

Određivanje tragova pesticida u vodama

Stipić, Matea

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:935391>

Rights / Prava: [Attribution 4.0 International](#)/[Imenovanje 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Matea Stipić

ODREĐIVANJE TRAGOVA PESTICIDA U VODAMA

Diplomski rad

Rijeka, 2022.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Matea Stipić

ODREĐIVANJE TRAGOVA PESTICIDA U VODAMA

Diplomski rad

Rijeka, 2022.

Mentor rada: **Doc.dr.sc. Igor Dubrović, dipl.sanit.ing.**

Diplomski rad ocjenjen je dana 15.07.2022. na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci
pred povjerenstvom u sastavu:

1. Izv.prof.dr.sc. Sandra Pavičić Žeželj, dipl.sanit.ing.
2. Doc.dr.sc. Željko Linšak, dipl.sanit.ing.
3. Doc.dr.sc. Igor Dubrović, dipl.sanit.ing.

Rad sadrži 61 stranicu, 23 slike, 16 tablica, 84 literaturna navoda.

ZAHVALE

Zahvaljujem se mentoru Doc.dr.sc. Igoru Dubroviću na svim savjetima, stalnoj dostupnosti te pomoći prilikom izrade ovog diplomskog rada.

Veliko hvala mojoj obitelji, ponajviše mojim roditeljima, koji su mi pružili neizmjernu podršku i omogućili daljnje školovanje.

Zahvaljujem se svim kolegicama i kolegama uz koje su studentski dani bili znatno lakši i zabavniji.

Hvala Mariu na svemu.

Ovaj rad posvećujem baki Nadi.

Matea Stipić

SAŽETAK

U posljednjih nekoliko desetljeća, intenzivna poljoprivredna proizvodnja dovela je do oslobađanja znatnih količina pesticida u ekosustav. U vodeni ekosustav pesticidi općenito dospijevaju s poljoprivrednih usjeva difuznim putem pomoću vjetra, kiše ili pak gravitacije te se procjeđuju u podzemne tokove. Zagađenje podzemnih voda ostacima pesticida u Hrvatskoj predstavlja značajan javnozdravstveni problem, s obzirom na činjenicu da 90% stanovništva koristi podzemnu vodu kao izvor vodoopskrbe. Veliki značaj u sprječavanju kontaminacije vode za ljudsku potrošnju pesticidima i njihovim razgradnim produktima imaju praćenja istih (revizijski monitoring) koja se redovito provode. U ovom radu analizirana je koncentracija odabranih organofosfornih pesticida (OPP-a) i njihovih razgradnih produkata, organoklornih pesticida (CIP-a), te glifosata plinskom i tekućinskom kromatografijom (GC – ECD, GC – MS, GC – MS/MS, LC – MS, LC – MS/MS) u uzorcima vode za ljudsku potrošnju (N=348) tijekom šestogodišnjeg razdoblja (2016.-2021.) na području Primorsko-goranske županije. Svi analizirani uzorci sadržavali su značajno nisku koncentraciju pesticida koja je bila manja od granica kvantifikacije te nijedan analizirani uzorak nije odstupao od maksimalno dopuštenih vrijednosti.

Ključne riječi: pesticidi, ostaci pesticida, voda za ljudsku potrošnju, javnozdravstveni problem

SUMMARY

In recent decades, intensive agricultural production has led to the release of significant amounts of pesticides into the ecosystem. Pesticides generally get into the aquatic ecosystem from agricultural crops by diffuse means of wind, rain or gravity and are leached into underground flows. Pollution of groundwater by pesticide residues in Croatia is a significant public health problem, due to the fact that 90% of the population uses groundwater as a source of water supply. Audit monitors that are regularly carried out have great importance in preventing water contamination for human consumption by pesticides and their degradation products. This study analyses the concentration of selected organophosphoric pesticides (OPP) and their degradation products, organochlorine pesticides (CIPs) and glyphosate by gas and liquid chromatography (GC-ECD, GC - MS, GC - MS/MS, LC - MS, LC - MS/MS) in water samples for human consumption (N=348) over a six-year period (2016-2021) in the Primorsko-goranska County. All of the samples analysed contained a significantly low concentration of pesticides that was less than quantification limits and none of the samples analysed deviated from the maximum permitted values.

Keywords: pesticides, pesticide residues, water for human consumption, public health problem

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Pesticidi	2
1.1.1. Povijest uporabe pesticida	5
1.1.2. Potrošnja pesticida u Republici Hrvatskoj	6
1.2. Insekticidi	7
1.3. Herbicidi	10
1.4. Pesticidi u vodi	11
1.4.1. Zakonska regulativa i monitoring ostataka pesticida u vodama.....	13
1.4.2. Metode uklanjanja pesticida iz vode	15
1.4.2.1. Kemijska obrada vode.....	15
1.4.2.2. Fizikalna obrada vode	16
1.4.2.3. Biološka obrada vode.....	17
1.4.3. Određivanje tragova pesticida u vodama	17
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	20
3. MATERIJALI I METODE	21
3.1. Materijali	21
3.1.1. Kemikalije	21
3.1.2. Pribor i oprema.....	21
3.2. Metode	24
3.2.1. Priprema radnih standarda.....	24
3.2.2. Analiza uzorka.....	24
3.2.3. Izračunavanje rezultata.....	28
4. REZULTATI	29
4.1. Validacija mjernog postupka	34

4.2. Mjerna nesigurnost rezultata ispitivanja.....	40
4.3. Međulaboratorijsko ispitivanje (interkalibracija).....	43
5. RASPRAVA.....	45
6. ZAKLJUČAK.....	47
7. LITERATURA.....	48
8. POPIS SLIKA.....	59
9. POPIS TABLICA.....	60
10. ŽIVOTOPIS.....	61

1. UVOD

S počecima moderne kemijske industrije, u prvoj polovici dvadesetog stoljeća došlo je do oslobađanja značajnih količina sintetskih sredstava u hidrološki sustav. Razlog tomu je intenzivna poljoprivredna proizvodnja koja je zahtijevala zaštitu usjeva od raznih štetnika upotrebom različitih vrsta pesticida (1). Upotrebom pesticida osiguravaju se veliki prinosi u poljoprivredi koji su neophodni za ostvarivanje potreba moderne civilizacije. Unatoč činjenici da se radi o tvarima koje stvaraju štete živom svijetu i prirodi, pesticidi se i dalje smatraju neophodnim sredstvom za zaštitu bilja od štetnika (2). Međutim, nekontrolirano korištenje ovih sredstava može dovesti do ugrožavanja biološke raznolikosti. Time je prvenstveno ugrožen opstanak riba, ptica, korisnih insekata i ostalih neciljanih organizama. Osim živog svijeta, voda, zrak i tlo su također potencijalno izloženi ovim kemikalijama do toksičnih razina (3). Procjenjivanje posljedica njihovog prekomjernog korištenja na ljudsko zdravlje te opstanak živih organizama u prirodi podrazumijeva uz poznavanje bioloških utjecaja, i način na koji okolišni uvjeti i antropogeni čimbenici utječu na njihovu koncentraciju u ekosustavu (1).

Ulazak u neki ekosustav ovisi o fizikalnim svojstvima samog pesticida. Oni pesticidi koji su topljivi u vodi, dospijevaju u podzemne vode, potoke, rijeke i jezera te štetno djeluju na neciljane organizme. S druge strane, oni koji su topivi u mastima adsorbiraju se u masna tkiva životinja, te se na taj način zadržavaju u hranidbenim lancima dulje vrijeme. Prilikom ispuštanja u okoliš, pesticidi se razgrađuju u metabolite koji u nekim situacijama mogu biti toksičniji nego aktivni oblici. Pojava pesticida u vodi predstavlja golemu prijetnju vodenom obliku života. Štetno utječu na vodene biljke, smanjuju otopljeni kisik u vodi te negativno djeluju na fizičke promjene i promjene u ponašanju kod riba (3). Stanovništvo diljem svijeta zabrinuto je činjenicom sve učestalije pojave tragova pesticida u vodenom okolišu, s obzirom da pesticidi imaju sposobnost akumuliranja u organizme. U vodeni ekosustav dospijevaju otjecanjem s poljoprivrednih površina i iz industrijskih otpadnih voda. Prilikom velikih oborina, molekule vode nose topive komponente pesticida prema donjim slojevima tla dospijevajući tako u podzemne vode (4).

Zdravstveni rizik za ljude i životinje predstavlja dugotrajna postojanost tragova pesticida u vodi (5). Zabrinutost oko ulaska pesticida u vodu dovela je do podjele interesa na dva različita pogleda na situaciju u cilju održavanja ili poboljšavanja kvalitete vode, a to su: zaštita vodenih ekosustava i promicanje održivog korištenja vodnih resursa (6). Pesticidi se smatraju jednim od izvora zagađenja okoliša jer njihova nekontrolirana primjena onečišćuje

vodu, tlo i zrak (7). Upravo zato, glavni cilj zaštite i održivosti okoliša je smanjiti kontaminaciju vodenog sustava pesticidima, njihovim metabolitima i razgradnim produktima (5).

1.1. Pesticidi

Prema definiciji Organizacije za hranu i agronomiju pri Ujedinjenim narodima (FAO), pesticidi su tvari ili smjese komponenata koje se koriste radi sprječavanja štetočina (vektora koji prenose bolesti ili neželjene vrste biljaka ili životinja koje prave štete na poljoprivrednim usjevima...) te suzbijanja štetnika koje mogu parazitirati na biljkama ili životinjama. Kada se koriste odgovorno, pesticidi su ključni element u poljoprivredi koji mogu pomoći u zaštiti sjemena i usjeva od neželjenih biljaka, insekata, bakterija, gljivica i glodavaca (8). Pesticidi djeluju na način tako da privuku, a zatim unište ili ublaže djelovanje štetočina. Upotreba pesticida se višestruko povećala tijekom posljednjih nekoliko desetljeća. Prema FAO podacima, procjenjuje se da se 2019. godine u svijetu upotrijebilo oko 4 milijuna tona pesticida, dok se u Hrvatskoj iste te godine utrošilo nešto više od 1500 tona. Primjena pesticida nije ograničena samo na poljoprivrednim usjevima, već ih se može pronaći i u kućanstvima u sprejevima, mamcima i prahovima za suzbijanje štetnih insekata (3,9).

Svaki pesticidni preparat sadrži takozvane "aktivne" i "inertne" tvari. Aktivna tvar pesticida je odgovorna za ublažavanje djelovanja štetnika, odnosno odbija i uništava štetnike. Osim toga, može biti regulator biljaka i stabilizator dušika. Udio aktivne tvari u ukupnom sastavu je relativno malen. Postoje tri kategorije aktivnih komponenti: konvencionalne, antimikrobne i biopesticidne komponente. Antimikrobne komponente su tvari ili mješavine tvari koje se koriste za uništavanje ili suzbijanje rasta štetnih mikroorganizama na neživim predmetima i površinama, dok su biopesticidi, kao što im samo ime govori, komponente dobivene od određenih prirodnih materijala. U konvencionalne komponente spadaju sve one komponente koje nisu antimikrobne i biopesticidne. S druge strane, inertne tvari su namjerno dodane tvari koje imaju ključnu ulogu u učinkovitosti samog pesticida te time čine pesticidni pripravak kompletnim (10).

U većini slučajeva, pesticidi u okolišu ne ostaju trajno u obliku u kojem su upotrijebljeni. Uz pomoć svjetlosti, topline, vode i mikroorganizama, pesticidi se u kombinaciji s drugim toksičnim spojevima mogu modificirati u još jače otrove. Značajan broj pesticidnih preparata je iznimno postojan odnosno teško razgradiv. Trajnost takvih pesticida se kreće u rasponu od par dana, par tjedana ili nekoliko godina. Neki pesticidi su izrazito perzistentni pa se pretpostavlja da će, unatoč njihovoj zabrani, ostati u ekosustavu duže od 50 godina (11).

Zbog postojanja raznih vrsta kemijskih sredstava s različitom namjenom i različitim toksičnim djelovanjem stvorene su razne podjele pesticida temeljene na određenim kriterijima:

a) Prema namjeni suzbijanja pesticidi se dijele na:

- Mikrobiocidi
 - Baktericidi – suzbijaju bakterije
 - Virocidi – suzbijaju viruse
- Fungicidi – suzbijaju gljivične bolesti
- Fitocidi
 - Algicidi – suzbijaju alge
 - Herbicidi
 - Selektivni
 - Neselektivni – suzbijaju svu vegetaciju
 - Arboricidi – suzbijaju drveće i grmlje
- Zoocidi
 - Insekticidi (neselektivni) – suzbijaju kukce
 - Akaricidi – suzbijaju grinje i pauke
 - Nematocidi – suzbijaju oblice
 - Limacidi – suzbijaju puževe
 - Moluscidi – suzbijaju mekušce
 - Rodenticidi
 - Neselektivni – suzbijaju glodavce
 - Muricidi – suzbijaju miševе i voluharice
 - Raticidi – suzbijaju štakore
 - Avicidi – suzbijaju ptice
- Homocidi – bojni otrovi protiv ljudi

b) Prema kemijskom sastavu pesticidi se dijele na:

- Anorganski spojevi (Žive, flouara, barija, sumpora, bakra, klorata, borata, cijanovodika (HCN), ugljikovog monoksida (CO) i drugih)
- Organski spojevi
 - Organoklorni
 - Organofosforni
 - Derivati karbaminske, tio- i ditiokarbaminske kiseline
 - Dušikovi derivati fenola
 - Derivati fenoksiocetene kiseline
 - Piretrini i piretroidi
 - Organoživine tvari
 - Ftalimidi
 - Triazini, derivati karbamida
 - Mineralna ulja

c) Prema primarnom mjestu ulaska pesticida u organizam dijele se na:

- Oralni – ulazak kroz probavni sustav
- Kontaktni – ulazak kroz pokrovni sustav
- Fumiganti – ulazak kroz dišni sustav (11)

1.1.1. Povijest uporabe pesticida

Još od davnina, jednostavni kemijski spojevi dostupni iz okoliša korišteni su u svrhu zaštite usjeva ili zaštite uskladištenih odnosno prerađenih plodova. Već 2500 godina prije Krista, Sumerani su rabili spojeve sumpora prilikom zaštite namirnica od kukaca, dok su u drevnoj Kini prije 3200 godina korišteni anorganski spojevi žive i arsena za uništavanje stjenica i uši (12). Osim toga, stari Rimljani su spaljivali sumpor za suzbijanje štetnih organizama, a sol, pepeo i gorčinu su koristili za uništavanje korova (13). Poljoprivrednici iz SAD-a su pri kraju devetnaestog stoljeća počeli koristiti nikotin sulfat, kalijev arsenat i sumpor za poljoprivredne usjeve (14). Također, prilikom borbe protiv epidemije koloradske zlatice u SAD-u korišteni su nečisti oblici bakra i arsena (13). Prije same pojave sintetičkih pesticidnih pripravaka, ljudi su upotrebljavali prirodne pripravke koji se i danas koriste, na primjer dalmatinski buhač i listovi duhana (14).

Vrhunac razvoja sintetičkih pesticida dogodio se 1939. godine kada su sintetizirani insekticidi diklordifeniltrikloretan (DDT) i aldrin. Nedugo nakon, otkriveni su drugi organofosfatni insekticidi i fenoksi herbicidi (15,16). Tijekom Vijetnamskog rata korišten je eksperimentalni ratni herbicid pod nazivom Agent Orange razvijen od strane Monsanta (13). No, već godinu dana nakon, javnost je suočena sa štetnim učincima neselektivne upotrebe pesticida čime je došlo do značajne redukcije razvoja novih pesticida (15,16). U kasnim 1960-ima, uveden je Integrated Pest Management (IPM), odnosno pristup „integriranog upravljanja štetočinama” kojim su korišteni biološki grabežljivci ili paraziti u svrhu suzbijanja štetnika. Iako se razina štetnika tom metodom može značajno smanjiti, IPM metoda nije bila kvalitetna zamjena za kemijske pesticide (15). Potvrđena istraživanja su dokazala kako DDT štetno djeluje na reproduktivni sustav ptica, kruži u okolišu i nakuplja se u živim organizmima (17). Znamenita knjiga Rachel Carson “Tiho proljeće”, objavljena 1962. odigrala je veliku ulogu u odluci da se zabrani DDT i drugi organoklorini insekticidi za poljoprivrednu upotrebu u SAD-u, te je dovela do pojačane regulative pesticida (18). Stoga je Agencija za zaštitu okoliša 1972. godine zabranila korištenje DDT-a u SAD-u, nakon čega su ostale zemlje učinile isto (17). Brojni pesticidni pripravci proizvedeni 60-ih godina 20. stoljeća danas su na popisu zabranjenih pesticida u Europi, pa tako i u Hrvatskoj. Trideset godina nakon, razvitak pesticidnih pripravaka usmjeren je na optimiziranje postojećih aktivnih komponenti s ciljem porasta selektivnosti i time smanjenja opterećenja ekosustava te rizika za ljudsko zdravlje. Prije otprilike 10-ak godina pojavilo se oko 30 novih sintetiziranih spojeva koji su registrirani kao tvari s pesticidnim efektom (19).

Od svih poznatih vrsta pesticida, danas su najzastupljeniji herbicidi (približno 50%), zatim fungicidi (blizu 30%) pa insekticidi (s udjelom od oko 15%). Te tri spomenute vrste pesticida čine gotovo 95% svih pesticida koji su stalno u upotrebi (20).

1.1.2. Potrošnja pesticida u Republici Hrvatskoj

Sva potrošnja pesticidnih spojeva regulirana je zakonodavstvom Europske unije koja većim dijelom čini zakonsku regulativu Republike Hrvatske. Cilj je, uz naveden niz mjera i obaveza različitih dionika poljoprivrede, smanjiti nepovoljan utjecaj na ljudsko zdravlje i životinje, na vodni sustav i generalno cijeli ekosustav. Temeljnu legislativu čine:

- Zakon o održivoj uporabi pesticida (NN 46/2022),
- Zakon o izmjenama zakona o provedbi Uredbe (EZ) br. 1107/2009 o stavljanju na tržište sredstava za zaštitu bilja (NN 32/2019)
- Pravilnik o uspostavi akcijskog okvira za postizanje održive uporabe pesticida (NN 142/2012)
- Zakon o održivom gospodarenju otpadom (NN 84/2021)
- Pravilnik o integriranoj proizvodnji poljoprivrednih proizvoda (NN 137/2012 i 59/2014) (21)

U Hrvatskoj je 2006. godine dozvolu za promet i upotrebu imalo 190 pripravaka insekticida s 63 aktivne tvari, 235 pripravka fungicida s 80 aktivnih tvari te 302 herbicidna pripravka s 94 aktivne tvari (11). Budući da ne postoje relevantni podaci o potrošnji pesticida u Hrvatskoj, uzeti su podaci koji su obrađeni od strane Hrvatskih voda za 2012. godinu. Prema navedenim podacima, 2012. godine je registrirano 210 aktivnih komponenta u 734 pesticidnih pripravaka. Na **Slici 1** prikazana je tablica sa skupinama pesticida, ukupnom potrošnjom pesticida u kilogramima aktivne tvari te postotni udio pojedinih pesticidnih skupina korištenih 2012. godine.

