da su neonikotinski insekticidi izrazito štetni za ljudsko zdravlje.[36] *Fenilpiroli* su mala skupina fungicida čiji su predstavnici fenpiklonil i fludioksonil. *Aromatski fungicidi* čine široku skupinu fungicida

visoke toksičnosti i velike otpornosti na razgradnju. Predstavnici ove skupine su klortalonil, bifenil, heksaklorbenzen, dikloran.



Slika 14. Struktura fungicida iz skupine benzamida i anilida (acilaminokiselina).

U ovom su radu sažeto prikazane samo neke od velikog broja (130) kemijskih skupina pesticida. Važno je napomenuti da postoji i velik broj pesticida koji obzirom na kemijsku strukturu nisu klasificirani niti u jednu skupinu.

Pesticidi istraživani u ovom radu većim dijelom pripadaju skupini fungicida, a manji broj pripada skupini insekticida (Tablica 2). Obzirom na kemijsku klasifikaciju obuhvaćeno je ukupno 12 kemijskih skupina pesticida od kojih najveće skupine čine triazoli (5 fungicida), strobilurini (4 fungicida) i anilidi, acilaminokiseline i anilinopirimidini (4 fungicida), piretroidi (3 insekticida) i benzamidi (2 fungicida). Uz ove pesticide, istraživanjem su obuhvaćeni jedan neonikotinski insekticid i jedan akaricid iz skupine tetronskih kiselina, zatim po jedan fungicid iz skupine ftalimida, fenilpirola, dikarboksiimida, aromatskih fungicida te spiroksamin kao jedini predstavnik neklasificiranih fungicida.

Tablica 2. Pesticidi istraživani u ovom radu.

Kemijska skupina pesticida	Pesticid
fungicidi iz skupine anilida, acilaminokiselina i anilinopirimidina	benalaksil
	boskalid
	metalaksil
	pirimetanil
aromatski fungicidi	klortalonil
benzamidni fungicidi	fluopikolid
	zoksamid
dikarboksiimidni fungicidi	iprodion
fenilpirolni fungicidi	fludioksonil
ftalimidi	kaptan
neonikotinski insekticid	tiametoksam
neklasificirani fungicidi	spiroksamin
piretroidni insekticidi	lambda – cihalotrin
	deltametrin
	alfa – cipermetrin
strobilurinski fungicidi	azoksistrobin
	krezoksim – metil
	piraklostrobin
	trifloksistrobin
akaricid iz skupine tetronskih kiselina	spirodiklofen
triazolski fungicidi	flusilazol
	flukinkonazol
	miklobutanil
	propikonazol
	tebukonazol

2.2.2. Fizikalno – kemijska svojstva pesticida

Biološka aktivnost pesticida ovisi najviše o njihovim fizikalno – kemijskim svojstvima. Ona određuju način djelovanja pesticida, dozu, način primjene te termodinamiku u okolišu.

Fizikalna svojstva pesticida ovise o kemijskoj prirodi pesticida. Najvažnija fizikalna svojstva pesticida koja direktno utječu na ponašanje pesticida u okolišu su tlak para, topljivost u vodi, hidrofobnost koja se izražava koeficijentom razdjeljenja u sustavu oktanol – voda, koeficijenti sorpcije u tlu i Henrijeva konstanta.

Kemijska svojstva pesticida također određuju ponašanje pesticida u okolišu. Pesticidi u okolišu podliježu nizu kompleksnih procesa koji se nazivaju kemodinamika pesticida. Kemodinamika pesticida ovisi o fizikalno – kemijskim svojstvima pesticida te o uvjetima okoliša kao što su pH, temperatura, vlažnost, salinitet, topografija, jačina svjetlosti te mokro i

suho taloženje.[37,38] Najvažniji kemodinamički procesi koji utječu na sudbinu pesticida u okolišu su njihov prijenos i zadržavanje, razgradnja u različitim dijelovima okoliša, sorpcija i desorpcija. Razgradnja pesticida je najutjecajnija obzirom da uključuje kemijske transformacije pesticida što mijenja njihova kemijska svojstva. Razgradnjom pesticida nastaju molekule koje nisu nužno jednostavnije strukture ili manje toksične u odnosu na molekulu izvornog pesticida. Vrlo često razgradnjom nastaju novi pesticidi ili još toksičnije tvari. Postojanost tj. brzina razgradnje pesticida mjeri se veličinom koja se naziva vrijeme poluživota, a definira se kao vrijeme potrebno da se razgradi 50 % početne količine pesticida.

Fizikalno – kemijska svojstva pesticida istraživanih u ovom radu prikazana su u PRILOGU I.

2.2.3. Istraživanja pesticida u vinu

Porastom proizvodnje i upotrebe pesticida porastao je i znanstveni interes za njihovo istraživanje u različitim područjima znanosti i tehnologije. Obzirom na utvrđenu postojanost pesticida, otpornost na kemikalije i razgradnju, a posebice na njihovu toksičnost, težište istraživanja u novije je vrijeme prvenstveno na određivanju pesticida u okolišu i proizvodima biljnog i životinjskog podrijetla. Zbog učestale upotrebe različitih pesticida često je potrebno istovremeno analizirati što je više moguće pesticidnih spojeva tzv. multirezidualnim analitičkim metodama. Međutim, široki raspon fizikalno – kemijskih svojstava pesticida te različite kemijske skupine kojima pripadaju ograničavaju takvu vrstu analize.

Određivanje ostataka pesticida u hrani jedno je od najvažnijih područja istraživanja u području pesticida te je dostupan veliki broj literaturnih podataka uključujući i podatke o ostacima pesticida u grožđu.[39-48] U zemljama EU uspostavljeni su mehanizmi sustavnog praćenja ostataka pesticida u hrani radi utvrđivanja njihovih koncentracija i usporedbe sa zakonom reguliranim maksimalno dopuštenim masenim udjelima (MDK) u pojedinom proizvodu. Na temelju rezultata analize procjenjuje se rizik obzirom da su pesticidi toksični i opasni za ljudsko zdravlje.[49-51]

Obzirom da vino nastaje tehnološkom obradom grožđa, pretpostavlja se da će se tim procesom ukloniti pesticidi zaostali u grožđu te da će koncentracije pesticida u vinu biti niže od granica detekcije ili u tragovima. Međutim, u novije vrijeme određeni su u vinima ostaci pesticida u znatno višim koncentracijama od očekivanih što je potaklo intenzivnija istraživanja radi utvrđivanja maksimalno dopuštenih masenih udjela pesticida u vinima.[9–

[11,14,52–54] Naime, većina postojećih zakonskih propisa ne propisuje vrijednosti MDK za pesticide u vinima. Tako su u EU utvrđene vrijednosti MDK za pesticide u grožđu, dok se vino klasificira kao tehnološki obrađena hrana pa se dopušta primjena MDK za grožđe. Pojedine zemlje, posebice zemlje Mediterana, na temelju znanstvenih istraživanja postupno uvode MDK za pesticide u vinu na nacionalnoj razini.

Osim u proizvodima biljnog i životinjskog podrijetla, ostaci pesticida se intenzivno istražuju i u uzorcima iz okoliša, primjerice u tlu[55–57] i vodi[58–60]. Istovremeno, istražuju se i različiti uvjeti, procesi i mehanizmi koji utječu na ponašanje pesticida u okolišu kao što su kinetika razgradnje[61–64], mobilnost pesticida u tlu [65–67] te klimatski uvjeti.[68,69]

2.2.4. Analitičke metode za određivanje pesticida u vinu

S novim saznanjima o toksičnosti i ponašanju pesticida u okolišu, maksimalno dozvoljene masene koncentracije ili dozvoljeni maseni udjeli u različitim tipovima uzoraka pomiču se prema sve nižim vrijednostima što zahtijeva visoku osjetljivost i pouzdanost analitičkih metoda. Osnovni zahtjev koji mora zadovoljiti svaka analitička metoda za određivanje ostataka pesticida je točno i precizno određivanje niskih koncentracija pesticida različitih svojstava uz što niže granice detekcije.[70] Analize koje uključuju praćenje jednog pesticida ili samo nekoliko njih, više ne zadovoljavaju zahtjeve prizvođača, nadležnih institucija, industrije i potrošača. U novije vrijeme intenzivno se razvijaju tzv. multirezidualne metode koje omogućuju istovremenu analizu velikog broja pesticida. Koje će vrste i koliki broj pesticida biti moguće analizirati multirezidualnom metodom najviše ovisi o svojstvima analita. Širok raspon fizikalno – kemijskih svojstava pesticida predstavlja najveći problem u takvim analizama obzirom da je vrlo teško postići zadovoljavajuće uvjete za istovremenu analizu svih željenih pesticida. Uz fizikalno – kemijska svojstva na učinkovitost cjelokupne analitičke metode uvelike utječe i matrica uzorka iz koje je potrebno ekstrahirati pesticide. Uzimajući u obzir navedene čimbenike, analitičke metode postaju izuzetno zahtjevne, bilo da se primjenjuju u okviru znanstvenih istraživanja ili rutinskih analiza.

Analitičke metode trebale bi zadovoljiti sljedeće zahtjeve:

- osigurati brzu analizu i što kraće vrijeme između sakupljanja i analize uzoraka
- biti što jednostavnije kako bi ih mogao obavljati što veći broj osoba u laboratoriju
- biti ekonomične, koristiti što manje kemikalija i aparatura
- osigurati visok stupanj automatizacije s ciljem smanjivanja pogrešaka

- biti izvodljive s malim količinama otapala i reagensa kako bi se smanjio ukupni otpad.

Cjelokupna analitička metoda za određivanje ostataka pesticida u različitim uzorcima okoliša i biološkim uzorcima obuhvaća tri glavna koraka: uzorkovanje, pripravu uzorka za analizu (ekstrakcija pesticida iz matrice uzorka) te instrumentnu analizu. Svaki je korak bitan kako bi se izbjegli gubici pesticida iz matrice uzorka. Uz poznavanje rada na instrumentu i stručnost koju analitičar mora posjedovati za uspješno provođenje analize, jedan od najzahtjevnijih dijelova analitičke metode je priprava uzorka.

2.2.4.1. Postupci priprave uzorka za analizu pesticida u vinu

Analiza tragova pesticida u složenim matricama uzoraka zahtijeva opsežnu pripravu uzorka. Priprava uzorka obično obuhvaća nekoliko koraka kao što su homogenizacija, ekstrakcija, pročišćavanje ekstrakta i koncentriranje. Pojedini postupci uključuju još i derivatizaciju analita. Postupci priprave uzorka ovise o analitu/pesticidu i o matrici uzorka. Analize pesticida često su otežane značajnim udjelom drugih spojeva (interferencija) prisutnih u matrici uzorka. Uvjet koji je zajednički svim postupcima priprave uzorka je odabir odgovarajuće količine uzorka potrebne za analizu što ovisi o vrsti matrice uzorka, svojstvima analiziranih pesticida te njihovim očekivanim koncentracijama.[71] Za analize uzoraka u kojima se očekuju više koncentracije pesticida, potrebna je manja količina uzorka. S druge strane, pri analizi tragova pesticida, posebice ako je njihova koncentracija u uzorku blizu granice detekcije, potrebne su veće količine uzorka kako bi se postigli zadovoljavajući rezultati. Međutim, veća količina uzorka zahtijeva i dodatna pročišćavanja te dulje vrijeme priprave što smanjuje točnost i preciznost analize. Uz navedeno, vrlo bitan korak u svim postupcima priprave uzorka je optimizacija. Optimizacijom priprave uzorka smanjuju se pogreške što je od izuzetne važnosti kod određivanja niskih koncentracija pesticida. Kako bi se smanjila varijabilnost analitičkih rezultata, odnosno mjerna nesigurnost koja ovisi o svakom koraku analitičkog postupka, bitno je reducirati broj koraka obuhvaćenih analizom. Tako se odabirom i optimizacijom odgovarajućeg postupka priprave uzorka (ekstrakcije) može smanjiti broj potrebnih koraka te istodobno maksimalno ukloniti interferencije koje često koeluiraju zajedno s analitom/pesticidom. S razvojem i porastom broja instrumentnih analiza, posebice detekcijskih tehnika, razvijeni su i automatizirani postupci priprave uzorka koji omogućuju direktnu i učinkovitu analizu pesticida u tragovima. Unatoč tome, priprava uzorka je i dalje ključan dio analize pesticida, posebice u složenijim matricama.

Do danas je razvijen veliki broj postupaka priprave uzorka za analizu pesticida u različitim matricama. Međutim, ovisno o broju i svojstvima pesticida te o matrici uzorka, često se postupci priprave uzorka kombiniraju ili prema potrebi modificiraju. Veliki je izazov razviti jedinstveni postupak priprave uzorka koji bi obzirom na razlike u kemijskoj prirodi pesticida i matrice uzorka zadovoljio sve zahtjeve analize.

Ekstrakcija otapalom (LLE) jedan je od najstarijih postupaka priprave uzorka koji se još uvijek koristi, zbog svoje jednostavnosti, prvenstveno u rutinskim analizama. Namijenjen je za ekstrakciju analita iz tekućih uzoraka, dok se čvrsti uzorci prvo moraju homogenizirati, odnosno prevesti u tekući oblik. Osnovni princip je raspodjela analita između dviju faza koje se ne miješaju, ovisno o topljivosti analita. Jedna je faza vodena, dok je druga faza organska (organska otapala). Odabir organskog otapala za ekstrakciju ovisi o polarnosti pesticida. Najčešće se koriste etil – acetat, acetonitril, metanol i *n* – heksan. U uporabi su često i smjese otapala.[72,73] Tako je acetonitril pogodno otapalo za ekstrakciju pesticida širokog raspona polarnosti, dok je *n* – heksan izbor za ekstrakciju nepolarnih spojeva. Veliki nedostatak ovog načina priprave uzorka je što nije prikladan za ekstrakciju polarnijih pesticida iz vodenih matrica te se u pripravu uzorka mora uvesti dodatni korak poput ekstrakcije na čvrstoj fazi (SPE).[73] Također, ovim postupkom troši se velika količina toksičnih otapala što zahtijeva njihovo zbrinjavanje te poskupljuje cjelokupni analitički postupak. Unatoč navedenom, ekstrakcija otapalom još se koristi pri analizama ostataka pesticida u uzorcima grožđa[74,75] i vina[76-78]. U novije vrijeme, ekstrakcija otapalom zamijenjena je s drugim postupcima priprave uzorka gdje je bitno smanjena upotreba toksičnih otapala te se time postiže ekonomičnost i održivost postupka. Jedan od takvih postupaka je i QuEChERS.

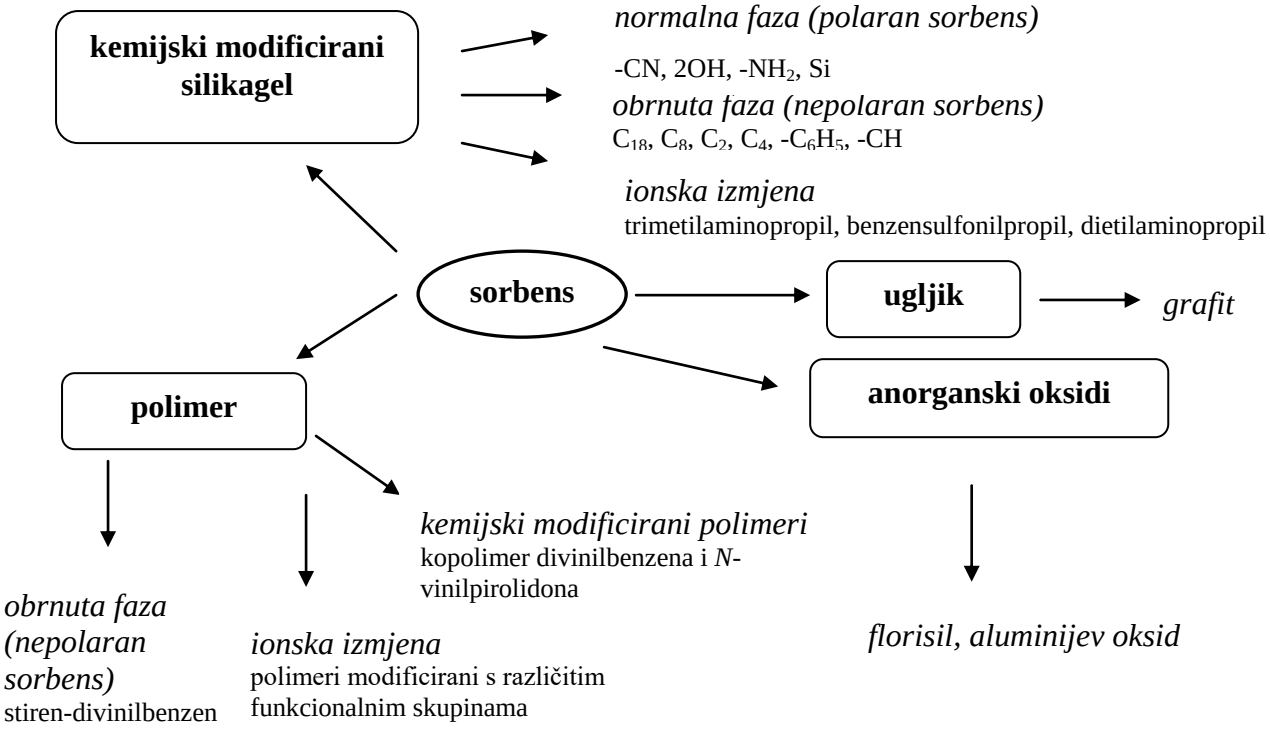
Mikroekstrakcija tekućom fazom (LPME) relativno je novi postupak ekstrakcije nastao s ciljem smanjivanja količine organskih otapala. Postupak je vrlo sličan LLE, pri čemu dolazi do uspostavljanja ravnoteže analita između vodene faze i vrlo male količine organskog otapala. Velika prednost LPME ekstrakcije je što se koncentriranje i prijenos analita iz uzorka u kromatograf izvode u jednom koraku. Vrlo je popularna mikroekstrakcija na kapi (SDME). Postupak se temelji na suspenziji jedne kapi otapala koje se zatim uvodi u otopinu uzorka. Iako je sam postupak jednostavan, ekonomičan i brz, za izvođenje je potrebna spretnost. Najveću prepreku predstavlja zadržavanje kapi na vrhu igle tijekom čitavog postupka. Sve veću primjenu nalazi i mikroekstrakcija raspršenjem tekuće faze (DLLME). Smjesa otapala i otapalo za raspršenje uvode se u vodenu otopinu uzorka. Smjesa se centrifugira, pri čemu se

mikroekstrakti sedimentiraju na dnu. Nedostatak LPME ekstrakcije je ograničena primjenjivost. Postupak ekstrakcije je primjenjiv prvenstveno na tekuće uzorke, odnosno na uzorke vode gdje matrica uzorka nije toliko izražena kao u uzorcima hrane i okoliša. U novije vrijeme sve se više istražuje DLLME i SDME pri analizama ostataka pesticida u uzorcima vina.[78-85]

Ekstrakcija na čvrstoj fazi (eng. *Solid Phase Extraction*, SPE) jedan je od najčešćih postupaka priprave uzoraka za analizu pesticida iz uzoraka hrane i okoliša.[86-91] Međutim, za ekstrakciju na čvrstoj fazi uzorak mora biti u tekućem obliku. SPE se često koristi kao samostalni postupak ekstrakcije ili u kombinaciji s dodatnim postupkom pročišćavanja ekstrakta. Također, u novije je vrijeme postupak SPE automatiziran pri čemu se može direktno povezati s kromatografskim sustavima. Povezivanje s plinskom kromatografijom je ograničeno jer je često analit prije plinskokromatografske analize potrebno derivatizirati te se SPE češće koristi kao samostalni dio analitičkog postupka. Povezivanje s instrumentnim tehnikama uvelike je poboljšalo osjetljivost i selektivnost analitičkih metoda te omogućilo visoku ponovljivost rezultata. Postupak SPE karakterizira brzina, jednostavnost, smanjena upotreba otapala, visoka ponovljivost te mogućnost određivanja niskih koncentracija analita. Ekstrakcijom na čvrstoj fazi uzorak se propušta kroz kolonu u kojoj se nalazi određena masa čvrstog sorbensa na kojem se sorbira analit. Sorbirani analit eluira se odgovarajućim otapalom. Postupak obuhvaća ukupno četiri koraka: kondicioniranje sorbensa u koloni, propuštanje uzorka kroz sorbens, ispiranje sorbensa i eluiranje sorbiranog analita s odgovarajućim otapalom (Slika 15). Sorbens se kondicionira propuštanjem odgovarajućeg otapala kroz kolonu kako bi se sorbens solvatirao. Otapalo za kondicioniranje mora biti istih karakteristika kao i uzorak radi što bolje sorpcije analita, a najčešće se koristi kombinacija organskog otapala i vode. Uspješnost ekstrakcije ovisi o načinu propuštanja uzorka, koje mora biti kontinuirano i jednoliko pri čemu je sorbens cijelo vrijeme ispunjen uzorkom. Na kraju se sorbirani analit eluira odgovarajućim otapalom ili smjesom otapala. Vrlo često se događa da pri ekstrakciji složenijih uzoraka uz ciljane analite koeluiraju i drugi neželjeni sastojci uzorka. Da bi se to spriječilo, prije eluiranja analita sorbens je potrebno isprati s odgovarajućim otapalom. Otapalo mora biti takvo da ispere interferirajuće sastojke uzorka, a da pri tom analit ostane sorbiran na sorbensu. Za ispiranje kolone najčešće se koristi voda.

Najvažniji korak u SPE je odabir odgovarajućeg sorbensa. Odabir sorbensa ovisi o vrsti analita i kemijskoj prirodi matrice uzorka. Vezivanje analita na sorbens omogućeno je

interakcijama između analita i površine sorbensa. Te su interakcije uglavnom hidrofobne (van der Waalsove veze), polarne (vodikove veze) te ionske (kationska i anionska izmjena).[71] U skladu s navedenim, SPE se dijeli na SPE normalnih faza (polaran sorbens) i SPE obrnutih faza (nepolaran sorbens). Najčešći nepolarni sorbensi su kemijski modificirani silikagel (oktadecilsilicijev dioksid C_{18} ili oktilsilicijev dioksid C_8)[16,92], sorbensi na bazi aktivnog ugljika[93,94] te polimerni sorbensi (kopolimer polistiren – divinilbenzen) (Slika 15). Velik napredak u postupcima priprave uzorka primjenom SPE je razvoj sorbensa hidrofilno – lipofilnog karaktera koji omogućuju istodobnu ekstrakciju većeg broja analita širokog raspona fizikalno – kemijskih svojstava. Najčešći predstavnik takve vrste sorbensa je kopolimer divinilbenzena i *N* – vinilpirolidona komercijalnog imena OASIS HLB.[9–11,14] Za uspješnu ekstrakciju uzoraka često se koriste kombinacije dvaju ili više sorbensa. U novije vrijeme koriste se i ionsko – izmjenjivački sorbensi pri čemu su različite ionske funkcionalne grupe kao što su karboksilne ili amino grupe, vezane na polimerne sorbense ili silikagel.



Slika 15. Najčešći sorbensi za ekstrakciju na čvrstoj fazi.

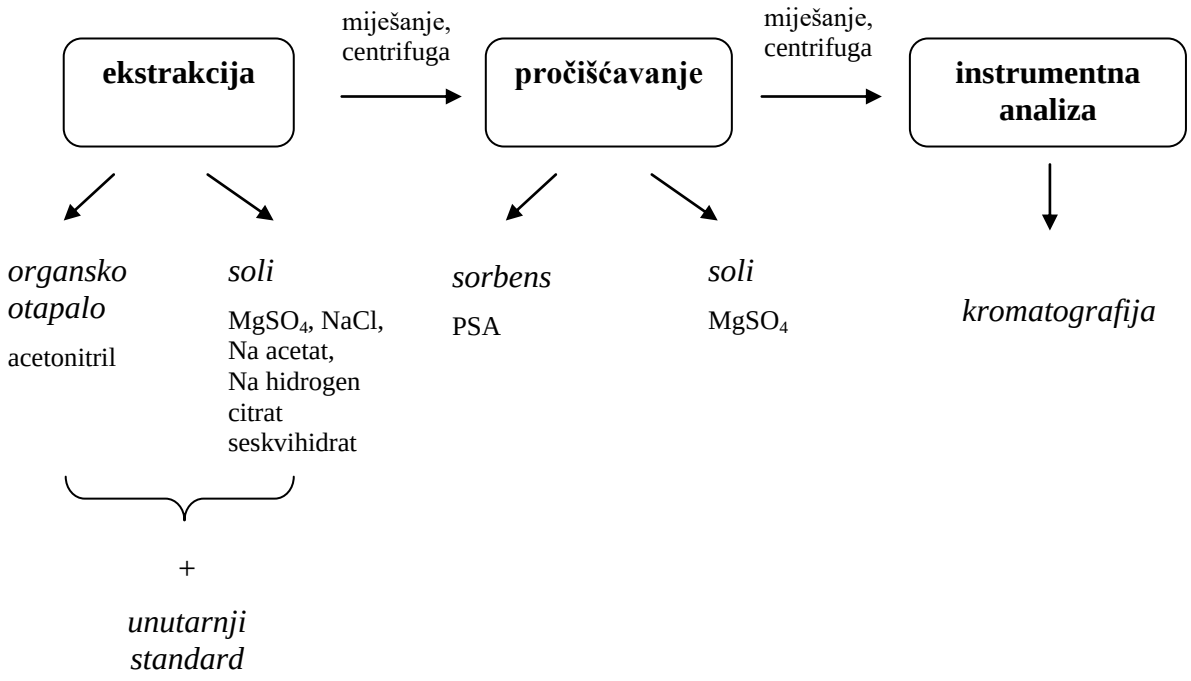
Ekstrakcija na čvrstoj fazi najčešći je odabir priprave uzorka pri analizama ostataka pesticida u vinima. U novije vrijeme sve se više koriste polimerni sorbensi hidrofilno – lipofilnog karaktera (OASIS HLB)[9,10,11,14,15] te ionska izmjena (OASIS MAX).[10,11,15] Kemijski modificirani silikagel (C_{18}) pokazao se prikladnim za analize manjeg broja pesticida sličnih svojstava[4,16] zbog čega se sve manje koristi za analize vina. Vrlo važan korak pri analizama vina je ispiranje sorbensa. Prema publikacijama sorbensi se najčešće ispiru s vodom.[9,10,15,16] Međutim, uspješna ekstrakcija pesticida iz uzoraka vina ovisi o kemijskoj prirodi vina. Vino sadrži mnoge spojeve (polifenolne spojeve, proteine, šećere, organske kiseline i dr.), ovisno o podrijetlu uzgoja vinove loze, koji koeluiraju zajedno s analitima/pesticidima. Zbog prisutnosti tih spojeva ispiranje s vodom često nije dovoljno, pogotovo ukoliko se radi o crnom vinu. Ispiranje s amonijevim hidroksidom[11] ili metanolom[4] pokazalo se učinkovitim. Od otapala za eluiranje najčešće se koriste metanol, etil – acetat, heksan, acetonitril ili kombinacija navedenih otapala.[9,10,11,14,15]

QuEChERS je novi postupak priprave uzorka razvijen za analizu pesticida u uzorcima hrane pri čemu je postignuta visoka ponovljivost rezultata, posebice pri određivanju niskih koncentracija analita. QuEChERS je akronim za engleski naziv „*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*“ te, kako i samo ime navodi, omogućuje brzu, učinkovitu i prvenstveno ekonomičnu ekstrakciju. Razvili su ga Anastassiades i sur. 2003.[95] te je namijenjen prvenstveno za analizu krutih uzoraka. Značajan napredak predstavlja smanjenje broja koraka ekstrakcije što uvelike utječe na potrebno vrijeme te smanjuje upotrebu kemikalija i aparature. Postupak se sastoji od dva koraka: ekstrakcije uzorka s acetonitrilom i pročišćavanja ekstrakta s odgovarajućim sorbensom. U okviru razvoja ekstrakcije postupkom QuEChERS ispitana je djelotvornost više organskih otapala (metanol, aceton, etil – acetat, acetonitril). Zadovoljavajući rezultati postignuti su s acetonitrilom.[45,95] Acetonitril ima i hidrofilne i hidrofobne karakteristike i miješa se s vodom te omogućuje ekstrakciju i polarnih i nepolarnih pesticida, a ujedno je prikladan za analize tekućinskom i plinskom kromatografijom. Obzirom da su uzorci hrane složene matrice, često se uz ciljane analite ekstrahiraju i interferirajući sastojci uzorka. Stoga QuEChERS uključuje pročišćavanje ekstrakta pomoću ekstrakcije raspršenjem čvrste faze (eng. *Dispersive Solid Phase Extraction,* DSPE). Prikladni sorbensi su oni koji se inače koriste za DSPE, međutim, najboljim se pokazao primarni sekundarni amin (PSA).[95,96] Kao i kod ekstrakcije otapalom, osnovni princip ekstrakcije postupkom QuEChERS je raspodjela analita između dviju faza

koje se ne miješaju, koja ovisi o njihovoj topljivosti. Ekstrakciju postupkom QuEChERS od ektrakcije otapalom razlikuje to što se kod postupka QuEChERS odvajanje faza i prijelaz analita iz vodene otopine uzorka u organsku fazu (acetonitril) pospješuje isoljavanjem. Koncentracijom dodane soli kontrolira se udio rezidualne vode u organskoj fazi. Magnezijev sulfat pokazao se kao najprikladniji za skupljanje rezidualne vode. Dodatkom natrijevog klorida kontrolira se polarnost ekstrakcijskog otapala pri čemu se pospješuje prijelaz polarnijih analita u organsku fazu te smanjuje utjecaj matrice. Valja napomenuti da prevelika količina dodanog natrijevog klorida smanjuje ekstrakciju polarnijih analita. Ključan korak u postupku QuEChERS je održavanje pH otopine. Obzirom da je većina pesticida stabilna pri pH 5, potrebno je tijekom ekstrakcije održavati stalni pH što se postiže dodatkom soli kao što su natrijev acetat i natrijev citrat. Pojedini pesticidi su stabilniji pri nižim pH, pa se preporuča da pH otopine tijekom ekstrakcije bude u rasponu od 2 do 7. Osnovni princip priprave uzorka postupkom QuEChERS prikazan je na Slici 16.

Uz navedene kemijske procese, za uspješnu pripravu uzorka postupkom QuEChERS ključni su i fizikalni procesi. Na ekstrakciju utječu vrijeme i brzina miješanja i centrifugiranja te vrijeme dodavanja soli, što zahtijeva spretnost. U izravnom kontaktu s vodom, magnezijev sulfat pravi grudaste nakupine čime se smanjuje učinkovitost ekstrakcije. Da bi se to izbjeglo, Anastassiades i sur., umjesto klasičnog miješanja na tresilici i Vorteks – miješalici, uveli su u postupak intenzivno tresenje uzorka rukom.[95] Intenzivnom ručnom trešnjom, u kratkom vremenu, pospješuje se miješanje faza i ravnomjerna raspodjela soli čime se postiže jasno odvajanje faza bez grudastih nakupina magnezijeva sulfata. Intenzitet i vrijeme trešnje ključni su za učinkovitu ekstrakciju analita različitih svojstava. Nakon ekstrakcije otopina se centrifugira, pri čemu su ključni brzina i vrijeme centrifugiranja. Pogreške koje mogu nastati tijekom cjelokupnog ekstrakcijskog postupka smanjuju se upotrebom unutarnjeg standarda koji se dodaje u uzorak na samom početku ekstrakcije. Anastassiades i sur. ispitali su nekoliko unutarnjih standarda i kao najprikladniji izabrali trifenilfosfat.[95]

Postupak QuEChERS izvorno je razvijen za analizu pesticida u krutim uzorcima hrane, ali se intenzivno istražuju mogućnosti njegove primjene na druge matrice. U zadnjih nekoliko godina posupak je doživio brojne modifikacije i poboljšanja ovisno o matrici uzorka. Značajan napredak primjene postupka QuEChERS potvrđuju razvijeni postupci ekstrakcije pesticida iz voćnih sokova,[97] meda i mlijeka[98,99] te uzoraka okoliša. [62,100] QuEChERS se također primjenjuje za određivanje analita koji nisu pesticidi, kao što su lijekovi.[101,102]



Slika 16. Osnovni princip QuEChERS postupka priprave uzorka.

2.2.4.2. Instrumentne tehnike za određivanje pesticida

Analitičke tehnike za određivanje pesticida ekstrahiranih iz različitih tipova uzoraka moraju biti visoko selektivne te omogućiti kvalitativnu i kvantitativnu analizu pri vrlo niskim koncentracijama analita. Uz odabir prikladnog postupka priprave uzorka, odabir instrumentne tehnike često je ključan korak za uspješnu analizu. Kromatografske tehnike, od kojih valja izdvojiti plinsku i tekućinsku kromatografiju, udovoljavaju navedenim zahtjevima za određivanje pesticida.

Analize pesticida u početku su bile orijentirane na plinsku kromatografiju obzirom da je prva razvijena (1950 – tih godina). Plinska kromatografija (GC) ima visoku moć odjeljivanja sastojaka složenih smjesa, međutim, prikladna je samo za analizu termički stabilnih spojeva koji su hlapljivi ispod 300 °C. Plinskom kromatografijom mogu se analizirati samo nepolarni do umjereno polarni pesticidi. Određivanje polarnih pesticida moguće je samo uz prethodnu derivatizaciju. Razvoj tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (LC) omogućio je uspješniju analizu pesticida širokog raspona fizikalno – kemijskih svojstava. Tekućinska kromatografija ne zahtijeva primjenu visokih temperatura kao plinska kromatografija, pa je prikladna tehnika za određivanje polarnih pesticida kao i termički nestabilnih i nehlapljivih spojeva.

Kromatografija sama po sebi nije dostatna tehnika za potvrdu identiteta analita jer se klasičnim kromatografskim detektorima ne mogu dobiti podaci koji bi omogućili nedvojbenu identifikaciju analita.

Značajan napredak razvoju kromatografskih tehnika, posebice za analize spojeva u tragovima, predstavlja povezivanje GC i LC sa spektrometrijom masa (MS). Vezani sustavi GC – MS i LC – MS omogućuju istovremeno djelotvorno odjeljivanje, potvrdu identiteta i kvantifikaciju analita u uzorku. Spektrometrija masa omogućuje visoku selektivnost i osjetljivost detekcije te dobivanje kvalitativnih i kvantitativnih podataka u jednoj analizi bez korištenja dodatnih potvrdnih tehnika. Praćenje iona karakterističnih vrijednosti *m/z* (eng. *Selected Ion Monitoring*, SIM), pri čemu se odabiru ioni karakteristični za analit, povećava selektivnost detekcije ciljanih analita. Uz ovaj način rada, vrlo je bitan i pretražni način rada (SCAN) kojim se detektiraju ioni svih vrijednosti *m/z* vrijednosti što je vrlo bitno za analize nepoznatih spojeva. Uporabom tandemne spektrometrije masa (MS/MS) može se dodatno poboljšati selektivnost i osjetljivost analize praćenjem višestrukih reakcija (eng. *Multiple Reaction Monitoring*, MRM) pri čemu se odabire jedan ion – prekursor, te dva ili više iona – produkta karakteristična za pojedini analit.

U GC – MS i LC – MS sustavima koristi se nekoliko različitih analizatora masa: kvadrupol (eng. *Quadrupole*, Q), ionska stupica (eng. *Ion Trap*, IT) ili analizator masa mjerenjem vremena leta (eng. *Time of Flight,* TOF). Ograničenje primjene spektrometara masa s analizatorima masa Q i IT je njihova rezolucija masa. Iz tog razloga sve se više primjenjuju spektrometri masa s analizatorom masa TOF. Osim veće rezolucije, TOF omogućuje vrlo velike brzine snimanja tako da je moguća visoka osjetljivost i snimanje čitavog spektra masa čak i kod vrlo niskih koncentracija analita. U novije vrijeme sve se češće koriste i hibridne tehnike koje povezuju različite analizatore u seriju kao što je Q – TOF, posebice za analize složenih uzoraka te analize spojeva u izrazito niskim koncentracijama. Trostruki kvadrupol (QQQ), TOF, te Q – TOF omogućavaju veliku točnost pri izračunu masa te izrazito visoku osjetljivost i selektivnost.

Obzirom da analize pesticida u različitim tipovima uzoraka postaju sve kompleksnije zbog potrebe da se njima obuhvati što više spojeva sadržanih u izrazito niskim koncentracijama, sve se više koriste vezani sustavi LC – MS/MS – TOF[10,15,104,105], LC – MS/MS – QTOF[106,107] ili LC – MS/MS – QQQ[106,107]. Uz navedene vezane sustave u analizama pesticida vrlo je česta upotreba i GC – MS/MS sustava[108–110]. Za analize pesticida u

uzorcima vina uz GC – MS[4,14,16], u novije vrijeme se sve više koriste vezani sustavi LC – MS/MS s TOF, QQQ, ili Q – TOF.[9,10.11,15]

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

Za razvoj multirezidualne metode određivanja ostataka pesticida u vinima korišteni su analitički standardi pesticida poznate čistoće (Tablica 3).

Tablica 3. Analitički standardi pesticida korišteni za razvoj multirezidualne metode određivanja ostataka pesticida u vinima.

	Pesticid	Čistoća / %	Proizvođač
1.	benalaksil	99,5	Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Njemačka
2.	fludioksonil	99,0	Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Njemačka
3.	flukinkonazol	99,0	Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Njemačka
4.	spiroksamin	99,0	Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Njemačka
5.	tiametoksam	98,5	Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Njemačka
6.	propikonazol	97,5	Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Njemačka
7.	pirimetanil	99,0	Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Njemačka
8.	fluopikolid	98,5	Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Njemačka
9.	spirodiklofen	96,7	Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Njemačka
10.	flusilazol	98,0	Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Njemačka
11.	metalaksil	99,9	Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka
12.	azoksistrobin	99,9	Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka
13.	trifloksistrobin	99,2	Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka
14.	krezoksim-metil	96,6	Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka
15.	iprodion	99,3	Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka
16.	miklobutanil	99,4	Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka
17.	tebukonazol	99,5	Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka
18.	lambda – cihalotrin	97,8	Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka
19.	deltametrin	99,6	Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka
20.	klortalonil	99,3	Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka
21.	piraklostrobin	99,9	Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka
22.	boskalid	99,9	Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka
23.	alfa – cipermetrin	99,7	Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka
24.	kaptan	99,6	Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka
25.	zoksamid	99,6	Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka

Fizikalno – kemijska svojstva odabranih pesticide detaljno su prikazana u PRILOGU I.

Uz analitičke standarde pesticida korištene su sljedeće kemikalije (Tablica 4):

Tablica 4. Kemikalije korištene za razvoj multirezidualne metode određivanja ostataka pesticida u vinima.

	Kemikalija	Karakteristike	Proizvođač
1.	acetonitril	za tekućinsku kromatografiju	J. T. Baker, Deventer, Nizozemska
2.	aceton	za plinsku kromatografiju	J. T. Baker, Deventer, Nizozemska
3.	etil – acetat	za tekućinsku kromatografiju	Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka
4.	*n* – heksan	za tekućinsku kromatografiju	Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka
5.	toluen	za tekućinsku kromatografiju	Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka
6.	voda	za tekućinsku kromatografiju	J. T. Baker, Deventer, Nizozemska
7.	klorovodična kiselina	0,1 M	J. T. Baker, Deventer, Nizozemska
8.	octena kiselina	glacijalna	J. T. Baker, Deventer, Nizozemska
9.	1,1´,2,2´-tetrafeniletilen (TEP)	čistoća 99 %	Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka
10.	magnezijev sulfat	bezvodni	Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD
11.	natrijev klorid	p.a.	Carlo Erba, Milano, Italija
12.	natrijev acetat	p.a.	Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD
13.	trinatrijev hidrogen citrat dihidrat	p.a.	Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD
14.	natrijev citrat	p.a.	Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD
15.	dinatrijev citrat seskvihidrat	p.a.	Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD
16.	primarni sekundarni amin	-	Agilent Technologies, Santa Clara, SAD
17.	OASIS HLB	60 mg/3 mL	Waters, Milford, SAD
18.	OASIS HLB	200 mg/6 mL	Waters, Milford, SAD

U okviru istraživanja korišten je sljedeći pribor (Tablica 5):

Tablica 5. Pribor korišten za razvoj multirezidualne metode određivanja ostataka pesticida u vinima.

	Pribor	Karakteristike	Proizvođač
1.	laboratorijska pipeta, mehanička	0,5 – 10 μL 20 – 50 μL 20 – 200 μL 100 – 1000 μL	Hirschmann, Eberstadt, Njemačka
2.	laboratorijska pipeta, digitalna	50 – 1000 μL	Biohit, Helsinki, Finska
3.	membranski filter	20 μm veličina pora	Milipore, Billerica, SAD
4.	uređaj za vakuumsku filtraciju	-	Supelco, St. Louise, SAD
5.	stakleno laboratorijsko posuđe	-	Schott, Isolab, Njemačka

U okviru istraživanja korišteni su sljedeći uređaji (Tablica 6):

Tablica 6. Uređaji korišteni za razvoj multirezidualne metode određivanja ostataka pesticida u vinima.

	Uređaj (model)	Karakteristike	Proizvođač
1.	analitička vaga (ME 235S)	točnost ±0,01 mg	Sartorius, Göttingen, Njemačka
2.	analitička vaga (PB 153-S)	točnost ±1 mg	Sartorius, Göttingen, Njemačka
3.	vakuumska pumpa (16694-2-50-06)	-	Sartorius, Göttingen, Njemačka
4.	uređaj za ekstrakciju na čvrstoj fazi	-	Supelco, St. Louise, SAD
5.	pH-metar (PP-50-P-11)	-	Sartorius, Göttingen, Njemačka
6.	centrifugalni uparivač (EZ-2 Plus HCl Compatible)	-	Genevac, Ipswich, Velika Britanija
7.	centrifuga (Universal 320)	4000 rpm	Hettich, Tuttlingen, Njemačka
8.	Vortex – miješalica (Ika Vortex 3 Genius)	-	Ika, Staufen, Njemačka
9.	vezani sustav plinski kromatograf (6890N) – spektrometar masa (5795), s automatskim uzorkivačem (7863B) i elektronskom kontrolom protoka	-	Agilent Technologies, Santa Clara, SAD

3.1.1. Radne otopine

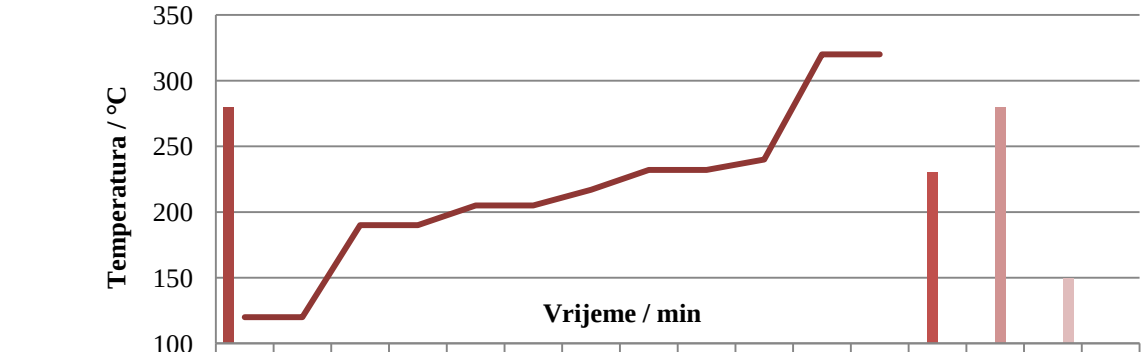
Izvorne otopine standarda pesticida približnih masenih koncentracija 500 μg mL^{-1} i 3125 μg mL^{-1} pripravljene su u acetonu. Radne otopine pripravljene su daljnjim razrjeđivanjem izvornih otopina standarda pesticida u acetonu i u ekstraktu matrice uzorka. Otopine za kalibraciju pripravljene su u rasponu masenih koncentracija pesticida od granice određivanja (GO) do 25 x GO. Za razvoj analitičkih metoda korišteno je crno vino *Babić* za koje je potvrđeno da izvorno ne sadrži odabrane pesticide. Koncentracije pesticida u realnim uzorcima vina obrađenim postupkom SPE određene su metodom dodatka standarda, a u uzorcima obrađenim postupkom QuEChERS prema kalibracijskim pravcima dobivenim analizom kalibracijskih otopina pripravljenih u matrici uzorka. Otopina unutarnjeg standarda 1,1′,2,2′-tetrafeniletilena (TEP) približne masene koncentracije 100 μg mL^{-1} pripravljena je u toluenu. Sve otopine su pohranjene u mraku pri 4 °C.

3.2. Metode

3.2.1. Plinska kromatografija vezana sa spektrometrijom masa

Za razvoj multirezidualne metode određivanja ostataka pesticida u vinima korišten je vezani sustav plinski kromatograf – spektrometar masa (GC – MS) s automatskim sustavom za djelomično i potpuno unošenje uzorka (eng. *split/splitless*). U ovom radu korišten je za injektiranje uzoraka insert (eng. *liner*) za potpuno unošenje uzorka bez staklene vune (Restek, Bellefonte, SAD). Za razdvajanje smjese pesticida odabrana je kapilarna kolona HP – 5MSi sa nepokretnom fazom [poli(5% – difenil – 95% – dimetilsiloksan)] (Agilent Technologies, Palo Alto, SAD) duljine 30 m, unutarnjeg promjera 0,25 mm i debljine filma selektivne tekućine 0,25 µm. Plin nosilac bio je helij (čistoća 6,0, Messer, Hrvatska).

Volumen od 5 µL uzorka injektiran je u sustav tehnikom potpunog unošenja uz pulsni tlak od 344,74 kPa i pulsno vrijeme od 0,6 min (eng. *pulsed splitless*) pri čemu je temperatura injektora bila 250 °C. Protok plina nosioca bio je 1 mL min^{-1}. Vrijeme analize bilo je 23,63 min s odgodom snimanja 4,5 min. Temperaturni program zagrijavanja kolone prikazan je na Slici 17. Za ionizaciju pesticida korištena je ionizacija elektronima pri 70 eV. Temperatura ionskog izvora bila je 230 °C, temperatura međuspoja plinskog kromatografa i spektrometra masa 280 °C, te kvadrupola 150 °C.



	0	1	3,33	4,33	7,33	8,33	14,33	16,83	17,83	18,63	20,63	23,63				
Injektor	280															
Ionski izvor													230			
Prijenosna linija														280		
Kvadrupol															150	
Kolona	120	120	190	190	205	205	217	232	232	240	320	320				

Slika 17. Temperaturni program zagrijavanja plinskokromatografske kolone i temperature injektora, ionskog izvora, GC – MS – međuspoja i kvadrupola.

Radi utvrđivanja iona čiji su signali u spektru masa određenog pesticida najintenzivniji (ciljni ion) analizirane su standardne otopine smjese pesticida u pretražnom načinu rada spektrometra masa (SCAN) nakon čega je analiziran i ekstrakt slijepe matrice uzorka vina kako bi se uočile i uklonile moguće interferencije. Detekcija i određivanje pesticida provedeni su praćenjem vrijednosti *m/z* odabranih iona (SIM) koji su prikazani u Tablici 7.

Tablica 7. Parametri za GC – MS analizu pesticida primjenom načina rada SIM.

Pesticid	**Vrijeme zadržavanja/ min**	**Ciljni ion (T)** ***m/z***	**Potvrdni ion (Q1)** ***m/z***	**Potvrdni ion (Q2)** ***m/z***	**Potvrdni ion (Q3)** ***m/z***
azoksistrobin	22,579	344	388	345	372
alfa – cipermetrin	21,356	181	163	165	140
benalaksil	16,348	148	132	206	204
boskalid	21,310	140	342	344	142
deltametrin	22,340	181	253	251	255
fludioksonil	13,242	248	127	154	182
flusilazol	13,674	233	234	315	220
flukinkonazol	20,829	340	342	341	108
fluopikolid	17,122	209	347	173	349
iprodion	18,691	314	316	187	189
kaptan	10,954	79	149	119	80
klortalonil	7,465	266	264	268	231
krezoksim metil	13,791	116	131	206	132
lambda – cihalotrin	20,176	181	197	208	209
metalaksil	8,493	206	160	132	249
miklobutanil	13,565	179	150	82	181
pirimetanil	7,002	198	199	91	200
piraklostrobin	21,915	132	164	111	133
propikonazol	16,594; 16,864	173	259	261	175
spiroksamin	8,030; 8,755	100	101	126	198
spirodiklofen	20,650	71	99	312	314
tiametoksam	10,403	182	212	247	132
tebukonazol	17,344	125	250	70	83
trifloksistrobin	16,913	116	131	222	132
zoksamid	18,147	187	189	258	260

Odabran je jedan ciljni ion za kvantitativno određivanje pesticida te tri potvrdna iona za potvrdu identiteta pesticida. Uz potvrdne ione, identifikacija je provedena i usporedbom vremena zadržavanja pesticida (Tablica 7) u kromatogramu uzorka s vremenom zadržavanja pesticida u kromatogramu standardne otopine smjese pesticida pripravljene u slijepoj matrici uzorka te u čistom otapalu. Radi postizanja bolje selektivnosti i osjetljivosti odabrano je sedam vremenskih segmenata za praćenje iona, a vrijeme praćenja iona (eng. *dwell time*) bilo je od 40 ms do 100 ms ovisno o zadanom segmentu)PRILOG III). Detaljniji prikazi

vrijednosti *m/z* i omjera intenziteta signala ciljnih i potvrdnih iona odabranih za kvalitativnu analizu pojedinih pesticida nalaze se u PRILOGU II.

3.2.2. Postupci priprave uzorka

Za ekstrakciju pesticida iz uzoraka vina istražena su dva postupka priprave uzorka:

- ekstrakcija na čvrstoj fazi
- postupak QuEChERS

Svaki postupak priprave uzorka razvijen je i optimiran uz iste uvjete GC – MS analize koji su opisani u poglavlju 3.2.1. Prije ekstrakcijskog postupka uzorci vina su filtrirani na uređaju za vakuumsku filtraciju kroz membranski filtar veličine pora od 22 μm te obrađeni unutar 48 h. Za razvoj multirezidualnih metoda korišteno je crno vino *Babić* za koje je potvrđeno da ne sadrži odabrane pesticide. Postupci SPE i QuEChERS razvijeni su i optimirani analizom modelnog uzorka pripravljenog dodatkom otopine standarda smjese pesticida masene koncentracije 5 μg mL^{-1} u slijepu matricu uzorka.

3.2.2.1. Ekstrakcija na čvrstoj fazi

Za ekstrakciju pesticida iz uzoraka vina korišten je uređaj za ekstrakciju na čvrstoj fazi s 12 slobodnih mjesta za SPE – kolonice. Ekstrakcija je provedena na sorbensu OASIS HLB 60 mg/3 mL uz protok uzorka od 5 mL min^{-1}. Protok je kontroliran uz vakuum pumpu.

Volumen od 10 mL uzorka vina razrijeđen je s vodom u volumnom omjeru 1:1 i propušten kroz SPE – kolonicu prethodno kondicioniranu s 3 mL acetonitrila i 3 mL vode. Nakon propuštanja uzorka, SPE – kolonica je isprana s 3 mL smjese ψ(metanol,voda) = 1:1 i zatim sušena pod vakuumom oko 15 min. Analiti su sa sorbensa eluirani prvo s 2 mL *n* – heksana i zatim s 4 x 2 mL acetonitrila. Eluati su skupljeni u staklene bočice od 15 mL i upareni do suhog ostatka u centrifugalnom uparivaču. Suhi ostatak je otopljen u 1 mL acetona te je uzorak analiziran vezanim sustavom plinski kromatograf – spektrometar masa.

3.2.2.2. QuEChERS

Ekstrakcija pesticida iz uzoraka vina postupkom QuEChERS provedena je u dva koraka. U prvom koraku pesticidi se iz uzoraka vina uz dodatak soli prevode u organsku fazu (acetonitril). U drugom koraku organska faza se dodatno pročišćava uz dodatak PSA i magnezijeva sulfata radi uklanjanja mogućih interferencija i ostatka vode.

Uzorak vina od 10 mL stavi se u kivetu za centrifugiranje od 50 mL u koju se doda 10 mL acetonitrila. Smjesa se promiješa najvećom brzinom na Vortex – miješalici, nakon čega se doda 4 g magnezijeva sulfata, 1,5 g natrijeva klorida, 2 g natrijeva acetata i 2 g trinatrijeva hidrogen citrata dihidrata. Smjesu je potrebno 1 min rukom snažno protresti odmah nakon dodatka soli, a zatim ju 10 min naizmjence tresti rukom i miješati na Vortex – miješalici. Smjesa se nakon miješanja centrifugira na 4000 rpm (2325,4 g) 15 min pri čemu se vodeni sloj odvaja od organskog. Nakon toga se 8 mL supernatanta prenese u kivetu za centrifugiranje od 15 mL u kojoj se nalazi 400 mg PSA i 1,2 g magnezijeva sulfata. Smjesa se snažno protrese rukom 1 min te se zatim miješa najvećom brzinom na Vortex – miješalici 3 min. Smjesa se nakon miješanja centrifugira na 4000 rpm (2325,4 g) 15 min. Nakon centrifugiranja preostali se uzorak upari do suha u centrifugalnom uparivaču. Suhi ostatak se otopi u 1 mL acetona i analizira vezanim sustavom plinski kromatograf – spektrometar masa.

3.2.3. Validacija metode

U okviru istraživanja provedena je validacija razvijenih multirezidualnih metoda u skladu sa smjernicama SANCO/12571/2013 za sustavno praćenje ostataka pesticida.[111] Ukupno su provedene četiri validacije. Obzirom na postupak priprave uzorka (SPE i QuEChERS) razvijene su dvije metode, te su za svaku metodu provedene po dvije validacije: zasebno za analizu pesticida u crnom vinu te zasebno u bijelom vinu (slijepe matrice uzorka).

Granica detekcije (GD) i granica određivanja (GO) određene su usporedbom kromatografskog pika ciljnog iona i signala šuma osnovne kromatografske linije. U tu svrhu analizirana je slijepa proba matrice uzorka u koju su dodane poznate masene koncentracije pesticida. Za određivanje granice detekcije minimalan omjer signala ciljnog iona i šuma osnovne linije bio je jednak 3, a za granicu određivanja 10. Granica određivanja bila je najniža koncentracija pesticida kod koje su uz ciljni ion detektirana i sva tri potvrdna iona. U slučaju pesticida u čijim spektrima masa je izražena slaba fragmentacija uzeti su u obzir ciljni ion te dva potvrdna iona.

Linearnost metode ispitana je u koncentracijskim rasponima pesticida u uzorku od GO do 400 μg L^{-1} za SPE, te od GO do 2500 μg L^{-1} za QuEChERS. Za svaku koncentracijsku razinu pripravljena su i analizirana po tri uzorka.

Točnost i preciznost metode ispitane su pri dvije koncentracije pesticida u uzorku: koncentraciji dvostruko (2 x GO) i koncentraciji deseterostruko (10 x GO) višoj od granice

određivanja. Ponovljivost odnosno obnovljivost multirezidualne metode koja uključuje postupak SPE određena je analizom pet paralelnih uzoraka pripravljenih za svaku koncentracijsku razinu unutar istog dana odnosno u tri uzastopna dana i to za matrice uzoraka crnog i bijelog vina. Ponovljivost multirezidualne metode koja uključuje postupak QuEChERS određena je za matrice crnog i bijelog vina također na temelju analize po pet paralelnih uzoraka pripravljenih za svaku koncentracijsku razinu unutar istog dana. Obnovljivost te metode određena je analizom po pet paralelnih uzoraka pripravljenih za svaku koncentracijsku razinu u pet uzastopnih dana za matricu crnog vina te u tri uzastopna dana za matricu bijelog vina.

Apsolutni analitički povrati (*R*) izračunati su prema sljedećem izrazu (1):

$$R(\%) = \frac{\gamma_s - \gamma_b}{\gamma} \cdot 100 \quad (1)$$

gdje je:

γ_s izmjerena masena koncentracija pesticida dodanih u slijepu matricu uzorka,

γ_b izmjerena masena koncentracija pesticida u slijepoj matrici uzorka u koju pesticidi nisu dodani,

γ_t teoretska masena koncentracija pesticida dodanih u slijepu matricu uzorka.

3.2.4. Mjerna nesigurnost

Mjerna nesigurnost određena je na temelju podataka prikupljenih u okviru validacije koja je opisana u poglavlju 4.3. koristeći izmjerene masene koncentracije pesticida dodanih u slijepu matricu vina.[112] Koncentracija pesticida u slijepoj matrici uzorka određena je prema izrazu (2):

$$\gamma_s = A_s \cdot \frac{A_{ISTD}}{A_{ISTD_S}} \cdot \frac{\gamma_t}{A_{st}} \cdot DF \quad (2)$$

gdje je:

γ_s izmjerena masena koncentracija pesticida dodanih u slijepu matricu vina,

A_s površina pika (odziv detektora) pesticida u kromatogramu uzorka,

A_{ISTD} površina pika (odziv detektora) unutarnjeg standarda u kromatogramu matrice/otapala,

A_{ISTDs} površina pika (odziv detektora) unutarnjeg standarda u kromatogramu uzorka,

γ_t teoretska koncentracija pesticida,

A_{st} površina pika (odziv detektora) pesticida u kromatogramu standardne otopine smjese pesticida u matrici/otapalu,

DF faktor razrijeđenja.

Koncentracija unutarnjeg standarda bila je 100 μg L^{-1} za postupak QuEChERS i 50 μg L^{-1} za postupak SPE.

Prvi član s desne strane je odziv detektora za određeni pesticid u kromatogramu standardne otopine smjese pesticida u slijepoj matrici uzorka. Drugi član s desne strane je normalizacijski faktor za korekciju utjecaja instrumenta i/ili matrice uzorka. Treći član je kalibracijski faktor koji pri analizi standardne otopine pesticida u ekstraktu vina predstavlja faktor kalibracije u odnosu na matricu vina, dok je pri analizi standardne otopine smjese pesticida u otapalu član vanjske kalibracije. Zadnji član, *DF*, je faktor razrjeđenja koji se mijenja ovisno o primijenjenom analitičkom postupku.

Za jednostavnije korištenje izraza (2), može se uvesti relativna funkcija odziva detektora (*RRF*) definirana prema izrazu (3):

$$RRF = \frac{A_{st} \cdot \gamma_{ISTD}}{A_{ISTD} \cdot \gamma_t} \tag{3}$$

čija se nepouzdanost M_{RRF} može izraziti kao:

$$M_{RRF} = \sqrt{\left(\frac{\gamma_{ISTD}}{\overline{A_{ISTD}} \cdot \gamma_t} \cdot M_{A_{st}}\right)^2 + \left(\frac{\overline{A_{st}} \cdot \gamma_{ISTD}}{\overline{A_{ISTD}}^2 \cdot \gamma_t} \cdot M_{A_{ISTD}}\right)^2} \tag{4}$$

gdje su srednje vrijednosti označene uobičajenom notacijom, a odnose se na broj uzastopnih ponavljanja mjerenja unutar jednog dana (n = 5), dok su s M označene nepouzdanosti (pogreške mjerenja) varijabli.

Konačno je nepouzdanost masene koncentracije pesticida u slijepoj matrici uzorka $M_{\gamma s}$ određena prema izrazu (5):

$$M_{\gamma_s} = \sqrt{\left(\frac{\gamma_{ISTD}}{\overline{A_{ISTD_s}} \cdot \overline{RRF}} \cdot M_{A_s}\right)^2 + \left(\frac{\overline{A_s} \cdot \gamma_{ISTD}}{\overline{A_{ISTD_s}}^2 \cdot \overline{RRF}} \cdot M_{A_{ISTD_s}}\right)^2 + \left(\frac{\overline{A_s} \cdot \gamma_{ISTD}}{\overline{A_{ISTD_s}} \cdot \overline{RRF}^2} \cdot M_{RRF}\right)^2}$$

S poznatim koncentracijama pesticida u slijepoj matrici vina, analitički povrati su izračunati prema izrazu (1). Mjerna nesigurnost M_{R} analitičkog povrata R, izračunata je prema izrazu (6):

$$M_R = \sqrt{\left(100 \cdot \frac{M_{\gamma s}}{\gamma_t}\right)^2 + \left(100 \cdot \frac{M_{\gamma b}}{\gamma_t}\right)^2} \quad (6)$$

gdje je $M_{\gamma b}$ mjerna nesigurnost koncentracija u slijepoj matrici uzorka bez dodanih pesticida.

