



**УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ**



**Департман за Фитомедицину и заштиту
животне средине**

Милош Француски

дипл. инж. пољопривреде

**ПРИМЕНА ТАНДЕМ МАСЕНЕ СПЕКТРОМЕТРИЈЕ У ОДРЕЂИВАЊУ
ОСТАКА ПЕСТИЦИДА У БУБРЕЖНОМ ТКИВУ ЗЕЦА**

МАСТЕР РАД

Нови Сад, 2021.



**УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ**



**Департман за Фитомедицину и заштиту
животне средине**

Кандидат

дипл.инж. Милош Француски

Ментор

др Војислава Бурсић, ванр. проф.

**ПРИМЕНА ТАНДЕМ МАСЕНЕ СПЕКТРОМЕТРИЈЕ У ОДРЕЂИВАЊУ
ОСТАКА ПЕСТИЦИДА У БУБРЕЖНОМ ТКИВУ ЗЕЦА**

Мастер рад

Нови Сад, 2021.

КОМИСИЈА ЗА ОДБРАНУ И ОЦЕНУ МАСТЕР РАДА:

др Војислава Бурсић, ванредни професор

Ужа научна област: Фитофармација

Пољопривредни факултет, Нови Сад

-Ментор-

др Александра Петровић, ванредни професор

Ужа научна област: Зоологија

Пољопривредни факултет, Нови Сад

-Председник-

др Дејан Беуковић, доцент

Ужа научна област: Исхрана животиња

Пољопривредни факултет, Београд

-Члан-

Захваљујем се проф. др Војислави Бурсић и др Горици Вуковић на несебичној помоћи и саветима. Својој породици и пријатељима одајем признање за сву љубав и подршку током школовања.

САДРЖАЈ

1. УВОД.....	1
2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ.....	4
2.1. ЕВРОПСКИ ЗЕЦ (<i>Lepus europaeus</i> Pallas, 1778)	4
2.2. ПЕСТИЦИДИ.....	5
3. ЗАДАТАК И ЦИЉ РАДА	7
4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД РАДА.....	8
4.1. ФОРМИРАЊЕ УЗОРКА	8
4.2. ПРАВЉЕЊЕ СТОК И РАДНИХ РАСТВОРА	11
4.2.1. Припрема сток раствора.....	11
4.3. ВАЛИДАЦИОНИ ПАРАМЕТРИ.....	11
4.3.1. Принос екстракције	11
4.3.2. Линеарност одзива детектора.....	12
4.3.3. Лимит детекције (LOD) и лимит квантификације (LOQ).....	12
4.3.4. Екстракција пестицида из бубрежног ткива зеца.....	12
4.3.5. Услови LC-MS/MS хроматографског раздвајања	14
5. РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА СА ДИСКУСИЈОМ.....	15
5.1. ВАЛИДАЦИОНИ ПАРАМЕТРИ.....	17
5.1.1. Принос екстракције	17
5.1.2. Линеарност одзива детектора.....	19
5.1.3. Лимит детекције (LOD) и лимит квантификације (LOQ).....	21
5.2. РЕЗУЛТАТИ АНАЛИЗЕ.....	21
6. ЗАКЉУЧАК.....	28
7. ЛИТЕРАТУРА.....	30

РЕЗИМЕ

Литературни извори указују на присуство остатака пестицида у масном ткиву европског зеца (*Lepus europaeus*) на територији Републике Србије, међутим, истраживања која су се бавила детекцијом остатака пестицида у другим ткивима зеца има изузетно мало. Из тог разлога, задатак овог истраживања је био одређивање остатака пестицида у бубрежном ткиву зеца. Анализирано је 13 узорака са локалитета Јарковац и Бачки Брестовац на присуство 16 пестицида LC-MS/MS методом. Од 100% анализираних узорака 69,03% није садржавало остатке пестицида, док је 23,07% имало детекције пестицида испод прописаних МДК вредности. У првом узорку су детектовани: цимоксанил (изнад прописане вредности МДК), никосулфурон, спироksamин и тиаметоксам.

Кључне речи: *Lepus europaeus*, LC-MS/MS, пестициди, цимоксанил, МДК

SUMMARY

The literature sources are indicating the presence of the pesticides in the fat tissue of the Brown hare (*Lepus europaeus*) on the territory of the Republic of Serbia. However, the studies dealing with the pesticides detection in other brown hare tissues are exceptionally low in number. Because of that, the goal of this research was to determine the pesticides residues in the renal tissues of the brown hare. The analysis comprised of 13 samples, analyzed on the localities Jarkovac and Bački Brestovac, in order to analyse the presence of the 16 pesticides by the LC-MS/MS. Out of the 100% of the tested samples, 69.03% did not contain the pesticides residues, while 23.07% had the pesticide detections below the established MRLs values. In the first sample: cymoxanil (above the established MRL value), nicosulfuron, spiroxamine and thiamethoxam were detected.

Keywords: *Lepus europaeus*, LC-MS/MS, pesticides, cymoxanil, MAC

1. УВОД

Употреба пестицида је, током последњих двадесет година, порасла на 3,5 милијарди килограма активних супстанци по години, што на глобалном нивоу представља вредност од 45 милијарди долара (Choudhary et al., 2018). Примена средстава за заштиту биља има значајан здравствени аспект услед сузбијања преносилаца бројних заразних болести (Костић и Вујовић, 2021). Међутим, иако помажу пољопривредним произвођачима да буду конкурентни на тржишту кроз смањење трошкова и ризика производње, пестициди могу да контаминирају земљиште, воду и вегетацију, услед чега долази до негативног утицаја, како на животну средину, тако и на здравље људи и животиња (Choudhary et al., 2018).

Naies је давне 1991. године, изнео чињеницу да ће се пројектоване потребе домаћинства за храном до 2020. године, односно потражња за прехранбеним житарицама, вероватно удвостручити, као и да ће потребе за поврћем постати 2,5 пута веће, односно 5 пута веће у случају воћа, што ће за последицу имати повећање употребе пестицида најмање два до три пута. Са данашње тачке гледишта, интензивна употреба средстава за заштиту биља је довела до присуства ових хемикалија у свим медијумима нашег окружења (загађење воде и земљишта, као и детектовање остатака пестицида у дивљим животињама). Извори контаминација су уско повезани са антропогеним загађењем, као што су: испуштања из домаћинства и индустрије, пољопривредне хемијске примене и ерозија тла услед крчења шума (Bhattacharya et al., 2003). У Републици Србији се у промету налази: 18,32% инсектицидних, 31,94% хербицидних, 34,55% фунгицидних, 6,28% акарицидних активних материја, 4,71% регулатора раста, док 4,19% чине заједно: лимациди, нематоциди, родентициди и фумиганти (Колектив аутора, 2020). Велики део пестицида који се примењују на усевима подлеже микробиолошкој или хемијској разградњи, или се пак акумулира у биљкама. Значајан део примењеног пестицида завршава у животној средини (заношењем током третирања, испирањем и отицањем у земљиште, површинске и подземне воде...). Поред примарне улоге у борби против инсеката или нежељене вегетације, пестициди могу да буду токсични за мноштво других организама, укључујући: птице, дивљач, рибе и корисне инсекте. Њихово присуство у животној средини доводи до нарушавања биодиверзитета. Многи

пестициди су перзистентни, те годинама остају у земљишту, док испирањем доспевају у површинске и подземне воде, чиме загађују животну средину. Пестициди контаминирају сва станишта животиња, тако да се рутинским анализама детектују у акватичним и копненим животињама (Law, 2014). Тровање животиња пестицидима често се повезује са људском немарношћу и грешкама попут: неправилног дозирања, употребе неадекватних и нерегистрованих пестицидних једињења, употребе третираног семена као хране, или неправилне апликације средстава за заштиту биља (UNEP, 2020). Главни извор присуства пестицида у дивљим животињама је исхрана третираним усевима (Ushewokunze, 1991). Зец (*Lepus europaeus* Pallas, 1778) је једна од најраспрострањенијих и најловљенијих дивљачи у Европи (Edwards et al., 2000), при чему се уједно налази на дну ланца исхране и представља плен многим карниворним врстама. С обзиром на то да зец не припада врстама које мигрирају, може да се сматра природним биоиндикатором диверзитета у датом биотопу. Популација зеца је у сталном опадању, што је условљено многим биотичким и абиотичким факторима. На бројност популација ове животиње утиче интензивирани пољопривредна производња током последњих деценија, као и фрагментираност станишта. Абиотички фактори, као што су нагле климатске промене у виду суше, екстремних захлађења, поплава, и др., имају значајно место у нарушавању бројности популације *L. europaeus*. Од давнина су, уместо употребе пестицида, најефикасније методе у сузбијању корова и штеточина биле окопавање, шпартање и друге механичке операције, док је у данашње време на првом месту употреба хемијских средстава. Имајући у виду да је зец у агробиотопу оријентисан ка исхрани како коровским, тако и гајеним биљкама, може се сматрати и врстом биомонитора са аспекта контаминације и присуства резидуа пестицида у ланцу исхране. Како би се испитале релације пестицида и бројности популације ове дивљачи, потребно је да се проблематици приступи другачије. Под тиме се подразумева другачији вид истраживања који би дао одговор на утицај латентног присуства пестицида и последице њиховог синергијског деловања на основу присуства пестицида у ланцу исхране, као и присуства резидуа активних материја у таргет ткивима животиња. Резидуе пестицида које се налазе у земљишту, ваздуху и површинским и подземним водама, имају способност нагомилавања у масном ткиву људи и животиња, при чему могу да изазову фаталне последице. Неке од нежељених последица нагомилавања

пестицида у ткиву зеца и других животиња подразумевају присуство остатака пестицидних активних материја у ткивима и неким органима, што доводи до: повишеног морталитета, смањене отпорности према болестима, скраћивања животног циклуса, смањене плодности, или измене у понашању (Шовљански и Лазић, 2007). Током 90-их година прошлог века, у Војводини је забележено обољење зеца познато као „синдром европског зеца“, које је имало значајан утицај на бројност популација (Симић, 2018). Многи литературни наводи указују на то да латентно присуство пестицида може за последицу да има смањење бројности популације европског зеца.

Немају сви пестициди штетан утицај на дивље животиње, нити остаци пестицида нужно доводе до озбиљних последица по дивљач. Потенцијални утицај се процењује на основу: присуства пестицида или њихових метаболита, токсиколошког својства пестицида, као и еколошке карактеристике изложености. Услед сложености процене, у тумачење резултата морају да се укључе различите научне дисциплине. Степен директног утицаја пестицида на дивље животиње се одређује осетљивошћу врсте на хемикалију и степеном изложености врсте (Whitford, 2016).

У циљу утврђивања нежељених последица примене пестицида на популацију зеца, изводе се истраживања у виду одређивања њихових остатака у бубрежном ткиву. Литературни наводи указују на присуству остатака пестицида у адипозном ткиву зеца у Србији (Мезеи и сар., 2018; Беуковић и сар., 2018), али су истраживања у вези са остацима пестицида у другим ткивима ове једике малобројна.