Skupina pesticida	Broj a. t.	Kg a. t.	Udjel u potrošnji, %
Herbicidi	56	1 031 533	46,8
Fungicidi	65	1 106 456	50,2
Zoocidi	36	67 197	3,0
Ukupno	157	2 205 186	100

Slika 1. Broj aktivnih tvari, ukupna potrošnja (u kilogramima aktivne tvari) i postotni udio pojedine skupine pesticida u Hrvatskoj za 2012. godinu (21)

Nadalje, potrošnja i udio pet najviše korištenih vrsta pesticida korištenih u Hrvatskoj u godini 2012. prikazani su na **Slici 2**. Ono što se može primijetiti je to da prema *Popisu opasnih tvari i prioritetnih opasnih tvari* i *Popisu ostalih opasnih tvari iz Uredbe o opasnim tvarima u vodama* (NN 137/08), niti jedna aktivna tvar herbicida koja je korištena u 2012. godini nije na spomenutim popisima. Također, svih pet aktivnih tvari fungicida koje su korištene navedene godine se ne nalaze na *Popisu opasnih tvari i prioritetnih opasnih tvar*, ali se mankozeb nalazi na *Popisu ostalih opasnih tvari*. Međutim, najčešće korišten insekticid klorpirifos (klorpirifos-etil) nalazi se na *Popisu opasnih tvari i prioritetnih opasnih tvari*, a na *Popisu ostalih opasnih tvari* navedeni su organofosforni insekticidi kojima pripada korišteni dimetoat.

Rang	Herbicidi	Fungicidi	Insekticidi
1	glifosat	sumpor	klorpirifos
2	s-metolaklor	bakar	dimetoat
3	terbutilazin	mankozeb	imidaklopid
4	acetoklor	pirimetanil	klorpirifos-metil
5	2,4-D	fosetil	cipermetrin
Ukupno kg	703 018 kg	863 854 kg	47 171 kg
Udjel, %	68,2	78,1	70,2

Slika 2. Potrošnja i udio pet najčešće korištenih aktivnih tvari herbicida, fungicida i insekticida u Hrvatskoj za 2012. godinu (21)

1.2. Insekticidi

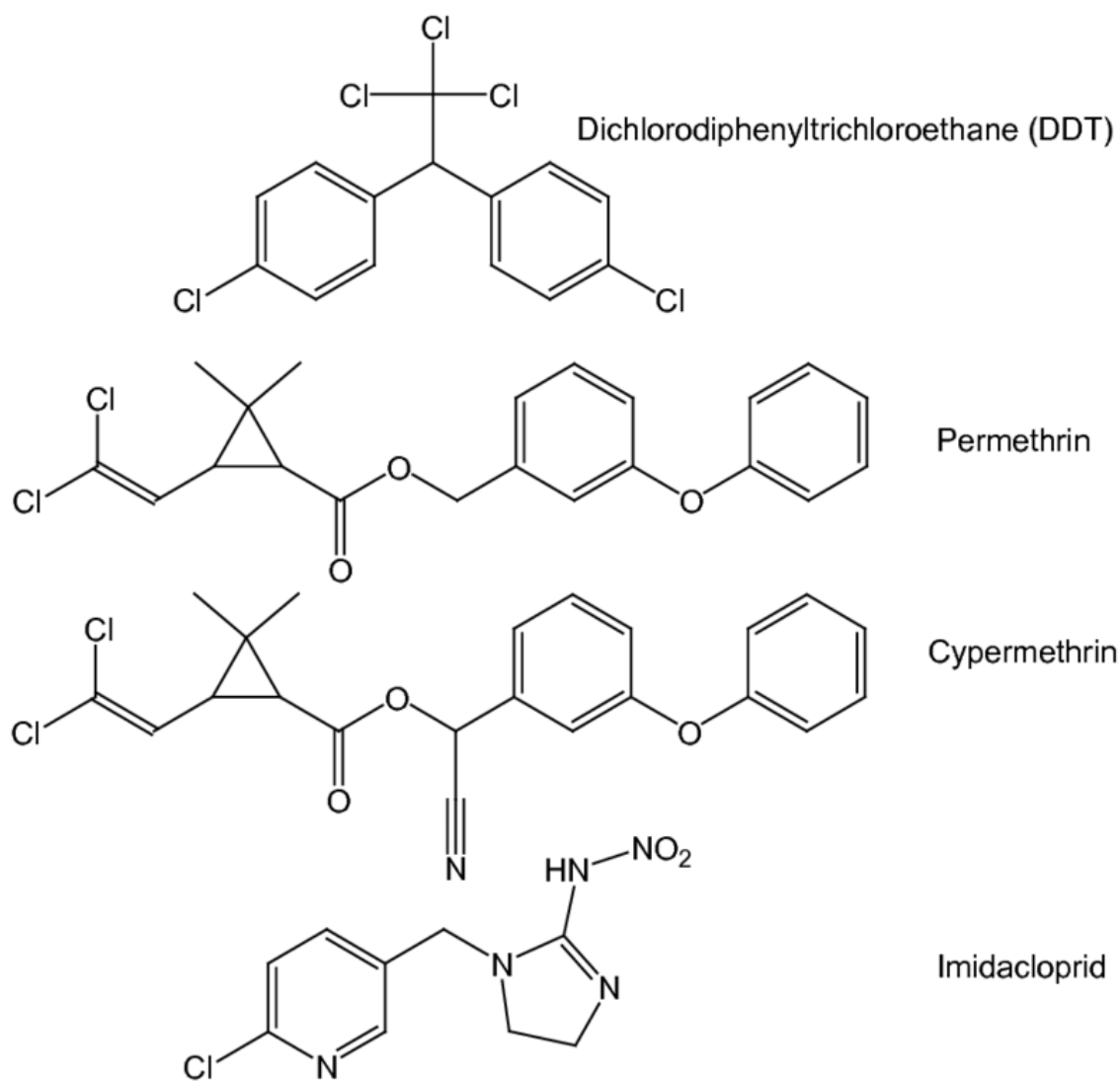
Insekticidi su pesticidni preparati za suzbijanje insekata na usjevima, domaćim životinjama i kućnim ljubimcima te na taj način sprječavaju prijenos bolesti koje prenose kukci. Tijekom proteklih sedam desetljeća uvedene su različite klase insekticida (22). Njihova primjena je donijela značajan doprinos, jer su pomoću njih iskorijenjene neke teške zarazne bolesti, spašene znatne količine hrane i spriječene štete na usjevima. No, šteta koja je nastala velikom primjenom insekticida još uvijek je nemjerljiva jer su posljedice za sad nepoznate (23). Insekticide možemo podijeliti u dvije skupine prema načinu djelovanja. Prvu skupinu čine insekticidi koji izravno suzbijaju insekte, dok insekticidi druge skupine uklanjaju ili doprinose njihovom uništenju a da ih pri tome izravno ne suzbiju. Nekolicina poznatih insekticida ima selektivno djelovanje i suzbija samo određenu vrstu insekata (24). Insekticidi u prvom redu djeluju na živčani sustav, no poznato je također da djeluju toksično na probavni i respiracijski sustav te na kožu. Sličnosti između živčanog sustava insekata i čovjeka često dovode do

unakrsne toksičnosti. Njihovo prekomjerno korištenje može dovesti do neurotoksičnosti odnosno do malformacija živčanog sustava (22,24). Ranih 1940-tih godina na tržište su uvedeni prvi organoklorini insekticidi širokog spektra djelovanja. Njih su ubrzo zamijenili organofosfati i karbamati, piretroidi, a 1990-tih neonikotinoidi (22).

Najstarija skupina insekticida su organoklorati, koji su zbog svoje sposobnosti akumuliranja u mastima, sve više mijenjale druge kemijske skupine. Najpoznatiji primjer organoklorinih pesticida je već spomenuti DDT (23). Osim njega, toj skupini pripadaju još izodrin, aldrin, lindan, dieldrin i drugi (25). Njihovo glavno obilježje je toliko duboka akumulacija u masnom tkivu da neki insekticidi gotovo zauvijek ostanu u masnom tkivu organizama koji su njima bili izloženi. Učinkoviti su u prolasku krvno-moždane i placentalne barijere, a dokazano je da se skladište i u masnom tkivu fetusa. Preko bubrega se izlučuju samo produkti biotransformacije, ali ne i sami pesticidi. S druge strane, organofosforini insekticidi su derivati fosforne ili tiofosforne kiseline. Vrlo su otrovne tvari koje su se nekad koristile kao bojni otrovi. U Hrvatskoj se najčešće koriste malation, paration, diazinon i naled (23). Imaju sposobnost brzog prodiranja u biljno tkivo, razgrađuju se lako a da pritom ne nastaju toksični produkti. Općenito, svi organofosfatni insekticidi imaju jaku moć apsorpcije svim putevima. Prolaznost tjelesnih barijera ponajviše ovisi o lipofilnosti samog spoja. Najviše se akumuliraju u jetri, bubrezima, masnom tkivu te žlijezdama s unutarnjim izlučivanjem. Glavni mehanizam njihovog toksičnog djelovanja je blokiranje enzima acetilkolinesteraze, enzima odgovornog za razgradnju neurotransmitera acetilkolina koji prenosi podražaje među živčanim vlaknima. Prekid prenošenja podražaja preko živčanog vlakna rezultira smrću kukaca koja proizlazi zbog paralize osnovnih živčanih procesa (23,24).

Karbamati imaju sličan mehanizam djelovanja kao i organofosfatni insekticidi, međutim smatraju se manje otrovnim za čovjeka. Izrazito dobro prolaze sve tjelesne barijere. Sintetizirani su s namjerno da se pronađe dostojna zamjena za organoklorne insekticide zbog njihovog negativnog djelovanja na okoliš i čovjeka. Biotransformiraju se u procesima hidrosidacije, hidrolize i konjugacije s glukuronskom kiselinom, a nastali metaboliti nemaju istu biološku aktivnost kao početna tvar (23,24).

Najnoviju skupinu insekticida čine neonikotinoidi. Najšire korišten neonikotinoid u poljoprivredi za zaštitu usjeva od štetnika je imidaklopid (IMI). Neonikotinoidi djeluju kao agonisti nikotinskih acetilkolinskih receptora. Vrlo su učinkoviti u suzbijanju različitih vrsta insekata, a rezistentnost kukaca na njihovo djelovanje je izrazito mala. Zbog široke primjene neonikotinoida, često se pronalaze u tlu, površinskim i podzemnim vodama (26).



Slika 3. Kemijske strukture pojedinih insekticida

Izvor: https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structure-of-insecticides-have-been-using-for-pine-weevil-control_fig17_239522273

1.3. Herbicidi

Herbicidi su pesticidna sredstva koja odstranjuju neželjene biljne vrste (korove), ometajući biokemijske procese koje su potrebne za njihov daljnji razvoj, a da pri tom ne djeluju štetno na biljnu vrstu koja je cilj uzgoja. Nakon što biljka upije herbicidne komponente, one se prenose po biljci i inhibiraju normalno izvođenje fiziološko-biokemijskih procesa što rezultira odumiranjem biljke.

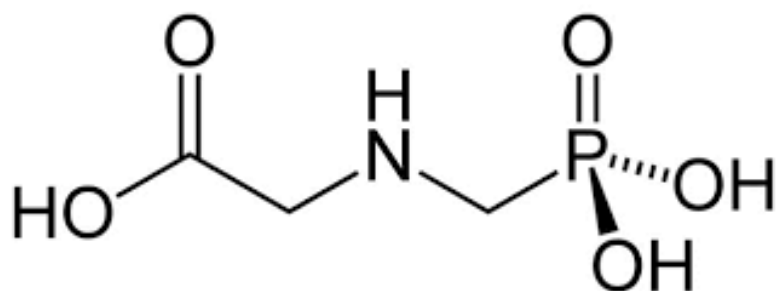
Generalno se herbicidi prema mehanizmu djelovanja mogu podijeliti:

- Inhibitori fotosinteze
- Inhibitori biljnog rasta
- Inhibitori biosintetičkih procesa
- Herbicidi nepoznatog mehanizma djelovanja (27)

Prilikom aplikacije, herbicid mora preko lista kroz kutikulu, epidermu, palisad doprijeti sve do floema. Također, herbicidne komponente mogu putem tla dospjeti u biljku. Razina djelovanja herbicida ovisi o tome je li on selektivan ili neselektivan. Selektivni herbicidi sprječavaju rast korovnih biljnih vrsta, a da pri tome ne djeluju štetno na kulturu. S druge strane, neselektivni herbicidi se koriste kad se želi uništiti sva moguća vegetacija koja je prisutna na tlu (23,24).

Dinitrofenoli su pesticidna sredstva koja mogu imati učinak insekticida, herbicida i fungicida. Najpoznatiji predstavnici dinitrofenola su: dinosebacetat (DNC), dinitroortokrezol (DNOC) i dinitrobutilfenol (DNBP) (24). Najčešće korišteni herbicid iz skupine fenil ureja herbicida je zasigurno diuron. Najviše se primjenjuje na poljoprivrednim usjevima za suzbijanje biljne vegetacije koja nije ciljna kultura (28). U biljci smanjuje mogućnost fotosinteze i onemogućuje stvaranje adenozin trifosfata (29).

Osim njih, valja spomenuti najkorišteniji pesticid na svijetu, glifosat, koji spada u skupinu organofosfornih herbicida. Jako je štetan za biljne vrste jer sprječava sintezu esencijalnih aminokiselina potrebnih za njihov rast (30). Djeluje kao sol, najčešće s kationima natrija ili izopropilaminom. Kako bi bio učinkovit u svojoj namjeni, glifosat se nanosi na listove biljaka. Glifosat sprječava sintezu aminokiselina fenilalanina, tirozina i triptofana, bez kojih je izgradnja biljne stanice neizvediva. To je jedina molekula koja veoma učinkovito inhibira enzim 5-enolpiruvil-šikimat-3-fosfat sintazu (EPSPS) šikiminskog puta (31).



Slika 4. Kemijska struktura herbicida glifosata

Izvor: https://www.researchgate.net/figure/Molecular-structure-of-glyphosate_fig1_322333408

1.4. Pesticidi u vodi

Osiguravanje dostatne količine zdravstveno ispravne vode za piće jedan je od temeljnih uvjeta očuvanja ljudskog zdravlja. Zdravstveno ispravnom vodom se smatra voda dobrih senzorskih svojstva, odnosno voda koja ne sadrži tvari u koncentraciji koje mogu nanijeti štetu ljudskom zdravlju (32). Primjena pesticida i njihovih ostataka postala je problem zbog mogućnosti onečišćenja podzemnih i površinskih voda, te posljedično potencijalnog utjecaja na okoliš i javno zdravlje (33). Upravo zbog toga, bitno je praćenje njene kvalitete koja se može narušiti ako u nju dospiju kemijske tvari, primjerice pesticidi (34). Nakon što se ispuste u okoliš, pesticidi mogu biti podložni ulasku u vodene ekosustave difuzno ili putem točkastih izvora. Prenošenje pesticida putem zraka spada u difuzne izvore. To podrazumijeva odnošenje pesticida vjetrom tijekom prskanja pesticida i isparavanje nakon primjene što može dovesti do taloženja spojeva u udaljenim ekosustavima od njihove početne primjene (35). Za većinu trenutno korištenih pesticida prijenos putem zraka je ograničen na radijus od 300 km jer su manje postojani za prenošenje na veće udaljenosti (36). Uz to, kod velike količine padalina tlo gubi sposobnost apsorbiranja vode te dolazi do zasićenosti tla vodom zbog čega pesticidi prisutni u tlu dospijevaju u vodene ekosustave. Površinski tok koji se stvara prilikom dodatnih padalina izaziva eroziju tla što rezultira otjecanje pesticida iz tla u podzemne tokove. Svi navedeni primjeri su difuzni izvori koji nisu pod potpunom kontrolom čovjeka (35).

S druge strane, pesticidi mogu dospjeti u vodu putem točkastih izvora kao rezultat ljudske pogreške. To se uglavnom odnosi na unos pesticida u vodeni sustav koji je povezan s

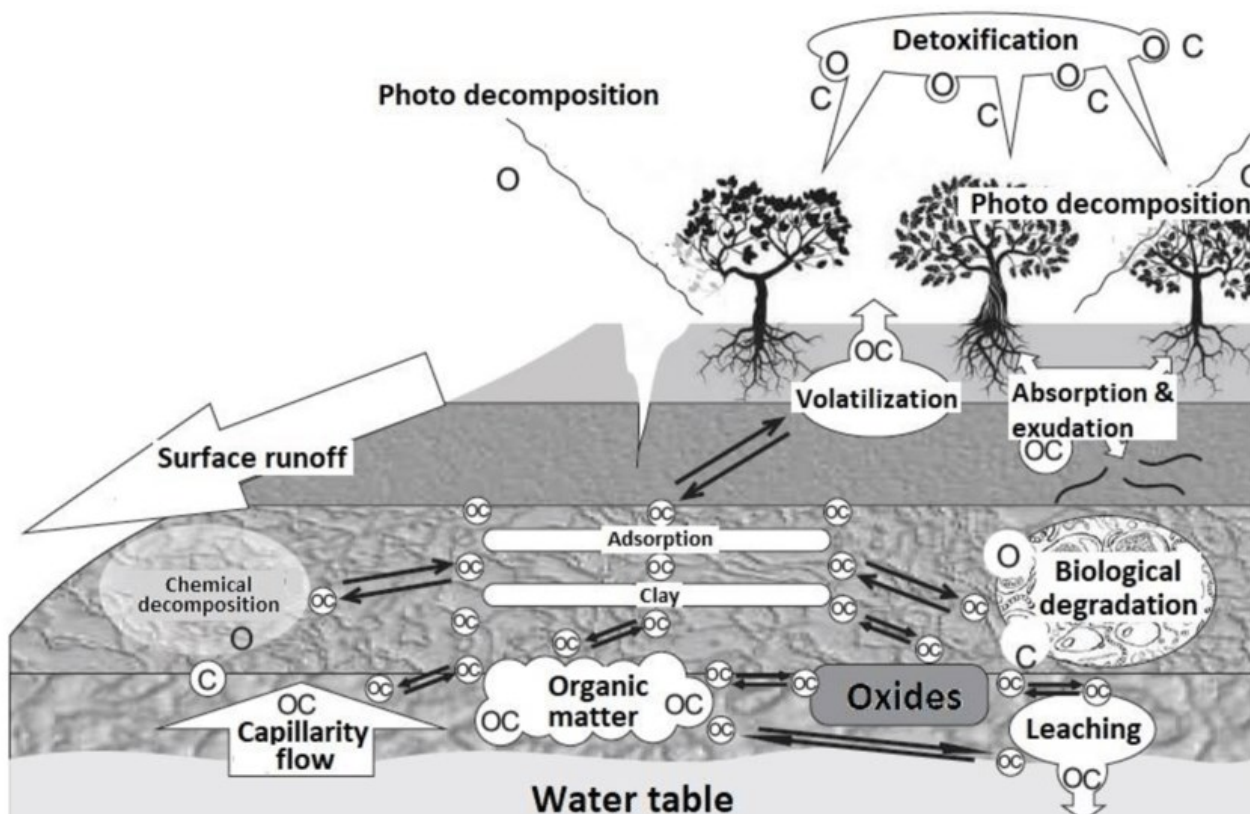
mjestima aplikacije, valjanosti strojeva te manipulacijom ambalaže (37). Uzrok mogućeg otjecanja pesticida u vodeni tok je i nepostojanje sustava odvodnje otpadnih voda. Ukoliko pesticidi dospiju u otpadnu vodu, većina pročišćivača otpadnih voda nema filter s aktivnim ugljen koji bi eliminirao prisutne pesticide.