Račun je proveden za dvije koncentracijske razine pesticida u uzorku (2 x GO i 10 x GO). Relativna pogreška analitičkog povrata izračunata je kao omjer mjerne nesigurnosti i srednje vrijednosti analitičkog povrata za svaki pesticid.

Preciznost metode za svaki je pesticid određena iz validacijskih podataka analizom varijanci ponovljenih mjerenja masenih koncentracija pesticida u uzorcima analiziranim unutar jednog dana (n = 5) i u više dana (m = 3 za SPE za oba vina i QuEChERS za bijela vina, m = 5 za QuEChERS za crna vina). Pretpostavljeno je da su sva mjerenja međusobno nezavisna, kao i da mjerenja zadovoljavaju normalnu razdiobu te je ustanovljeno da su varijance svake pojedine grupe slične. Analiza varijance provedena je za obje koncentracijske razine pesticida u vinu na dva nivoa značajnosti p = 0,05 i p = 0,01.

Analizom varijanci provjerava se jednakost srednjaka grupa mjerenja („nul – hipoteza“) uspoređujući varijabilnost unutar pojedinih grupa s varijabilnosti među grupama. Konačni rezultat analize varijanci je prihvaćanje ili odbacivanje hipoteze testa na nekom nivou značajnosti usporedbom dobivene vijednosti F i odgovarajuće teorijske vrijednosti F – raspodjele F_{crit} određene na temelju broja ponavljanja mjerenja unutar grupe, broja grupa i ciljanog nivoa značajnosti. Broj F određen je kao:

$$F = \frac{s_{UD}^2}{s_{ID}^2} \quad (7)$$

pa su stoga neposredni rezultati analize varijanci standardne devijacije masenih koncentracija pesticida izmjerene unutar jednog dana s_{UD} i u više uzastopnih dana s_{ID}.

Mjerna nesigurnost analitičke metode procijenjena je koristeći rezultate analize varijance.[9] Mjerna nesigurnost (u) metode mjerenja (Y) izražena je kvadratnom sumom standardnih varijacija svih pojedinačnih pogrešaka pri mjerenju i to kao (izraz 8):

$$u^2(Y) = s_{UL}^2 + u^2\left(\hat{\delta}\right) + \sum_i a_i^2 u_i^2 \quad (8)$$

gdje je:

s_{UL} unutarlaboratorijska standardna devijacija,

$u^2\left(\hat{\delta}\right)$ nepouzdanost zbog pristranosti mjerenja,

$\sum_i a_i^2 u_i^2$ dodatna mjerna nesigurnost svih ostalih utjecaja povezana s pogreškama tipa B.

Najznačajniji doprinos u ukupnoj mjernoj nesigurnosti uobičajeno ima standardna devijacija unutar laboratorija i nesigurnost pristranosti metode, dok se doprinos posljednjeg člana u izrazu (8) može zanemariti. Mjerna nesigurnost pristranosti i standardna devijacija unutar laboratorija mogu se izraziti koristeći rezultate analize varijance (izrazi 9 i 10):

$$u(\hat{\delta}) = \sqrt{\frac{(s_{UD}^2+s_{ID}^2)\left(1-\frac{s_{UD}^2}{s_{UD}^2+s_{ID}^2}+\frac{s_{UD}^2}{n\cdot(s_{UD}^2+s_{ID}^2)}\right)}{m}} \tag{9}$$

$$s_{UL}^2 = s_{UD}^2 + s_{ID}^2 \tag{10}$$

Proširena mjerna nesigurnost analitičke metode $U(Y)$ konačno je određena iz mjerne nesigurnosti metode $u(Y)$ koristeći faktor k = 2 čime je određen interval s 95 % – tnom sigurnosti za određivanje prave vrijednosti masene koncentracije pesticida ($\hat{\gamma}$) u odnosu na izmjerenu masenu koncentraciju (γ). Sa sigurnošću od 95 % može se tvrditi da je prava masena koncentracija pesticida $\gamma - U(Y) < \hat{\gamma} < \gamma + U(Y)$. Relativne proširene mjerne nesigurnosti za svaki pesticid izračunate su kao omjer proširene mjerne nesigurnosti i izmjerene masene koncentracije pesticida.

3.2.5. Utjecaj matrice uzorka

Vino je složena matrica uzorka i za očekivati je da će imati utjecaj na određivanje pesticida. Radi postizanja bolje djelotvornosti cjelokupnog analitičkog postupka ispitan je utjecaj matrice uzorka obzirom na primijenjeni postupak priprave uzorka (SPE i QuEChERS) te obzirom na vrstu analiziranog vina (crno i bijelo).

Utjecaj matrice uzorka na djelotvornost multirezidualne metode koja uključuje SPE istražen je metodom po Matuszewskom.[113] Prema navedenoj metodi procjenjuje se ukupna djelotvornost analitičkog postupka na temelju instrumentnih odziva (odziva detektora) dobivenih za pesticide u kromatogramu standardne otopine smjese pesticida pripravljene u slijepoj matrici uzorka prije ekstrakcije, i u ekstraktu slijepe matrice te standardne otopine smjese pesticida pripravljene u otapalu. Utjecaj matrice uzorka (ME) određen je prema izrazu (11):

$$ME(\%) = \frac{A_{se}}{A_s} \cdot 100 \tag{11}$$

gdje je:

A_{se} odziv detektora za pesticide u kromatogramu standardne otopine smjese pesticida u slijepoj matrici uzorka poslije ekstrakcije, a

A_s odziv detektora za pesticide u kromatogramu standardne otopine smjese pesticida pripravljene u acetonu.

Utjecaj matrice uzorka (ME) na djelotvornost multirezidualne metode koja uključuje postupak QuEChERS ispitan je usporedbom nagiba kalibracijskih krivulja dobivenih linearnom regresijom koncentracije pesticida u standardnim otopinama pripravljenim u slijepoj matrici uzorka odnosno u acetonu i površina odgovarajućih kromatografskih pikova. Nagibi su uspoređeni prema izrazu (12):

$$ME(\%) = \frac{S_m}{S_s} \cdot 100 \qquad (12)$$

gdje je:

S_m nagib kalibracijske krivulje dobivene linearnom regresijom odziva detektora (površine pikova) i koncentracije pesticida u standardnim otopinama smjese pesticida pripravljenim u slijepoj matrici uzorka, a

S_s nagib kalibracijske krivulje dobivene linearnom regresijom odziva detektora (površine pikova) i koncentracije pesticida u standardnim otopinama smjese pesticida pripravljenim u acetonu.

Uz utjecaj matrice uzorka izračunata je i djelotvornost postupaka priprave uzorka (EE) na dvije koncentracijske razine (2 x GO i 10 x GO) prema izrazu (13):

$$EE(\%) = \frac{A_{ss} - A_{ns}}{A_{se} - A_{ne}} \cdot 100 \qquad (13)$$

gdje je:

A_{ss} površina pika (odziv detektora) pesticida u kromatogramu standardne otopine smjese pesticida pripravljene u slijepoj matrici uzorka,

A_{ns} površina pika (odziv detektora) pesticida u kromatogramu slijepe matrice uzorka kojoj nije dodana standardna otopina smjese pesticida,

A_{se} površina pika (odziv detektora) pesticida u kromatogramu slijepe matrice uzorka u koju je nakon ekstrakcije dodana standardna otopina smjese pesticida, a

A_{ne} površina pika (odziv detektora) pesticida u kromatogramu slijepe matrice uzorka u koju nakon ekstrakcije nije dodana standardna otopina smjese pesticida.

3.2.6. Primjena multirezidualnih metoda na uzorke vina

Razvijene multirezidualne metode primijenjene su za analizu pesticida u različitim vinima s naglaskom na crno i bijelo vino kao dvije zasebne matrice uzorka. U okviru istraživanja ukupno je analizirano 63 uzoraka vina. Za uzorke kodnih oznaka 41 i 42 analiza nije provedena zbog poteškoća u radu instrumenta GC – MS.

Kod uzoraka analiziranih multirezidualnom metodom koja uključuje ekstrakciju pesticida iz vina postupkom SPE primijenjena je metoda standardnog dodatka pri čemu su u uzorke vina dodavane standardne otopine smjese pesticida pripravljene u acetonu. Kalibracijsku krivulju činilo je pet točaka pri čemu je prva točka odgovarala analizi uzorka vina bez dodatka standardne otopine smjese pesticida, dok su ostale četiri točke dobivene analizom uzoraka vina u koje su dodane standardne otopine smjese pesticida tako da su koncentracije pesticida u tim uzorcima odgovarale: granici određivanja pesticida u vinu (GO), 2 x GO, 10 x GO i 20 x GO. Na temelju kalibracijskih krivulja izračunate su koncentracije pesticida u analiziranim uzorcima.

Primjenom multirezidualne metode koja uključuje postupak ekstrakcije QuEChERS pesticidi u uzorcima vina analizirani su na temelju kalibracijskih krivulja dobivenih analizom standardnih otopina smjese pesticida pripravljenih u ekstraktu matrice uzorka. Kalibracijske krivulje činilo je pet točaka koje su odgovarale koncentracijama pesticida u vinu od GO, 2 x GO, 5 x GO, 10 x GO i 25 x GO.

Prikupljeni podaci o sadržaju pesticida u uzorcima vina analiziranim razvijenim multirezidualnim metodama statistički su obrađeni pri čemu su uspoređene učestalost pesticida i njihove koncentracije u odnosu na vinorodne regije Hrvatske s naglaskom na različite sorte vina te način proizvodnje što se prvenstveno odnosi na ekološku i konvencionalnu proizvodnju.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

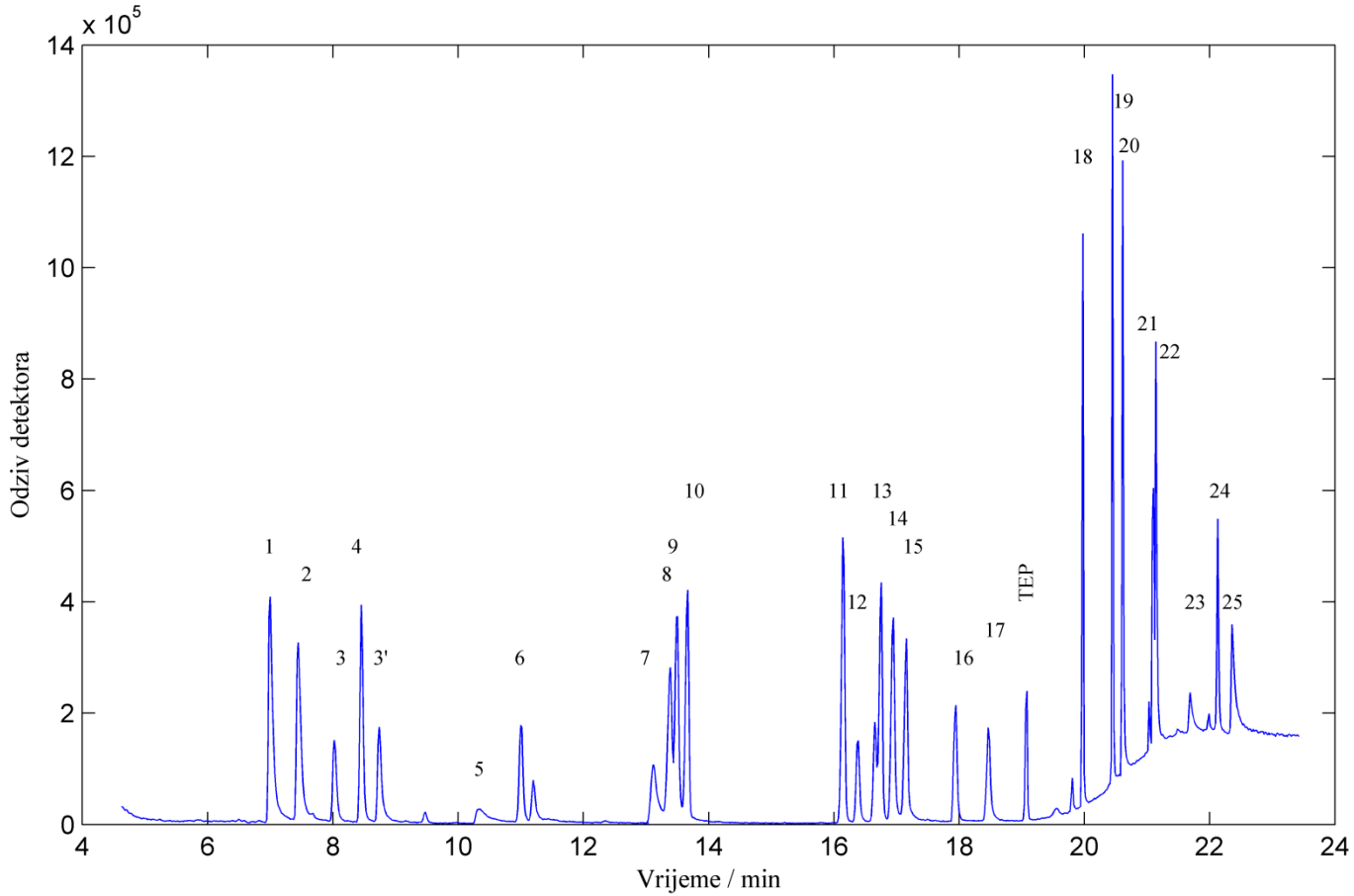
4.1. Optimizacija kromatografskih uvjeta za odjeljivanje pesticida

Za razvoj multirezidualne metode neophodno je optimirati uvjete instrumentne analize radi što uspješnijeg odjeljivanja pesticida. Prema dostupnim literaturnim podacima, najčešće primjenjivane plinskokromatografske kolone za odjeljivanje pesticida su kapilarne kolone s nepolarnom nepokretnom fazom poli(5 % difenil – 95 % dimetilsiloksanom) (HP – 5, DB – 5, Rtx – 5) te kapilarne kolone s polarnijom nepokretnom fazom poli(50 % difenil – 50 % dimetilsiloksanom) (DB – 17MS).[14,16,42,43]

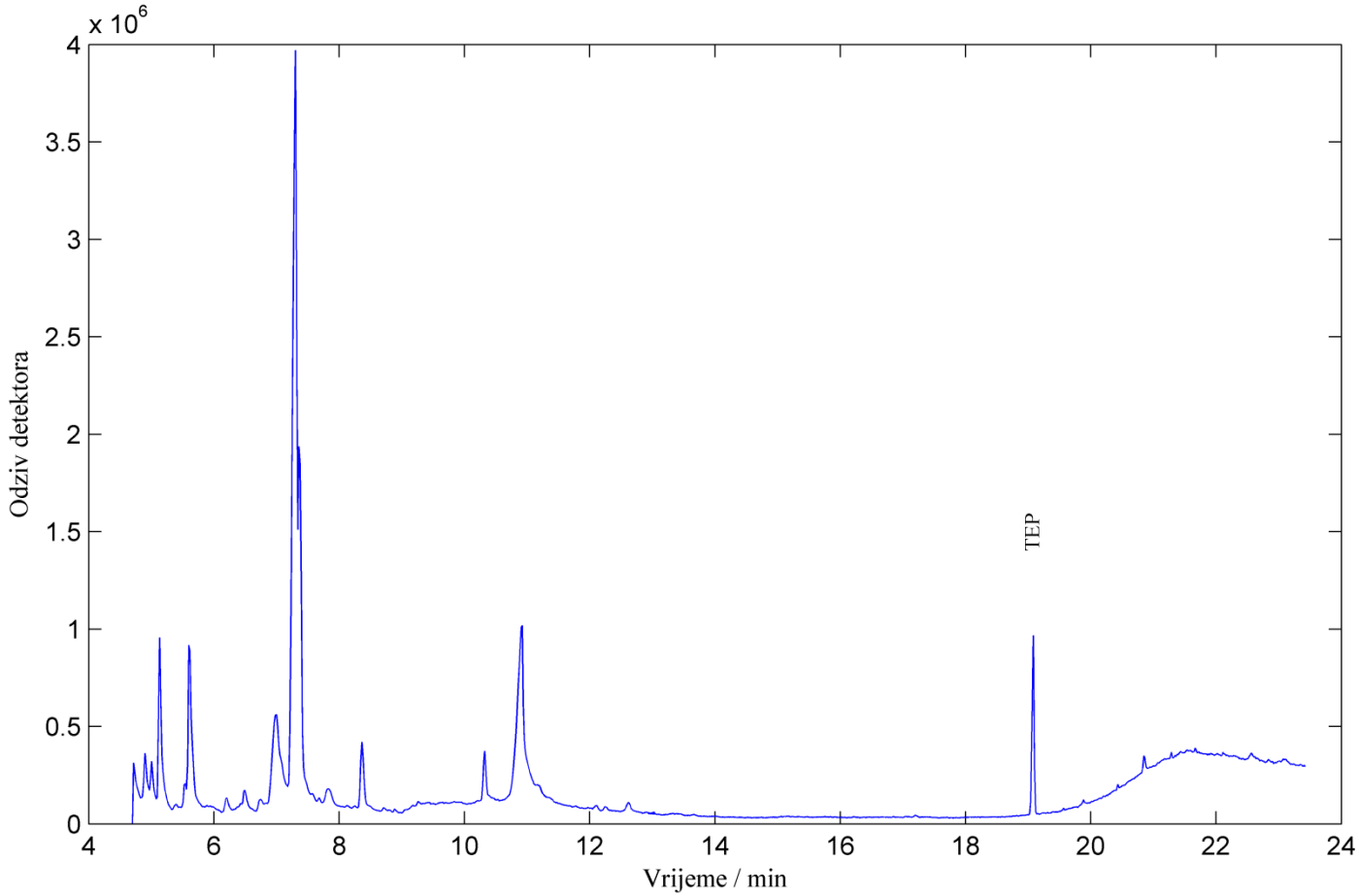
Većina pesticida analiziranih u ovom radu prema fizikalno – kemijskim svojstvima pripada skupini nepolarnih spojeva te je njihovo potpuno odjeljivanje postignuto na kapilarnoj koloni HP - 5MSi unutar 23,63 min. Odabrani karakteristični ciljni i potvrdni ioni pesticida detektiranih spektrometrijom masa prikazani su u Tablici 7. Detaljniji prikaz načina rada praćenjem odabranih iona je u PRILOZIMA II i III.

Na razlučivanje, odnosno uspješno odjeljivanje uzastopnih kromatografskih pikova, utječu postupci priprave uzorka (u ovom radu ekstrakcija na čvrstoj fazi i QuEChERS), kromatografske tehnike (u ovom radu plinska kromatografija), te tehnike detekcije (u ovom radu spektrometrija masa). Važnost navedenih čimbenika je različita kao i priroda njihovih utjecaja na razlučivanje. Najbolje su objašnjeni utjecaji primijenjene kromatografske tehnike što je ujedno i direktno povezano s teorijom kromatografije.[103] Međutim, često je od presudne važnosti detaljno objasniti i utjecaje ostalih čimbenika, od kojih valja spomenuti tehnike detekcije. Praćenje analita u složenim matricama uzorka moguće je postići uporabom spektrometra masa kao detektora. Odabirom karakterističnih vrijednosti omjera mase i naboja iona (*m/z*) postiže se visoka selektivnosti i osjetljivost detekcije. U pretražnom načinu rada spektrometar masa detektira sve vrijednosti *m/z*, pa se često uz ione ciljnih analita detektiraju i ioni ostalih sastojaka prisutnih u matrici uzorka. Praćenjem ciljnih vrijednosti *m/z* karakterističnih za pojedini pesticid smanjuju se moguće interferencije ostalih sastojaka matrice detektiranih u pretražnom načinu rada. Uz navedeno, na isti se način mogu detektirati i odrediti i nepotpuno odijeljeni pesticidi. Selektivnost analize nepotpuno odijeljenih pesticida postiže se odabirom i praćenjem najintenzivnijih signala, tj. najzastupljenijih iona (vrijednosti

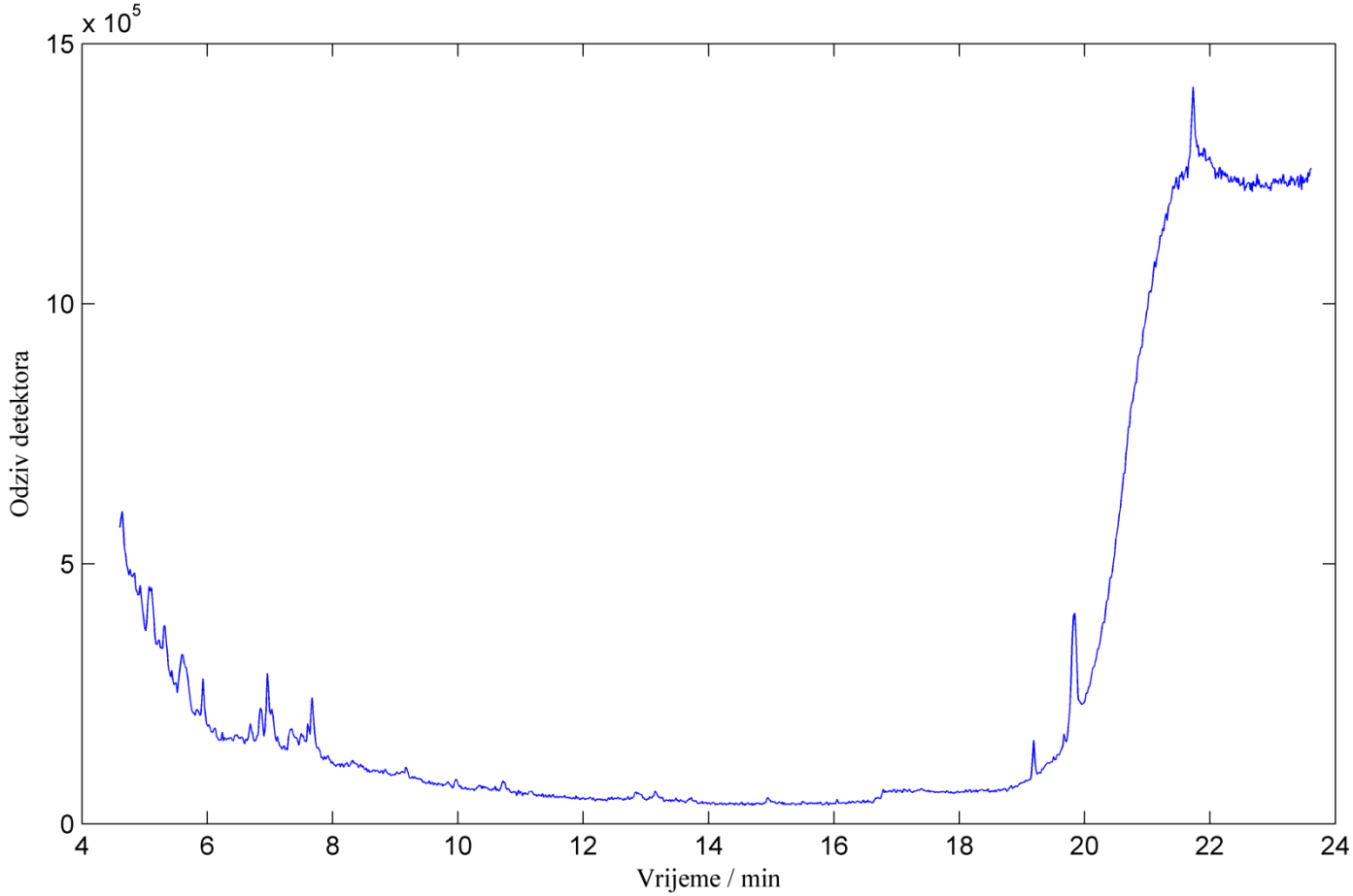
m/z) u spektru masa pojedinog pesticida. Valja napomenuti da se praćene vrijednosti *m/z* nepotpuno odijeljenih pesticida ne smiju preklapati. Ciljni i potvrdni ioni odabrani su u pretražnom načinu rada analizom standardne otopine smjese pesticida pripravljene u acetonu (Slika 18). Radi utvrđivanja i uklanjanja mogućih interferencija sastojaka matrice uzorka, nakon odabira iona karakterističnih za pojedine pesticide analizirane su i slijepe matrice uzoraka crnog (Slike 19 i 20) i bijelog vina (Slike 21 i 22). Identitet svakog pesticida utvrđen je na temelju ciljnog iona te triju potvrdnih iona pri čemu je vrlo važno slaganje omjera površine pikova ciljnog iona i potvrdnih iona u kromatogramima uzorka i kromatogramu standardne otopine smjese pesticida. Osim navedenog, za potvrdu identiteta analiziranih spojeva neophodno je i podudaranje vremena zadržavanja pesticida zabilježenih u kromatogramu uzorka (Slike 23 – 26) s vremenima zadržavanja istih pesticida u kromatogramu standardne otopine smjese pesticida u acetonu (Slika 18) s maksimalno dopuštenim odstupanjem od ± 0,2 min.[111] Fragmentacija pojedinih pesticida u spektrometru masa bila je slaba (omjer intenziteta signala ciljnog i potvrdnih iona <10) što je navedeno u PRILOGU II. U kromatogramima slijepe matrice crnog vina obrađene postupcima SPE ili QuEChERS uočeni su interferirajući pikovi između šeste i osme minute (Slike 19 i 20). Kao što se može vidjeti, interferencije su izraženije u kromatogramima uzoraka pripravljenih ekstrakcijom na čvrstoj fazi nego u kromatogramima uzoraka pripravljenih postupkom QuEChERS. Prema spektrima masa, koeluirajući spojevi po svojoj su strukturi polifenoli. U njihovim spektrima pojavljuju se signali pri istim vrijednostima *m/z* kao što su vrijednosti *m/z* ciljnih i potvrdnih iona pesticida koji se s kolone eluiraju u sličnom vremenu (pirimetanil, klortalonil, metalaksil, spiroksamin). Izraženije interferencije zabilježene su u vremenu eluiranja pirimetanila, klortalonila i spiroksamina. Osim toga, u slučaju pirimetanila i spiroksamina zabilježena je i slaba fragmentacija izvornog spoja što je također negativno utjecalo na njihove granice detekcije i određivanja. Odabirom iona čiji se *m/z* ne podudara s *m/z* iona interferencija, negativni utjecaj matrice djelomično se smanjio, ali su granice određivanja pirimetanila (1 μg L^{-1}) i spiroksamina (2,5 μg L^{-1}) ipak bile više od granica određivanja većine ostalih pesticida. Kod klortalonila je utjecaj matrice crnog vina odabirom odgovarajućih vrijednosti *m/z* sveden na najmanju moguću mjeru te je njegova granica određivanja bila 0,1 μg L^{-1}. Slaba fragmentacija zabilježena je i za flusilazol, ali to nije značajnije utjecalo na njegovu granicu određivanja (0,01 μg L^{-1}) jer pri vremenu zadržavanja ovog spoja nisu uočeni pikovi interferencija.



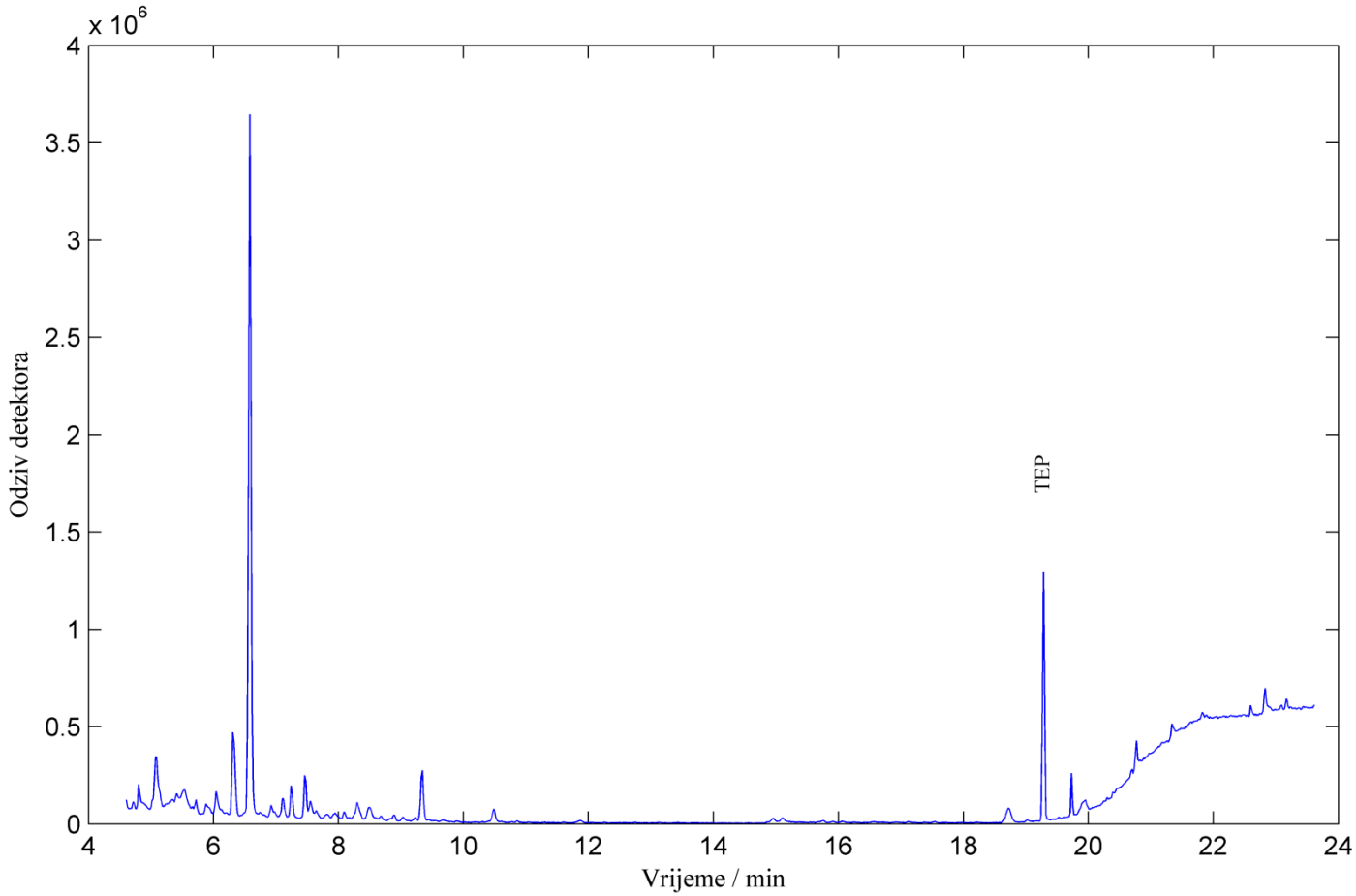
Slika 18. Kromatogram standardne otopine smjese pesticida u acetonu, γ = 100 μg L^{-1}. (1-pirimetanil, 2-klortalonil, 3 i 3'-spiroksamin, 4-metalaksil, 5-tiametoksam, 6-kaptan, 7-fludioksonil, 8-miklobutanil, 9-flusilazol, 10-krezoksim-metil, 11-benalaksil, 12-propikonazol, 13-trifloksistrobin, 14-fluopikolid, 15-tebukonazol, 16-zoksamid, 17-iprodion, 1,1´2,2´-tetrafeniletilen (TEP), 18-lambda-cihalotrin, 19-spirodiklofen, 20-flukinkonazol, 21-boskalid, 22-alfa-cipermetrin, 23-piraklostrobin, 24-deltametrin, 25-azoksistrobin).



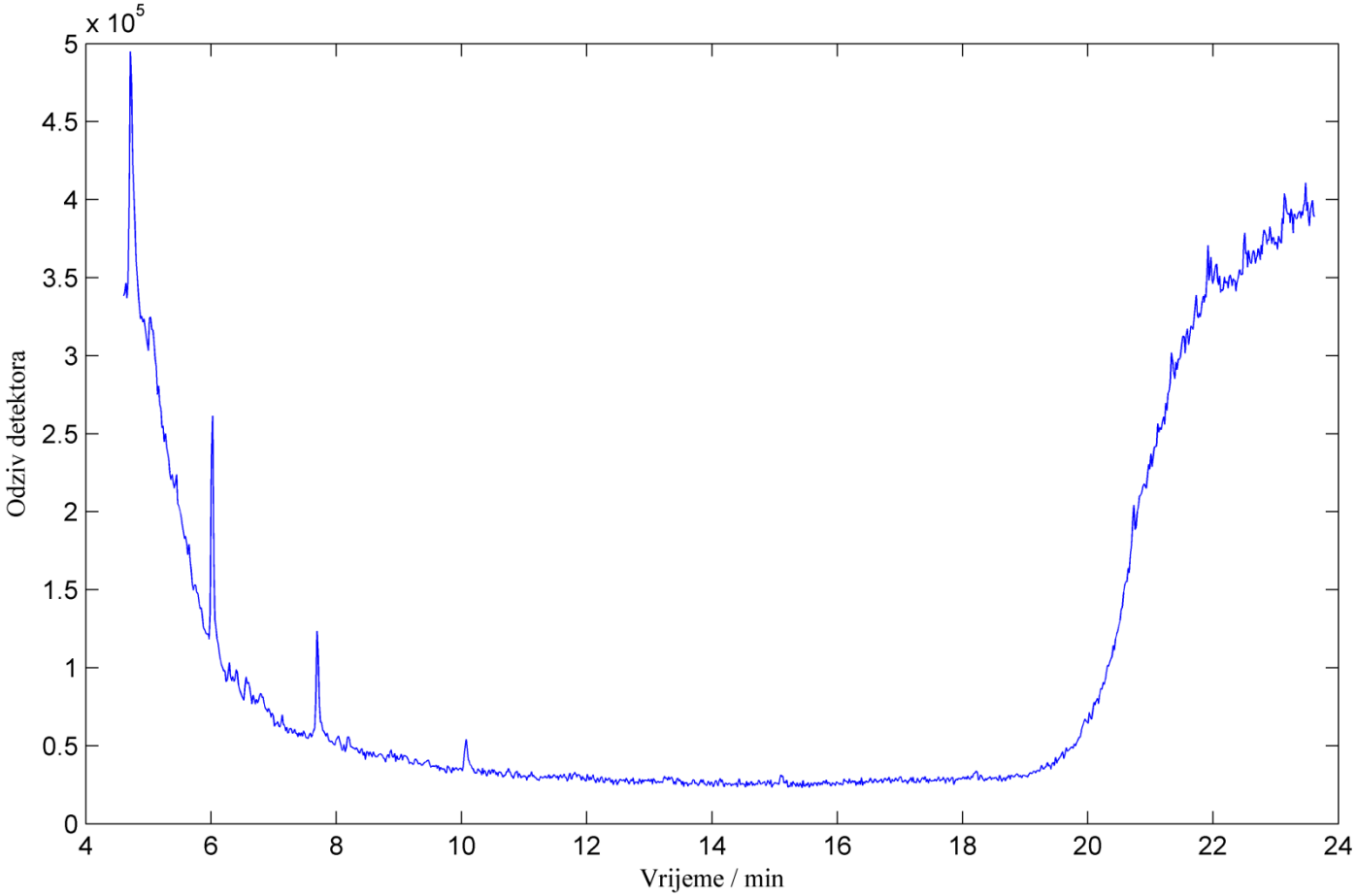
Slika 19. Kromatogram ekstrakta slijepe matrice crnog vina pripravljenog postupkom SPE.



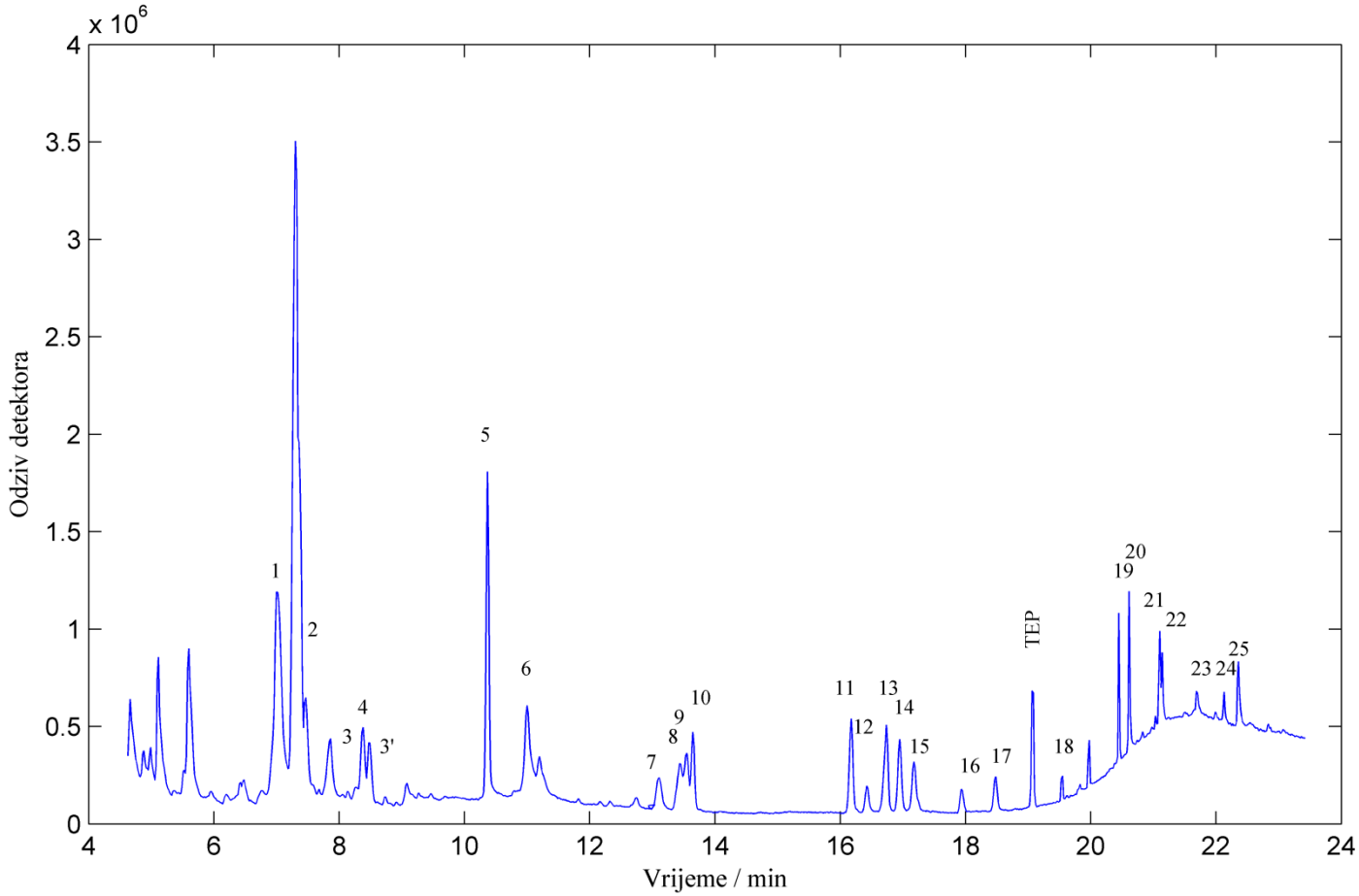
Slika 20. Kromatogram slijepe matrice crnog vina obrađene postupkom QuEChERS.



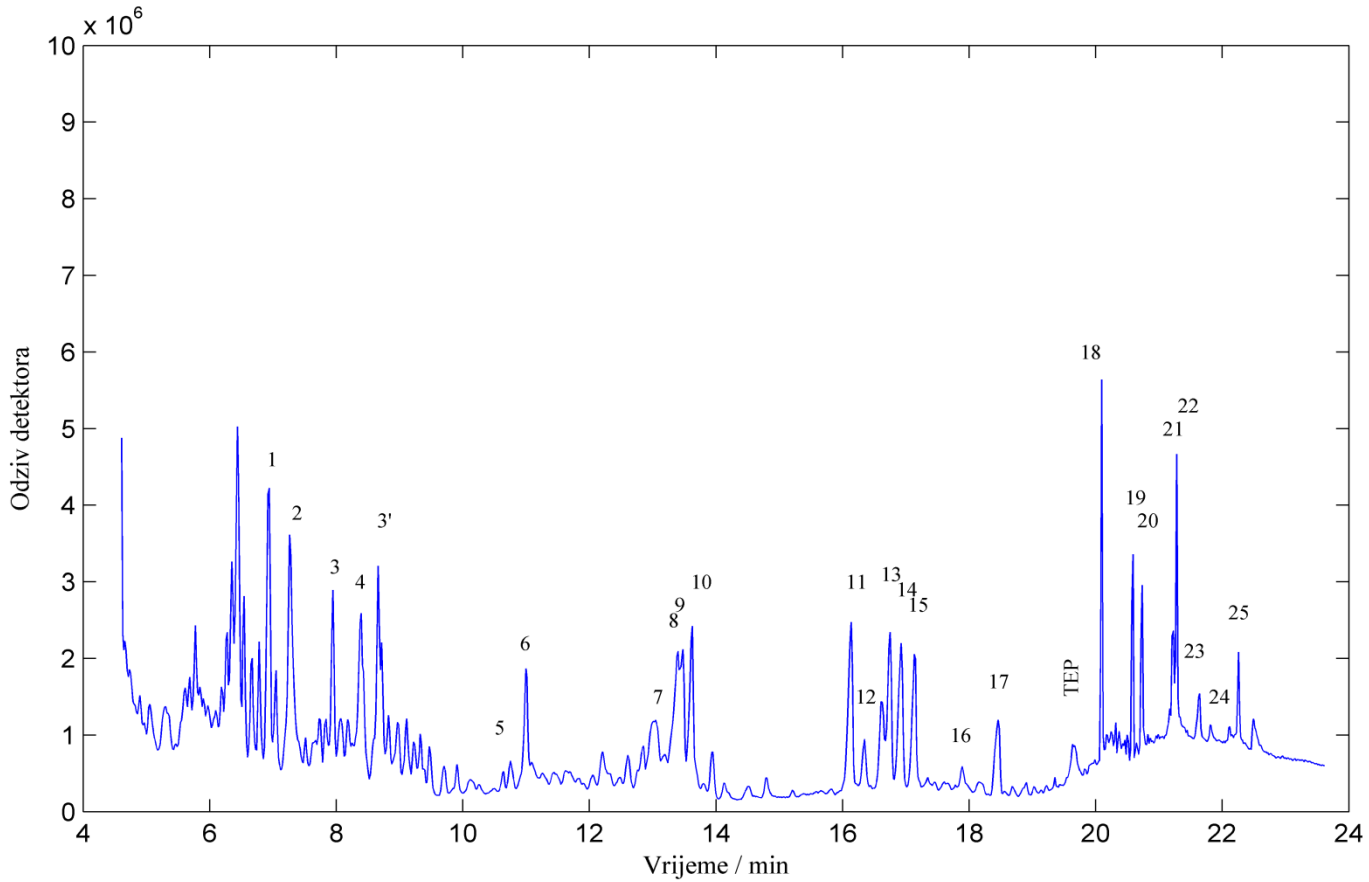
Slika 21. Kromatogram ekstrakta slijepe matrice bijelog vina pripravljenog postupkom SPE.



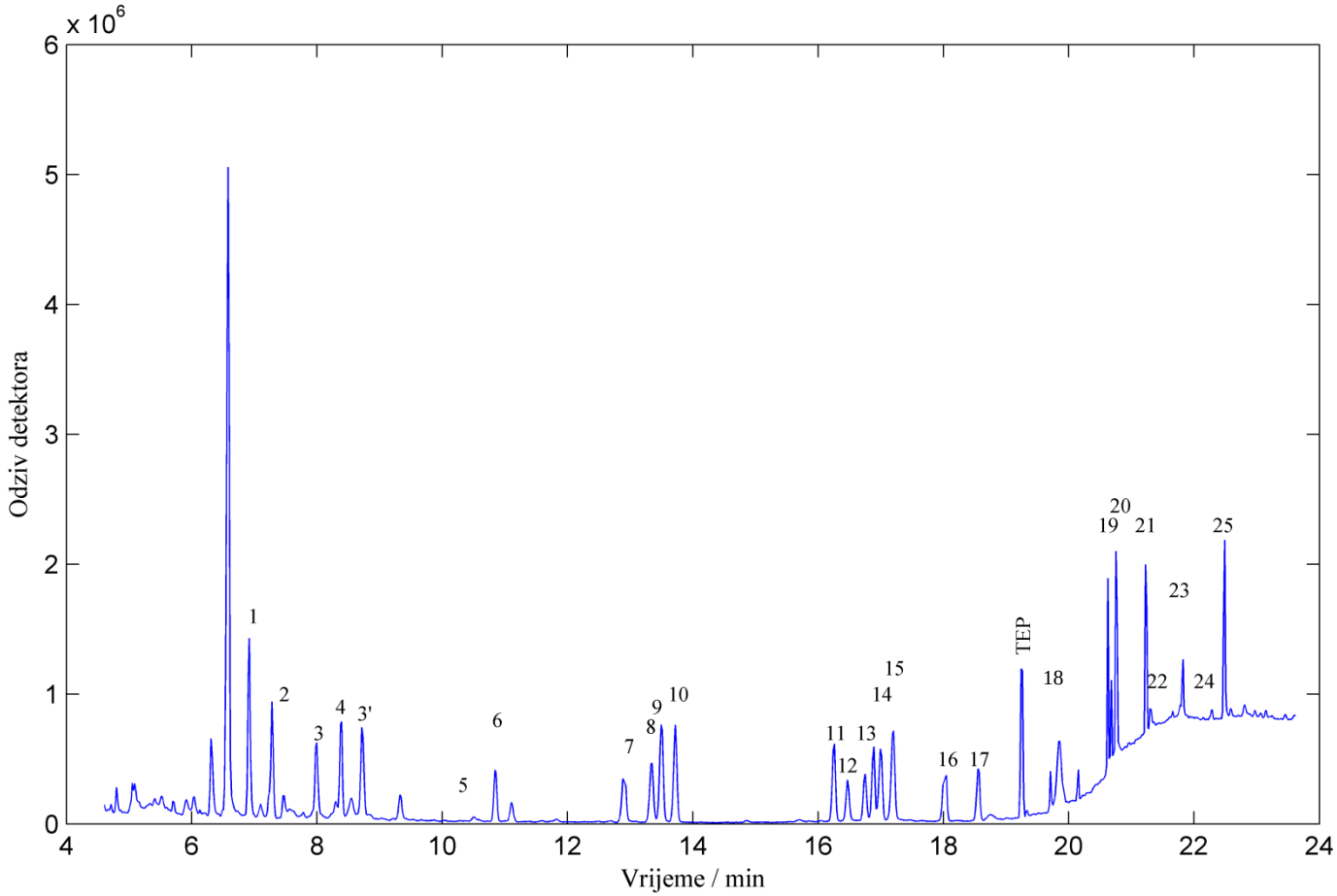
Slika 22. Kromatogram slijepe matrice bijelog vina obrađene postupkom QuEChERS.



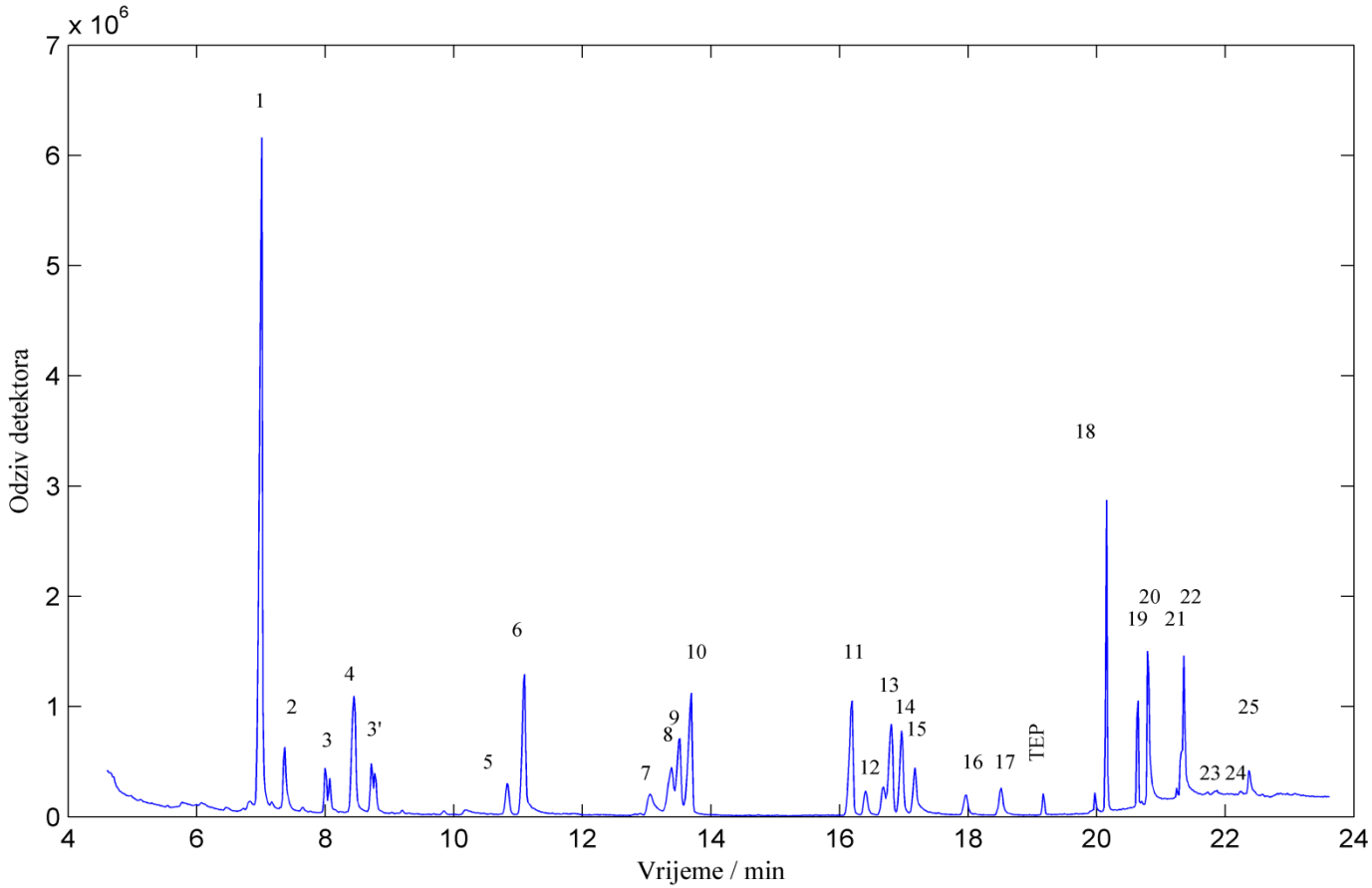
Slika 23. Kromatogram 25 pesticida ekstrahiranih iz matrice crnog vina postupkom SPE, γ = 100 µg L^{-1}. (1-pirimetanil, 2-klortalonil, 3,3'-spiroksamin, 4-metalaksil, 5-tiametoksam, 6-kaptan, 7-fludioksonil, 8-miklobutanil, 9-flusilazol, 10-krezoksim-metil, 11-benalaksil, 12-propikonazol, 13-trifloksistrobin, 14-fluopikolid, 15-tebukonazol, 16-zoksamid, 17-iprodion, 1,1´2,2´-tetrafeniletilen (TEP), 18-lambda-cihalotrin, 19-spirodiklofen, 20-flukinkonazol, 21-boskalid, 22-alfa-cipermetrin, 23-piraklostrobin, 24-deltametrin, 25-azoksistrobin).



Slika 24. Kromatogram 25 pesticida izdvojenih iz matrice crnog vina postupkom QuEChERS, γ = 2000 μg L^{-1}. (1-pirimetanil, 2-klortalonil, 3,3'-spiroksamin, 4-metalaksil, 5-tiametoksam, 6-kaptan, 7-fludioksonil, 8-miklobutanil, 9-flusilazol, 10-krezoksim-metil, 11-benalaksil, 12-propikonazol, 13-trifloksistrobin, 14-fluopikolid, 15-tebukonazol, 16-zoksamid, 17-iprodion, 1,1´2,2´-tetrafeniletilen (TEP), 18-lambda-cihalotrin, 19-spirodiklofen, 20-flukinkonazol, 21-boskalid, 22-alfa-cipermetrin, 23-piraklostrobin, 24-deltametrin, 25-azoksistrobin).



Slika 25. Kromatogram 25 pesticida ekstrahiranih iz matrice bijelog vina postupkom SPE, γ = 100 μg L^{-1}. (1-pirimetanil, 2-klortalonil, 3,3'-spiroksamin, 4-metalaksil, 5-tiametoksam, 6-kaptan, 7-fludioksonil, 8-miklobutanil, 9-flusilazol, 10-krezoksim-metil, 11-benalaksil, 12-propikonazol, 13-trifloksistrobin, 14-fluopikolid, 15-tebukonazol, 16-zoksamid, 17-iprodion, 1,1´2,2´-tetrafeniletilen (TEP), 18-lambda-cihalotrin, 19-spirodiklofen, 20-flukinkonazol, 21-boskalid, 22-alfa-cipermetrin, 23-piraklostrobin, 24-deltametrin, 25-azoksistrobin).



Slika 26. Kromatogram 25 pesticida ekstrahiranih iz matrice bijelog vina postupkom QuEChERS, γ = 2000 µg L^{-1}. (1-pirimetanil, 2-klortalonil, 3,3'-spiroksamin, 4-metalaksil, 5-tiametoksam, 6-kaptan, 7-fludioksonil, 8-miklobutanil, 9-flusilazol, 10-krezoksim-metil, 11-benalaksil, 12-propikonazol, 13-trifloksistrobin, 14-fluopikolid, 15-tebukonazol, 16-zoksamid, 17-iprodion, 1,1´2,2´-tetrafeniletilen (TEP), 18-lambda-cihalotrin, 19-spirodiklofen, 20-flukinkonazol, 21-boskalid, 22-alfa-cipermetrin, 23-piraklostrobin, 24-deltametrin, 25-azoksistrobin).

U kromatogramima prikazanim na Slikama 18 i 23 – 26 vidljivo je da su pikovi određenih pesticida nepotpuno odijeljeni (miklobutanil, flusilazol i krezoksim – metil te boskalid i alfa – cipermetrin). Potpuno razlučivanje pikova ovih spojeva postignuto je upravo praćenjem iona karakterističnih za pojedini pesticid. Miklobutanilu, flusilazolu i krezoksim – metilu zajednički su ioni *m/z* 206, *m/z* 150, *m/z* 245, *m/z* 181 i *m/z* 82. Ioni niskih vrijednosti *m/z* nisu odabrani za praćenje obzirom da su njihovi signali zabilježeni i u spektrima masa interferirajućih spojeva. U spektrima masa flusilazola i krezoksim – metila najintenzivniji je bio signal pri *m/z* 206 što je ujedno bio i prvi potvrdni ion miklobutanila. Međutim, u spektrima masa interferencija također je zabilježen signal velikog intenziteta iona *m/z* 206 te je zadovoljavajuće razlučivanje pikova postignuto praćenjem iona čiji je signal bio manjeg, ali još uvijek velikog intenziteta (*m/z* 233 za flusilazol i *m/z* 116 za krezoksim – metil). Za identifikaciju boskalida odabrani su kao potvrdni ioni *m/z* 342 i *m/z* 344 čiji signali su, međutim, zabilježeni i u spektrima masa alfa – cipermetrina. Stoga su za alfa – cipermetrin kao potvrdni odabrani ioni *m/z* 163 i *m/z* 165. Pri analizi kaptana zabilježena je interferencija čiji je fragmentacijski put bio isti kao fragmentacija kaptana. Obzirom da se nisu mogli izdvojiti ioni fragmenata karakterističnih samo za kaptan, granica određivanja ovog pesticida u vinu bila je izrazito visoka (250 μg L^{-1}).

Postupak određivanja pesticida praćenjem odabranih iona, razrađen za matrice crnog vina, primijenjen je i na matricu bijelog vina. Iz kromatograma slijepih matrica uzoraka vina obrađenih postupcima SPE ili QuEChERS (Slike 19 – 22) može se uočiti da je kod bijelih vina utjecaj matrice uzorka znatno manji u usporedbi s crnim vinima. Interferirajući pikovi sastojaka koji se eluiraju s kolone u periodu od šeste do osme minute zanemarivog su intenziteta iz čega se zaključuje da su koncentracije polifenolnih spojeva znatno niže u bijelim nego u crnim vinima te da odabrani postupci priprave uzorka uspješno uklanjaju interferirajuće sastojke prisutne u matrici uzorka bijelog vina.

4.1.1. Optimizacija instrumentnih uvjeta

Parametri spektrometra masa koji utječu na detekciju odabranih iona su vrijeme praćenja iona odabranih vrijednosti *m/z*, ovisnost odziva o promjenama temperature u pojedinom vremenskom segmentu te ovisnost odziva o brzini snimanja spektara. Uvjeti instrumentne analize optimirani su obzirom na temperaturu, tlak te vrijeme pulsnog načina rada injektora s ciljem postizanja maksimalne osjetljivosti detekcije analiziranih pesticida.

Za odabir optimalne temperature injektora pesticidi su analizirani u temperaturnom rasponu od 180 °C do 280 °C (ukupno 10 mjerenja). Mjerenja su pri svakoj temperaturi provedena u seriji od pet ponavljanja. Najviši odzivi detektora te najniže relativne standardne devijacije (RSD <5) za većinu su pesticida zabilježene pri temperaturi od 250 °C pa je ta temperatura injektora odabrana za daljnja istraživanja.

Mjerenja za odabir optimalnog tlaka i vremena pulsnog načina rada injektora provedena su u rasponu od 0,1 min do 1,5 min za puls (ukupno 15 mjerenja) te od 0,689 bara do 4,136 bara za tlak (ukupno šest mjerenja). Mjerenja su provedena u seriji od pet ponavljanja. Kao i kod odabira optimalne temperature injektora kriteriji za odabir bili su intenziteti odziva detektora i vrijednosti RSD. Najviši odzivi i najniže relativne standardne devijacije (RSD <5) za većinu su pesticida zabilježene pri vremenu od 0,6 min i tlaku od 3,447 bara, pa su te vrijednosti korištene u daljnjim istraživanjima.