Крајњи циљ овог истраживања подразумева утврђивање учесталости, интензитета и нивоа присуства пестицида у бубрежном ткиву зеца. На основу добијених резултата постоји могућност да се ближе утврди у којој мери интензивна употреба средстава за заштиту биља може да утиче на популацију зеца на испитиваним локалитатима, па самим тим и у Војводини. Такође, резултати овог истраживања треба да покажу у којој мери поларни пестициди који нису липосолубилни и не задржавају се у масном ткиву зеца, имају способност нагомилавања и задржавања у бубрегу као поларном матриксу.

2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

2.1.ЕВРОПСКИ ЗЕЦ (*Lepus europaeus* Pallas, 1778)

Европски зец припада двозупцима, или паглодарима (ред Lagomorpha), фамилији зечева *Leporidae*, роду зечева *Lepus* (Слика 1). У питању је економски најраспрострањенија и најзначајнија врста дивљачи у Србији и Европи. Зечеви могу да доживе старост од 10 до 15 година у идеалним животним условима, међутим, у пракси само 3% зечева преживљава старосну границу од 4 године (Беуковић и сар., 2011). Највећа густина насељености ове врсте је у низијским пределима. Најбројније популације зеца су у пољопривредним реонима, односно на пољопривредним парцелама са различитим културама, које се смењују са шумарцима, ливадама и грмовима (Шелмић и Гачић, 2011). Зец се храни искључиво биљном храном попут: траве, коровских биљака, разних ратарских и повртарских култура, пупољака младог грмља, коре младог дрвећа и зрнастих хранива. Преко сочних биљака обезбеђује довољну количину воде, тако да воду готово и не пије (Беуковић и Поповић, 2014).



Слика 1. *Lepus europaeus* Pallas, 1778

Драстичним повећањем површина под ратарским културама, на којима је интензивна употреба пестицида, са истовременим смањењем површина под крмним биљем, смањена је могућност квалитетне исхране за зеца, а уједно су измењена типична станишта у којима зец обитава (Беуковић и Маринковић, 2011).

2.2. ПЕСТИЦИДИ

Пестициди су токсичне супстанце које се користе са намером да сузбију циљни организам. Коришћење пестицида подразумева примену активних материја пестицида које „елиминишу“: нежељене коровске врсте (хербициди), фитопатогене гљиве (фунгициди), глодаре (родентициди), инсекте (инсектициди) и др. Идеалан пестицид мора да буде леталан за циљни организам, али безопасан по друге, нециљане организме. Позитивно дејство употребе пестицида подразумева сузбијање нежељених микроорганизама, корова, инсеката и глодара који могу значајно да умање принос гајених усева.

Уз позитивне добробити примене пестицида, у смислу заштите усева од болести и штеточина, што у завршници доноси добар род пољопривредних култура, постоји и штетан утицај пестицида на околину (Berny, 2007). Пестициди су, нажалост, контаминирали сваки део нашег окружења. Резидуе се налазе у земљишту, подземним водама и рекама, где елиминишу и корисне микроорганизме који имају значајну улогу у разградњи органске материје. Не треба заборавити и негативно деловање преко затроване хране и воде (зелене хране, семена корова и других биљака, инсеката, итд.) (Беуковић и Поповић, 2014). Да ли ће се одређени симптоми тровања развити и у ком степену, зависиће од: количине апсорбованог отрова, затим врсте и старости животиње, њеног општег здравственог стања, индивидуалних варијација, као и других потенцирајућих и предиспонирајућих фактора (Andrews and Humphreys, 1982).

Као јака токсична средства, пестициди могу да делују на дивљач директно и индиректно. Директан утицај пестицида на дивље животиње укључује: акутно тровање, имунотоксичност, поремећај ендокриног система и система за репродукцију, измењену морфологију и стопе раста, те промене у понашању. Дивљач може да буде изложена

токсичној дози пестицида: гутањем (орално), удисањем (инхалација), или путем коже (дермално) (Baker and Bauer, 2018). Присуство остатака пестицида који су довели до тровања птица, дивљачи и водоземцима (Mineau and Palmer, 2013) је, нажалост, више пута доказано. Индиректни утицај пестицида на дивље животиње подразумева: смањење ресурса хране и склоништа, изгладњивање услед смањене доступности плена, хипотермију и секундарно тровање. Смањење хране (биљно обиље и разноликост) доводи до умањене доступности станишта, односно уточишта за дивље животиње (Pimentel, 2005). Наиме, услед новонастале ситуације, ситни сисари имају смањену могућност преживљавања променом исхране, а смањује им се и могућност скривања у растињу. Такође је потврђена корелација смањења разноврсности и присуства вегетацијског покривача са специјским диверзитетом ситних сисара (Baker and Bauer, 2018).

Дивљач је у целој овој причи „коллатерална штета“, јер о утицају на дивљач нема посебних студија, док се брига о њиховој заштити своди на декларативне реченице „отровно за дивљач, рибе и водоземце, не прскати близу водотокова“ (Топић, 2013).

3. ЗАДАТАК И ЦИЉ РАДА

Литературни извори указују на присуство остатака пестицида у масном ткиву зеца на територији Републике Србије (Бурсић и сар., 2017; Беуковић и сар., 2017; Мезеи и сар., 2018; Беуковић и сар., 2018), међутим, истраживања која су се бавила детекцијом остатака пестицида у другим ткивима зеца има изузетно мало.

Задатак рада подразумева одређивање остатака пестицида у бубрежном ткиву зеца применом тандем масене спектрометрије.

Циљ рада је да се, након извршене валидације мултирезидуалне методе одређивања остатака пестицида у бубрежном ткиву зеца, односно методе течне хроматографије са тандем масеном спектрометријом (LC-MS/MS), у складу са документом SANTE/12682/2019, изврши провера здравствене безбедности испитиваних узорака упоређивањем детектованих вредности остатака пестицида са важећим МДК вредностима пестицида, прописаним Националним правилником (Сл. Гласник РС, 22/18) и регулативом ЕУ 396/2005.

Добијени резултати ће такође омогућити процену утицаја пољопривреде на здравствени статус *Lepus europaeus* Pall. у оквиру локалитета обухваћених истраживањем који представљају атрактивна војвођанска ловишта.

4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД РАДА

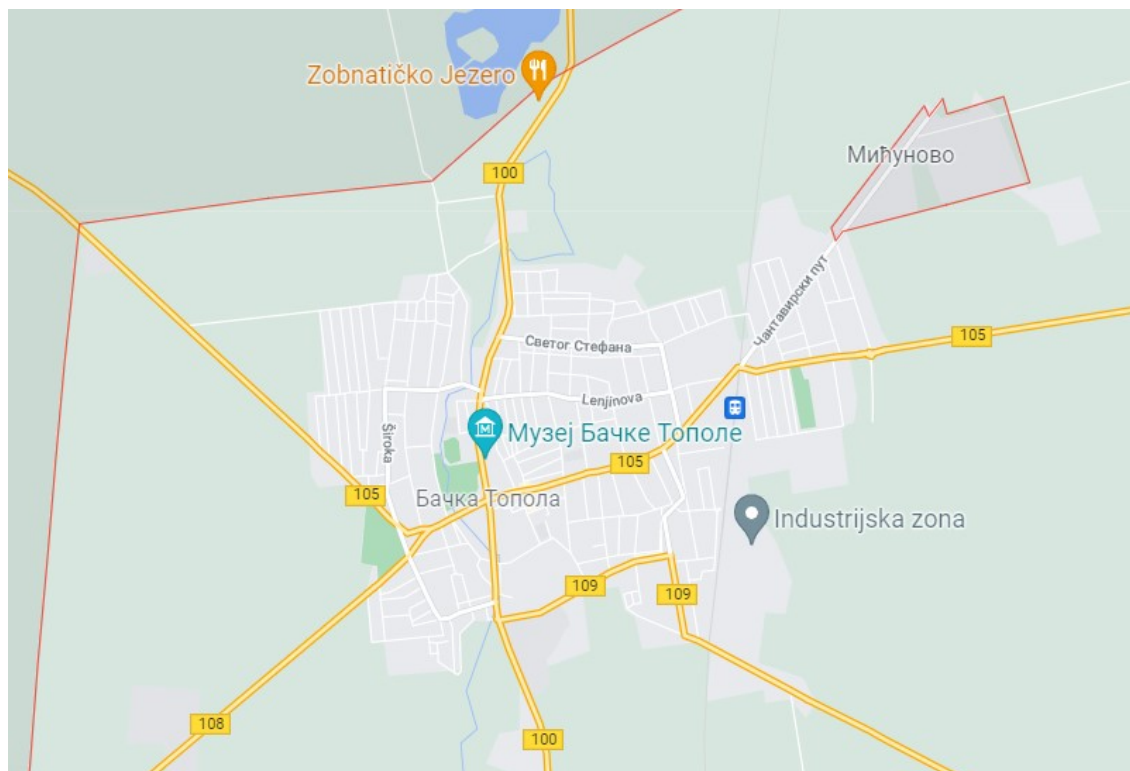
Хомогенизовање узорака је урађено на Департману за сточарство Пољопривредног факултета у Новом Саду, у Лабораторији за анализу сточне хране и анималних производа.

Обележени узорци су екстраховани на Департману за фитомедицину и заштиту животне средине Пољопривредног факултета у Новом Саду, у Лабораторији за биолошка испитивања и пестициде.