Koncentracija pesticida koja dospije u vodene ekosustave varira ovisno o fizikalno-kemijskim svojstvima samog spoja kao i o zemljopisnim, geološkim, hidrološkim i klimatskim uvjetima i vrsti usjeva (36). Rijeka, jezera i potoci koji se nalaze u blizini poljoprivrednih usjeva mogu doći u doticaj s tragovima pesticida. Pesticidi koji se pronadu u površinskim vodama vrlo lako mogu dospjeti u podzemne vode zbog otjecanja tla (34). Stoga je potrebno točno i učinkovito praćenje pesticida i njihovih ostataka u izvorima vode i vodi za ljudsku potrošnju. Zbog njihove toksičnosti Američka agencija za zaštitu okoliša (EPA) i Europska unija (EU) uvrstile su pesticide na svoj popis prioriternih zagađivača (38).

Pesticidi nakon primjene kruže u okolišu na različite načine. Ukoliko biljka ne apsorbira pesticid, on će se zadržati u tlu ili će biti podvrgnut razgradnji u neki metabolit. Pesticide topljive u vodi odnijeti će molekule vode sa sobom, posebno tijekom velike količine padalina te će se cijediti prema donjim slojevima tla i na kraju dospjeti u podzemnu vodu (39). Kontaminaciji vode pesticidima također pridonose isparljivi pesticidi u atmosferi koji se vraćaju nazad u vodu tijekom padalina. Uglavnom pesticidi u hidrološki sustav ulaze procjeđivanjem površinskih voda kroz slojeve tla pri čemu na stupanj onečišćenja pesticidima u vodi utječu svojstva pesticida, karakteristike tla i okolišni uvjeti (40).

S obzirom na to da su većim dijelom pesticidi organski spojevi, oni se razgrađuju mikrobnim, fotokemijskim ili kemijskim reakcijama. Mikrobnu razgradnju pesticida uključuje proces mineralizacije pri čemu se pesticid razlaže na ugljik i proces kometabolizacije pri kojem se pesticid pretvara u druge kemijske oblike. Razgradnja pesticida fotolizom uvjetovana je prisutnošću ultraljubičastog (UV) svjetla. Kemijska razgradnja pesticida podrazumijeva redoks reakcije i hidrolizu sa zrakom, vodom i drugim spojevima u okolišu. Pesticidi s niskom sposobnošću biorazgradnje imaju dulji poluvijek i skloniji su dužem opstajanju u okolišu kontaminirajući tako izvore vode. Prilikom razgradnje pesticida stvaraju se metaboliti, anorganski krajnji produkti koji mogu biti veće ili manje toksičnosti od polaznog pesticida. Osim toga, mobilnost pesticida ovisi o sposobnosti adsorpcije i topljivosti pesticida. Pesticidi koji imaju sposobnost snažnog adsorbiranja u tlo manje će infiltrirati prema dolje kroz tlo, no lako se mogu prenijeti erodiranim česticama tla preko površinskog otjecanja i na kraju doći do podzemnih voda (40). Pesticidi s dugim poluvijekom, slabim kapacitetom adsorpcije na čestice

tla i dobrom topljivošću imaju sposobnost ispiranja i otapanja u vodi. Herbicid atrazin je vrlo postojan i kao takav se smatra sposoban za ispiranje u podzemne vode. S druge strane, cijanazin je slabije postojan stoga ima manji potencijal ispiranja. Pesticid 2,4-D je pesticid topiv u vodi koji se brzo razgrađuje biološkim djelovanjem stoga je manja vjerojatnost da će se akumulirati u tlu (41).



Slika 5. Putovi ulaska pesticida u vodeni okoliš i mobilizacija iz tla

Izvor: https://www.researchgate.net/figure/Pathways-of-entry-of-pesticides-into-the-aquatic-environment-and-mobilization-from-the_fig1_332940602

1.4.1. Zakonska regulativa i monitoring ostataka pesticida u vodama

Prema Zakonu o vodama, praćenje kakvoće površinskih, priobalnih i podzemnih voda je u nadležnosti Hrvatskih voda. Praćenje površinskih voda obuhvaća kontrolu ekoloških i kemijskih pokazatelja, dok se za podzemne vode prate kemijski i količinski pokazatelji. Prilikom praćenja kemijskog stanja površinskih voda velika pažnja se posvećuje tvarima za koje na razini EU postoje propisani standardi Direktivom 2013/39/EU o izmjenama i dopunama

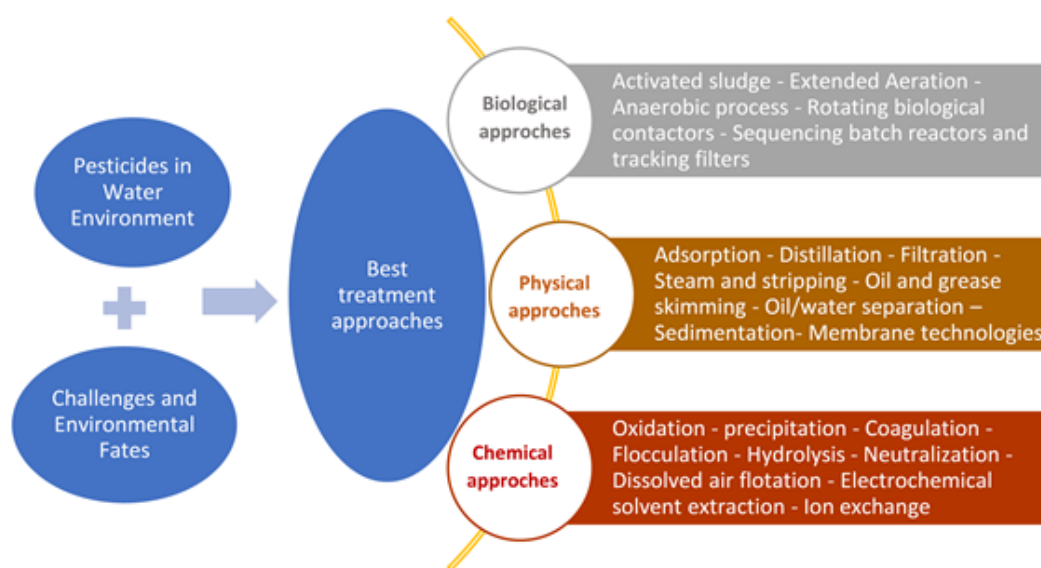
Direktiva 2000/60/EZ i 2008/105/EZ o prioritetnim tvarima u području vodne politike (42). Na Popisu prioritetnih tvari u području vodne politike nalazi se 45 tvari, od kojih je 21 tvar utvrđena kao prioritetno opasna tvar (43).

Zakon o vodi za ljudsku potrošnju prenosi opće odredbe stare Direktive 98/83 EZ (44). Pravilnikom o parametrima sukladnosti, metodama analize, monitoringu i planovima sigurnosti vode za ljudsku potrošnju te načinu vođenja registra pravnih osoba koje obavljaju djelatnost javne vodoopskrbe je uređen način i učestalost vršenja uzorkovanja vode za ljudsku potrošnju. Također, u navedenom Pravilniku je određen popis i vrijednosti parametara koji se ispituju, vrste analiza i njihov opseg te sve ostalo što je potrebno za monitoring (45). Svrha Zakona o održivoj uporabi pesticida (NN 46/22) je ostvarivanje održive uporabe pesticida, smanjenje rizika i nepovoljnih učinaka od upotrebe pesticida na ljudsko zdravlje te zaštitu okoliša i očuvanja bioraznolikosti (46).

Pesticidi koji se prate u površinskim i podzemnim vodama su uglavnom pesticidi koji se nalaze na Popisu prioritetnih tvari sukladno navedenoj Direktivi. Države članice Europske unije obvezne su pratiti te tvari i vršiti monitoring nad istima. S obzirom da su većim dijelom pesticidi koji sadrže navedene tvari odavno već zabranjeni za upotrebu, u praćenje je potrebno uvrstiti ona sredstva koja se koriste u Hrvatskoj, a mogu štetno utjecati na vodeni ekosustav. Praćenje kvalitete vode za piće je u nadležnosti Ministarstva zdravstva. Hrvatski zavod za javno zdravstvo zajedno s županijskim zavodima vrše analize praćenja kvalitete vode. Zagađenje podzemnih voda u Hrvatskoj predstavlja značajan problem budući da 90% stanovništva koristi podzemnu vodu kao izvor vodoopskrbe (42). Direktivom o kvaliteti vode namijenjene za ljudsku potrošnju 2020/2184 Europskog parlamenta i Vijeća određena je maksimalno dopuštena koncentracija pesticida u uzorcima vode koja iznosi 0,1 mikrograma po litri ($\mu\text{g/L}$), odnosno maksimalno dopuštena koncentracija ukupnih pesticida u uzorku vode ne smije prelaziti 0,5 mikrograma po litri ($\mu\text{g/L}$). Pod pojmom „pesticidi“ podrazumijevaju se: organski insekticidi, organski herbicidi, organski fungicidi, organski nematocidi, organski akaricidi, organski algicidi, organski rodenticidi, organski slimicidi, srodni proizvodi (među ostalima, regulatori rasta) kao i njihovi metaboliti koji se smatraju relevantnima za vodu namijenjenu za ljudsku potrošnju. Koncentracija od 0,1 $\mu\text{g/L}$ se odnosi na sve pesticide osim na aldrin, dieldrin, heptaklor i heptaklor epoksid čija koncentracija ne smije biti veća od 0,03 $\mu\text{g/L}$ (38).

1.4.2. Metode uklanjanja pesticida iz vode

Vodeni ekosustavi postaju jako onečišćeni industrijskim, poljoprivrednim, rudarskim i urbanim otpadnim vodama koji su izvor znatnih količina pesticida. Danas postoje različite tehnike obrade i uklanjanja pesticida iz vode koje uključuju kombiniranje metoda fizikalnog, kemijskog i biološkog pročišćavanja (**Slika 6**). Svaka navedena tehnika obrade voda ima svoje prednosti i ograničenja ne samo u smislu kapitalnih i operativnih troškova, već i u smislu učinkovitosti, pouzdanosti te utjecaja na okoliš (47).



Slika 6. Različite biološke, fizikalne i kemijske metode pročišćavanja otpadnih voda (47)

1.4.2.1. Kemijska obrada vode

Kemijska metoda obrade otpadnih voda podrazumijeva razne kemijske reakcije koje pomažu u razgradnji pesticida u sigurnije kemikalije. Jedne od glavnih kemijskih metoda su koagulacija i napredni oksidacijski proces (AOP), ozoniranje i Fentonov tretman. Uglavnom se navedene metode koriste u kombinaciji s fotokatalizom i/ili membranskim tehnikama (48). Napredni oksidacijski procesi (AOP) koriste oksidacijska sredstva za oksidaciju pesticida. Najčešće korišteni oksidacijski radikali su hidroksilni radikal ($\cdot\text{OH}$) i sulfatni radikal ($\text{SO}_4\cdot^-$) (49). Ekološki je prihvatljiva metoda koja može razgraditi organske kontaminante u bezopasne tvari (50). Općenito se metoda dijeli na tretmane temeljene na ozonu, ultraljubičastim (UV) zrakama, elektrokemijskim naprednim oksidacijskim procesima (eAOP), katalitičkim

naprednim oksidacijskim procesima (cAOP) i foto naprednim oksidacijskim procesima (pAOP). Osim pomoću AOP-a, pesticidi se iz vode mogu ukloniti ozoniranjem. Ozonizacija može imati izravan učinak na onečišćujuće tvari u vodi uz djelovanje molekula ozona, ali i neizravni oksidacijski učinak pomoću slobodnih radikala koji nastaju razgradnjom ozona u vodi. Proizvedeni slobodni radikali su visoko reaktivni i manje selektivni od kemijskih oksidansa. Ozon ima vrlo kratak vijek postojanosti, pa bi se trebao stvarati prilikom izvođenja metode, što povećava cijenu postupka. Uklanjanje 40 različitih pesticida pomoću ozoniranja proučavali su Ormad i sur. (2008). Rezultati su pokazali uklanjanje 70% izoproturona, 75% diurona i paration metila dok je uklonjeno samo 50% razine atrazina. Međutim, kada se ozoniranje kombiniralo s aktivnim ugljenom, brzina uklanjanja atrazina dosegla je 90%, dok je preostalih tri pesticida 100% uklonjeno (51). Metodom ozoniranja uz dodatak nano-ZnO (nZnO) postignuto je 100%-tno uklanjanje atrazina iz kontaminirane vode (52). Najučinkovitijom metodom oksidacije za uklanjanje organskih onečišćenja smatra se Fenton tehnologija (53). Fenton tehnologija se pokazala učinkovita u uklanjanju organofosfatnih insekticida fenitrotona i klorfenvinfososa te organoklornih pesticida iz otpadne vode (54).

1.4.2.2. Fizikalna obrada vode

Tehnike membranske filtracije su najčešće korištene metode pročišćavanja otpadnih voda. S obzirom na vrstu membrane i ciljanim onečišćenjima, filtracija se može provesti u bilo kojoj fazi tijekom obrade vode. Vrsta filtracije ovisi o veličine same membrane (55). Nano-filtracijske membrane s veličinom pora između 10^{-2} i 10^{-3} μm idealne su za uklanjanje bakterija, virusa i velikih organskih molekula (56). Ahmad i sur. (2008) su utvrdili četiri različite vrste poliamidnih nanomembrana za filtraciju organofosfatnog insekticida dimetoata te atrazina, budući da su oba pesticida poznata kao toksična za ljudsko zdravlje. Najboljom membranom među četiri testirane imenovana je NF90 sa stopom zadržavanja od 85% za dimetoat i 95% za atrazin (57). Uklanjanje diurona i izoproturona početne koncentracije od 2 mg/L iz vode poljoprivrednih polja proučavali su Mehta i sur. (2015). Pri postupku je korištena tankoslojna kompozitna poliamidna membrana reverzne osmoze, a više od 95% pesticida je uklonjeno (58). Proces adsorpcije aktivnim ugljenom najučinkovitiji je i najperspektivniji temeljni pristup u procesima pročišćavanja otpadnih voda. Upotreba tehnologije adsorpcije u pročišćavanju otpadnih voda još uvijek je skup proces, uglavnom zbog visoke cijene adsorbenta. Komercijalni aktivni ugljen proizveden za postizanje preciznih površinskih svojstava skup je i zahtijeva razrađene procese reaktivacije i regeneracije (59). Najveći postoci uklanjanja pesticida uz

pomoć aktivnog ugljena dobiveni su za heptaklor, drine i DDT, kao i za trifluralin, klorpirifos, heksaklorobenzen, metoksiklor i tetradifon, s učinkovitošću iznad 90% (60).

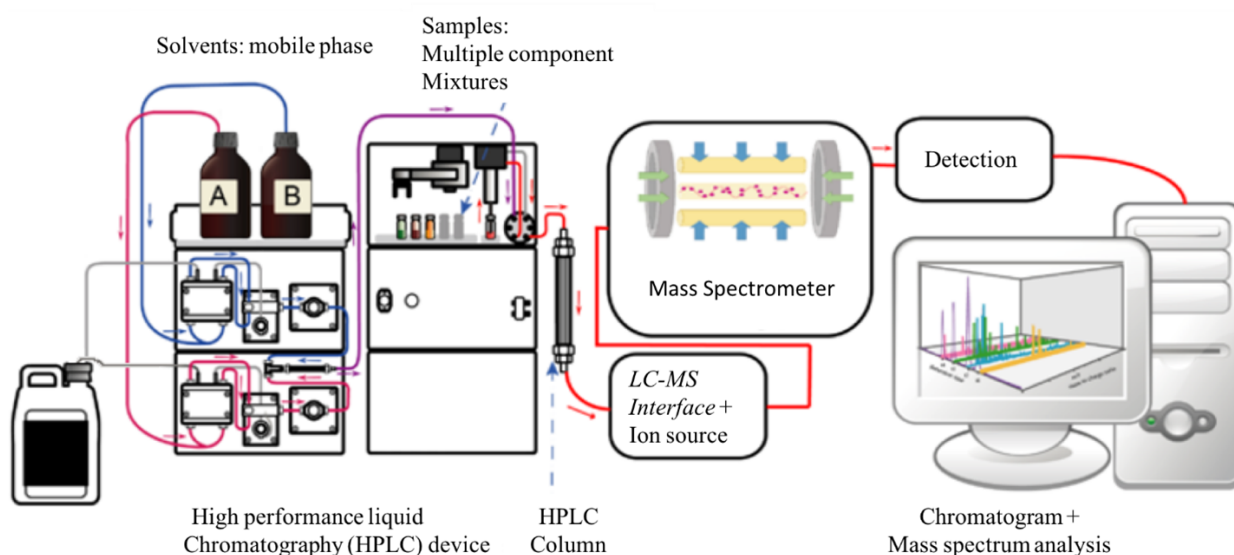
1.4.2.3. Biološka obrada vode

Različiti bio sustavi za pročišćavanje otpadnih voda sadrže mikroorganizme koji su sposobni razgraditi pesticide. Bio-smjese su obično izrađene od tvari bogatih huminima za povećanje zadržavanja pesticida, tla i mikroorganizama (61). Biološki postupak pročišćavanja dijeli se na aerobni i anaerobni tretman. Poznato je da se diklorirani pesticidi razgrađuju aerobnom metodom, koja uključuje oksidaciju i cijepanje eterske veze, te hidroksilaciju klorofenola kako bi se formirao klorokatehol. Nakon što se aromatski prsten otvori, spoj se može lako razgraditi bakterijskim metabolizmom u vodu i ugljični dioksid (62). Di-klorirani pesticidi se također mogu anaerobno probaviti reduktivnom dehalogenacijom. Nakon što je količina atoma klora dovoljno niska, spoj će se razgraditi u metan i ugljični dioksid (63). Biološka razgradnja pesticida je zahtjevna, no kada se jednom uspostavi, sustav biorazgradnje se može lako održavati. Prethodne obrade razgradnja određenih pesticida fotokemijskom razgradnjom ili enzimskim reakcijama može olakšati njihovu biološku pretvorbu (64). U nedavnoj studiji, aerobni biološki tretman prihvaćen je kao sekundarni tretman nakon fotokatalitičke obrade vode kontaminirane insekticidom klorpirifosom. Rezultati su pokazali da odabrani biološki tretman ima visoku učinkovitost uklanjanja tog insekticida (65). Membranski bioreaktor je jedna od novijih tehnologija u pročišćavanju otpadnih voda koja kombinira biološki postupak zajedno s tehnikama membranske filtracije. Unatoč visokoj učinkovitosti, tehnika zahtijeva veliku energiju i visoke troškove održavanja sustava (66).