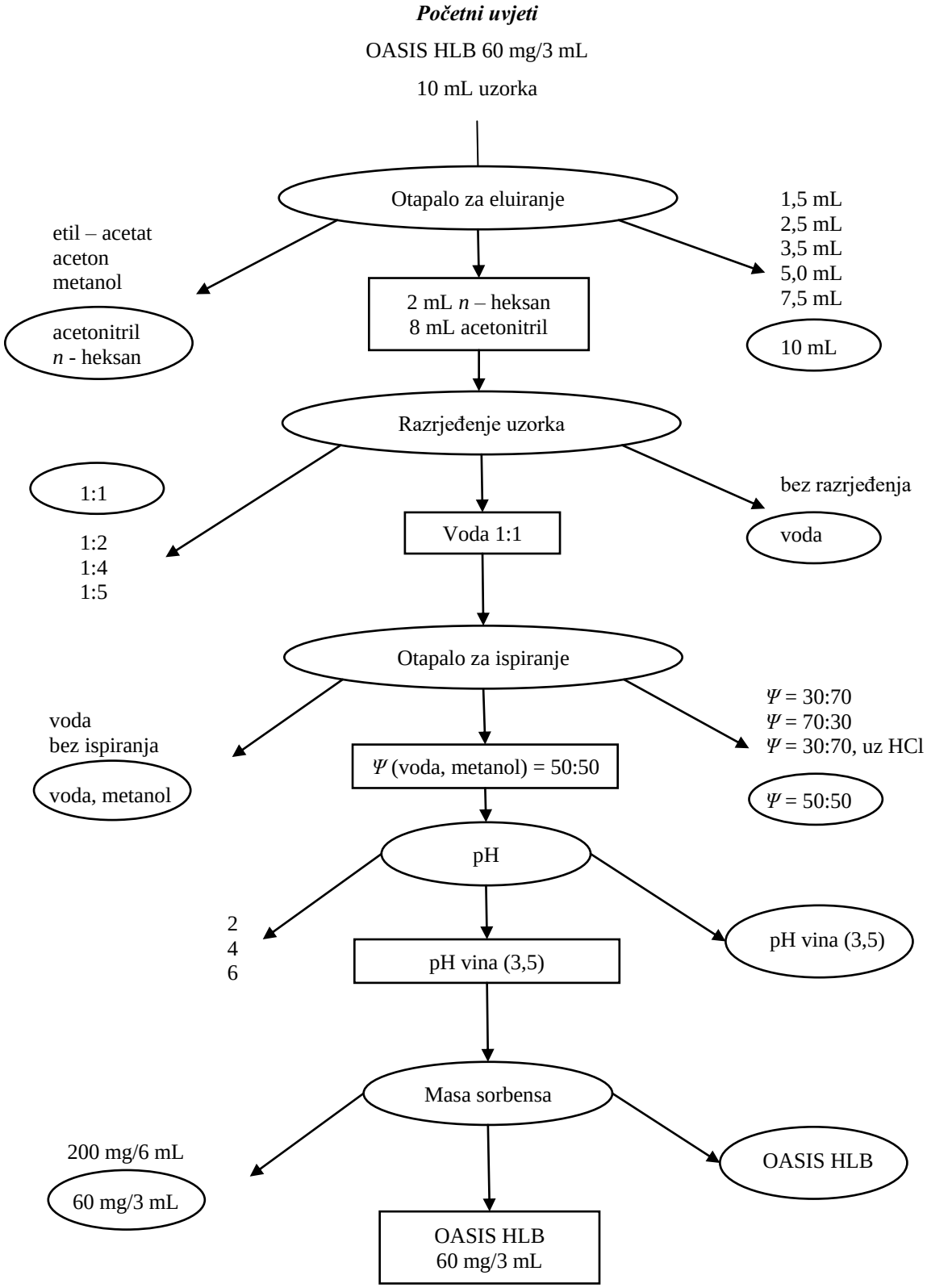
Za uspješno odjeljivanje pikova 25 pesticida neophodno je optimirati temperaturni program plinskokromatografske kolone. Kako su pesticidi osjetljivi na temperaturu, vrlo je bitno namjestiti temperature i zadržavanje na pojedinim temperaturama plinskokromatografske kolone. Stoga optimizacija, ovog dijela optimizacije predstavlja najvažniji korak. U tu svrhu ispitane su početne temperature programa u rasponu od 110 °C do 150 °C pri čemu je utvrđeno da je temperatura od 120 °C bila optimalna za odjeljivanje svih 25 pesticida. Temperature niže od 120 °C rezultirale su preklapanjem vremena zadržavanja pesticida s vremenima zadržavanja otapala, dok su temperature više od 120 °C rezultirale neoravilnim izgledima pikova u vremenskom periodu izlaženja od 6 – 10 min. Temperaturni program bio je rasponu od 120 °C do 320 °C. Za uspješno odjeljivanje 25 pesticida potrebno je bilo namjestiti ukupno 7 podizanja temperature s različitim vremenima zadržavanja na tim temperaturama unutar tog raspona. Temperaturni program plinskokromatografske kolone prikazan je na Slici 17.

4.2. Postupci ekstrakcije pesticida iz uzoraka vina

Većina analitičkih metoda za određivanje pesticida u različitim tipovima uzoraka temelji se na optimizaciji već postojećih postupaka priprave uzorka obzirom da ti postupci nisu jedinstveno primjenjivi za sve uzorke složenog sastava. Pesticidi u uzorcima okoliša često su prisutni u tragovima pa je odabir postupka ekstrakcije pesticida iz uzorka ključan korak u cjelokupnoj analitičkoj metodi. Multirezidualne metode zahtijevaju brze, učinkovite, robusne te prvenstveno ekonomične postupke ekstrakcije što je često vrlo teško zadovoljiti obzirom na širok raspon fizikalno – kemijskih svojstava pesticida. Neoptimirane metode često rezultiraju nepotpunom ekstrakcijom analita što smanjuje osjetljivost i selektivnost cjelokupne analitičke metode. Optimiranjem postupaka priprave uzorka (trajanje postupka priprave, vrste i volumena otapala za ekstrakciju/eluiranje) istraživači dolaze do novih zaključaka što rezultira modifikacijama postojećih metoda te razvojem novih.

4.2.1. Ekstrakcija pesticida iz vina na čvrstoj fazi

Ekstrakcija na čvrstoj fazi danas je jedan od najuspješnijih postupaka ekstrakcije pesticida iz različitih uzoraka ponajprije zbog njene robustnosti i učinkovitosti. Optimizacija postupka SPE primijenjenog u ovom radu provedena je dodatkom analiziranih pesticida u slijepu matricu uzorka crnog vina. Crno je vino odabrano zbog kompleksnosti matrice uzorka, odnosno zbog mogućeg izraženijeg utjecaja matrice uzorka na djelotvornost i selektivnost ekstrakcije ciljanih analita u odnosu na matricu bijelog vina. Neposredno prije ekstrakcije, u slijepu matricu uzorka crnog vina dodana je standardna otopina smjese pesticida pripravljena u acetonu. Razvoj i optimizacija postupka SPE provedeni su pri koncentraciji pesticida u vinu od 100 μg L^{-1}. Početni uvjeti i tijek optimizacije prikazan je na Slici 27, a detaljniji rezultati (analitički povrati pesticida) za pojedine korake optimizacije prikazani su u PRILOZIMA IV – IX. Za SPE vrlo je bitan odabir odgovarajućeg sorbensa kojim će se postići visoka selektivnost i učinkovitost ekstrakcije analita. Za ekstrakciju pesticida iz vina postupkom SPE odabran je sorbens OASIS HLB, ponajviše zbog svojih hidrofilno – lipofilnih karakteristika te njegove široke primjene u analizama pesticida u hrani i uzorcima okoliša.[9,11,14,15] OASIS HLB je sorbens koji se primjenjuje u sustavu obrnutih faza što je optimalno za ekstrakciju kiselih, bazičnih te neutralnih analita. Po kemijskom sastavu je kopolimer lipofilnog divinilbenzena i hidrofilnog *N* – vinilpirolidona.

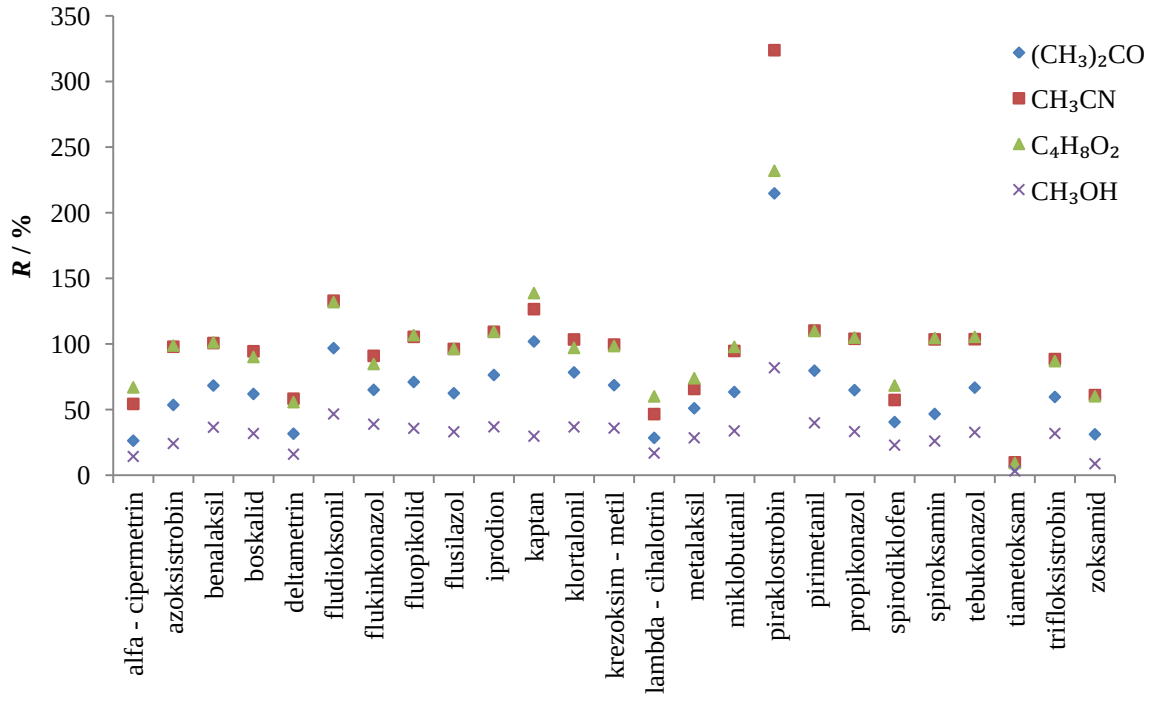


Slika 27. Detaljan prikaz optimizacije ekstrakcije pesticida iz vina na čvrstoj fazi.

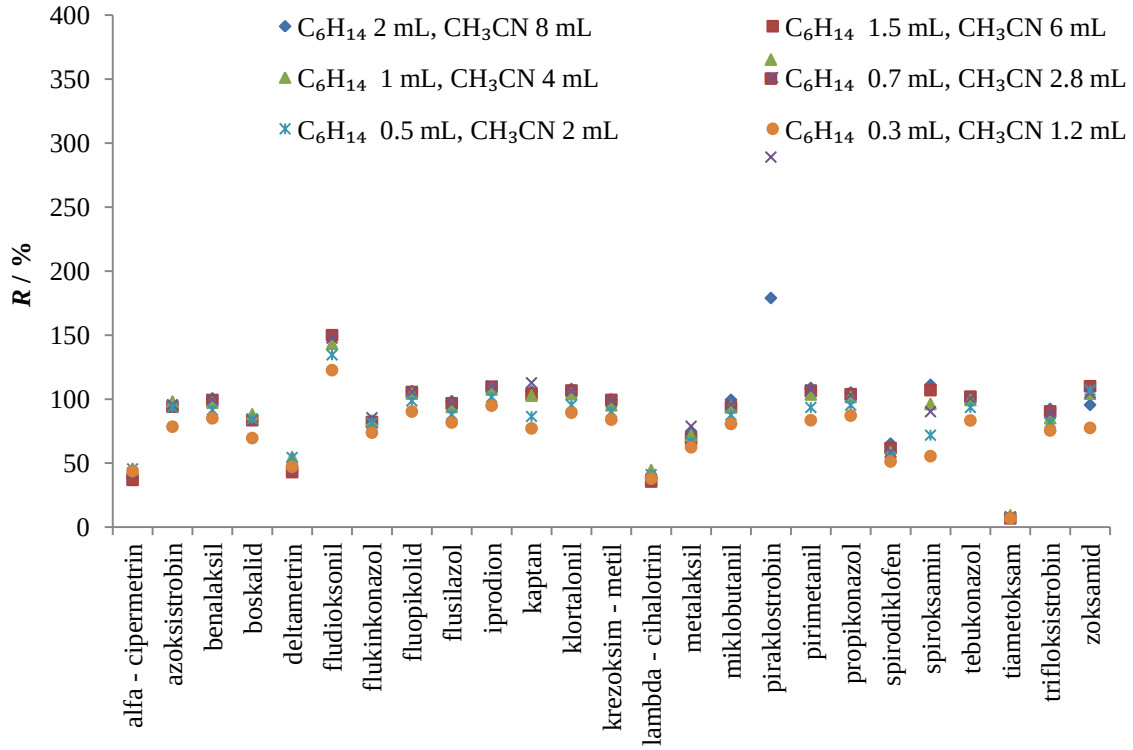
Početni uvjeti za optimizaciju ekstrakcije pesticida iz vina postupkom SPE odabrani su prema literaturnim navodima gdje je metanol izabran kao otapalo prikladno za eluiranje pesticida sa sorbensa.[9,11] Međutim, preliminarna istraživanja su pokazala da se s metanolom kao eluensom postižu izrazito niski analitički povrati analiziranih pesticida iz vina (<20 %).

Stoga su kao otapala za eluiranje, uz metanol, ispitani acetonitril, etil – acetat i aceton obzirom da su ta otapala prikladna za eluiranje sorbiranih analita različitih polarnosti.[4,9,10,15] Početni volumen za eluiranje bio je za svako otapalo 10 mL (5 x 2 mL). Acetonitril i etil – acetat pokazali su se prikladnim otapalima za eluiranje sorbiranih pesticida pri čemu su analitički povrati većine pesticida bili između 70 % i 120 %. Niži povrati (40 % do 60 %) dobiveni su za deltametrin, lambda – cihalotrin, alfa – cipermetrin, zoksamid i spirodiklofen, dok su povrati fludioksonila i kaptana bili viši od 120 %. U usporedbi s acetonitrilom i etil – acetatom, s acetonom kao otapalom za eluiranje analitički povrati svih pesticida bili su niži (<70 %). Povrati u rasponu od 80 % do 110 % za većinu su pesticida postignuti s acetonitrilom, pa je to otapalo odabrano za daljnja istraživanja. Acetonitril se pokazao prikladnim jer se kao polarno otapalo miješa s vodom, ali također ima i hidrofobne značajke što omogućuje učinkovitu ekstrakciju ostataka i polarnih i nepolarnih pesticida iz uzoraka.[43] Obzirom da većina pesticida ima nepolarne karakteristike (log K_{ow} >3), dodatna primjena nepolarnog otapala za eluiranje sorbiranih spojeva mogla bi imati pozitivne učinke na djelotvornost ekstrakcije pesticida.[14] Eluiranjem analita *n* – heksanom i potom acetonitrilom postignuti su viši analitčki povrati svih pesticida od kojih valja izdvojiti spirodiklofen (73 %) i zoksamid (108 %). Primjena *n* – heksana rezultirala je smanjenjem interferencija sastojaka matrice uzorka što se moglo vidjeti na pripadnom kromatogramu. Ovisnost analitičkog povrata pesticida iz crnog vina o vrsti otapala primijenjenog za njhovo eluiranje sa sorbensa OASIS HLB prikazana je na Slici 28.

Djelotvornost eluiranja sorbiranih pesticida ispitana je i s različitim volumenima acetonitrila i *n* – heksana zadržavajući pritom omjer njihovih volumena konstantnim (4:1). Primjećeno je da su pri ukupnim volumenima tih dvaju otapala manjim od 10 mL (7,5 mL, 5 mL, 3,5 mL, 2,5 mL i 1,5 mL) analitički povrati svih pesticida bili niži. Optimalnim se pokazalo eluiranje sorbiranih pesticida najprije s 2 mL *n* – heksana, a zatim s 8 mL (4 x 2 mL) acetonitrila (Slika 29).



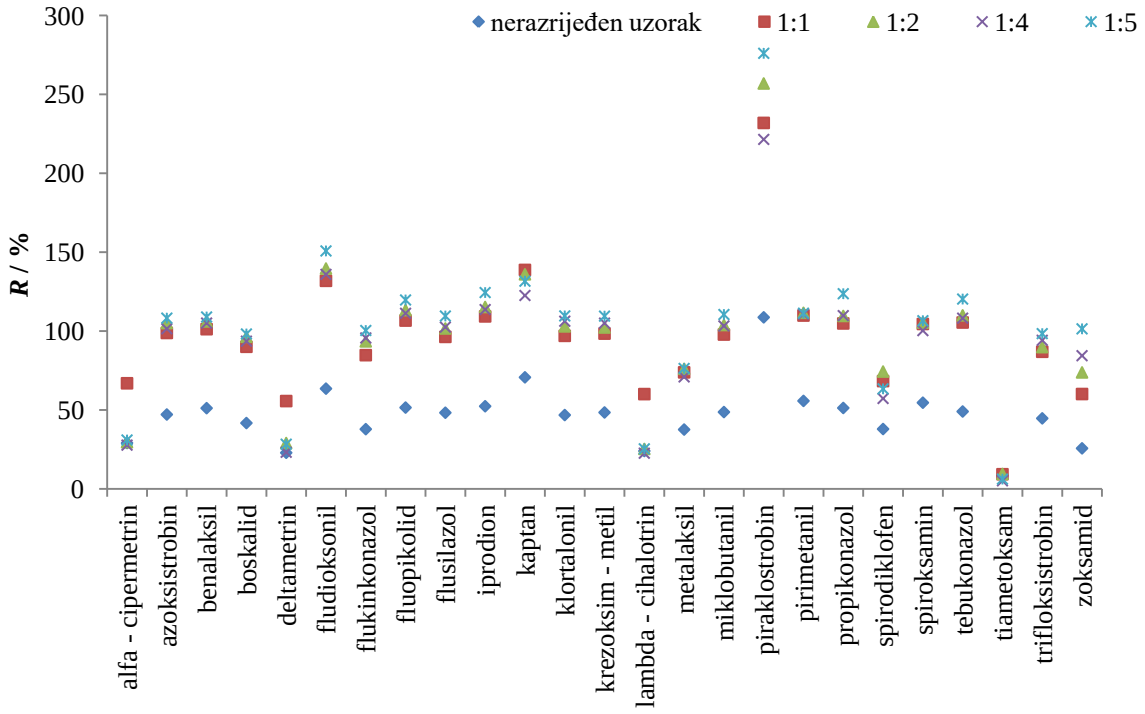
Slika 28. Optimizacija SPE – ovisnost analitičkog povrata (*R*) pesticida iz crnog vina o vrsti otapala za eluiranje sa sorbensa.



Slika 29. Optimizacija SPE – ovisnost analitičkog povrata (*R*) pesticida iz crnog vina o volumenu otapala (*n* – heksana i acetonitrila) za eluiranje.

Izrazito niski analitički povrati postignuti su eluiranjem sorbiranih pesticida s metanolom (od 20 % do 30 %). Crno vino je kompleksna matrica koja sadrži različite organske spojeve od kojih valja izdvojiti polifenolne spojeve. Zbog svoje velike molekulske mase polifenolni spojevi mogu zaostajati na sorbensu ili sa sorbensa koeluirati zajedno s analitom. Jedni od najzastupljenijih spojeva prisutnih u vinu su antocijanini koji vinu daju crvenu boju. Razlog niskim analitičkim povratima pesticida uz primjenu metanola kao eluensa može biti prisutnost antocijanina što je vizualno potvrđeno crvenom bojom eluata.[10,114]

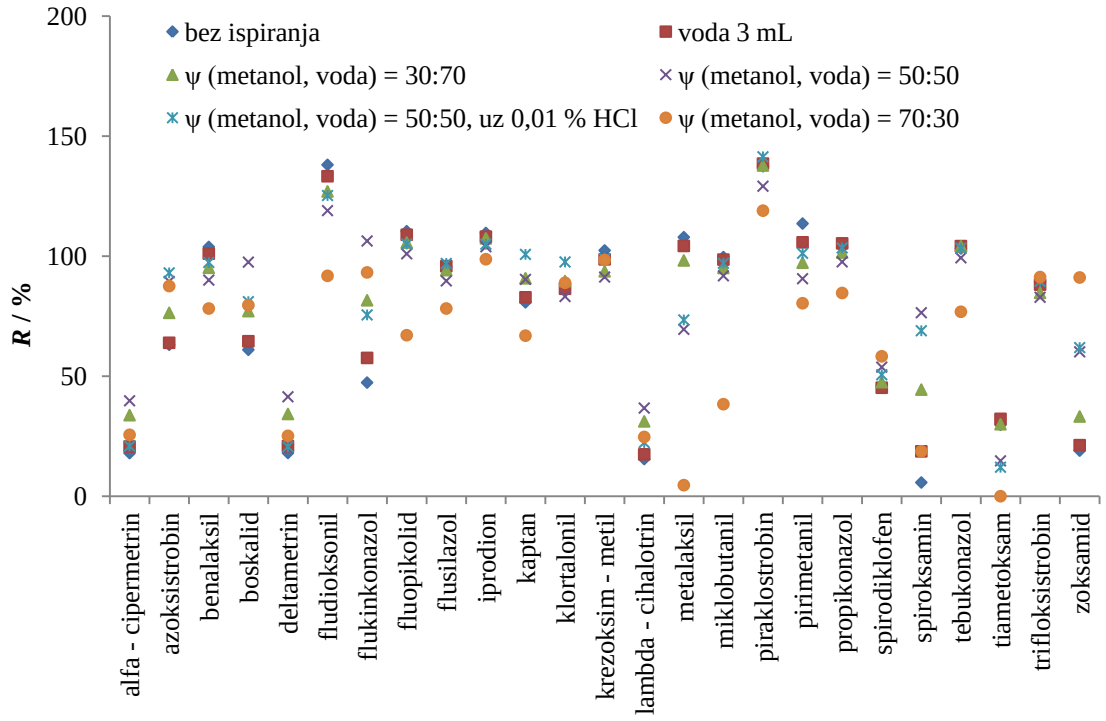
Vrlo bitan korak u optimizaciji postupka SPE je razrjeđenje uzorka. Relativno niski analitički povrati svih analiziranih pesticida (≤50 %), postignuti bez razrjeđivanja uzorka vina, najvjerojatnije su posljedica visokog udjela etanola u vinu (od 11 % do 15 %).[9] Uz navedeno, valja napomenuti da je utjecaj matrice nerazrijeđenog uzorka na djelotvornost SPE veći od utjecaja matrice razrijeđenog uzorka što rezultira samo djelomičnom ekstrakcijom pesticida iz vina. Ispitana je ovisnost djelotvornosti postupka SPE o različitim razrjeđenjima uzorka vina s vodom (1:1, 1:2, 1:4, 1:5). Pri svim razrjeđenjima postignuti su za većinu pesticida prihvatljivi analitički povrati (70 % do 120 %). Međutim, povrati deltametrina, lambda – cihalotrina i alfa – cipermetrina bili su viši (60 %) pri razrjeđenju uzorka s vodom u omjeru 1:1, dok su pri ostalim razrjeđenjima bili <20 %. Razrjeđenjem uzorka smanjuje se mogući utjecaj matrice na djelotvornost postupka, ali se ujedno smanjuje i osjetljivost metode, što posljedično utječe na povišenje granice detekcije analita.[48] Obzirom da se analitički povrati pesticida (osim povrata piretroida) postignuti pri različitim razrjeđenjima uzorka s vodom nisu značajno razlikovali te radi postizanja veće osjetljivosti, za daljnja je istraživanja odabrano razrjeđenje uzorka vina s vodom u omjeru 1:1. Utjecaj razrjeđenja uzorka vina na djelotvornost ekstrakcije pesticida iz vina postupkom SPE prikazan je na Slici 30.



Slika 30. Optimizacija SPE – ovisnost analitičkog povrata (*R*) pesticida iz crnog vina o razrjeđenju uzorka s vodom.

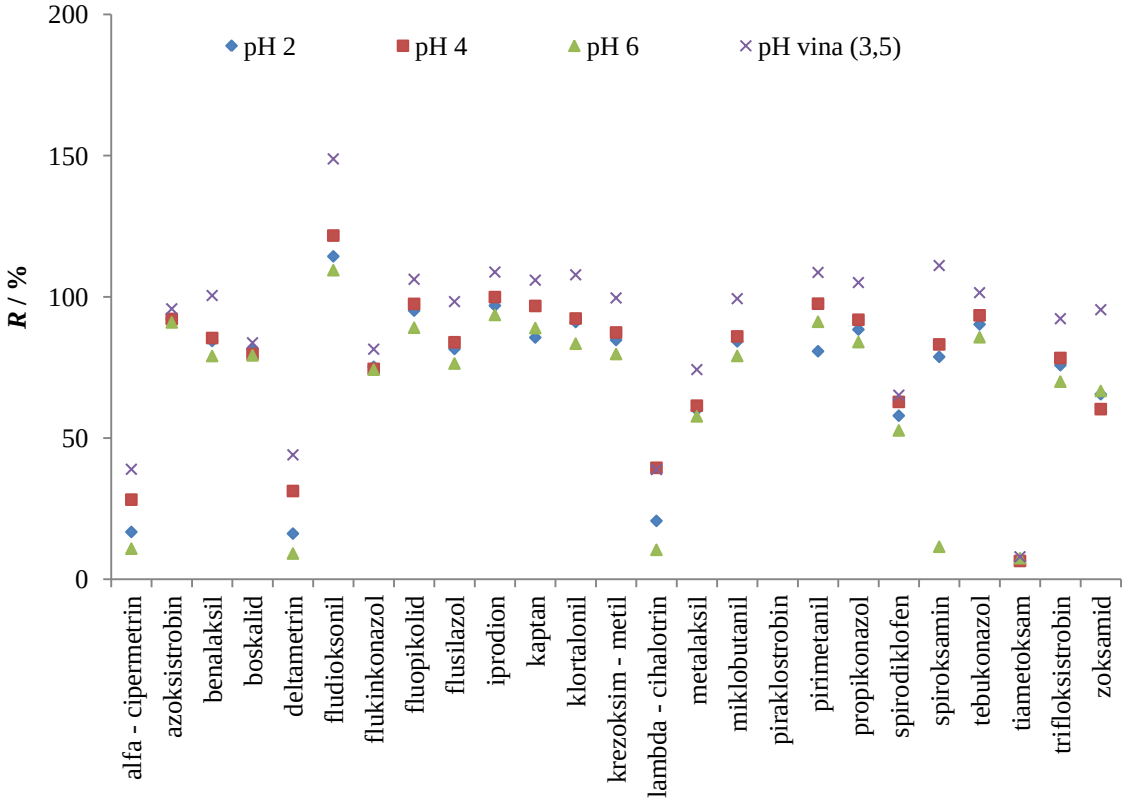
Kao što je već spomenuto, prisutnost antocijanina u eluatu potvrđena je crvenom bojom eluata i može rezultirati djelomičnom ekstrakcijom pesticida iz uzorka vina. Vrlo često se u optimizaciju postupka SPE uključuje dodatni korak, tj. ispiranje sorbensa s odgovarajućim otapalom prije eluiranja ciljanih analita. Ispiranje sorbensa prvenstveno služi za uklanjanje interferirajućih sastojaka matrice uzorka. Otapalo za ispiranje mora imati takve karakteristike da može ukloniti interferirajuće spojeve, a da se pritom analit zadrži na sorbensu. Za tu svrhu najčešće se koristi voda obzirom da se pokazala optimalnim otapalom za ispiranje interferirajućih spojeva. Međutim, u okviru optimizacije postupka SPE za određivanje pesticida u uzorcima vina ispiranje sorbensa s vodom nije dalo zadovoljavajuće rezultate za osam pesticida čiji su analitički povrati bili <60 %. Prema literaturnim podacima najčešće otapalo za eluiranje sorbiranih antocijanina je smjesa metanola i vode uz mogućnost dodatka kiseline u različitim omjerima.[115] Metanol se u ovom istraživanju pokazao neodgovarajućim otapalom za eluiranje pesticida sa sorbensa OASIS HLB, ali se pokazao vrlo dobrim izborom za eluiranje sorbiranih antocijanina (izrazito crvena boja eluata). U tu svrhu ispitani su različiti volumni omjeri metanola i vode u otapalu za ispiranje. Najboljim se pokazao ψ

(metanol, voda) = 50:50. Uz ispiranje sorbensa ovom smjesom otapala analitički povrati većine pesticida bili su od 90 % do 105 %. Za deltametrin, lambda – cihalotrin, alfa – cipermetrin i spirodiklofen postignuti su povrati od 40 % do 70 %. Previsoki povrat fludioksonila, postignut bez ispiranja sorbensa, snižen je na 119 %. Uz niži volumni omjer metanola i vode (30:70) u otapalu za ispiranje, postignuti su niži analitički povrati spiroksamina (44 %), zoksamida (33 %), spirodiklofena (47 %), flukinkonazola (82 %), deltametrina, lambda – cihalotrina i alfa –cipermetrina (<40 %). Sniženje analitičkih povrata pesticida uočeno je i uz viši omjer metanola vode (70:30) u otapalu za ispiranje. Dodatak kiseline u otapalo za ispiranje nije značajnije utjecao na analitičke povrate analiziranih pesticida. Za daljnja je istraživanja kao otapalo za ispiranje odabrana smjesa *ψ* (metanol, voda) = 50:50 bez dodatka kiseline. Rezultati su u skladu s literaturnim navodima prema kojima je smjesa metanola i vode najbolje otapalo za ekstrakciju antocijanina iz uzoraka vina što se ujedno moglo i vizualno potvrditi (crvena boja nakon ispiranja).[115] Nakon ispiranja sorbensa sa smjesom metanola i vode, eluati pesticida u acetonitrilu bili su bezbojni. Ispiranje sorbensa s različitim volumenima smjese smjese *ψ* (metanol, voda) = 50:50 (1 mL, 3 mL, 5 mL) nisu uočene značajnije razlike u analitičkim povratima pesticida, pa je kao optimalan odabran volumen od 3 mL.



Slika 31. Optimizacija SPE – ovisnost analitičkog povrata (*R*) pesticida iz crnog vina o sastavu otapala za ispiranje sorbensa.

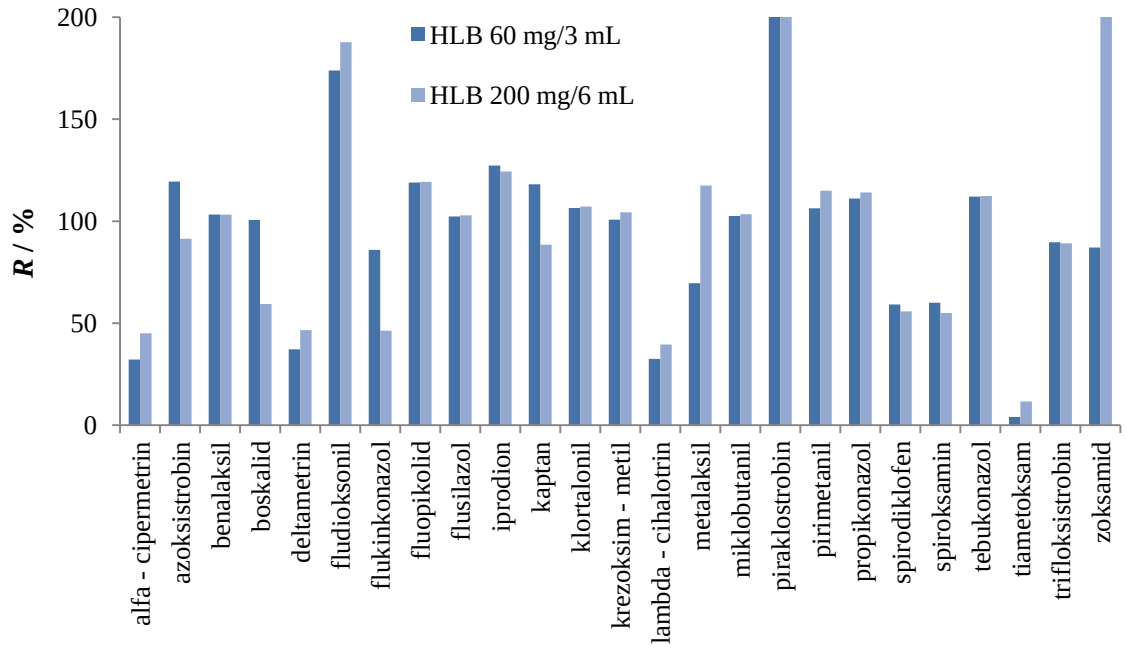
Vino je prvenstveno vodeni medij, pa u njemu sadržane tvari mogu disocirati. Prema tome, pH uzorka vina može utjecati na kemijski oblik tih tvari. Različiti kemijski oblici pojedinih tvari različito će se zadržavati na SPE – sorbensu. Stoga je ispitan utjecaj pH vrijednosti uzorka vina na djelotvornost ekstrakcije pesticida postupkom SPE. Uspoređeni su analitički povrati pesticida postignuti uz prirodni pH vina od 3,5 te uz pH 2, 4 i 6. Rezultati za piraklostrobin bili su iznad 200 % te zbog jednostavnijeg prikaza nisu prikazani na Slici 32. Vrijednosti su dane u PRILOGU VIII. Rezultati su pokazali da pH uzorka vina značajno ne utječe na djelotvornost ekstrakcije pesticida na čvrstoj fazi (Slika 32) što je u skladu s literaturnim podacima.[9] Optimalni analitički povrati postignuti su iz vina prirodnog pH (3,5).



Slika 32. Optimizacija SPE – ovisnost analitičkog povrata (*R*) pesticida iz crnog vina o pH uzorka.

U okviru ovog istraživanja ispitane su za ekstrakciju pesticida iz vina postupkom SPE dvije različite mase sorbensa: OASIS HLB 60 mg/3 mL te OASIS HLB 200 mg/6 mL. Kao što se može vidjeti na Slici 33, za većinu su pesticida s obje mase sorbensa postignuti prihvatljivi analitički povrati (70 % do 120 %), uz neznatno bolje povrate na sorbensu OASIS HLB 60 mg/3 mL. Analitički povrati tiametoksama bili su izrazito niski (<10 %) bez obzira na masu

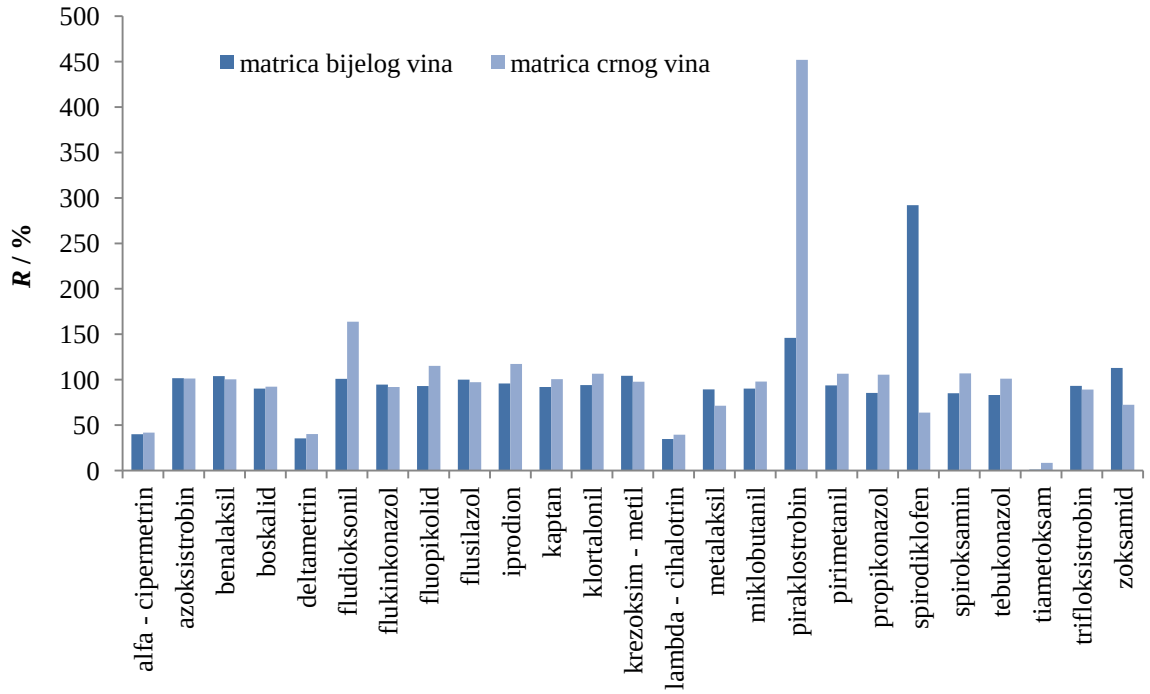
sorbensa što upućuje da OASIS HLB nije odgovarajući sorbens za njegovu ekstrakciju iz vina. Povrati lambda – cihalotrina, alfa – cipermetrina i deltametrina te spirodiklofena također su bili niži pri obje mase sorbensa (50 %), dok je povrat spirodiklofena (<60 %) bio neznatno viši pri većoj masi sorbensa. OASIS HLB 60 mg/3 mL se pokazao se znatno boljim izborom za ekstrakciju boskalida (100 %), flukinkonazola (86 %), kaptana (118 %) i zoksamida (87 %) nego OASIS HLB 200 mg/6 mL na kojem su analitički povrati bili 59 % za boskalid, 46 % za flukinkonazol, 89 % za kaptan te čak 273 % za zoksamid. Jedan od razloga za različite analitičke povrate pesticida iz vina pri primjeni dviju različitih masa sorbensa OASIS HLB je nedovoljno uklanjanje interferirajućih sastojaka prisutnih u matrici uzorka pri ekstrakciji ciljanih analita na masi sorbensa od 200 mg. Naime, sastojci matrice uzorka organske su prirode, pri čemu valja izdvojiti fenolne i polifenolne spojeve velike molekulske mase koji se vežu na sorbens te otežavaju eluiranje pesticida i/ili koeluiraju zajedno s njima. Pretpostavlja se da je za veću masu sorbensa potreban i veći volumen otapala za uklanjanje/ispiranje interferirajućih sastojaka kao i veći volumen otapala za eluiranje pesticida. Obzirom da se manja masa sorbensa pokazala odgovarajućom za ekstrakciju većine pesticida iz vina, za daljnja istraživanja odabran je OASIS HLB 60 mg/3 mL.



Slika 33. Optimizacija SPE – ovisnost analitičkog povrata (*R*) pesticida iz crnog vina o masi sorbensa OASIS HLB.

Analitički povrat za piraklostrobin bio je viši od 200 % pri obje mase sorbensa kao i za zoksamid čiji je povrat bio viši od 200 % na sorbensu OASIS HLB 200 mg/6 mL. Zbog jednostavnijeg prikaza povrati za navedene pesticide nisu prikazani na Slici 33, već su navedeni u PRILOGU IX.

Tijekom optimizacije ekstrakcije pesticida iz crnog vina postupkom SPE izrazito niski analitički povrati postignuti su za tiametoksam što je i očekivano obzirom da se radi o izrazito hidrofilnom pesticidu (log K_{ow} = -0,13). Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da je za određivanje tiametoksama u vinu potrebna upotreba polarnijih otapala, kao i analiza tekućinskom, a ne plinskom kromatografijom. Za razliku od tiametoksama, izrazito visoki analitički povrati piraklostrobina (>300 %) upućuju na izražen utjecaj matrice uzorka koji je detaljno prikazan u poglavlju 4.4. Djelotvornost postupka SPE optimiranog za matricu crnog vina, ispitana je i za matricu bijelog vina (Slika 34) pri čemu su za većinu pesticida postignuti prihvatljivi analitički povrati. Učinkovita ekstrakcija pesticida iz bijelog vina upućuje na smanjen utjecaj matrice uzorka. Na temelju tih rezultata može se zaključiti da je utjecaj matrice na djelotvornost određivanja pesticida u vinu znatno slabiji kod bijelog nego kod crnog vina što je pokazano i potvrđeno u poglavlju 4.4.

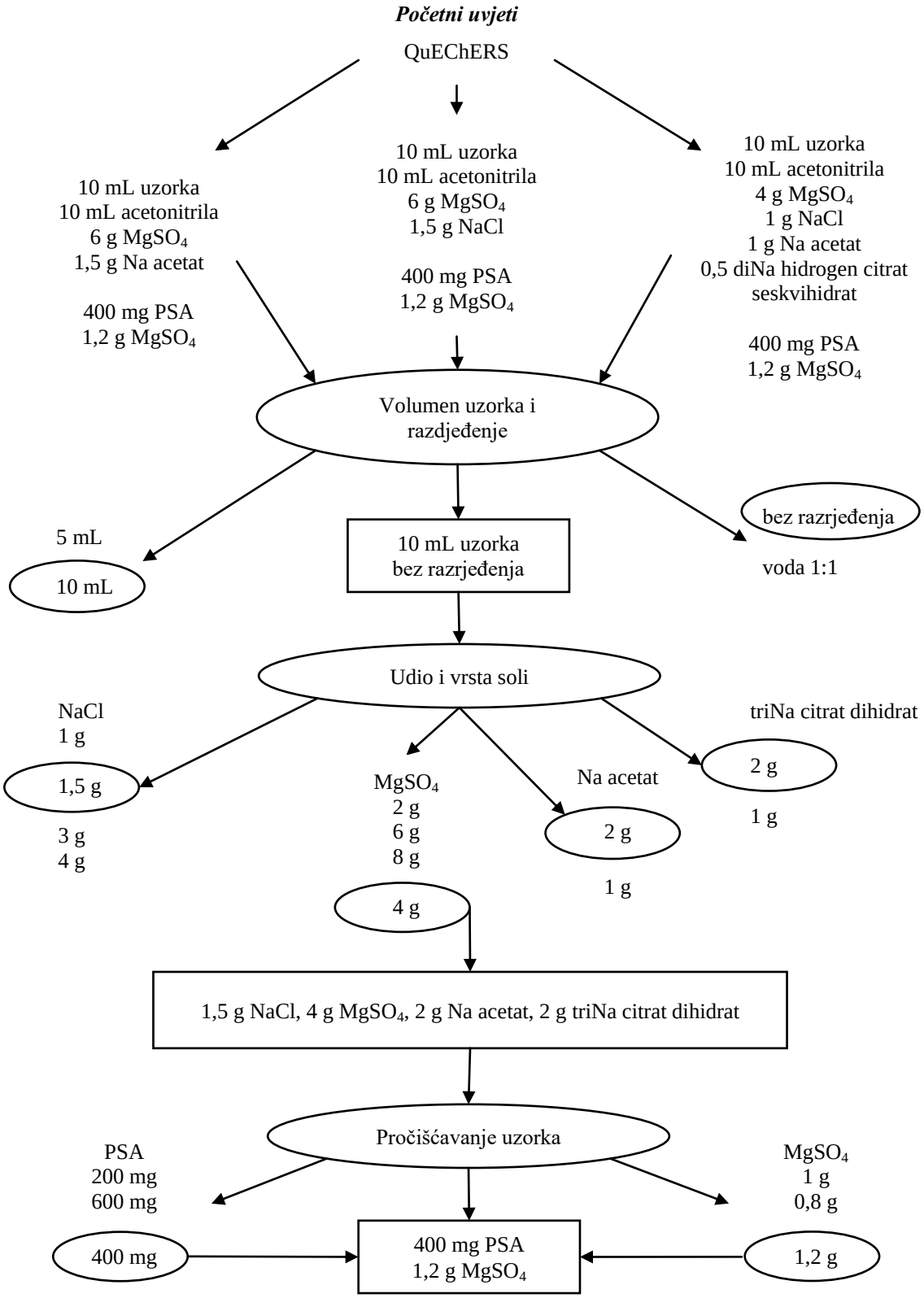


Slika 34. Usporedba analitičkih povrata (*R*) pesticida iz matrica bijelog i crnog vina postignutih optimiranim postupkom ekstrakcije na čvrstoj fazi.

4.2.2. Ekstrakcija pesticida iz vina postupkom QuEChERS

Prema dostupnim literaturnim podacima postupak QuEChERS, izvorno razvijen za ekstrakciju pesticida iz uzoraka hrane,[48,95] dosad nije optimiran ni primijenjen na uzorke vina. Cilj istraživanja u ovom radu bio je razviti i optimirati postupak ekstrakcije pesticida iz vina koji se temelji na postupku QuEChERS. Za razvoj i optimizaciju tog postupka korištena je slijepa matrica crnog vina zbog mogućeg izraženijeg utjecaja matrice uzorka na djelotvornost i selektivnost određivanja pesticida u usporedbi s matricom bijelog vina. Neposredno prije ekstrakcije, u slijepu matricu uzorka crnog vina dodana je standardna otopina smjese pesticida pripravljena u ekstraktu matrice uzorka crnog vina, te 10 μL unutarnjeg standarda (TEP) koncentracije 100 μg mL^{-1}. Razvoj i optimizacija postupka ekstrakcije provedeni su pri koncentraciji pesticida u vinu od 100 μg L^{-1}. Početni uvjeti i tijek optimizacije prikazani su na Slici 35, a detaljniji rezultati (analitički povrati pesticida) za pojedine korake optimizacije prikazani su u PRILOZIMA X – XI.

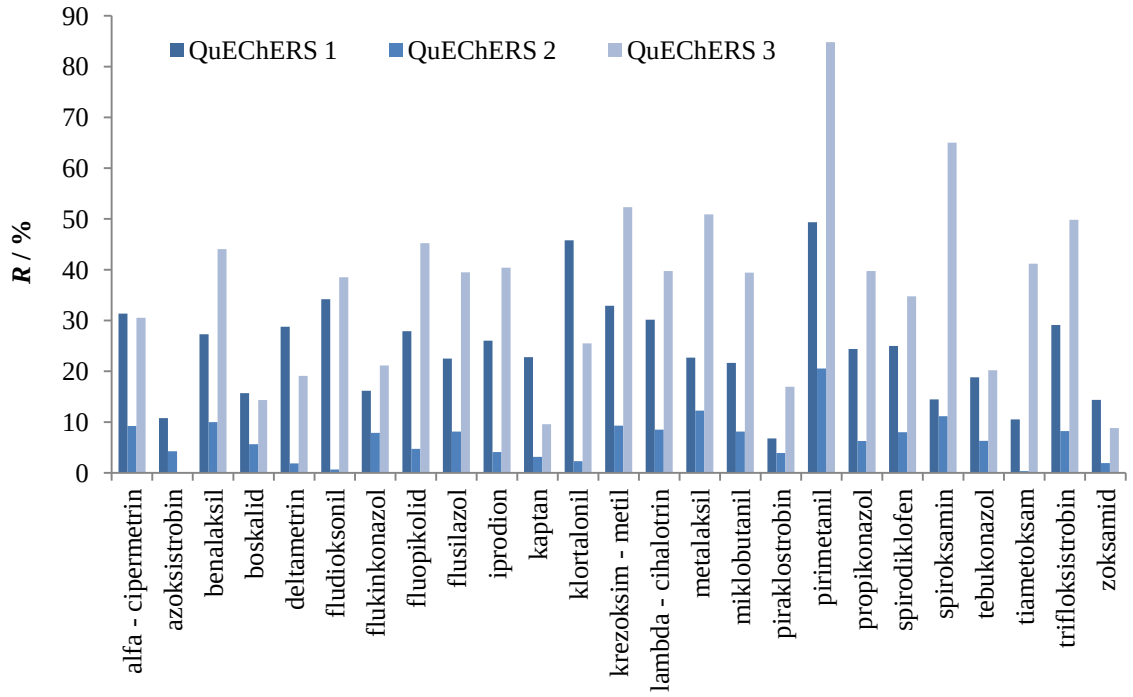
Izvorni postupak QuEChERS uključuje ekstrakciju 10 g uzorka s 10 mL acetonitrila, odijeljivanje vodene i organske faze uz dodatak 6 g magnezijevog sulfata i 1,5 g natrijevog acetata ili 1,5 g natrijevog klorida i pročišćavanje ekstrakta s 400 mg PSA i 1,2 g magnezijevog sulfata. Međutim, rezultati istraživanja u ovom radu pokazali su da izvorni postupak QuEChERS nije primjenjiv za ekstrakciju pesticida iz uzoraka vina (analitički povrati pesticida bili su <20 %). Jedno od važnih svojstava uzorka vina koje treba uzeti u obzir je visok udio etanola što nije pretpostavljeno u izvornom postupku QuEChERS. Također, za razliku od ekstrakcijskih postupaka koji uključuju razrjeđenje uzorka (među kojima je i SPE), pri ekstrakciji uzoraka s visokim udjelom vode (>80 %) postupkom QuEChERS obrađuje se nerazrijeđeni uzorak.[95,116] Razrjeđenje uzorka vina s vodom u volumnom omjeru 1:1 nije dalo zadovoljavajuće rezultate (analitički povrati pesticida bili su <20 %) što je u skladu s rezultatima izvornog postupka QuEChERS. Također, pri ekstrakciji postupkom QuEChERS volumen uzorka i volumen acetonitrila su konstanti i ne optimiraju se. Međutim, iz dosadašnjih istraživanja vidljivo je da pri ekstrakciji pesticida iz različitih uzoraka postoji potreba za optimizacijom svih parametara na kojima se temelji izvorni postupak QuEChERS.[43,48]



Slika 35. Detaljan prikaz optimizacije ekstrakcije pesticida iz vina postupkom QuEChERS.

U okviru ovog istraživanja pokazalo se da manji volumen uzorka vina (5 mL) nije dovoljan za djelotvornu ekstrakciju pesticida te je odabran volumen od 10 mL. Pri manjem volumenu uzorka analitički povrati većine pesticida bili su znatno niži (oko 10 %) što je u skladu s rezultatima istraživanja Anastassiadesa i sur. prema kojima su optimalni masa uzorka od 10 g odnosno volumen uzorka od 10 mL.[95] Također, mijenjanje volumena acetonitrila znatno utječe na djelotvornost ekstrakcije pesticida. Volumen od 10 mL pokazao se optimalnim za razliku od većih volumena (15 mL) s kojima su analitički povrati većine pesticida bili niži (oko 30 %).

Izvorni princip QuEChERS-a je uspostavljanje ravnoteže između dviju faza koje se ne miješaju, odnosno prijelaz analita (pesticida) iz vodene u organsku fazu.[70,117] Acetonitril se pokazao najboljim ekstrakcijskim otapalom zbog svojih hidrofilno – lipofilnih karakteristika što omogućava ekstrakciju i polarnijih i nepolarnijih pesticida. Međutim, ekstrakcija samo s otapalom nije dovoljno djelotvorna za ekstrakciju većeg broja pesticida različitih fizikalno – kemijskih svojstava. Učinkovit prijelaz pesticida iz jedne faze u drugu pospješuje se isoljavanjem, odnosno dodavanjem anorganske soli radi postizanja odgovarajuće ionske jakosti. U izvornom postupku QuEChERS, prijelaz pesticida u organsku fazu (acetonitril) pospješuje se dodatkom natrijevog klorida i magnezijevog sulfata. Svrha natrijevog klorida je povećati ionsku jakost vode, odnosno povećati njenu polarnost.[117] Na taj način pospješen je prijelaz nepolarnih do umjereno polarnih pesticida u organsku fazu. Dodatkom magnezijevog sulfata uklanja se višak vode, te potiče prijelaz pesticida u organsku fazu. Uz natrijev klorid kontrolira se polarnost organskog otapala, ali veće količine natrijevog klorida smanjuju afinitet organske faze prema pesticidima. Koristeći izvorni postupak QuEChERS (6 g magnezijevog sulfata i 1,5 g natrijevog klorida) za ekstrakciju pesticida iz vina postignuti su izrazito niski analitički povrati svih pesticida (<10 %) što je upućivalo na potrebu daljnje optimizacije postupka. Primjenom proširenog izvornog postupka QuEChERS, koji uključuje ekstrakciju pesticida uz dodatak 4 g magnezijevog sulfata, 1 g natrijevog klorida, 1 g natrijevog citrata i 0,5 g dinatrijevog hidrogen citrata seskvihidrata, također nisu postignuti zadovoljavajući analitički povrati pesticida iz vina. Djelotvornost izvornih postupaka QuEChERS za ekstrakciju pesticida iz crnog vina prikazana je na Slici 36.



Slika 36. Analitički povrati (*R*) pesticida iz crnog vina postignuti primjenom osnovnih ekstrakcijskih postupaka QuEChERS.
QuEChERS 1: 6 g magnezijevog sulfata i 1,5 g natrijevog acetata;
QuEChERS 2: 6 magnezijevog sulfata i 1,5 g natrijevog klorida;
QuEChERS 3: 4 g magnezijevog sulfata, 1 g natrijevog klorida, 1 g natrijevog citrata i 0,5 g dinatrijevog hidrogen citrata seskvihidrata.

Iz rezultata na Slici 36 može se vidjeti da su izvorni postupci QuEChERS bez daljnjeg razvoja i optimizacije neprimjenjivi za ekstrakciju pesticida iz uzoraka vina. Kao što je već spomenuto, u postupku QuEChERS ključno je uspostavljanje ravnoteže između dviju faza koje se ne miješaju, odnosno prijelaz pesticida iz vodene u organsku fazu. Obzirom na nezadovoljavajuće rezultate ekstrakcije pesticida iz vina pretpostavka je da je većina pesticida zaostala u vodenoj fazi/uzorku što upućuje na nedovoljnu ionsku jakost otopine. Natrijev klorid je jaka sol pomoću koje se kontrolira polarnost faza i potiče prijelaz pesticida u organsku fazu. Uz vrstu soli, vrlo važna je i masa dodane soli. Natrijev klorid u suvišku smanjuje prijelaz polarnih pesticida u organsku fazu. Iz navedenih razloga ispitan je učinak dodatka različitih masa natrijevog klorida (1 g, 1,5 g, 3 g, 4 g) i magnezijevog sulfata (2 g, 4 g, 6 g, 8 g) na djelotvornost ekstrakcije pesticida iz vina.

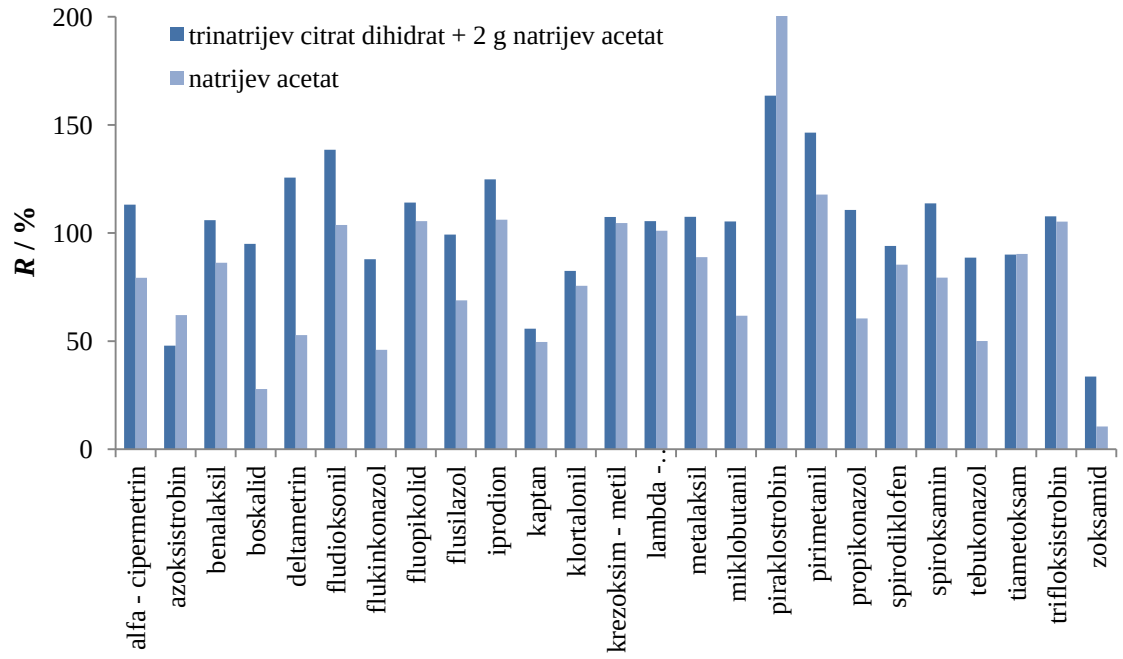
Primjećeno je da masa natrijevog klorida nema značajnijeg utjecaja na djelotvornost ekstrakcije pesticida. Analitički povrati pesticida bili su <30 % bez obzira na dodanu masu soli. Slični rezultati dobiveni su i variranjem dodatka magnezijevog sulfata. Obzirom da rezultati nisu bili značajno bolji od vrijednosti postignutih izvornim postupcima QuEChERS, za daljnja su istraživanja odabrane mase od 4 g magnezijevog klorida i 1,5 g natrijevog klorida.

Vrlo važan parametar koji je također potrebno kontrolirati pri primjeni postupka QuEChERS je pH. Većina pesticida stabilna je pri niskim pH vrijednostima. Međutim, za određene pesticide kao što su pesticidi koji su znatno protonirani pri niskim pH vrijednostima, ekstrakcija se mora odvijati u rasponu pH 2 do 7 što se postiže dodavanjem, uz magnezijev sulfat i natrijev klorid, soli kao što su natrijev acetat, natrijev citrat monobazični i trinatrijev citrat dihidrat te dinatrijev hidrogen citrat seskvihidrat. Prošireni postupak QuEChERS uključuje dodavanje navedenih soli radi održavanja stabilnog pH tijekom ekstrakcije.[47] Valja napomenuti da se vrlo često sastojci matrice uzorka ekstrahiraju zajedno s pesticidima bez obzira na pH vrijednost.

Dodatak monobazičnog natrijevog citrata i dinatrijevog hidrogen citrata seskvihidrata nije se pokazao učinkovitim za ekstrakciju pesticida iz vina. Uz dodatak navedenih soli analitički povrati pesticida bili su viši, ali i dalje neprihvatljivi (50 % do 60 %, uz iznimku povrata pirimetanila od 80 %).

Analitički povrati pesticida iz vina znatnije su se mijenjali s promjenama dodanih masa natrijevog acetata i trinatrijevog citrata dihidrata što upućuje na promjenu pH tijekom ekstrakcije. Prema izvornom postupku, pH bi trebao biti u rasponu između 5 i 5,5. Navedeni raspon zapravo je kompromis da bi se postigla učinkovita ekstrakcija i kiselo i lužnato osjetljivih pesticida. Vrijednosti pH niže i više od navedenog raspona rezultiraju nepotpunim prijelazom pesticida u organsku fazu, ovisno o polarnosti pesticida. Prihvatljivi analitički povrati većine pesticida (80 % do 120 %) postignuti su dodatkom u uzorak 2 g natrijevog acetata i 2 g trinatrijevog citrata dihidrata. Iznimke su bili povrati zoksamida (34 %), kaptana (56 %) i azoksistrobina (48 %). pH je tijekom ekstrakcije bio 5,5 što je u skladu s izvornim postupkom QuEChERS. [95,116] Dodatak manjih masa navedenih soli (1 g) rezultirao je nižim analitičkim povratima pesticida. Na temelju tih rezultata može se zaključiti da je pH tijekom ekstrakcije bio prenizak (<5) što je uzrokovalo nepotpunu ekstrakciju pesticida u organsku fazu. Dodatkom trinatrijevog citrata dihidrata i natrijevog acetata pH se tijekom ekstrakcije

povisio (5,5) te ostao stabilan što je rezultiralo višim analitičkim povratima. Kao što je već spomenuto u poglavlju 4.2.1., crvena boja indikator je prisutnosti antocijanina u uzorku. Pri prirodnom pH vina (3 do 3,5) antocijanini su u ioniziranom obliku što rezultira intenzivnom crvenom bojom. S povišenjem pH antocijanini se deprotoniraju pri čemu se crvena boja mijenja u plavu. Zbog njihove velike reaktivnosti, očekuje se da će se ekstrahirati zajedno s pesticidima zbog čega će utjecaj matrice biti izraženiji. Na Slici 37 prikazani su analitički povrati pesticida iz crnog vina postignuti primjenom izvornog postupka QuEChERS (4 g magnezijevog sulfata i 1,5 g natrijevog klorida), uz dodatak 2 g natrijevog acetata te zajedno 2 g trinatrijevog citrata dihidrata i 2 g natrijevog acetata u uzorak. Analitički povrat piraklostrobina uz dodatak 2 g natrijevog acetata bio je iznad 500 (PRILOG XI) te zbog jednostavnijeg prikaza nije prikazan na Slici 37.



Slika 37. Optimizacija postupka QuEChERS - analitički povrati (*R*) pesticida iz crnog vina postignuti uz dodatak 2 g dinatrijevog citrata dihidrata i 2 g natrijevog acetata u uzorak.