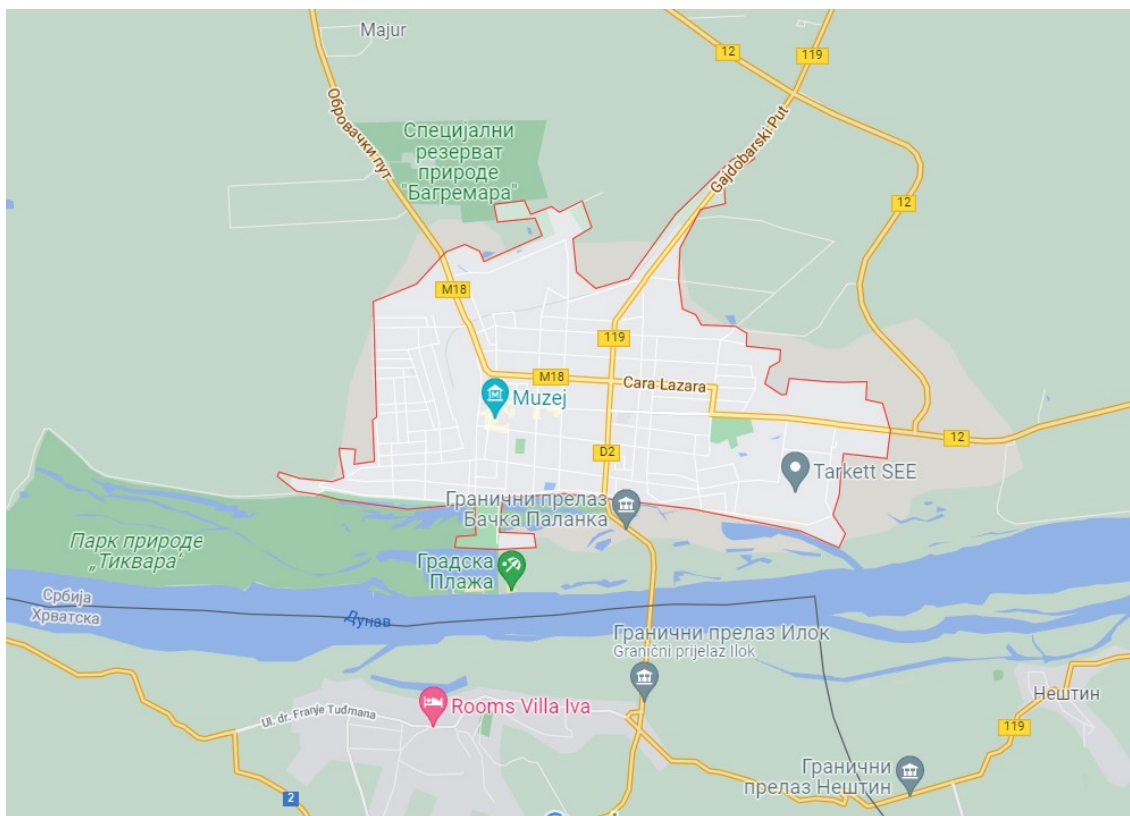
Хроматографско снимање екстраката је извршено у Заводу за јавно здравље Београд.

4.1. ФОРМИРАЊЕ УЗОРКА

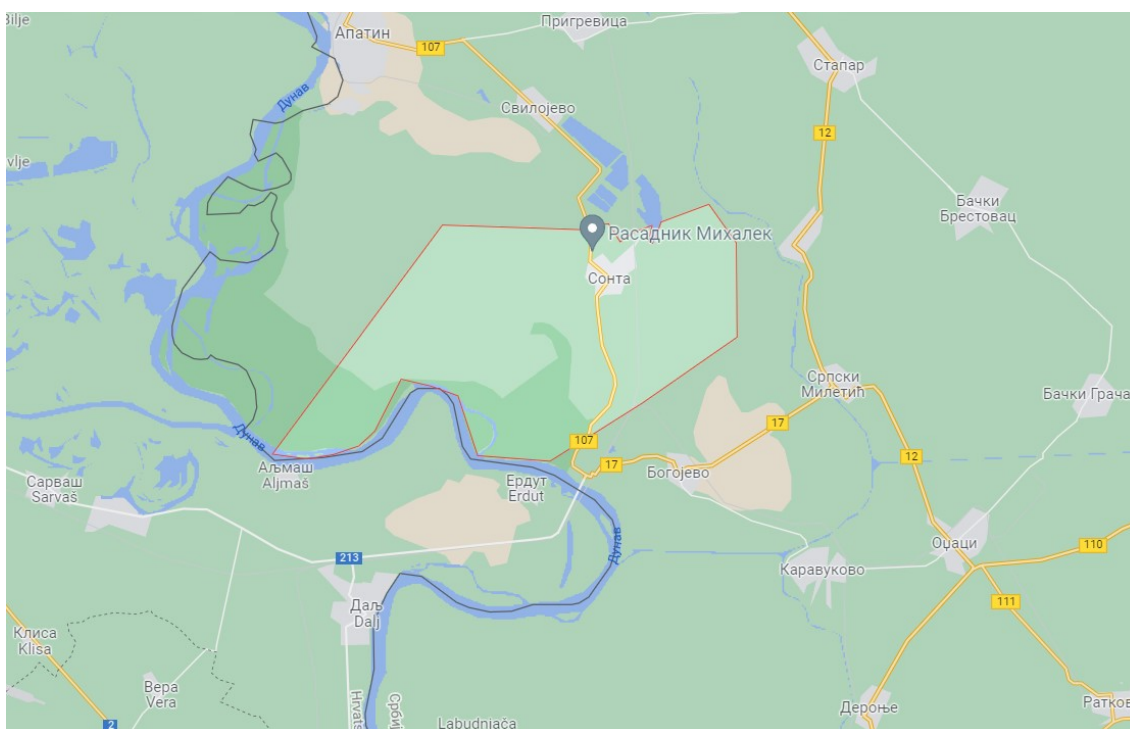
Узорци су прикупљени са локалитета: Бачка Топола (Слика 2), Бачка Паланка (Слика 3), Сонта (Слика 4) и Вогањ (Слика 5) – са сваког локалитета је прикупљено по 10 узорака.



Слика 2. Локалитет Бачка Топола (Извор: [google.com/maps/](https://www.google.com/maps/))



Слика 3. Локалитет Бачка Паланка (Извор: google.com/maps/)



Слика 4. Локалитет Сонта (Извор: google.com/maps/)



Слика 5. Локалитет Вогањ (Извор: google.com/maps/)

Обележавање узорака бубрежног ткива зеца обухваћених истраживањем је приказано у Табели 1.

Табела 1. Обележавање узорака бубрежног ткива зеца обухваћених истраживањем

Узорак	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Ознака	БП1	БП2	БП3	БП4	БП5	БП6	БП7	БП8	БП9	БП10
Узорак	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Ознака	БТ1	БТ2	БТ3	БТ4	БТ5	БТ6	БТ7	БТ8	БТ9	БТ10
Узорак	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Ознака	СТ1	СТ2	СТ3	СТ4	СТ5	СТ6	СТ7	СТ8	СТ9	СТ10
Узорак	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Ознака	ВЊ1	ВЊ2	ВЊ3	ВЊ4	ВЊ5	ВЊ6	ВЊ7	ВЊ8	ВЊ9	ВЊ10

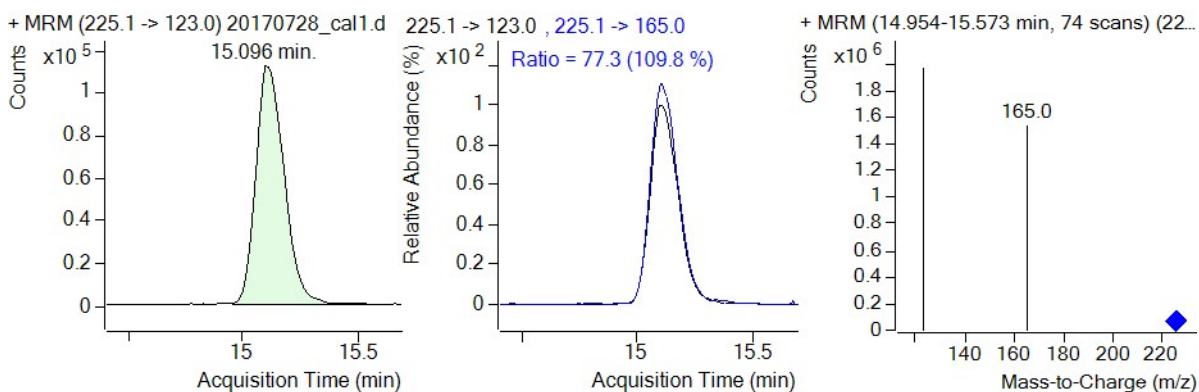
4.2. ПРАВЉЕЊЕ СТОК И РАДНИХ РАСТВОРА

4.2.1. ПРИПРЕМА СТОК РАСТВОРА

Аналитички стандарди свих педесет испитиваних пестицида су производи Dr. Ehrenstorfer-a. Сток и радни раствори су припремани растварањем пестицида у ацетонитрилу (HPLC чистоће, J. T. Baker).

Радни раствор мешавине пестицида масене концентрације 10 µg/mL добијен је мешањем одговарајућих запремина сток раствора.

Као интерни стандард (ИС) приликом валидације коришћен је карбофуран-ДЗ (97,0% чистоће, Dr. Ehrenstorfer) масене концентрације 10 µg/mL. На слици 6 су приказани MRM прелази карбофурана-ДЗ.



Слика 6. MRM прелази карбофурана-ДЗ

4.3. ВАЛИДАЦИОНИ ПАРАМЕТРИ

4.3.1. Принос екстракције

Принос екстракције је проверен за нивое обогаћења од 0,05; 0,01 и 0,2 mg/kg. У 10 g контролног узорка додаје се 100 µL интерног стандарда и 200 (100, 50) µL радног раствора масене концентрације 10 µg/mL, како би коначна концентрација обухваћених анализата (азоксистробин, боскалид, епоксиконазол, зоксамид, изопротурон, имидаклоприд, индоксакарб, карбендазим, карбоксим, карбофуран, квиноксифен, клотианидин, крезокси-метил, линурон, луфенурон, металаксил, метамитрон, метидатион, метконазол, метоксифенозид, никосулфурон, оксадиксил, пенцикурон, пиметрозин, пиракlostробин, пиримикарб, пиримифос-метил, пирипроксифен,

пропиконазол, спироksamин, тебуконазол, тебуфенпирад, тефлутрин, тиаклоприд, тиаметоксам, тиодикарб, тиофанат-метил, трифлуксистробин, трифлуралин, феноксикарб, фенпропатрин, флуороксибир-мептил, флусилазол, флутриафол, фоксим, хексаконазол, хлорпирифос, цимоксанил, ципродинил, ципроконазол) у обогаћеном узорку износила 0,2 (0,1; 0,05) $\mu\text{g/mL}$.

4.3.2. Линеарност одзива детектора

У циљу испитивања линеарности метода, било је неопходно да се провери одговор масеног спектрометра за калибрационе смеше пестицида у концентрационом опсегу од 0,01 до 0,5 $\mu\text{g/mL}$, што одговара концентрацији пестицида у узорку од 0,01 до 0,5 mg/kg . Провера линеарности одзива детектора за испитиване пестициде је спроведена употребом пет нивоа масених концентрација.

Како би се испитао утицај матрикса, који је карактеристичан за ову хроматографску технику, извршена је калибрација пестицида у растварачу и у матриксу узорка, односно у екстракту бубрежног ткива зеца. За калибрацију у матриксу припремљен је узорак, за који је претходно утврђено да не садржи остатке пестицида, на начин приказан Схемом 1. Супернатант је упарен и растворен у 500 μL калибрационих стандарда који су припремљени у мобилној фази.

4.3.3. Лимит детекције (LOD) и лимит квантификације (LOQ)

Лимит детекције (LOD) представља најнижу концентрацију неког анализата која може квантитативно да се одреди. LOD се одређује на основу односа сигнала и шума, при чему тај однос представља концентрацију анализата која даје сигнал око три пута већи од шума. Вредности за LOD су израчунате математичким путем.