1.4.3. Određivanje tragova pesticida u vodama

Detekcija i kvantifikacija pesticida u vodi određuje se tekućinskom i plinskom kromatografijom (LC i GC) (67). Korištenjem sve veće količine polarnih, nisko hlapljivih i/ili termolabilnih spojeve pesticida, potaknula je primjenu tekućinske kromatografije (LC) za njihovo određivanje. Najnovije tehnike analize pesticida i njihovih metabolita u uzorcima vode primjenjuju se u kombinaciji sa spektrometrijom masa (LC-MS). LC-MS je analitička tehnika koja uključuje fizičko odvajanje ciljnih spojeva (analita) nakon čega slijedi ionizacija molekula, te detekcija u analizatoru na temelju odnosa naboja i mase molekulskih iona, odnosno fragmenata izvornog spoja - pesticida. Za postizanje visoke osjetljivosti i selektivnosti, kombinacija tekućinske kromatografije s tandem masenom spektrometrijom pokazala se vrlo uspješnom (68,69). LC-MS/MS je sposoban kvantificirati tragova pesticida u vrlo složenim

matricama. Osim toga, korištenje MS-MS detekcije omogućuje analizu bez potpunog kromatografskog odvajanja između analita, čime se skraćuje vrijeme same analize. Najčešće korištene tehnike ionizacije u LC-MS instrumentima su ionizacija elektrosprejom (ESI) i kemijska ionizacija pod atmosferskim tlakom (APCI). Odabir najprikladnijeg izvora ionizacije i načina ionizacije (pozitivan, PI ili negativan, NI) ovisi o vrstama analiziranih pesticida. Karbamati, spojevi fenil ureje i triazini najbolje se ioniziraju uz korištenje APCI, a kationski i anionski herbicidi bolje se ioniziraju s ESI (70,71). Za analizu organoklornih pesticida primjenjuje se LC na nanoskali povezan s izvorom elektronske ionizacije (EI) (72).

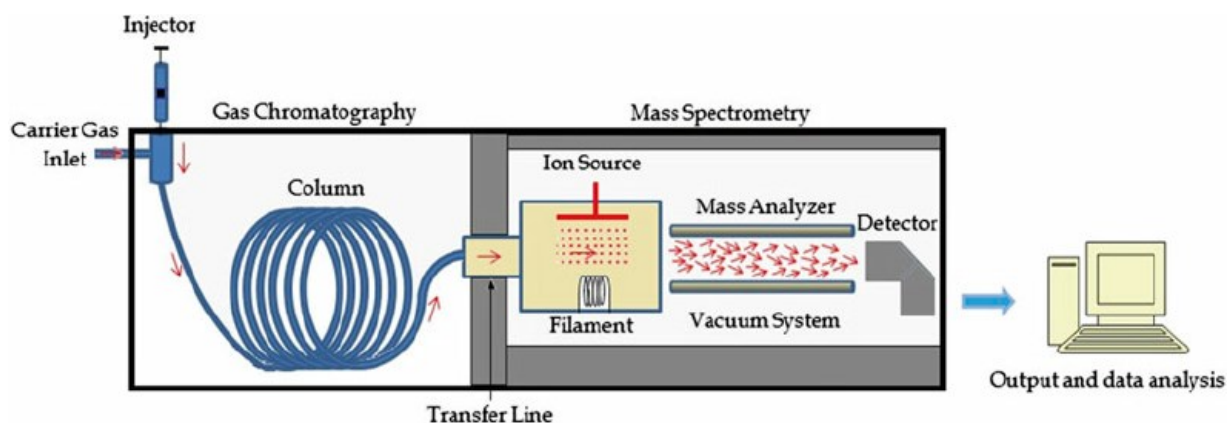


Slika 7. Prikaz sheme LC-MS

Izvor: <https://www.nebiolab.com/complete-guide-on-liquid-chromatography-mass-spectrometry-lc-ms/>

Plinska kromatografija-masena spektrometrija (GC-MS) je glavna usvojena analitička tehnika za izvođenje analize više ostataka nepolarnih, hlapljivih pesticida, kao što su organoklorni i organofosforni pesticidi. Komponente razdvojene plinskom kromatografijom odlaze u maseni spektrometar u kojem dolazi do ionizacije te nastaju molekularni ioni koji se u analizatoru odvajaju s obzirom na odnos mase i naboja. U GC-MS sustavu ionizacija pesticida se može postići elektronskim udarom (EI) ili pozitivnom ili negativnom kemijskom ionizacijom (PCI, NCI). Također, koriste se instrumenti s različitim analizatorima mase, na primjer magnetski sektori, kvadrupoli (Q), ionske zamke (IT) i analizatori vremena leta (TOF). Najbolja

selektivnost i osjetljivost za piretroidne insekticide postignuta je s negativnom kemijskom ionizacijom (73,74). Uz plinsku kromatografiju sa spektrometrijom masa, kao česta analitička metoda se još koristi plinska kromatografija (GC) pomoću dugih kapilarnih kolona i sa selektivnim i osjetljivim detektorima, kao što je elektronički detektor hvatanja (ECD). Detektor za hvatanje elektrona (ECD) je selektivni detektor za elektronegativne spojeve, posebno halogene kao što su organoklorni pesticidi. Relativna vremena retencije kriteriji su koji se primjenjuju za identifikaciju kromatografskih pikova, ali je ponekad potrebna dodatna potvrдна tehnika. U tu svrhu, osjetljivost i selektivnost mogu se poboljšati korištenjem tandemске masene spektrometrije (MS-MS). Druge alternative za potvrdu rezidua su korištenje različitih GC detektora, kao i korištenje dva GC stupca s različitim polaritetima (75,76). Organofosfatni pesticidi se u uzorcima vode uz već navedene metode mogu odrediti i plinskom kromatografijom s plameno-fotometrijskom detekcijom (FPD), plinskom kromatografijom s detekcijom ionizacije plamena (FID) te plinskom kromatografijom s detekcijom dušika i fosfora (NPD) (77).



Slika 8. Prikaz sheme GC-MS

Izvor: https://www.researchgate.net/figure/Schematic-plot-of-the-main-components-of-GC-MS-instruments_fig1_273955959

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja bio je odrediti koncentracije ostataka odabranih organofosforinih pesticida (OPP-a) i njihovih metabolita, organoklornih pesticida (CIP-a) te glifosata u uzorcima vode za ljudsku potrošnju, prirodnih mineralnih voda, prirodnih izvorskih voda, stolnih, površinskih i podzemnih voda koji su dostavljeni u svrhu analize na Zdravstveno-ekološki odjel Nastavnog zavoda za javno zdravstvo Primorsko – goranske županije (NZZJZ PGŽ). Uz to, u obzir su uzeta analitička izvješća određivanja pesticida u uzorcima vode za razdoblje od 2016. – 2021.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

- natrijev tetraborat dekahidrat (Borat-Pufer)
- Fmoc-Cl reagens
- fosforna kiselina
- diklormetan (DCM), za analizu ostataka pesticida
- n-heksan, LiChrosolv
- natrij-sulfat, bezvodni
- metanol LC-MS grade (za mobilnu fazu)
- amonijev formijat (pufer)

3.1.2. Pribor i oprema

- magnetska miješalica
- vakumski uparivač
- mikser
- tehnička vaga
- staklene bočice s plastičnim čepom i PTFE septumom od 2 ml (vialke)
- staklene bočice s metalnim čepom i PTFE septumom od 10 ml (vialke)
- staklene posudice za skupljanje frakcija
- odmjerne tikvice, pipete, menzure, Erlenmayerove tikvice, tikvice s okruglim dnom, tarionik
- filter papir, crna vrpca
- filter papir, 0,45 µm veličina pora
- LC-MS/MS Sciex Triple Quad™ 4500, HPLC Sciex ExionLC
- GC-MS Agilent 7000 Series Triple Quad
- GC-MS Shimadzu GC/MS-QP 2020 NX, Nexis GC 2030
- GC-ECD Scion 436-GC



Slika 9. LC-MS/MS Sciex Triple Quad™ 4500, HPLC Sciex ExionLC

Izvor: osobna arhiva



Slika 10. GC-MS Agilent 7000 Series Triple Quad

Izvor: osobna arhiva



Slika 11. GC-MS Shimadzu GC/MS-QP 2020 NX, Nexis GC 2030

Izvor: osobna arhiva



Slika 12. GC-ECD Scion 436-GC

Izvor: osobna arhiva

3.2. Metode

3.2.1. Priprema radnih standarda

Za pripremu radnih standarda OPP-a koncentracije 200 µg/mL, odnosno klorfenvinfosa, triazina i permetrina 100 µg/mL:

Svaki se standard razrijedi na 1 ng/µL. Odmjerna tikvica od 10 mL napuni se do 2/3 n-heksanom te se doda 50 µL (odnosno 100 µL) standarda i nadopuni do oznake n-heksanom. Zatim se u šest tikvica od 10 mL pipetira 5 mL n-heksana te se redom dodaje: 1 mL, 0,8 mL, 0,6 mL, 0,4 mL, 0,2 ml i 0,1 mL stock standarda. Potom se tikvice nadopune n-heksanom do oznake. Dobivena razrjeđenja su radni standardi od 0,10 ng/µL, 0,08 ng/µL, 0,06 ng/µL, 0,04 ng/µL, 0,02 ng/µL i 0,01 ng/µL.

Za pripremu smjese 30 pesticida koncentracije 200 µg/mL svaki, te dimetoata i klorpirifos-metila koncentracije 100 µg/mL:

Standard se u prvom stupnju razrijedi na 10 ng/µL. U vialku od 2 mL doda se 0,95 mL DCM-a te 50 µL standarda, odnosno za dimetoat i klorpirifos-metil doda se 0,90 mL DCM-a, te 100 µL standarda koncentracije 10 ng/µL. U drugom stupnju standard se razrijedi na 1 ng/µL. U vialku od 2 mL doda se 0,90 mL DCM-a, te 100 µL standarda koncentracije 10 ng/µL. Dobiveno razrjeđenje je stock standard iz kojeg se pripremaju radni standardi. Nakon toga se u šest vialki od 2 mL doda redom: 1,485 mL; 1,47 ml; 1,44 mL; 1,41 mL; 1,38 mL i 1,35 mL n-heksana, te injekcijskom iglom 15 µL; 30 µL; 60 µL, 90 µL; 120 µL i 150 µL stock standarda koncentracije 1 ng/µL. Dobivena razrjeđenja su radni standardi od 0,01 ng/µL, 0,02 ng/µL, 0,04 ng/µL, 0,06 ng/µL, 0,08 ng/µL i 0,10 ng/µL. Nakon pripremljenih standardnih otopina definira se baždarna krivulja.

3.2.2. Analiza uzorka

Analiza uzoraka vode na ostatke organofosfornih i organoklornih pesticida provodi se u dva koraka:

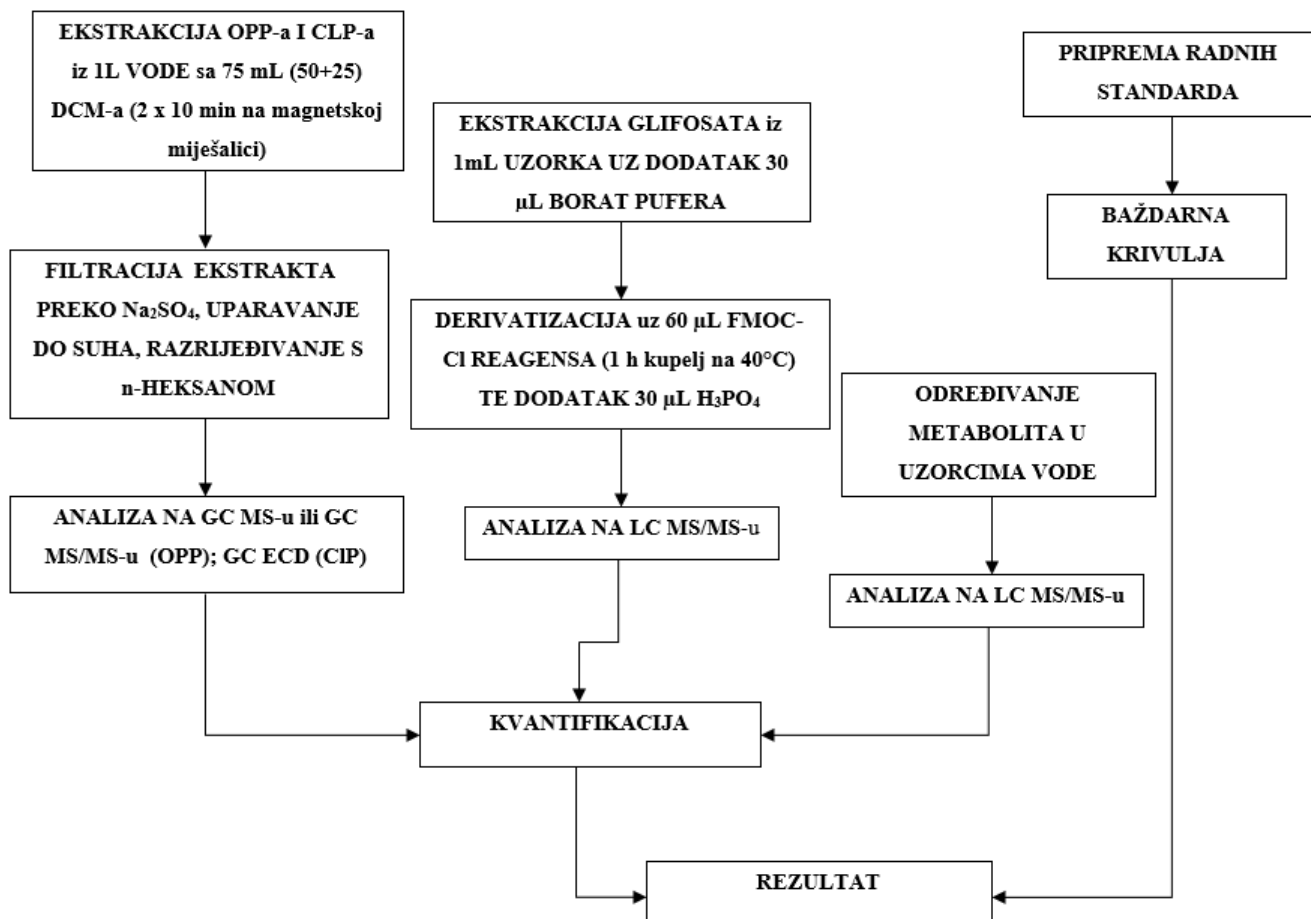
1. Priprema uzoraka
2. Završno određivanje

Postupak pripreme uzorka za određivanje ostataka organofosforinih pesticida je modifikacija postupka pripreme opisanog normama: HRN EN 12918:2002 Kakvoća vode – Određivanje parationa, metil- parationa i nekih drugih organofosforinih spojeva u vodi ekstrakcijom s diklormetanom i analizom plinskom kromatografijom (EN 12918:1999) i HRN EN ISO 10695:2002 Kakvoća vode - Određivanje odabranih organskih spojeva dušika i fosfora - Metode plinske kromatografije (ISO 10695:2000; EN ISO 10695:2000).

Postupak pripreme uzorka za određivanje ostataka organoklorinih pesticida je modifikacija postupka pripreme opisanog u normi HRN EN ISO 6468:2002 Kakvoća vode – Određivanje nekih organoklorinih insekticida, polikloriranih bifenila i klorbenzena – Metoda plinske kromatografije nakon ekstrakcije tekuće-tekuće (ISO 6468:1996; EN ISO 6468:1996).

U bocu od 1L s uzorkom vode dodaje se 50 mL DCM-a te se pesticidi ekstrahiraju 10 minuta na magnetskoj miješalici. Nakon toga organski sloj se propušta kroz lijevak s filter papirom i malom količinom bezvodnog natrij-sulfata (da bi se uklonili eventualni tragovi vode) u tikvicu s okruglim dnom. Potom se u bocu dodaje još 25 mL DCM-a i ponovno stavlja na ekstrakciju sljedećih 10 min. Organski sloj se potom filtrira na isti način i u istu tikvicu. Tako spojeni ekstrakti se uparavaju na vakuum uparivaču. Uzorku se dodaje 2 mL n-heksana, te se 1 µL unosi u plinskokromatografsku kolonu.

Završno određivanje ostataka organofosforinih pesticida se provodi na plinskim kromatografima s MS i MS/MS detektorima, dok se za organoklorne pesticide provodi na plinskom kromatografu s ECD detektorom. U slučaju da je koncentracija nekog od analiziranih organoklorinih pesticida veća od maksimalno dopuštene koncentracije, potvrдна metoda prisutnosti te komponente provodi se na GC-MS-u ili GC-MS/MS-u. Prilikom određivanja glifosata akreditiranom metodom HRN EN ISO/IEC 17025:2017 uz pomoć tekućinske kromatografije sa spektrometrijom masa, u uzorcima vode prvo je potrebno izvršiti derivatizaciju uzorka vode pomoću FMOC-a, budući da je glifosat nehlapljiv, visoko topljiv u vodi ali netopljiv u organskim otapalima. Određeni metaboliti koji se određuju s tekućinskom kromatografijom, direktno se unose u kromatograf, bez prethodne pripreme (**Slika 13**).



Slika 13. Postupak određivanja OPP-a i njihovih metabolita, CLP-a te glifosata različitim analitičkim metodama

Izvor: osobna arhiva

Tablica 1. Popis pesticida i metabolita, te metoda određivanja njihovih koncentracija u svrhu revizijskog monitoringa

Pesticid	Metoda	Detektor	Pesticid	Metoda	Detektor
Izodrin**	GC	ECD	2,4 D	GC	MS/MS
Dimetoat**	GC	MS	Diuron	LC	MS/MS
Klorpirifos-etil**	GC	MS	MCPA	GC	MS/MS
Klorpirifos-metil**	GC	MS	Bromacil	GC	MS/MS
Malation**	GC	MS/MS	Mekoprop	GC	MS/MS
Ometoat**	GC	MS	Izoproturon	GC	MS/MS
Pirifos-metil**	GC	MS/MS	Desmetilizoproturon	GC	MS/MS
Glifosat	LC	MS/MS	Pendimetalin**	GC	MS
Klorfenvinfos**	GC	MS	Linuron	LC	MS
Fosetil	LC	MS/MS	Klorotoluron	LC	MS/MS
Malaokson	GC	MS/MS	Dimetenamid-p	LC	MS/MS
Atrazin**	GC	MS	Dikamba	LC	MS/MS
Simazin**	GC	MS	Prosulfokarb	LC	MS/MS
Terbutilazin**	GC	MS/MS	Mankozeb	LC	MS/MS
Destehil atrazin	GC	MS/MS	Propineb	LC	MS/MS
Deisopropil atrazin	GC	MS/MS	Tiofanat-metil	LC	MS/MS
Desetil terbutilazin	LC	MS/MS	Tebukonazol	LC	MS/MS
Desetil deisopropil atrazin	LC	MS/MS	Azoksistrobin	LC	MS/MS
2-hidroksi atrazin	LC	MS/MS	Folpet	GC	MS/MS
Hidroksi simazin	LC	MS/MS	Acetoklor	LC	MS/MS
Hidroksi terbutilazin	LC	MS/MS	Acetoklor ESA	LC	MS/MS
Desetil-2-hidroksi atrazin	LC	MS/MS	Acetoklor OXA	LC	MS/MS
Metribuzin	GC	MS/MS	S-metolaklor	LC	MS/MS
Bentazon	GC	MS/MS	Matolaklor OXA	LC	MS/MS
2,6-diklorobenzamid	GC	MS/MS	Matolaklor ESA	LC	MS/MS

(*) Pojmovi crveno istaknuti su metaboliti

(**) Pesticidi koji se analiziraju akreditiranim metodama

U **Tablici 1** su prikazani pesticidi i njihovi razgradni produkti koji se određuju u akreditiranom laboratoriju na Nastavnom zavodu za javno zdravstvo Primorsko – goranske županije. Također, u tablici su prikazane metode s kojima se oni određuju, kao i to da se određeni pesticidi analiziraju akreditiranim metodama. Uz to, valja spomenuti da se neki pesticidi kao što su dimetoat, ometoat, bentazon, MCPA, linuron, tebukonazol i drugi, mogu analizirati i s plinskom i tekućinskom kromatografijom.