Pročišćavanje ekstrakta radi uklanjanja interferirajućih sastojaka i postizanja prihvatljivih rezultata često je ključni korak u postupcima priprave uzoraka za analizu pesticida. U okviru postupka QuEChERS predlaže se pročišćavanje uzorka pomoću ekstrakcije raspršenjem čvrste faze. Sorbensi koji se u tu svrhu koriste najčešće su oni koji se koriste i za ekstrakciju na čvrstoj fazi.[96] Primarni sekundarni amin je sorbens koji se pokazao najdjelotvornijim za

pročišćavanje ekstrakta uzorka jer omogućava pročišćavanje ionskom izmjenom. U slučajevima pročišćavanja ekstrakata uzoraka s visokim udjelom karotenoida i/ili klorofila, uz PSA se koristi i crni amorfni ugljik (GCB).[116] Obzirom da se navedeni spojevi ne očekuju u matrici vina, za optimizaciju pročišćavanja ekstrakta razmatran je samo PSA kao sorbens i ovisnost pročišćavanja o dodanoj masi PSA (200 mg, 400 mg i 600 mg). Primijećeno je da se dodatkom PSA pH otopine naglo povisi s 5,5 na 8 što može utjecati na stabilnost lužnato osjetljivih pesticida kao što su kaptan i klortalonil.[116] Da bi se izbjegla razgradnja navedenih pesticida ekstrakt se neposredno nakon pročišćavanja s PSA mora zakiseliti do pH između 5 i 5,5 s ledenom octenom kiselinom. Razmatrajući učinak dodane mase PSA na djelotvornost ekstrakcije pesticida primijećeno je da pri dodatku od 600 mg ekstrakcija pesticida nije potpuna te da su njihovi analitički povrati značajno niži nego pri dodatku 400 mg PSA. Ekstrakt je pri dodatku 600 mg PSA bio bezbojan što upućuje na potpuno uklanjanje antocijanina sadržanih u matrici uzorka, ali sniženi povrati pesticida upućuju ujedno i na interakcije pesticida s PSA što je rezultiralo njihovim zaostajanjem na sorbensu. Unatoč blago crvenoj boji ekstrakta primijećenoj nakon ekstrakcije s 400 mg PSA, postignuti su prihvatljivi analitički povrati većine pesticida. Pri ekstrakciji s 200 mg PSA povrati analiziranih pesticida bili su niski. Iz ovih se rezultata može zaključiti da dodana masa PSA utječe i na ekstrakciju pesticida i na ekstrakciju interferirajućih sastojaka matrice uzorka. Povećanjem mase PSA povećava se i mogućnost interakcija između pesticida i PSA, iako je pri većoj masi sorbensa utjecaj matrice uzorka sveden na minimum. Nedovoljna masa PSA rezultirat će nepotpunom ekstrakcijom pesticida, pri čemu će utjecaj matrice uzorka biti izraženiji. Obzirom da se među analiziranim pesticidima nalaze kaptan i klortalonil, za pretpostaviti je da će se oni razgraditi pri kontaktu s PSA. Međutim, zakiseljavanje ekstrakta nije bilo potrebno s obzirom da su za i za ta dva pesticida postignuti prihvatljivi analitički povrati iz vina. Iz navedenih je razloga u daljnjim istraživanjima za pročišćavanje uzorka odabrana masa PSA od 400 mg.

Radi uklanjanja viška vode i poboljšanja djelotvornosti ekstrakcije pesticida, uz PSA se pri pročišćavanju uzorka dodaje i određena masa magenzijevog sulfata. Primijećeno je da promjena mase dodanog magnezijevog sulfata (0,8 g, 1 g, 1,2 g) nije utjecala na analitičke povrate pesticida. Za daljnja istraživanja odabran dodatak od 1,2 g magnezijevog sulfata što je u skladu s izvornim postupkom QuEChERS.

Osim kemijskih procesa za postupak ekstrakcije QuEChERS vrlo su važni i mehanički procesi pri čemu valja izdvojiti vrijeme centrifugiranja te brzinu i jačinu potresanja/miješanja

uzorka neposredno nakon dodavanja acetonitrila i soli. Vrlo je bitno smjesu brzo i vrlo jako ručno protresti nakon dodavanja soli da bi se pospješila ekstrakcija s acetonitrilom. Magnezijev sulfat u prisutnosti vode vrlo brzo pravi grudaste nakupine nakon čega se stvrdnjava što rezultira neučinkovitom ekstrakcijom. Stoga je smjesu potrebno odmah vrlo jako protresti. Prema izvornom postupku QuEChERS vrijeme potresanja je 1 min nakon čega slijedi centrifugiranje od 5 min što se u okviru ovog istraživanja nije pokazalo dovoljnim za odvajanje faza i prijelaz pesticida u organsku fazu. Nakon naizmjeničnog potresanja uzorka rukom i miješanja na Vorteks – miješalici kroz 10 min smjesa je postala homogena što upućuje na uspješnu ekstrakciju. Vrijeme centrifugiranja također se moralo produžiti s predloženih 5 min (izvorni postupak QuEChERS) na 15 min nakon čega su vodena i organska faza bile jasno odvojene.

Za ekstrakciju postupkom QuEChERS vrlo je važna upotreba unutarnjeg standarda kako bi se smanjile pogreške nastale u koracima ekstrakcije. Unutarnji standard je potrebno dodati u prvim koracima ekstrakcije, odnosno neposredno nakon dodavanja acetonitrila. U okviru ovog istraživanja odabran je kao unutarnji standard 1,1′,2,2′-tetrafeniletilen, jer se pokazao odgovarajućim izborom za ekstrakciju raspršenjem čvrste faze, te prikladnim za optimizaciju postupka QuEChERS.

Na temelju prikazanih rezultata može se zaključiti da izvornim postupkom QuEChERS nije bez daljnje optimizacije moguće postići prihvatljive analitičke povrate pesticida iz uzoraka vina. Pritom je bilo bitno optimirati vrstu i mase dodanih soli što utječe na djelotvornost ekstrakcije pesticida iz vina.

Djelotvornost postupka QuEChERS optimiranog za matricu crnog vina, ispitana je i za matricu bijelog vina. Pritom su postignuti uglavnom niski analitički povrati analiziranih pesticida što upućuje na izražen utjecaj matrice uzorka bijelog vina koji je detaljno opisan u poglavlju 4.4.

4.3. Validacija metoda

Predložene multirezidualne metode određivanja ostataka pesticida u uzorcima vina validirane su radi utvrđivanja njihove ispravnosti i pouzdanosti prema smjernicama SANCO/12571/2013 koje se odnose na validaciju analitičkih metoda za određivanje ostataka pesticida.[111] Za potrebe validacije korištene su slijepe matrice crnog i bijelog vina za koje je predloženim metodama potvrđeno da ne sadrže analizirane pesticide. U okviru ovog istraživanja provedene su ukupno četiri validacije, po dvije obzirom na vrstu vina te po dvije obzirom na postupak ekstrakcije pesticida iz uzoraka vina.

4.3.1. Validacija metode određivanja pesticida u vinu ekstrakcijom na čvrstoj fazi

Za validaciju metode određivanja pesticida u vinu koja uključuje ekstrakciju analita na čvrstoj fazi, u slijepu matricu uzorka vina dodani su pesticidi u odgovarajućim masenim koncentracijama neposredno prije provedbe validacije. Kvantitativno određivanje pesticida ekstrahiranih iz uzoraka vina na čvrstoj fazi provedeno je metodom dodatka standarda.

Specifičnost metode provjerena je usporedbom kromatograma standardne otopine smjese pesticida pripravljene u acetonu (Slika 18) s kromatogramima ekstrakta slijepe matrice uzorka crnog (Slike 19 i 20) i bijelog vina (Slike 21 i 22). Obzirom da nije bilo interferencija u području eluiranja (vremena zadržavanja) analiziranih pesticida potvrđena je specifičnost metode.

Linearnost metode ispitana je u rasponu masenih koncentracija pesticida u uzorku vina od granice određivanja do 400 μg L^{-1}. U tu su svrhu pripravljene radne standardne otopine smjese pesticida u acetonu u kojima su masene koncentracije pojedinih pesticida bile između 0,0005 μg mL^{-1} i 20 μg mL^{-1}. Te su otopine dodane u slijepu matricu vina neposredno prije analize. Kalibracijske krivulje za svaki su pesticid dobivene linearnom regresijom površina kromatografskih pikova (y – os) i masenih koncentracija (x – os) pesticida u vinu. Površine pikova koji su odgovarali koncentracijama analita nižim od granice određivanja nisu uzete u obzir za procjenu linearnosti metode. Izuzetak je bio kaptan u matrici crnog vina čija je granica određivanja bila visoka (250 μg L^{-1}) te je stoga za najnižu točku linearnog područja uzeta površina pika koji odgovara granici detekcije kaptana (50 μg L^{-1}). Koeficijent determinacije (r^2) za svaki je pesticid izračunat na temelju kalibracijske krivulje s najmanje pet točaka. Za analizirane su pesticide koeficijenti determinacije bili ≥0,99 što je ujedno i

minimalna prihvatljiva vrijednost prema smjernicama SANCO/12571/2013. Time je potvrđena linearnost metode za analizirane pesticide u cijelom navedenom koncentracijskom području. Istim postupkom ispitana je linearnost metode za određivanje pesticida u matrici crnog i bijelog vina, a rezultati su prikazani u Tablici 8.

Tablica 8. Linearnost metode za određivanje pesticida u matricama crnog i bijelog vina uz pripravu uzorka postupkom SPE.

	Matrica crnog vina		**Matrica bijelog vina**	
Pesticid	r^2	**Linearno područje / µg L^{-1}**	r^2	**Linearno područje / µg L^{-1}**
alfa – cipermetrin	0,9929	1-400	0,9944	5-50
azoksistrobin	0,9985	0,1-400	0,9970	0,25-400
benalaksil	0,9924	0,01-400	0,9984	0,025-400
boskalid	0,9965	0,5-400	0,9993	0,05-400
deltametrin	0,9936	5-400	1,0000	5-50
fludioksonil	0,9996	0,25-400	0,9916	0,25-25
flukinkonazol	0,9998	0,25-400	0,9985	0,25-400
fluopikolid	0,9963	0,05-400	0,9980	1-400
flusilazol	0,9999	0,01-400	0,9983	0,01-400
iprodion	0,9999	0,1-400	0,9980	0,1-400
kaptan	0,9963	50-400	0,9987	2,5-400
klortalonil	0,9997	0,1-400	0,9980	0,25-400
krezoksim – metil	0,9998	0,01-400	0,9979	0,01-400
lambda – cihalotrin	0,9919	0,7-400	0,9930	0,05-10
metalaksil	0,9977	5-400	0,9934	2,5-400
miklobutanil	0,9998	0,25-400	0,9990	0,25-400
piraklostrobin	0,9964	0,7-400	0,9914	2,5-400
pirimetanil	0,9998	1-400	0,9970	1-400
propikonazol	0,9998	0,5-400	0,9983	0,25-400
spirodiklofen	0,9979	0,01-400	0,9988	0,05-250
spiroksamin	0,9939	2,5-250	0,9998	0,5-100
tebukonazol	0,9989	10-400	0,9974	0,5-400
tiametoksam	0,9940	25-100	0,9972	5-50
triflokstrobin	0,9999	0,25-400	0,9989	0,25-400
zoksamid	0,9985	0,05-400	0,9924	0,025-10

Prema rezultatima prikazanim u Tablici 8, analizom pesticida u matrici crnog vina postignuti su izrazito visoki koeficijenti (≥0,9998) determinacije za flukinkonazol, flusilazol, iprodion, krezoksim – metil, miklobutanil, propikonazol, pirimetanil i trifloksistrobin. Također, u matrici bijelog vina izrazito visoki koeficijenti determinacije određeni su i za deltametrin i spiroksamin (≥0,9998). Najniži koeficijent determinacije u matrici crnog vina određen je za

lambda – cihalotrin (0,9919) te za piraklostrobin u matrici bijelog vina (0,9914). Za većinu analiziranih pesticida povtrđena je linearnost metode u cijelom ispitanom raponu masenih koncentracija u vinu (GO do 400 μg L^{-1}). U matrici crnog vina izuzeci su bili tiametoksam, za koji je linearno područje bilo između 25 i 100 μg L^{-1} te spiroksamin za koji je linearno područje bilo između 2,5 i 250 μg L^{-1}. U matrici bijelog vina izuzeci su bili alfa – cipermetrin, deltametrin i tiametoksam (5 do 50 μg L^{-1}), fludioksonil (0,25 do 25 μg L^{-1}), lambda – cihalotrin (0,05 do 10 μg L^{-1}), spirodiklofen (0,05 do 250 μg L^{-1}), spiroksamin (0,5 do 100 μg L^{-1}) i zoksamid (0,025 do 10 μg L^{-1}).

Tablica 9. Granice detekcije i određivanja pesticida u matricama crnog i bijelog vina uz pripravu uzorka postupkom SPE.

	Matrica crnog vina		**Matrica bijelog vina**	
Pesticid	**GD / μg L^{-1}**	**GO / μg L^{-1}**	**GD / μg L^{-1}**	**GO / μg L^{-1}**
alfa – cipermetrin	0,5	1	2,5	5
azoksistrobin	0,01	0,1	0,025	0,25
benalaksil	0,01	0,01	0,005	0,025
boskalid	0,05	0,5	0,01	0,05
deltametrin	0,01	5	1	5
fludioksonil	0,25	0,25	0,1	0,25
flukinkonazol	0,01	0,25	0,01	0,25
fluopikolid	0,01	0,05	0,5	1
flusilazol	0,01	0,01	0,005	0,01
iprodion	0,1	0,1	0,005	0,1
kaptan	50	250	0,5	2,5
klortalonil	0,05	0,1	0,1	0,25
krezoksim – metil	0,01	0,01	0,005	0,01
lambda – cihalotrin	0,25	0,7	0,01	0,05
metalaksil	1	5	0,05	2,5
miklobutanil	0,05	0,25	0,05	0,25
piraklostrobin	0,7	0,7	0,005	2,5
pirimetanil	0,7	1	0,01	1
propikonazol	0,01	0,5	0,05	0,25
spirodiklofen	0,01	0,01	0,01	0,05
spiroksamin	2,5	2,5	0,05	0,5
tebukonazol	0,01	10	0,25	0,5
tiametoksam	25	25	0,25	5
triflokstrobin	0,1	0,25	0,025	0,25
zoksamid	0,01	0,05	0,05	0,025

Granice detekcije odabranih pesticida u vinu bile su između 0,01 μg L^{-1} i 2,5 μg L^{-1}, osim za kaptan čija je granica detekcije bila 50 μg L^{-1} u matrici crnog vina (Tablica 9). *Granice određivanja* odabranih pesticida bile su između 0,01 μg L^{-1} i 10 μg L^{-1}, osim za kaptan i tiamteoksam čije su granice određivanja bile 250 μg L^{-1}, odnosno 25 μg L^{-1} u matrici crnog vina (Tablica 9).

Jedan od najvažnijih čimbenika koji direktno utječu na granice detekcije i određivanja pesticida u vinu je matrica uzorka. Utvrđeni utjecaj matrice uzorka na određivanje ostataka pesticida metodama predloženim u ovom radu detaljnije je opisan u poglavlju 4.4. Iz Tablice 9 može se vidjeti da su uz primjenu ekstrakcije na čvrstoj fazi za većinu pesticida postignute izrazito niske granice određivanja (≤1 μg L^{-1}). U odnosu na dostupne literaturne podatke prema kojima su primjenom SPE ostvarene znatno više granice određivanja pesticida u vinu (≥1 μg L^{-1}),[9–11,14,15] rezultati postignuti u ovom radu predstavljaju značajno poboljšanje multirezidualne metode koja uključuje ekstrakciju pesticida iz vina na čvrstoj fazi. Pregledom istraživanja opisanih u literaturi utvrđeno je da do sada u postupak SPE nije bio uključen korak ispiranja sorbensa nakon propuštanja uzorka vina ili je kao otapalo za ispiranje korištena voda. U ovom se radu upravo primjena smjese metanola i vode kao otapala za ispiranje pokazala ključnom za maksimalno smanjivanje utjecaja matrice uzorka što je rezultiralo niskim granicama određivanja pesticida. Granice određivanja pesticida bile su niže u matricama bijelog vina što je i za očekivati obzirom da bijela vina ne sadrže toliko vrsta spojeva različitih kemijskih klasa (npr. polifenolnih spojeva) kao što je to slučaj kod crnih vina. Značajna interferencija sastojka matrice utvrđena je pri određivanju kaptana u crnom vinu. Naime, obzirom na slabu fragmentaciju molekulskog iona kaptana i očito sličan fragmentacijski put kaptana i interferirajućeg sastojka matrice, taj je sastojak otežavao detekciju ciljnog iona odabranog za kvantifikaciju kaptana. Iz tog je razloga i granica određivanja kaptana u crnom vinu vrlo visoka (250 μg L^{-1}). Analitička metoda koja uključuje SPE pokazala se prikladnom za određivanje većine pesticida koji su uglavnom lipofilnog karaktera (2< log K_{ow} <6,6). Utjecaj matrice uzorka kod takvih je pesticida znatno smanjen što je rezultiralo i nižim granicama detekcije i određivanja. Međutim, kod određivanja metalaksila i tiametoksama postignute su granice određivanja više od 1 μg L^{-1}: za metalaksil 5 μg L^{-1} u matrici crnog vina i 2,5 μg L^{-1} u matrici bijelog vina, a za tiametoksam 25 μg L^{-1} u matrici crnog vina i 5 μg L^{-1} u matrici bijelog vina. Metalaksil s log K_{ow} 1,7 spada u grupu slabo lipofilnih spojeva (0< log K_{ow} <2), dok je tiametoksam hidrofilan spoj (log K_{ow} <0). Oba

pesticida su polarnog karaktera, pri čemu je tiametoksam izrazito polaran spoj. Visoke granice određivanja, uz utvrđen utjecaj matrice uzorka, posljedica su njihovog izraženog polarnog karaktera.

Točnost i preciznost metode određivanja pesticida u vinu uz primjenu postupka SPE ispitane su na dvije koncentracijske razine, tj. pri koncentracijama pesticida u vinu dvostruko (2 x GO) i deseterostruko (10 x GO) višim od granice određivanja. Rezultati za točnost i preciznost određivanja pesticida u crnom vinu su prikazani u Tablici 10.

Tablica 10. Točnost, ponovljivost i obnovljivost određivanja pesticida u matrici crnog vina uz primjenu postupka SPE.

	Ponovljivost ***R*** **/ % (RSD / %)**		**Obnovljivost** ***R*** **/ % (RSD / %)**	
Pesticid	**γ = 2 x GO**	**γ = 10 x GO**	**γ = 2 x GO**	**γ = 10 x GO**
alfa – cipermetrin	63 (3)	66 (5)	61 (2)	62 (3)
azoksistrobin	116 (3)	108 (4)	115 (2)	109 (4)
benalaksil	105 (5)	108 (5)	93 (6)	108 (6)
boskalid	115 (1)	105 (2)	113 (1)	106 (2)
deltametrin	78 (4)	66 (1)	78 (4)	65 (2)
fludioksonil	204 (6)	110 (2)	221 (5)	113 (2)
flukinkonazol	97 (10)	83 (3)	98 (12)	85 (3)
fluopikolid	73 (11)	102 (6)	84 (12)	106 (8)
flusilazol	72 (9)	101 (5)	69 (9)	99 (5)
iprodion	108 (4)	112 (4)	106 (5)	113 (5)
kaptan	90 (2)	90 (3)	85 (2)	92 (2)
klortalonil	101 (1)	110 (3)	99 (1)	107 (3)
krezoksim – metil	88 (4)	101 (7)	85 (4)	102 (7)
lambda – cihalotrin	77 (3)	63 (3)	71 (3)	61 (2)
metalaksil	107 (4)	85 (8)	99 (5)	81 (5)
miklobutanil	76 (14)	94 (2)	80 (14)	103 (3)
piraklostrobin	111 (5)	248 (3)	109 (5)	255 (2)
pirimetanil	101 (4)	96 (1)	92 (4)	99 (2)
propikonazol	97 (5)	108 (1)	100 (5)	112 (2)
spirodiklofen	83 (6)	101 (9)	83 (8)	99 (8)
spiroksamin	109 (3)	100 (2)	108 (3)	104 (2)
tebukonazol	108 (3)	98 (1)	102 (4)	103 (1)
tiametoksam	50 (5)	8 (3)	54 (4)	7,7 (3)
triflokstrobin	106 (1)	113 (2)	108 (2)	113 (4)
zoksamid	107 (4)	109 (3)	109 (4)	105 (4)

R – analitički povrat

Ponovljivost metode utvrđena je na temelju pet određivanja analitičkog povrata pesticida na svakoj koncentracijskoj razini unutar istog dana. Analitički povrati većine pesticida bili su na obje koncentracijske razine između 72 % i 116 % uz RSD između 1 % i 14 %. Za fludioksonil zabilježen je visoki analitički povrat (204 %) pri nižoj koncentraciji, dok je pri višoj koncentraciji povrat od 110 % bio prihvatljiv. Vrijednosti RSD za fludioksonil bile su prihvatljive na obje koncentracijske razine (6 % pri pri koncentraciji od 2 x GO; 2 % pri koncentraciji od 10 x GO). Analitički povrati fludioksonila upućuju na izraženiji utjecaj matrice uzorka crnog vina pri nižim koncentracijama. Za razliku od fludioksonila, za piraklostrobin visoka vrijednost povrata od 248 % uz RSD od 3 % zabilježena je pri višoj koncentraciji, dok je pri nižoj koncentraciji povrat bio 111 % uz RSD od 5 %. Analitički povrati piretroida (deltametrin, lambda – cihalotrin i alfa – cipermetrin) bili su slični na obje koncentracijske razine, između 63 % i 78 % uz RSD od 3 % do 4 % pri nižoj koncentraciji te između 63 % i 66 % uz RSD od 1 % do 5 % pri višoj koncentraciji. Rezultati za piretroide upućuju da se primjenom metode koja uključuje SPE ne mogu postići viši analitički povrati, bez obzira na njihovu koncentraciju u vinu. Za tiametoksam zabilježene su niske vrijednosti analitičkih povrata, 50 % pri višoj, te svega 8 % pri nižoj koncentraciji, što potvrđuje da ova metoda nije odgovarajuća za određivanje tiametoksama zbog njegovih hidrofilnih karakteristika (log K_{ow} = -0,13) te da je za određivanje ovog spoja prikladnija tekućinska nego plinska kromtografija.

Obnovljivost metode utvrđena je na temelju pet određivanja analitičkog povrata pesticida na svakoj koncentracijskoj razini tri dana uzastopce. Rezultati su bili u skladu s rezultatima za ponovljivost metode unutar istog dana. Za većinu pesticida postignuti su prihvatljivi povrati u rasponu od 70 % do 120 % pri obje koncentracijske razine. Izuzetak su sva tri piretroida za koje su povrati pri višoj koncentraciji bili od 61 % do 65 % te alfa – cipermetrin s povratom pri nižoj koncentraciji od 61 %. Najniži su bili povrati tiametoksama od 54 % pri nižoj i samo 8 % pri višoj koncentraciji. Vrijednosti RSD analitičkih povrata, u rasponu od 1 % do 14 % pri pri nižoj te od 1 % do 8 % pri višoj koncentraciji, bile su prihvatljive za sve analizirane pesticide.

Preciznost i točnost određivanja pesticida u vinu metodom koja uključuje postupak SPE ispitane su i za matricu bijelog vina (Tablica 11).

Tablica 11. Točnost, ponovljivost i obnovljivost određivanja pesticida u matrici bijelog vina uz primjenu postupka SPE.

	Ponovljivost ***R*** **/ % (RSD / %)**		**Obnovljivost** ***R*** **/ % (RSD / %)**	
Pesticid	**2 x GO**	**10 x GO**	**2 x GO**	**10 x GO**
alfa – cipermetrin	33 (3)	39 (5)	37 (4)	40 (4)
azoksistrobin	84 (8)	108 (7)	98 (3)	99 (5)
benalaksil	72 (19)	112 (10)	115 (7)	109 (5)
boskalid	112 (10)	118 (9)	86 (7)	88 (10)
deltametrin	27 (5)	40 (4)	28 (6)	32 (6)
fludioksonil	95 (5)	125 (6)	109 (5)	107 (5)
flukinkonazol	89 (5)	112 (8)	96 (4)	94 (4)
fluopikolid	74 (5)	94 (4)	86 (5)	88 (5)
flusilazol	98 (10)	134 (12)	107 (6)	104 (5)
iprodion	64 (4)	100 (7)	86 (9)	91 (7)
kaptan	27 (5)	88 (4)	85 (4)	85 (6)
klortalonil	147 (13)	142 (9)	95 (4)	94 (5)
krezoksim – metil	127 (10)	155 (8)	118 (14)	117 (10)
lambda – cihalotrin	134 (3)	146 (12)	40 (26)	35 (14)
metalaksil	81 (2)	84 (3)	84 (4)	83 (4)
miklobutanil	89 (5)	109 (7)	92 (5)	92 (4)
piraklostrobin	121 (5)	177 (8)	141 (6)	134 (5)
pirimetanil	92 (4)	102 (5)	89 (4)	88 (5)
propikonazol	72 (7)	102,7 (7)	82 (4)	88 (5)
spirodiklofen	238 (6)	331 (5)	272 (6)	271 (7)
spiroksamin	73 (3)	89 (5)	83 (5)	82 (5)
tebukonazol	80 (3)	98 (9)	84 (4)	86 (4)
tiametoksam	2 (21)	2 (16)	1 (19)	1 (16)
triflokstrobin	96 (6)	116 (7)	93 (5)	94 (5)
zoksamid	104 (12)	214 (13)	111 (11)	124 (10)

R – analitički povrat

Pri obje koncentracijske razine pesticida u vinu ponovljivost metode za većinu je pesticida bila prihvatljiva pri čemu su analitički povrati bili u rasponu od 70 % do 120 %, a RSD od 2 % do 19 %. Povrati alfa – cipermetrina i deltametrina bili su ≤40 %, dok je povrat lambda – cihalotrina bio viši od 130 %. Previsoki analitički povrati zabilježeni su i za spirodiklofen (čak 331 % pri koncentraciji od 10 x GO) te za klortalonil (>140 %), krezoksim – metil (127 % i 155 %) te zoksamid (214 % pri koncentraciji od 10 x GO). Neprihvatljivo nizak bio je analitički povrat kaptana pri nižoj koncentraciji (27 %) te tiametoksama (2 %) pri obje koncentracije.

Pri određivanju obnovljivosti metode analitički povrati većine pesticida bili su prihvatljivi pri obje koncentracijske razine pesticida u bijelom vinu (od 70 % do 120 % uz RSD ≤10 %). Izuzetak su i ovdje bili piretroidi za koje je povrat bio ≤40 %. Neprihvatljivo visoki bili su povrati spirodiklofena (>270 %) i piraklostrobina (>130 %). Analitički povrati tiametoksama bili su izrazito niski u svim ispitivanjima (<2 %) što je i očekivano obzirom da se radi o pesticidu s hidrofilnim karakteristikama.

4.3.2. Validacija QuEChERS metode

Validacija metode za određivanje pesticida u vinu uz pripravu uzorka postupkom QuEChERS provedena je sličnim pristupom kao i validacija metode koja uključuje ekstrakciju pesticida iz vina na čvrstoj fazi. Međutim, za validaciju ove metode standardne otopine smjese pesticida pripravljene su u ekstraktima matrica crnog i bijelog vina. Analizom tih otopina načinjene su kalibracijske krivulje za kvantitativno određivanje pesticida u uzorcima vina.

Specifičnost metode utvrđena je istim postupkom kao pri validaciji metode uz pripravu uzorka ekstrakcijom na čvrstoj fazi.

Linearnost metode za svaki je pesticid utvrđena na temelju kalibracijskih krivulja (najmanje pet točaka) dobivenih linearnom regresijom površina kromatografskih pikova (y – os) i masenih koncentracija (x – os) pojedinih pesticida u standardnim otopinama.

U tu su svrhu pripravljene radne standardne otopine smjese pesticida u ekstraktima crnog i bijelog vina u kojima su masene koncentracije pojedinih pesticida bile između 0,0005 μg mL^{-1} i 125 μg mL^{-1}. Rezultati su prikazani u Tablici 12. Linearnost metode ispitana je u rasponu masenih koncentracija u uzorcima vina od granice određivanja do 2500 μg L^{-1}. Kao i kod ekstrakcije na čvrstoj fazi, površine pikova koji su odgovarali koncentracijama analita nižim od granice određivanja nisu uzete u obzir za procjenu linearnosti metode. Koeficijent determinacije (r^2) za svaki je pesticid izračunat na temelju kalibracijske krivulje.

Za analizirane su pesticide koeficijenti determinacije bili ≥0,99 čime je potvrđena linearnost metode za sve određivane pesticide u skladu sa smjernicama SANCO 12571/2013.

Tablica 12. Linearnost metode za određivanje pesticida u matricama crnog i bijelog vina uz pripravu uzorka postupkom QuEChERS.

	Matrica crnog vina		Matrica bijelog vina	
Pesticid	r^2	**Linearno područje / μg L^{-1}**	r^2	**Linearno područje / μg L^{-1}**
alfa – cipermetrin	0,9955	5-1500	0,9987	250-2500
azoksistrobin	0,9970	250-2500	1,0000	10-2000
benalaksil	0,9923	0,25-1500	0,9909	250-2500
boskalid	0,9917	50-1000	0,9894	250-2500
deltametrin	0,9921	50-2500	0,9904	250-2500
fludioksonil	0,9916	250-2500	0,9930	50-2500
flukinkonazol	0,9903	5-1000	0,9927	50-2500
fluopikolid	0,9931	5-1500	0,9921	25-2500
flusilazol	0,9928	5-1500	0,9945	250-2500
iprodion	0,9979	1-1500	0,9937	50-2500
kaptan	0,9917	50-2500	0,9930	50-2500
klortalonil	0,9941	10-2500	0,9926	10-2500
krezoksim – metil	0,9919	5-1500	0,9904	10-2500
lambda – cihalotrin	0,9954	5-1500	0,9928	10-1500
metalaksil	0,9993	10-400	0,9878	50-2500
miklobutanil	0,9928	10-1500	0,9958	50-1500
piraklostrobin	0,9944	250-2500	0,9986	250-2500
pirimetanil	0,9923	5-1500	0,9998	5-100
propikonazol	0,9984	5-400	0,9956	5-2500
spirodiklofen	0,9921	50-2500	0,9932	5-1500
spiroksamin	0,9906	50-1500	0,9916	250-2500
tebukonazol	0,9981	50-1000	0,9850	250-2500
tiametoksam	0,9953	50-2000	0,9919	25-2000
trifloksistrobin	0,9912	5-1500	0,9931	250-2500
zoksamid	0,9901	50-1500	0,9946	250-2500

U matrici crnog vina najviša vrijednost koeficijenta determinacije postignuta je za metalaksil (0,9993), dok je najniža vrijednost zabilježena za zoksamid (0,9901). Za sedam pesticida (azoksistrobin, kaptan, klortalonil, deltametrin, fludioksonil, piraklostrobin i spirodiklofen) utvrđena je linearnost metode u cijelom ispitanom rasponu koncentracija pesticida u crnom vinu (od GO do 2500 μg L^{-1}). Za najveći broj pesticida (njih 12) metoda je bila linearna do masene koncentracije od 1500 μg L^{-1}, za jedan pesticid (tiametoksam) do 2000 μg L^{-1}, a za tri pesticida (boskalid, flukinkonazol i tebukonazol) do 1000 μg L^{-1}. Najuže područje linearnosti (od GO do 400 μg L^{-1}) zabilježeno je za metalaksil i propikonazol. U matrici bijelog vina najviši koeficijent determinacije zabilježen je za azoksistrobina (1,000), a najniži za tebukonazol (0,9850). Za većinu je pesticida utvrđena linearnost metode u čitavom ispitanom

rasponu njihovih koncentracija u vinu (od GO do 2500 μg L^{-1}), osim za azoksistrobin i tiametoksam s gornjom granicom linearnosti od 2000 μg L^{-1}, lambda – cihalotrin, miklobutanil i spirodiklofen s gornjom granicom linearnosti od 1500 μg L^{-1} te pirimetanil s gornjom granicom linearnosti od samo 100 μg L^{-1}.

Granice detekcije i određivanja pesticida u vinu uz pripravu uzorka postupkom QuEChERS utvrđene su istim postupkom kao i uz primjenu ekstrakcije pesticida iz vina na čvrstoj fazi (Tablica 13). Granice detekcije pesticida u matrici crnog vina bile su u rasponu masenih koncentracija od 0,01 μg L^{-1} do 250 μg L^{-1}, a u matrici bijelog vina od 0,1μg L^{-1} do 250 μg L^{-1}. Granice određivanja pesticida u matrici crnog vina bile su od 0,25 μg L^{-1} do 250 μg L^{-1}, a u matrici bijelog vina od 5 μg L^{-1} do 250 μg L^{-1}.

Tablica 13. Granice detekcije i određivanja pesticida u matricama crnog i bijelog vina uz pripravu uzorka postupkom QuEChERS.

	Matrica crnog vina		**Matrica bijelog vina**	
Pesticid	**GD / μg L^{-1}**	**GO / μg L^{-1}**	**GD / μg L^{-1}**	**GO / μg L^{-1}**
alfa – cipermetrin	0,5	5	25	50
azoksistrobin	250	250	250	250
benalaksil	0,01	0,25	2,5	10
boskalid	10	50	250	250
kaptan	2,5	50	250	250
klortalonil	1	10	250	250
deltametrin	50	50	25	50
fludioksonil	50	250	25	50
fluopikolid	0,25	5	25	25
flukinkonazol	0,01	5	100	250
flusilazol	0,5	5	25	50
iprodion	0,01	1	25	50
krezoksim – metil	0,5	5	2,5	10
lambda – cihalotrin	0,025	5	5	10
metalaksil	0,01	10	2,5	10
miklobutanil	2,5	10	25	50
propikonazol	2,5	5	25	50
piraklostrobin	250	250	250	250
pirimetanil	0,01	5	0,1	5
spirodiklofen	5	50	2,5	5
spiroksamin	10	50	0,1	5
tebukonazol	25	50	250	250
tiametoksam	25	50	250	250
triflokstrobin	0,025	5	10	25
zoksamid	5	50	100	250

Usporedbom rezultata prikazanih u Tablicama 9 i 13 može se vidjeti da su granice detekcije i određivanja pesticida u vinu više uz pripravu uzorka postupkom QuEChERS nego uz pripravu uzorka postupkom SPE. Granice određivanja pesticida u vinu uz pripravu uzorka postupkom QuEChERS u skladu su s literaturnim podacima o dosadašnjim istraživanjima pesticida u hrani.[42,43,47,118,119] Povišene granice određivanja (250 μg L^{-1}) zabilježene u matricama i crnog i bijelog vina za azoksistrobin, fludioksonil i piraklostrobin te u matricama bijelog vina još i za boskalid, kaptan, klortalonil, flukinkonazol, tebukonazol, tiametoksam i zoksamid, rezultat su izraženog utjecaja matrice uzorka. Za većinu je pesticida u matricama crnog i bijelog vina granica određivanja bila između 5 μg L^{-1} i 50 μg L^{-1}. Granica određivanja ≤10 μg L^{-1} određena je u matrici crnog vina za 14 pesticida, a u matrici bijelog vina za sedam pesticida.

Tablica 14. Točnost, ponovljivost i obnovljivost određivanja pesticida u matrici crnog vina uz primjenu postupka QuEChERS.

	Ponovljivost ***R*** **/ % (RSD / %)**		**Obnovljivost** ***R*** **/ % (RSD / %)**	
Pesticid	**2 x GO**	**10 x GO**	**2 x GO**	**10 x GO**
alfa – cipermetrin	115 (2)	55 (6)	111 (4)	57 (11)
azoksistrobin	82 (3)	79 (6)	77 (4)	97 (6)
benalaksil	94 (7)	60 (6)	95 (4)	55 (5)
boskalid	89 (1)	41 (3)	83 (3)	46 (4)
deltametrin	80(4)	73 (2)	79 (4)	84 (4)
fludioksonil	77 (2)	76 (3)	74 (3)	87 (3)
flukinkonazol	110 (3)	82 (4)	109 (3)	86 (4)
fluopikolid	110 (3)	73 (24)	104 (3)	74 (18)
flusilazol	83 (1)	70 (4)	75 (3)	71 (4)
iprodion	118 (2)	77 (9)	111 (3)	79 (5)
kaptan	120 (3)	94 (3)	117 (7)	104 (4)
klortalonil	82 (2)	75 (4)	76 (3)	79 (5)
krezoksim – metil	93 (2)	106 (3)	95 (4)	118 (4)
lambda – cihalotrin	102 (2)	81 (2)	95 (3)	91 (3)
metalaksil	119 (0,4)	97 (2)	112 (3)	105 (3)
miklobutanil	119 (5)	90 (2)	121 (4)	102 (4)
piraklostrobin	105 (1)	116 (2)	114 (3)	121 (4)
pirimetanil	100 (1)	100 (5)	98 (3)	91 (6)
propikonazol	120 (1)	44 (7)	119 (3)	42 (10)
spirodiklofen	77 (3)	67 (2)	78 (3)	69 (4)
spiroksamin	111 (7)	91 (2)	113 (4)	102 (3)
tebukonazol	115 (2)	87 (22)	108 (3)	81 (8)
tiametoksam	113 (2)	82 (5)	108 (3)	86 (5)
triflokstrobin	118 (4)	71 (3)	115 (3)	82 (3)
zoksamid	101 (3)	51 (16)	88 (4)	49 (25)

R – analitički povrat

Točnost i preciznost (ponovljivost i obnovljivost) određivanja pesticida u matrici crnog vina uz pripravu uzorka postupkom QuEChERS ispitane su pri koncentracijama pesticida u vinu dvostruko (2 x GO) i deseterostruko (10x GO) višim od granice određivanja. Rezultati su prikazani u Tablici 14.

Ponovljivost metode je utvrđena je na temelju pet određivanja analitičkog povrata pesticida na svakoj koncentracijskoj razini unutar istog dana. Pri nižoj koncentracijskoj razini (2 x GO) analitički povrati bili su između 70 % i 120 % s najmanjom vrijednosti za fludioksonil i spirodiklofen (77 %), a najvišom vrijednosti za kaptan i propikonazol (120 %). Relativna standardna devijacija (RSD) analitičkih povrata bila je <20 % kako se i zahtjeva prema smjernicama SANCO/12571/2013, s najvišim vrijednostima za benalaksil i spiroksamin (7 %). Pri višoj koncentracijskoj razini (10 x GO) za 19 su pesticida postignuti prihvatljivi analitički povrati u rasponu od 70 % do 120 %, dok je analitički povrat spirodiklofena (67 %) bio malo ispod donje granice toga raspona. Vrijednosti RSD bile su <20 %, osim za fluopikolid (24 %) i tebukonazol (22 %). Za pet su pesticida analitički povrati pri koncentraciji u crnom vinu od 10 x GO bili niži (≤60 %) nego pri koncentraciji od 2 x GO (≥89 %): alfa – cipermetrin, benalaksil, propikonazol, boskalid i zoksamid. Unatoč nižim analitičkim povratima, vrijednosti RSD za navedene su pesticide bile prihvatljive i slične pri obje koncentracije u vinu. Jedino je RSD analitičkog povrata zoksamida bio znatno viši (16 %) pri koncentraciji od 10 x GO nego pri koncentraciji 2 x GO (3 %).

Obnovljivost metode određivanja pesticida u matrici crnog vina uz pripravu uzorka postupkom QuEChERS ispitana je određivanjem analitičkog povrata pesticida iz vina pri dvije koncentracijske razine tijekom pet uzastopnih dana (Tablica 14). Analitički povrati svih pesticida pri nižoj koncentraciji u vinu i većine pesticida pri višoj koncentraciji u vinu bili su u rasponu od 70 % do 120 % uz RSD <20 %. Povrati niži od 70 % zabilježeni su pri višoj koncentraciji u vinu za alfa – cipermetrin (57 %), benalaksil (55 %), propikonazol (42 %), boskalid (46 %) i zoksamid (49 %). RSD analitičkog povrata fluopikolida bio je 18 % što je niže u usporedbi s RSD unutar istog dana (24 %), dok je RSD analitičkog povrata zoksamida zabilježen tijekom pet dana bio viši (25 %) nego unutar istog dana (16 %).

Točnost i preciznost metode uz pripravu uzorka postupkom QuEChERS ispitane su i za matricu bijelog vina sličnim postupkom kao i za matricu crnog vina. Za utvrđivanje ponovljivosti napravljeno je pet uzastopnih mjerenja unutar istog dana na dvije koncentracijske razine pesticida u vinu (2 x GO i 10 x GO), dok je za utvrđivanje

obnovljivosti provedeno po pet mjerenja za svaku koncentracijsku razinu kroz tri uzastopna dana. Rezultati su prikazani u Tablici 15.

Tablica 15. Točnost, ponovljivost i obnovljivost određivanja pesticida u matrici bijelog vina uz primjenu postupka QuEChERS.

	Ponovljivost ***R*** **/ % (RSD / %)**		**Obnovljivost** ***R*** **/ % (RSD / %)**	
Pesticid	**γ = 2 x GO**	**γ = 10 x GO**	**Pesticid**	**γ = 2 x GO**
alfa– cipermetrin	80 (19)	45 (17)	33 (5)	51 (5)
azoksistrobin	65 (3)	57 (8)	29 (3)	60 (7)
benalaksil	40 (7)	99 (32)	23 (3)	66 (9)
boskalid	43 (7)	39 (19)	18 (4)	36 (7)
deltametrin	40 (29)	47 (14)	17 (8)	48 (5)
fludioksonil	52 (2)	39 (6)	32 (1)	41 (2)
flukinkonazol	91 (21)	60 (19)	25 (6)	49 (5)
fluopikolid	84 (17)	43 (6)	37 (4)	42 (3)
flusilazol	129 (25)	55 (22)	48 (6)	47 (6)
iprodion	34 (13)	50 (19)	19 (4)	40 (6)
kaptan	33 (4)	22 (6)	14 (3)	22 (4)
klortalonil	37 (3)	25 (6)	18 (2)	27 (4)
krezoksim – metil	53 (5)	91 (28)	32 (3)	64 (8)
lambda – cihalotrin	157 (28)	84 (28)	52 (7)	62 (7)
metalaksil	104 (20)	43 (10)	44 (5)	37 (3)
miklobutanil	172 (28)	40 (4)	55 (7)	49 (2)
piraklostrobin	290 (11)	91 (10)	200 (4)	69 (6)
pirimetanil	89 (3)	60 (5)	55 (2)	51 (8)
propikonazol	83 (34)	50 (18)	31 (7)	43 (5)
spirodiklofen	148 (6)	71 (10)	87 (3)	79 (3)
spiroksamin	115 (19)	74 (4)	69 (6)	70 (2)
tebukonazol	46 (4)	36 (19)	13 (2)	33 (7)
tiametoksam	19 (27)	19 (6)	13 (10)	28 (3)
triflokstrobin	118 (23)	73 (21)	43,3 (6)	54 (5)
zoksamid	12 (6)	16 (30)	7,6 (4)	21 (8)

Pri određivanju ponovljivosti metode postignuti su analitički povrati u rasponu od 70 % do 120 % za osam pesticida pri nižoj te za sedam pesticida pri višoj koncentracijskoj razini u vinu. Najniži povrati na obje su razine određeni za zoksamid i tiametoksam (<20 %). Za većinu pesticida vrijednosti RSD bile su <20 %, dok je RSD >20 % određen za sedam pesticida (deltametrin, flusilazol, lambda – cihalotrin, miklobutanil, propikonazol, tiametoksam i trifloksistrobin) pri nižoj i za šest pesticida (benalaksil, flusilazol, krezoksim – metil, lambda – cihalotrin, trifloksistrobin i zoksamid) pri višoj koncentracijskoj razini. Pri

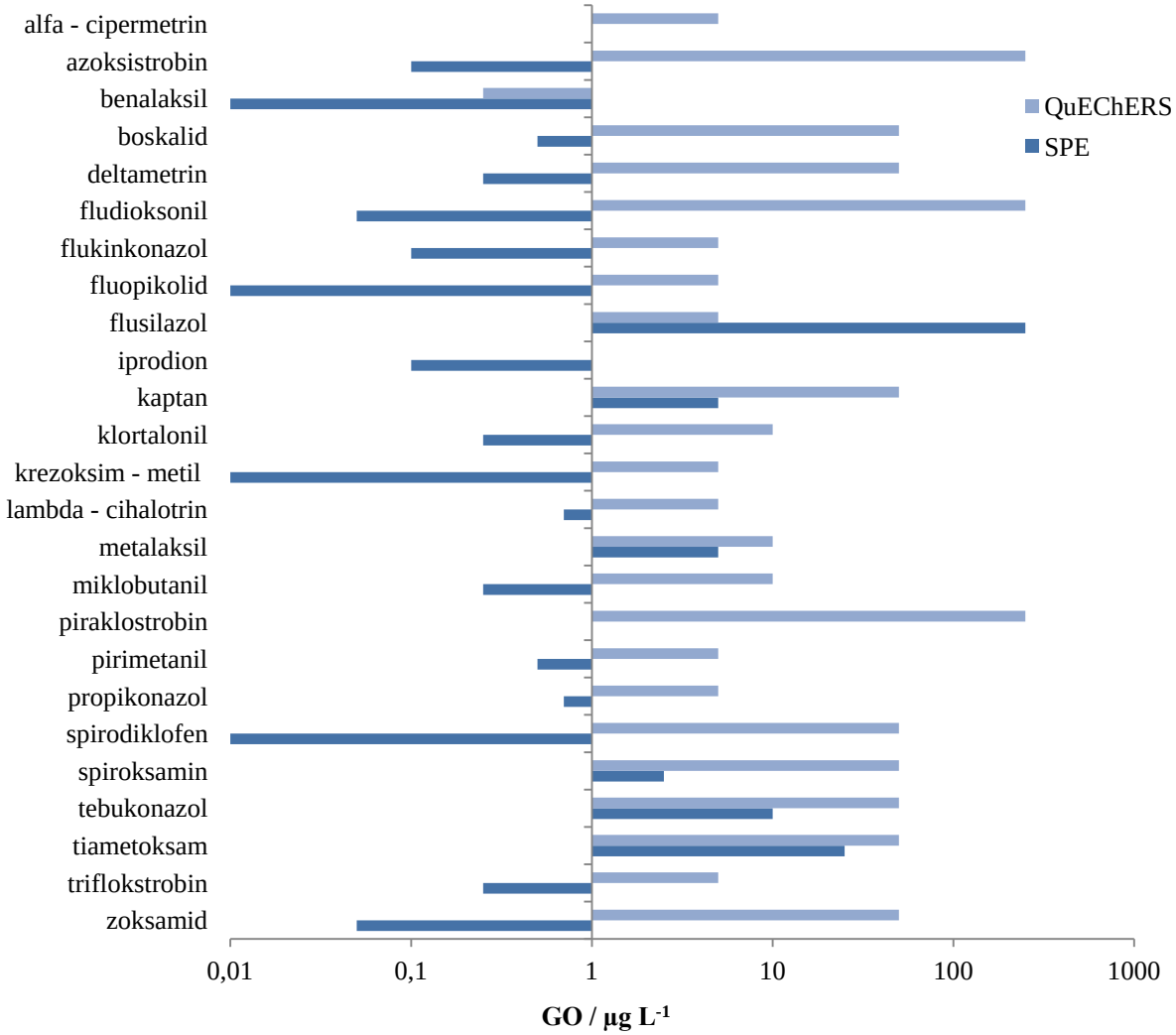
višim koncentracijama u vinu analitički povrati većine pesticida bila su niži nego pri nižim koncentracijama.

Pri određivanju obnovljivosti metode za većinu pesticida postignuti su analitički povrati niži od 70 % uz RSD <20 %, osim za piraklostrobin čiji je povrat pri nižoj koncentraciji bio 200 %. Prihvatljivi analitički povrati određeni su za spirodiklofen i spiroksamin na obje koncentracijske razine. Pri višoj koncentracijskoj razini analitički povrati većine pesticida bili su malo viši nego na nižoj.

Uspoređujući Tablice 14 i 15 može se uočiti da su ispitivanjem točnosti i preciznosti određivanja pesticida u matrici crnog vina za većinu analiziranih spojeva postignuti prihvatljivi analitički povrati uz RSD niži od 20 %, dok su povrati iz matrice bijelog vina bili znatno niži (za većinu pesticida <70 % uz viši RSD). To upućuje na zaključak da predložena metoda uz pripravu uzorka postupkom QuEChERS nije primjenjiva za određivanje većine analiziranih pesticida u matricama bijelog vina. Prema Tablici 15 predložena metoda primjenjiva je za određivanje spirodiklofena i spiroksamina u matrici bijelog vina, obzirom da su za te spojeve analitički povrati i vrijednosti RSD bili prihvatljivi. Valja napomenuti da su granice detekcije i određivanja pesticida u matrici bijelog vina više nego u matrici crnog vina. Lošiji rezultati određivanja pesticida u matrici bijelog vina mogu biti uzrokovani zaostajanjem pesticida u uzorku (vodena faza) što može biti posljedica nedovoljnog isoljavanja. Obzirom da je utjecaj matrice uzorka manji pri određivanju pesticida u matrici bijelog vina u usporedbi s matricom crnog vina, očekivalo se da će se validacijom metode za matrice bijelog vina postići prihvatljiviji rezultati. Može se prepostaviti da su nezadovoljavajući rezultati određivanja pesticida u bijelom vinu u većoj mjeri posljedica nepotpune ekstrakcije pesticida iz uzorka, a u manjoj mjeri posljedica utjecaja matrice uzorka koji je opisan u poglavlju 4.4.

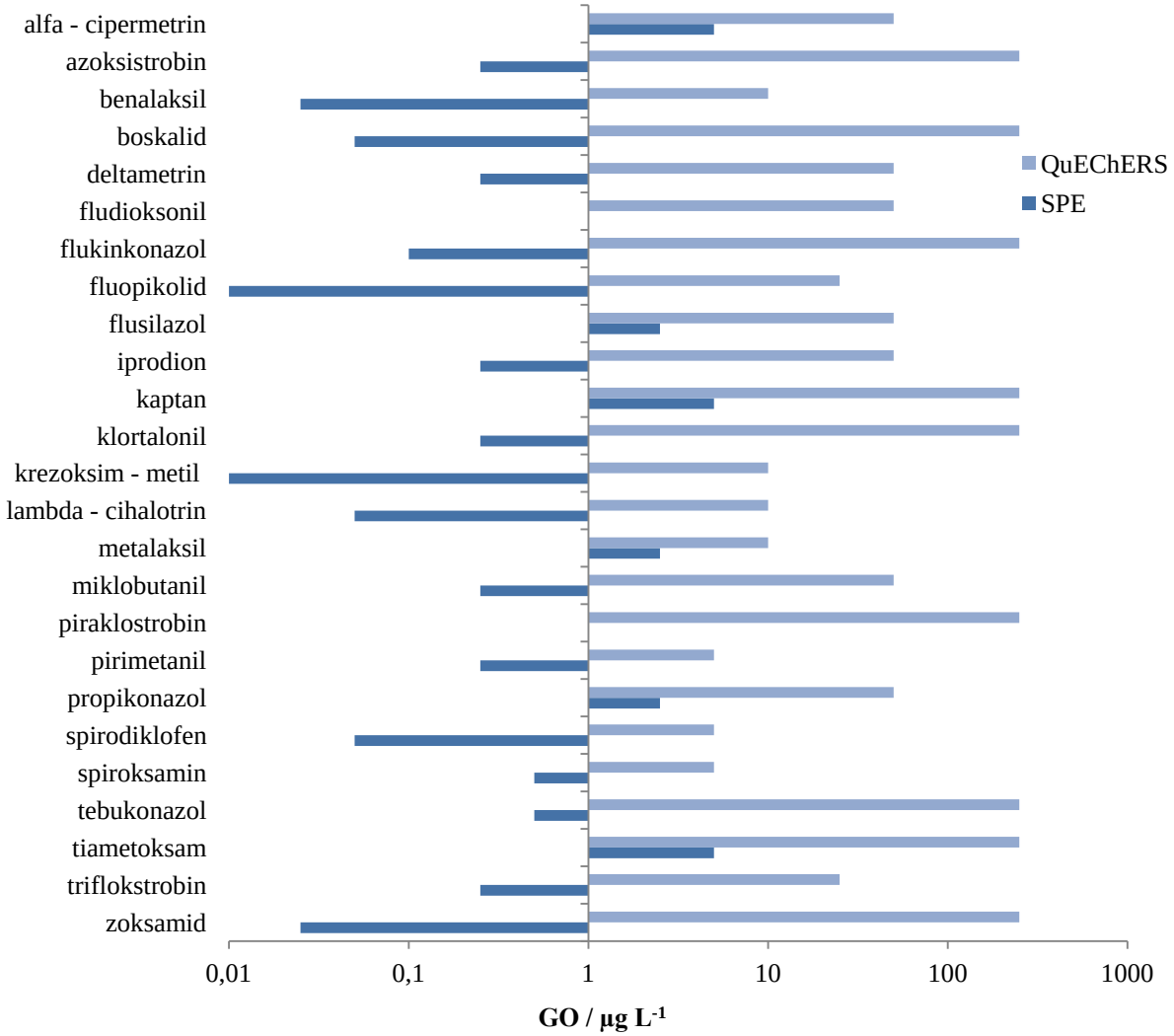
4.3.3. Usporedba ekstrakcije pesticida iz vina na čvrstoj fazi ipostupkom QuEChERS

Uspoređujući granice detekcije i određivanja pesticida u vinu postignute pripravom uzorka ekstrakcijom na čvrstoj fazi i postupkom QuEChERS vidljivo je da su vrijednosti postignute primjenom postupka QuEChERS znatno više (u prosjeku 10 puta) od vrijednosti postignutih primjenom SPE. Usporedba granica određivanja pesticida u matricama crnog i bijelog vina postignutih pripravom uzorka ekstrakcijom na čvrstoj fazi i postupkom QuEChERS prikazana je na Slici 38 (matrica crnog vina) i Slici 39 (matrica bijelog vina).



Slika 38. Usporedba granica određivanja pesticida u matrici crnog vina uz pripravu uzorka postupkom SPE i postupkom QuEChERS (koncentracije na osi x prikazane su u logaritamskoj skali radi preglednosti prikaza).

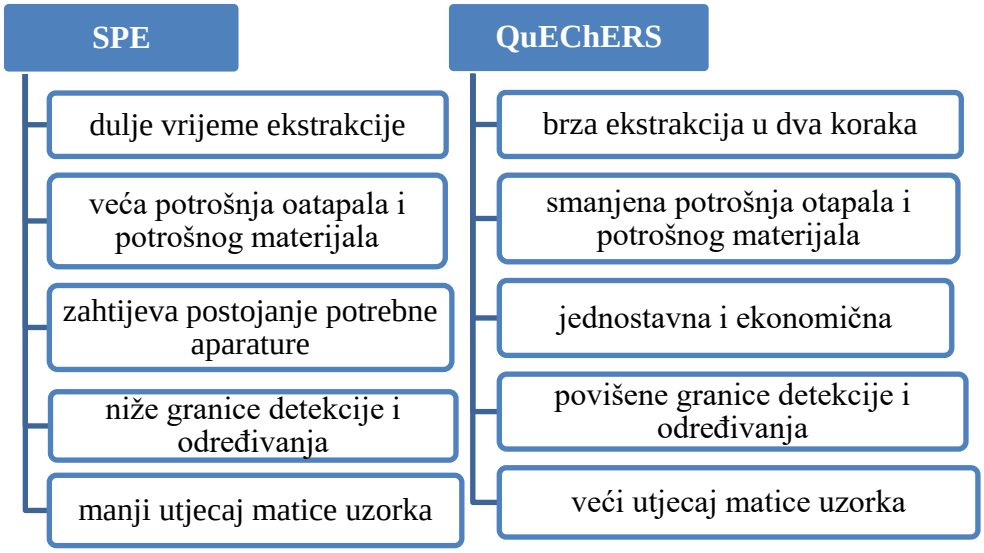
Na temelju prikazanih rezultata može se zaključiti da je utjecaj matrice uzorka znatno izraženiji pri ekstrakciji pesticida iz uzoraka vina postupkom QuEChERS nego pri ekstrakciji na čvrstoj fazi. Ekstrakcijom na čvrstoj fazi postignuto je bolje uklanjanje interferirajućih sastojaka prisutnih u matrici uzorka nego postupkom QuEChERS što je rezultiralo i nižim granicama određivanja pesticida u vinu.



Slika 39. Usporedba granica određivanja pesticida u matrici bijelog vina uz pripravu uzorka postupkom SPE i postupkom QuEChERS (koncentracije na osi x prikazane su u logaritamskoj skali radi preglednosti prikaza).

Unatoč razlici u granicama određivanja pesticida, postignuti su svakom od tih metoda prihvatljivi analitički povrati (70 % do 120 %) pojedinih pesticida. Uz primjenu postupka SPE postignut je izrazito niski povrat tiametoksama iz crnog vina vina (8 % pri koncentraciji od 10 x GO), dok je primjenom postupka QuEChERS analitički povrat tog pesticida bio značajno viši (82 %). Tiametoksam je pesticid izrazito polarnog karaktera što je detaljnije opisano u poglavlju 4.2.2., pa je niska djelotvornost ekstrakcije na čvrstoj fazi očekivana. Znatno viši analitički povrat tiametoksama uz pripravu uzorka postupkom QuEChERS postignut je djelomično i zbog utjecaja matrice uzorka koja smanjuje polarnost navedenog pesticida te tako pospješuje njegov prijelaz u organsku fazu. Postupci SPE i QuEChERS značajno se

razlikuju po osnovnim pristupima ekstrakciji analita iz matrice uzorka od kojih valja napomenuti razrjeđenje uzorka. Razrjeđenje uzorka može značajno utjecati na smanjenje osjetljivosti metode, što za posljedicu ima i povišenje granica detekcije i određivanja. Bez razrjeđenja uzorka, SPE se pokazao neuspješnim postupkom priprave uzorka vina, jer su analitički povrati pesticida bili izrazito niski. Za razliku od postupka SPE, postupkom QuEChERS ekstrahira se prirodni nerazrijeđeni uzorak čime se postižu prihvatljivi analitički povrati pojedinih pesticida. Međutim, utjecaj matrice uzorka izraženiji je pri ekstrakciji pesticida iz vina postupkom QuEChERS nego postupkom SPE što upućuje na važnost razrjeđenja uzorka. QuEChERS se pokazao bržim i ekonomičnijim postupkom koji uključuje dva jednostavna koraka, ekstrakciju pesticida i pročišćavanje ekstrakta, dok je SPE kompleksniji postupak koji uključuje pet koraka: kondicioniranje sorbensa, propuštanje uzorka kroz sorbens, ispiranje sorbensa, sušenje sorbensa i eluiranje sorbiranih analita. Ipak, jedan od najvažnijih zahtjeva u razvoju metode je postizanje što nižih granica detekcije i određivanja analita u uzorcima, posebice pri analizi tragova što je u ovom radu postignuto primjenom postupka SPE. Sažeta usporedba postupaka SPE i QuEChERS prikazana je na Slici 40.



Slika 40. Usporedba postupaka SPE i QuEChERS.