Лимит квантификације (LOQ) је најмања вредност анализата у узорку која може квантитативно да се одреди. Одређивање LOQ се врши на основу односа између сигнала узорка и познате концентрације анализата, који треба да буде десет пута већи него шум бланк узорка.

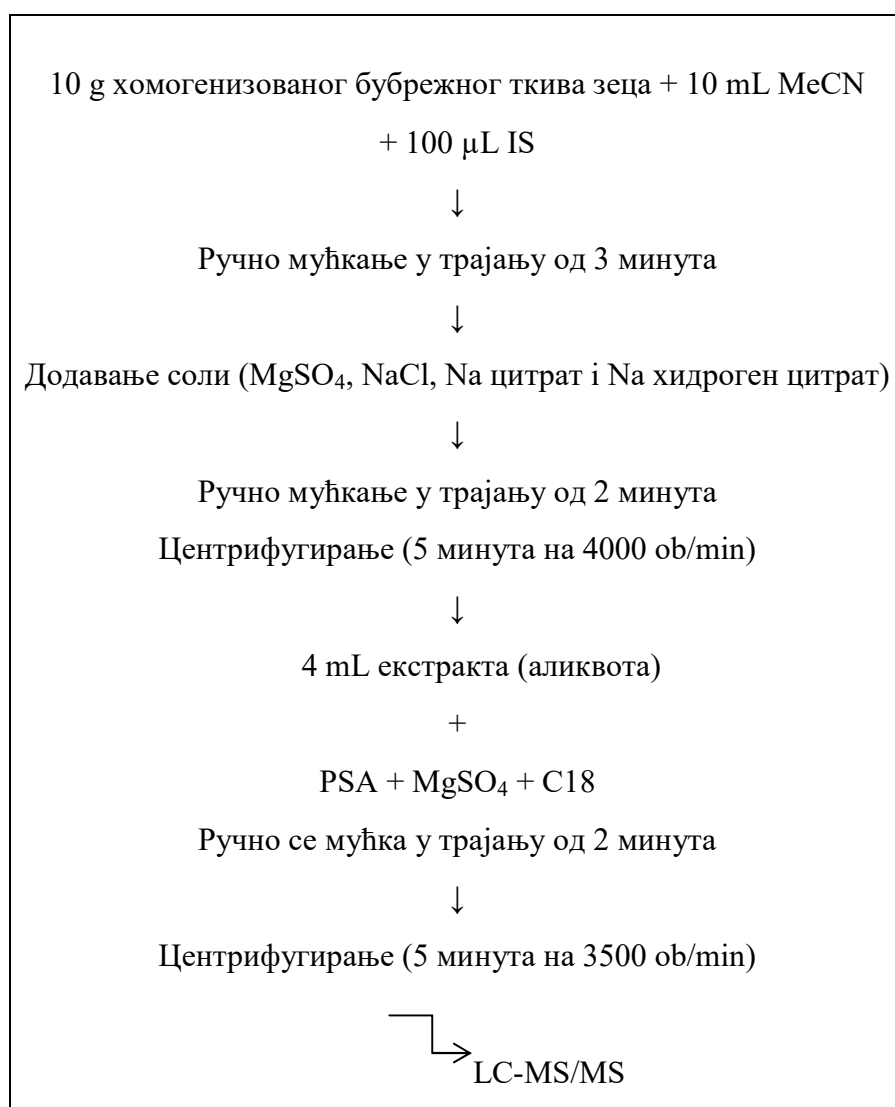
4.3.4. Екстракција пестицида из бубрежног ткива зеца

QuEChERS (Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe) представља скраћеницу за: брзу, једноставну, јефтину, ефикасну, робусну и безбедну методу екстракције, која је

развијена у циљу одређивања остатака пестицида у пољопривредним производима. Ова метода је постала званична АОАС метода број 2007.01 и BSEN 15662:2008 за одређивање остатака пестицида у храни, како гасном (GC), тако и течном (LC) хроматографијом (Бурсић и сар., 2012).

У раду је коришћена QuEChERS техника екстракције и пречишћавања при дефинисању валидационих параметара одређивања обухваћених анализата у бубрежном ткиву зеца. Поступак је описан Схемом 1.

Схема 1. QuEChERS екстракција



4.3.5. Услови LC-MS/MS хроматографског раздвајања

Инструмент	Agilent 6410B QQQ
Колона	XBridge C18, 150x3,0mm, 3.5 μ m, Waters
Јонски извор/Тип јонизације	Multimod, MMI, +ESI
Drying gas flow/Drying gas temp.	5 ml/min/325°C
Vaporizer temp./Nebulizer gas	220°C/48psi
Опсег мерења маса	m/z 70-2000
Напон капиларе	2000 V
Аутосамплер	h-ALS-SL+, Model G1367D
Запремина инјектовања узорака	V _{inj} =10 μ L
Тип инјектовања/Бинарна пумпа	Са испирањем/BinPump-SL, Model G1312B
Однос мобилних фаза: V/V	50/50
Проток	0.5 mL/min
Мобилна фаза	A: 0.1% HCOOH у MeOH; B: 0.1% HCOOH у води
Однос мобилне фазе	A:B=70:30
Градијент	0 min-90% B; 2 min-90% B; 15 min-10% B 20 min-2% B; 23 min-2% B; 25 min-90% B
Термостат температура колоне	Column-SL, Model G1316B, 40°C

5. РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА СА ДИСКУСИЈОМ

Након одабира активних супстанци за које је претпостављено да могу да се детектују у бубрежном ткиву зеца, постављени су аквизициони параметри масеног спектрометра. SRM прелази фрагментационе енергије и колизионе енергије су преузети из базе података Pesticides_TriggeredMRM_B0600 (Agilent Technologies, 2012). По постављању реакције за праћење јона и енергије фрагментације и колизије погодне за анализирани пестициде, приступило се испитивању хроматографских услова за одабране анализе. Када су одређена времена задржавања на колони (ретенционо време, t_R), за сваки аналит је постављена метода која у одређеним временским интервалима прати јоне који потичу само од једног анализе, тзв. Метода у динамичком моду (dMRM) (Табела 2).

Табела 2. SRM прелази, фрагментационе (Frag.) и колизионе (CE) енергије и ретенциона времена пестицида (Rt)

Пестицид	MRM прелази (m/z)		Продукт јон (m/z)	Frag. (V)	CE (V)	Rt (min)
Азоксистробин	404,1	→	372,1	100	9	13,17
	404,1	→	344,1	100	25	
Боскалид	304,3	→	147,1	120	30	15,17
	304,3	→	130,1	100	28	
Епоксиконазол	330,1	→	121,0	130	21	17,34
	330,1	→	101,0	130	50	
Зоксамид	336,0	→	187,0	125	16	5,45
	336,0	→	159,0	125	36	
Изопротурон	207,0	→	72,0	135	17	15,58
	207,0	→	165,0	135	17	
Имидаклоприд	256,0	→	208,7	100	15	10,30
	256,0	→	174,6	100	20	
Индоксакарб	528,1	→	203,0	120	36	18,12
	528,1	→	150,0	120	16	
Карбендазим	192,1	→	160,1	104	18	8,05
	192,1	→	132,0	104	34	
Карбоксим	236,0	→	143,0	120	20	14,66
	236,0	→	87,0	120	20	
Карбофуран	222,1	→	165,1	90	20	14,00
Квиноксифен	308,0	→	272,0	135	30	19,60
	308,0	→	197,0	135	32	
Клотианидин	250,0	→	169,1	90	10	10,50
	250,0	→	132,1	90	15	
Крезокси-метил	331,0	→	268,0	80	10	17,27
	331,0	→	81,0	80	25	
Линурон	249,0	→	160,0	70	18	16,69

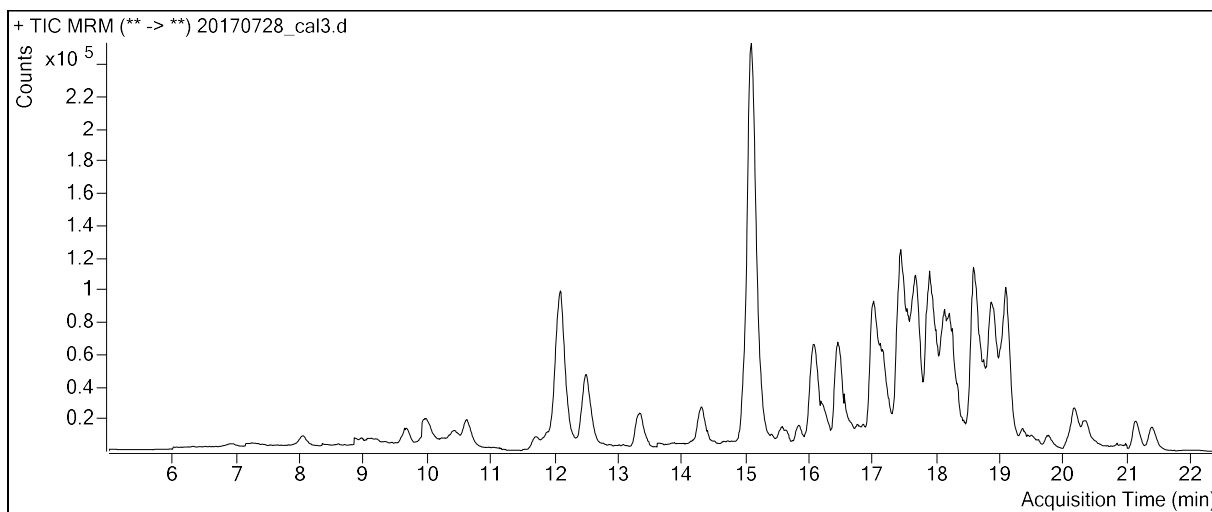
	249,0	→	182,1	70	18	
Луфенурон	228,2	→	60,2	130	23	17,96
	228,2	→	57,1	130	23	
Металаксил	280,2	→	220,1	90	9	15,47
	280,2	→	192,1	90	13	
Метамитрон	203,1	→	175,0	115	14	11,13
	203,1	→	104,0	115	22	
Метидатион	304,0	→	144,2	80	5	16,30
	304,0	→	85,3	80	15	
Метконазол	320,0	→	125,0	100	20	18,13
	320,0	→	70,0	100	20	
Метоксифенозид	369,2	→	149,1	100	12	16,65
	369,2	→	133,0	90	15	
Никосулфурон	411,1	→	182,1	100	32	14,16
	411,1	→	213,0	100	32	
Оксадиксил	279,1	→	219,1	80	10	13,07
	279,1	→	133,3	80	15	
Пенцикурон	329,1	→	125,1	120	38	18,20
	329,1	→	99,1	130	35	
Пиметрозин	218,1	→	104,9	100	20	4,30
	218,1	→	78,9	100	48	
Пираклостробин	388,1	→	194,0	100	10	17,98
	388,1	→	163,0	100	10	
Пиримикарб	239,2	→	182,1	120	15	14,90
	239,2	→	72,0	120	20	
Пиримифос-метил	306,2	→	164,2	150	20	18,08
	306,2	→	108,2	150	20	
Пирипроксифен	322,1	→	227,1	120	10	19,46
	322,1	→	185,1	120	10	
Пропиконазол	342,1	→	159,0	100	20	17,92
Спироксамин	298,3	→	144,1	130	20	15,26
	298,3	→	100,1	130	35	
Тебуконазол	308,1	→	70,0	100	25	18,01
	308,1	→	125,0	100	25	
Тебуфенпирад	334,2	→	145,1	175	24	18,92
	334,2	→	117,0	175	32	
Тефлутрин	419,1	→	193,0	80	20	18,77
	419,1	→	419,0	80	15	
Тиаклоприд	253,0	→	186,0	100	10	12,00
	253,0	→	126,0	100	20	
Тиаметоксам	292,0	→	211,0	120	15	9,13
	292,0	→	181,0	120	20	
Тиодикарб	355,1	→	88,0	80	10	14,85
Тиофанат-метил	343,1	→	151,0	80	15	14,11
	343,1	→	93,0	80	20	
Трифлуксистробин	409,1	→	206,1	120	10	18,30
	409,1	→	186,1	120	15	
Трифлуралин	336,1	→	252,0	100	15	20,25
	336,1	→	248,1	100	20	
Феноксикарб	302,1	→	116,1	100	5	17,45
	302,1	→	88,0	100	20	
Фенпропатрин	350,2	→	125,1	135	24	7,51
	350,2	→	55,2	135	34	
Флуроксипир-	367,1	→	209,0	80	11	19,97