Na Nastavnom zavodu za javno zdravstvo Primorsko – goranske županije analiziraju se uzorci vode na pesticide i njihove razgradne produkte u svrhu revizijskih monitoringa i za ostale zavode za javno zdravstvo na području Republike Hrvatske. Osim u svrhu revizijskog monitoringa, u akreditiranom laboratoriju se analiziraju pesticidi u uzorcima vode za Hrvatske vode.

3.2.3. Izračunavanje rezultata

Koncentracije pojedinih komponenti izračunavaju se iz jednadžbe dobivene kalibracijskim pravcem:

$$A_{komponente} = a \cdot c_{komponente}$$

$A_{komponente}$ = površina pika iz kromatograma uzorka

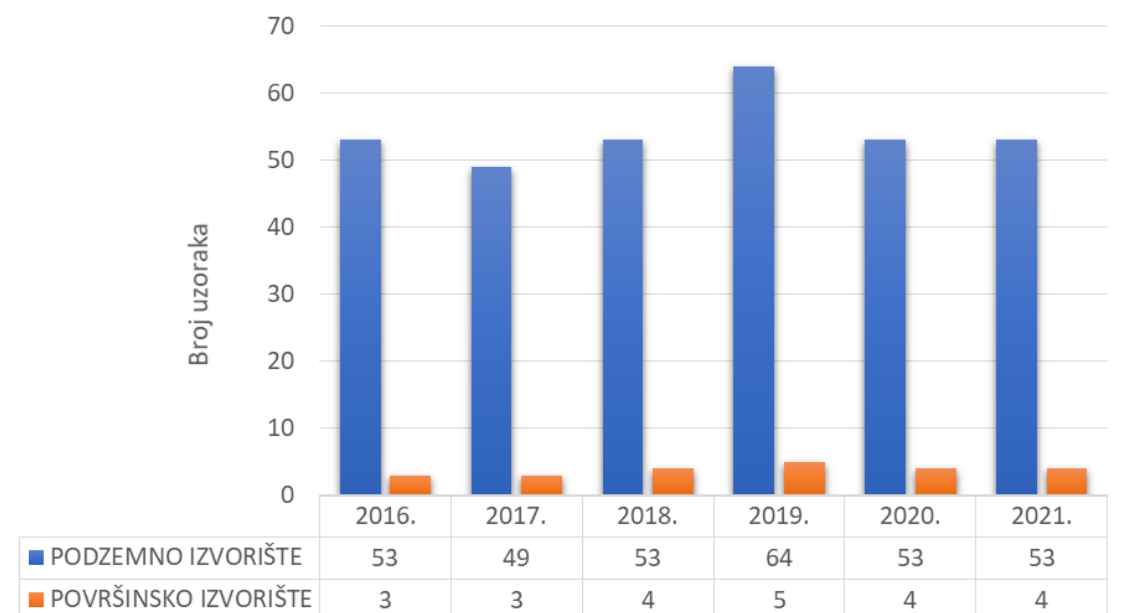
a = nagib kalibracijskog pravca

$c_{komponente}$ = koncentracija komponente

Rezultati se izražavaju u $\mu\text{g/L}$, za koncentracije $> 0,020 \mu\text{g/L}$ na dvije značajne znamenke.

4. REZULTATI

U svrhu revizijskog monitoringa, u razdoblju od 2016. do 2021. godine na Odsjeku za kontrolu voda, voda u prirodi, otpadnih voda, otpada, ekotoksikologiju i mikrobiologiju Nastavnog zavoda za javno zdravstvo Primorsko – goranske županije ukupno je analizirano 348 uzoraka (N=348) podzemnih i površinskih voda na odabrane pesticide (**Tablica 1**). Uzorci su uzorkovani na području Primorsko – goranske županije na vodoopskrbnim područjima DP Opatija – Rijeka – Krk, DP Cres – Lošinj, DP Hrvatsko primorje, DP Gorski kotar i DP Žrnovnica. Tijekom navedenih šest godina najveći broj uzoraka uzorkovan je iz podzemnih vodozahvata (N=325), a tijekom 2019. godine uzorkovano je najviše uzoraka (N=69) (**Slika 14**).



Slika 14. Grafički prikaz broja uzorka i vrsta vodozahvata tijekom razdoblja 2016. - 2021.

Svi uzorci su analizirani u akreditiranom laboratoriju uz pomoć plinske kromatografije s ECD i MS/MS detektorima, te tekućinske kromatografije s MS/MS detektorima. Prema dobivenim rezultatima, svi rezultati su bili ispod granica kvantifikacije (**Tablica 2**) i ispod maksimalno dopuštene koncentracije (**Tablica 3**). S obzirom na vrlo male koncentracije određenih pesticida u analiziranim uzorcima, rezultati analiza su istaknuti preko granica kvantifikacije. Granicu kvantifikacije čini najmanju koncentraciju analita koja se može kvantitativno odrediti u uzorku sa određenom sigurnošću.

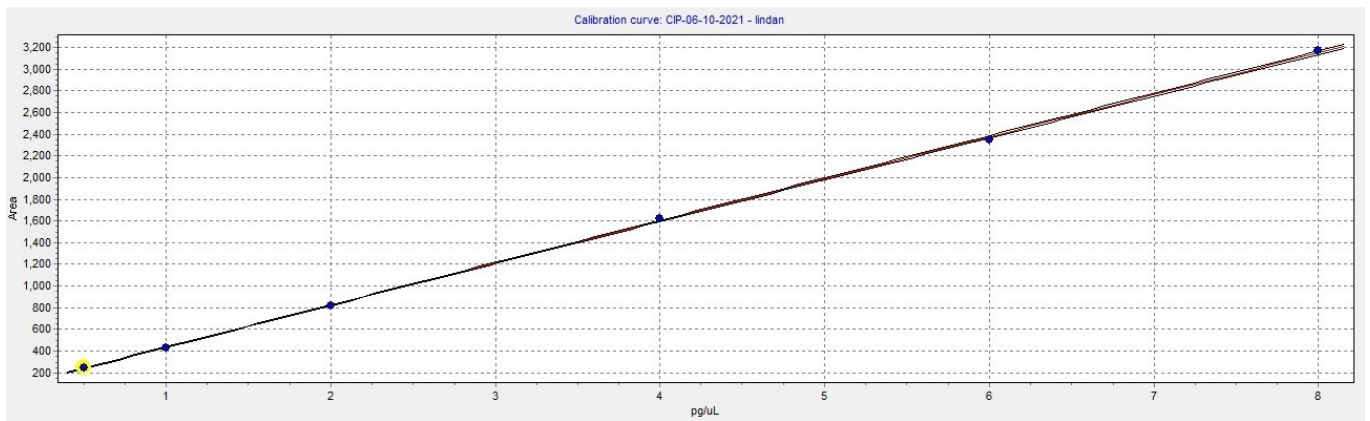
Tablica 2. Broj uzoraka podzemnih i površinskih izvorišta kroz šestogodišnje razdoblje (2016. – 2021.) te sadržaj odabranih pesticida u uzorcima vode

Broj uzoraka	Godina analize	Sadržaj odabranih pesticida*
56	2016.	<GK
52	2017.	<GK
57	2018.	<GK
69	2019.	<GK
57	2020.	<GK
57	2021.	<GK

*pesticidi navedeni u **Tablici 1**

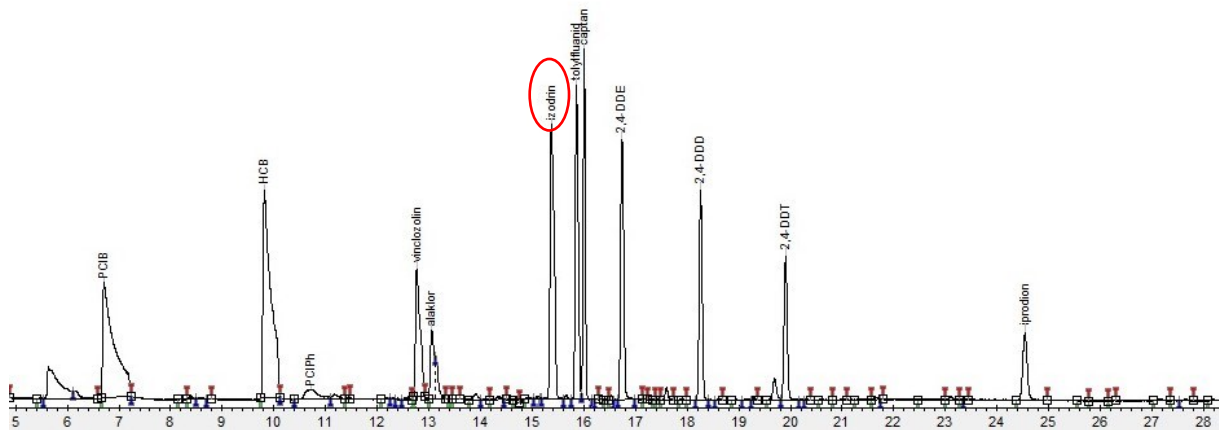
Tablica 3. Pesticidi i metaboliti koji se analiziraju u akreditiranom laboratoriju i njihove granice kvantifikacije i maksimalno dopuštene koncentracije ($\mu\text{g/L}$)

Pesticid	Granica kvantifikacije ($\mu\text{g/L}$)	MDK ($\mu\text{g/L}$)	Pesticid	Granica kvantifikacije ($\mu\text{g/L}$)	MDK ($\mu\text{g/L}$)
Izodrin	<0,001	0,10	2,4 D	<0,020	0,10
Dimetoat	<0,020	0,10	Diuron	<0,020	0,10
Klorpirifos-etil	<0,020	0,10	MCPA	<0,020	0,10
Klorpirifos-metil	<0,020	0,10	Bromacil	<0,020	0,10
Malation	<0,020	0,10	Mekoprop	<0,020	0,10
Ometoat	<0,020	0,10	Izoproturon	<0,020	0,10
Pirifos-metil	<0,020	0,10	Desmetilizoproturon	<0,020	0,10
Glifosat	<0,030	0,10	Pendimetalin	<0,020	0,10
Klorfenvinfos	<0,020	0,10	Linuron	<0,020	0,10
Fosetil	<0,020	0,10	Klorotoluron	<0,020	0,10
Malaokson	<0,020	0,10	Dimetenamid-p	<0,020	0,10
Atrazin	<0,020	0,10	Dikamba	<0,020	0,10
Simazin	<0,020	0,10	Prosulfokarb	<0,020	0,10
Terbutilazin	<0,020	0,10	Mankozeb	<0,020	0,10
Destehil atrazin	<0,020	0,10	Propineb	<0,020	0,10
Deisopropil atrazin	<0,020	0,10	Tiofanat-metil	<0,020	0,10
Desetil terbutilazin	<0,020	0,10	Tebukonazol	<0,020	0,10
Desetil deisopropil atrazin	<0,020	0,10	Azoksistrobin	<0,020	0,10
2-hidroksi atrazin	<0,020	0,10	Folpet	<0,020	0,10
Hidroksi simazin	<0,020	0,10	Acetoklor	<0,020	0,10
Hidroksi terbutilazin	<0,020	0,10	Acetoklor ESA	<0,020	0,10
Desetil-2-hidroksi atrazin	<0,020	0,10	Acetoklor OXA	<0,020	0,10
Metribuzin	<0,020	0,10	S-metolaklor	<0,020	0,10
Bentazon	<0,020	0,10	Matolaklor OXA	<0,020	0,10
2,6-diklorobenzamid	<0,020	0,10	Matolaklor ESA	<0,020	0,10



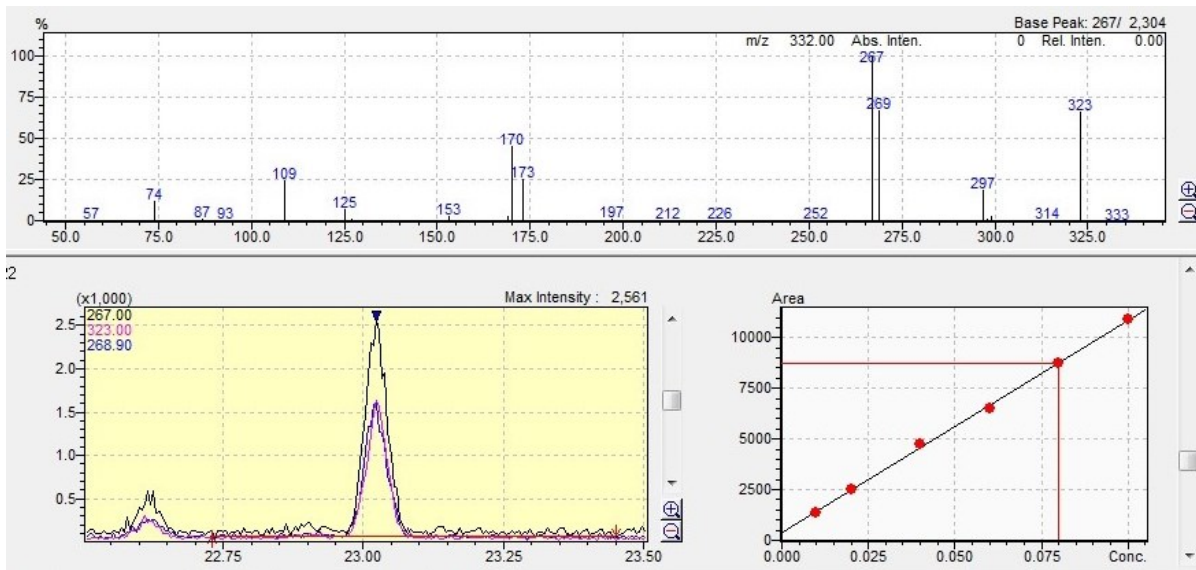
Slika 15. Kalibracija na GC – ECD-u za lindan

Izvor: osobna arhiva



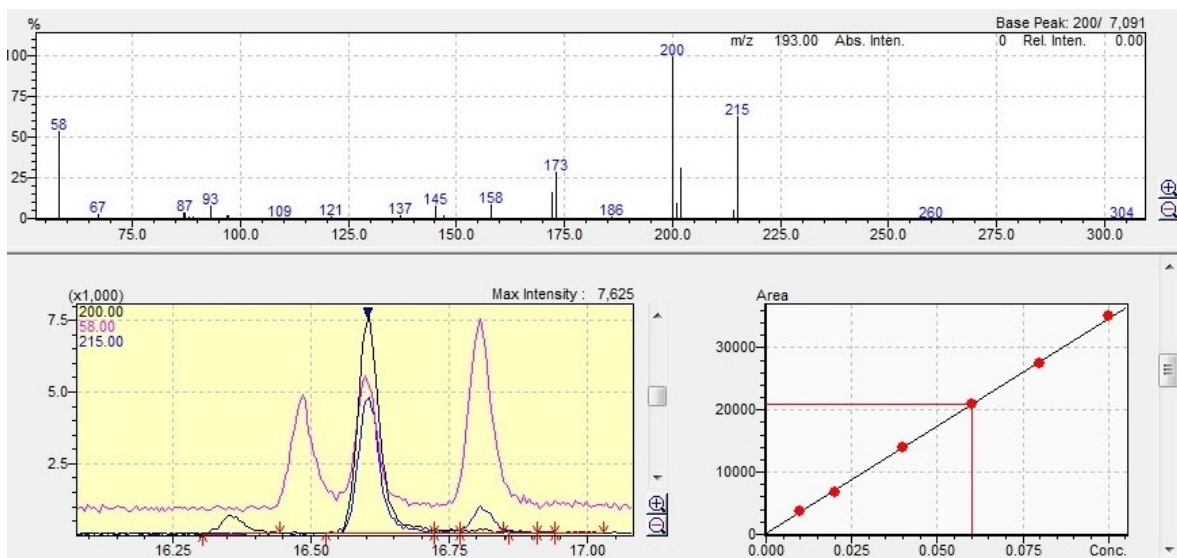
Slika 16. Izgled kromatograma standarda izodrina na GC – ECD-u

Izvor: osobna arhiva



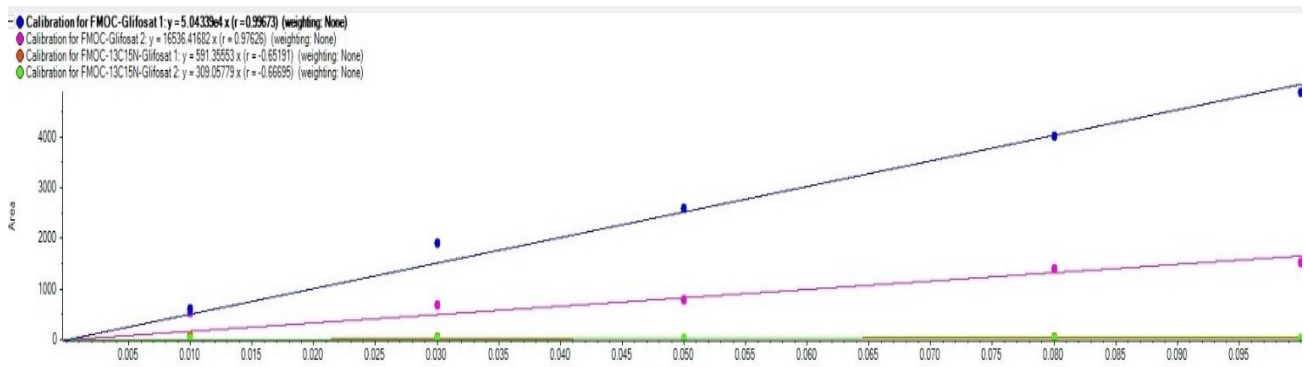
Slika 17. Klorfenvinfos GC – MS

Izvor: osobna arhiva



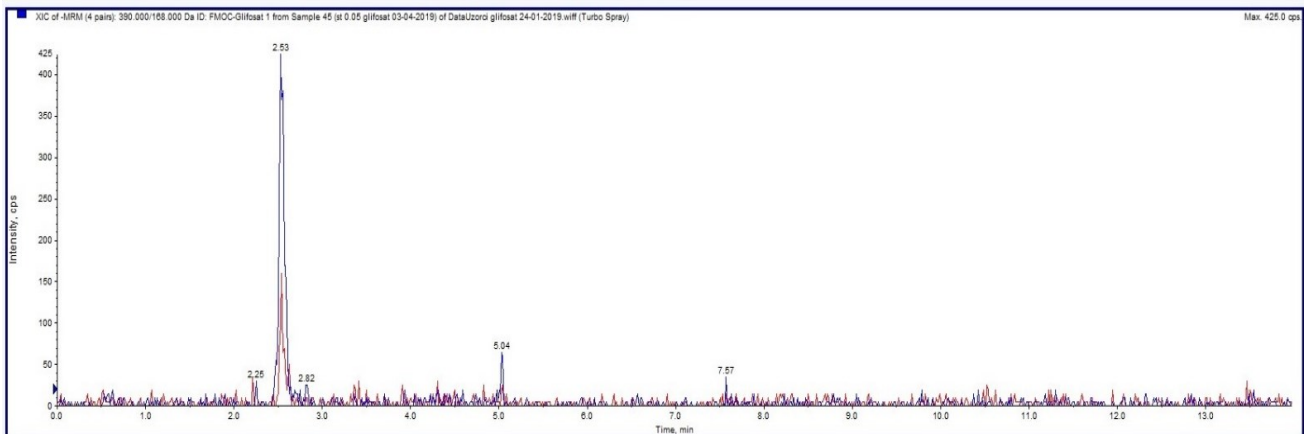
Slika 18. Atrazin GC – MS

Izvor: osobna arhiva



Slika 19. Kalibracija standarda glifosata na LC – MS-u

Izvor: osobna arhiva



Slika 20. Izgled kromatograma standarda glifosata na LC – MS/MS

Izvor: osobna arhiva

4.1. Validacija mjernog postupka

Validacija je dokumentirani sustav određivanja povoljnosti mjernog postupka za dobivanje kvalitetnih analitičkih podataka. Pomoću nje se potvrđuje da je taj mjerni postupak primjeren za namijenjenu svrhu (78). Kako bi analitički sustav postao validiran, nužno je provesti vrednovanje za sve bitne korake. Validacija mjernog postupka se izvodi procjenom točnosti i preciznosti, selektivnosti i specifičnosti, osjetljivosti metode, granica detekcije i kvantifikacije, linearnosti, iskoristivosti te otpornosti metode (79).