4.4. Utjecaj matrice uzorka na djelotvornost određivanja pesticida u vinu

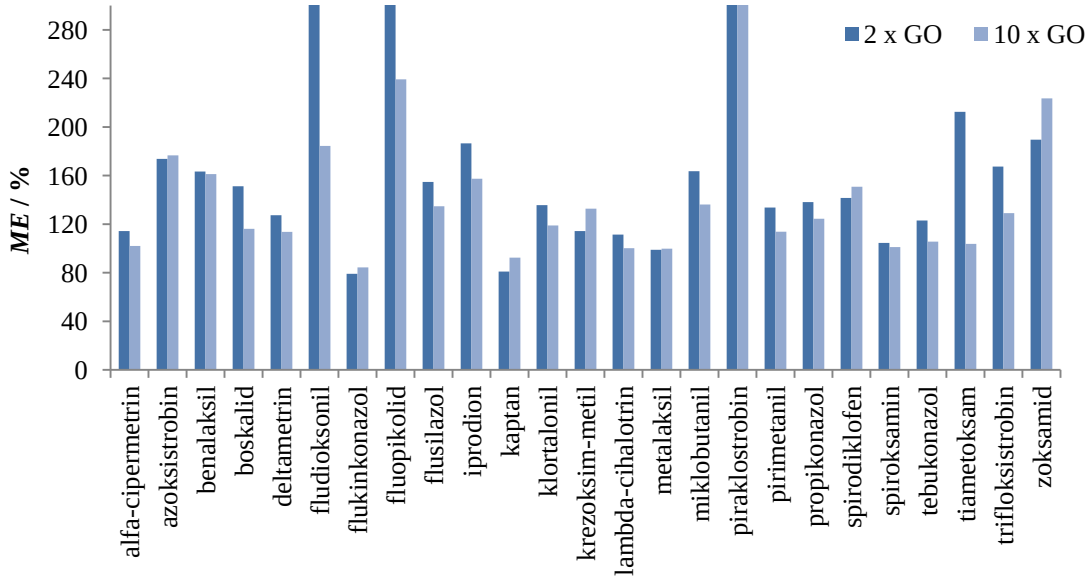
Utjecaj matrice uzorka jedan je od najvećih problema koji se pojavljuju u kvantitativnim analizama te može biti uzrok pogrešnom tumačenju rezultata.[9] Unatoč tome što su tehnike kao što su tekućinska i plinska kromatografija uz detekciju analita spektrometrijom masa visokoselektivne te se najčešće koriste za identifikaciju i određivanje pesticida u različitim uzorcima, vrlo često ipak ne omogućavaju potpuno uklanjanje negativnih utjecaja matrice što je posebno izraženo pri analizi složenih uzoraka. U složenijim uzorcima pesticidi su često prisutni u izrazito niskim koncentracijama, a interferirajući sastojci matrice uzorka u znatno višim koncentracijama što može direktno utjecati na rezultate analize. Postoji nekoliko različitih pristupa smanjivanju utjecaja matrice uzorka na rezultate analize: (i) metoda dodatka standarda, (ii) korištenje kalibracijskih krivulja izrađenih analizom standardnih otopina pripravljenih u ekstraktu matrice uzorka, (iii) korištenje izotopno obilježenih unutarnjih standarda, (iv) korištenje korekcijskih faktora pri izračunu koncentracija analita u određenoj matrici, (v) dodatak protektanta tj. spojeva koji će reagirati s aktivnim mjestima u GC – sustavu, smanjiti termičku razgradnju i/ili adsorpciju injektiranog analita.[120] Optimizacija postupka priprave uzorka najčešći je izbor za uklanjanje interferirajućih sastojaka prisutnih u uzorku koje vrlo često koeluiraju zajedno s analitom. Upotreba protektanata analita ili izotopno obilježenih unutarnjih standarda također je dobar izbor, ali nije ekonomičan što je vrlo bitan čimbenik pri rutinskim analizama. Pristupi koji se u novije vrijeme najčešće koriste za smanjivanje utjecaja matrice uzorka pri analizi pesticida su metoda dodatka standarda ili korištenje kalibracijskih krivulja izrađenih analizom standardnih otopina pripravljenih u ekstraktu matrice uzorka. Postoji više načina procjene utjecaja matrice uzorka na rezultat analize ciljanog analita. Najčešći pristup je usporedba nagiba kalibracijskih krivulja dobivenih linearnom regresijom rezultata analize standardnih otopina smjese pesticida pripravljenih u čistom otapalu i rezultata analize standardnih otopina smjese pesticida pripravljenih u matrici uzorka.[9,11] Također vrlo čest pristup izračunu utjecaja matrice uzorka je metoda po Matuszewskom.[113] Tom se metodom uspoređuju rezultati analize pesticida dodanih u vino prije ekstrakcije i rezultati analize pesticida dodanih u ekstrakt vina te se procjenjuje, uz utjecaj matrice uzorka, i djelotvornost ekstrakcije.

U okviru ovog istraživanja ispitana su dva pristupa procjeni utjecaja matrice uzorka kako je detaljno opisano u poglavlju 3.2.5. Procijenjen je utjecaj matrice uzorka obzirom na postupak priprave uzorka (SPE i QuEChERS) te obzirom na vrstu vina (crno i bijelo vino).

Detaljniji prikaz rezultata utjecaja matrice uzorka na djelotvornost cjelokupne analitičke metode uz primjenu SPE i postupka QuEChERS prikazan je u PRILOZIMA XII i XIII.

4.4.1. Utjecaj matrice uzorka na djelotvornost određivanja pesticida u vinu uz primjenu ekstrakcije na čvrstoj fazi

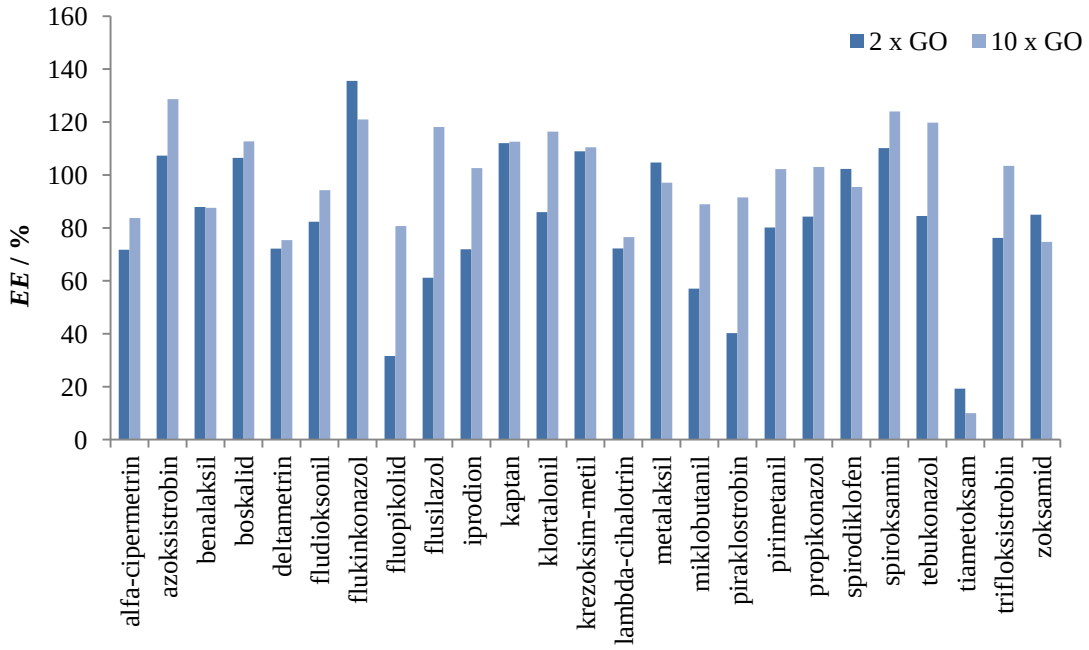
Utjecaj matrice (ME) uzorka na djelotvornost određivanja pesticida u vinu metodom koja uključuje SPE izračunat je prema izrazu (11) metodom po Matuszewskom[113] i to za koncentracije pesticida u vinu dvostruko (2 x GO) i deseterostruko (10 x GO) više od granice određivanja. Odstupanje do ±10 % od 100 % – tnog odziva detektora za određeni pesticid upućuje da nema značajnog utjecaja matrice uzorka na djelotovornost primijenjene metode. Vrijednosti veće od 100 % upućuju na utjecaj matrice uzorka koji se ocjenjuje kao: mali (do ±20 %, od 100 %), srednji (± 20 % do ±50 %, od 100 %) ili jak utjecaj (veći od ±50 %, od 100 %). Vrijednosti niže od 100 % upućuju na prigušenje kromatografskog signala (odziva detektora), a vrijednosti više od 100 % na pojačanje signala. U matrici crnog vina za većinu je analiziranih pesticida zabilježen pozitivni utjecaj matrice uzorka, odnosno pojačanje signala na obje koncentracijske razine. Jedino su signali kaptana i flukinkonazola bili prigušeni (Slika 41). Za piraklostrobin, fluopikolid, fludioksonil i zoksamid zabilježen je izrazito jak utjecaj matrice izražen kao pojačanje kromatografskog signala na obje koncentracijske razine.



Slika 41. Utjecaj matrice uzorka na kromatografski signal pesticida ekstrahiranih iz crnog vina postupkom SPE pri koncentracijama u vinu dvostruko (2 x GO) i deseterostruko (10 x GO) višim od granice određivanja.

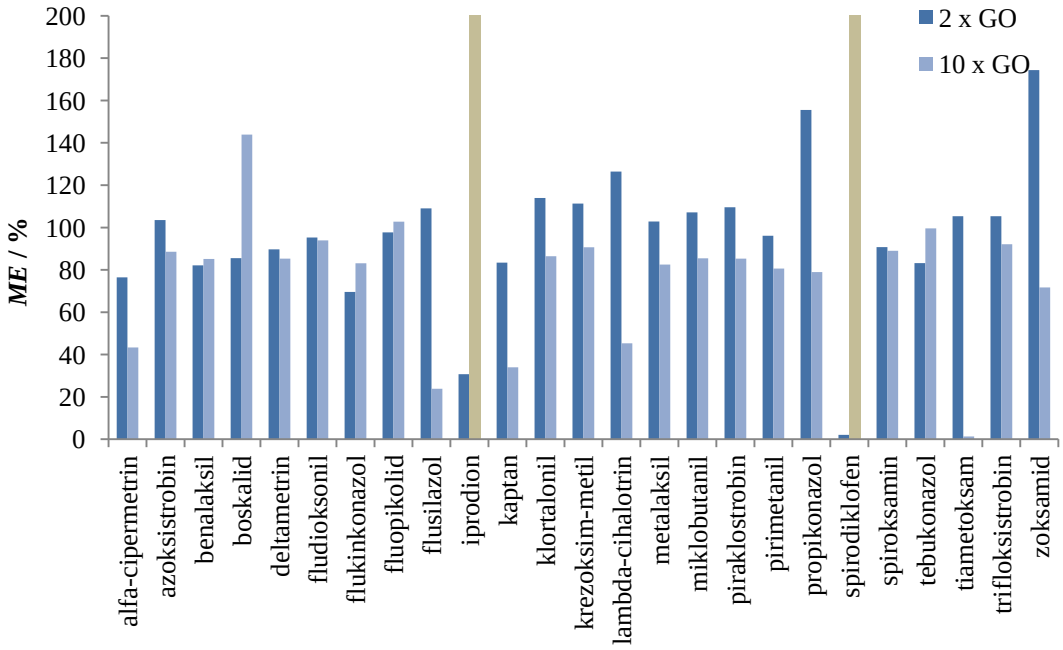
Djelotvornost ekstrakcije (EE) pesticida iz crnog vina ispitana je također na dvije koncentracijske razine, 2 x GO i 10 x GO. Za većinu pesticida (76 % pesticida pri koncentraciji od 2 x GO te 84 % pesticida pri koncentraciji od 10 x GO) djelotvornost ekstrakcije je bila u rasponu od 70 % do 120 %. Djelotvornost ekstrakcije od 60 % do 140 % zabilježena je za 84 % pesticida pri koncentraciji od 2 x GO te za 96 % pesticida pri koncentraciji od 10 x GO. Rezultati upućuju na mali do umjereni utjecaj matrice uzorka na djelotvornosti ekstrakcije postupkom SPE na određivanje pesticida u uzorcima crnog vina što potvrđuje učinkovitost ovog postupka za ekstrakciju pesticida iz crnih vina. Iznimke su pesticidi s djelotvornošću ekstrakcije nižom od 60 % kao što su tiametoksam pri obje koncentracijske razine te miklobutanil, fluopikolid i piraklostrobin pri nižoj koncentracijskoj razini (2 x GO).

Iz navedenih rezultata može se zaključiti da je utjecaj matrice crnog vina na djelotvornost ekstrakcije izraženiji pri nižim koncentracijama pesticida pa je, očekivano, i djelotvornost ekstrakcije niža. Djelotvornost ekstrakcije pesticida iz crnog vina postupkom SPE prikazana je na Slici 42.



Slika 42. Djelotvornost ekstrakcije pesticida iz crnog vina postupkom SPE pri koncentracijama u vinu dvostruko (2 x GO) i deseterostruko (10 x GO) višim od granice određivanja.

Utjecaj matrice uzorka na djelotvornost određivanja pesticida u bijelom vinu znatno je manji nego u crnom vinu što se može vidjeti na Slici 43. Manji utjecaj matrice bijelog vina na određivanje pesticida je i očekivan obzirom da u matrici bijelog vina nije prisutno toliko spojeva različitih kemijskih klasa kao u matrici crnog vina.

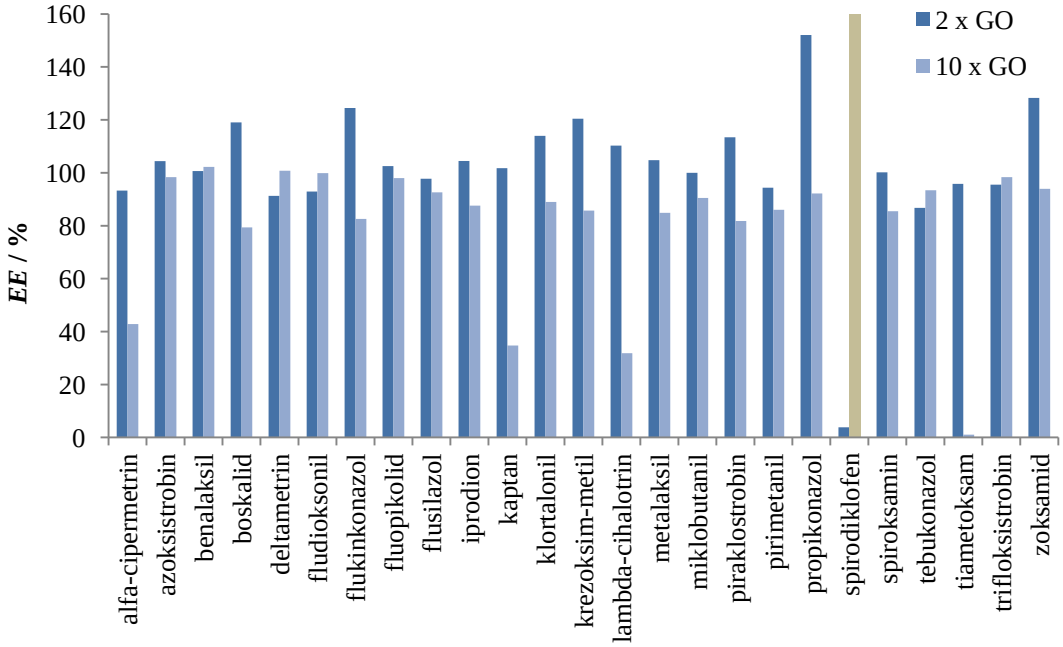


Slika 43. Utjecaj matrice uzorka na kromatografski signal pesticida ekstrahiranih iz bijelog vina postupkom SPE pri koncentracijama u vinu dvostruko (2 x GO) i deseterostruko (10 x GO) višim od granice određivanja.

Na obje koncentracijske razine za većinu je pesticida utvrđen sličan utjecaj matrice bijelog vina na njihovo određivanje što upućuje na zaključak da taj utjecaj ne ovisi o njihovoj koncentraciji u uzorku. Za alfa – cipermetrin zabilježeno je jako prigušenje kromatografskog signala pri koncentraciji od 10 x GO, dok je pri koncentraciji od 2 x GO utjecaj matrice bio mali. Za iprodion i spirodiklofen također je pri koncentraciji od 10 x GO zabilježen jak utjecaj matrice izražen kao pojačanje signala (označeno sivom bojom što označava interferenciju – signal veći od prikazanog na Slici 43), dok je pri koncentraciji od 2 x GO velik utjecaj matrice izražen kao prigušenje signala. Za tiametoksam utvrđen je jak utjecaj matrice izražen kao prigušenje signala pri koncentraciji od 10 x GO.

Procijenjen je i ukupni utjecaj matrice crnog i bijelog vina na određivanje pesticida izračunat kao srednja vrijednost rezultata dobivenih analizom pesticida dodanih u vino u koncentracijama na dvije koncentracijske razine. Rezultati su prikazani u Tablici 16.

Djelotvornost ekstrakcije pesticida iz bijelog vina postupkom SPE pri koncentracijama u vinu dvostruko i deseterostruko višim od granice određivanja prikazana je na Slici 44.



Slika 44. Djelotvornost ekstrakcije pesticida iz bijelog vina postupkom SPE pri koncentracijama u vinu dvostruko (2 x GO) i deseterostruko (10 x GO) višim od granice određivanja.

Za 20 pesticida djelotvornost ekstrakcije bila je u rasponu od 70 % do 120 % na obje koncentracijske razine. Analitički povrat zoksamida bio je u rasponu od 60 % do 140 % (128 % pri nižoj koncentraciji), dok je analitički povrat propikonazola pri nižoj koncentraciji bio povišen, čak 152 %. Pri koncentraciji od 10 x GO analitički povrati alfa – cipermetrina i lambda – cihalotrina bili su <40 %, dok je analitički povrat tiametoksama bio zanemariv, svega 1 %. Za spirodiklofen je dobiven izrazito visok analitički povrat (>200 %, označeno sivom bojom, signal veći od prikazanog na Slici 44) pri višoj koncentraciji, dok je pri nižoj koncentraciji analitički povrat bio svega prbližno 4 %.

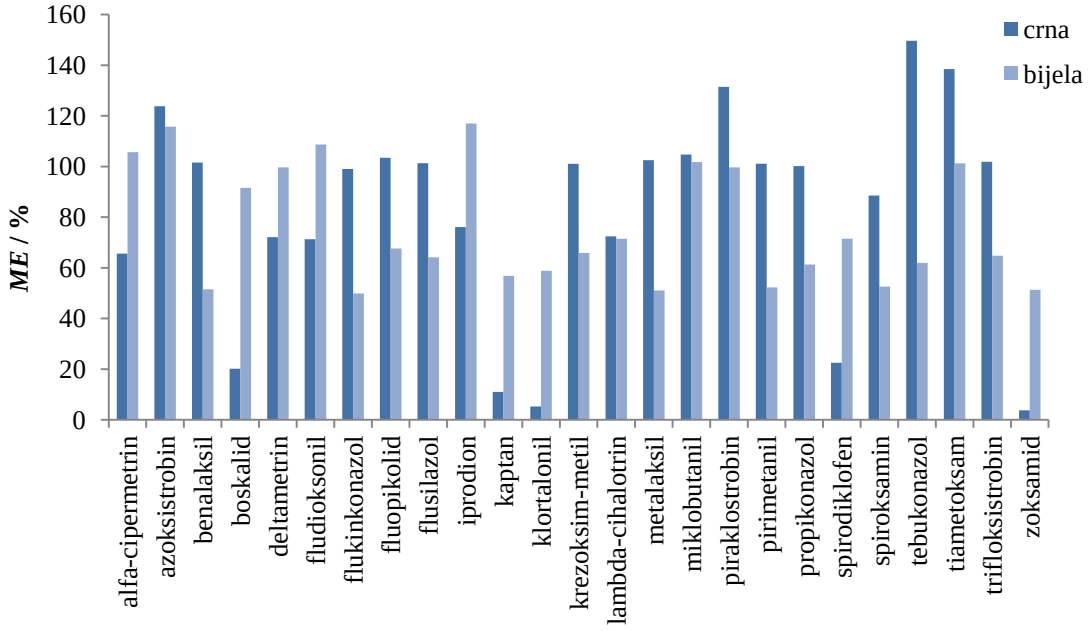
Na temelju rezultata određivanja utjecaja matrice uzorka i primijenjenog postupka ekstrakcije na djelotvornost određivanja pesticida u crnim i bijelim vinima može se zaključiti da je postupak SPE prikladan za ekstrakciju većine istraživanih pesticida iz obje matrice vina.

Primjenom SPE utjecaj matrice uvelike je smanjen, što se može vidjeti iz rezultata dobivenih za djelotvornost ekstrakcije tj. analitičkih povrata pesticida. Detaljni rezultati utjecaja matrice vina na djelotovornost određivanja pesticida i analitički povrati pojedinih spojeva ekstrahiranih iz vina postupkom SPE prikazani su u PRILOGU XII.

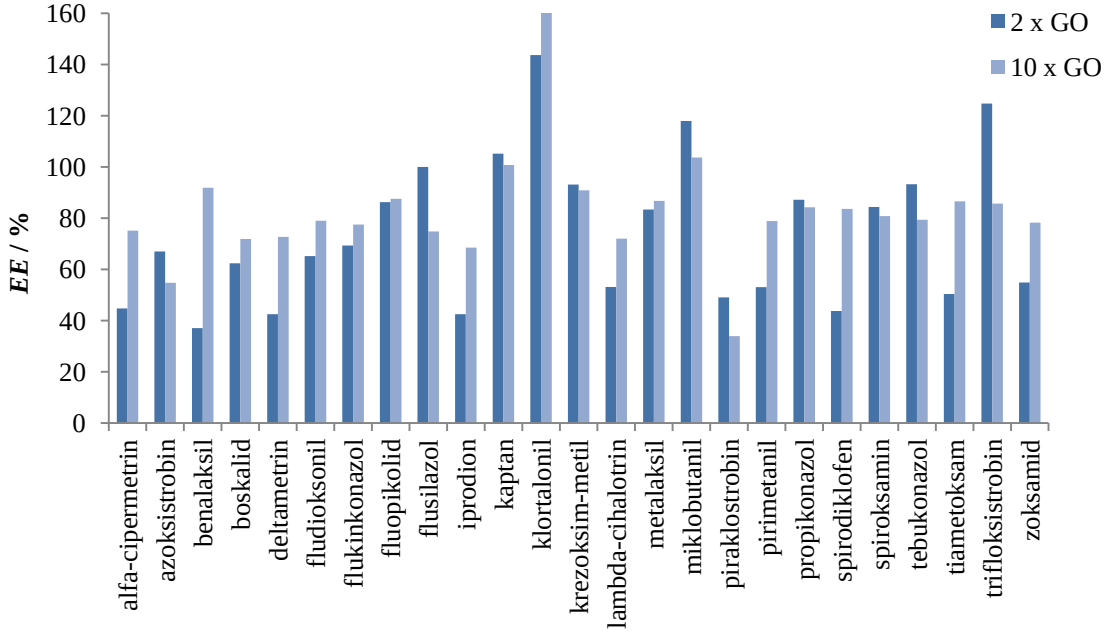
4.4.2. Utjecaj matrice uzorka na djelotvornost određivanja pesticida u vinu uz primjenu postupka QuEChERS

Kao što je već spomenuto u poglavlju 4.3.2. primjenom postupka QuEChERS zabilježen je u usporedbi s postupkom SPE izraženiji utjecaj matrice uzorka što je bitno utjecalo na rezultate određivanja pesticida u vinu. Utjecaj matrice uzorka procijenjen je na temelju usporedbe nagiba kalibracijskih krivulja dobivenih linearnom regresijom rezultata analize standardnih otopina smjese pesticida pripravljenih u čistom otapalu i standardnih otopina pripravljenih u matrici uzorka.[9] Utjecaj matrice uzorka izračunat je prema izrazu (12). Na ovaj način procjenjuje se utjecaj matrice uzorka u cijelokupnom linearnom području analitičke metode, a izražava se kao prigušenje i/ili pojačanje kromatografskog signala. Vrijednosti do ±10 %, od 100 % znači da nema utjecaja matice uzorka; vrijednosti do ±20 % od 100 % upućuju na mali utjecaj matrice uzorka, vrijednosti ± 20 % do ±50 %, od 100 % upućuju na srednji utjecaj matrice, dok vrijednosti veće od ±50 %, od 100 % upućuju na jak utjecaj matrice. Utjecaj matrice ispitan je istim postupkom za matrice crnog i bijelog vina (Slika 45). Za 11 od 25 pesticida određivanih u matrici crnog vina utjecaj matrice na njihov kromatografski signal nije zabilježen ili je bio mali. Za devet pesticida zabilježen je srednji utjecaj matrice uzorka i to za pet pesticida izražen kao prigušenje signala, a za četiri pesticida kao pojačanje signala. Jak utjecaj matrice crnog vina, izražen kao prigušenje signala, zabilježen je za pet pesticida. U matrici bijelog vina 9 od 25 pesticida nije zabilježen utjecaj matrice na njihov kromatografski signal ili je bio mali, kod 16 pesticida zabilježen je srednji utjecaj matrice, dok jak utjecaj matrice na njihov kromatografski signal nije zabilježen.

Djelotvornost ekstrakcije pesticida iz crnog vina postupkom QuEChERS ispitana je na pri koncentracijama u vinu dvostruko i deseterostruko višim od granice određivanja (Slika 46). Pri koncentraciji od 2 x GO djelotvornost ekstrakcije je za 9 pesticida bila u rasponu od 70 % do 120 %, za dva pesticida viša od 120 %, a za 14 pesticida niža od 70 %. Pri višoj koncentraciji od 10 x GO za 21 je pesticid djelotvornost ekstrakcije bila od 70 % do 120 %.

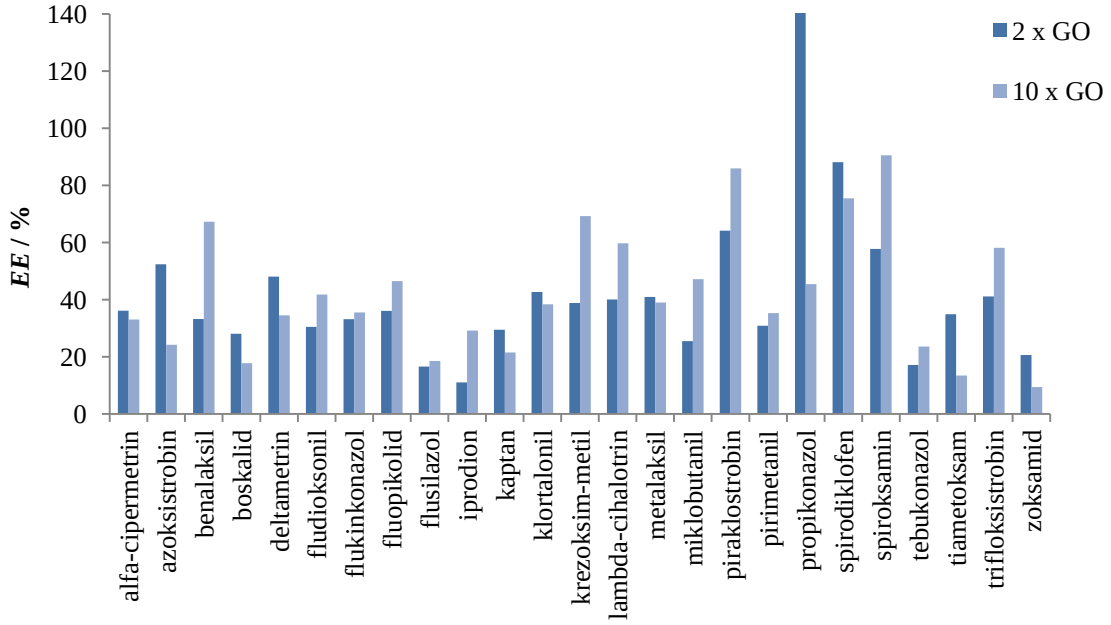


Slika 45. Utjecaj matrice uzorka na kromatografski signal pesticida ekstrahiranih iz crnog i bijelog vina postupkom QuEChERS.



Slika 46. Djelotvornost ekstrakcije pesticida iz crnog vina postupkom QuEChERS pri koncentracijama u vinu dvostruko (2 x GO) i deseterostruko (10 x GO) višim od granice određivanja.

Djelotvornost ekstrakcije pesticida postupkom QuEChERS iz bijelih vina ispitana je na isti način kao i iz crnih vina. Kao što se može vidjeti na Slici 47, iz matrice bijelog vina postignute su znatno niže vrijednosti analitičkih povrata pesticida nego iz crnog vina. Na temelju tih rezultata može se zaključiti da postupak QuEChERS nije primjenjiv na matrice bijelog vina kao što je i navedeno u poglavlju 4.3.2.



Slika 47. Djelotvornost ekstrakcije pesticida iz bijelog vina postupkom QuEChERS pri koncentracijama u vinu dvostruko (2 x GO) i deseterostruko (10 x GO) višim od granice određivanja.

Detaljni rezultati utjecaja matrice vina na djelotovornost određivanja pesticida i analitički povrati pojedinih spojeva ekstrahiranih iz vina postupkom QuEChERS prikazani su u PRILOGU XIII.

Utjecaj matrice uzorka znatno je izraženiji uz ekstrakciju pesticida iz bijelih vina postupkom QuEChERS nego postupkom SPE. To potvrđuje činjenica da je za 64 % pesticida određivanih u matrici bijelog vina uz ekstrakciju QuEChERS zabilježen srednji do jaki utjecaj matrice uzorka na kromatografski signal analita. Iz navedenog se može zaključiti da je SPE djelotvorniji postupak za ekstrahiranje pesticida iz bijelih vina kojim je utjecaj matrice maksimalno reduciran, a djelotvornost ekstrakcije za većinu je pesticida u prihvatljivom području od 70 % do 120 %. Utjecaj matrice uzorka bio je podjednak za oba postupka ekstrakcije pesticida iz crnih vina.

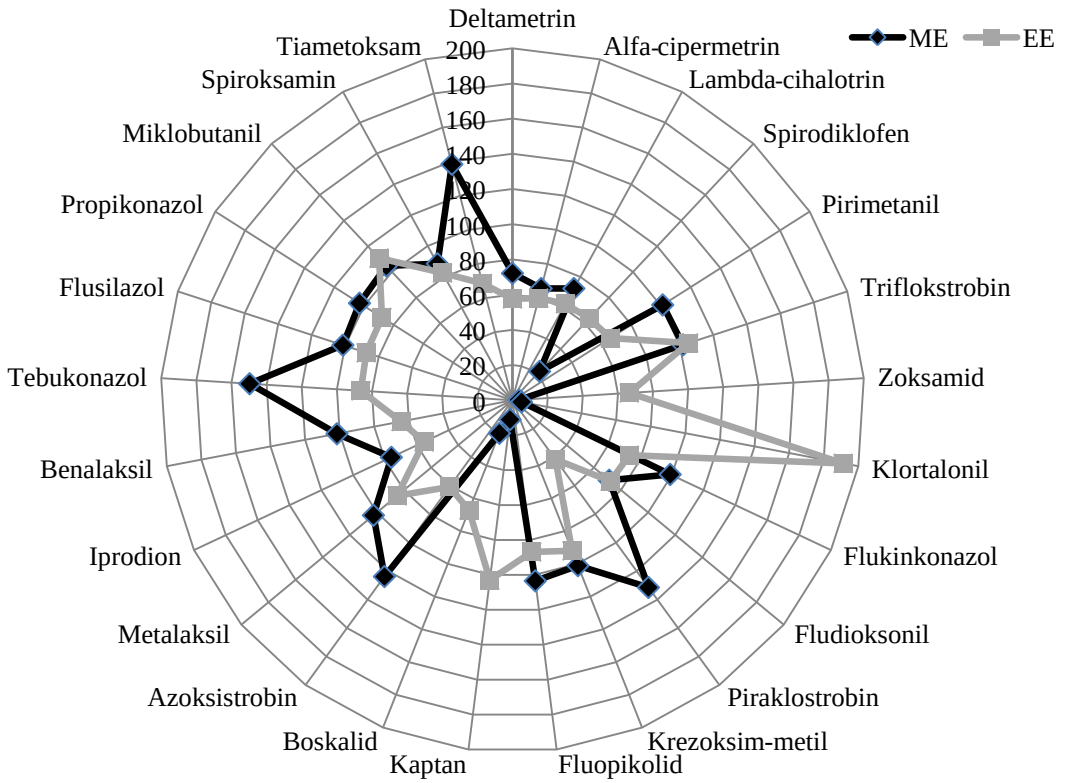
Koliko će biti izražen utjecaj matrice uzorka ovisi, osim o samoj matrici i postupku priprave uzorka, i o fizikalno – kemijskim svojstvima određivanih pesticida. Ključna fizikalno – kemijska svojstva pesticida koja imaju važnu ulogu pri odabiru metodologije određivanja ostataka pesticida u uzorcima, su topljivost pesticida u vodi i njihova hidrofobnost izražena koeficijentom razdjeljenja u sustavu oktanol – voda. Većina pesticida određivanih u ovom radu nepolarnog je karaktera (ukupno 23 pesticida), dok tiametoksam i metalaksil spadaju u pesticide s izraženim polarnim karakterom. Pri različitim postupcima priprave uzorka utjecaj iste matrice uzorka na određivanje istih analita ne mora biti jednak niti sličan. U Tablici 16. sažeto je prikazan utjecaj matrice crnog i bijelog vina na djelotvornost određivanja pesticida ovisno o postupku priprave uzorka. Za svaki su pesticid navedeni topljivost u vodi i koeficijent razdjeljenja K_{ow}. Iz Tablice 16 može se vidjeti da je za matrice crnog vina iz kojih su pesticidi ekstrahirani postupkom SPE, za osam pesticida utvrđen jak utjecaj matrice, za 10 pesticida srednji, za tri pesticida mali, dok za četiri pesticida nije bilo značajnog utjecaja. Uz primjenu postupka QuEChERS jak utjecaj matrice utvrđen je za pet pesticida, srednji za 10 pesticida, dok za 10 pesticida nije uočen utjecaj. Pri ekstrakciji pesticida iz bijelih vina postupkom SPE za ukupno 11 pesticida utvrđeno je da nema utjecaja matrice, za šest pesticida utjecaj matrice bio je mali, za šest pesticida utjecaj matrice bio je srednji, a za dva jaki. Uz primjenu postupka QuEChERS srednji utjecaj matrice utvrđen je za 16 pesticida, za dva pesticida utjecaj matrice bio je mali, dok za sedam pesticida nije zabilježen utjecaj. Kao što je već spomenuto u ovom poglavlju, utjecaj matrice uzorka vina na djelotvornost određivanja pesticida različitih fizikalno – kemijskih svojstava uvelike ovisi o odabiru postupka priprave uzorka. Primjenom različitih postupaka priprave uzorka ne mora se nužno na jednak način smanjiti utjecaj matrice što je i potvrđeno u okviru ovog istraživanja. Uspoređujući podatke o utjecaju matrice uzorka na kromatografski signal pesticidnih analita ekstrahiranih iz vina postupkom SPE ili QuEChERS (Tablica 16) vidljivo je da primjenom ovih dvaju postupaka nije postignuto jednako smanjivanje utjecaja matrice uzorka. O postupku priprave uzoraka ovisi i utječe li matrica uzorka na prigušenje ili pojačanje kromatografskog signala analita. Tako je za boskalid, spirodiklofen i zoksamid nakon ekstrakcije iz crnog vina postupkom SPE utvrđeno pojačanje, a nakon ekstrakcije postupkom QuEChERS prigušenje kromatografskog signala. Podudadaranje utjecaja matrice uz pripravu uzorka postupcima SPE i QuEChERS zabilježeno je u matricama bijelog vina za azoksistrobin, boskalid, fludioksonil, deltametrin, flusilazol, miklobutanil, piraklostrobin i kaptan (mali ili nikakav utjecaj).

Tablica 16. Utjecaj matrice (ME) crnog i bijelog vina na kromatografski signal na postupak priprave uzorka.

Pesticid	Topljivost u vodi / mg L^{-1}	log K_{ow}	ME (SPE, crna vina)	ME (QuEChERS, crna vina)	ME (SPE, bijela vina)	ME (QuEChERS, bijela vina)
alfa – cipermetrin	0,004	6,6	nema utjecaja	srednji, prigušenje	srednji, prigušenje	nema utjecaja
azoksistrobin	6	2,5	jak, pojačanje	srednji, pojačanje	nema utjecaja	mali
benalaksil	28,6	3,5	jak, pojačanje	nema utjecaja	mali	srednji, prigušenje
boskalid	4,64	2,9	srednji, pojačanje	jak, prigušenje	mali	nema utjecaja
deltametrin	0,0002	4,6	srednji, pojačanje	srednji, prigušenje	mali	nema utjecaja
fludioksonil	1,8	4,1	jak, pojačanje	srednji, prigušenje	nema utjecaja	nema utjecaja
flukinkonazol	1	3,2	mali	nema utjecaja	srednji, prigušenje	srednji, prigušenje
fluopikolid	2,8	3,3	jak, pojačanje	nema utjecaja	nema utjecaja	srednji, prigušenje
flusilazol	42	3,9	srednji, pojačanje	nema utjecaja	srednji, prigušenje	srednji, prigušenje
iprodion	13	3	jak, pojačanje	srednji, prigušenje	jak, pojačanje	mali
kaptan	3,3	2,8	mali	jak, prigušenje	srednji, prigušenje	srednji, prigušenje
klortalonil	0,81	2,9	srednji, pojačanje	jak, prigušenje	nema utjecaja	srednji, prigušenje
krezoksim – metil	2	3,4	srednji, pojačanje	nema utjecaja	nema utjecaja	srednji, prigušenje
lambda – cihalotrin	0,005	7	nema utjecaja	srednji, prigušenje	mali	srednji, prigušenje
metalaksil	8,4	1,7	nema utjecaja	nema utjecaja	nema utjecaja	srednji, prigušenje
miklobutanil	142	2,9	srednji, pojačanje	nema utjecaja	nema utjecaja	nema utjecaja
piraklostrobin	1,9	4	jak, pojačanje	srednji, pojačanje	nema utjecaja	nema utjecaja
pirimetanil	0,12	2,8	srednji, pojačanje	nema utjecaja	mali	srednji, prigušenje
propikonazol	100	3,7	srednji, pojačanje	nema utjecaja	mali	srednji, prigušenje
spirodiklofen	0,05	5,8	srednji, pojačanje	jak, prigušenje	jak, pojačanje	srednji, prigušenje
spiroksamin	470	2,8	nema utjecaja	srednji, prigušenje	nema utjecaja	srednji, prigušenje
tebukonazol	32	3,7	mali	srednji, pojačanje	nema utjecaja	srednji, prigušenje
tiametoksam	4100	-0,1	jak, pojačanje	srednji, pojačanje	srednji, prigušenje	nema utjecaja
triflokstrobin	0,61	4,5	srednji, pojačanje	nema utjecaja	nema utjecaja	srednji, prigušenje
zoksamid	0,681	3,8	jak, pojačanje	jak, prigušenje	srednji, pojačanje	srednji, prigušenje

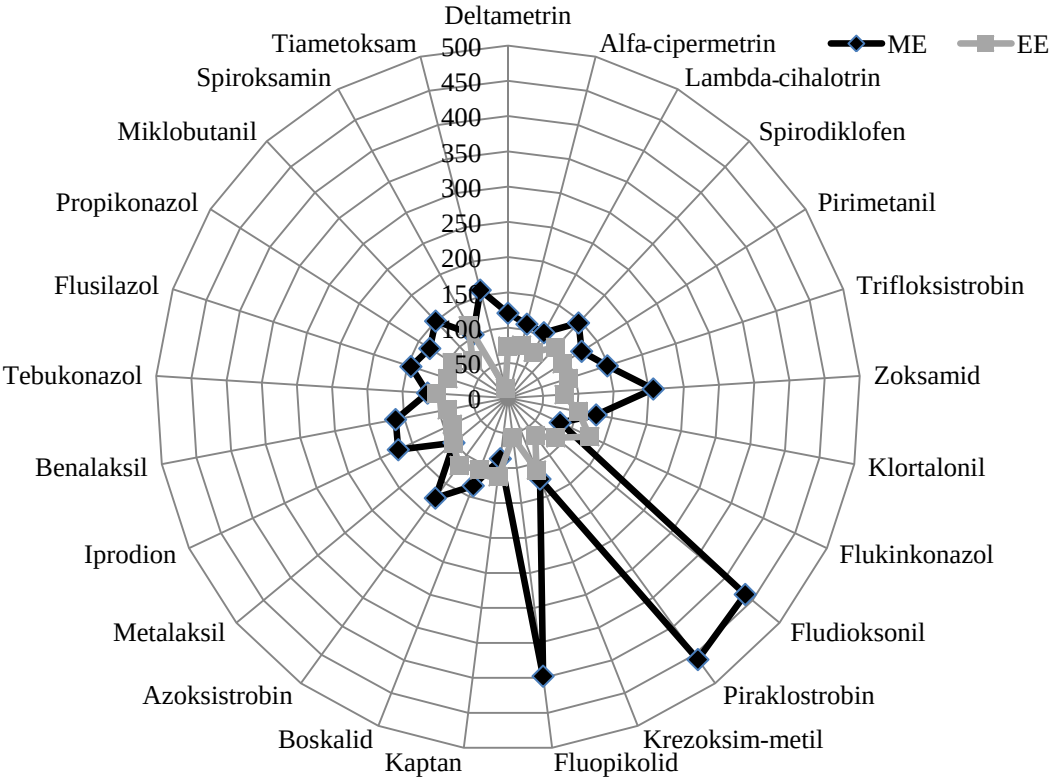
4.4.3. Ovisnost utjecaja matrice uzorka i djelotvornosti ekstrakcije pesticida iz vina o topljivosti pesticida u vodi i njihovoj hidrofobnosti

Na Slici 48 prikazan je odnos utjecaja matrice uzorka crnog vina na kromatografski signal pesticida uz pripravu uzorka postupkom QuEChERS, djelotvornosti ekstrakcije pesticida iz crnog vina tim postupkom i topljivosti pesticida u vodi. Ovisnost je prikazana u smjeru kazaljke na satu počevši od najmanje vrijednosti topljivosti analiziranih pesticida u vodi (deltametrin, 0,0002 mg L^{-1}). Zbog preglednijeg prikaza vrijednosti za ME prikazane su u postotku tako da vrijednost od 100 % znači da utjecaja matrice nema, ±20 % da je utjecaj matrice mali (80 % do 120 %), i tako redom. Vrijednost ME je uglavnom viša od EE za sve pesticide s vrijednostima ME između 60 % i 120 %. Iz prikaza na Slici 48 može se zaključiti da su više vrijednosti EE i ME dobivene za pesticide koji imaju veću topljivost u vodi. Iznimke su kaptan i boskalid za koje je utvrđena niska vrijednost ME. Kod klortalonila zabilježeno je jako prigušenje signala uz visoki EE što upućuje na nedjelotvornost postupka QuEChERS za ekstrakciju klortalonila iz crnog vina.



Slika 48. Utjecaj matrice uzorka na kromatografski signal i djelotvornost ekstrakcije pesticida iz crnog vina postupkom QuEChERS u ovisnosti o topljivosti pesticida u vodi.

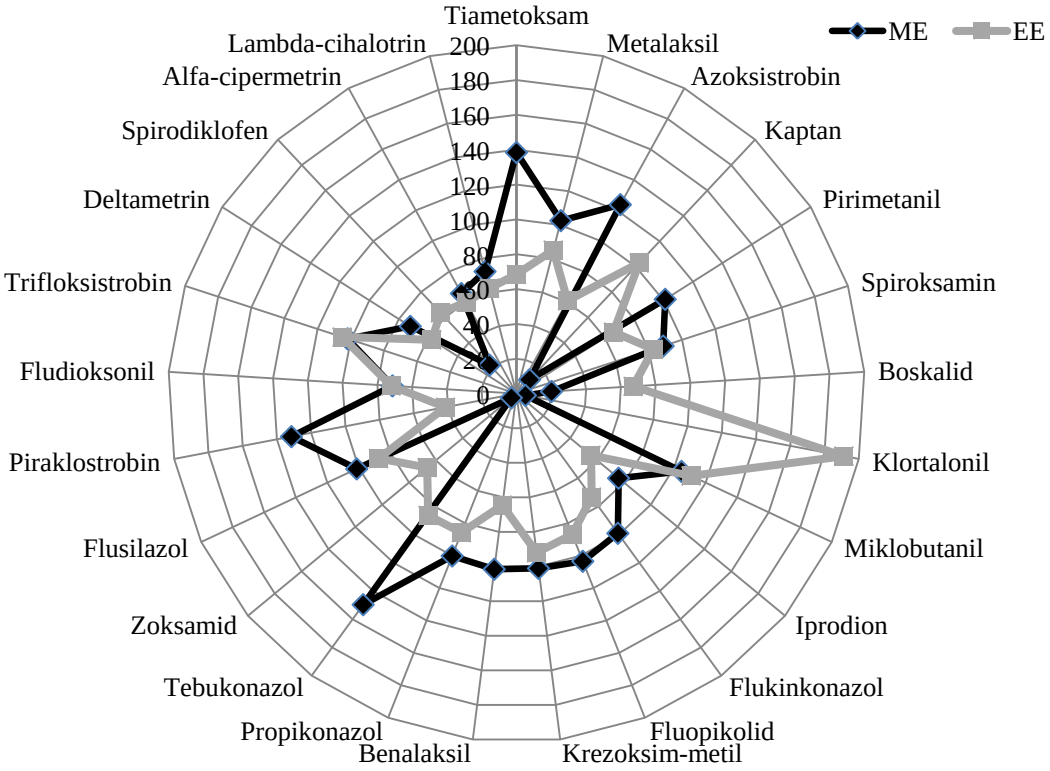
Odnos utjecaja matrice uzorka, djelotvornosti ekstrakcije iz crnog vina i topljivosti pesticida u vodi ispitan je i uz pripravu uzorka postupkom SPE. Na Slici 49 prikazane su srednje vrijednosti EE i ME određene analizom pesticida dodanih u crno vino u koncentracijama dvostruko i deseterostruko višim od granice određivanja. Za razliku od postupka QuEChERS, primjenom postupka SPE dobivene su za pojedine pesticide slične vrijednosti EE i ME neovisno o njihovoj topljivosti u vodi. Iznimke su piraklostrobin, fluopikolid i fludioksonil za koje su utvrđene izrazito visoke vrijednosti ME.



Slika 49. Utjecaj matrice uzorka na kromatografski signal i djelotvornost ekstrakcije pesticida iz crnog vina postupkom SPE u ovisnosti o topljivosti pesticida u vodi.

Uz topljivost u vodi, vrlo važno svojstvo pesticida o kojem također ovisi utjecaj matrice uzorka i djelotvornost ekstrakcije iz vina, njihova je hidrofobnost, tj. koeficijent razdjeljenja u sustavu oktanol – voda (log K_{ow}). Na Slici 50 prikazana je ovisnost utjecaja matrice uzorka na kromatografski signal i djelotvornosti ekstrakcije pesticida iz crnog vina postupkom QuEChERS o log K_{ow} pojedinih pesticida. Vrijednosti su poredane na isti način kao na Slici 48 u smjeru kazaljke na satu počevši od tiametoksama koji ima najnižu vrijednost log K_{ow} (-

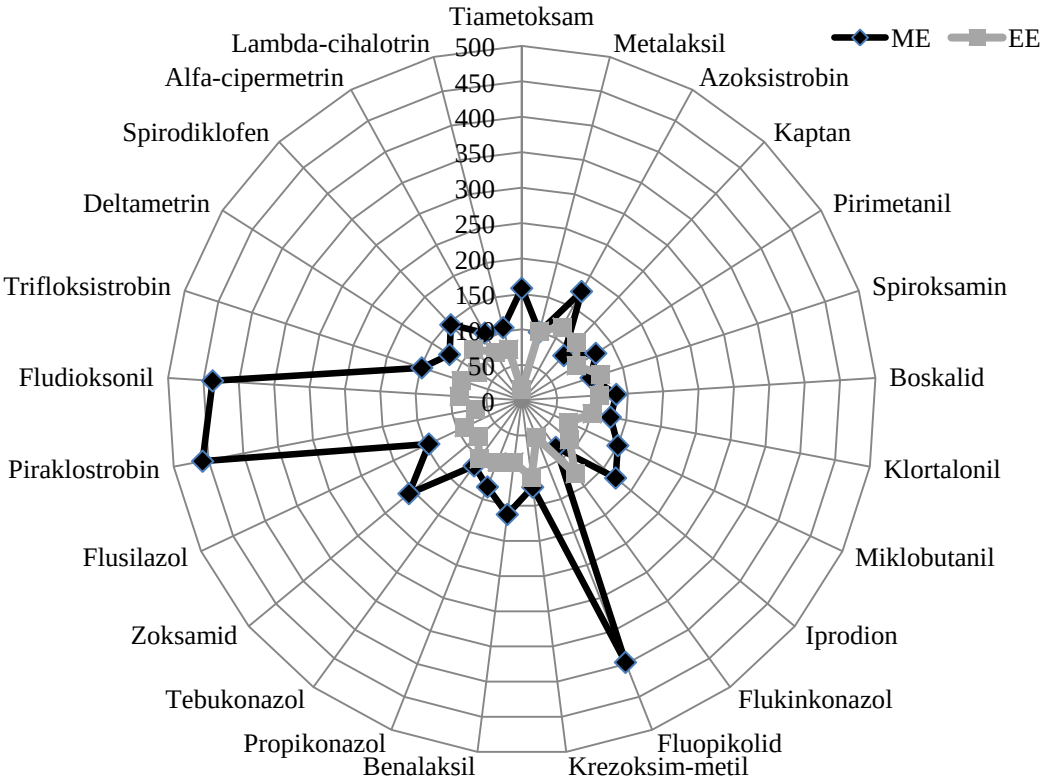
0,13). Prema Slici 50, niže vrijednosti za EE određene su za pesticide s nižim log K_{ow}, odnosno djelotvornost ekstrakcije bila je veća za pesticide s izraženim nepolarnim karakterom. Za pesticide s višom vrijednosti log K_{ow} primjećeno je jače prigušenje kromatografskog signala. Kod pesticida umjereno nepolarnog karaktera može se vidjeti da utjecaja matrice uzorka nema i da su vrijednosti EE više.



Slika 50. Utjecaj matrice uzorka na kromatografski signal i djelotvornost ekstrakcije pesticida iz crnog vina postupkom QuEChERS u ovisnosti o koeficijentu razdjeljenja pesticida u sustavu oktanol – voda (log K_{ow}).

Na Slici 51 prikazan je odnos utjecaja matrice uzorka, djelotvornosti ekstrakcije i log K_{ow} pojedinih pesticida uz pripravu uzorka postupkom SPE. Prikazane su srednje vrijednosti EE i ME određene analizom pesticida dodanih u crno vino u koncentracijama dvostruko i deseterostruko višim od granice određivanja. Primjenom postupka SPE, dobivene su za pojedine pesticide slične vrijednosti EE i ME neovisno o njihovom log K_{ow}. Iznimke su piraklostrobin, fluopikolid i fludioksonil za koje su utvrđene izrazito visoke vrijednosti ME.

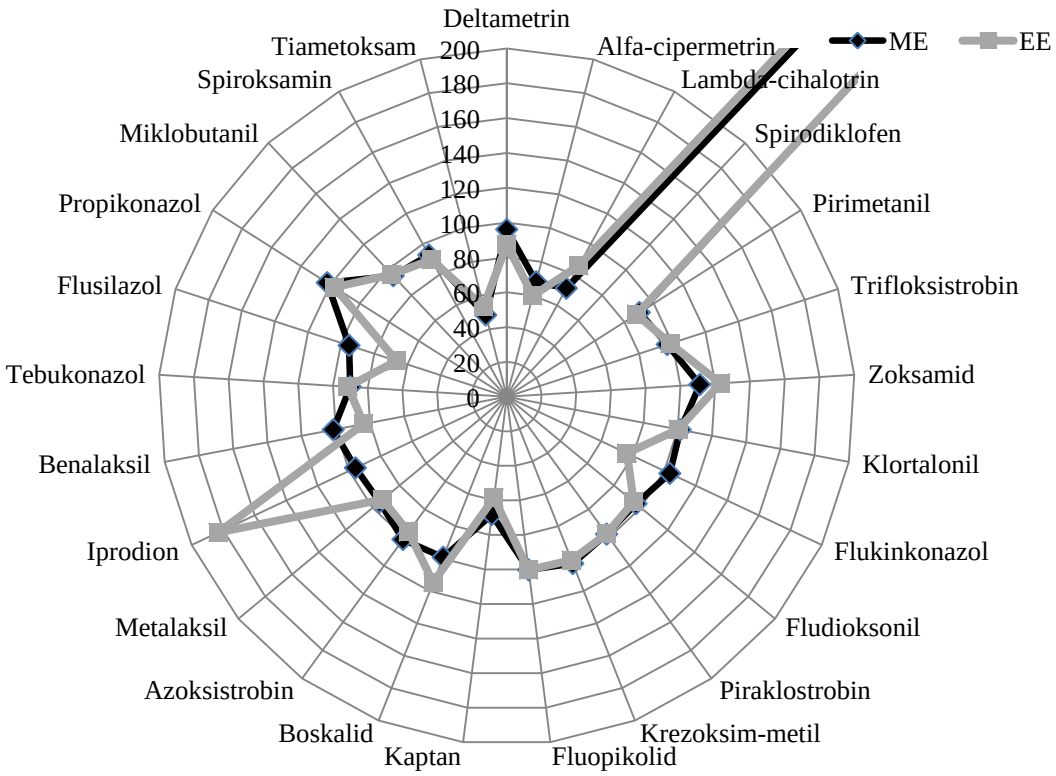
Slični su rezultati uz pripravu uzorka crnog vina postupkom SPE dobiveni i za ovisnost EE i ME o topljivosti pesticida u vodi.



Slika 51. Utjecaj matrice uzorka na kromatografski signal i djelotvornost ekstrakcije pesticida iz crnog vina postupkom SPE u ovisnosti o koeficijentu razdjeljenja pesticida u sustavu oktanol – voda (log K_{ow}).

Na temelju rezultata prikazanih na Slikama 48 – 51 može se zaključiti da pri ekstrakciji pesticida iz crnih vina postupkom SPE utjecaj matrice uzorka ne ovisi značajno o topljivosti pesticida u vodi i njihovoj hidrofobnosti, dok kod postupka QuEChERS ta ovisnost dolazi do izražaja što posljedično utječe i na djelotvornost ekstrakcije.

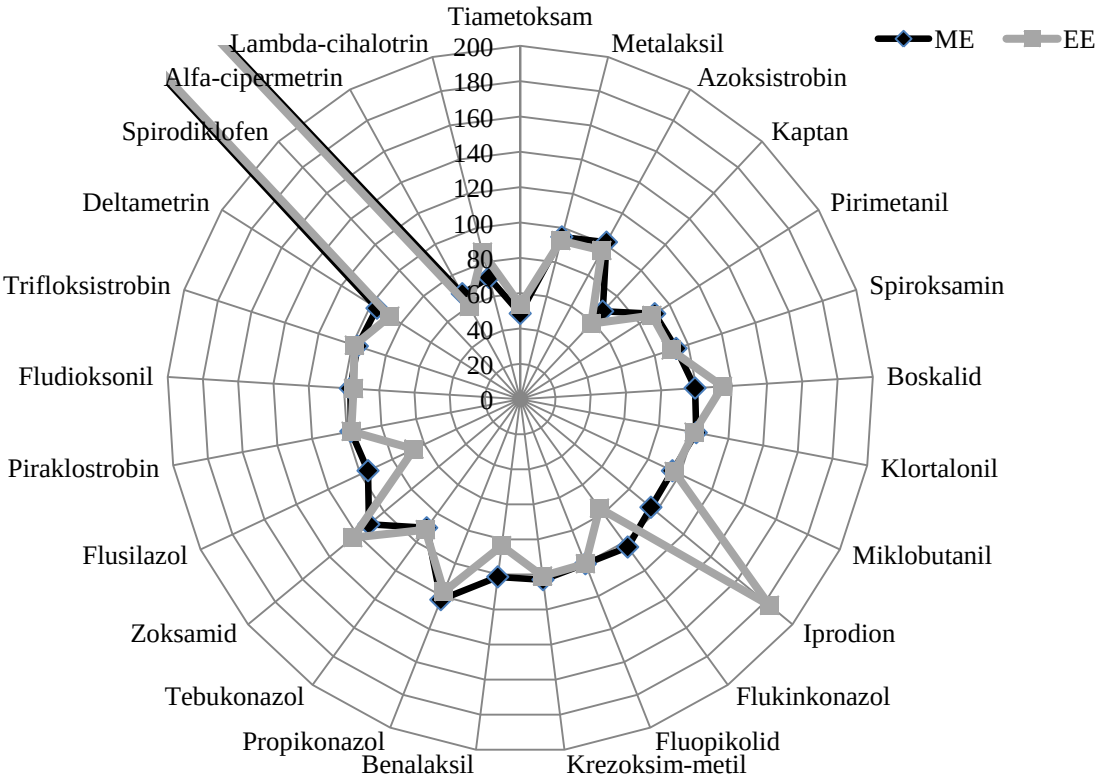
Za očekivati je da u matrici bijelog vina i primjenom postupka SPE utjecaj matrice neće ovisiti o topljivosti analiziranih pesticida u vodi i njihovoj hidrofobnosti što potvrđuju i rezultati prikazani na Slikama 52 i 53. Naime, za većinu pesticida utjecaj matrice je mali, ili ga nema, dok je djelotvornost ekstrakcije visoka.



Slika 52. Utjecaj matrice uzorka na kromatografski signal i djelotvornost ekstrakcije pesticida iz bijelog vina postupkom SPE o topljivosti pesticida u vodi.

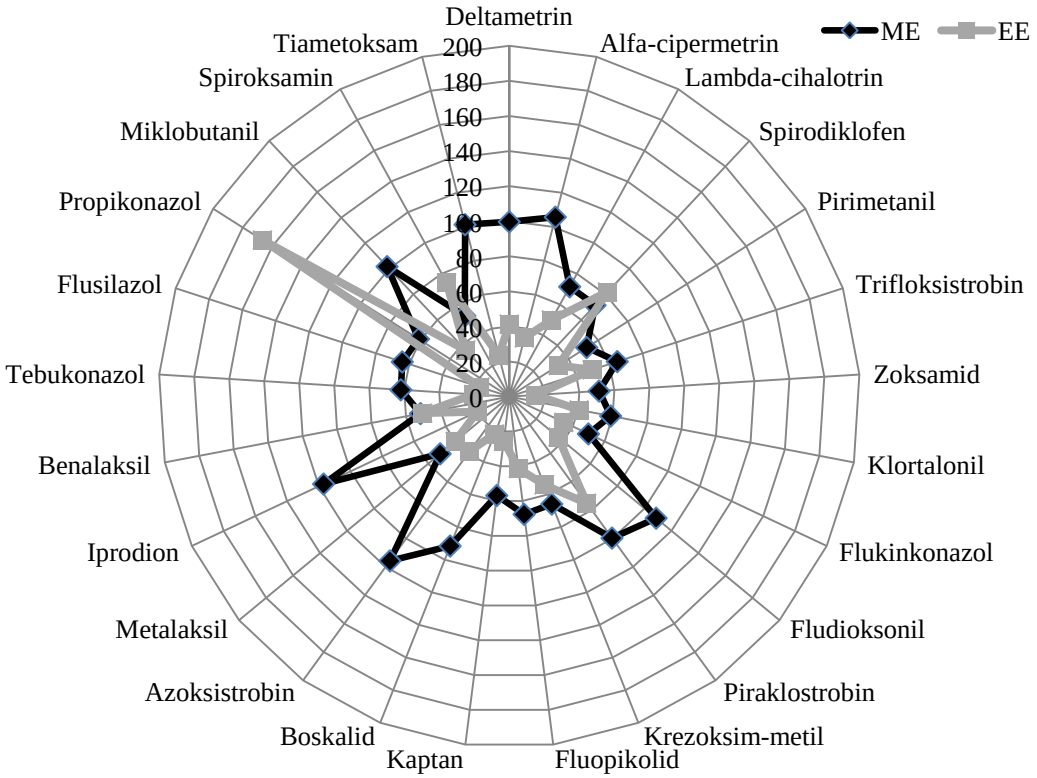
Na Slici 52 može se vidjeti da uz pripravu uzorka postupkom SPE, vrijednosti ME i EE za većinu pesticida ne ovise o njihovoj topljivosti u vodi. Iznimke su spirodiklofen za kojeg su određene iznimno visoke vrijednosti ME i EE te iprodion za kojeg su određene visoke vrijednosti EE.

Kao što se može vidjeti na Slici 53, utjecaj matrice bijelog vina uz primjenu postupka SPE ne ovisi o koeficijentu razdjeljenja pesticida u sustavu oktanol – voda, osim za spirodiklofen i iprodion. Za te je spojeve uočena i ovisnost utjecaja matrice o njihovoj topljivosti u vodi (Slika 52).