метил	367,1	→	255,0	80	32	
Флусилазол	316,1	→	247,1	110	12	17,30
	316,1	→	165,0	110	20	
Флутриафол	302,1	→	123,0	110	25	15,18
Фоксим	299,1	→	129,0	80	10	17,95
	299,1	→	77,0	80	35	
Хексаконазол	314,1	→	159,0	100	20	18,07
	314,1	→	70,1	130	17	
Хлорпирифос	349,9	→	197,9	80	10	3,9
	349,9	→	97,0	80	15	
Цимоксанил	388,1	→	301,1	120	30	16,56
	388,1	→	165,0	120	20	
Ципродинил	226,1	→	108,0	120	30	17,40
	226,1	→	93,0	120	40	
Ципроконазол	292,1	→	125,0	120	29	17,00
	292,1	→	70,1	120	17	

5.1.ВАЛИДАЦИОНИ ПАРАМЕТРИ

5.1.1. Принос екстракције

Обогаћивањем контролног узорка испитиваним концентрацијама у случају постављања приноса екстракције, приказан је на слици 7.



Слика 7. Спајкован узорак бубрежног ткива зеца

Добијене вредности приноса екстракције су се кретале у интервалу од 47,25 до 103,21% за испитиване пестициде са RSD од 0,8 до 12,1% (Табела 3). Добијене вредности су у складу са SANTE/11813/2017 документом.

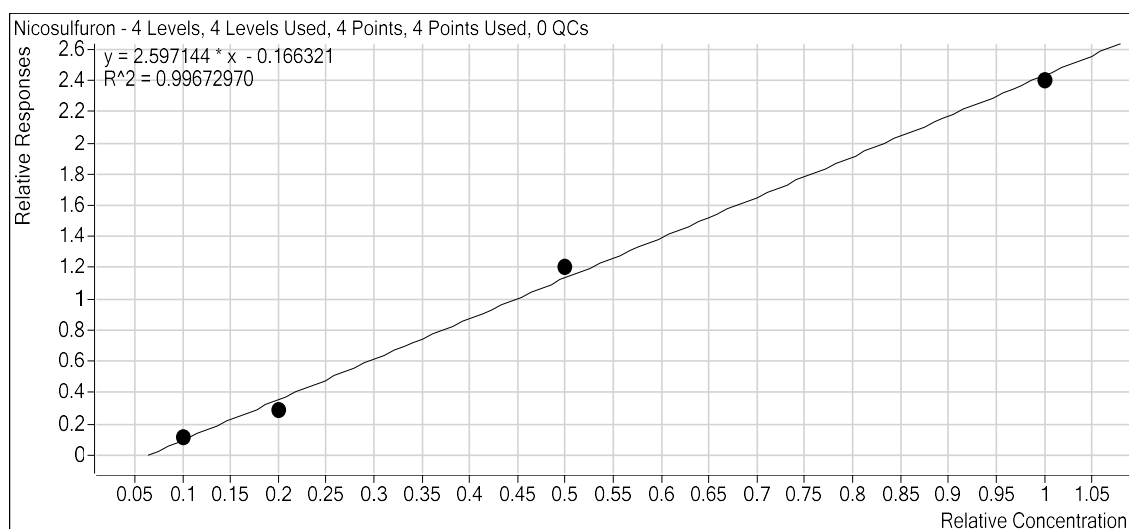
Табела 3. Вредности коефицијената корелације (R^2) и приноса екстракције са релативном стандардном девијацијом (RSD) испитиваних пестицида

Пестицид	R^2	Принос екстракције \pm RSD (%)
Азоксистробин	0,9984	98,33 \pm 10,3
Боскалид	0,9947	75,35 \pm 5,8
Епоксиконазол	0,9965	93,05 \pm 2,4
Зоксамид	0,9953	91,28 \pm 1,7
Изопротурон	0,9950	102,33 \pm 12,1
Имидаклоприд	0,9988	95,99 \pm 4,3
Индоксакарб	0,9990	73,55 \pm 2,9
Карбендазим	0,9995	98,8 \pm 8,9
Карбоксим	0,9987	102,73 \pm 7,3
Карбофуран	0,9989	86,24 \pm 3,1
Квиноксифен	0,9764	77,76 \pm 4,3
Клотианидин	0,9994	103,21 \pm 2,2
Крезокси-метил	0,9990	48,12 \pm 9,7
Линурон	0,9943	67,00 \pm 3,8
Луфенурон	0,9987	70,12 \pm 3,5
Металаксил	0,9971	97,98 \pm 4,6
Метамитрон	0,9649	62,04 \pm 4,2
Метидатион	0,9982	66,74 \pm 7,9
Метконазол	0,9973	77,32 \pm 2,8
Метоксифенозид	0,9977	94,26 \pm 2,7
Никосулфурон	0,9790	93,57 \pm 6,7
Оксадиксил	0,9902	102,31 \pm 2,3
Пенцикурон	0,9986	48,12 \pm 3,1
Пиметрозин	0,9927	102,05 \pm 9,1
Пиракlostробин	0,9961	53,01 \pm 2,9
Пиримикарб	0,9961	96,07 \pm 4,3
Пиримифос-метил	0,9918	86,72 \pm 4,3
Пирипроксифен	0,9996	59,16 \pm 9,0
Пропиконазол	0,9951	85,15 \pm 4,3
Спироксамин	0,9981	47,25 \pm 6,5
Тебуконазол	0,9941	101,67 \pm 2,7
Тебуфенпирад	0,9957	49,16 \pm 7,2
Тефлутрин	0,9811	78,91 \pm 5,4
Тиаклоприд	0,9754	73,72 \pm 5,5
Тиаметоксам	0,9923	64,02 \pm 5,7
Тиодикарб	0,9918	97,02 \pm 1,0
Тиофанат-метил	0,9918	97,02 \pm 1,0
Трифлостробин	0,9885	103,02 \pm 5,9
Трифлуралин	0,9980	72,14 \pm 3,6
Феноксикарб	0,9987	82,64 \pm 5,9
Фенпропатрин	0,9576	59,6 \pm 3,4
Флуроксипир-мептил	0,9976	90,00 \pm 8,8

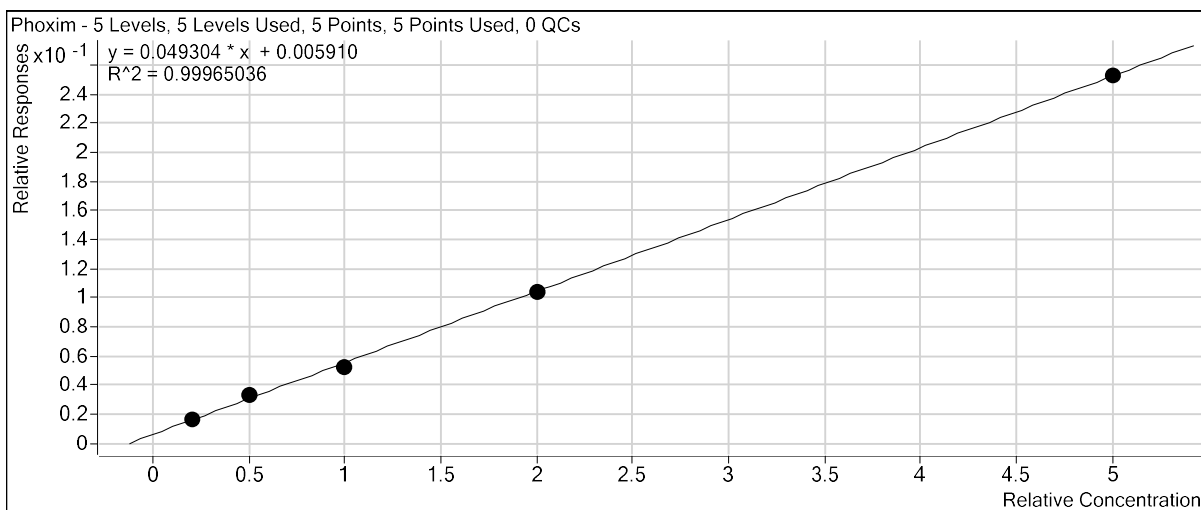
Флусилазол	0,9998	92,25±2,9
Флутриафол	0,9992	83,19±3,1
Фоксим	0,9997	74,27±3,2
Хексаконазол	0,9966	73,03±5,5
Хлорпирифос	0,9989	55,43±8,9
Цимоксанил	0,9995	93,48±4,1
Ципродинил	0,9916	73,78±0,8
Ципроконазол	0,9978	81,01±1,3

5.1.2. Линеарност одзива детектора

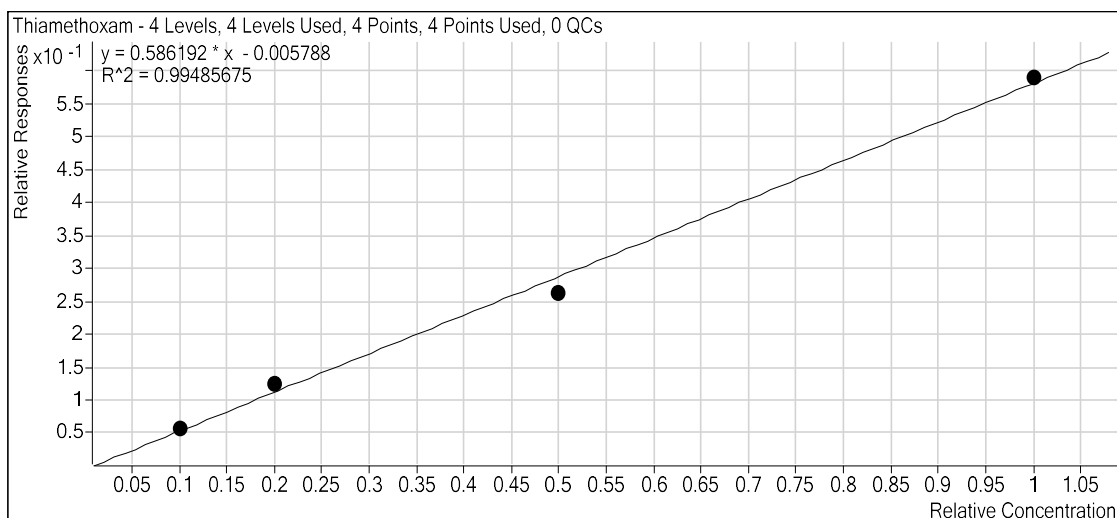
Провера линеарности одзива детектора за испитиване пестициде (Слике 8-11) извршена је употребом пет нивоа масених концентрација у опсегу од 0,01 до 0,5 µg/mL.