Tablica 4. Odabrani parametri validacije i kriteriji prihvatljivosti za glifosat

Parametar	Kriterij prihvatljivosti
Selektivnost	Retencijsko vrijeme (RT) i m/z
Točnost (iskorištenje)	$100 \pm 30\%$ (*)
Preciznost -ponovljivost mjerenja standarda -intermedijarna preciznost	$RSD \leq 25\%$ (*) $RSD \leq 25\%$
Linearnost	$k \geq 0,95$
Granica detekcije, $\mu\text{g/L}$	30% od GK (**)
Granica kvantifikacije, $\mu\text{g/L}$	manja od vrijednosti odgovarajućeg standarda kakvoće vodnog okoliša (***)

(*) Kriteriji prihvatljivosti za točnost i preciznost preuzeti iz AOAC INTERNATIONAL 2016 Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements

(**) N.N. 125/13 Pravilnik o parametrima sukladnosti i metodama analize vode za ljudsku potrošnju; Pravilnik o parametrima sukladnosti, metodama analize, monitoringu i planovima sigurnosti vode za ljudsku potrošnju te načinu vođenja registra pravnih osoba koje obavljaju djelatnost javne vodoopskrbe (NN 125/17)

(***) NN 66/19 Pravilnik o posebnim uvjetima za obavljanje djelatnosti uzimanja uzoraka i ispitivanja voda (Članak 14.)

Selektivnost se može definirati kao svojstvo metode da može odrediti skupine sličnih komponenti u uzorku, dok se pod specifičnošću misli na mogućnost da u isto vrijeme identificira ili kvantificira određene analite koji ne ovise jedan o drugom. Pri instrumentalnom određivanju, metoda koja je specifična će dati signal koji je odgovarajući samo odzivu analita, a selektivna metoda će dati zasebne signale za različite komponente i međusobno neće utjecati

na rezultat (79). Za selektivnost metode određivanja glifosata u vodi pomoću tekućinske kromatografije sa spektrometrijom masa primarni uvjeti selektivnosti uz retencijsko vrijeme su odgovarajući MRM prijelazi specifični za svaki analit. Kod uvođenja metode RT za glifosat je pri 2,47 min (**Tablica 5**).

Točnost je razlika mjerene i prave vrijednosti uglavnom dobivene sustavnom pogreškom, a izračunava se dobivanjem podataka tri mjerenja s tri različite koncentracije standarda (**Tablica 6**).

Preciznost uključuje dva pojma: ponovljivost rezultata dobivenih u istim uvjetima, u istom uzorku te istom metodom, a izračunava se na temelju dobivenog mjerenja tri puta, pet različitih koncentracija radnih standardnih otopina (**Tablica 7**), te intermedijarna preciznost koja se dobiva iz podataka dobivenih u dva eksperimenta od različitih analitičara.

Linearnost je osobina analitičke metode da unutar mjernog područja omogući proporcionalnu ovisnost mjernih rezultata o koncentraciji analita što je određeno kalibracijskim pravcem (79). Da bi se utvrdila linearnost neke metode, potrebno je analizirati najmanje pet različitih koncentracija (**Tablica 8**) (80).

Tablica 5. Rezultati validacije metode za određivanje glifosata u uzorcima vode za piće

Parametar	Rezultat	Kriterij prihvatljivosti
Selektivnost	2,47 min.	RT
	Q1 (kvantificirajući ion) = -390,00 Q2 (potvrđni ion) = -168,00 Q3 (potvrđni ion) = -150,00	Karakteristični m/z (MRM) (literatura)
Točnost (iskorištenje)	100 ±19,33%	100 ± 30%
Preciznost (ponovljivost)	MAX RSD = 9,7%	RSD ≤ 25%
Intermedijarna preciznost	MAX RSD = 13,33%	RSD ≤ 25%
Linearnost	k = 0,9976	k ≥ 0,95
Granica detekcije	0,004 ng/mL ili µg/L	≤ 0,05 µg/L
Granica kvantifikacije	0,012 ng/mL µg/L; 0,030 ng/mL ili µg/L	≤ 0,10 µg/L

Tablica 6. Rezultati ispitivanja točnosti metode dobiveni ponovljenim mjerenjem (tri mjerenja) standardne otopine koncentracija 0,030; 0,050 i 0,100 ng/mL

Dodana koncentracija, ng/mL	glifosat, %
0,030	97,0
0,030	105,3
0,030	107,0
0,050	102,6
0,050	97,2
0,050	98,2
0,100	101,1
0,100	99,2
0,100	102,0
Sr. iskorištenje	101,07
SD	3,532
RSD,%	3,49

Tablica 7. Rezultati ispitivanja preciznosti metode dobiveni ponovljenim mjerenjem (tri puta) radnih standarda pet različitih koncentracija

	0,010 ng/mL	0,030 ng/mL	0,050 ng/mL	0,080 ng/mL	0,100 ng/mL
glifosat	0,012	0,029	0,051	0,082	0,101
	0,013	0,032	0,049	0,080	0,099
	0,014	0,032	0,049	0,081	0,102
Sr.vrij.	0,013	0,031	0,050	0,081	0,101
RSD, %	0,001	0,002	0,001	0,001	0,001
Sr. RSD, %	0,001				

Tablica 8. Rezultati ispitivanja linearnosti pet različitih koncentracija standardnih otopina

	0,010 ng/mL	0,030 ng/mL	0,050 ng/mL	0,080 ng/mL	0,100 ng/mL
glifosat	0,012	0,029	0,051	0,082	0,101
	0,013	0,032	0,049	0,080	0,099
	0,014	0,032	0,049	0,081	0,102
Faktor korelacije, k	0,9976				
Jednadžba pravca	A= 10295,3590 2·c				

Granica detekcije (dokazivanja) uključuje najmanju koncentraciju analita u uzorku koju je moguće sa sigurnošću detektirati, ali ne i kvantitativno odrediti. Dobiva se na temelju sljedeće formule:

$$LD = \frac{3.3 \cdot \sigma}{S}$$

Granica kvantifikacije (određivanja) uključuje najmanju koncentraciju analita koja se može kvantitativno odrediti u uzorku uz dopuštenu pogrešku. To je parametar koji se najčešće određuje pri određivanju maksimalno dopuštene koncentracije onečišćenja i njihovih razgradnih produkata, a dobiva se formulom:

$$QL = \frac{10 \cdot \sigma}{S}$$

gdje su σ standardne devijacije odsječaka na y osi, a S srednje vrijednosti nagiba kalibracijskih pravaca. Pravci su nacrtani tako da ih čini samo jedna točka za svaku koncentracijsku razinu i ne prolaze kroz središte.

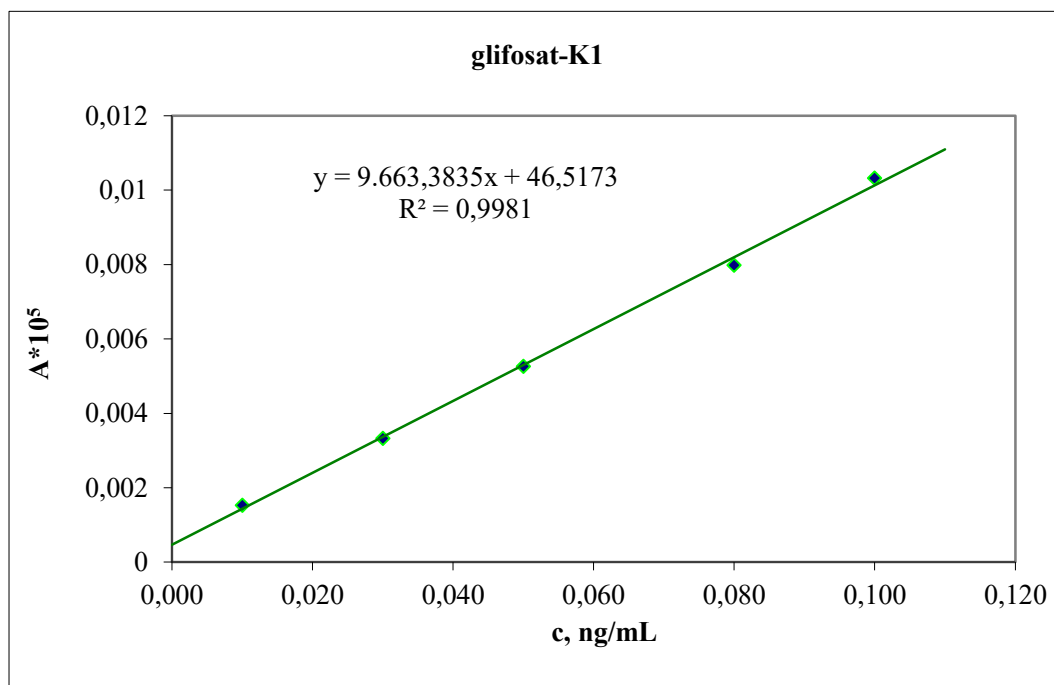
Kod određivanja granica detekcije i kvantifikacije, uzastopno se šest puta ponavlja jedna točka. Nakon toga se od šest točaka i srednje vrijednosti kalibracijskih pravaca dobije granica detekcije i kvantifikacije (**Tablica 9**). Tako izračunate granice detekcije i kvantifikacije su teoretske, a granica kvantifikacije potvrđuje se sa šest uzastopnih mjerenja radnog standarda koncentracije najbliže teoretski izračunatoj, a za koju su ponovljivost mjerenja i točnost prihvatljivi ($RSD \leq 20\%$, točnost 60-120%). Obično se radi o najnižoj točki kalibracijskog pravca.

Tablica 9. Rezultati određivanja granica detekcije i kvantifikacije za glifosat

Mjerenje	Nagib pravca	Odsječak na y-osi
K1	9663,3835	46,5173
K2	9673,1955	33,6274
K3	9972,5564	2,782
K4	9411,8421	50,9605
K5	9923,8346	24,9729
K6	9973,4586	27,9932
	Srednja vrijednost	Standardna devijacija
	9769,711783	11,524
LD	0,004	
LQ	0,012	

Tablica 10. Kalibracija glifosata od 0,010 do 0,100 ng/mL (K1)

c, ng/mL	0,010	0,030	0,050	0,080	0,100
A	152,8	332,9	525,8	798,2	1032

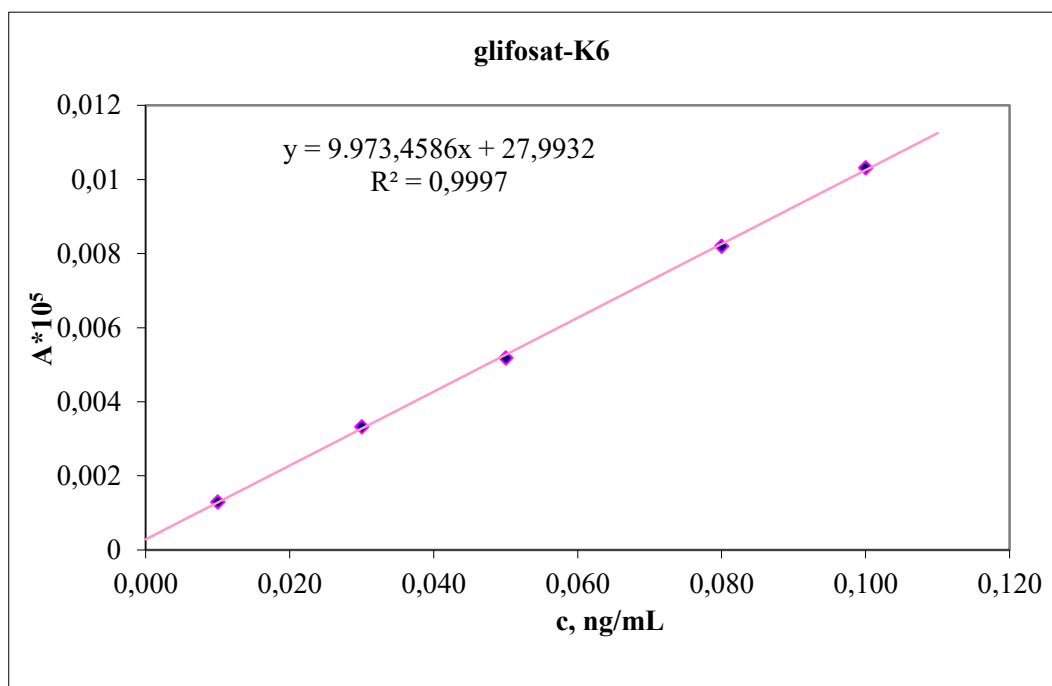


Slika 21. Grafički prikaz kalibracije od 0,010 do 0,100 ng/mL za glifosat (K1)

Izvor: osobna arhiva

Tablica 11. Kalibracija glifosata od 0,010 do 0,100 ng/mL (K6)

c, ng/mL	0,010	0,030	0,050	0,080	0,100
A	129,1	332,9	518,4	820,4	1032



Slika 22. Grafički prikaz kalibracije od 0,010 do 0,100 ng/mL za glifosat (K6)

Izvor: osobna arhiva

Prema gore navedenim formulama, dobivena je granica detekcije od 0,004 $\mu\text{g/L}$ i granica kvantifikacije od 0,030 $\mu\text{g/L}$ za glifosat (**Tablica 12**).

Tablica 12. Rezultati granice detekcije i granice kvantifikacije za glifosat

Pesticid	Granica detekcije	Granica kvantifikacije
Glifosat	0,004 ng/mL ili $\mu\text{g/L}$	0,012 ng/mL $\mu\text{g/L}$ 0,030 ng/mL ili $\mu\text{g/L}$

Iz dobivenih rezultata validacije mjernog postupka, zaključeno je da metoda za određivanje izomera glifosata zadovoljava postavljene zahtjeve i stoga je prikladna za namijenjenu svrhu.

4.2. Mjerna nesigurnost rezultata ispitivanja

Mjerna nesigurnost se može definirati kao nesigurnost u rezultat mjerenja, a izražava se na temelju objektivne i subjektivne procjene analitičara. Preduvjet pri određivanju granica mjerne nesigurnosti je sumnja u rezultat zadanog mjerenja. Upravo zato, svaki laboratorij mora imati postavljene ciljne granice mjerne nesigurnosti za sve metode s kojima se koristi (81). Prema podacima iz umjernica i certifikata, kao izvor nesigurnosti smatraju se čistoća standarda i odmjerne tikvice i pipete. Osim toga, za izvore nesigurnosti uzimaju se i podaci dobiveni validacijom metode, dugoročnim praćenjem rezultata ispitivanja te rezultati uzorkovanja. Prilikom izračuna ponovljivosti pripreme standarda, iz stock standardne otopine CIP-a koncentracije 80-800 pg/μL pripremaju se radne standardne otopine. Iz stock standardne otopine izodrina koncentracije 100 pg/μL pripremljene su radne standardne otopine koncentracija 1; 3; 5; 8 i 10 pg/μL. Pripremljena radna standardna otopina izmjerena je po tri puta. Svaki pripremljeni uzorak za interkalibraciju koji je korišten za validaciju metode mjeren je jedanput, a relativna mjerna nesigurnost uslijed ponovljivosti mjerenja izračunata je za koncentraciju izodrina od 3,7 pg/μL koja odgovara koncentraciji od 0,0037 μg/L uzorka. Uzorak je razrijeđen 1:10, tako da je prava koncentracija izodrina u uzorku 0,037 μg/L (**Tablica 13**).

Tablica 13. Ponovljivost pripreme standarda za izodrin

Pripremljena koncentracija, pg/μL	1	3	5	8	10
Izmjerena koncentracija, pg/μL	1,21	3,12	4,87	8,01	9,99
	0,99	3,06	5,02	7,85	10,05
	1,23	3,17	4,97	7,94	9,97
Sr. vrijednost	1,14	3,12	4,96	7,93	10,00
St. odstupanje	0,13	0,05	0,08	0,08	0,05
Srednje st. odstupanje, u_{pmi}	0,08				
c_u	3,7 pg/μL			0,0037 μg/L	
$u_{pmi,r}$	0,021				

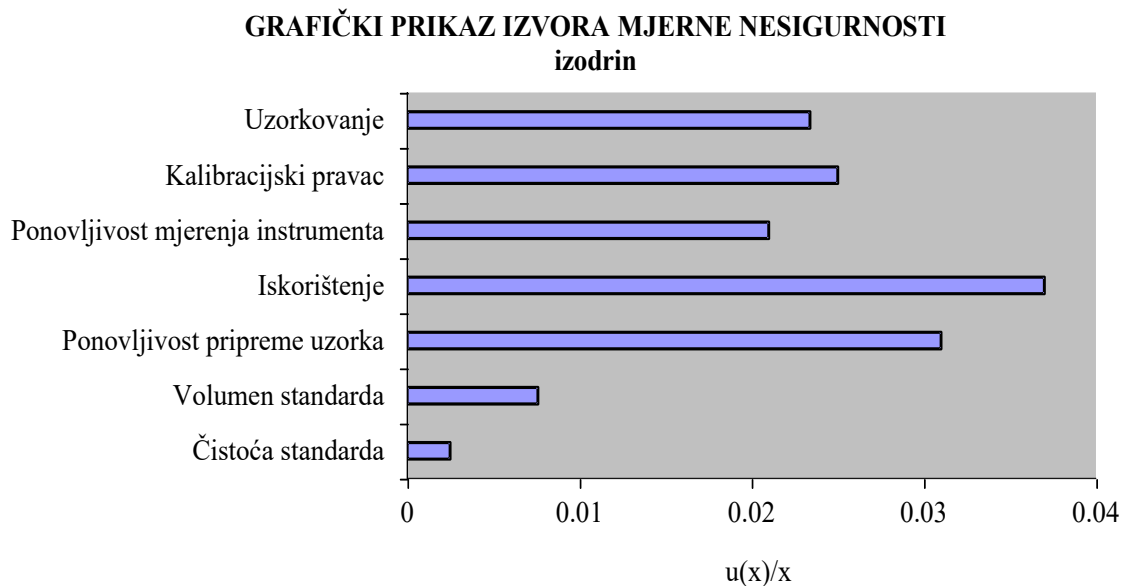
Mjerna nesigurnost kod ponovljivost mjernog instrumenta:

$$u_{pmi} = \frac{\text{srednje_st.odstupanje}}{\sqrt{\text{br. mjerenja_uzorka}}} = \frac{0,08}{\sqrt{1}} = 0,08 \text{ pg}/\mu\text{L}$$

$$u_{pmi,r} = \frac{u_{pmi}}{c_u} = \frac{0,08 \text{ pg}/\mu\text{L}}{3,7 \text{ pg}/\mu\text{L}} = 0,021$$

c_u - srednja koncentracija uzoraka

Na grafičkom prikazu izvora mjerne nesigurnosti za izodrin vidljivo je da iskorištenje i ponovljivost pripreme uzorka najviše doprinose mjernoj nesigurnosti, dok čistoća standarda ne doprinosi mjernoj nesigurnosti u znatnoj mjeri (Slika 23).