Slika 53. Utjecaj matrice uzorka na kromatografski signal i djelotvornost ekstrakcije pesticida iz bijelog vina postupkom SPE u ovisnosti o koeficijentu razdjeljenja pesticida u sustavu oktanol – voda (log K_{ow}).

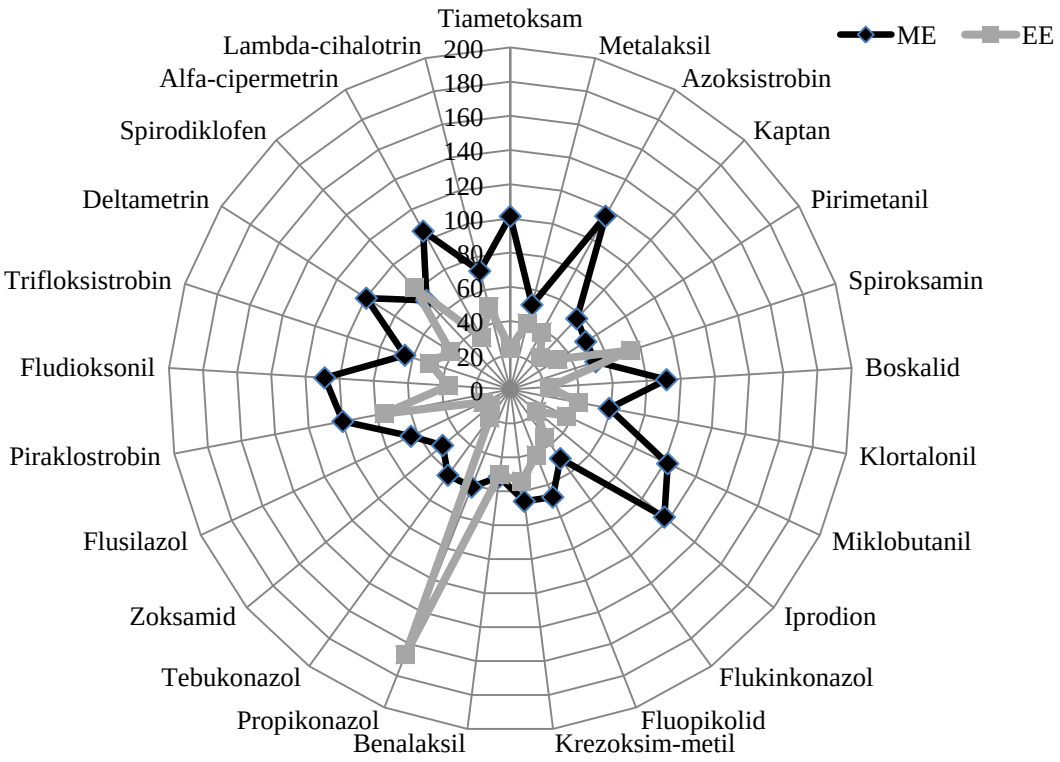
QuEChERS metodom utvrđene su visoke vrijednosti za utjecaj matrice te niske vrijednosti za djelotvornost ekstrakcije za većinu pesticida pa je prema tome teško utvrditi i ovisnost o fizikalno – kemijskim svojstvima pesticida. Na Slikama 54 i 55 prikazane su ovisnosti o topljivosti u vodi i o koeficijentu razdjeljenja u sustavu oktanol – voda.



Slika 54. Utjecaj matrice uzorka na kromatografski signal i djelotvornost ekstrakcije pesticida iz bijelog vina postupkom QuEChERS u ovisnosti o topljivosti pesticida u vodi.

Na Slici 54 može se vidjeti da je jako prigušenje kromatografskog signala nešto izraženije kod pesticida s većom topljivošću u vodi. Djelotvornost ekstrakcije postupkom QuEChERS neznatno je veća za pesticide manje topljivosti u vodi, dok je za propikanzol određena visoka vrijednost EE.

Na Slici 55 prikazana je za pojedine pesticide ovisnost ME i EE u o njihovom log K_{ow}. Uz primjenu postupka QuEChERS, neznatno više vrijednosti ME određene su za pesticide s višim vrijednostima log K_{ow} odnosno za pesticide s izraženijim nepolarnim karakterom.



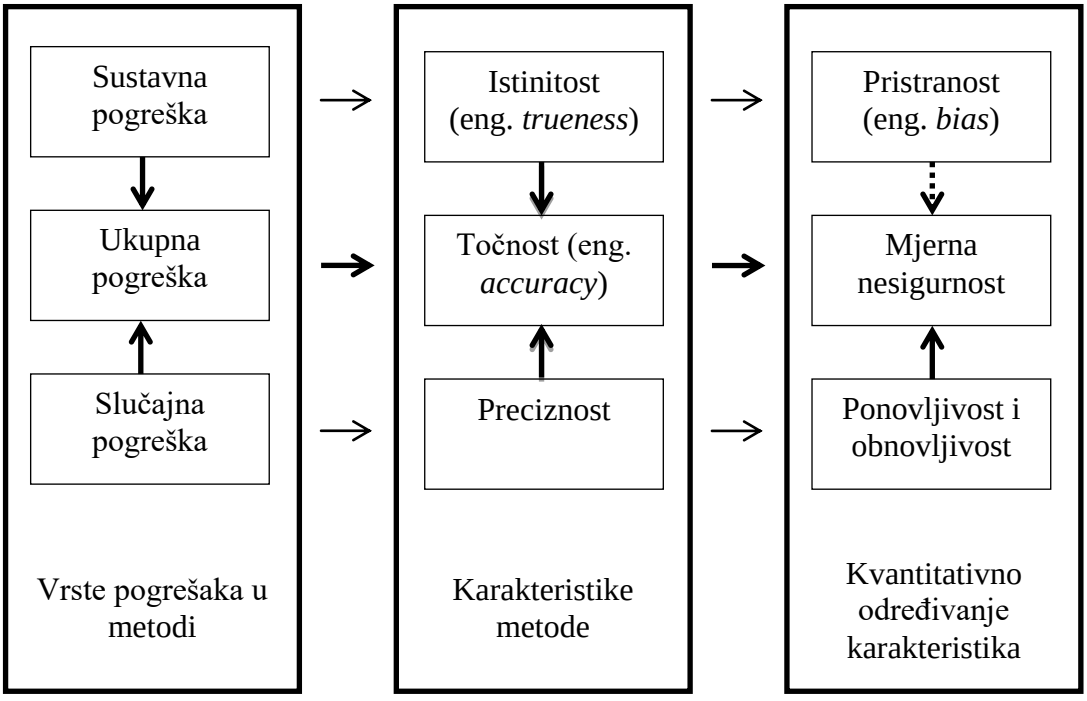
Slika 55. Utjecaj matrice uzorka na kromatografski signal i djelotvornost ekstrakcije pesticida iz bijelog vina postupkom QuEChERS u ovisnosti o koeficijentu razdjeljenja pesticida u sustavu oktanol – voda (log K_{ow}).

Na temelju rezultata prikazanih na Slikama 52 do 55 može se zaključiti da pri ekstrakciji pesticida iz bijelog vina postupkom SPE metode utjecaj matrice na kromatografski signal vina ne ovisi značajno o topljivosti pesticida u vodi i njihovoj hidrofobnosti. Za postupak QuEChERS je zbog niske djelotvornosti ekstrakcije većine pesticida teško utvrditi ovisnost EE o svojstvima analiziranih spojeva.

4.5. Procjena mjerne nesigurnosti

Svrha svakog mjerenja odnosno kvantitativnog određivanja je procjena stvarne vrijednosti mjerene veličine.[121] Vrlo često se najbolja procjena dobiva iz niza individualnih (ponovljenih) mjerenja koristeći statističke metode procjene.[122] Rezultat svakog mjerenja mora sadržavati i nedvosmislenu informaciju o mjerenoj veličini i kvaliteti mjerenja. Stvarna vrijednost mjerene veličine nikad neće biti izmjerena pa se rezultat mjerenja prikazuje kao najbolja procjena mjerene veličine i pogreška povezana s tim mjerenjem odnosno mjerna nesigurnost.

Razlikujemo tri vrste pogrešaka: sustavne pogreške uzrokovane mjernim sustavom, grube pogreške uzrokovane naglim promjenama mjerne okoline ili ljudskim faktorom te slučajne pogreške koje se ne mogu u potpunosti izbjeći, ali se ponavljanjem mjerenja mogu matematički odrediti. U ovom je radu u obradi podataka pretpostavljeno da su pogreške slučajne. Pogreške mjerenja također se mogu dijeliti prema načinu određivanja na greške tipa A, koje se određuju statističkom analizom nizova (ponavljanja) mjerenih vrijednosti te greške tipa B koje se određuju drugim metodama (na primjer poznavanjem deklarirane mjerne nesigurnosti analitičke vage od strane proizvođača). U ovom radu iskorištena je pretpostavka da su greške tipa B kod analitičkih metoda gotovo zanemarive u odnosu na greške tipa A.[9]



Slika 56. Veza između vrsti pogrešaka u analitičkoj metodi, karakterizacije metode i kvantitativnog određivanja karakteristika metode.[123]

U analitičkoj kemiji rezultat procesa mjerenja prikazuje se kao srednja vrijednost i mjerna nesigurnost povezana s postupkom kvantitativnog određivanja. Validacija neke analitičke metode sastoji se od procjene mjernih karakteristika metode i kvantitativnog određivanja tih karakteristika kako je prikazano na Slici 56.[123]

Točnost metode ocijenjena je analizom analitičkih povrata pesticida (70 % <*R*< 120 %), a preciznost analizom relativnih standarnih devijacija analitičkih povrata (RSD <20 %), kao što je opisano u poglavlju 4.3. Preciznost je također ocijenjena analizom varijanci mjerenih masenih koncentracija pesticida u slijepoj matrici vina. Za svaki je pesticid izračunata mjerna nesigurnost na dvije koncentracijske razine. Analiza je provedena za oba postupka priprave uzoraka crnih i bijelih vina. Rezultati su prikazani na tablicama koje slijede.

U Tablicama 17 do 20 prikazane su mjerne nesigurnosti za pesticide ekstrahirane iz matrica crnog i bijelog vina postupcima SPE i QuEChERS. Mjerne nesigurnosti dobivene za pesticide analizirane u matrici crnog vina značajno se razlikuju od mjernih nesigurnosti određenih u matrici bijelog vina.

Mjerna nesigurnost, izražena kao relativna proširena mjerna nesigurnost $U(Y)$r, za većinu je pesticida slična na obje koncentracijske razine, s tim da je u matrici crnog vina nešto veća pri višoj koncentracijskoj razini (10 x GO) pesticida, dok je u matrici bijelog vina veća pri nižoj koncentracijskoj razini (2 x GO) pesticida. Mjerne nesigurnosti većine analiziranih pesticida u prosjeku su veće u matrici bijelog vina, a najveće su pri analizi pesticida u uzorcima bijelog vina pripravljenim postupkom SPE. U tim uzorcima za nekoliko su pesticida kao što su flusilazol, kaptan, krezoksim – metil, piraklostrobin te zoksamid, izračunate značajne relativne proširene mjerne nesigurnosti.

U matrici crnog vina relativne proširene mjerne nesigurnosti određene uz primjenu postupaka SPE i QuEChERS za većinu su pesticida usporedive. Iznimke su lambda – cihalotrin, zoksamid i fludioksonil za koje su pri nižim koncentracijama (2 x GO) mjerne nesigurnosti uz primjenu postupka SPE veće u odnosu na postupak QuEChERS, te klortalonil čija je mjerna nesigurnost pri višoj koncentraciji (10 x GO) veća uz primjenu postupka QuEChERS u odnosu na postupak SPE. Pri analizi pesticida u matrici bijelog vina općenito su određene veće mjerne nesigurnosti, ali i veće razlike za pojedini pesticid između dvaju koncentracijskih razina te između postupaka SPE i QuEChERS.

Za većinu analiziranih pesticida proširena relativna mjerna nesigurnost bila je manja od 50 %, što je često ciljana vrijednost validiranih analitičkih metoda.[111] U prosjeku je taj zahtjev

ispunjen češće pri određivanju pesticida u matrici crnog vina. Nisu uočene značajne razlike u mjernim nesigurnostima obzirom na različite postupke priprave uzorka, no uz primjenu postupka QuEChERS mjerna je nesigurnost bila manja od 50 % za veći broj analiziranih pesticida.

Promatrajući obje predložene metode priprave uzorka i obje matrice uzorka, pesticidi s prosječno najvećim proširenim relativnim mjernim nesigurnostima su krezoksim – metil, flusilazol, zoksamid, piraklostrobin i fludioksonil, dok su najmanje proširene relativne mjerne nesigurnosti određene za tiametoksam, alfa – cipermetrin, propikonazol i fluopikolid.

Tablica 17. Mjerna nesigurnost pesticida u matrici crnog vina uz pripravu uzorka postupkom QuEChERS.

Pesticid	γ / µg L^{-1} (2 x GO)	s_{UL} / µg L^{-1}	$u(\delta)$ / µg L^{-1}	$u(Y)$ / µg L^{-1}	$U(Y)$ / µg L^{-1}	$U(Y)$r / %	γ / µg L^{-1} (10 x GO)	s_{UL} / µg L^{-1}	$u(\delta)$ / µg L^{-1}	$u(Y)$ / µg L^{-1}	$U(Y)$ / µg L^{-1}	$U(Y)$r / %
alfa – cipermetrin	10,1	1,0	0,4	1,1	2,2	21,4	50,6	8,9	3,7	9,6	19,2	37,9
azoksistrobin	407,6	55,7	22,2	60,0	119,9	29,4	2499,5	177,7	50,5	184,8	369,6	14,8
benalaksil	0,5	0,1	0,0	0,1	0,1	25,7	2,5	0,9	0,3	0,9	1,9	74,1
boskalid	101,4	7,9	2,3	8,2	16,4	16,2	405,6	36,4	13,3	38,8	77,5	19,1
deltametrin	101,1	8,3	3,3	9,0	17,9	17,7	404,4	64,2	26,6	69,5	139,0	34,4
fludioksonil	409,9	47,5	19,0	51,1	102,3	25	2486,9	428,6	179,1	464,5	929,0	37,4
flukinkonazol	10,0	1,2	0,5	1,3	2,5	24,9	50,2	3,6	0,8	3,6	7,3	14,5
fluopikolid	9,7	1,4	0,6	1,5	3,0	30,5	48,5	5,9	1,9	6,2	12,3	25,4
flusilazol	9,7	1,2	0,5	1,3	2,5	26,1	48,3	8,3	2,9	8,8	17,7	36,6
iprodion	2,5	0,4	0,2	0,4	0,9	33,4	10,2	2,3	0,8	2,4	4,8	47,1
kaptan	102,1	11,0	4,5	11,9	23,9	23,4	408,4	55,6	23,6	60,4	120,9	29,6
klortalonil	24,8	6,5	2,3	6,9	13,7	55,2	99,3	44,2	15,5	46,9	93,7	94,4
krezoksim – metil	9,7	1,4	0,6	1,5	3,1	31,5	48,5	12,2	4,7	13,1	26,1	53,7
lambda – cihalotrin	9,9	1,0	0,4	1,1	2,3	22,7	49,6	11,8	4,4	12,6	25,1	50,6
metalaksil	25,3	3,6	1,4	3,9	7,8	30,7	101,4	20,3	8,1	21,9	43,7	43,1
miklobutanil	25,2	2,4	0,7	2,6	5,1	20,2	100,9	17,9	7,6	19,4	38,9	38,5
piraklostrobin	403,6	47,2	17,6	50,4	100,7	25	2497,5	199,5	64,8	209,7	419,4	16,8
pirimetanil	10,2	1,6	0,7	1,8	3,5	34,4	51,0	6,1	2,2	6,5	12,9	25,4
propikonazol	9,9	1,0	0,4	1,1	2,2	22,4	49,5	7,9	3,2	8,5	17,0	34,3
spirodiklofen	99,1	9,2	3,7	9,9	19,8	20	396,5	26,0	7,7	27,1	54,2	13,7
spiroksamin	99,0	12,5	4,9	13,5	26,9	27,2	396,0	48,4	20,4	52,5	105,0	26,5
tebukonazol	98,0	14,7	6,1	15,9	31,8	32,5	392,0	42,3	16,4	45,3	90,6	23,1
tiametoksam	100,5	12,8	4,8	13,7	27,3	27,2	401,9	48,4	19,6	52,3	104,5	26,0
trifloksistrobin	10,1	1,4	0,5	1,5	3,0	29,7	50,3	5,5	2,3	6,0	11,9	23,7
zoksamid	103,1	8,8	3,9	9,6	19,3	19,3	412,3	40,8	15,1	43,4	86,9	21,1

Tablica 18. Mjerna nesigurnost pesticida u matrici crnog vina uz pripravu uzorka postupkom SPE.

Pesticid	γ / µg L^{-1} (2 x GO)	s_{UL} / µg L^{-1}	$u(\delta)$ / µg L^{-1}	$u(Y)$ / µg L^{-1}	$U(Y)$ / µg L^{-1}	$U(Y)$r / %	γ / µg L^{-1} (10 x GO)	s_{UL} / µg L^{-1}	$u(\delta)$ / µg L^{-1}	$u(Y)$ / µg L^{-1}	$U(Y)$ / µg L^{-1}	$U(Y)$r / %
alfa – cipermetrin	2,5	0,1	0,0	0,1	0,2	6,4	10,1	1,4	0,8	1,6	3,3	32,3
azoksistrobin	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	12,3	1,0	0,1	0,1	0,1	0,2	19,7
benalaksil	0,3	0,1	0,0	0,1	0,1	47,8	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1	111,1
boskalid	1,0	0,1	0,0	0,1	0,1	10,6	5,1	0,4	0,2	0,4	0,8	15,6
deltametrin	10,0	0,4	0,2	0,4	0,8	8,3	49,8	3,4	1,8	3,8	7,6	15,3
fludioksonil	0,5	0,3	0,2	0,4	0,8	154	2,5	0,1	0,1	0,2	0,3	12,1
flukinkonazol	0,5	0,0	0,0	0,1	0,1	19,9	2,5	0,1	0,1	0,1	0,3	11,2
fluopikolid	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	46,9	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	40,9
flusilazol	0,3	0,0	0,0	0,0	0,1	20	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	42,4
iprodion	0,3	0,0	0,0	0,0	0,1	28,4	1,0	0,1	0,1	0,1	0,2	23,1
kaptan	488,4	26,1	14,9	30,0	60,1	15,5	2500,0	120,9	61,3	135,5	271,0	10,8
klortalonil	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	8,1	1,0	0,2	0,1	0,2	0,4	38,7
krezoksim – metil	0,2	0,0	0,0	0,0	0,1	19,6	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1	115,5
lambda – cihalotrin	1,0	1,0	0,5	1,1	2,2	224,4	9,9	1,1	0,6	1,3	2,5	25,3
metalaksil	9,7	1,3	0,7	1,5	3,0	30,4	48,7	7,1	4,0	8,2	16,4	33,6
miklobutanil	0,5	0,1	0,0	0,1	0,1	26,4	2,5	0,3	0,1	0,3	0,6	22,2
piraklostrobin	1,0	0,1	0,1	0,1	0,3	26,4	10,2	2,3	1,2	2,7	5,3	51,9
pirimetanil	2,5	0,0	0,0	0,0	0,1	2,7	10,1	0,6	0,3	0,7	1,4	13,4
propikonazol	1,0	0,1	0,1	0,1	0,2	20,8	4,9	0,2	0,1	0,2	0,4	8,4
spirodiklofen	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	13,5	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	33,3
spiroksamin	5,0	0,1	0,1	0,1	0,3	5,6	25,1	1,8	0,9	2,0	4,0	15,9
tebukonazol	25,4	1,2	0,7	1,4	2,7	10,7	101,5	4,5	2,3	5,0	10,0	9,9
tiametoksam	49,7	1,3	0,8	1,5	3,0	6	248,7	1,0	0,5	1,1	2,2	0,9
trifloksistrobin	0,5	0,1	0,0	0,1	0,1	25	2,5	0,3	0,1	0,3	0,7	27,2
zoksamid	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	59,7	0,5	0,1	0,0	0,1	0,2	33,4

Tablica 19. Mjerna nesigurnost pesticida u matrici bijelog vina uz pripravu uzorka postupkom QuEChERS.

Pesticid	γ / µg L^{-1} (2 x GO)	s_{UL} / µg L^{-1}	$u(\delta)$ / µg L^{-1}	$u(Y)$ / µg L^{-1}	$U(Y)$ / µg L^{-1}	$U(Y)$r / %	γ / µg L^{-1} (10 x GO)	s_{UL} / µg L^{-1}	$u(\delta)$ / µg L^{-1}	$u(Y)$ / µg L^{-1}	$U(Y)$ / µg L^{-1}	$U(Y)$r / %
alfa – cipermetrin	101,2	25,1	13,4	28,4	56,9	56,2	404,8	45,2	17,1	48,3	96,6	23,9
azoksistrobin	407,6	91,4	48,0	103,2	206,5	50,7	2499,5	462,9	254,5	528,3	1056,5	42,3
benalaksil	25,1	1,9	1,1	2,2	4,3	17,2	100,5	62,8	44,4	76,9	153,8	153
boskalid	405,6	85,1	48,2	97,8	195,6	48,2	2507,5	205,0	87,2	222,8	445,6	17,8
deltametrin	404,4	24,2	12,3	27,2	54,3	13,4	2492,0	1568,8	900,8	1809	3618,1	145,2
fludioksonil	409,9	32,2	13,7	35,0	69,9	17,1	2486,9	303,5	152,6	339,7	679,5	27,3
flukinkonazol	100,5	22,1	11,9	25,1	50,1	49,9	401,9	222,7	128,2	256,9	513,9	127,8
fluopikolid	97,0	10,5	6,0	12,1	24,2	25	388,1	73,3	34,9	81,1	162,3	41,8
flusilazol	48,3	2,4	1,0	2,6	5,2	10,7	241,3	181,7	95,6	205,3	410,7	170,2
iprodion	407,1	40,0	17,5	43,6	87,2	21,4	2474,6	421,7	211,2	471,6	943,2	38,1
kaptan	102,1	15,4	8,7	17,7	35,4	34,7	408,4	157,3	85,3	178,9	357,8	87,6
klortalonil	99,3	10,5	5,6	11,9	23,8	24	397,2	8,9	3,6	9,6	19,1	4,8
krezoksim – metil	24,3	26,1	13,8	29,6	59,1	243,5	97,1	81,1	44,6	92,5	185,0	190,6
lambda – cihalotrin	24,8	2,0	1,0	2,2	4,3	17,5	99,3	80,8	45,5	92,8	185,5	186,9
metalaksil	9,9	4,6	2,3	5,1	10,3	103,6	49,5	7,0	2,9	7,6	15,2	30,7
miklobutanil	100,9	5,5	2,4	6,0	11,9	11,8	403,6	286,2	137,6	317,5	635,1	157,4
piraklostrobin	403,6	420,5	187,2	460,3	920,6	228,1	2497,5	655,0	239,6	697,5	1394,9	55,9
pirimetanil	10,2	4,8	3,1	5,7	11,5	112,4	51,0	28,9	20,4	35,4	70,7	138,7
propikonazol	99,0	12,4	7,0	14,2	28,4	28,7	395,9	54,8	23,9	59,8	119,5	30,2
spirodiklofen	9,9	2,0	1,3	2,4	4,8	48	49,6	22,2	11,7	25,1	50,2	101,3
spiroksamin	25,3	6,4	3,3	7,2	14,3	56,4	101,4	67,8	39,0	78,2	156,5	154,3
tebukonazol	392,0	29,1	14,4	32,5	65,0	16,6	2489,5	1635,8	942,7	1888	3776,0	151,7
tiametoksam	401,9	85,7	35,3	92,7	185,4	46,1	2474,3	303,2	187,9	356,7	713,4	28,8
trifloksistrobin	50,3	6,9	3,9	7,9	15,9	31,5	251,7	224,6	119,1	254,3	508,5	202
zoksamid	412,3	52,0	34,4	62,4	124,7	30,2	2488,0	969,8	553,9	1117	2233,6	89,8

Tablica 20. Mjerna nesigurnost pesticida u matrici bijelog vina uz pripravu uzorka postupkom SPE.

Pesticid	γ / µg L^{-1} (2 x GO)	s_{UL} / µg L^{-1}	$u(\delta)$ / µg L^{-1}	$u(Y)$ / µg L^{-1}	$U(Y)$ / µg L^{-1}	$U(Y)$r / %	γ / µg L^{-1} (10 x GO)	s_{UL} / µg L^{-1}	$u(\delta)$ / µg L^{-1}	$u(Y)$ / µg L^{-1}	$U(Y)$ / µg L^{-1}	$U(Y)$r / %
alfa – cipermetrin	10,0	1,4	0,8	1,6	3,2	32,2	49,9	2,1	1,1	2,4	4,8	9,6
azoksistrobin	0,5	0,1	0,1	0,1	0,2	39,2	2,4	0,6	0,3	0,7	1,4	58,1
benalaksil	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	45,3	0,2	0,0	0,0	0,1	0,1	40,7
boskalid	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	66,5	0,5	0,1	0,1	0,1	0,3	56,4
deltametrin	9,9	0,8	0,4	0,8	1,7	16,9	49,6	1,4	0,4	1,4	2,9	5,8
fludioksonil	2,0	1,3	0,7	1,5	2,9	146,5	9,9	2,8	1,9	3,3	6,7	67,4
flukinkonazol	0,5	0,2	0,1	0,2	0,4	86,1	2,5	0,4	0,2	0,5	0,9	37,3
fluopikolid	2,5	0,2	0,1	0,2	0,4	18,1	9,8	1,5	1,1	1,9	3,8	38,4
flusilazol	0,0	0,1	0,0	0,1	0,2	621,7	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	85,8
iprodion	0,2	0,1	0,0	0,1	0,2	63	1,0	0,2	0,1	0,2	0,5	48,5
kaptan	5,1	10,6	6,1	12,2	24,4	478,9	25,5	2,8	1,9	3,4	6,8	26,8
klortalonil	0,5	0,1	0,0	0,1	0,2	37,5	2,5	0,3	0,2	0,4	0,8	32,4
krezoksim – metil	0,0	0,1	0,0	0,1	0,1	466,7	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	230,7
lambda – cihalotrin	0,1	0,1	0,0	0,1	0,2	170,9	0,5	0,1	0,0	0,1	0,2	30,5
metalaksil	1,0	0,2	0,1	0,2	0,4	34,7	5,0	0,5	0,3	0,6	1,1	22,8
miklobutanil	0,5	0,3	0,1	0,3	0,6	124,2	2,4	0,4	0,3	0,5	1,0	41,9
piraklostrobin	4,9	8,9	5,1	10,2	20,4	418,8	24,4	9,9	5,2	11,2	22,4	92
pirimetanil	2,5	0,5	0,3	0,6	1,2	47,1	10,1	1,4	0,8	1,6	3,2	31,3
propikonazol	0,5	0,1	0,1	0,1	0,2	43,2	2,4	0,5	0,4	0,6	1,2	50,9
spirodiklofen	0,1	0,1	0,1	0,1	0,3	295,6	0,5	0,3	0,1	0,3	0,6	113,9
spiroksamin	5,0	1,1	0,6	1,3	2,5	51,1	24,9	1,6	1,0	1,9	3,7	15
tebukonazol	1,0	0,5	0,3	0,5	1,0	101,6	5,1	2,0	1,1	2,2	4,5	88
tiametoksam	9,9	0,1	0,1	0,2	0,3	3,1	49,7	0,3	0,1	0,3	0,6	1,2
trifloksistrobin	0,5	0,3	0,2	0,4	0,7	142,1	2,5	0,8	0,4	0,9	1,8	70,7
zoksamid	0,1	0,1	0,1	0,1	0,3	546,3	0,3	0,2	0,1	0,2	0,3	132,7

4.6. Analize vina

Zemljopisno područje uzgoja vinove loze u Hrvatskoj podijeljeno je na tri regije, Istočna kontinentalna Hrvatska, Zapadna kontinentalna Hrvatska i Primorska Hrvatska, s ukupno 12 podregija.[124] Raspodjela vinorodnih regija s podregijama prikazana je na Slici 57. Identitet analiziranih vina obzirom na zemljopisno područje, sortu te primijenjenu metodu prikazan je u PRILOGU XIV, dok su izmjerene masene koncentracije pesticida u analiziranim vinima prikazane u PRILOGU XV.



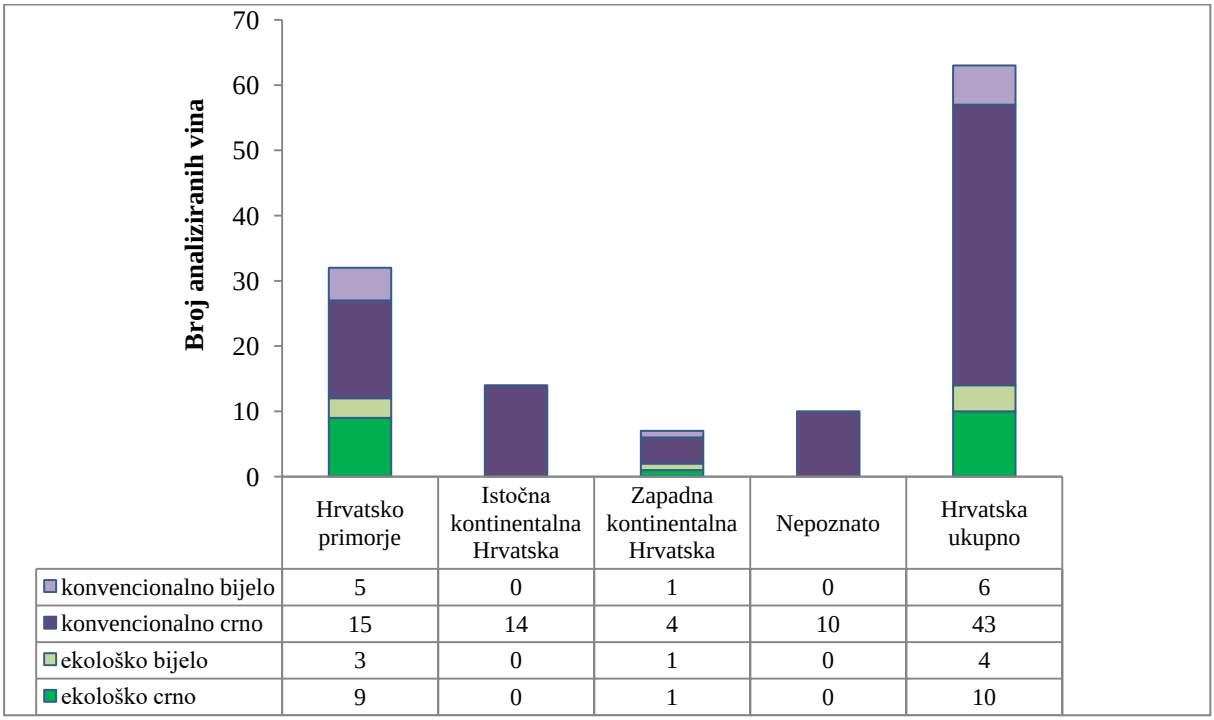
Slika 57. Vinorodne regije Hrvatske (žuto – Istočna kontinentalna, zeleno – Zapadna kontinentalna, crveno i narančasto – Primorska) s 12 podregija.

Metoda određivanja pesticida u uzorcima, odnosno njihovih koncentracija u vinima temeljila se na pristupima koji uzimaju u obzir utjecaj matrice, jer je taj utjecaj potvrđen kod oba postupka priprave uzorka. Kod uzoraka ekstrahiranih postupkom SPE primijenjena je metoda dodatka standarda, dok su uzorci obrađeni postupkom QuEChERS analizirani na temelju kalibracijske krivulje konstruirane analizom standardnih otopina smjese pesticida pripravljenih u ekstraktu matrice uzorka.

Predloženi analitički postupci primijenjeni su za analizu različitih vina da bi se istražile i usporedile koncentracije pesticida u vinima proizvedenim iz različitih sorti grožđa te ovisno o načinu proizvodnje vina što se prvenstveno odnosi na ekološku i konvencionalnu proizvodnju.

Konvencionalni uzgoj vinove loze podrazumijeva upotrebu pesticida, najčešće sintetskog podrijetla te u manjoj mjeri i prirodnog podrijetla. Za razliku od konvencionalnog uzgoja, kod ekološkog uzgoja grožđa upotreba pesticida je vrlo ograničena, pri čemu je dozvoljeno primijeniti samo mali broj pesticida.[125,126] Također, ukupna koncentracija pesticida u proizvodima ekološkog podrijetla ne smije biti viša od 10 μg L^{-1}.[127]

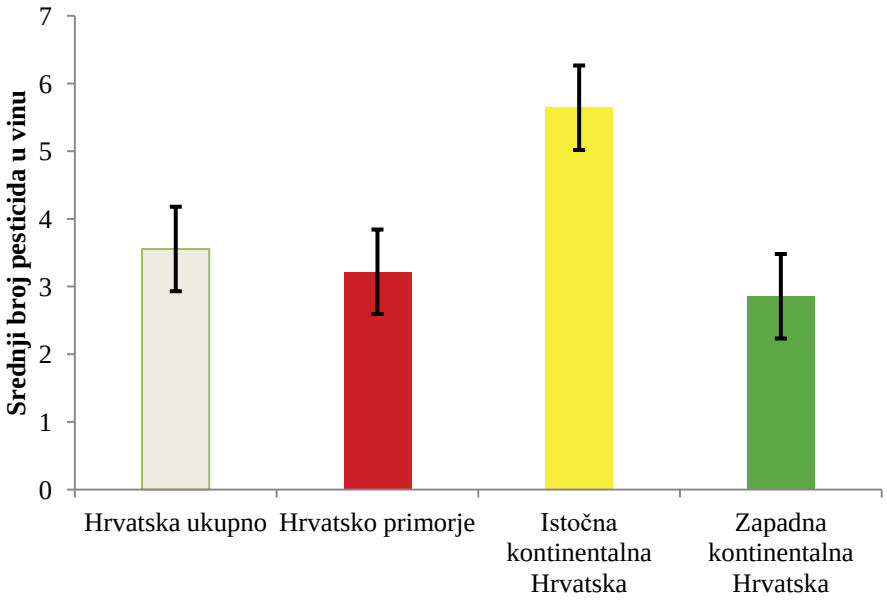
Ukupno su prikupljena 63 uzorka vina u periodu od 2012. do 2015. godine. Najveći broj uzoraka predstavljala su vina iz regije Hrvatsko primorje, dok zemljopisno podrijetlo 10 analiziranih vina nije bilo poznato (Slika 58).



	Hrvatsko primorje	Istočna kontinentalna Hrvatska	Zapadna kontinentalna Hrvatska	Nepoznato	Hrvatska ukupno
konvencionalno bijelo	5	0	1	0	6
konvencionalno crno	15	14	4	10	43
ekološko bijelo	3	0	1	0	4
ekološko crno	9	0	1	0	10

Slika 58. Analizirani uzorci vina prema zemljopisnom podrijetlu, vrsti vina (crno i bijelo), i načinu proizvodnje (ekološka i konvencionalna).

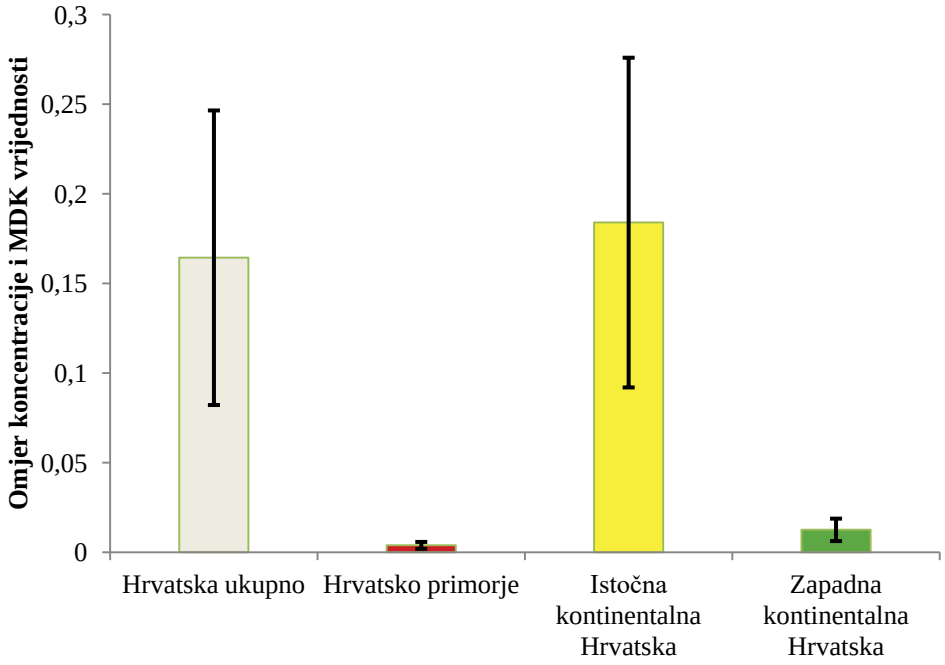
U analiziranim vinima različiti pesticidi su detektirani ukupno 224 puta. U šest vina pesticidi nisu detektirani, dok je u čak 46 vina detektirano od jednog do pet pesticida. U 16 vina nađeno je od šest do 10 pesticida, dok je u jednom vinu detektirano čak 15 pesticida (crno vino sorte Portugizac iz Kutjevačkog vinogorja). Obzirom na prosječan broj pesticida detektiranih u vinima iz tri vinorodne regije ustanovljeno je da u prosjeku najviše različitih pesticida sadrže vina regije Istočna Hrvatska (pet do šest pesticida po vinu), dok je prosjek za sva vina s područja Hrvatske 3,6±0,3 pesticida po vinu. Rezultati su prikazani na Slici 59, a potvrđeni su analizom varijance na razini značajnosti 0,05.



Slika 59. Srednji broj pesticida u vinu obzirom na vinorodnu regiju.

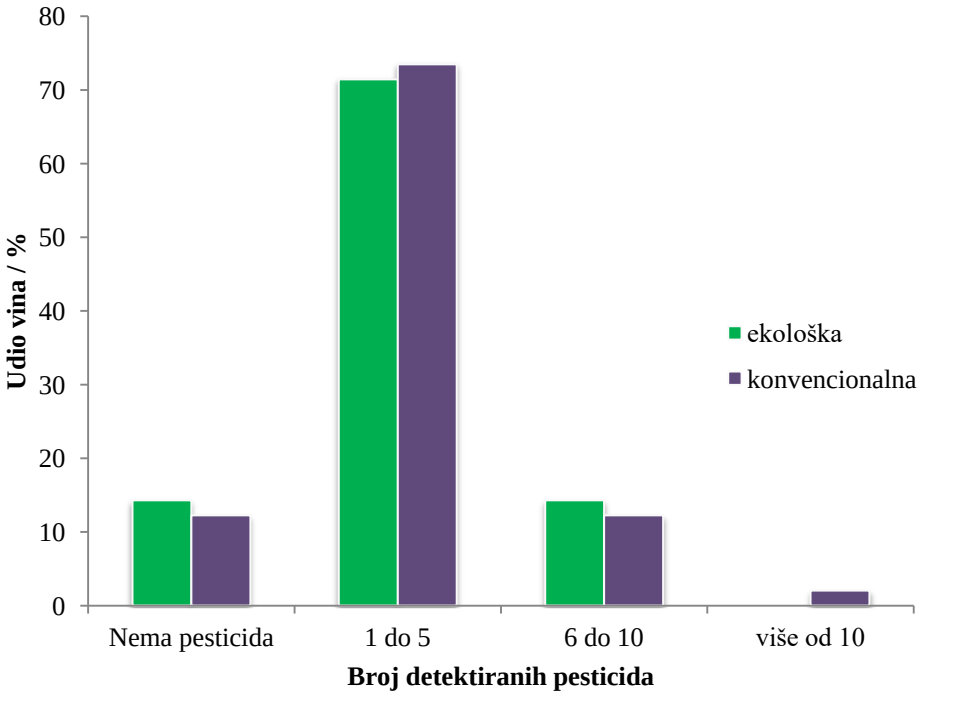
Omjer koncentracije pesticida u vinu i pripadne vrijednosti MDK (za grožđe, PRILOG XVI) može se uzeti za približnu mjeru odstupanja načina uzgoja vinove loze od dobre poljoprivredne prakse (i potencijalnog rizika za ljudsko zdravlje). Analizom omjera ustanovljeno je da su koncentracije pesticida u 98 % od 63 analizirana uzorka vina bile niže od propisanih vrijednosti MDK. Samo je u jednom vinu (crno vino Portugizac iz Kutjevačkog vinogorja) koncentracija pesticida kaptana (60±20 μg L^{-1}) bila viša od propisane MDK (20 μg L^{-1}) po trenutno važećoj legislativi.[128] Analizom varijanci srednjih koncentracija pesticida u vinima iz triju različitih regija na razini značajnosti 0,05 može se zaključiti da su srednje koncentracije neravnomjerno prostorno raspoređene te da su najviše u vinima s područja Istočne kontinentalne Hrvatske.

Na Slici 60. prikazani su podaci o zastupljenosti i koncentracijama pesticida u uzorcima vina iz triju vinorodnih regija u odnosu na MDK.



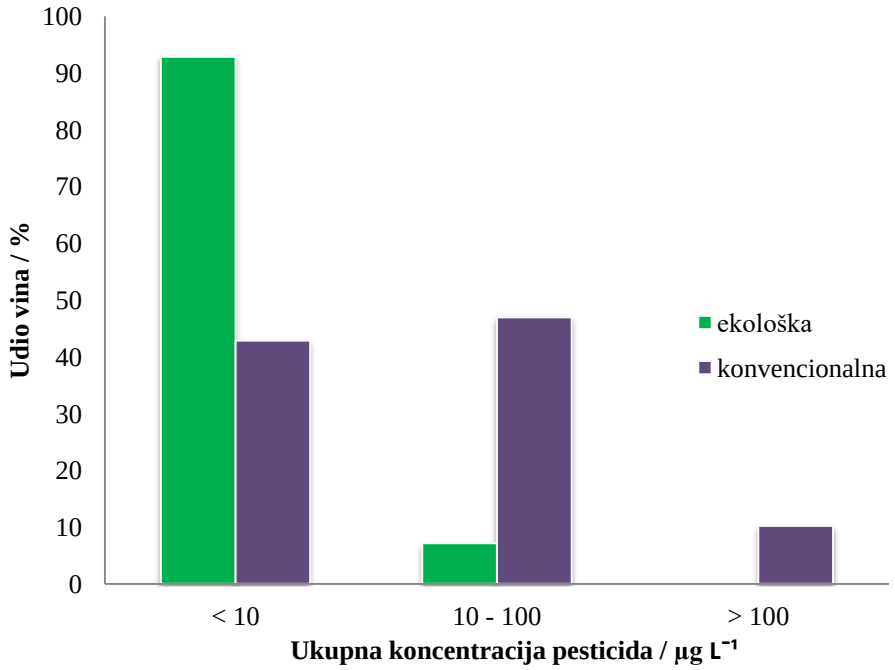
Slika 60. Srednja vrijednost omjera masenih koncentracija pesticida u vinu i pripadnih MDK po vinorodnim regijama i ukupno za Hrvatsku.

Analizirane su razlike u učestalosti i masenim koncentracijama pesticida između ekoloških i konvencionalnih vina. Vina su podijeljena u četiri kategorije prema broju detektiranih pesticida: i) pesticidi nisu detektirani, ii) detektirano od jednog do pet pesticida, iii) detektirano od 6 do 10 pesticida i iv) detektirano je više od 10 pesticida. U dva ekološka i šest konvencionalnih vina pesticidi nisu detektirani. Broj analiziranih vina u svakoj grupi podijeljen je s ukupnim brojem analiziranih vina odgovarajućeg načina uzgoja vinove loze kako bi se dobili postotni odnosi. Analizom varijanci ustanovljeno je da na razini značajnosti 0,05 ne postoji značajno odstupanje u srednjem broju detektiranih pesticida između 14 ekoloških i 49 konvencionalnih vina te da se u obje vrste vina (obzirom na način uzgoja vinove loze) može očekivati od tri do četiri pesticida što je ujedno i prosjek za cijelu Hrvatsku. Rezultati su prikazani na Slici 61.



Slika 61. Udio ekoloških i konvencionalnih vina s obzirom na broj detektiranih pesticida po vinu.

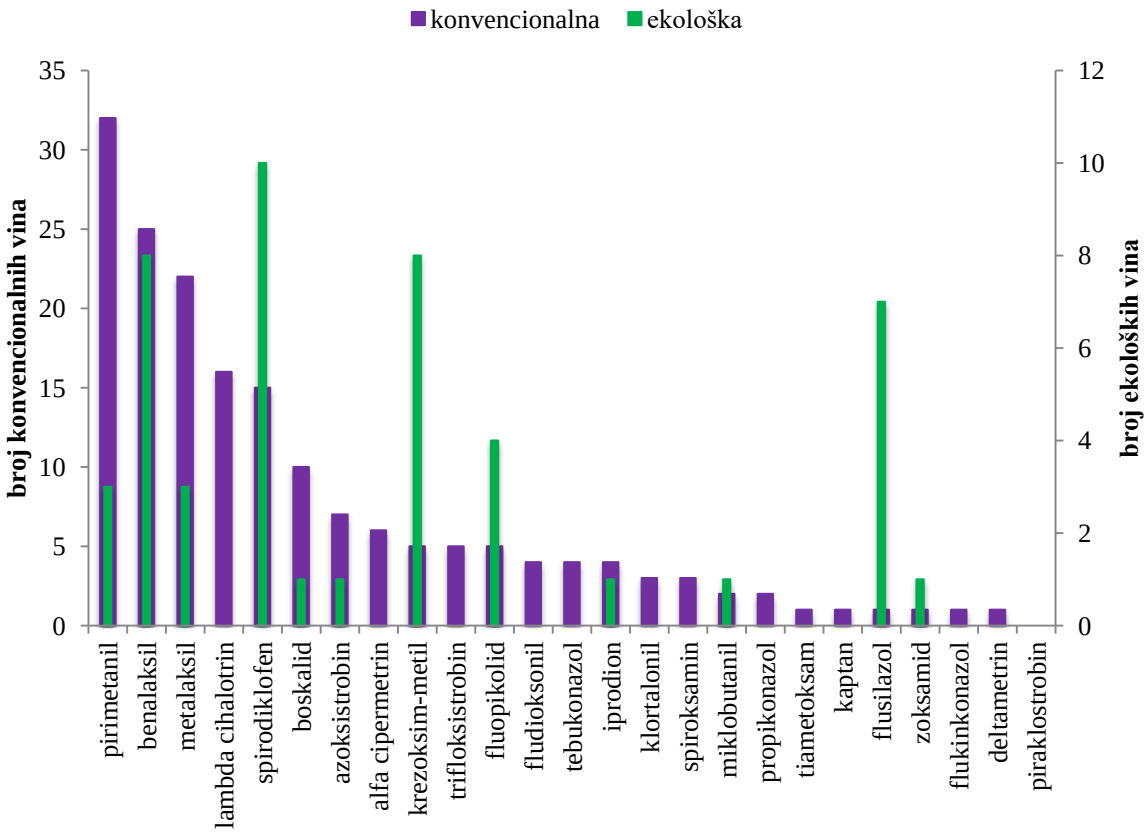
Radi usporedbe koncentracija pesticida u ekološki i konvencionalno proizvodenim vinima izračunate su ukupne koncentracije pesticida u vinu kao zbroj koncentracija svih detektiranih pesticida. Prema ukupnoj koncentraciji pesticida vina su razvrstana u tri kategorije: i) niže od 10 μg L^{-1}, ii) od 10 μg L^{-1} do 100 μg L^{-1} te iii) više od 100 μg L^{-1}. U 13 ekoloških vina i 21 konvencionalnom vinu, ukupna koncentracija pesticida bila je niža od 10 μg L^{-1}. Broj vina unutar pojedinih kategorija podijeljen je s ukupnim brojem vina odgovarajućeg tipa uzgoja vinove loze kako bi rezultati bili usporedivi (Slika 62). Nađeno je samo jedno ekološko vino (crno vino Teran iz Istre) s ukupnom koncentracijom pesticida od 11±3 μg L^{-1} (pirimetanil 5,29±0,07 μg L^{-1}, metalaksil 6±3 μg L^{-1}, benalaksil 0,04±0,10 μg L^{-1} i spirodiklofen 0,02±0,002 μg L^{-1}), što je više od dozvoljenih 10 μg L^{-1}.[127]



Slika 62. Ukupne koncentracije pesticida u ekološkim i konvencionalnim vinima.

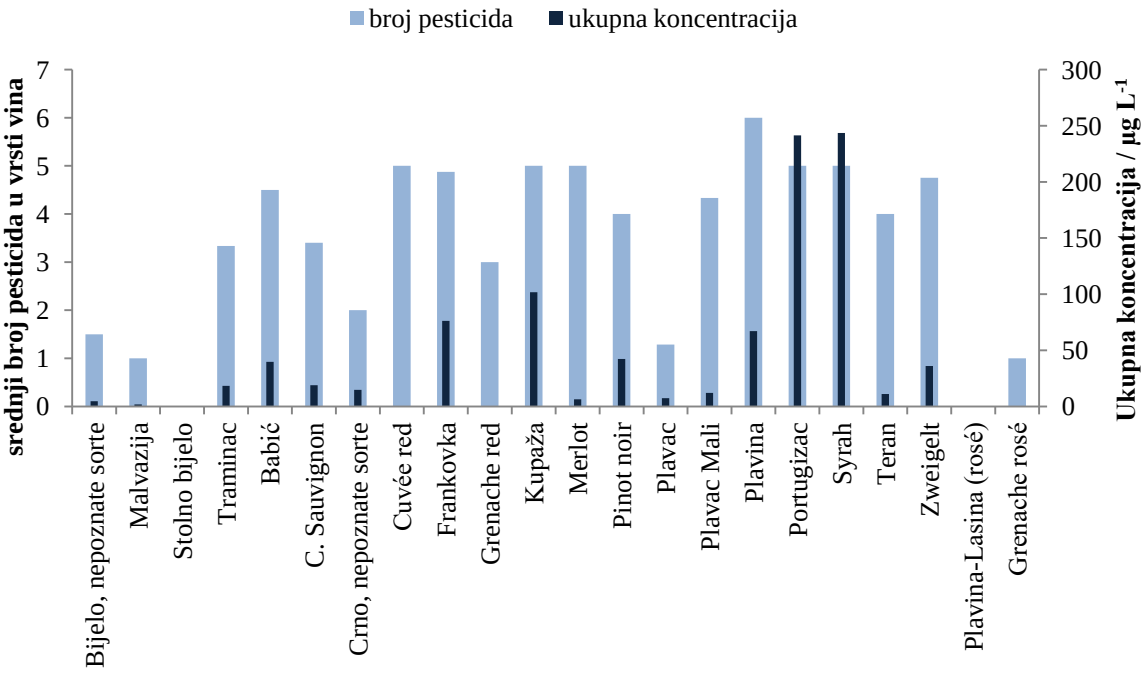
Na temelju rezultata analize pesticida u ukupno 63 različita vina uočene su razlike u učestalosti pojedinih pesticida pri konvencionalnom i ekološkom uzgoju vinove loze. Najučestaliji pesticidi u vinu bili su pirimetanil (detektiran u 3 ekološka i 32 konvencionalna vina), benalaksil (detektiran u 8 ekoloških i 25 konvencionalnih vina) i metalaksil (detektiran u 3 ekološka i 22 konvencionalna vina).

Na Slici 63 mogu se vidjeti značajne razlike u učestalosti nekih pesticida u ekološki i konvencionalno proizvedenim vinima. Općenito, najzastupljeniji pesticid u ekološkim vinima bio je spirodiklofen koji je nađen u 10 (70 %) ekoloških vina, dok je u konvencionalnim vinima detektiran u svega 15 (30 %) analiziranih uzoraka. Značajne razlike nađene su i za krezoksim – metil, flusilazol te fluopikolid koji su detektirani u preko 50 % ekoloških vina, te u samo oko 10 % konvencionalnih vina.



Slika 63. Učestalost pesticida u konvencionalno i ekološki prizvedenim vinima.

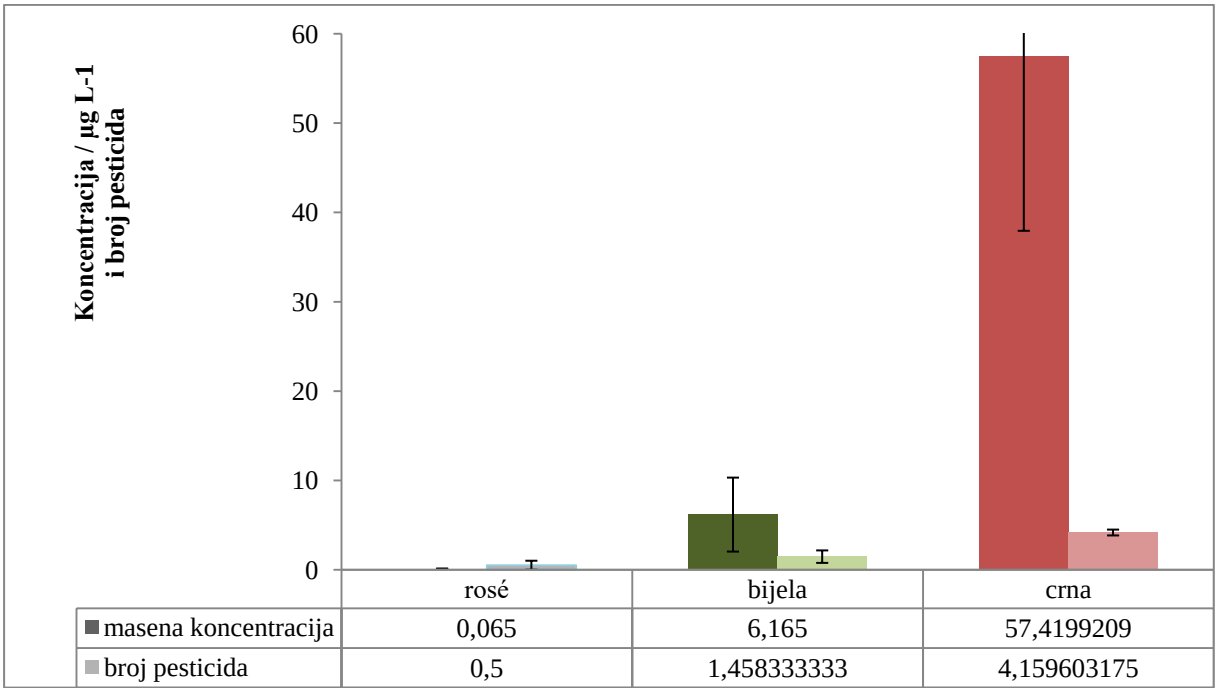
Obzirom na boju vina i vrstu grožđa, analizirana su rosé vina (dvije sorte), bijela vina (četiri sorte) i crna vina (16 sorti). Od 63 vina obrađena u ovom radu, sorta grožđa nije bila poznata za pet vina (dva bijela i tri crna). Na Slici 64 prikazan je srednji broj detektiranih pesticida obzirom na sorte grožđa i srednje ukupne koncentracije svih pesticida detektiranih u vinima iste sorte. Prosječno najviše pesticida (šest) nađeno je u vinima crne sorte Plavina (jedno vino iz Pirovačko – Skradinskog vinogorja sa sedam pesticida i jedno vino iz Komarna – Klek vinogorja s pet pesticida). Ukupna masena koncentracija pesticida u vinima sorte Plavina bila je oko 67 µg L^{-1}, što je iznad srednje ukupne koncentracije pesticida u vinima svih sorti (oko 43 µg L^{-1}). Pesticidi nisu detektirani u stolnom bijelom vinu (vinogorje Nadin), ni rosé vinu sorte Plavina – Lasina (Pirovačko-Skradinsko vinogorje). Najviše ukupne koncentracije nađene su za crne sorte Portugizac i Syrah uglavnom zbog prisutnosti tiametoksama, spiroksamina, spirodiklofena ili zoksamida. Od tri analizirana vina sorte Portugizac pesticidi su detektirani u samo jednom vinu (vinogorje Kutjevo), dok su od pet analiziranih vina sorte Syrah veće ukupne koncentracije pronađene samo u dva vina (vinogorja Kutjevo i Feričanci).



Slika 64. Srednje vrijednosti broja i ukupne koncentracije pesticida u vinima s područja Hrvatske prema sortama grožđa (4 bijele sorte, 16 crnih sorti i 2 rosé sorte).

Grupirajući vina iste boje (Slika 65) uočene su razlike u prosječnom broju detektiranih pesticida i njihovih koncentracija u tri grupe vina. Analizom varijance ustanovljeno je da ne postoji statistički značajna razlika u ukupnoj masenoj koncentraciji pesticida između tri promatrane grupe vina te da se sa sigurnošću od 95 % može tvrditi da su ukupne koncentracije pesticida u bijelim, crnim i rosé vinima podjednake. Valja napomenuti da se zbog malog broja vina rosé i bijelih sorti obuhvaćenih ovom analizom, rezultate statističkih testova treba uzeti s oprezom.

Srednji broj pesticida u vinu obzirom na boju vina, dobiven grupiranjem vina prema sorti grožđa (Slika 65), upućuje na veći broj pesticida u crnim nego u bijelim i rosé vinima. Unatoč malom broju članova pojedine grupe, analiza varijanci na razini značajnosti 0,05 uputila je na razlike između grupa. Primjenom *t* – testa u analizi *post – hoc* zaključeno je s 95 – postotnom sigurnošću da vina crnih sorti u prosjeku sadrže veći broj pesticida (4,2±0,3) od vina bijelih sorti (1,5±0,7).



	rosé	bijela	crna
masena koncentracija	0,065	6,165	57,4199209
broj pesticida	0,5	1,458333333	4,159603175

Slika 65. Srednje vrijednosti ukupne masene koncentracije (tamno) i broja detektiranih pesticida (svijetlo) u analiziranim vinima razvrstanim prema boji (prema sortama grožđa).

Dobiveni rezultati u skladu su s literaturnim navodima. Nedavno provedeno istraživanje francuskih vina pokazalo je da se 30 % pesticida sadržanih u grožđu prenosi u vino, dok su u vinima konvencionalne proizvodnje utvrđene značajne koncentracije pirimetanila, fludioksonila, azoskistrobina, iprodiona, tebukonazola, metalaksila, benalaksila, flusilazola, boskalida i spiroksamina.[2] Također je potvrđena kontaminacija španjolskih vina s pirimetanilom, metalaksilom i azoksitrobinom te grčkih vina s metalaksilom, miklobutanilom, azoksistrobinom, tebukonazolom i benalaksilom.[9-11,12]

§ 5. ZAKLJUČAK

Razvijena je multirezidualna metoda za određivanje ostataka 25 pesticida u vinima vezanim sustavom plinska kromatografija – spektrometrija masa uz primjenu dvaju postupaka priprave uzorka.

Istraživanje je provedeno primjenom plinskokromatografske kolone HP – 5MSi koja se pokazala prikladnom za odjeljivanje svih odabranih pesticida. Identitet analiziranih pesticida povrđen je spektrometrijom masa praćenjem ciljnog iona i triju potvrdnih iona karakterističnih za svaki spoj. Interferencije drugih sastojaka vina uklonjene su odabirom iona analita manjeg intenziteta čiji se *m/z* razlikuje od *m/z* iona interferencija. Uvjeti instrumentne analize optimirani su obzirom na temperaturu, pulsni tlak, vrijeme pulsnog načina rada injektora te temperaturni program plinskokromatografske kolone s ciljem postizanja maksimalne osjetljivosti detekcije odabranih pesticida.