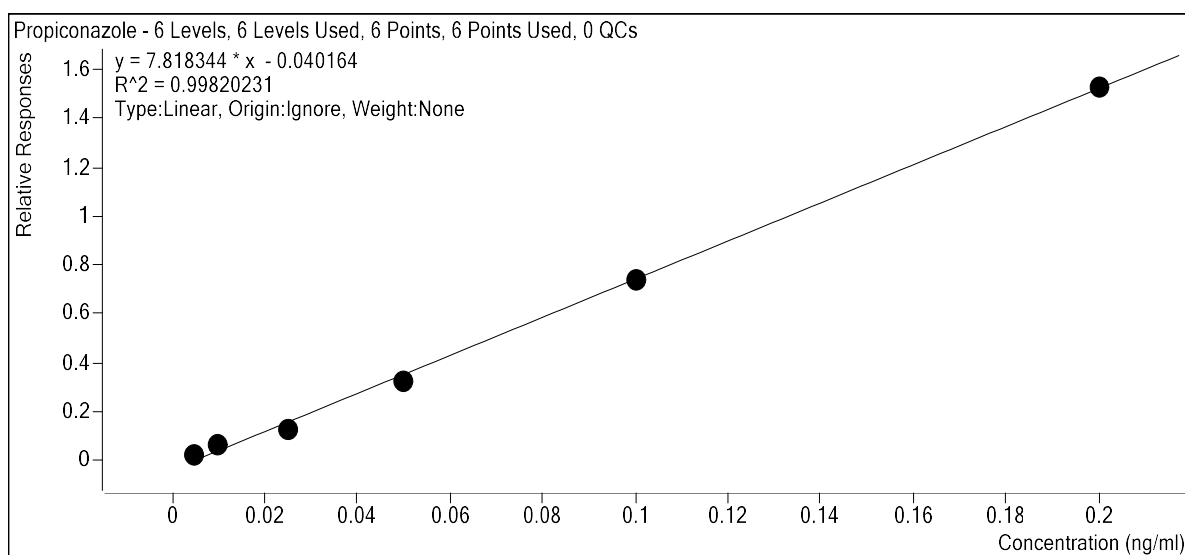
Слика 8. Калибрациона крива никосулфурана



Слика 9. Калибрациона крива фоксима



Слика 10. Калибрациона крива тиаметоксама



Слика 11. Калибрациона крива пропиконазола

Калибрационе криве анализираних анализа карактеришу коефицијенти корелације са вредностима прописаним у складу са SANTE/11813/2017 документом ($R^2 > 0,99$).

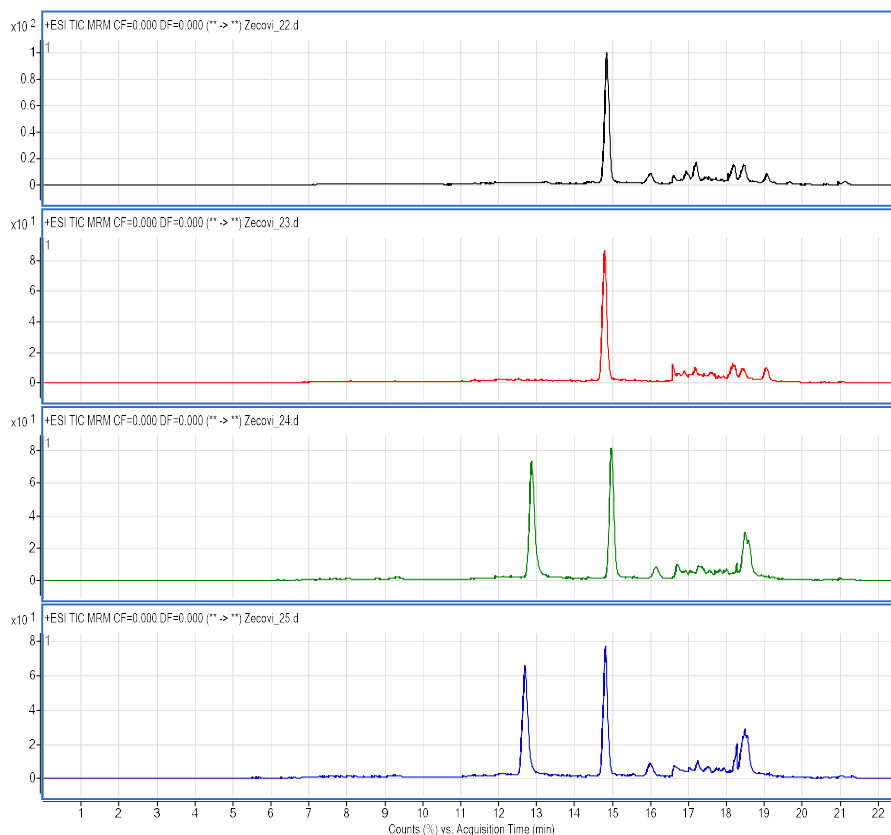
Утицај матрикса је за поједине пестициде био изнад 15%, тако да је за квантификацију детектованих пестицида у бубрежном ткиву зеца коришћена калибрација у матриксу како би се анулирао, односно умањио утицај матрикса на крајњи резултат анализе остатака пестицида.

5.1.3. Лимит детекције (LOD) и лимит квантификације (LOQ)

LOQ је постављен у складу са прописаним МДК вредностима и то на ниво од 0,05 mg/kg. LOD је математичким путем израчунат преко софтвера LC-MS/MS (MassHunter Workstation software B.06.00, Agilent Technologies 2010).

5.2. РЕЗУЛТАТИ АНАЛИЗЕ

Хроматографско снимање узорка употребом течне хроматографије са тандем масеном спектрометријом (LC-MS/MS) је препоручено од стране Европске уније, пошто се LC-MS/MS сматра поузданом, осетљивом и селективном методом за одређивање остатака пестицида и пестицида у траговима (SANTE/11813/2018).



Слика 12. ТИС хроматограми узорка бубрежног ткива зеца 9-12

LC-MS/MS хроматографско раздвајање екстракта анализираних узорака бубрежног ткива зеца је дало ТИС (Total anion chromatogram) хроматограме, који су приказани на слици 12.

У Табели 4 су приказани резултати испитивања остатака 50 пестицида у 40 узорака, узоркованих на различитим локалитетима (Бачка Паланка, Бачка Топола, Сонта и Вогањ).

Табела 4. Детектоване вредности пестицида (mg/kg)

	Број узорка (10 узорака са локалитета Бачка Паланка)									
Пестицид	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Боскалид	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Имидаклоприд	*	*	*	*	*	0,005	*	*	*	*
Карбендазим	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Клотианидин	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Крезокси-метил	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Луфенурон	*	*	*	*	0,005	*	*	*	*	*
Никосулфурон	0,005	*	0,002	*	*	*	*	*	*	*
Пропиконазол	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Спироксамин	*	0,002	0,001	*	*	*	*	0,001	*	*
Тиаметоксам	*	*	0,006	*	*	*	*	*	*	*
Феноксикарб	*	*	*	*	0,047	*	*	*	*	*
Фоксим	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Цимоксанил	0,041	*	0,021	*	*	*	*	*	*	*
Ципроконазол	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	Број узорка (10 узорака са локалитета Бачка Топола)									
Пестицид	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Боскалид	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Имидаклоприд	*	*	*	*	*	*	*	0,021	*	*
Карбендазим	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Клотианидин	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Крезокси-метил	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Луфенурон	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Никосулфурон	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Пропиконазол	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Спироксамин	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Тиаметоксам	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Феноксикарб	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Фоксим	*	*	*	0,006	*	*	*	*	*	*
Цимоксанил	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Ципроконазол	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	Број узорка (10 узорака са локалитета Сонта)									
Пестицид	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Боскалид	*	*	*	*	*	0,090	*	*	*	*
Имидаклоприд	*	*	*	*	*	0,014	*	*	*	*
Карбендазим	*	*	*	*	*	0,007	*	*	*	*
Клотианидин	*	*	*	*	*	0,007	*	*	*	*
Крезокси-метил	*	*	*	*	*	0,035	*	*	*	*
Луфенурон	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

Никосулфурон	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Пропиконазол	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Спироксамин	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Тиаметоксам	*	*	*	*	*	0,007	*	*	*	*
Феноксикарб	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Фоксим	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Цимоксанил	*	*	*	*	*	*	4,58	*	*	*
Ципроконазол	*	*	*	*	*	*	*	0,004	*	*
Број узорка (10 узорака са локалитета Вогањ)										
Пестицид	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Боскалид	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Имидаклоприд	*	*	0,02	*	*	*	*	*	*	*
Карбендазим	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Клотианидин	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Крезокси-метил	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Луфенурон	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Никосулфурон	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Пропиконазол	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0,074
Спироксамин	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Тиаметоксам	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Феноксикарб	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Фоксим	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Цимоксанил	*	*	*	*	*	4,97	*	*	*	*
Ципроконазол	*	*	*	*	0,003	*	*	1,78	*	*