Slika 23. Grafički prikaz mjerne nesigurnosti za izodrin

Izvor: osobna arhiva

Tablica 14. Prikaz izračuna mjerne nesigurnosti za izodrin

Izvor mjerne nesigurnosti	Vrijednost, x	Standardna nesigurnost, u(x)	Relativna standardna nesigurnost, u(x)/x	Kvadrirana relativna standardna nesigurnost, (u(x)/x) ²
Čistoća standarda	100 µg/mL	0,25 µg/mL	$2,5 \cdot 10^{-3}$	$6,2 \cdot 10^{-6}$
Volumen standarda	10 mL	$7,6 \cdot 10^{-2}$ mL	$7,6 \cdot 10^{-3}$	$5,8 \cdot 10^{-5}$
Ponovljivost pripreme uzorka	0,037 µg/L	$1,13 \cdot 10^{-3}$	0,031	$9,6 \cdot 10^{-4}$
Iskorištenje	0,037 µg/L	$1,36 \cdot 10^{-3}$	0,037	$1,4 \cdot 10^{-3}$
Ponovljivost mjerenja instrumenta	3,7 pg/µL	0,078	0,021	$4,4 \cdot 10^{-4}$
Kalibracijski pravac	3,7 pg/µL	0,094	0,025	$6,3 \cdot 10^{-4}$
Uzorkovanje	3,7 pg/µL	0,087	0,023	$5,5 \cdot 10^{-4}$

Za računanje sastavljene mjerne nesigurnosti izodrina u obzir se uzima sljedeća formula:

$$u = \sqrt{\sum_i \left[\frac{u(x_i)}{x_i} \right]^2}$$

$$u = \sqrt{u_{\check{c},r}^2 + u_{prs,r}^2 + u_{pmi,r}^2 + u_{ppu,r}^2 + u_{i,rk}^2 + u_{c_0}^2}$$

$$u = \sqrt{(2,5 \cdot 10^{-3})^2 + (7,6 \cdot 10^{-3})^2 + 0,031^2 + 0,037^2 + 0,021^2 + 0,025^2 + 0,023^2} = 0,063$$

$u_{\check{c},r}$ = mjerna nesigurnost za čistoću standarda

$u_{prs,r}$ = mjerna nesigurnost pripreme (volumena) radnih standardnih otopina

$u_{pps,r}$ = mjerna nesigurnost uslijed ponovljivosti pripreme standarda

$u_{ppu,r}$ = mjerna nesigurnost uslijed ponovljivosti pripreme

$u_{i,rk}$ = nesigurnost iskorištenja

u_{c_0} = nesigurnost kalibracijskog pravca

Za računanje proširene mjerne nesigurnosti izodrina u obzir se uzima sljedeća formula:

$$U = k \cdot u$$

$$U = 2 \cdot 0,063 = 0,126$$

Kako bi se proširena mjerna nesigurnost izrazila u mjernoj jedinici, proširena mjerna nesigurnost se množi s rezultatom mjerenja:

$$3,7 \text{ pg}/\mu\text{L} \cdot 0,126 = 0,5 \text{ pg}/\mu\text{L} = 0,0047 \text{ }\mu\text{g}/\text{L}$$

Ukoliko je potrebno rezultat se može prikazati kao $(0,037 \pm 0,0047) \text{ }\mu\text{g}/\text{L}$ uzorka za izodrin uz obuhvatni faktor $k=2$.

Tablica 15. Rezultati računanja sastavljene i proširene mjerne nesigurnosti

Komponenta	Sastavljena mjerna nesigurnost	Proširena mjerna nesigurnost, $k=2$	Rezultat, $\text{pg}/\mu\text{L}$	Mjerna nesigurnost, $\text{pg}/\mu\text{L}$	Rezultat, $\mu\text{g}/\text{L}$	Mjerna nesigurnost, $\mu\text{g}/\text{L}$
izodrin	0,063	0,126	3,7	0,5	0,037	0,0047

4.3. Međulaboratorijsko ispitivanje (interkalibracija)

Međulaboratorijsko usporedno ispitivanje provodi se u svrhu vlastite provjere kvalitetnog rada laboratorija. Na temelju toga dobiva se procijenjena razina sposobnosti različitih laboratorija te se definira "najbolja vrijednost" za konkretno mjerenje. Svaki akreditirani laboratorij normom EN ISO/IEC 17025:2000 i EN ISO/IEC 9001:2000 je obavezan provoditi međulaboratorijske usporedbe jer se na taj način zadovoljava sljedivost rezultata mjerenja. Uz validaciju metode, interkalibracija je uvjet da bi određeni laboratorij bio akreditirani ili dobio ovlaštenje od Ministarstva zdravstva za provođenje analiza za revizijski monitoring i od Ministarstva zaštite okoliša i energetike za Hrvatske vode.

Ukoliko je z-score u skladu s unaprijed definiranim kriterijima prihvatljivosti, laboratorij postaje akreditiran za analizu određenih pesticida u vodi.

Z-score se izračunava prema formuli:
$$z = \frac{(x-x_a)}{\sigma}$$

x – rezultat pojedinog laboratorija

x_a – poznata, referencijska vrijednost analita

σ – standardno odstupanje rezultata testa

Kriteriji prihvatljivosti se određuje s obzirom na dobiveni rezultat z-score-a:

- $\leq |2|$ – osposobljenost laboratorija je zadovoljavajuća
- $< |2-3|$ – osposobljenost laboratorija je upitna
- $\geq |3|$ – osposobljenost laboratorija je neprihvatljiva (79)

U **Tablici 16** prikazane su predane vrijednosti, prave vrijednosti ($\mu\text{g/L}$), z-score dobiven gore navedenom formulom, analizirani uzorci dobiveni u svrhu interkalibracije i određena metoda analiziranja. Prema dobivenim z-score vrijednostima, može se zaključiti da je osposobljenost laboratorija zadovoljavajuća.

Tablica 16. Prikaz prave vrijednosti, predane vrijednosti i z-score-a u svrhu interkalibracije

Godina interkalibracije	Uzorak	Pesticid	Metoda	Predana vrijednost ($\mu\text{g/L}$)	Prava vrijednost ($\mu\text{g/L}$)	z – score
2019.	Industrijska otpadna voda	Glifosat	HPLC - MS/MS	0,5465	0,4480	0,73
2021.	Površinska voda	Simazin	GC - MS/MS	0,140	0,1374	0,06
2021.	Površinska voda	Atrazin	GC - MS/MS	0,119	0,1082	0,40
2021.	Površinska voda	Bentazon	HPLC - MS/MS	0,1200	0,1949	-1,54
2021.	Mineralna voda	Heptaklor	GC-ECD	0,0164	0,0157	0,15
2021.	Mineralna voda	Aldrin	GC-ECD	0,0177	0,0147	-0,57
2021.	Površinska voda	Izodrin	GC-ECD	0,0135	0,0147	-0,27
2022.	Pitka voda	Malation	GC - MS/MS	0,0545	0,0772	-1,18
2022.	Pitka voda	Diazinon	GC - MS/MS	0,0820	0,0850	-0,14

5. RASPRAVA

Intenzivna poljoprivredna proizvodnja dovela je do značajne upotrebe sredstava za suzbijanje štetnika i korova. Stoga, ostaci pesticida mogu dospjeti u podzemne i površinske vode putem protoka i ispiranja tijekom velikih oborina, kontaminirajući tako vodeni ekosustav. Prisutnost tragova pesticida u vodenim ekosustavima ima štetne učinke koji variraju ovisno o koncentraciji onečišćivača, količini i vremenu izlaganja (82).

S obzirom na analitičko izvješće tijekom šestogodišnjeg razdoblja (2016. – 2021.), udio pesticida u svim ispitanim uzorcima vode za ljudsku potrošnju, prirodnim mineralnim vodama, prirodnim izvorskim vodama, stolnim, površinskim i podzemnim vodama je bio znatno malen. Svi analizirani uzorci vode sadržavali su udio pesticida koji je manji od granica njihove kvantifikacije (**Tablica 2**). Prema Pravilniku o parametrima sukladnosti, metodama analize, monitoringu i planovima sigurnosti vode za ljudsku potrošnju te načinu vođenja registra pravnih osoba koje obavljaju djelatnost javne vodoopskrbe (NN 125/17), maksimalno dopuštena koncentracija pesticida u vodi za ljudsku potrošnju smije iznositi najviše 0,10 µg/L. U svim ispitanim uzorcima (N=348) u šestogodišnjem razdoblju otkriven je udio pesticida koji je manji od maksimalno dopuštene koncentracije propisane Pravilnikom (**Tablica 3**). Treba imati na umu da su u ovim krajevima stijene podrijetlom vapnenačke, koje imaju sposobnost propuštanja onečišćenja i upravo zbog toga je velika vjerojatnost da će ostaci pesticida doći u kontakt s podzemnim vodama. Međutim, razlog malom udjelu pesticida u vodi za ljudsku potrošnju može se pripisati činjenici da se u poljoprivredi na području Primorsko – goranske županije dobro provode agrotehničke mjere. S obzirom na vrstu vodozahvata prilikom uzorkovanja analiziranih uzoraka vode, pretežno su uzorkovane podzemne vode (N= 325). Prema analitičkom izvješću, 2016. godine je analizirano 53 uzorka podzemne vode i 3 uzorka površinske vode, a 2017. godine 49 uzoraka podzemne, te 3 površinske vode. Uz to, 2018., 2020. i 2021. godine je analiziran isti broj uzoraka površinskih (53) i podzemnih voda (4), dok je 2019. godine ukupno analizirano 69 uzoraka vode, od kojih je 64 bilo iz podzemnog, a 5 iz površinskog izvorišta (**Slika 14**). Znatno male koncentracije pesticida u svim analiziranim uzorcima vode mogu biti rezultat revizijskih monitoringa koji se redovito provode na Nastavnom zavodu za javno zdravstvo Primorsko – goranske županije.

Prema El-Nahhal i sur. (2021), u 1116 uzoraka vode za ljudsku potrošnju iz 31 zemlje diljem svijeta otkriveno je 58 rezidua organoklornih pesticida i njihovih metabolita u različitim frakcijama. Najveće koncentracije ostataka organoklornih pesticida u uzorcima vode otkrivene

su u vodi iz Libanona i Egipta (2,4'-DDD, 12,82 µg/L; heptaklor epoksid, heptaklor 9,01; 4,22 µg/L; aldrin 6,0), a najmanja koncentracija organoklornih pesticida zabilježena je u vodi iz Kanade (heptaklor, 0,000525 µg/L). Otkrivanje ostataka organoklornih pesticida u uzorcima vode može se pripisati povijesnoj poljoprivrednoj primjeni ovih spojeva. Štoviše, ostaci pesticida nakon primjene nastavljaju kružiti različitim putovima, kao što su atmosferski transport i otjecanje te se odupiru razgradnji i stoga ostaju u ekosustavu dulje vrijeme. Osim toga, ostaci organoklorata mogu ispariti iz tla u atmosferu i difundirati kroz vodene sustave. U istom broju uzoraka (N=1116) iz različitih zemalja svijeta otkriveno je 27 organofosfornih rezidua u uzorcima vode. Otkriveni organofosforni ostaci uključuju zinfos-metil, klorfenvinfos, klorpirifos, cijanofos, diazinon, diklofention, diklorvos, dikrotofos, dimetoat, etion, etoprofos, fenitroton, fention, izofenfos-okson, malation, mefosfolan, metamidofos, monokrotofos, ometofos, parathion-metilfoat, parathion-metilfot, parathion-metilfot tionazin i triazofos. U uzorcima vode iz Njemačke otkrivena su samo dva rezidua organofosfornih pesticida s rasponom koncentracija od 0,18–3,46 µg/L, dok je u uzorcima pitke vode iz Španjolske identificirano dvanaest organofosfornih pesticida s rasponom koncentracije od 1,01–21,95 µg/L. U usporedbi s ostacima organoklorata, organofosfati su rjeđe otkriveni u uzorcima vode u ovom analiziranom radu (83).

U istraživanju Schipper i sur. (2008), analizirani su uzorci podzemnih voda iz bušotina u Nizozemskoj 2006. godine u svrhu monitoringa kvalitete podzemnih voda. Kako bi ispunili zahtjev o maksimalno dopuštenoj koncentraciji pesticida u vodi za ljudsku potrošnju (0,1 µg/L), koja je propisana Okvirnom direktivom o vodama, analizirana je široka lista pesticida. Od ukupno 771 uzorka podzemnih voda, u 27% uzoraka su otkriveni ostaci pesticida, dok su u 11% uzoraka pronađene prekoračene dozvoljene vrijednosti propisane Direktivom. Detaljna analiza je pokazala da u gornjim slojevima podzemnih voda ima manje ostataka pesticida nego u donjim dubljim slojevima. Uvjeti u donjim slojevima podzemnih voda su nepovoljniji za daljnju redukciju ostataka pesticida zbog smanjene mikrobiološke aktivnosti, smanjene sorpcije organskih tvari te smanjene razine kisika (84).

6. ZAKLJUČAK

S obzirom na rezultate ovog istraživanja kojim je analizirano 348 uzoraka vode za ljudsku potrošnju, prirodnih mineralnih voda, prirodnih izvorskih voda, stolnih, površinskih i podzemnih voda kroz šestogodišnje razdoblje (2016.-2021.), može se zaključiti sljedeće:

- najviše analiziranih uzoraka činile su podzemne vode (N=325)
- svi analizirani uzorci sadržavali su koncentraciju pesticida koja je bila manja od granica njihovih kvantifikacija dobivenih validacijom analitičkih metoda
- u svim ispitanim uzorcima nije otkrivena koncentracija pesticida koja prelazi maksimalno dopuštenu koncentraciju propisanu Pravilnikom
- s obzirom na znatno nisku koncentraciju pesticida koja je određena posebno u svakom uzorku, dokazano je da su svi uzorci bili zdravstveno ispravni

Niska koncentracija pesticida u svim analiziranim uzorcima s područja Primorsko – goranske županije kroz šestogodišnje razdoblje može se pripisati dobrim agrotehničkim mjerama.

7. LITERATURA

1. Barbash JE. The geochemistry of pesticides. Treatise on geochemistry, 2003. 9, 612, 2 [Internet] [citirano 11.05.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/B0-08-043751-6/09056-3>
2. Špelić I, Bažok R, Piria M. Pesticides in inland waters. Hrvatske vode, 2022. 30(119), 35-39. [Internet] [citirano 11.05.2022.] Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/275801>
3. Mahmood I, Imadi SR, Shazadi K, Gul A, Hakeem KR. Plant, soil and microbes. Journal of Implications in Crop Science, 2016. 1.
4. Syafrudin M i sur. Pesticides in drinking water—a review. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2021. 18(2), 468. [Internet] [citirano 12.05.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.3390/ijerph18020468>
5. Petrović M, Tomašić V, Macan J, Zagađenje okoliša, u: M. Kaštelan Macan, M. Petrović, Analitika okoliša, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2013.
6. Carter A. How pesticides get into water-and proposed reduction measures. Pesticide Outlook, 2000. 11.4: 149-156. [Internet] [citirano 12.05.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.1039/B006243J>
7. Rozman KK, Doull J, Hayes Jr WJ, Dose and time determining, and other factors influencing, toxicity. In Hayes' handbook of pesticide toxicology, 2010. (pp. 3-101). Academic Press. [Internet] [citirano 12.05.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374367-1.00001-X>
8. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) [Internet] [citirano 16.05.2022.] Dostupno na: <http://www.fao.org/>
9. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), FAOSTAT [Internet] [ažurirano: 10.12.2021.; citirano 16.05.2022.] Dostupno na: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/RP>

10. United States Environmental Protection Agency (EPA), Ingredients Used in Pesticide Products, Basic Information about Pesticide Ingredients [ažurirano: 08.06.2021.; citirano 17.05.2022.] Dostupno na: <https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/basic-information-about-pesticide-ingredients>
11. Springer OP, Springer D. Otrovní modrozeleni planet, Priručnik iz ekologije, ekotoksikologije i zaštite prirode i okoliša, Meridijan, Zagreb, 2008. 115-128.
12. Smith EH, Kennedy GG. History of Pesticides U: Pimentel D, Encyclopedia of Pest Management, Informa Taylor & Francis Group, London, 2002.
13. History of pesticide use, 1998. [Internet] [citirano 18.05.2022.] Dostupno na: <http://www2.mcdaniel.edu/Biology/eh01/pesticides/historyofpesticidesuse.html>
14. Castillo M, Carbonell E, González C, Miralles-Marco A. Pesticide Residue Analysis in Animal Origin Food: Procedure Proposal and Evaluation for Lipophilic Pesticides. IntechOpen, 2012. [Internet] [citirano 18.05.2022.] Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.5772/3329>
15. Delaplane KS. Pesticide usage in the United States: history, benefits, risks, and trends. Cooperative Extension Service. The University of Georgia, College of Agricultural and Environmental Sciences, 2000. [Internet] [citirano 18.05.2022.] Dostupno na: <http://pubs.caes.uga.edu/caespubs/pubs/PDF/B1121.pdf>
16. Jabbar A, Mallick S. Pesticides and environment situation in Pakistan. Sustainable Development Policy Institute, 1994.
17. Đokić M, Bilandžić N, Briški F. Postupci uklanjanja pesticida iz okoliša. Kemija u industriji: Časopis kemičara i kemijskih inženjera Hrvatske, 2012. 61(7-8), 341-348. [Internet] [citirano 18.05.2022.] Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/83941>

18. Epstein L. Fifty years since silent spring. *Annu. Rev. Phytopathol*, 2014. 52, 377–402.
[Internet] [citirano 18.05.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-102313-045900>
19. The British Crop Protection Council (BCPC). *The pesticide Manual (Incorporating the Agrochemicals Handbook) a world compendium*, 15th edition, Tomlin, C. Datix International, Bungay, 2009.
20. Čížek J, Vadjon V. *Pesticidi i okoliš*, Hrvatska paneuropska unija, Zagreb, 2006.
21. Romić D. i sur. *Utjecaj poljoprivrede na onečišćenje površinskih i podzemnih voda u Republici Hrvatskoj*, 2014. [Internet] [citirano: 22.05.2022.] Dostupno na: https://www.voda.hr/sites/default/files/dokumenti/utjecaj_poljoprivrede_na_oneciscenje_povrsinskih_i_podzemnih_voda_u_republici_hrvatskoj.pdf
22. Abreu-Villaça Y, Levin ED. Developmental neurotoxicity of succeeding generations of insecticides. *Environment international*, 2017. 99:55-77. [Internet] [citirano: 24.05.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.11.019>
23. Plavšić F, Žuntar I. *Uvod u analitičku ekotoksikologiju*. Zagreb, Hrvatska: Školska knjiga, 2006.
24. Požar H. *Tehnička enciklopedija*, Miroslav Krleža, Zagreb, 1986. 237-249.
25. Gupta A. *Pesticide residue in food commodities: Advances in Analysis, Evaluation, and Management, With Particular Reference to India*, Agrobios (India), Jodhpur, 2006.
[Internet] [citirano 25.05.2022.] Dostupno na: https://content.kopykitab.com/ebooks/2016/05/7060/sample/sample_7060.pdf
26. Inženjerstvo P. Pregled tehničke literature i dokumentacije. *Chem. Eng. J*, 2021. 404, 126540. [Internet] [citirano 26.05.2022.] Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/file/372520>
27. Topolovec D. *Herbicidi i mehanizmi djelovanja I*. *Glasnik zaštite bilja*, 2008. 31(3), 61-66.
[Internet] [citirano: 26.05.2022.] Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/file/241805>