Tijekom optimizacije uvjeta ekstrakcije pesticida iz vina na čvrstoj fazi provjereni su analitički povrati uz primjenu različitih otapala za eluiranje. Analtički povrati bili su niski, pri čemu valja izdvojiti metanol s kojim su povrati analiziranih pesticida bili <20 %. Utvrđeno je da su niski analitički povrati rezultat sorbiranih antocijanina, što se moglo vidjeti po intenzivnoj crvenoj boji sorbensa. Ključnim se korakom pokazalo njihovo uklanjanje smjesom otapala ψ(metanol, voda) = 1:1. Djelotvorno eluiranje pesticida postignuto je primjenom acetonitrila koji se pokazao najprikladnijim otapalom zbog svojih hidrofilno – lipofilnih karakteristika. Dodatak *n* – heksana dodatno je pospješio uklanjanje interferencija što je potvrđeno boljim izgledom kromatograma analiziranih pesticida. Za uspješnu ekstrakciju pesticida iz vina bilo je neophodno razrijediti uzorak vodom. Optimalna ekstrakcija na čvrstoj fazi postignuta je s minimalnim razrjeđenjem ψ(vino, voda) = 1:1, što je rezultiralo i nižim granicama određivanja pesticida.

Optimizacija priprave uzoraka postupkom QuEChERS dovela je do novih saznanja o njegovoj primjenjivosti na složenije matrice kao što je vino. Izvorno razvijen za ekstrakciju pesticida iz uzoraka hrane, osnovni QuEChERS postupak pokazao se neuspješnim za njihovu ekstrakciju iz uzoraka vina obzirom da su analitički povrati odabranih pesticida bili <20 %. Razvoj metode temeljio se na optimizaciji vrste i koncentracije soli dodane u uzorak pospješujući tako prijelaz pesticida iz vodene otopine uzorka u organsku fazu. Uz magnezij

sulfat, za djelotvornu ekstrakciju pesticida iz uzoraka vina postupkom QuEChERS pokazao se prikladnim dodatak trinatrijevog citrata dihidrata uz natrijev klorid i natrijev acetat čija kombinacija nije predložena u komercijalno dostupnim pripravcima. Ključan korak u optimizaciji postupka QuEChERS bilo je optimiranje pH pri čemu je za uspješnu ekstrakciju pesticida iz vina bilo neophodno podesiti i održavati stalnom vrijednost od pH~5,5. Pročišćavanje uzorka vina provedeno je na sorbensu PSA uz dodatak magnezijeva sulfata. Za optimizaciju postupka QuEChERS neohodno je bilo korištenje unutarnjeg standarda kako bi se smanjile pogreške nastale u koracima ekstrakcije. Uz optimizaciju vrste i koncentracije soli, nužna je bila i optimizacija mehaničkih postupaka kao što su vrijeme centrifugiranja i vrijeme potresanja/mućkanja smjese na Vortex – miješalici tijekom ekstrakcije. Pokazalo se da je trajanje mehaničkih postupaka predloženo u izvornom QuEChERS postupku potrebno produžiti kako bi se uspostavila ravnoteža između dviju faza i postigla uspješna ekstrakcija pesticida. QuEChERS se pokazao prikladnim za analize ostataka pesticida u crnom vinu, dok su analitički povrati pesticida iz matrice bijelog vina bili izrazito niski što upućuje na zaostajanje pesticida u vodenoj fazi/uzorku i negativan utjecaj matrice.

Kao dvije zasebne matrice koje sadrže kemijske spojeve različitih klasa istražene su matrice crnog i bijelog vina i njihov utjecaj na djelotvornost određivanja ostataka pesticida primjenom dvaju predloženih postupaka priprave uzorka. Uz primjenu SPE, za 28 % pesticida analiziranih u matrici crnog vina te 68 % pesticida analiziranih u matrici bijelog vina uočen je vrlo mali ili nikakav utjecaj matrice. Postupak SPE pokazao se djelotvornijim od postupka QuEChERS pri čemu su analitički povrati analiziranih pesticida iz crnih i bijelih vina bili u rasponu od 70 % do 120 %. Djelotvornost SPE pozitivno je utjecala na granice detekcije i određivanja pesticida koje su bile izrazito niske. Utjecaj matrice uzorka na djelotvornost ekstrakcije pesticida iz vina postupkom QuEChERS bio je za 60 % pesticida određivanih u matricama crnog vina i za 64 % pesticida određivanih u matricama bijelog vina srednji do vrlo jak. Analitički povrati većine pesticida iz matrice crnog vina, postignuti QuEChERS postupkom, bili su u rasponu od 70 % do 120 %, dok su iz matrica bijelog vina bili niži od 70 % za većinu pesticida. Takav rezultat upućuje na činjenicu da postupak QuEChERS nije primjenjiv za određivanje ostataka pesticida u matrici bijelog vina.

Predloženi analitički postupci validirani su u skladu sa smjernicama SANCO/12571/2013 pri čemu su provedene validacije obaju postupaka priprave uzorka za matrice crnog i bijelog vina. Postupkom SPE postignute su izrazito niske granice detekcije pesticida, koje su bile u

rasponu od 0,01 μg L^{-1} do 2,5 μg L^{-1} u matrici crnog vina (osim za kaptan čija je granica detekcije u crnom vinu bila 50 μg L^{-1}) te u rasponu od 0,005 μg L^{-1} do 2,5 μg L^{-1} u matrici bijelog vina. Granice određivanja pesticida u matrici crnog vina bile su između 0,01 μg L^{-1} i 10 μg L^{-1}, osim za kaptan čija je granica određivanja bila 250 μg L^{-1}. Granice određivanja pesticida u matrici bijelog vina bile su između 0,01 μg L^{-1} i 5 μg L^{-1} . Postupkom QuEChERS postignute su znatno više vrijednosti granica detekcije pesticida u vinu i bile su u rasponu od 0,01 μg L^{-1} do 250 μg L^{-1} u matrici crnog vina te od 0,1 μg L^{-1} do 250 μg L^{-1} u matrici bijelog vina. Granice određivanja pesticida u matrici crnog vina bile između 0,25 μg L^{-1} i 250 μg L^{-1}, a u matrici bijelog vina između 5 μg L^{-1} i 250 μg L^{-1}. Metoda koja uključuje SPE bila je linearna u rasponu koncentracija pesticida u vinu od GO do 400 μg L^{-1} za većinu pesticida, a metoda koja uključuje QuEChERS od GO do 2500 μg L^{-1} za većinu pesticida, uz koeficijente determinacije >0,99.

U okviru validacije razrađenih metoda ispitana je mjerna neisgurnost analiziranih pesticida. Za većinu pesticida proširena relativna mjerna nesigurnost bila je niža od 50 %, što je često ciljana vrijednost validiranih analitičkih metoda. U prosjeku je taj zahtjev bio češće ispunjen za spojeve određivane u matrici crnog vina. Iako nisu uočene značajnije razlike između postupaka priprave uzorka, uz primjenu postupka QuEChERS mjerna je nesigurnost bila niža od 50 % za veći broj pesticida. Promatrajući obje predložene metode i obje matrice uzorka, pesticidi s prosječno najvišim proširenim relativnim mjernim nesigurnostima bili su krezoksim – metil, flusilazol, zoksamid, piraklostrobin i fludioksonil, dok su najniže proširene relativne mjerne nesigurnosti određene za tiametoksam, alfa – cipermetrin, propikonazol i fluopikolid.

Razrađeni analitički postupci primijenjeni su za analizu pesticida u vinima prikupljenim iz vinorodnih regija Hrvatske. Analizom prostorne raspodjele, načina uzgoja i sorti vinove loze za 63 vina može se zaključiti da hrvatska vina sadržavaju u prosjeku tri do četiri pesticida, uglavnom u niskim koncentracijama. Prosječno najviše koncentracije i najveći broj pesticida nađeni su u vinima Istočne kontinentalne Hrvatske, među kojima je bilo i jedino vino s koncentracijom kaptana višom od zakonski dopuštene vrijednosti od 20 μg L^{-1}.

Zabrinjava činjenica što je u ekološkim vinima, obzirom na zahtjeve proizvodnje (bez primjene sredstava za zaštitu bilja) u prosjeku detektiran isti broj pesticida kao i u konvencionalno proizvedenim vinima. Koncentracije pesticida ipak su niže u vinima iz ekološke proizvodnje među kojima je samo u jednom vinu ukupna koncentracija pesticida

bila viša od 10 μg L^{-1} (kontaminacija). Najučestaliji pesticidi u ekološkim vinima bili su spirodiklofen, krezoksim – metil i flusilazol. Obzirom na zakonsku regulativu očekivala se visoka zastupljenost deltametrina i lambda – cihalotrina koja je izostala.[125,126]

Pesticidi su podjednako zastupljeni u svim vinima obzirom na sorte grožđa. Iznimka su vina sorti Malvazija i Plavac te vina sorti rosé u kojima je zastupljen mali broj pesticida. Značajnije razlike postoje u ukupnim koncentracijama pesticida. Vina sorti Portugizac i Syrah sadrže velik broj i visoke koncentracije pesticida. U okviru istraživanja u ovom radu nađeno je da crna vina u prosjeku sadrže više koncentracije i veći broj pesticida nego rosé i bijela vina, no analizu bi trebalo ponoviti na većem broju uzoraka vina.

Značajne koncentracije pesticida nađene u vinima u okviru ovog istraživanja potvrđuju važnost podizanja svijesti o kontaminaciji vina na globalnoj razini. Pesticidi obuhvaćeni ovim radom najučestaliji su pesticidi u zaštiti vinove loze, a predloženi analitički postupci predstavljaju jednostavne pristupe za buduće sustavno praćenje pesticida u vinima.

§ 6. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ

ADP – adenozin difosfat

ATP – adenozin trifosfat

DDT – diklordifeniltrikloretan

DLLME – mikroekstrakcija raspršenjem tekuće faze

dSPE – ekstrakcija raspršenjem čvrste faze

EE – djelotvornost ekstrakcije

EU – Europska unija

FAO – Organizacija za hranu i poljoprivredu Ujedinjenih naroda

$FADH_2$ – flavin adenin dinukleotid

γ – masena koncentracija

GC – plinska kromatografija

GC – MS – plinska kromatografija vezana sa spektrometrijom masa

GC – MS/MS – plinska kromatografija s tandemnom spektrometrijom masa

GCB – crni amorfni ugljik

GD – granica detekcije

GO – granica određivanja

HLB – hidrofilni – lipofilni balans (eng. *hydrofilic – lypophilic balance*)

IT – ionska stupica

LC – tekućinska kromatografija

LC – MS – tekućinska kromatografija sa spektrometrijom masa

LC – MS/MS – tekućinska kromatografija s tandemnom spektrometrijom masa

LLE – ekstrakcija otapalom

LPME – mikroekstrakcija tekućom fazom

log K_{ow} – koeficijent razdijeljenja oktanol/voda, logaritamska vrijednost

NADH, NAD – nikotinamid adenin dinukleotid

MDK – maksimalno dopušteni maseni udio

ME – utjecaj matrice uzorka

MRM – praćenje višestrukih tranzicijskih reakcija

m/z – omjer masa/naboja

MS – spektrometrija masa

PSA – primarni sekundarni amin

ψ – volumni omjer

QTOF – kvadrupol s analizatorom masa mjerenja vremena leta

QuEChERS – quick, easy, cheap, effective, rugged and safe

QQQ – trostruki kvadrupol

R – analitički povrat

r^2 – koeficijent determinacije

RSD – relativna standardna devijacija

SAD – Sjedinjene američke države

SCAN – pretražni način rada spektrometra masa

SDME – mikroekstrakcija na kapi

SIM – praćenje odabranih iona

SPE – ekstrakcija na čvrstoj fazi

TEP – 1,1′,2,2′ – tetrafeniletilen

TOF – analizator masa mjerenja vremena leta

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. E. Herrero-Hernández, M.S. Andrades, A. Álvarez-Martín, E. Pose-Juan, M.S. Rodríguez-Cruz, M.J. Sánchez-Martín, *J. Hydrol.* **486** (2013) 234–245.
2. International Organisation of Vine and Wine, OIV - The OIV Presents the 2013 Statistical Report on World Vitiviniculture at the 36th World Congress of Vine and Wine, http://www.oiv.int/, (28.5.2015.).
3. L. Minuti, R.M. Pellegrino, I. Tesei, *J. Chromatogr. A* **1114** (2006) 263–268.
4. J. Jiménez, J.. Bernal, M.. del Nozal, L. Toribio, E. Arias, *J. Chromatogr. A* **919** (2001) 147–156.
5. P. Cabras, A. Angioni, *J. Agric. Food Chem.* **48** (2000) 967–73.
6. B. Šebečić, D. Pavišić-Strache, I. Vedrina-Dragojević, *Dtsch. Leb.* **94** (1998) 341–344.
7. Ž. Fiket, N. Mikac, G. Kniewald, *Food Chem.* **126** (2011) 941–947.
8. M. Šeruga, I. Nemet, B. Laslavić, *Dtsch. Leb.* **104** (2008) 46–54.
9. A. Economou, H. Botitsi, S. Antoniou, D. Tsipi, *J. Chromatogr. A* **1216** (2009) 5856–67.
10. A.R. Fontana, I. Rodríguez, M. Ramil, J.C. Altamirano, R. Cela, *J. Chromatogr. A* **1218** (2011) 2165–75.
11. I. Carpinteiro, M. Ramil, I. Rodríguez, R. Cela, *J. Chromatogr. A* **1217** (2010) 7484–92.
12. J.P. dos Anjos, J.B. de Andrade, *Microchem. J.* **120** (2015) 69–76.
13. Z. He, Y. Xu, L. Wang, Y. Peng, M. Luo, H. Cheng, X. Liu, *Food Chem.* **196** (2016) 1248–55.
14. J.W. Wong, M.G. Webster, C.A. Halverson, M.J. Hengel, K.K. Ngim, S.E. Ebeler, *J. Agric. Food Chem.* **51** (2003) 1148–61.
15. A.R. Fontana, I. Rodríguez, M. Ramil, J.C. Altamirano, R. Cela, *Anal. Bioanal. Chem.* **401** (2011) 767–75.
16. G.J. Soleas, J. Yan, K. Hom, D.M. Goldberg, *J. Chromatogr. A* **882** (2000) 205–12.
17. R. Phillips, *A Short History of Wine*, HarperCollins, New York, 2002, pp. 400.
18. M. Moreno-Arribas, M. Polo, *Wine Chemistry and Biochemistry*, Springer Science+Business Media, New York, 2009, pp. 728.

19. M. Aznar, R. López, J. Cacho, V. Ferreira, *J. Agric. Food Chem.* **51** (2003) 2700–7.
20. R.G.V. Bramley, J. Ouzman, P.K. Boss, *Aust. J. Grape Wine Res.* **17** (2011) 217–229.
21. C.E. Abrahamse, E.J. Bartowsky, *World J. Microbiol. Biotechnol.* **28** (2012) 255–65.
22. J. Bakker, R.J. Clarke, *Wine: Flavour Chemistry*, 2nd ed., Wiley-Blackwell, New York, 2011, pp. 440.
23. B. Coombe, P. Dry, *Viticulture Volume 1 - Resources*, 2nd ed., Winetitles Pty Ltd., Adelaide, 2005, pp. 250.
24. R. Flamini, P. Traldi, *Mass Spectrometry in Grape and Wine Chemistry*, John Wiley & Sons, New Jersey, 2010, pp. 349.
25. M. dos S. Lima, M. da Conceição Prudêncio Dutra, I.M. Toaldo, L.C. Corrêa, G.E. Pereira, D. de Oliveira, M.T. Bordignon-Luiz, J.L. Ninow, *Food Chem.* **188** (2015) 384–92.
26. M. Palma, C.G. Barroso, *Anal. Chim. Acta* **458** (2002) 119–130.
27. R.J.C. J. Bakker, *Wine: Flavour Chemistry*, John Wiley & Sons, 2008, pp. 336.
28. R. Flamini, F. Mattivi, M. De Rosso, P. Arapitsas, L. Bavaresco, *Int. J. Mol. Sci.* **14** (2013) 19651–69.
29. I.V. Vrček, M. Bojić, I. Žuntar, G. Mendaš, M. Medić-Šarić, *Food Chem.* **124** (2011) 354–361.
30. Y. Sun, N. Fang, D.D.Y. Chen, K.K. Donkor, *Food Chem.* **106** (2008) 415–420.
31. D.P. Makris, S. Kallithraka, P. Kefalas, *J. Food Compos. Anal.* **19** (2006) 396–404.
32. A.M. Martínez-Gil, T. Garde-Cerdán, C. Lorenzo, J.F. Lara, F. Pardo, M.R. Salinas, *J. Food Sci.* **77** (2012) C71–9.
33. M. Stoytcheva, *Pesticides in the Modern World -Trends in Pesticides Analysis*, InTech, Rijeka, 2011, pp. 526.
34. Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and the Council of 21 October 2009 concerning the placing of plant protection products on the market and repealing Council Directives 79/117/EEC and 91/414/EEC, http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32009R1107&from=EN
35. EURL | Residues of Pesticides, http://www.eurl-pesticides.eu/docs/public/home.asp?LabID=100&Lang=EN, (2.1.2016.).
36. A. Kumar, A. Verma, A. Kumar, *Egypt. J. Forensic Sci.* **3** (2013) 123–126.
37. I. Delcour, P. Spanoghe, M. Uyttendaele, *Food Res. Int.* **68** (2015) 7–15.

38. P.V.L. Reddy, K.-H. Kim, *J. Hazard. Mater.* **285** (2015) 325–35.
39. F.M. Malhat, M.N. Haggag, N.M. Loutfy, M.A.M. Osman, M.T. Ahmed, *Chemosphere* **120** (2015) 457–61.
40. A. Valverde, A.R. Fernández-Alba, C. Ferrer, A. Aguilera, *Food Control* **63** (2016) 255–258.
41. M. Arvand, E. Bozorgzadeh, S. Shariati, *J. Food Compos. Anal.* **31** (2013) 275–283.
42. C. Lesueur, P. Knittl, M. Gartner, A. Mentler, M. Fuerhacker, *Food Control* **19** (2008) 906–914.
43. S.N. Sinha, K. Vasudev, M. Vishnu Vardhana Rao, *Food Chem.* **132** (2012) 1574–1584.
44. X. Yang, H. Zhang, Y. Liu, J. Wang, Y.C. Zhang, A.J. Dong, H.T. Zhao, C.H. Sun, J. Cui, *Food Chem.* **127** (2011) 855–65.
45. K. Maštovská, S.J. Lehotay, *J. Chromatogr. A* **1040** (2004) 259–272.
46. A. Balinova, R. Mladenova, D. Shtereva, *J. Chromatogr. A* **1150** (2007) 136–44.
47. F.J. Camino-Sánchez, A. Zafra-Gómez, J. Ruiz-García, R. Bermúdez-Peinado, O. Ballesteros, A. Navalon, J.L. Vílchez, *J. Food Compos. Anal.* **24** (2011) 427–440.
48. J.-Y. Park, J.-H. Choi, A.M. Abd El-Aty, B.M. Kim, J.-H. Oh, J.-A. Do, K.S. Kwon, K.-H. Shim, O.-J. Choi, S.C. Shin, J.-H. Shim, *Food Chem.* **128** (2011) 241–53.
49. R.M. Evans, M. Scholze, A. Kortenkamp, *Food Chem. Toxicol.* **84** (2015) 260–9.
50. O. Ogbeide, I. Tongo, L. Ezemonye, *Chemosphere* **144** (2015) 1319–1326.
51. S.A. Gad Alla, N.M. Loutfy, A.H. Shendy, M.T. Ahmed, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **73** (2015) 985–991.
52. Z. He, Y. Xu, L. Wang, Y. Peng, M. Luo, H. Cheng, X. Liu, *Food Chem.* **196** (2016) 1248–55.
53. B. Chen, F. Wu, W. Wu, B. Jin, L. Xie, W. Feng, G. Ouyang, *Microchem. J.* 110 (2013) 280-284.
54. A. Garbi, V. Sakkas, Y.C. Fiamegos, C.D. Stalikas, T. Albanis, *Talanta* **82** (2010) 1286–91.
55. E. Pose-Juan, M.J. Sánchez-Martín, M.S. Andrades, M.S. Rodríguez-Cruz, E. Herrero-Hernández, *Sci. Total Environ.* **514** (2015) 351–8.
56. M. Pastor-Belda, I. Garrido, N. Campillo, P. Viñas, P. Hellín, P. Flores, J. Fenoll, *J. Chromatogr. A* **1394** (2015) 1–8.

57. A.A. Jennings, Z. Li, *J. Environ. Manage.* **146** (2014) 420–43.
58. D. Xu, S. Wang, J. Zhang, X. Tang, Y. Guo, C. Huang, *Chem. Eng. Res. Des.* **94** (2015) 396–406.
59. H.A. Azab, Z.M. Anwar, M.A. Rizk, G.M. Khairy, M.H. El-Asfoury, *J. Lumin.* **157** (2015) 371–382.
60. E.-N. Papadakis, A. Tsaboula, A. Kotopoulou, K. Kintzikoglou, Z. Vryzas, E. Papadopoulou-Mourkidou, *Sci. Total Environ.* **536** (2015) 793–802.
61. O. López-Fernández, R. Rial-Otero, J. Simal-Gándara, J. Boned, *Sci. Total Environ.* **543** (2016) 1–8.
62. N. Pang, T. Wang, J. Hu, *Food Chem.* **190** (2016) 793–800.
63. F. Long, A. Zhu, H. Shi, J. Sheng, Z. Zhao, *Chemosphere* **120** (2015) 615–20.
64. H. Bouya, M. Errami, A. Chakir, E. Roth, *Chemosphere* **134** (2015) 301–6.
65. F.R. Bortolozo, T.R. Aguiar, F.A. Hansel, E.F. Rosa Filho, L.V. Parron, S. Froehner, *Agric. Water Manag.* **163** (2016) 19–27.
66. J.A. Rodríguez-Liébana, M.D. Mingorance, A. Peña, *Sci. Total Environ.* **497-498** (2014) 561–9.
67. J.M. Dabrowski, M. Balderacchi, *Chemosphere* **93** (2013) 2433–43.
68. I. Delcour, P. Spanoghe, M. Uyttendaele, *Food Res. Int.* **68** (2015) 7–15.
69. O. Zivan, M. Segal-Rosenheimer, Y. Dubowski, *Atmos. Environ.* **127** (2016) 155–162.
70. A. Wilkowska, M. Biziuk, *Food Chem.* **125** (2011) 803–812.
71. K. Ridgway, S.P.D. Lalljie, R.M. Smith, *J. Chromatogr. A* **1153** (2007) 36–53.
72. R.-C. Duca, G. Salquebre, E. Hardy, B.M.R. Appenzeller, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **955-956** (2014) 98–107.
73. M.A. Farajzadeh, L. Khoshmaram, A.A.A. Nabil, *J. Food Compos. Anal.* **34** (2014) 128–135.
74. M.A. Farajzadeh, S. Sheykhizadeh, P. Khorram, *Food Anal. Methods* **7** (2014) 1229-1237.
75. R.R. Otero, R.C. Grande, J.G. Simal, *J. Chromatogr. A* **992 (1-2)** (2003) 121-31.
76. K. Sen, T. Cabaroglu, H. Yilmaz, *Food Chem. Toxicol.* **50** (2012) 3990-3995.
77. Q. Liu, W. Kong, F. Qiu, J. Wei, S. Yang, Y. Zheng, M. Yang, *J. Chromatogr. B* **15** (2012) 90-96.
78. F.O. Pelit, H. Ertaş, I. Seyrani, F.N. Ertaş, *Food Chem.* **138** (2013) 54-61.

79. B. Chen, F. Wu, W., Wu, B. Jin, L. Xie, W. Feng, G. Ouyang, *Microchem. J.* **126** (2016) 415-422.
80. J.P. dos Anjos, J.B. de Andrade, *Microchem. J.* **120** (2015) 69-76.
81. A. Garbi, V. Sakkas, Y.C. Fiamegos, C.D. Stalikas, T.Albanis, *Talanta* **82** (2010) 1286-1291.
82. G. Cinelli, P. Avino, I. Notardonato, A. Centola, M.V. Russo, Anal. Chim. Acta 769 (2013) 72-78.
83. A. Gure, F.J. Lara, A.M. García-Campaña, N. Megersa, M. del Olmo.Iruela, *Food Chem.* **170** (2015) 348-353.
84. C. Pizarro, N. Pérez del Notario, A. Sáenz-Mateo, J.M. Gonzáles-Sáiz, *Talanta* **128** (2014) 1-8.
85. R. Montes, I. Rodriquez, M. Ramil, E. Rubi, R. Cela, *J. Chromatogr. A* **1216** (2009) 5459-5466.
86. J. Gan, L. Lv, J. Peng, J. Li, Z. Xiong, D. Chen, L. He, *Food Chem.* **207** (2016) 195-204.
87. L. L. El Atrache, R.B. Sghaier, B.B. Kefi, V. Haldys, M. Dachraoui, J. Tortajada, *Talanta* **117** (2013) 392-398.
88. A.I.G. Costa, M.E.L.R. Queiroz, A.A. Neves, F.A. de Sousa, L. Zambolim, *Food Chem.* **181** (2015) 64-71.
89. Z. Shi, J. Hu, Q. Li, S. Zhang, Y. Liang, H. Zhang, *J. Chromatogr. A.* **1355** (2014) 219-227.
90. H. Heidari, H. Razmi, *Talanta* **99** (2012) 13-21.
91. P. Pérez-Ortega, B. Gilbert-López, J.F. Garcia-Reyes, N. Ramos-Martos, A. Molina-Díaz, *J.Chromatogr. A.* **1249** (2012) 32-40.
92. B. Albero, C. Sánchez-Brunete, J.L. Tadeo, *Talanta* **66** (2005) 917–24.
93. A. Balinova, R. Mladenova, D. Shtereva, *J. Chromatogr. A* **1150** (2007) 136–44.
94. X. Yang, H. Zhang, Y. Liu, J. Wang, Y.C. Zhang, A.J. Dong, H.T. Zhao, C.H. Sun, J. Cui, *Food Chem.* **127** (2011) 855–65.
95. M. Anastassiades, S.J. Lehotay, D. Stajnbaher, F.J. Schenck, *J. AOAC Int.* **86** (2003) 412–431.
96. Y. He, Y.-H. Liu, *Chromatographia* **65** (2007) 581–590.
97. T.M. Rizzetti, M. Kemmerich, M.L. Martins, O.D. Prestes, M.B. Adaime, R. Zanella,

Food Chem. **196** (2016) 25–33.

98. D. Tomasini, M.R.F. Sampaio, S.S. Caldas, J.G. Buffon, F.A. Duarte, E.G. Primel, *Talanta* **99** (2012) 380–386.
99. H.-Y. Liu, S.-L. Lin, M.-R. Fuh, *Talanta* **150** (2016) 233–239.
100. F. Rouvière, A. Buleté, C. Cren-Olivé, C. Arnaudguilhem, *Talanta* **93** (2012) 336–344.
101. M.B.R. Cerqueira, J.R. Guilherme, S.S. Caldas, M.L. Martins, R. Zanella, E.G. Primel, *Chemosphere* **107** (2014) 74–82.
102. I. Bragança, A. Plácido, P. Paíga, V.F. Domingues, C. Delerue-Matos, *Sci. Total Environ.* **433** (2012) 281–289.
103. H.-J. Hubschmann, *Handbook of GC/MS*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2008.
104. P. Sivaperumal, P. Anand, L. Riddhi, *Food Chem.* **168** (2015) 356–365.
105. T. Portolés, J.G.J. Mol, J. V Sancho, F.J. López, F. Hernández, *Anal. Chim. Acta* **838** (2014) 76–85.
106. C. Ferrer, O. Malato, A. Agüera, *TOF-MS within Food and Environmental Analysis - Comprehensive Analytical Chemistry*, Elsevier, 2012, pp. 1-60.
107. L. Lucini, R. Pellegrino, N. Cimino, D. Kane, L. Pretali, *Int. J. Mass Spectrom.* **392** (2015) 16–22.
108. A. Páleníková, G. Martínez-Domínguez, F.J. Arrebola, R. Romero-González, S. Hrouzková, A.G. Frenich, *Food Chem.* **173** (2015) 796–807.
109. O.P. Luzardo, M. Almeida-González, N. Ruiz-Suárez, M. Zumbado, L.A. Henríquez-Hernández, M.J. Meilán, M. Camacho, L.D. Boada, *Sci. Justice* **55** (2015) 307–15.
110. Y.-B. Jiang, M. Zhong, Y.-Y. Ma, *Food Control* **43** (2014) 110–114.
111. Method Validation & Quality Control Procedures for Pesticide Residue Analysis in Food and Feed, SANCO/12571/2013, European Commission, http://www.eurl-pesticides.eu/library/docs/allcrl/AqcGuidance_Sanco_2013_12571.pdf.
112. United States Environmental Protection Agency, Volatile Organic Analysis in Water by GC/MS, https://clu-in.org/docs/embed.cfm?link=%2Fpublications%2Fdb%2Fdb%5Fsearch%2Ecgi%3Fcustom%5Fsearch%3Dyes%26submit%5Fsearch%3D1, (16.12.2015.).
113. B.K. Matuszewski, M.L. Constanzer, C.M. Chavez-Eng, *Anal. Chem.* **75** (2003) 3019–3030.

114. F. He, N.-N. Liang, L. Mu, Q.-H. Pan, J. Wang, M.J. Reeves, C.-Q. Duan, *Molecules* **17** (2012) 1571–1601.
115. L.E. Rodriquez-Saona, M.M. Giusti, R.W. Durst, R.E. Wrolstad, *J. Food Process. Preserv.* **25** (2001) 165–182.
116. M. Anastassiades, QuEChERS - Mini-Multiresidue Method for the Analysis of Pesticides, http://www.weber.hu/PDFs/QuEChERS/EN_15662.pdf, (28.8.2015.).
117. R.E. Majors, QuEChERS — A New Technique for Multiresidue Analysis of Pesticides in Foods and Agricultural Samples, http://www.chromatographyonline.com/quechers-new-technique-multiresidue-analysis-pesticides-foods-and-agricultural-samples, (28.8.2015.).
118. G. Chen, P. Cao, R. Liu, *Food Chem.* **125** (2011) 1406–1411.
119. S.J. Lehotay, K. Mastovská, A.R. Lightfield, *J. AOAC Int.* **88** (2005) 615–629.
120. R.M. González-Rodríguez, B. Cancho-Grande, J. Simal-Gándara, *J. Chromatogr. A* **1216** (2009) 6033–42.
121. M. Požek, A. Dulčić, *Fizički Praktikum I I II*, Sunnypress, Zagreb, 1999, str. 122.
122. W. Hässelbarth, EUROLAB Technical Report 1/2006 – Guide to the Evaluation of Measurement Uncertainty for Quantitative Test Results, http://www.eurolab.org, (18.1.2016.).
123. A. Menditto, M. Patriarca, B. Magnusson, *Accredit. Qual. Assur.* **12** (2006) 45–47.
124. Pravilnik o zemljopisnim područjima uzgoja vinove loze, (NN (74/2012), Republika Hrvatska, Ministarstvo poljoprivrede, http://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2012_07_74_1723.html.
125. Commission Regulation (EC) No 889/2008 of 5 September 2008 laying down detailed rules for the implementation of Council Regulation (EC) No 834/2007 on organic production and labelling of organic products with regard to organic production, labelling and co, EC No 889/2008, European Commission, http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:250:0001:0084:EN:PDF.
126. Pravilnik o ekološkoj proizvodnji bilja i životinja, (NN 1/2013), Republika Hrvatska, Ministarstvo poljoprivrede, http://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2013_01_1_31.html.
127. The 2013 European Union Report on Pesticide Residues in Food, http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/40

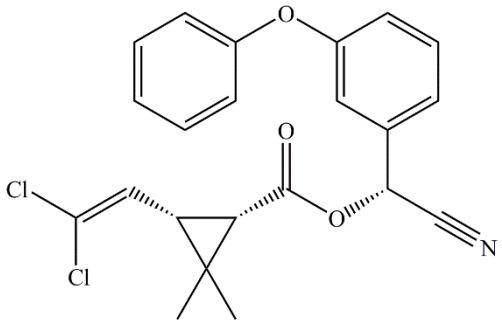
38.pdf, (16.9.2015.).

128. Regulation (EC) NO 396/2005 of the European Parlament 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, (EC) No 396/2005, European Commission, http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2005:070:0001:0016:en:PDF.

§ 8. DODATAK

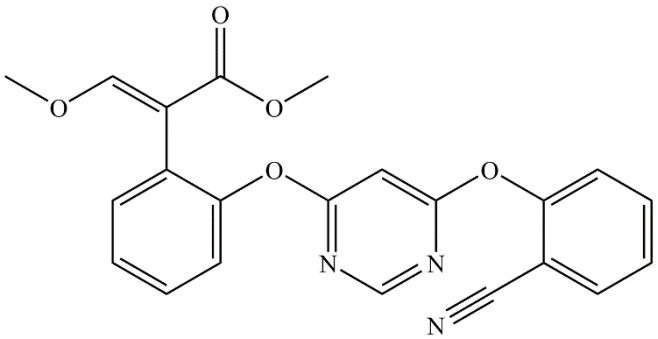
PRILOG I. Fizikalno – kemijska svojstva istraživanih 25 pesticida.

Alfa – cipermetrin



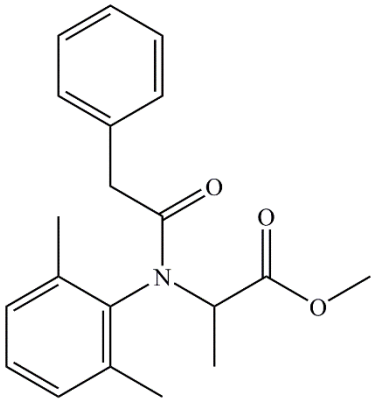
Trivijalni naziv:	alfa – cipermetrin
Kemijski naziv (IUPAC):	racemat (*R*)-α-cijano-3-fenoksibenzil (1*S*)-cis-3-(2,2-diklorvinil)-2,2-dimetilciklopropankarboksilat i (*S*)- α-cijano-3-fenoksibenzil (1*R*)-cis-3-(2,2-diklorvinil)-2,2-dimetilciklopropankarboksilat
Kemijska klasifikacija:	piretroid
Aktivnost:	insekticid
Molekulska formula:	$C_{22}H_{19}Cl_2NO_3$
Molekulska masa:	416,30
CAS br.:	67375-30-8
Izgled:	bezbojni kristalični prah
Talište / °C:	81,5
Vrelište / °C:	razgrađuje se prije vrenja
Gustoća / g cm^{-3} (20 °C):	1,33
pK_a (25 °C):	5, slaba kiselina
Topljivost u vodi / mg L^{-1} (20 °C):	0,004
Topljivost u organskim otapalima / mg L^{-1} (20 °C):	toluen: 596000 metanol: 21300 etil – acetat: 584000
log K_{ow} (pH 7, 20 °C):	5,5
Tlak para / mPa (25 °C):	0,00034
Henrijeva konstanta / Pa m^3 mol^{-1} (25 °C):	$6,90 \cdot 10^{-02}$
Vrijeme polurazgradnje u vodi:	101 dan, stabilan pri pH 4; stabilan 7,3 dana pri pH 9
Vrijeme polurazgradnje u tlu:	35 dana

Azoksistrobin



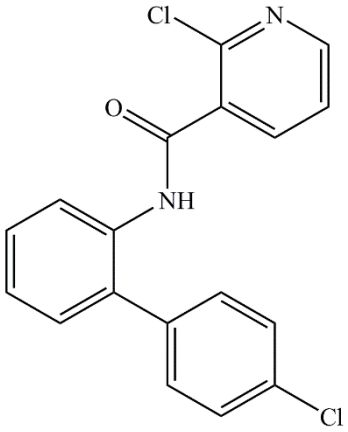
Trivijalni naziv:	azoksistrobin	
Kemijski naziv (IUPAC):	metil (*E*)-2-{2-{[6-(2-cijanofenoksi)pirimidin-4-il]oksi}fenil)-3-metoksiprop-2-enoat	
Kemijska klasifikacija:	strobilurin	
Aktivnost:	fungicid	
Molekulska formula:	$C_{22}H_{17}N_3O_5$	
Molekulska masa:	403,4	
CAS br.:	131860-33-8	
Izgled:	bijeli kristalični prah	
Talište / °C:	116	
Vrelište / °C:	3600 °C	
Gustoća / g cm^{-3} (20 °C):	1,34	
pK_a (25 °C):	ne disocira	
Topljivost u vodi / mg L^{-1} (20 °C):	6,7	
Topljivost u organskim otapalima / mg L^{-1} (20 °C):	*n* – heksan:	57
	metanol:	20000
	toluen:	55000
	aceton:	86000
log K_{ow} (pH 7, 20 °C):	2,5	
Tlak para / mPa (25 °C):	$1{,}10 \cdot 10^{-07}$	
Henrijeva konstanta / Pa m^3 mol^{-1} (25 °C):	$7{,}40 \cdot 10^{-09}$	
Vrijeme polurazgradnje u vodi:	hidrolitički stabilan, nije osjetljiv na promjene pH	
Vrijeme polurazgradnje u tlu:	279 dana	

Benalaksil



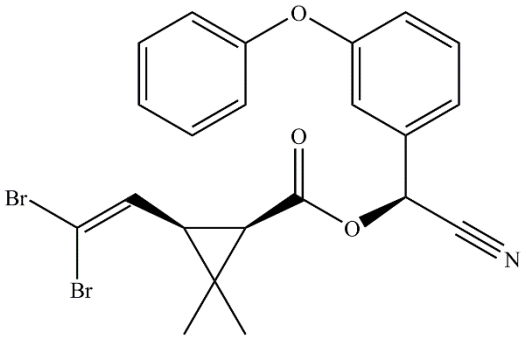
Trivijalni naziv:	benalaksil
Kemijski naziv (IUPAC):	metil *N*-(fenilacetil)-*N*-(2,6-ksilil)-*DL*-alaninat
Kemijska klasifikacija:	acilamino kiselina
Aktivnost:	fungicid
Molekulska formula:	$C_{20}H_{23}NO_3$
Molekulska masa:	325,402
CAS br.:	71626-11-4
Izgled:	bezbojan prah
Talište / °C:	79
Vrelište / °C:	razgrađuje se prije vrenja (250 °C)
Gustoća / g cm^{-3} (20 °C):	1,27
pK_a (25 °C):	ne disocira
Topljivost u vodi / mg L^{-1} (20 °C):	28,6
Topljivost u organskim otapalima / mg L^{-1} (20 °C):	*n* – heptan : 19400 metanol: 250000 aceton: 250000 etil – acetat: 250000
log K_{ow} (pH 7, 20 °C):	3,54
Tlak para / Pa (25 °C):	0,572
Henrijeva konstanta / Pa m^3 mol^{-1} (25 °C):	$6{,}50 \cdot 10^{-03}$
Vrijeme polurazgradnje u vodi:	86 dana pri pH 9; stabilan pri pH 4 – 9
Vrijeme polurazgradnje u tlu:	20 – 71 dan

Boskalid



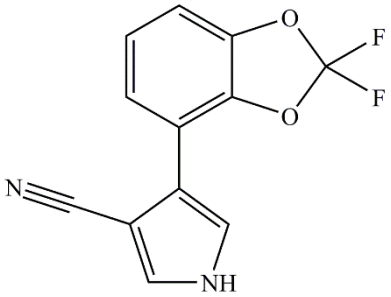
Trivijalni naziv:	boskalid	
Kemijski naziv (IUPAC):	2-klor-*N*-(4'-klorbifenil-2-il)nikotinamid	
Kemijska klasifikacija:	karboksamid	
Aktivnost:	fungicid	
Molekulska formula:	$C_{18}H_{12}Cl_2N_2O$	
Molekulska masa:	343,21	
CAS br.:	188425-85-6	
Izgled:	bijeli kristalični prah	
Talište / °C:	143,3	
Vrelište / °C:	razgrađuje se prije vrenja (300 °C)	
Gustoća / g cm^{-3} (20 °C):	1,381	
pK_a (25 °C):	ne disocira	
Topljivost u vodi / mg L^{-1} (20 °C):	4,6	
Topljivost u organskim otapalima / mg L^{-1} (20 °C):	toluen:	22500
	1 – oktanol:	10000
	metanol:	45000
	aceton:	180000
log K_{ow} (pH 7, 20 °C):	2,96	
Tlak para / mPa (25 °C):	0,00072	
Henrijeva konstanta / Pa m^3 mol^{-1} (25 °C):	$5{,}18 \cdot 10^{-08}$	
Vrijeme polurazgradnje u vodi:	hidrolitički stabilan pri pH 4 – 9	
Vrijeme polurazgradnje u tlu:	200 dana	

Deltametrin



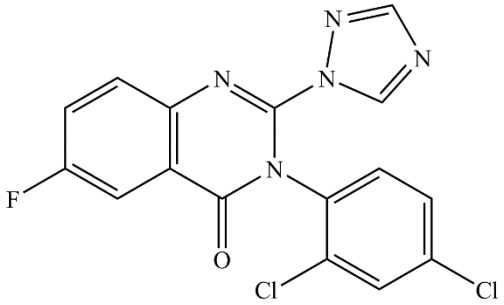
Trivijalni naziv:	deltametrin
Kemijski naziv (IUPAC):	(S)-cijano-(3-fenoksibenzil)metil (1R,3R)-3-(2,2-dibrometenil)-2,2-dimetilciklopropan-1-karboksilat
Kemijska klasifikacija:	piretroid
Aktivnost:	insekticid
Molekulska formula:	$C_{22}H_{19}Br_2NO_3$
Molekulska masa:	505,2
CAS br.:	52918-63-5
Izgled:	bezbojni kristalični prah
Talište / °C:	101
Vrelište / °C:	razgrađuje se prije vrenja
Gustoća / g cm^{-3} (20 °C):	0,55
pK_a (25 °C):	ne disocira
Topljivost u vodi / mg L^{-1} (20 °C):	0,0002
Topljivost u organskim otapalima / mg L^{-1} (20 °C):	aceton: 450000 ksilen: 175000 metanol: 8150 *n* – heptan: 2470
log K_{ow} (pH 7, 20 °C):	4,6
Tlak para / mPa (25 °C):	0,0000124
Henrijeva konstanta / Pa m^3 mol^{-1} (25 °C):	$3{,}10 \cdot 10^{-02}$
Vrijeme polurazgradnje u vodi:	hidrolitički stabilan pri pH 5 – 7; DT50 31 dan pri pH 8; 2,5 dana pri pH 9
Vrijeme polurazgradnje u tlu:	13 dana

Fludioksonil



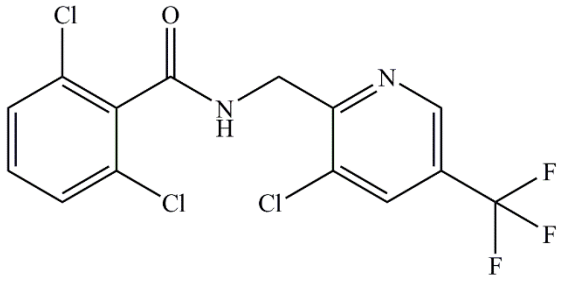
Trivijalni naziv:	fludioksonil	
Kemijski naziv (IUPAC):	4-(2,2-difluor-2H-1,3-benzodioksol-4-il)-1H-pirol-3-karbonitril	
Kemijska klasifikacija:	fenilpirol	
Aktivnost:	fungicid	
Molekulska formula:	$C_{12}H_6F_2N_2O_2$	
Molekulska masa:	248,19	
CAS br.:	131341-86-1	
Izgled:	žuti kristalični prah	
Talište / °C:	199,8	
Vrelište / °C:	razgrađuje se prije vrenja (306 °C)	
Gustoća / g cm^{-3} (20 °C):	1,54	
pK_a (25 °C):	0	
Topljivost u vodi / mg L^{-1} (20 °C):	1,8	
Topljivost u organskim otapalima / mg L^{-1} (20 °C):	oktanol:	20000
	aceton:	190000
	toluen:	2700
	metanol:	42000
log K_{ow} (pH 7, 20 °C):	4,12	
Tlak para / mPa (25 °C):	$3{,}90 \cdot 10^{-04}$	
Henrijeva konstanta / Pa m^3 mol^{-1} (25 °C):	$5{,}40 \cdot 10^{-05}$	
Vrijeme polurazgradnje u vodi:	hidrolitički stabilan pri pH 5 – 9	
Vrijeme polurazgradnje u tlu:	164 dana	

Flukinkonazol



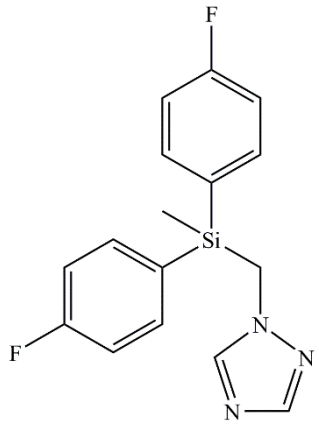
Trivijalni naziv:	flukinkonazol
Kemijski naziv (IUPAC):	3-(2,4-diklorfenil)-6-fluor-2-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)kinazolin-4(3*H*)-on
Kemijska klasifikacija:	triazol
Aktivnost:	fungicid
Molekulska formula:	$C_{16}H_8Cl_2FN_5O$
Molekulska masa:	376,17
CAS br.:	136426-54-5
Izgled:	žuti kristalični prah
Talište / °C:	191
Vrelište / °C:	razgrađuje se prije vrenja (320 °C)
Gustoća / g cm^{-3} (20 °C):	1,58
pK_a (25 °C):	0,9; jaka kiselina
Topljivost u vodi / mg L^{-1} (20 °C):	1,15
Topljivost u organskim otapalima / mg L^{-1} (20 °C):	aceton: 44000 etil – acetat: 34000 etanol: 3480 heksan: 114
log K_{ow} (pH 7, 20 °C):	3,24
Tlak para / mPa (25 °C):	$6{,}40 \cdot 10^{-06}$
Henrijeva konstanta / Pa m^3 mol^{-1} (25 °C):	$2{,}90 \cdot 10^{-06}$
Vrijeme polurazgradnje u vodi:	194 dana pri pH 4; 202,4 dana pri pH 5; 0,4 dana pri pH 9
Vrijeme polurazgradnje u tlu:	350 dana

Fluopikolid



Trivijalni naziv:	fluopikolid	
Kemijski naziv (IUPAC):	2,6-diklor-N-[3-klor-5-(trifluormetil)-2-piridilmetil]benzamid	
Kemijska klasifikacija:	benzamid	
Aktivnost:	fungicid	
Molekulska formula:	$C_{14}H_8Cl_3F_3N_2O$	
Molekulska masa:	383,58	
CAS br.:	2391100-15-7	
Izgled:	žućkasti prah	
Talište / °C:	150	
Vrelište / °C:	razgrađuje se prije vrenja (320 °C)	
Gustoća / g cm^{-3} (20 °C):	1,65	
pK_a (25 °C):	ne disocira	
Topljivost u vodi / mg L^{-1} (20 °C):	2,8	
Topljivost u organskim otapalima / mg L^{-1} (20 °C):	*n* – heksan:	200
	etanol:	19200
	toluen:	20500
	aceton:	74700
log K_{ow} (pH 7, 20 °C):	2,9	
Tlak para / mPa (25 °C):	$3{,}03 \cdot 10^{-04}$	
Henrijeva konstanta / Pa m^3 mol^{-1} (25 °C):	$4{,}15 \cdot 10^{-05}$	
Vrijeme polurazgradnje u vodi:	hidrolitički stabilan	
Vrijeme polurazgradnje u tlu:	271 dan	

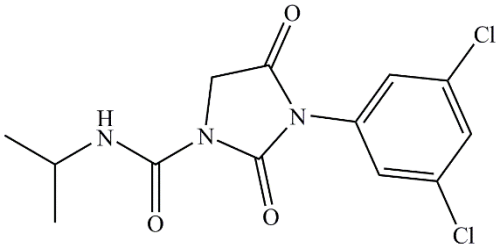
Flusilazol



Trivijalni naziv:	flusilazol
Kemijski naziv (IUPAC):	bis(4-fluorfenil)(metil)(1*H*-1,2,4-triazol-1-ilmetil)silan
Kemijska klasifikacija:	triazol
Aktivnost:	fungicid
Molekulska formula:	$C_{16}H_{15}F_2N_3Si$
Molekulska masa:	315,39
CAS br.:	85509-19-9
Izgled:	bijeli do smeđi kristalični prah
Talište / °C:	53,2
Vrelište / °C:	393
Gustoća / g cm^{-3} (20 °C):	1,31
pK_a (25 °C):	ne disocira
Topljivost u vodi / mg L^{-1} (20 °C):	41,9

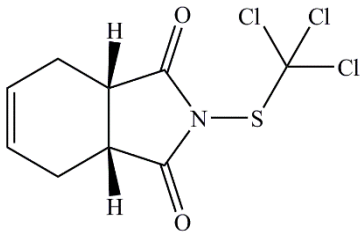
Topljivost u organskim otapalima / mg L^{-1} (20 °C):	*n* – heksan:	85000
	etil – acetat:	200000
	ksilen:	200000
log K_{ow} (pH 7, 20 °C):	3,87	
Tlak para / mPa (25 °C):	0,0387	
Henrijeva konstanta / Pa m^3 mol^{-1} (25 °C):	$2,70 \cdot 10^{-04}$	
Vrijeme polurazgradnje u vodi:	hidrolitički stabilan 34 dana pri pH 5 – 9	
Vrijeme polurazgradnje u tlu:	300 dana	

Iprodion



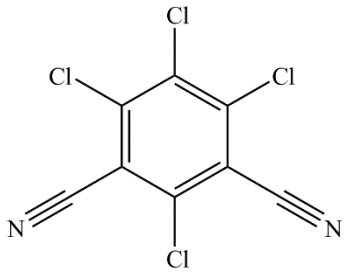
Trivijalni naziv:	iprodion	
Kemijski naziv (IUPAC):	3-(3,5-diklorfenil)-*N*-izopropil-2,4-dioksoimidazolidin-1-karboksamid	
Kemijska klasifikacija:	dikarboksiimid	
Aktivnost:	fungicid	
Molekulska formula:	$C_{13}H_{13}Cl_2N_3O_3$	
Molekulska masa:	330,17	
CAS br.:	253-178-9	
Izgled:	bezbojni kristalični prah	
Talište / °C:	134	
Vrelište / °C:	-	
Gustoća / g cm^{-3} (20 °C):	1,0	
pK_a (25 °C):	ne disocira	
Topljivost u vodi / mg L^{-1} (20 °C):	12,2	
Topljivost u organskim otapalima / mg L^{-1} (20 °C):	*n* – heksan:	590
	toluen:	147000
	aceton:	342000
	etil – acetat:	225000
log K_{ow} (pH 7, 20 °C):	3,1	
Tlak para / mPa (25 °C):	0,0005	
Henrijeva konstanta / Pa m^3 mol^{-1} (25 °C):	$7{,}00 \cdot 10^{-06}$	
Vrijeme polurazgradnje u vodi:	146 dana pri pH 5; 0,2 dana pri pH 8	
Vrijeme polurazgradnje u tlu:	84 dana	

Kaptan



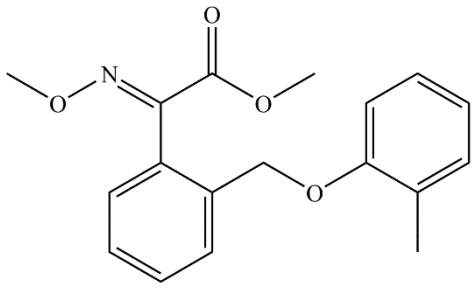
Trivijalni naziv:	kaptan	
Kemijski naziv (IUPAC):	*N*-(triklormetiltio)cikloheks-4-en-1,2-dikarboksimid	
Kemijska klasifikacija:	ftalimid	
Aktivnost:	fungicid	
Molekulska formula:	$C_9H_8Cl_3NO_2S$	
Molekulska masa:	300,61	
CAS br.:	133-06-2	
Izgled:	bijeli prah	
Talište / °C:	174	
Vrelište / °C:	173	
Gustoća / g cm^{-3} (20 °C):	1,68	
pK_a (25 °C):	ne disocira	
Topljivost u vodi / mg L^{-1} (20 °C):	5,2	
Topljivost u organskim otapalima / mg L^{-1} (20 °C):	*n* - heksan:	40
	metanol:	4000
	ksilen:	9000
	aceton:	38000
log K_{ow} (pH 7, 20 °C):	2,5	
Tlak para / mPa (25 °C):	0,0042	
Henrijeva konstanta / Pa m^3 mol^{-1} (25 °C):	$3{,}00 \cdot 10^{-04}$	
Vrijeme polurazgradnje u vodi:	32,4 h pri pH 5; <2 min pri pH 10	
Vrijeme polurazgradnje u tlu:	0,8 dan	

Klortalonil



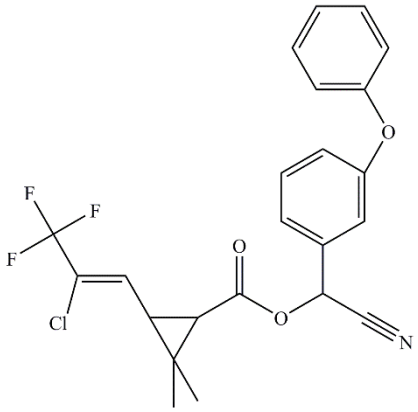
Trivijalni naziv:	klortalonil
Kemijski naziv (IUPAC):	tetraklorbenzen-1,3-dikarbonitril
Kemijska klasifikacija:	aromatski fungicid, klornitril
Aktivnost:	fungicid
Molekulska formula:	$C_8Cl_4N_2$
Molekulska masa:	265,91
CAS br.:	1897-45-6
Izgled:	bijeli kristalični prah
Talište / °C:	252,1
Vrelište / °C:	350
Gustoća / g cm^{-3} (20 °C):	1,74
pK_a (25 °C):	ne disocira
Topljivost u vodi / mg L^{-1} (20 °C):	0,81
Topljivost u organskim otapalima / mg L^{-1} (20 °C):	etil – acetat: 13800 aceton: 20600 metanol: 1360 ksilen: 74400
log K_{ow} (pH 7, 20 °C):	2,94
Tlak para / mPa (25 °C):	0,076
Henrijeva konstanta / Pa m^3 mol^{-1} (25 °C):	$2{,}50 \cdot 10^{-02}$
Vrijeme polurazgradnje u vodi:	hidrolitički stabilan pri pH 5 – 7; 16-38 dana pri pH 9
Vrijeme polurazgradnje u tlu:	22 dana

Krezoksim – metil



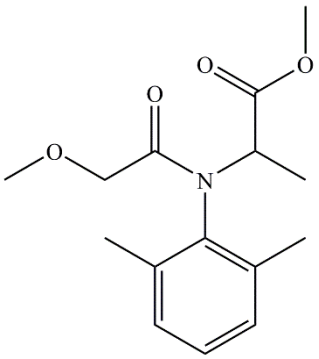
Trivijalni naziv:	krezoksim – metil	
Kemijski naziv (IUPAC):	metil (*E*)-metoksiimino[α-(o-toliloksi)-o-tolil]acetat	
Kemijska klasifikacija:	strobilurin	
Aktivnost:	fungicid	
Molekulska formula:	$C_{18}H_{19}N_2O_4$	
Molekulska masa:	313,35	
CAS br.:	143390-89-0	
Izgled:	bijeli kristalični prah	
Talište / °C:	102	
Vrelište / °C:	razgrađuje se prije vrenja (350 °C)	
Gustoća / g cm^{-3} (20 °C):	1,26	
pK_a (25 °C):	ne disocira	
Topljivost u vodi / mg L^{-1} (20 °C):	2,0	
Topljivost u organskim otapalima / mg L^{-1} (20 °C):	*n* – heptan:	1720
	metanol:	14900
	aceton:	217000
	etil – acetat:	123000
log K_{ow} (pH 7, 20 °C):	3,4	
Tlak para / mPa (25 °C):	$2{,}30 \cdot 10^{-03}$	
Henrijeva konstanta / Pa m^3 mol^{-1} (25 °C):	$3{,}60 \cdot 10^{-04}$	
Vrijeme polurazgradnje u vodi:	34 dana pri pH 7, 7 h pri pH 9	
Vrijeme polurazgradnje u tlu:	<1 dan	

Lambda – cihalotrin



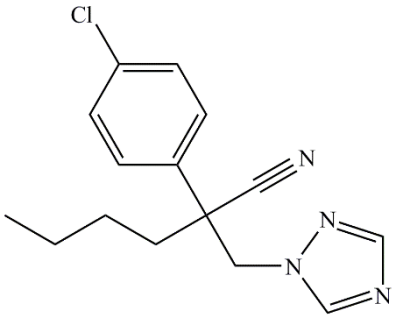
Trivijalni naziv:	lambda – cihalotrin
Kemijski naziv (IUPAC):	(*R*)-cijano-3-fenoksibenzil (1*S*)-cis-3[(*Z*)-2-2-klor-3,3,3-trifluorpropenil]-2,2-dimetilciklopropankarboksilat i (*S*)-cijano-3-fenoksibenzil (1*R*)-cis-3[(*Z*)-2-2-klor-3,3,3-trifluorpropenil]-2,2-dimetilciklopropankarboksilat
Kemijska klasifikacija:	piretroid
Aktivnost:	insekticid
Molekulska formula:	$C_{23}H_{19}ClF_3NO_3$
Molekulska masa:	449,85
CAS br.:	91465-08-6
Izgled:	bijeli kristalični prah
Talište / °C:	49,2
Vrelište / °C:	275
Gustoća / g cm^{-3} (20 °C):	1,33
pK_a (25 °C):	ne disocira
Topljivost u vodi / mg L^{-1} (20 °C):	0,005
Topljivost u organskim otapalima / mg L^{-1} (20 °C):	*n* – heksan: 500000 toluen: 500000 metanol: 250000
log K_{ow} (pH 7, 20 °C):	5,5
Tlak para / mPa (25 °C):	0,0002
Henrijeva konstanta / Pa m^3 mol^{-1} (25 °C):	$2{,}00 \cdot 10^{-02}$
Vrijeme polurazgradnje u vodi:	hidrolitički stabilan pri pH 5, 7 dana pri pH 9
Vrijeme polurazgradnje u tlu:	175 dana

Metalaksil



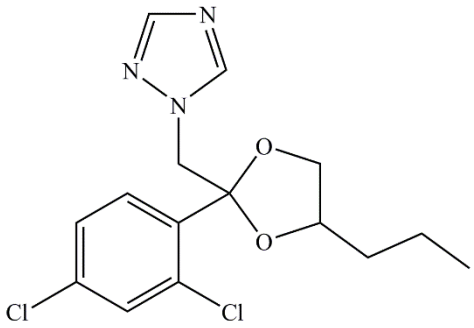
Trivijalni naziv:	metalaksil	
Kemijski naziv (IUPAC):	metil *N*-(metoksiacetil)-*N*-(2,6-ksilil)-*DL*-alaninat	
Kemijska klasifikacija:	fenilamid	
Aktivnost:	fungicid	
Molekulska formula:	$C_{15}H_{21}NO_4$	
Molekulska masa:	279,33	
CAS br.:	57837-19-1	
Izgled:	bijeli kristalični prah	
Talište / °C:	72	
Vrelište / °C:	-	
Gustoća / g cm^{-3} (20 °C):	1,2	
pK_a (25 °C):	0; vrlo jaka kiselina	
Topljivost u vodi / mg L^{-1} (20 °C):	8400	
Topljivost u organskim otapalima / mg L^{-1} (20 °C):	benzen:	550000
	n – heksan:	9100
	metanol:	650000
	toluen:	topljivo
log K_{ow} (pH 7, 20 °C):	1,75	
Tlak para / mPa (25 °C):	0,75	
Henrijeva konstanta / Pa m^3 mol^{-1} (25 °C):	$1,60 \cdot 10^{-05}$	
Vrijeme polurazgradnje u vodi:	200 dana pri pH 1; 115 dana pri pH 9, 12 dana pri pH 10	
Vrijeme polurazgradnje u tlu:	36 dana	