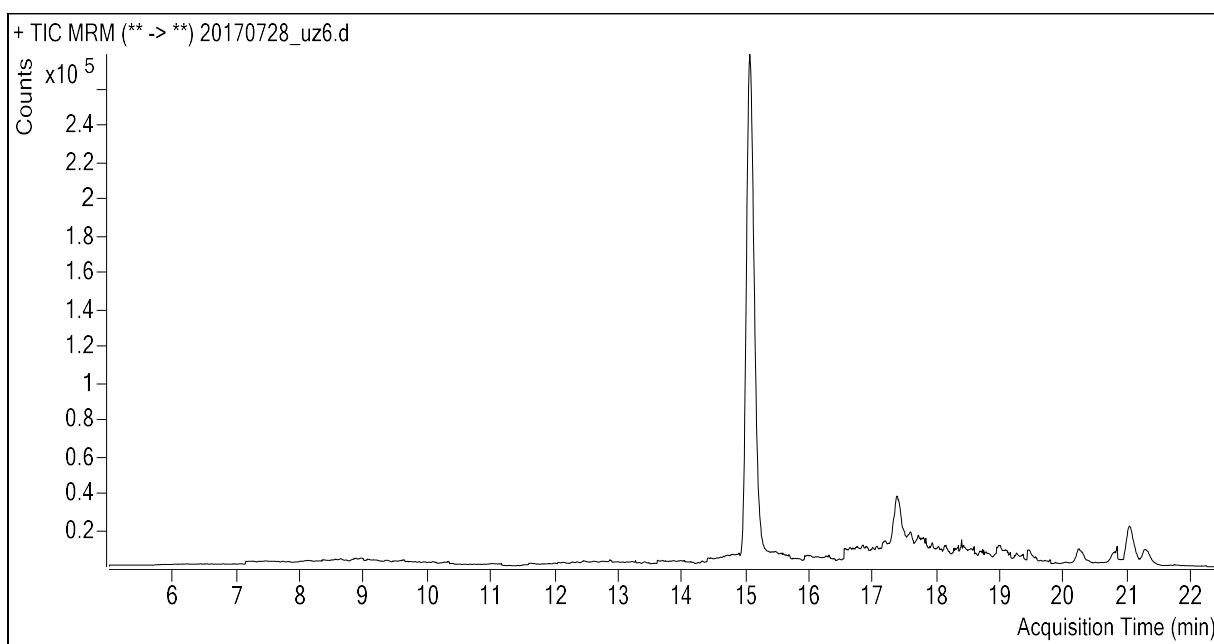
*Вредности нису квантификоване, или су испод LOQ

Вредности означене црвеном бојом представљају вредности >МДК

Од 50 одабраних пестицида на чије су присуство испитивани узорци бубрежног ткива зеца, прикупљени са 4 локалитета (Бачка Паланка, Бачка Топола, Сонта и Вогањ), детектовано је 14 пестицида (боскалид, имидаклоприд, карбендазим, клотианидин, крезокси-метил, луфенурон, никосулфурон, пропиконазол, спироксамин, тиаметоксам, феноксикарб, фоксим, цимоксанил и ципроконазол). Детекције појединачних пестицида испод МДК су установљене у узорцима: 2 (спироксамин - 0,002 mg/kg), 6 (имидаклоприд - 0,005 mg/kg), 8 (спироксамин - 0,001 mg/kg), 14 (фоксим - 0,006 mg/kg), 18 (имидаклоприд - 0,021 mg/kg), 28 (ципроконазол - 0,004 mg/kg), 33 (имидаклоприд - 0,02 mg/kg), 35 (ципроконазол - 0,003 mg/kg) и 40 (пропиконазол - 0,074 mg/kg). Присуство пестицида у количинама изнад прописаних МДК је забележено у узорцима: 27 (цимоксанил - 4,58 mg/kg), 36 (цимоксанил - 4,97 mg/kg) и 38 (ципроконазол - 1,78 mg/kg). Вишеструке детекције пестицида су утврђене у узорцима: 1 (никосулфурон - 0,005 mg/kg; цимоксанил - 0,041 mg/kg → вредност изнад МДК) и 5 (луфенурон - 0,005 mg/kg; феноксикарб - 0,047 mg/kg → вредност изнад МДК).

У узорку 3 су детектована 3 пестицида у количинама испод МДК (никосулфурон - 0,002, спироksamин - 0,001 и тиаметоксам - 0,006 mg/kg), док је цимоксанил био присутан у количини изнад МДК (0,021 mg/kg).

Узорак 26 је био узорак са највише детектованих пестицида (Слика 13). Наиме, детектовано је 6 различитих пестицида, али у количинама испод МДК (боскалид - 0,090, имидаклоприд - 0,014, карбендазим - 0,007, клотианидин - 0,007, крезокси-метил - 0,035 и тиаметоксам - 0,007 mg/kg). У осталим узорцима (укупно 26) нису детектовани пестициди, односно, присутни су у количинама које су испод LOQ.



Слика 13. ТИС хроматограм узорка 26

Важећи Правилник о максимално дозвољеним количинама остатака средстава за заштиту биља у храни и храни за животиње за коју се утврђују максимално дозвољене количине остатака средстава за заштиту биља (Сл. Гласник РС, бр. 22/2018) за анализиране пестициде прописује максимално дозвољене количине у бубрегу зеца које су приказане у табели 5.

Графички приказ добијених резултата је представљен на графицима 1 и 2.

Табела 5. Прописане максимално дозвољене количине остатака пестицида у бубрегу зеца

Пестицид	Прописане вредности МДК (mg/kg)
Боскалид	0,2
Имидаклоприд	0,3
Карбендазим	0,05
Клотианидин	0,02
Крезокси-метил	0,05
Луфенурон	0,15
Никосулфурон	0,02
Пропиконазол	0,5
Спироксамин	0,15
Тиаметоксам	0,01
Феноксикарб	0,01
Фоксим	0,02
Цимоксанил	0,01
Ципроконазол	0,5

График 1. Приказ добијених резултата анализе узорака бубрежног ткива зеца на садржај остатака пестицида у односу на укупан број испитиваних узорака

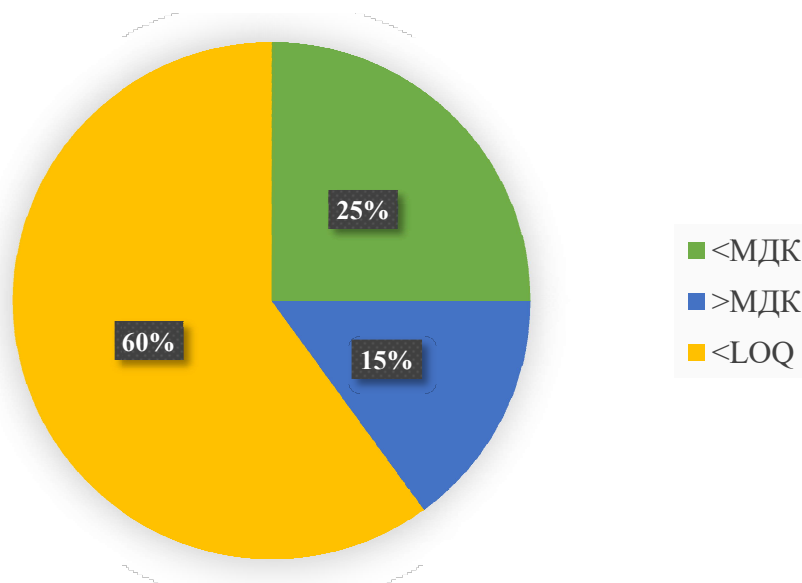
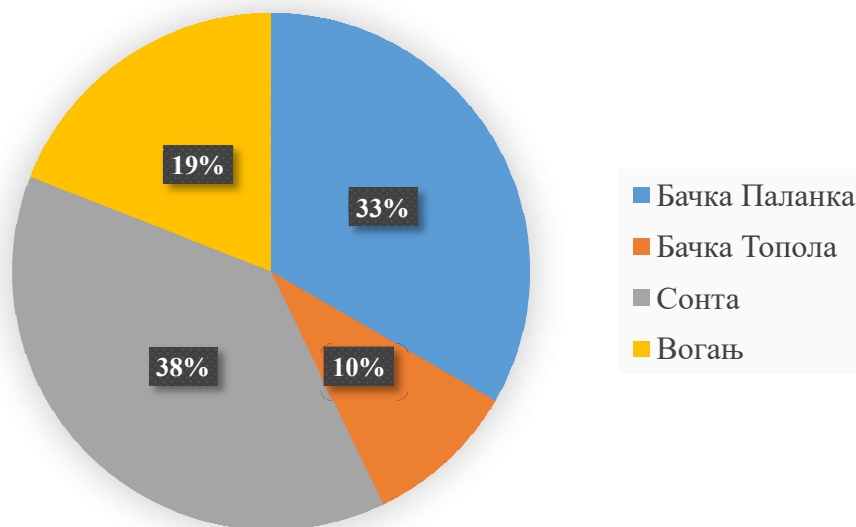


График 2. Приказ добијених резултата анализе узорака бубрежног ткива зеца на садржај остатака пестицида у односу на испитиване локалитете



Од 100% анализираних узорака бубрежног ткива зеца 60% није садржавало остатке пестицида (односно пестициди су били присутни испод LOQ), док су у 25% испитиваних узорака детектовани пестициди испод прописаних МДК вредности. Забрињава чињеница да је 15% испитиваних узорака садржавало пестициде у количинама изнад прописаних МДК вредности. Наиме, феноксикарб је детектован у узорку 5 са 0,047 mg/kg, ципроконазол у узорку 38 са 1,78 mg/kg, док остале детекције представља цимоксанил који је детектован у чак 4 узорка (узорак 1 – 0,041; узорак 3 – 0,021; узорак 27 – 4,58; узорак 36 – 4,97 mg/kg). Ако узмемо у обзир да је прописана МДК за цимоксанил 0,01 mg/kg, може да се закључи да је у узорцима 27 и 36 цимоксанил детектован у количини 4,58, односно 497 пута већој од прописане МДК, што је и више него алармантно.

Највише детекција је забележено на локалитету Сонта (38%), затим у Бачкој Паланци (33%), потом у Вогању (19%), док је локалитет са најмањим процентуалним уделом детекција Бачка Топола (10%).

Најчешће детектовани пестициди у бубрежном ткиву зеца у овом истраживању су имидаклоприд и цимоксанил са по 4 детекције и они заједно чине 30% од 100%

установљених детекција (укупно 26). Имидаклоприд је инсектицид који се у Републици Србији примењује у заштити парадајза и паприке, док је цимоксанил фунгицид који се користи у заштити кромпира, парадајза, краставца и винове лозе (Друштво за заштиту биља Србије, 2021).

6. ЗАКЉУЧАК

На основу резултата добијених коришћењем валидоване LC-MS/MS методе и QuEChERS екстракције пестицида из бубрежног ткива зеца може да се закључи следеће:

- ❖ Мултирезидуална метода течне хроматографије са тандем масеном спектрометријом (LC-MS/MS) са сигурношћу аналитичког поступка може да се користи у одређивању остатака педесет пестицида у бубрежном ткиву зеца уз примену интерног стандарда карбофурана-Д3.

- ❖ За све испитиване пестициде LOQ је постављен у складу са прописаним МДК вредностима на ниво од 0,05 mg/kg. LOD вредности су математичким путем израчунате преко софтвера LC-MS/MS (MassHunter Workstation software B.06.00, Agilent Technologies 2010).