28. Ngigi A, Getenga Z, Boga H, Ndalut P. Biodegradation of phenylurea herbicide diuron by microorganisms from longterm-treated sugarcane-cultivated soils in Kenya. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 2011. 93, 1623-1635. [Internet] [citirano: 27.05.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.1080/02772248.2011.595718>
29. Moncada A. Environmental Fate of Diuron, Environmental Monitoring Branch, Department of Pesticide Regulation, Sacramento, Kalifornija, SAD, 2004.
30. Moneke AN, Okpala GN, Anyanwu CU Biodegradation of glyphosate herbicide in vitro using bacterial isolates from four rice fields. *African Journal of Biotechnology*, 2010. 9, 4067-4074. [Internet] [citirano: 27.05.2022.] Dostupno na: <http://www.academicjournals.org/AJB>
31. Denžić Lugomer M, Pavliček D, Bilandžić N. Glifosat - od primjene do životinja i ljudi. *Veterinarska stanica*, 2019. 50 (3), 211-221. [Internet] [citirano: 28.05.2022.] Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/223828>
32. Vukić Lušić D i sur. Zdravstvena ispravnost vode za piće u Gorskom kotaru u petogodišnjem razdoblju od 2011. do 2015. *Medicina Fluminensis: Medicina Fluminensis*, 2017. 53(2), 216-224. [Internet] [citirano: 28.05.2022.] Dostupno na: https://doi.org/10.21860/medflum2017_179762
33. Ballesteros E, Parrado MJ, J. *Chromatogr. A*, 2004. 1029 267.
34. Tudi M i sur. Agriculture Development, Pesticide Application and Its Impact on the Environment. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2021. 18(3):1112. [Internet] [citirano: 28.05.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.3390/ijerph18031112>
35. Reichenberger S, Bach M, Skitschak A, Frede HG. Mitigation strategies to reduce 901 pesticide inputs into ground- and surface water and their effectiveness; A review. *Sci. Total*

- Environ, 2007. 384, 1–35. [Internet] [citirano: 28.05.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.04.046>
36. Schäfer RB, van den Brink PJ, Liess M. Impacts of pesticides on freshwater ecosystems. Ecological impacts of toxic chemicals, 2011. 111-137.
37. Barić K, Bažok R, Pintar A. Potrošnja pesticida u Hrvatskoj poljoprivredi u razdoblju od 2012. do 2017. godine. Glasilo biljne zaštite, vol. 19, no.5, 2019. pp. 537-548. [Internet] [citirano: 28.05.2022.] Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/237168>
38. EUR-LEX, Direktiva (EU) 2020/2184 Europskog parlamenta i Vijeća od 16. prosinca 2020. o kvaliteti vode namijenjene za ljudsku potrošnju (preinaka) [Internet] [citirano: 29.05.2022.] Dostupno na: <http://data.europa.eu/eli/dir/2020/2184/ojmonitoring>
39. Aydinalp C, Porca MM. The effects of pesticides in water resources. Journal of Central European Agriculture, 2004. 5(1), 5-12. [Internet] [citirano: 01.06.2022.] Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/16556>
40. National Research Council. Board on Agriculture; Committee on Long-Range Soil and Water Conservation Policy. Soil and Water Quality: An Agenda for Agriculture; National Academies Press: Cambridge, MA, USA, 1993.
41. Lushchak VI, Matviishyn TM, Husak VV, Storey JM, Storey KB. Pesticide toxicity: A mechanistic approach. EXCLI J, 2018. 17, 1101. [Internet] [citirano: 01.06.2022.] Dostupno na: [10.17179/excli2018-1710](https://doi.org/10.17179/excli2018-1710)
42. Bokulić A i sur. Priručnik za sigurno rukovanje i primjenu sredstava za zaštitu bilja. Ministarstvo poljoprivrede. Zagreb, 2015. 10-145.
43. EUR-LEX, Direktiva 2013/39/EU Europskog parlamenta i Vijeća od 12. kolovoza 2013. o izmjeni direktiva 2000/60/EZ i 2008/105/EZ u odnosu na prioritetne tvari u području vodne politike [Internet] [citirano: 01.06.2022.] Dostupno na: <http://data.europa.eu/eli/dir/2013/39/oj>

44. Sabor RH. zakon.hr. [Internet] [citirano: 01.06.2022.] Dostupno na: <https://www.zakon.hr/z/124/Zakon-o-vodama>
45. Sabor RH. narodne-novine.hr [Internet] [citirano: 01.06.2022.] Dostupno na: https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2017_12_125_2848.html
46. Sabor RH. zakon.hr. [Internet] [citirano: 01.06.2022.] Dostupno na: <https://www.zakon.hr/z/703/Zakon-o-odr%C5%BEivoj-uporabi-pesticida>
47. Saleh IA, Zouari N, Al-Ghouti MA. Removal of pesticides from water and wastewater: Chemical, physical and biological treatment approaches. *Environmental Technology & Innovation*, 2020. 19, 101026 [Internet] [citirano: 01.06.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.101026>
48. Salimi M i sur. Contaminants of emerging concern: a review of new approach in AOP technologies. *Environmental monitoring and assessment*, 2017. 189(8), 414. [Internet] [citirano: 02.06.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.1007/s10661-017-6097-x>
49. Tsydenova O, Batoev V, Batoeva A. Solar-Enhanced Advanced Oxidation Processes for Water Treatment: Simultaneous Removal of Pathogens and Chemical Pollutants. *Internatinal journal of environmental research and public health*, 2015. 12(8), 9542-9561. [Internet] [citirano: 02.06.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.3390/ijerph120809542>
50. Marican A, Durán-Lara EF. A review on pesticide removal through different processes. *Environmental Science and Pollution Research*, 2018. 25(3), 2051-2064. [Internet] [citirano: 02.06.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0796-2>
51. Ormad MP, Miguel N, Claver A, Matesanz JM, Ovelleiro JL. Pesticides removal in the process of drinking water production. *Chemosphere*, 2008. 71(1), 97-106. [Internet] [citirano: 02.06.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.10.006>

52. Pérez-Lucas G, Aliste M, Vela N, Garrido I, Fenoll J, Navarro S. Decline of fluroxypyr and triclopyr residues from pure, drinking and leaching water by photo-assisted peroxonation. *Process Safety and Environmental Protection*, 2020. 137, 358-365. [Internet] [citirano: 02.06.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.psep.2020.02.039>
53. Zhang MH, Dong H, Zhao L, Wang DX, Meng D. A review on Fenton process for organic wastewater treatment based on optimization perspective. *Science of the Total Environment*, 2019. 670, 110-121. [Internet] [citirano: 02.06.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.180>
54. Barbusiński K, Filipek K. Use of Fenton's reagent for removal of pesticides from industrial wastewater. *Polish Journal of Environmental Studies*, 2001. 10(4), 207-212. [Internet] [citirano: 02.06.2022.] Dostupno na: <https://www.pjoes.com/pdf-87375-21234?filename=Use%20of%20Fentons%20reagent.pdf>
55. Chiam CK, Sarbatly R. Purification of Aquacultural Water - Conventional and New Membrane-based Techniques. *Separation and Purification Reviews*, 2011. 40, 126-160. [Internet] [citirano: 02.06.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.1080/15422119.2010.549766>
56. Asad A, Sameoto D, Sadrzadeh M. Chapter 1 - Overview of membrane technology. In M. Sadrzadeh & T. Mohammadi. *Nanocomposite Membranes for Water and Gas Separation*, 2020. (pp. 1-28): Elsevier [Internet] [citirano: 02.06.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816710-6.00001-8>
57. Ahmad S, Tan L, Shukor S. Dimethoate and atrazine retention from aqueous solution by nanofiltration membranes. *Journal of hazardous materials*, 2008. 151(1), 71- 77. [Internet] [citirano: 02.06.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.05.047>
58. Mehta R, Brahmabhatt H, Saha NK, Bhattacharya A. Removal of substituted phenyl urea pesticides by reverse osmosis membranes: Laboratory scale study for field water

- application. *Desalination*, 2015. 358, 69-75. [Internet] [citirano: 02.06.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.desal.2014.12.019>
59. Gupta VK, Gupta B, Rastogi A, Agarwal S, Nayak, A. Pesticides removal from waste water by activated carbon prepared from waste rubber tire. *Water research*, 2011. 45(13), 4047-405. [Internet] [citirano: 02.06.2022.] Dostupno na : <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.05.016>
60. Ormad MP, Miguel N, Claver A, Matesanz JM, Ovelleiro JL. Pesticides removal in the process of drinking water production. *Chemosphere*, 2008. 71(1), 97-106. . [Internet] [citirano: 02.06.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.10.006>
61. Karanasios E, Tsiropoulos NG, Karpouzas DG. On-farm biopurification systems for the depuration of pesticide wastewaters: recent biotechnological advances and future perspectives. *Biodegradation*, 2012. 23(6), 787-802. [Internet] [citirano: 02.06.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.1007/s10532-012-9571-8>
62. Javaid MK, Ashiq M, Tahir M. Biodegradation and Environmental Impacts of Pesticides. *Scientifica*, 2016. 9
63. Maltseva O, McGowan C, Fulthorpe R, Oriel P. Degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by haloalkaliphilic bacteria. *Microbiology*, 1996. 142 (Pt 5), 1115-1122. [Internet] [citirano: 02.06.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.1099/13500872-142-5-1115>
64. Huang Y i sur. Microbial Degradation of Pesticide Residues and an Emphasis on the Degradation of Cypermethrin and 3-phenoxy Benzoic Acid: A Review. *Molecules*, 2018. 23(9), 2313. [Internet] [citirano: 02.06.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.3390/molecules23092313>
65. Becerra D i sur. Coupling of heterogeneous photocatalysis and aerobic biological process of activated sludge to treat wastewater containing Chlorpyrifos. *Ingeniería y*

- competitividad, 2022. 22. [Internet] [citirano: 02.06.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.25100/iyv.v22vi1i.8135>
66. Navaratna D, Shu L, Jegatheesan V. Evaluation of herbicide (persistent pollutant) removal mechanisms through hybrid membrane bioreactors. *Bioresource Technology*, 2016. 200, 795-803. [Internet] [citirano: 02.06.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.10.041>
67. Petrović M, Mutavdžić Pavlović D, Babić S, Horvat AJM, Ašperger D. Analiza tragova i ultratragova, u: M. Kaštelan Macan, M. Petrović, *Analitika okoliša*, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2013
68. Reemtsma T. The use of liquid chromatography-atmospheric pressure ionization-mass spectrometry in water analysis- Part II: Obstacles. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2001. 20(10), 533-542. [Internet] [citirano: 10.06.2022.] Dostupno na: [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(01\)00103-0](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(01)00103-0)
69. Skoog DA, West DM, Holler FJ, Crouch SR. *Fundamentals of Analytical Chemistry*. Cengage Learning, 2013.
70. Thurman EM, Ferrer I, Barceló D. Choosing between atmospheric pressure chemical ionization and electrospray ionization interfaces for the HPLC/MS analysis of pesticides. *Analytical Chem*, 2001. 73, 5441–5449.
71. Baglio D, Kotzias D, Larsen BR. Atmospheric pressure ionisation multiple mass spectrometric analysis of pesticides. *J. Chromatogr. A*, 1999. 854, 207–220.
72. Famiglini G, Palma P, Pierini E, Trufelli H, Cappiello A. Organochlorine pesticides by LC-MS. *Analytical chemistry*, 2008. 80(9), 3445-3449.
73. Feo ML, Eljarrat E, Barceló D. Performance of gas chromatography/tandem mass spectrometry in the analysis of pyrethroid insecticides in environmental and food samples.

- Rapid Commun. Mass Spectrom, 2011. 25, 869–876. [Internet] [citirano: 16.06.2022.]
Dostupno na: <https://doi.org/10.1002/rcm.4936>
74. Pine SH. Organska kemija. Zagreb: Školska knjiga. 1994,1130-2.
75. Pablos-Espada MC, Arrebola-Liébanas FJ, Garrido-Frenich A, Martínez-Vidal JL. Analysis of pesticides in water samples using GC-ECD and GC-MS/MS techniques. International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 1999. 75(1-2), 165-179. [Internet] [citirano:16.06.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.1080/03067319908047309>
76. Chromedia Analytical Sciences [Internet] Dostupno na: <http://www.chromedia.org/chromedia?waxtrapp=wbqucDsHqnOxmOIIecCdCqBhBmB&subNav=qpbgcDsHqnOxmOIIecCdCqBhBmBbC>
77. Tankiewicz M, Fenik J, Biziuk M. Determination of organophosphorus and organonitrogen pesticides in water samples. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2010. 29(9), 1050-1063. [Internet] [citirano: 20.06.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.05.008>
78. Taverniers I, De Loose M, Van Bockstaele E. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2004. 23(8), 535-552. [Internet] [citirano: 20.06.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2004.04.001>
79. Kaštelan-Macan M. Kemijska analiza u sustavu kvalitete. Školska knjiga, 2017. 17-105.
80. Food and Drug Administration (FDA), Guidance for Industry - Bioanalytical Method Validation, [Internet] [citirano: 20.06.2022.] Dostupno na: <http://www.fda.gov>
81. Zamberlin Š, Antunac N, Samaržija D, Horvat I, Mikulec N, Kuliš Z. Osiguranje kvalitete rezultata analiza analitičkih mljekarskih laboratorija. Mljekarstvo: časopis za unaprjeđenje

proizvodnje i prerade mlijeka, 2005. 55(2), 139-153. [Internet] [citirano: 20.06.2022.]

Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/1491>

82. de Souza RM i sur. Occurrence, impacts and general aspects of pesticides in surface water:

A review. Process Safety and Environmental Protection, 2020. 135, 22-37. [Internet]

[citirano: 21.06.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.psep.2019.12.035>

83. El-Nahhal I, El-Nahhal Y. Pesticide residues in drinking water, their potential risk to

human health and removal options. Journal of Environmental Management, 2021. 299,

113611. [Internet] [citirano: 21.06.2022.] Dostupno na:

<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113611>

84. Schipper PNM, Vissers MJM, van der Linden AA. Pesticides in groundwater and drinking

water wells: overview of the situation in the Netherlands. Water Science and

Technology, 2008. 57(8), 1277-1286. [Internet] [citirano: 21.06.2022.] Dostupno na:

<https://doi.org/10.2166/wst.2008.255>

8. POPIS SLIKA

Slika 1. Broj aktivnih tvari, ukupna potrošnja (u kilogramima aktivne tvari) i postotni udio pojedine skupine pesticida u Hrvatskoj za 2012. godinu.....	6
Slika 2. Potrošnja i udio pet najviše korištenih aktivnih tvari herbicida, fungicida i insekticida u Hrvatskoj za 2012. godinu.....	7
Slika 3. Kemijske strukture pojedinih insekticida.....	9
Slika 4. Kemijska struktura herbicida glifosata.....	11
Slika 5. Putovi ulaska pesticida u vodeni okoliš i mobilizacija iz tla.....	13
Slika 6. Različite biološke, fizikalne i kemijske metode pročišćavanja otpadnih voda.....	15
Slika 7. Prikaz sheme LC-MS.....	18
Slika 8. Prikaz sheme GC-MS.....	19
Slika 9. LC-MS/MS Sciex Triple Quad™ 4500, HPLC Sciex ExionLC.....	22
Slika 10. GC-MS Agilent 7000 Series Triple Quad.....	22
Slika 11. GC-MS Shimadzu GC/MS-QP 2020 NX, Nexis GC 2030.....	23
Slika 12. GC-ECD Scion 436-GC.....	23
Slika 13. Postupak određivanja OPP-a i njihovih metabolita, CIP-a te glifosata različitim analitičkim metodama.....	26
Slika 14. Grafički prikaz broja uzorka i vrsta vodozahvata tijekom razdoblja 2016. - 2021....	29
Slika 15. Kalibracija na GC - ECD-u za lindan.....	31
Slika 16. Izgled kromatograma standarda izodrina na GC – ECD-u.....	31
Slika 17. Klorfenvinfos GC – MS.....	32
Slika 18. Atrazin GC – MS.....	32
Slika 19. Kalibracija standarda glifosata na LC – MS-u.....	33
Slika 20. Izgled kromatograma standarda glifosata na LC - MS/MS.....	33
Slika 21. Grafički prikaz kalibracije od 0,010 do 0,100 ng/mL za glifosat (K1).....	38
Slika 22. Grafički prikaz kalibracije od 0,010 do 0,100 ng/mL za glifosat (K6).....	39
Slika 23. Grafički prikaz mjerne nesigurnosti za izodrin.....	41

9. POPIS TABLICA

Tablica 1. Popis pesticida i metabolita, te metoda određivanja njihovih koncentracija u svrhu revizijskog monitoringa.....	27
Tablica 2. Broj uzoraka podzemnih i površinskih izvorišta kroz šestogodišnje razdoblje (2016. – 2021.) te sadržaj odabranih pesticida u uzorcima vode.....	30
Tablica 3. Pesticidi i metaboliti koji se analiziraju u akreditiranom laboratoriju i njihove granice kvantifikacije i maksimalno dopuštene koncentracije ($\mu\text{g/L}$).....	30
Tablica 4. Odabrani parametri validacije i kriteriji prihvatljivosti za glifosat.....	34
Tablica 5. Rezultati validacije metode za određivanje glifosata u uzorcima vode za piće.....	35
Tablica 6. Rezultati ispitivanja točnosti metode dobiveni ponovljenim mjerenjem (tri mjerenja) standardne otopine koncentracija 0,030; 0,050 i 0,100 ng/mL.....	36
Tablica 7. Rezultati ispitivanja preciznosti metode dobiveni ponovljenim mjerenjem (tri puta) radnih standarda pet različitih koncentracija.....	36
Tablica 8. Rezultati ispitivanja linearnosti pet različitih koncentracija standardnih otopina...	37
Tablica 9. Rezultati određivanja granica detekcije i kvantifikacije za glifosat.....	38
Tablica 10. Kalibracija glifosata od 0,010 do 0,100 ng/mL (K1).....	38
Tablica 11. Kalibracija glifosata od 0,010 do 0,100 ng/mL (K6).....	39
Tablica 12. Rezultati granice detekcije i granice kvantifikacije za glifosat.....	39
Tablica 13. Ponovljivost pripreme standarda za izodrin.....	40
Tablica 14. Prikaz izračuna mjerne nesigurnosti za izodrin.....	41
Tablica 15. Rezultati računanja sastavljene i proširene mjerne nesigurnosti.....	42
Tablica 16. Prikaz prave vrijednosti, predane vrijednosti i z-score-a u svrhu interkalibracije.	44

10. ŽIVOTOPIS

Matea Stipić rođena je 26.07.1998. godine u Zadru. Osnovnoškolsko obrazovanje završava 2013. godine u Zadru. Srednjoškolsko obrazovanje je završila 2017. godine u Gimnaziji Vladimira Nazora (opći smjer) u Zadru. Iste godine upisuje Zdravstveno veleučilište Zagreb, te 2020. godine stječe naziv stručni prvostupnik sanitarnog inženjerstva (bacc. sanit. ing.). Iste godine upisuje se na Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci na Diplomski sveučilišni studij Sanitarnog inženjerstva.