Miklobutanil



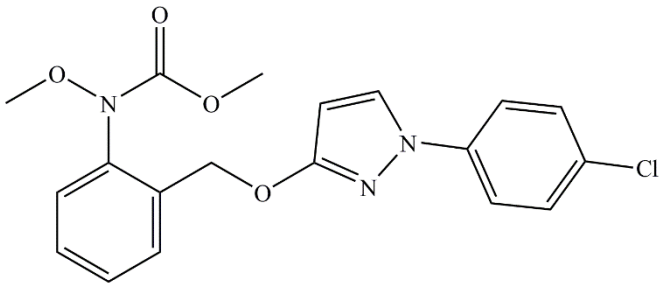
Trivijalni naziv:	miklobutanil	
Kemijski naziv (IUPAC):	(*RS*)-2-(4-klorfenil)-2-(1*H*-1,2,4-triazol-1-ilmetil)heksanenitril	
Kemijska klasifikacija:	triazol	
Aktivnost:	fungicid	
Molekulska formula:	$C_{15}H_{17}ClN_4$	
Molekulska masa:	288,78	
CAS br.:	88671-89-0	
Izgled:	bijeli kristalični prah	
Talište / °C:	70,9	
Vrelište / °C:	390,8	
Gustoća / g cm^{-3} (20 °C):	1,24	
pK_a (25 °C):	2,3; jaka kiselina	
Topljivost u vodi / mg L^{-1} (20 °C):	132	
Topljivost u organskim otapalima / mg L^{-1} (20 °C):	*n* – heptan:	1020
	ksilen:	270000
	metanol:	250000
	aceton:	250000
log K_{ow} (pH 7, 20 °C):	2,89	
Tlak para / mPa (25 °C):	0,198	
Henrijeva konstanta / Pa m^3 mol^{-1} (25 °C):	$4{,}33 \cdot 10^{-04}$	
Vrijeme polurazgradnje u vodi:	hidrolitički stabilan pri pH 4 – 9	
Vrijeme polurazgradnje u tlu:	560 dana	

Propikonazol



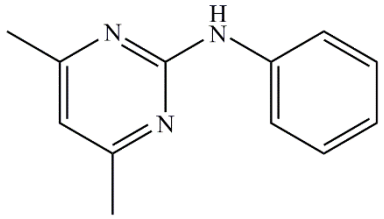
Trivijalni naziv:	propikonazol	
Kemijski naziv (IUPAC):	(2*RS*,4*RS*;2*RS*,4*SR*)-1-[2-(2,4-diklorfenil)-4-propil-1,3-dioksolan-2-ilmetil]-1*H*-1,2,4-triazol	
Kemijska klasifikacija:	triazol	
Aktivnost:	fungicid	
Molekulska formula:	$C_{15}H_{17}Cl_2N_3O_2$	
Molekulska masa:	342,22	
CAS br.:	60207-90-1	
Izgled:	žuta viskozna tekućina	
Talište / °C:	-23	
Vrelište / °C:	razgrađuje se prije vrenja (355 °C)	
Gustoća / g cm^{-3} (20 °C):	1,32	
pK_k (25 °C):	1,09; vrlo slaba baza	
Topljivost u vodi / mg L^{-1} (20 °C):	150	
Topljivost u organskim otapalima / mg L^{-1} (20 °C):	*n* – heptan:	1585
	aceton:	topljivo
	metanol:	topljivo
	ksilen:	topljivo
log K_{ow} (pH 7, 20 °C):	3,72	
Tlak para / mPa (25 °C):	0,056	
Henrijeva konstanta / Pa m^3 mol^{-1} (25 °C):	$1{,}70 \cdot 10^{-07}$	
Vrijeme polurazgradnje u vodi:	53,5 dana	
Vrijeme polurazgradnje u tlu:	214 dana	

Piraklostrobin



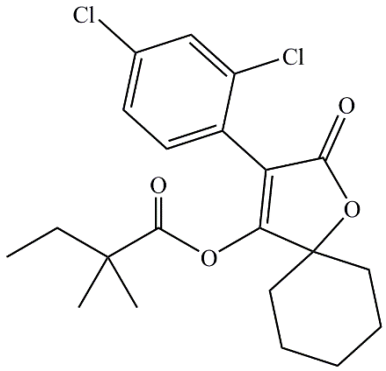
Trivijalni naziv:	piraklostrobin
Kemijski naziv (IUPAC):	metil {2-[1-(4-klorfenil)pirazol-3-iloksimetil]fenil}(metoksi)karbamat
Kemijska klasifikacija:	strobilurin
Aktivnost:	fungicid
Molekulska formula:	$C_{19}H_{18}ClN_3O_4$
Molekulska masa:	387,8
CAS br.:	175013-18-0
Izgled:	bijeli do žućkasti kristalični prah
Talište / °C:	64,5
Vrelište / °C:	razgrađuje se prije vrenja (200 °C)
Gustoća / g cm^{-3} (20 °C):	1,37
pK_a (25 °C):	Ne disocira
Topljivost u vodi / mg L^{-1} (20 °C):	1,9
Topljivost u organskim otapalima / mg L^{-1} (20 °C):	*n* – heptan: 3700 oktanol: 24200 aceton: 500000 metanol: 100800
log K_{ow} (pH 7, 20 °C):	3,99
Tlak para / mPa (25 °C):	$2{,}60 \cdot 10^{-05}$
Henrijeva konstanta / Pa m^3 mol^{-1} (25 °C):	$5{,}31 \cdot 10^{-06}$
Vrijeme polurazgradnje u vodi:	hidrolitički stabilan pri pH 5 – 9
Vrijeme polurazgradnje u tlu:	32 dana

Pirimetanil



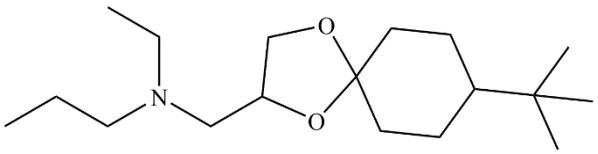
Trivijalni naziv:	pirimetanil	
Kemijski naziv (IUPAC):	*N*-(4,6-dimetilpirimdin-2-il)anilin	
Kemijska klasifikacija:	anilinpirimidin	
Aktivnost:	fungicid	
Molekulska formula:	$C_{12}H_{13}N_3$	
Molekulska masa:	199,11	
CAS br.:	53112-28-0	
Izgled:	bezbojni prah	
Talište / °C:	96,3	
Vrelište / °C:	razgrađuje se prije vrenja (189,9 °C)	
Gustoća / g cm^{-3} (20 °C):	1,19	
pK_a (25 °C):	3,52; slaba baza	
Topljivost u vodi / mg L^{-1} (20 °C):	121	
Topljivost u organskim otapalima / mg L^{-1} (20 °C):	*n* – heksan:	23700
	toluen:	412300
	aceton:	388800
	etil – acetat:	616900
log K_{ow} (pH 7, 20 °C):	2,84	
Tlak para / mPa (25 °C):	1,1	
Henrijeva konstanta / Pa m^3 mol^{-1} (25 °C):	$7{,}42 \cdot 10^{-07}$	
Vrijeme polurazgradnje u vodi:	hidrolitički stabilan pri pH 5 – 9	
Vrijeme polurazgradnje u tlu:	55 dana	

Spirodiklofen



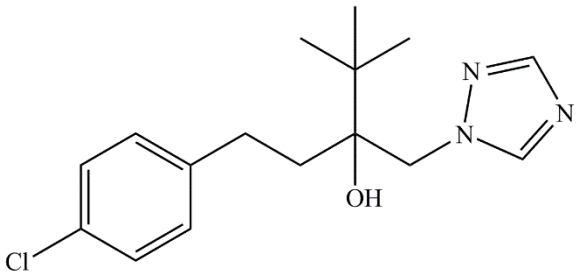
Trivijalni naziv:	spirodiklofen	
Kemijski naziv (IUPAC):	3-(2,4-diklorfenil)-2-okso-1-oksapiro[4,5]dek-3-en-4-il 2,2-dimetilbutirat	
Kemijska klasifikacija:	tetronska kiselina	
Aktivnost:	fungicid	
Molekulska formula:	$C_{21}H_{24}Cl_2O_4$	
Molekulska masa:	411,32	
CAS br.:	148477-71-8	
Izgled:	bezbojni prah	
Talište / °C:	94,8	
Vrelište / °C:	razgrađuje se prije vrenja	
Gustoća / g cm^{-3} (20 °C):	1,29	
pK_a (25 °C):	-	
Topljivost u vodi / mg L^{-1} (20 °C):	0,05	
Topljivost u organskim otapalima / mg L^{-1} (20 °C):	*n* – heptan:	20000
	etil – acetat:	250000
	ksilen:	250000
	diklormetan:	250000
log K_{ow} (pH 7, 20 °C):	5,84	
Tlak para / mPa (25 °C):	$3{,}00 \cdot 10^{-04}$	
Henrijeva konstanta / Pa m^3 mol^{-1} (25 °C):	$2{,}00 \cdot 10^{-02}$	
Vrijeme polurazgradnje u vodi:	119,6 pri pH 4, 2,5 dana pri pH 9	
Vrijeme polurazgradnje u tlu:	7 dana	

Spiroksamin



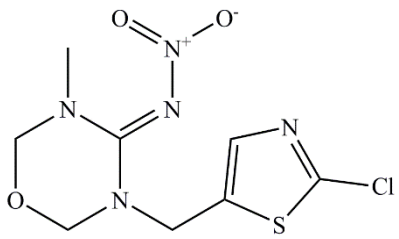
Trivijalni naziv:	spiroksamin
Kemijski naziv (IUPAC):	8-*tert*-butil-1,4-dioksaspiro[4,5]dekan-2-ilmetil(etil)(propil)amin
Kemijska klasifikacija:	morfolin
Aktivnost:	fungicid
Molekulska formula:	$C_{18}H_{35}NO_2$
Molekulska masa:	297,5
CAS br.:	118134-30-8
Izgled:	žućkasta tekućina
Talište / °C:	-170
Vrelište / °C:	razgrađuje se prije vrenja (120 °C)
Gustoća / g cm^{-3} (20 °C):	0,93
pK_a (25 °C):	6,9; baza
Topljivost u vodi / mg L^{-1} (20 °C):	405
Topljivost u organskim otapalima / mg L^{-1} (20 °C):	*n* – heksan: 200000 aceton: 200000 metanol: 200000 toluen: 200000
log K_{ow} (pH 7, 20 °C):	2,89
Tlak para / mPa (25 °C):	3,5
Henrijeva konstanta / Pa m^3 mol^{-1} (25 °C):	$3{,}80 \cdot 10^{-03}$
Vrijeme polurazgradnje u vodi:	hidrolitički stabilan pri pH 5 – 7, hidroliza pri pH 9
Vrijeme polurazgradnje u tlu:	25 dana

Tebukonazol



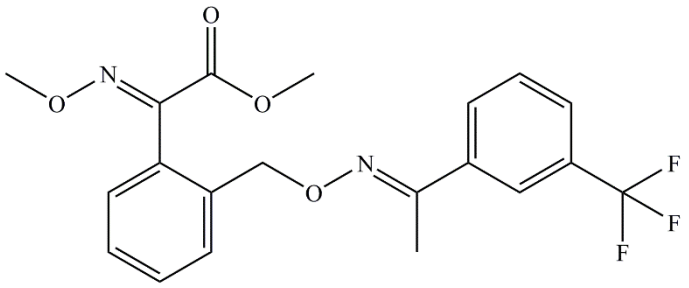
Trivijalni naziv:	tebukonazol
Kemijski naziv (IUPAC):	(*RS*)-1-p-klorfenil-4,4-dimetil-3-(1*H*-1,2,4-triazol-1-ilmetil)pentan-3-ol
Kemijska klasifikacija:	triazol
Aktivnost:	fungicid
Molekulska formula:	$C_{16}H_{22}ClN_3O$
Molekulska masa:	307,82
CAS br.:	107534-96-3
Izgled:	bezbojni kristalični prah
Talište / °C:	105
Vrelište / °C:	razgrađuje se prije vrenja (350 °C)
Gustoća / g cm^{-3} (20 °C):	1,25
pK_a (25 °C):	5,0
Topljivost u vodi / mg L^{-1} (20 °C):	36
Topljivost u organskim otapalima / mg L^{-1} (20 °C):	diklormetan: 200000 *n* – heksan: 80 toluen: 57000 oktanol: 96000
log K_{ow} (pH 7, 20 °C):	3,7
Tlak para / mPa (25 °C):	$1{,}30 \cdot 10^{-03}$
Henrijeva konstanta / Pa m^3 mol^{-1} (25 °C):	$1{,}00 \cdot 10^{-05}$
Vrijeme polurazgradnje u vodi:	hidrolitički stabilan pri pH 5 – 9
Vrijeme polurazgradnje u tlu:	63 dana

Tiametoksam



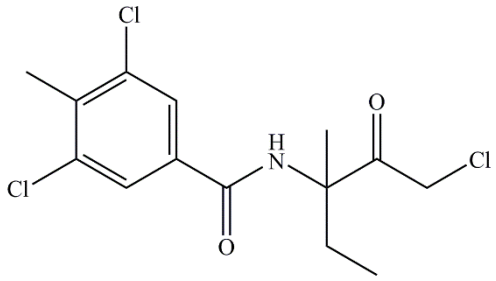
Trivijalni naziv:	tiametoksam
Kemijski naziv (IUPAC):	(*EZ*)-3-(2-klor-1,3-tiazol-5-ilmetil)-5-metil-1,3,5-oksadiazinan-4-iliden(nitro)amin
Kemijska klasifikacija:	neonikotinoid
Aktivnost:	insekticid
Molekulska formula:	$C_8H_{10}ClN_5O_3S$
Molekulska masa:	291,71
CAS br.:	153719-23-4
Izgled:	bezbojni kristalični prah
Talište / °C:	139,1
Vrelište / °C:	razgrađuje se prije vrenja (147 °C)
Gustoća / g cm^{-3} (20 °C):	1,57
pK_a (25 °C):	ne disocira
Topljivost u vodi / mg L^{-1} (20 °C):	4100
Topljivost u organskim otapalima / mg L^{-1} (20 °C):	aceton: 48000 etil – acetat: 7000 heksan: 1 toluen: 680
log K_{ow} (pH 7, 20 °C):	-0,13
Tlak para / mPa (25 °C):	$6{,}60 \cdot 10^{-06}$
Henrijeva konstanta / Pa m^3 mol^{-1} (25 °C):	$1{,}93 \cdot 10^{-13}$
Vrijeme polurazgradnje u vodi:	hidrolitički stabilan pri pH 1 – 7, 11,5 dana pri pH 9
Vrijeme polurazgradnje u tlu:	50 dana

Trifloksistrobin



Trivijalni naziv:	trifloksistrobin
Kemijski naziv (IUPAC):	metil (*E*)-metoksimino-{(*E*)-α-[1-(α,α,α-trifluoro-m-tolil)etiledenaminooksi]-o-tolil}acetat
Kemijska klasifikacija:	strobilurin
Aktivnost:	fungicid
Molekulska formula:	$C_{20}H_{19}F_3N_2O_4$
Molekulska masa:	408,37
CAS br.:	141517-21-7
Izgled:	bijeli prah
Talište / °C:	72,9
Vrelište / °C:	razgrađuje se prije vrenja (285 °C)
Gustoća / g cm^{-3} (20 °C):	1,36
pK_a (25 °C):	ne disocira
Topljivost u vodi / mg L^{-1} (20 °C):	0,61
Topljivost u organskim otapalima / mg L^{-1} (20 °C):	aceton: 500000 etil – acetat: 500000 metanol: 76000 toluen: 500000
log K_{ow} (pH 7, 20 °C):	4,5
Tlak para / mPa (25 °C):	$3{,}40 \cdot 10^{-03}$
Henrijeva konstanta / Pa m^3 mol^{-1} (25 °C):	$2{,}30 \cdot 10^{-03}$
Vrijeme polurazgradnje u vodi:	480 dana pri pH 5, 40 dana pri pH 7, 1,2 dana pri pH 9
Vrijeme polurazgradnje u tlu:	7 dana

Zoksamid



Trivijalni naziv:	zoksamid	
Kemijski naziv (IUPAC):	(*RS*)-3,5-diklor-*N*-(3-klor-1-etil-1-metil-2-oksopropil)-*p*-toluamid	
Kemijska klasifikacija:	benzamid	
Aktivnost:	fungicid	
Molekulska formula:	$C_{14}H_{16}Cl_3NO_2$	
Molekulska masa:	336,64	
CAS br.:	156052-68-5	
Izgled:	bijeli prah	
Talište / °C:	160	
Vrelište / °C:	-	
Gustoća / g cm^{-3} (20 °C):	1,36	
pK_a (25 °C):	-	
Topljivost u vodi / mg L^{-1} (20 °C):	0,681	
Topljivost u organskim otapalima / mg L^{-1} (20 °C):	etil acetat:	20000
	aceton:	55700
	ksilen:	1560
	n – heptan:	38
log K_{ow} (pH 7, 20 °C):	3,76	
Tlak para / mPa (25 °C):	0,013	
Henrijeva konstanta / Pa m^3 mol^{-1} (25 °C):	$2{,}70 \cdot 10^{-06}$	
Vrijeme polurazgradnje u vodi:	16 dana pri pH 4, 8 dana pri pH 9	
Vrijeme polurazgradnje u tlu:	60 dana	

PRILOG II. Fragmentacija odabranih pesticida s omjerima intenziteta signala ciljnog i potvrdnih iona.

Pesticid	Ciljni ion	Potvrdni ion 1 / %	Potvrdni ion 2 / %	Potvrdni ion 3 / %
alfa – cipermetrin	181	163,0/54,0	165,0/32,3	140,0/33,8
azoksistrobin	344,1	388,1/31,7	345,05/31,0	372,1/16,1
benalaksil	148,05	206,1/29,3	204,1/22,6	132,1/16,5
boskalid	140	342,05/51,1	344,1/33,6	142,0/32,3
kaptan	79,05	149,05/30	119/13,2	80,1/22
klortalonil	266	263,9/79,2	267,9/48,3	231,0/11,3
deltametrin	181,05	252,9/95,4	250,9/50,4	254,9/46,3
fludioksonil	248	127,0/29,7	154,1/24,4	182,0/16,7
fluopikolid	209	347,0/78,6	173,0/64,2	349,0/52,1
flukinkonazol	340,05	342,05/34,2	341,05/19,4	108,0/16,4
flusilazol	233,1	234,1/19	315,1/9,5	220,1/8,5
iprodion	314	316,0/65,5	187,0/36,1	189,0/21,6
krezoksim – metil	116,05	131,0/55,2	206,0/52,5	132,1/23,5
lambda – cihalotrin	181,05	197,05/38,9	208,1/25,0	209,05/12,6
metalaksil	206	160,1/56,4	132,05/51,8	249,2/49,6
miklobutanil	179	150,0/47,8	82,1/34,4	181,0/32,9
propikonazol	173	259,0/98,8	175,0/64,2	261,0/62,1
piraklostrobin	132	164,05/41,3	133,1/10,7	111,0/8,4
pirimetanil	198	199,1/46,1	91,0/3,4	200,1/5,6
spirodiklofen	71,05	99,1/19,9	312,1/17,3	314,1/11,6
spiroksamin	100	101,0/7,1	126,0/4,8	198,0/4,0
tebukonazol	125	250,1/97,3	70,05/53,0	83,05/49,0
tiametoksam	181,95	212,1/98,5	247,0/85,1	132,0/82,1
triflokstrobin	116,05	131,05/66,8	222,05/35	132,1/28,5
zoksamid	187	189,0/63,9	258,1/39,5	260,05/25,3

PRILOG III. Parametri SIM načina rada.

SIM	Grupa	Grupa	Grupa	Grupa	Grupa	Grupa	Grupa

	1	2	3	4	5	6	7
Početno vrijeme/min	0,000	9,8	12,7	16,0	17,8	19,9	21,7
Vrijeme praćenja iona/ ms	50	75	40	40	100	40	50
Broj snimanja s^{-1}	1,0	1,4	1,1	1,0	1,1	1,0	1,3
Ion 1	91	79,05	82,1	70,05	187	71,05	91
Ion 2	100	80,1	116,05	83,05	189	91,1	100
Ion 3	101	119	127	116,05	253,1	99,1	101
Ion 4	126	132	131	125	258,1	108	126
Ion 5	132,05	149,05	132,1	131,05	260,05	140	132,05
Ion 6	160,1	181,95	150	132,1	314	142	160,1
Ion 7	198	212,1	154,1	148,05	316	163	198
Ion 8	199,1	247	179	173	332,2	165	199,1
Ion 9	200,1		181	175		181,05	200,1
Ion 10	206		182	204,1		181,1	206
Ion 11	231		206	206,1		197,05	231
Ion 12	249,2		220	209		208,1	249,2
Ion 13	263,9		233,1	222,05		209,05	263,9
Ion 14	266		234,1	250,1		312,1	266
Ion 15	267,9		248	259		314,1	267,9
Ion 16			315,1	261		340,05	
Ion 17				347		341,05	
Ion 18				349		342,05	
Ion 19						344,1	

PRILOG IV. Optimizacija SPE, vrsta otapala za eluiranje, analitički povrat (n = 3).

	Analitički povrat / %			
Pesticid	**$C_4H_8O_2$**	**CH_3CN**	**CH_3OH**	**$(CH_3)_2CO$**
alfa – cipermetrin	67	54	14	26
azoksistrobin	99	98	24	54
benalaksil	101	101	36	68
boskalid	90	94	32	62
deltametrin	56	58	16	32
fludioksonil	132	133	47	97
flukinkonazol	85	91	39	65
fluopikolid	107	105	36	71
flusilazol	96	96	33	62
iprodion	109	109	37	76
kaptan	139	127	30	102
klortalonil	97	103	37	78
krezoksim – metil	98	100	36	69
lambda – cihalotrin	60	47	17	28
metalaksil	74	66	29	51
miklobutanil	98	95	34	63
piraklostrobin	232	324	82	215
pirimetanil	110	110	40	80
propikonazol	105	104	33	65
spirodiklofen	68	57	23	41
spiroksamin	105	103	26	47
tebukonazol	105	104	33	67
tiametoksam	9	10	3	7
trifloksistrobin	87	88	32	60
zoksamid	60	61	9	31

n – broj ponavljanja

PRILOG V. Optimizacija SPE, volumen otapala za eluiranje, analitički povrat (*n* = 3).

Pesticid	Analitički povrat / %					
	A 2 mL, B 8 mL	**A 1,5 mL, B 6 mL**	**A 1 mL, B 4 mL**	**A 0,7 mL, B 2,8 mL**	**A 0,5 mL, B 2 mL**	**A 0,3 mL, B 1,2 mL**
alfa – cipermetrin	39	37	45	42	46	44
azoksistrobin	96	94	98	96	93	78
benalaksil	100	99	97	100	92	85
boskalid	84	84	88	84	85	70
deltametrin	44	43	55	45	54	47
fludioksonil	149	150	143	148	135	123
flukinkonazol	81	82	83	85	81	74
fluopikolid	106	106	104	106	99	90
flusilazol	98	97	94	97	88	82
iprodion	109	110	107	110	102	95
kaptan	106	104	103	113	86	77
klortalonil	108	107	104	106	95	89
krezoksim – metil	100	99	95	99	90	84
lambda – cihalotrin	39	36	45	37	41	38
metalaksil	74	69	72	79	67	62
miklobutanil	99	94	94	96	88	81
piraklostrobin	179	350	365	289	880	922
pirimetanil	109	106	104	107	93	83
propikonazol	105	104	102	103	95	87
spirodiklofen	65	62	59	59	54	51
spiroksamin	111	107	96	90	72	55
tebukonazol	101	102	99	100	93	83
tiametoksam	8	7	9	8	7	7
trifloksistrobin	92	90	85	89	82	75
zoksamid	95	110	104	105	107	77

n – broj ponavljanja
A – *n* – heksan
B – acetonitril

PRILOG VI. Optimizacija SPE, razrjeđenje uzorka, analitički povrat (*n* = 3).

Pesticid	Analitički povrat / %			
	nerazrijeđen uzorak	1:1	1:2	1:4
alfa – cipermetrin	29	67	30	28
azoksistrobin	47	99	105	102
benalaksil	51	101	106	105
boskalid	42	90	96	94
deltametrin	23	56	29	23
fludioksonil	64	132	140	136
flukinkonazol	38	85	94	96
fluopikolid	52	107	113	111
flusilazol	48	96	102	103
iprodion	52	109	115	114
kaptan	71	139	136	123
klortalonil	47	97	103	106
krezoksim – metil	48	98	102	105
lambda – cihalotrin	24	60	25	23
metalaksil	38	74	76	71
miklobutanil	49	98	104	103
piraklostrobin	109	232	257	222
pirimetanil	56	110	112	111
propikonazol	51	105	110	110
spirodiklofen	38	68	74	57
spiroksamin	55	105	105	100
tebukonazol	49	105	110	108
tiametoksam	8	9	9	5
trifloksistrobin	45	87	90	94
zoksamid	26	60	74	84

n – broj ponavljanja

PRILOG VII. Optimizacija SPE, otapalo za ispiranje, analitički povrat, (*n* = 3).

Analitički povrat / %						
Pesticid	**bez ispiranja**	**voda 3 mL**	**A**	**B**	**C**	**D**
alfa – cipermetrin	18	21	34	40	21	26
azoksistrobin	63	64	76	89	93	88
benalaksil	104	101	95	90	97	78
boskalid	61	65	77	98	81	80
deltametrin	18	21	34	41	21	25
fludioksonil	138	133	127	119	125	92
flukinkonazol	47	58	82	106	76	93
fluopikolid	110	109	106	101	105	67
flusilazol	95	96	94	90	97	78
iprodion	110	108	107	104	105	99
kaptan	81	83	91	90	101	67
klortalonil	89	86	90	83	98	89
krezoksim – metil	102	99	94	91	99	98
lambda – cihalotrin	15	17	31	37	22	25
metalaksil	108	104	98	70	73	5
miklobutanil	100	99	95	92	97	38
piraklostrobin	137	139	138	129	141	119
pirimetanil	114	106	97	91	101	80
propikonazol	104	105	101	98	103	85
spirodiklofen	46	45	47	54	51	58
spiroksamin	6	19	44	76	69	19
tebukonazol	103	104	104	99	103	77
tiametoksam	30	32	30	15	12	n.d.
trifloksistrobin	90	88	85	83	89	91
zoksamid	19	21	33	60	62	91

n – broj ponavljanja
n.d. – nije detektirano
A - ψ(MeOH, H_2O) = 30:70
B - ψ (MeOH, H_2O = 50:50
C - ψ (MeOH, H_2O) = 50:50 0,01 % HCl
D - ψ (MeOH, H_2O = 70:30

PRILOG VIII. Optimizacija SPE, pH, analitički povrat (*n* = 3).

	Analitički povrat / %			
Pesticid	**pH 2**	**pH 4**	**pH 6**	**pH vina (3,5)**
alfa – cipermetrin	17	28	11	39
azoksistrobin	92	92	91	96
benalaksil	84	85	79	100
boskalid	82	80	79	84
deltametrin	16	31	9	44
fludioksonil	114	122	109	149
flukinkonazol	75	75	74	81
fluopikolid	95	98	89	106
flusilazol	82	84	76	98
iprodion	97	100	94	109
kaptan	86	97	89	106
klortalonil	91	92	83	108
krezoksim – metil	85	87	80	100
lambda – cihalotrin	21	39	10	39
metalaksil	60	61	58	74
miklobutanil	84	86	79	99
piraklostrobin	576	607	589	679
pirimetanil	81	98	91	109
propikonazol	88	92	84	105
spirodiklofen	58	63	53	65
spiroksamin	79	83	12	111
tebukonazol	90	93	86	101
tiametoksam	7	6	7	8
trifloksistrobin	76	78	70	92
zoksamid	66	60	67	95

n – broj ponavljanja

PRILOG IX. Optimizacija SPE, masa sorbensa, analitički povrat (*n* = 3).

	Analitički povrat / %	
Pesticid	**HLB 60 mg/3 mL**	**HLB 200 mg/6 mL**
alfa – cipermetrin	32	45
azoksistrobin	119	91
benalaksil	103	103
boskalid	101	59
deltametrin	37	47
fludioksonil	174	188
flukinkonazol	86	46
fluopikolid	119	119
flusilazol	102	103
iprodion	127	124
kaptan	118	89
klortalonil	106	107
krezoksim – metil	101	104
lambda – cihalotrin	32	40
metalaksil	70	117
miklobutanil	103	103
piraklostrobin	789	755
pirimetanil	106	115
propikonazol	111	114
spirodiklofen	59	56
spiroksamin	60	55
tebukonazol	112	112
tiametoksam	4	12
trifloksistrobin	90	89
zoksamid	87	273

n – broj ponavljanja

PRILOG X. Djelotvornost ekstrakcije pesticida postignuta s komercijalno dostupnim

pakiranjima za ekstrakciju postupkom QuEChERS (*n* = 3).

	Analitički povrat / %		
Pesticid	**QuEChERS 1**	**QuEChERS 2**	**QuEChERS 3**
alfa – cipermetrin	31	9	31
azoksistrobin	11	4	n.d.
benalaksil	27	10	44
boskalid	16	6	14
deltametrin	29	2	19
fludioksonil	34	1	39
flukinkonazol	16	8	21
fluopikolid	28	5	45
flusilazol	23	8	39
iprodion	26	4	40
kaptan	23	3	10
klortalonil	46	2	25
krezoksim – metil	33	9	52
lambda – cihalotrin	30	9	40
metalaksil	23	12	51
miklobutanil	22	8	39
piraklostrobin	7	4	17
pirimetanil	49	21	85
propikonazol	24	6	40
spirodiklofen	25	8	35
spiroksamin	14	11	65
tebukonazol	19	6	20
tiametoksam	11	0	41
trifloksistrobin	29	8	50
zoksamid	14	2	9

n – broj ponavljanja
QuEChERS 1 – 6 g $MgSO_4$ i 1,5 g Na acetat
QuEChERS 2 - 6 g $MgSO_4$ i 1,5 g NaCl
QuEChERS 3 – 4 g $MgSO_4$, 1 g NaCl, 1 g Na citrat, 0,5 diNa hidrogen citrat seskvihidrat

PRILOG XI. Optimizacija postupka QuEChERS, optimizacija soli (*n* = 3).

	Analitički povrat / %	
Pesticid	**trinatrijev citrat dihidrat + natrijev acetat**	**natrijev acetat**
alfa – cipermetrin	113	79
azoksistrobin	48	62
benalaksil	106	86
boskalid	95	28
deltametrin	126	53
fludioksonil	139	104
flukinkonazol	88	46
fluopikolid	114	106
flusilazol	99	69
iprodion	125	106
kaptan	56	50
klortalonil	82	76
krezoksim – metil	107	105
lambda – cihalotrin	105	101
metalaksil	108	89
miklobutanil	105	62
piraklostrobin	164	535
pirimetanil	146	118
propikonazol	111	60
spirodiklofen	94	85
spiroksamin	114	79
tebukonazol	89	50
tiametoksam	90	90
trifloksistrobin	108	105
zoksamid	34	11

n – broj ponavljanja

PRILOG XII. Utjecaj matrice uzorka[113] na kromatografski signal pesticida ekstrahiranih iz uzoraka vina postupkom SPE pri koncentracijama u vinu dvostruko i deseterostruko višim od granice određivanja i djelotvornost ekstrakcije SPE[113] (n = 3).

	Crno vino				**Bijelo vino**			
Pesticid	***ME* / %**		***EE* / %**		***ME* / %**		***EE* / %**	
	2 x GO	**10 x GO**	**2 x GO**	**10 x GO**	**2 x GO**	**10 x GO**	**2 x GO**	**10 x GO**
alfa – cipermetrin	114	102	72	84	76	43	93	43
azoksistrobin	174	177	107	129	104	89	104	98
benalaksil	163	161	88	88	82	85	101	102
boskalid	151	116	106	113	86	144	119	79
deltametrin	127	114	72	75	90	85	91	101
fludioksonil	689	184	82	94	95	94	93	100
flukinkonazol	79	84	136	121	70	83	124	83
fluopikolid	556	239	32	81	98	103	103	98
flusilazol	155	135	61	118	109	24	98	93
iprodion	187	157	72	103	31	336	104	88
kaptan	81	92	112	113	83	34	102	35
klortalonil	136	119	86	116	114	86	114	89
krezoksim – metil	114	133	109	110	111	91	120	86
lambda – cihalotrin	111	100	72	77	126	45	110	32
metalaksil	99	100	105	97	103	83	105	85
miklobutanil	164	136	57	89	107	85	100	91
piraklostrobin	404	513	40	92	110	85	113	82
pirimetanil	134	114	80	102	96	81	94	86
propikonazol	138	125	84	103	156	79	152	92
spirodiklofen	142	151	102	95	2	14190	4	7108
spiroksamin	105	101	110	124	91	89	100	85
tebukonazol	123	106	84	120	83	100	87	93
tiametoksam	212	104	19	10	105	1	96	1
trifloksistrobin	167	129	76	103	105	92	96	98
zoksamid	190	224	85	75	174	72	128	94

n – broj ponavljanja, *ME* – utjecaj matrice uzorka, *EE* – djelotvornost postupka ekstrakcije

PRILOG XIII. Utjecaj matrice uzorka uzorka[9] na kromatografski signal pesticida ekstrahiranih iz uzoraka vina postupkom QuEChERS i djelotvornost ekstrakcije[113], QuEChERS (n = 3).

	Crno vino			**Bijelo vino**		
Pesticid	***ME* / %**	***EE* / %**		***ME* / %**	***EE* / %**	
		2 x GO	**10 x GO**		**2 x GO**	**10 x GO**
alfa – cipermetrin	66	45	75	106	36	33
azoksistrobin	124	67	55	116	52	24
benalaksil	102	37	92	52	33	67
boskalid	20	62	72	92	28	18
deltametrin	72	42	73	100	48	35
fludioksonil	71	65	79	109	31	42
flukinkonazol	99	69	78	50	33	36
fluopikolid	103	86	88	68	36	47
flusilazol	101	100	75	64	17	19
iprodion	76	43	68	117	11	29
kaptan	11	105	101	57	30	22
klortalonil	5	144	239	59	43	38
krezoksim – metil	101	93	91	66	39	69
lambda – cihalotrin	72	53	72	72	40	60
metalaksil	103	83	87	51	41	39
miklobutanil	105	118	104	102	26	47
piraklostrobin	131	49	34	100	64	86
pirimetanil	101	53	79	52	31	35
propikonazol	100	87	84	61	288	45
spirodiklofen	23	44	84	71	88	75
spiroksamin	89	84	81	53	58	91
tebukonazol	150	93	79	62	17	24
tiametoksam	138	50	87	101	35	13
trifloksistrobin	102	125	86	65	41	58
zoksamid	4	55	78	51	21	9

n – broj ponavljanja, *ME* – utjecaj matice uzorka, *EE* – djelotvornost postupka ekstrakcije

PRILOG XIV. Analizirana vina i njihov identitet.

Kodna oznaka vina	Sorta	Vino	Regija	Lokacija	Metoda analize pesticida	Proizvodnja
1	Cuvée red	Crno	Hrvatsko primorje	Sjeverna Dalmacija	SPE	Ekološka
2	Plavac Mali	Crno	Hrvatsko primorje	Vis	SPE	Ekološka
3	C. Sauvignon	Crno	Hrvatsko primorje	Istra	SPE	Ekološka
4	Malvazija	Bijelo	Hrvatsko primorje	Istra	SPE	Ekološka
5	Malvazija	Bijelo	Hrvatsko primorje	Istra	SPE	Ekološka
6	Teran	Crno	Hrvatsko primorje	Istra	SPE	Ekološka
7	Syrah	Crno	Hrvatsko primorje	Istra	SPE	Ekološka
8	C. Sauvignon	Crno	Hrvatsko primorje	Nadin	SPE	Ekološka
9	Grenache rosé	Bijelo (rosé)	Hrvatsko primorje	Nadin	SPE	Konvencionalna
10	Syrah	Crno	Hrvatsko primorje	Nadin	SPE	Ekološka
11	C. Sauvignon - Syrah - Grenache red	Crno	Hrvatsko primorje	Nadin	SPE	Ekološka
12	Grenache red	Crno	Hrvatsko primorje	Nadin	SPE	Ekološka
13	Stolno bijelo	Bijelo	Hrvatsko primorje	Nadin	SPE	Ekološka
14	Zweigelt	Crno	Zapadna kontinentalna Hrvatska	Sv. Ivan Zelina	SPE	Ekološka
15	Traminac	Bijelo	Zapadna kontinentalna Hrvatska	Sv. Ivan Zelina	SPE	Ekološka
16	Plavina	Crno	Hrvatsko primorje	Pirovac-Skradin	SPE	Konvencionalna
17	Plavac Mali	Crno	Hrvatsko primorje	Vis	SPE	Konvencionalna
18	Plavac Mali	Crno	Hrvatsko primorje	Baštica-Zadar	SPE	Konvencionalna
19	Merlot	Crno	Hrvatsko primorje	Vrgorac	SPE	Konvencionalna

PRILOG XIV. Nastavak.

Kodna oznaka vina	Sorta	Vino	Regija	Lokacija	Metoda analize pesticida	Proizvodnja
20	Babić	Crno	Hrvatsko primorje	Kruševo-Primošten	SPE	Konvencionalna
21	Babić	Crno	Hrvatsko primorje	Pirovac-Skradin	SPE	Konvencionalna
22	Plavina-Lasina (rosé)	Bijelo (rosé)	Hrvatsko primorje	Pirovac-Skradin	SPE	Konvencionalna
23	Tr. Toscano	Bijelo	Hrvatsko primorje	Benkovac-Stankovci	SPE	Konvencionalna
24	Zweigelt	Crno	Istočna kontinentalna Hrvatska	Feričanci	SPE	Konvencionalna
25	Traminac	Bijelo	Zapadna kontinentalna Hrvatska	Sv. Ivan Zelina	SPE	Konvencionalna
26	Syrah	Crno	X	X	SPE	Konvencionalna
27	Merlot	Crno	X	X	SPE	Konvencionalna
28	C. Sauvignon	Crno	X	X	SPE	Konvencionalna
29	X	Bijelo	Hrvatsko primorje	Istra	SPE	Konvencionalna
30	X	Bijelo	Hrvatsko primorje	Istra	SPE	Konvencionalna
31	X	Crno	Hrvatsko primorje	Istra	SPE	Konvencionalna
32	Plavac Mali	Crno	Hrvatsko primorje	Pelješac	SPE	Konvencionalna
33	X	Crno	X	X	SPE	Konvencionalna
34	Plavac	Crno	X	X	SPE	Konvencionalna
35	X	Crno	X	X	SPE	Konvencionalna
36	Plavac	Crno	Hrvatsko primorje	Vis	SPE	Konvencionalna
37	Plavac	Crno	Hrvatsko primorje	Vis	SPE	Konvencionalna
38	Plavac	Crno	Hrvatsko primorje	Vis	SPE	Konvencionalna
39	Plavac Mali	Crno	Hrvatsko primorje	Pelješac	SPE	Konvencionalna

PRILOG XIV. Nastavak.

Kodna oznaka vina	Sorta	Vino	Regija	Lokacija	Metoda analize pesticida	Proizvodnja
40	Plavac	Crno	X	X	SPE	Konvencionalna
41*	Plavac	Crno	Hrvatsko primorje	Vis	SPE	Konvencionalna
42*	Plavac	Crno	X	X	SPE	Konvencionalna
45	Frankovka	Crno	Zapadna kontinentalna Hrvatska	Sveta Jana-Plešivica	QuEChERS	Konvencionalna
46	Frankovka	Crno	Istočna kontinentalna Hrvatska	Virovitica	QuEChERS	Konvencionalna
47	Frankovka	Crno	Istočna kontinentalna Hrvatska	Feričanci	QuEChERS	Konvencionalna
48	Frankovka	Crno	Zapadna kontinentalna Hrvatska	Moslavina	QuEChERS	Konvencionalna
49	Frankovka	Crno	Istočna kontinentalna Hrvatska	Feričanci	QuEChERS	Konvencionalna
50	Frankovka	Crno	Istočna kontinentalna Hrvatska	Feričanci	QuEChERS	Konvencionalna
51	Frankovka	Crno	Istočna kontinentalna Hrvatska	Feričanci	QuEChERS	Konvencionalna
52	Frankovka	Crno	Istočna kontinentalna Hrvatska	Feričanci	QuEChERS	Konvencionalna
53	Zweigelt	Crno	Istočna kontinentalna Hrvatska	Feričanci	QuEChERS	Konvencionalna
54	Zweigelt	Crno	Zapadna kontinentalna Hrvatska	Ozalj-Vivodina	QuEChERS	Konvencionalna
55	Plavac Mali	Crno	Hrvatsko primorje	Korčula	QuEChERS	Konvencionalna

PRILOG XIV. Nastavak.

Kodna oznaka vina	Sorta	Vino	Regija	Lokacija	Metoda analize pesticida	Proizvodnja
56	Pinot noir	Crno	Istočna kontinentalna Hrvatska	Kutjevo	QuEChERS	Konvencionalna
57	Merlot	Crno	X	X	QuEChERS	Konvencionalna
58	Kupaža	Crno	X	X	QuEChERS	Konvencionalna
59	Portugizac	Crno	Zapadna kontinentalna Hrvatska	Ozalj-Vivodina	QuEChERS	Konvencionalna
60	Portugizac	Crno	Istočna kontinentalna Hrvatska	Kutjevo	QuEChERS	Konvencionalna
61	Portugizac	Crno	Istočna kontinentalna Hrvatska	Kutjevo	QuEChERS	Konvencionalna
62	Syrah	Crno	Istočna kontinentalna Hrvatska	Kutjevo	QuEChERS	Konvencionalna
63	Syrah	Crno	Istočna kontinentalna Hrvatska	Feričanci	QuEChERS	Konvencionalna
64	C. Sauvignon	Crno	Istočna kontinentalna Hrvatska	Feričanci	QuEChERS	Konvencionalna
65	Plavina	Crno	Hrvatsko primorje	Komarna-Klek	QuEChERS	Konvencionalna

* – za vina kodnih oznaka 41 i 42 analiza nije provedena zbog poteškoća u radu s instrumentom.
X – nepoznato

PRILOG XV. Izmjerene masene koncentracije (μg L^{-1}) pesticida u uzorcima vina.

Kodna oznaka	1	2	3	6	7	8	10	11	12

vina / Pesticid									
alfa-cipermetrin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
azoksistrobin	-	0,33±0,05	-	-	-	-	-	-	-
benalaksil	0,1±0,1	0,1±0,1	0,1±0,1	0,04±0,1	0,1±0,1	-	0,02±0,1	-	0,02±0,1
boskalid	-	-	-	-	-	-	-	-	-
deltametrin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
fludioksonil	-	-	-	-	-	-	-	-	-
flukinkonazol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
fluopikolid	0,05±0,02	0,3±0,1	0,09±0,04	-	0,07±0,03	-	-	-	-
flusilazol	0,07±0,04	0,15±0,05	0,06±0,04	-	0,03±0,04	-	0,05±0,04	-	0,04±0,04
iprodion	-	0,2±0,06	-	-	-	-	-	-	-
kaptan	-	-	-	-	-	-	-	-	-
klortalonil	-	-	-	-	-	-	-	-	-
krezoksim-metil	0,06±0,05	0,11±0,05	0,02±0,05	-	0,04±0,05	0,02±0,05	0,03±0,05	0,01±0,05	-
lambda-cihalotrin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
metalaksil	-	-	-	6±3	-	-	-	-	-
miklobutanil	-	0,9±0,2	-	-	-	-	-	-	-
piraklostrobin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pirimetanil	-	-	3,53±0,07	5,29±0,07	-	-	-	1,1±0,07	-
propikonazol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
spirodiklofen	0,04±0,009	0,3±0,1	0,1±0,03	0,02±0,002	0,15±0,05	0,03±0,005	0,06±0,02	0,03±0,005	0,05±0,01
spiroksamin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
tebukonazol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
tiametoksam	-	-	-	-	-	-	-	-	-
trifloksistrobin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
zoksamid	-	0,06±0,05	-	-	-	-	-	-	-

PRILOG XV. Nastavak.

Kodna oznaka	**14**	**16**	**17**	**18**	**19**	**20**	**21**	**24**	**26**

vina / Pesticid									
alfa-cipermetrin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
azoksistrobin	-	0,1±0,02	-	-	0,17±0,01	1,7±0,4	1,4±0,3	-	-
benalaksil	-	0,1±0,1	0,1±0,1	-	-	-	0±0,1	0,3±0,1	0,1±0,1
boskalid	-	-	-	1,2±0,1	2,2±0,3	-	0,62±0,04	9±2	-
deltametrin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
fludioksonil	-	0,4±0,8	-	0,5±0,8	-	-	-	1,4±0,6	-
flukinkonazol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
fluopikolid	-	0,06±0,03	-	-	0,4±0,1	-	-	0,06±0,03	-
flusilazol	0,03±0,04	-	-	-	-	-	-	-	-
iprodion	-	-	-	-	0,19±0,06	-	1,3±0,3	-	-
kaptan	-	-	-	-	-	-	-	-	-
klortalonil	-	-	-	-	-	-	-	-	-
krezoksim-metil	-	-	-	-	-	-	-	-	-
lambda-cihalotrin	-	1±2	1±2	1±2	1±2	-	-	-	1±2
metalaksil	-	-	-	8±3	-	-	-	7±3	-
miklobutanil	-	-	-	-	-	-	-	-	-
piraklostrobin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pirimetanil	-	11,5±0,07	13,2±0,07	7,43±0,07	5,73±0,07	69,53±0,07	4,76±0,07	11,31±0,07	2,35±0,07
propikonazol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
spirodiklofen	0,02±0,002	-	-	-	-	0,07±0,02	0,09±0,03	0,04±0,009	0,05±0,01
spiroksamin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
tebukonazol	-	16±2	-	-	-	-	-	11±1	-
tiametoksam	-	-	-	-	-	-	-	-	-
trifloksistrobin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
zoksamid	-	-	-	-	-	-	-	-	-

PRILOG XV. Nastavak.

Kodna oznaka	**27**	**28**	**31**	**32**	**33**	**34**	**35**	**36**	**37**

vina / Pesticid									
alfa-cipermetrin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
azoksistrobin	-	-	-	2,2±0,5	-	0,21±0,02	0,3±0,04	-	-
benalaksil	0±0,1	-	-	-	-	-	-	-	0,3±0,1
boskalid	-	-	-	-	-	-	-	-	-
deltametrin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
fludioksonil	-	-	1,3±0,6	-	-	-	-	-	-
flukinkonazol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
fluopikolid	-	-	-	-	-	-	-	-	-
flusilazol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
iprodion	-	-	-	0,6±0,1	-	-	-	-	-
kaptan	-	-	-	-	-	-	-	-	-
klortalonil	-	-	-	-	-	-	-	-	-
krezoksim-metil	0,18±0,05	-	-	-	-	-	-	-	-
lambda-cihalotrin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
metalaksil	-	-	-	6±3	-	-	-	-	-
miklobutanil	-	-	-	0,4±0,1	-	-	-	-	-
piraklostrobin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pirimetanil	2,76±0,07	3,8±0,07	-	-	6,41±0,07	-	6,7±0,07	20,38±0,07	13,2±0,07
propikonazol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
spirodiklofen	0,09±0,03	0,04±0,009	0,02±0,002	-	-	0,04±0,009	0,02±0,002	-	0,15±0,05
spiroksamin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
tebukonazol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
tiametoksam	-	-	-	-	-	-	-	-	-
trifloksistrobin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
zoksamid	-	-	-	-	-	-	-	-	-

PRILOG XV. Nastavak.

Kodna oznaka	**38**	**39**	**40**	**41***	**42***	**45**	**46**	**47**	**48**

vina / Pesticid									
alfa-cipermetrin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
azoksistrobin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
benalaksil	0,1±0,1	-	-	-	-	-	2±1	20±20	2±1
boskalid	-	0,82±0,07	-	-	-	-	-	-	-
deltametrin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
fludioksonil	-	-	-	-	-	-	-	-	-
flukinkonazol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
fluopikolid	-	-	-	-	-	-	-	-	-
flusilazol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
iprodion	-	-	-	-	-	-	-	-	-
kaptan	-	-	-	-	-	-	-	-	-
klortalonil	-	-	-	-	-	-	-	-	-
krezoksim-metil	-	-	-	-	-	-	-	-	-
lambda-cihalotrin	-	-	-	-	-	6±2	7±2	6±2	6±2
metalaksil	-	-	-	-	-	27±8	24±8	13±8	16±8
miklobutanil	-	-	-	-	-	-	-	-	-
piraklostrobin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pirimetanil	15±0,07	-	1,9±0,07	-	-	60±20	17±5	17±5	60±20
propikonazol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
spirodiklofen	-	-	-	-	-	-	-	-	-
spiroksamin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
tebukonazol	-	-	-	-	-	-	-	80±30	-
tiametoksam	-	-	-	-	-	-	-	-	-
trifloksistrobin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
zoksamid	-	-	-	-	-	-	-	-	-

PRILOG XV. Nastavak.

Kodna oznaka	**49**	**50**	**51**	**52**	**53**	**54**	**55**	**56**	**57**

vina / Pesticid									
alfa-cipermetrin	10±2	-	6±2	6±2	-	22±2	6±2	6±2	-
azoksistrobin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
benalaksil	1,5±1	2±2	2±1	1,4±0,9	0,4±0,04	0,6±0,2	0,9±0,5	1,2±0,7	-
boskalid	-	-	-	-	-	-	-	-	-
deltametrin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
fludioksonil	-	-	-	-	-	-	-	-	-
flukinkonazol	-	-	-	7±2	-	-	-	-	-
fluopikolid	-	-	-	-	-	-	-	-	-
flusilazol	-	-	-	9±3	-	-	-	-	-
iprodion	-	-	-	-	-	-	-	-	-
kaptan	-	-	-	-	-	-	-	-	-
klortalonil	-	-	-	-	-	-	-	-	-
krezoksim-metil	-	-	-	-	-	-	-	-	-
lambda-cihalotrin	6±2	6±2	6±2	6±2	7±2	16±2	-	-	-
metalaksil	17±8	17±8	18±8	16±8	19±8	19±8	14±8	29±8	-
miklobutanil	-	-	-	20±5	-	-	-	-	-
piraklostrobin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pirimetanil	22±6	22±6	20±6	17±5	10±3	-	-	-	-
propikonazol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
spirodiklofen	-	-	-	-	-	-	-	-	-
spiroksamin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
tebukonazol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
tiametoksam	-	-	-	-	-	-	-	-	-
trifloksistrobin	-	-	-	6±2	-	11±3	6±2	6±2	-
zoksamid	-	-	-	-	-	-	-	-	-

PRILOG XV. Nastavak.

Kodna oznaka	**58**	**59**	**60**	**61**	**62**	**63**	**64**	**65**	**4**

vina / Pesticid									
alfa-cipermetrin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
azoksistrobin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
benalaksil	4±3	-	-	-	0,3±0,1	0,3±0,1	0,3±0,1	-	-
boskalid	-	-	70±20	-	-	-	-	-	-
deltametrin	-	-	60±20	-	-	-	-	-	-
fludioksonil	-	-	-	-	-	-	-	-	-
flukinkonazol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
fluopikolid	-	-	5±2	-	-	-	-	-	-
flusilazol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
iprodion	-	-	3±1	-	-	-	-	-	-
kaptan	-	-	60±20	-	-	-	-	-	-
klortalonil	-	-	10±10	-	10±10	-	-	10±10	-
krezoksim-metil	-	-	6±3	-	6±3	6±3	-	6±3	0,2±0,4
lambda-cihalotrin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
metalaksil	22±8	-	12±8	-	13±8	-	12±8	13±8	3,4±0,8
miklobutanil	-	-	-	-	-	-	-	-	-
piraklostrobin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pirimetanil	17±5	-	7±3	-	8±3	7±3	7±3	7±3	-
propikonazol	8±2	-	7±2	-	-	-	-	-	-
spirodiklofen	-	-	60±20	-	60±20	70±20	70±20	70±20	-
spiroksamin	50±10	-	50±10	-	50±10	-	-	-	-
tebukonazol	-	-	80±30	-	-	-	-	-	-
tiametoksam	-	-	110±30	-	-	-	-	-	-
trifloksistrobin	-	-	-	-	5±2	-	-	-	-
zoksamid	-	-	170±20	-	-	-	-	-	-

PRILOG XV. Nastavak.

Kodna oznaka vina	**5**	**9**	**13**	**15**	**22**	**23**	**25**	**29**	**30**

Pesticid									
alfa-cipermetrin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
azoksistrobin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
benalaksil	-	-	-	0,11±0,05	-	0,03±0,01	0,7±0,3	-	-
boskalid	-	0,13±0,08	-	0,2±0,1	-	1,3±0,7	-	1,1±0,6	0,16±0,1
deltametrin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
fludioksonil	-	-	-	-	-	-	-	-	-
flukinkonazol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
fluopikolid	-	-	-	-	-	15,6±0,4	-	-	-
flusilazol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
iprodion	-	-	-	-	-	-	-	-	-
kaptan	-	-	-	-	-	-	-	-	-
klortalonil	-	-	-	-	-	-	-	-	-
krezoksim-metil	-	-	-	-	-	-	-	-	-
lambda-cihalotrin	-	-	-	-	-	-	0,8±0,1	-	-
metalaksil	-	-	-	2,6±0,7	-	-	12±3	-	3,4±0,8
miklobutanil	-	-	-	-	-	-	-	-	-
piraklostrobin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pirimetanil	-	-	-	-	-	22±6	-	-	-
propikonazol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
spirodiklofen	-	-	-	-	-	-	-	-	-
spiroksamin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
tebukonazol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
tiametoksam	-	-	-	-	-	-	-	-	-
trifloksistrobin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
zoksamid	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* – analiza nije provedena zbog poteškoća pri radu s instrumentom.

PRILOG XVI. Maksimalno dopušteni maseni udjeli (MDK) odabranih pesticida u grožđu.

Pesticid	**MDK / mg kg^{-1}**
alfa – cipermetrin	2
azoksistrobin	2
benalaksil	0,5
boskalid	0,3
deltametrin	0,2
fludioksonil	4
flukinkonazol	0,5
fluopikolid	2
flusilazol	0,2
iprodion	10
kaptan	3
klortalonil	5
krezoksim – metil	1
lambda – cihalotrin	0,2
metalaksil	1
miklobutanil	1
piraklostrobin	2
pirimetanil	5
propikonazol	0,3
spirodiklofen	0,2
spiroksamin	1
tebukonazol	2
tiametoksam	0,5
trifloksistrobin	5
zoksamid	5

§ 9. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 16.5.1983. godine u Zagrebu gdje sam u okviru srednjoškolskog obrazovanja istovremeno završila dvije srednje škole (VII gimnazija i baletna škola). Godine 2002. upisala sam Prirodoslovno – matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Diplomu inženjera kemije stekla sam 5.11.2008. s obranom diplomskog rada pod naslovom „Utjecaj duljine lanca poli(alilaminhidroklorida) na kompleksiranje s natrijevim poli(stirensulfonatom)“ pod vodstvom prof.dr.sc. Davora Kovačevića. Od 1.1.2009. zaposlena sam u Zavodu za zaštitu bilja u poljoprivredi i šumarstvu Republike Hrvatske, koji 1.7.2009. postaje dio Hrvatskog centra za poljoprivredu, hranu i selo, u laboratoriju za kontrolu sredstava za zaštitu bilja na mjestu stručnog suradnika analitičara. Sveučilišni poslijediplomski doktorski studij kemije na Prirodoslovno – matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisala sam u akademskoj godini 2009./2010.

U okviru zaposlenja radim na područjima registracije sredstava za zaštitu bilja i njihove postregistracijske kontrole, te 2014. godine postajem rukovoditelj laboratorija za kontrolu sredstava za zaštitu bilja.

Tijekom rada usavršavala sam se u području kemije pesticida, ali i nacionalne i europske legislative vezane uz sredstva za zaštitu bilja, te analitičkih postupaka koji uključuju njihovo određivanje (posebno plinske i tekućinske kromatografije te spektrometrije masa). U periodu od 2009. do 2011. dodatno sam se usavršavala u područjima registracije sredstava za zaštitu bilja i njihove postregistracijske kontrole u Chemical Regulation Directorate, York, UK i The Food and Environment Research Agency, York, UK. Godine 2010. sudjelovala sam na međunarodnoj školi kromatografije (ISC) u Berlinu, Njemačka. Godine 2014. sudjelovala sam kao hrvatski delegat na radionici Europske Komisije "Assessment of Persistent, Bioaccumulative and Toxic (PBT) substances in EU Legislations", Bruxelles, Belgija. Aktivna sam u područjima validacije analitičkih metoda i akreditacije laboratorija. Certificirana sam za ustrojstvo laboratorija prema normi HRN EN ISO/IEC 17025, te sam interni auditor za sustave upravljanja kvalitetom prema normi HRN EN ISO 9001.

Znanstveno područje interesa su kemija pesticida, fizikalno – kemijska svojstva pesticida, s naglaskom na interakcije pesticida s tvarima prisutnim u biljnim vrstama kao što su polifenolni spojevi, utjecaj pesticida na metabolizam biljnih vrsti, utjecaj pesticida na okoliš,

te njihove interakcije od kojih valja izdvojiti adsorpciju u tlu i bioakumulaciju, kinetiku razgradnje pesticida, reakcije pesticida u atmosferi (reakcije oksidacije, redukcije, hidrolize i fotodegradacije), biorazgradnju, procjenu, procjena rizika pesticida za ljudsko zdravlje i okoliš, razvoj analitičkih metoda za određivanje pesticida s naglaskom na multirezidualne metode, utjecaj matrice uzorka na određivanje pesticida, plinska kromatografija i spektrometrija masa, tekućinska kromatografija te razvoj postupaka ekstrakcije pesticida iz uzoraka.

Koautor sam dva znanstvena rada u časopima indeksiranim u Thomson Reutersovim bazama podataka *Web of Science* i *Current Contents*, te 6 kongresnih priopćenja. Godine 2015. godine na *8th Symposium With Food to Health* dobila sam nagradu za najbolji poster.

Znanstveni radovi u časopisima:

1. **M. Pelajić**, G. Peček, D. Mutavdžić Pavlović, D. Vitali Čepo. Novel multiresidue method for determination of pesticides in red wine using gas chromatography-mass spectrometry and solid phase extraction, *Food Chem.* **200** (2016) 98–106.
2. J. Požar, J. Salopek, **M. Poldrugač**, D. Kovačević. The effect of cation type, ionic strength and temperature on the complexation between polyallylammonium cation and polystyrenesulfonate anion, *Colloids Surf., A* (2016). (prihvaćen, članak, znanstveni). doi.10.1016/j.colsurfa.2016.01.039.

Priopćenja na znanstvenim skupovima:

1. **Maja Pelajić**, Dubravka Vitali Čepo, Dragana Mutavdžić Pavlović. Interaction of phenols and polyphenols with pesticides – impact on wine quality. // *8th Symposium With Food to Health, Knjiga sažetaka*. Tuzla, BIH. 2015. 33-33.
2. **Maja Pelajić**, Dubravka Vitali Čepo. Pesticides in Croatian wines// *8th Symposium With Food to Health, Knjiga sažetaka*. Tuzla, BIH. 2015. 34-34 – **nagrada za najbolji poster.**
3. **Maja Pelajić**, Dubravka Vitali Čepo. Multiresidue analysis of 25 pesticide residues in wines: comparative study of SPE and QuEChERS methods // *21th International Symposium on Separation Sciences, Knjiga sažetaka*. Ljubljana, Slovenija. 2015. 93-93.
4. **Maja Pelajić**, Dubravka Vitali Čepo. Optimizacija ekstrakcije u čvrstoj fazi pri

određivanju ostataka pesticida u crnim vinima // *XXIV Hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera, Knjiga sažetaka*. Zagreb, Hrvatska. 2015. 112-112.

5. **Maja Pelajić**, Dubravka Vitali Čepo. Utjecaj matrice uzorka na određivanje ostataka pesticida u uzorcima vina plinskom kromatografijom – spektrometrijom masa // *XXIV Hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera, Knjiga sažetaka*. Zagreb, Hrvatska. 2015. 113-113.
6. **Maja Poldrugač**, Josip Požar, Davor Kovačević. Utjecaj duljine lanca poli(alilamin hidroklorida) na kompleksiranje s natrijevim poli(stirensulfonatom) // *XXI Hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera, Knjiga sažetaka*. Trogir, Hrvatska. 2009. 164-164.