- ❖ Приноси екстракције су проверени за нивое обогаћења од 0,05; 0,1 и 0,2 mg/kg. Добијене вредности приноса екстракције су се кретале у интервалу од 47,25 до 103,21% за испитиване пестициде са RSD од 0,8 до 12,1%. Добијене вредности су у складу са SANTE/11813/2017 документом.

- ❖ Провера линеарности одзива детектора за испитиване пестициде је извршена употребом шест нивоа масених концентрација у концентрационом опсегу од 0,01 до 0,5 µg/mL. Калибрационе криве анализираних анализата карактеришу коефицијенти корелације са вредностима прописаним у складу са SANTE/11813/2017 документом ($R^2 > 0,99$).

- ❖ Утицај матрикса је за поједине пестициде био изнад 15%, што указује на то да је за квантификацију испитиваних пестицида у реалним узорцима обавезна калибрација у матриксу.

- ❖ Од 40 испитиваних узорака у 26 (60%) није установљено присуство нити једног од пестицида обухваћених анализом, односно, пестициди су били присутни испод LOQ.

- ❖ Од 50 одабраних пестицида на чије су присуство испитивани узорци бубрежног ткива зеца, прикупљени са 4 локалитета (Бачка Паланка, Бачка Топола, Сонта и Вогањ), детектовано је 14 пестицида (боскалід, имидаклоприд, карбендазим, клотианидин,

крезокси-метил, луфенурон, никосулфурон, пропиконазол, спироksamин, тиаметоксам, феноксикарб, фоксим, цимоксанил и ципроконазол).

❖ Од 100% анализираних узорака бубрежног ткива зеца, у 25% су детектовани пестициди испод прописаних МДК вредности. Забрињава чињеница да је 15% испитиваних узорака садржавало пестициде у количинама изнад прописаних МДК вредности. Наиме, феноксикарб је детектован у узорку 5 са 0,047 mg/kg, ципроконазол у узорку 38 са 1,78 mg/kg, док остале детекције представља цимоксанил који је детектован у чак 4 узорка (узорак 1 – 0,041; узорак 3 – 0,021; узорак 27 – 4,58; узорак 36 – 4,97 mg/kg). Ако узмемо у обзир да је прописана МДК за цимоксанил 0,01 mg/kg, може да се закључи да је у узорцима 27 и 36 цимоксанил детектован у количини 4,58, односно 497 пута већој од прописане МДК, што је и више него алармантно.

❖ Највише детекција је забележено на локалитету Сонта (38%), затим у Бачкој Паланци (33%), потом у Вогњу (19%), док је локалитет са најмањим процентуалним уделом детекција Бачка Топола (10%).

7. ЛИТЕРАТУРА

- Andrews A. H., Humphreys D. J. (1982): Poisoning in veterinary practice, NOAH.
- Baker A., Bauer C. (2018): A review of the potential impacts of cannabis cultivation on fish and wildlife resources. California Department of fish and wildlife habitat conservation planning branch.
- Berny P. (2007): Pesticides and the intoxication of wild animals, *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 30, 93-110.
- Беуковић М., Беуковић Д., Бурсић В., Крстовић С., Јајић И., Поповић З., Лавадиновић В. (2017): The presence of pesticides in the fatty tissue of brown hare (*Lepus europaeus* Pall.): Pilot test in one hunting ground of Ваџка territory, Conference "Sustainable Forestry: Fact or Fiction?", 4-6 October, Skopje, VJR Macedonia, Book of Abstracta, 37.
- Беуковић Д., Поповић З., Беуковић М., Бурсић В., Ђорђевић Н., Крстовић С., Јајић И., Лавадиновић В. (2018): The pesticide in brown hare adipose tissue as consequence of anthropogenic factors, *International Symposium on Animal Science (ISAS) 2018*, 22-23.11. Belgrade, Serbia, Proceedings, 69-74.
- Беуковић М., Ђорђевић З., Поповић Н., Беуковић Д., Ђурђевић М. (2011): Nutrition specificity of brown hare (*Lepus europaeus*) as a cause of the decreased number of population, *Савремена пољопривреда*, 60, 3-4, 403-412.
- Беуковић М., Поповић З. (2014): *Ловство*, Универзитет у Новом Саду, Пољопривредни факултет Нови Сад.
- Bhattacharya P., Tandukar N., Neku A., Valero A. A., Mukherjee A. B., Jacks G. (2003): Geogenic arsenic in groundwaters from terai alluvial plain of Nepal. *Journal of Physics IV France*, 107, 173-176.
- Бурсић В., Вуковић Г., Беуковић М., Мезеи М., Шпировић-Трифунковић Б., Петровић А., Ивановић И. (2017): Agricultural impact on brown hare: LC-MS/MS kidney multiresidual pesticides analyses, 23rd International Symposium on Analytical and Environmental Problems, 9-10 October, Szeged, Hungary, Proceedings, 120-123.

- Друштво за заштиту биља Србије (2021): Средства за заштиту биља у промету у Србији (2021). Биљни лекар, 49(3-4).
- Edwards P. J., Fletscher M. R., Berny P. (2000): Review of the factors affecting the decline of the European brown hare, *Lepus europaeus* (Pallas, 1778) and the use of wildlife incident data to evaluate the significance of paraquat. Agriculture, Ecosystems and Environment, 79, 95-103.
- Колектив аутора (2020): Средства за заштиту биља у промету у Србији 2020, Биљни лекар, 48, 3-4.
- Костић Е., Вујовић М. (2021): Токсиколошки извештај о тровању пестицидима у југоисточном региону Србије током 2020. године, Зборник радова XXVI Саветовања о биотехнологији са међународним учешћем, 313-319.
- Law R. J. (2014): An overview of time trends in organic contaminant concentrations in marine mammals: Going up or down, Marine Pollution Bulletin, 82, 7-10.
- Мезеи М., Бурсић В., Вуковић Г., Петровић А., Беуковић Д., Маринковић Д., Беуковић М. (2018): Pesticides and the loss of biodiversity: European hare. 26th International Conference Ecological Truth & Environmental Research, Bor, Serbia, 221-225.
- Mineau P., Palmer C. (2013): The impact of the nation's most widely used insecticides on birds, American Bird Conservancy, The Plains, VA, USA.
- Pimentel D. (2005): Environmental and economic costs of the application of pesticides primarily in the United States, Environment, Development and Sustainability, 7, 229-252.
- Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC.
- SANTE/11813/2017: Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed.
- SANTE/12684/2019: Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed.
- Симић Б. (2018): Присуство пестицида у масном ткиву зеца у ловиштима Војводине. Мастер рад, Пољопривредни факултет, Универзитет у Новом Саду.

- Службени гласник РС број 22/2018: Правилник о максимално дозвољеним количинама остатака средстава за заштиту биља у храни и храни за животиње и о храни за животиње за коју се утврђују максимално дозвољене количине остатака средстава за заштиту биља.
- Топић (2013): Утицај пестицида на ситну дивљач, Лорист 66.
- UNEP (2020): The EU's chemicals strategy for sustainability towards a toxic-free environment.
- Ushewokunze O., Froslic A., Gathuma J. M., Nafstad I. (1991): Residues of quintofos in cattle milk after dermal application of bacdip, Bulletin Animal Health Production Africa.
- Шелмић В., Гачић Д. (2011): Ловство са заштитом ловне фауне – практикум, Универзитет у Београду, Шумарски факултет Београд.
- Шовљански Р., Лазић С. (2007): Основи фитофармације, Универзитет у Новом Саду, Пољопривредни факултет Нови Сад.
- Whitford F. (2016): Pesticide impact on wildlife ecology.
- <https://www.google.com/maps/place/%D0%91%D0%B0%D1%87%D0%BA%D0%B0+%D0%9F%D0%B0%D0%BB%D0%B0%D0%BD%D0%BA%D0%B0/@45.2547508,19.3761491,14z/data=!3m1!4b1!4m5!3m4!1s0x475b7a7342701e97:0xa307f05ee4f66493!8m2!3d45.2499139!4d19.3879619?hl=sr>
- <https://www.google.com/maps/place/%D0%91%D0%B0%D1%87%D0%BA%D0%B0+%D0%A2%D0%BE%D0%BF%D0%BE%D0%BB%D0%B0/@45.7978647,19.5950958,12z/data=!3m1!4b1!4m5!3m4!1s0x4744a97f96da4179:0x56c072ab8a6d2fc!8m2!3d45.8129152!4d19.6300949?hl=sr>
- <https://www.google.com/maps/place/%D0%A1%D0%BE%D0%BD%D1%82%D0%B0/@45.5755634,18.980253,12z/data=!3m1!4b1!4m5!3m4!1s0x475cbbfceed3d3ad:0x5f545344089cf0ef!8m2!3d45.5930057!4d19.0988283?hl=sr>
- <https://www.google.com/maps/place/%D0%92%D0%BE%D0%B3%D0%B0%D1%9A/@44.9933601,19.7256941,13z/data=!3m1!4b1!4m5!3m4!1s0x475baecfb10728d1:0x3d498fa0adf7c4fb!8m2!3d45.004009!4d19.7567968?hl=sr>

Списак слика:

- Слика 1.** *Lepus europaeus* Pallas, 1778
- Слика 2.** Локалитет Бачка Топола (Извор: google.com/maps/)
- Слика 3.** Локалитет Бачка Паланка (Извор: google.com/maps/)
- Слика 4.** Локалитет Сонта (Извор: google.com/maps/)
- Слика 5.** Локалитет Вогањ (Извор: google.com/maps/)
- Слика 6.** MRM прелази карбофурана-ДЗ
- Слика 7.** Спајкован узорак бубрежног ткива зеца
- Слика 8.** Калибрациона крива никосулфурана
- Слика 9.** Калибрациона крива фоксима
- Слика 10.** Калибрациона крива тиаметоксама
- Слика 11.** Калибрациона крива пропиконазола
- Слика 12.** ТИС хроматограми узорака бубрежног ткива зеца 9-12
- Слика 13.** ТИС хроматограм узорка 26

Списак схема:

- Схема 1.** QuEChERS екстракција

Списак табела:

- Табела 1.** Обележавање узорака бубрежног ткива зеца обухваћених истраживањем
- Табела 2.** SRM прелази, фрагментационе (Frag.) и колизионе (CE) енергије и ретенциона времена пестицида (R_t)
- Табела 3.** Вредности коефицијената корелације (R^2) и приноса екстракције са релативном стандардном девијацијом (RSD) испитиваних пестицида
- Табела 4.** Детектоване вредности пестицида (mg/kg)
- Табела 5.** Прописане максимално дозвољене количине остатака пестицида у бубрегу зеца

Списак графика:

График 1. Приказ добијених резултата анализе узорака бубрежног ткива зеца на садржај остатака пестицида у односу на укупан број испитиваних узорака

График 2. Приказ добијених резултата анализе узорака бубрежног ткива зеца на садржај остатака пестицида у односу на испитиване локалитете