

Određivanje ditiokarbamata u malini (*Rubus idaeus* L.) gasnom hromatografijom preko Head Space-a

Divna Kovačević¹, Anka Jovanović², Mira Pucarević³,
Miloš B. Rajković¹

¹Poljoprivredni fakultet, Zemun-Beograd

²Gradski zavod za zdravstvenu zaštitu (GZZZ), Beograd

³Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad

Sadržaj: Ditiokarbamati su fungicidi, po hemijskom sastavu derivati ditiokarbaminske kiseline, a nalaze se u preparatima Mancozeb i Zineb koji se koriste za zaštitu maline od plesni. Upotreba ovih preparata limitirana je do početka cvetanja ploda, ali ne i tokom razvoja ploda. Prisustvo ditiokarbamata u malini zakonom nije dozvoljeno, međutim njihovo prisustvo je dokazano u pojedinim uzorcima maline, što je posledica korišćenja ovih preparata i za vreme sazrevanja ploda, što ni na koji način ne poboljšava kvalitet ploda niti ga štiti od propadanja. To je bio razlog zašto su pojedini kontigenti izvezene smrznute maline bili vraćeni iz zemalja EU. U radu je opisana metoda određivanja tragova pesticida (ditiokarbamata) gasnom hromatografijom preko Head Space-a koja je korišćena za ispitivanje smrznute maline uzorkovane iz različitih hladnjača tokom 2000., 2001 i 2002. god. Iako je većina uzoraka ispitivanih malina sadržala ditiokarbamate ispod tragova detekcije (0,05 mg/kg), što znači da je malina bila ispravna za upotrebu, pojedini uzorci maline, naročito proizvedene tokom 2001. god., sadržali su ditiokarbamate u količinama koje su višestruko premašivale dozvoljene vrednosti: od 0,07 do 0,23 mg/kg. Ovi rezultati ukazuju na nepravilno korišćenje fungicida koji sadrže ditiokarbamate, zbog čega je neophodno da, uz određivanje agrotehničkih mera koje poboljšavaju prinos i kvalitet maline, istovremeno treba vršiti i edukaciju naročito individualnih proizvođača, radi očuvanja zdravstvene ispravnosti ovog izuzetnog voća, po čijoj proizvodnji Srbija poslednjih godina preuzima primat u Evropi.

Ključne reči: Malina, ditiokarbamati, gasna hromatografija preko Head Space-a.

Uvod

Malina (*Rubus idaeus*) je, posle jagode, najznačajnija jagodasta voćka. Mada se malina pominje i u Starom veku, bliže podatke o gajenju malina u literaturi nalaze se od sredine XVI veka (Pantelić, 1982; www.serbiafood.co.yu; www.herbateka.co.yu).

Od tog doba, praktično, počinje i rad na stvaranju i selekciji novih sorti malina. U ovom vremenskom periodu, rađeno je vrlo mnogo na stvaranju novih sorti, tako da je stvoreno više od 1.000 sorti malina.

Radi povećavanja prinosa malina, koriste se različite agrotehničke mere, a u tom smislu i upotreba različitih akaricida i insekticida, fungicida i herbicida u cilju uništavanja grinja, biljnih vaši, bakterija i mikroorganizama kao i različitih korovnih biljaka. Na žalost, povećanje upotrebe pesticida u cilju povećanja prinosa pri proizvodnji hrane dovela je i do upotrebe velikih količina pesticida, kao i do njihovog nekontrolisanog korišćenja, što u velikoj meri utiče i na higijensku ispravnost namirnica. Naime, ostaci (residue) pesticida u namirnicama namenjenim ljudskoj ili životinjskoj ishrani, čak i u veoma malim količinama, mogu da izazovu ozbiljne zdravstvene probleme, a u najvećem broju slučajeva prouzrokuju različita kancerogena oboljenja, zbog toga što su fungicidi citotoksični.

Pesticidi čine veoma heterogenu grupu hemijskih jedinjenja sa različitim biološkim, hemijskim i fizičkim svojstvima, pa zbog toga ne postoji univerzalna metoda ili tehnika za njihovo lako dokazivanje i određivanje.

Ditiokarbamati su fungicidi, po hemijskom sastavu derivati ditiokarbaminske kiseline (www.inchem.org; Newkome, 1974; Winell, 1975; Analyst, 1981). Procenjeno je da fungicidi čine oko 6% svih rezidua pesticida u namirnicama. U hemijskoj strukturi ovih jedinjenja nalaze se joni metala vezani za organske radikale (slobodne radikale), stabilni su u životnoj sredini i dobro štite folijarne strukture. Derivati ditiokarbaminske kiseline su slabo toksični, ali su zabeležene alergijske reakcije na koži nakon njihove primene. Neki od ditiokarbaminskih kiselina mogu u biljnim i životinjskim organizmima ili tokom prerade i termičke obrade namirnica da pređu u derivate etilen-tiouree koji pokazuju teratogena, mutagena, antitiroidna i kancerogena svojstva. Jedinjenja iz grupe ditiokarbamata izazivaju smanjenje potrošnje kiseonika, inhibiraju sintezu noradrenalina i remete aktivnost nekih enzima.

U Pravilniku o količinama pesticida koji se mogu nalaziti u namirnicama (Službeni list SRJ, 1992) ne navodi se MRL (Maximum Residue Limit) za ditiokarbamate, što znači da njihovo prisustvo u namirnicama (malinama) nije dozvoljeno. Kako su se u nekim uzorcima koji su izvezeni u zemlje EU pojavile količine ditiokarbamata u količinama koje su znatno premašivale granicu detekcije (0,05 mg/kg), cilj rada je bio da se utvrdi pouzdana metoda za određivanje sadržaja ditiokarbamata u malinama kao i da se izvrši ispitivanje tragova ditiokarbamata u različitim uzorcima smrznute maline koja se proizvodi kod nas da bi se utvrdilo da li je upotreba fungicida pravilna, ili ne.

Materijal i metode

Princip metode. Princip metode za određivanje ditiokarbamata zasniva se na reakciji pesticida sa kalaj(II)-hloridom pri čemu se oslobađa ugljen disulfid (CS₂), pri čemu je koncentracija oslobođenog ugljen disulfida proporcionalna koncentraciji ditiokarbamata u malini (Analyst, 1981; Ministry of Public Health, Welfare and Sport, 1996).

Priprema uzorka. 5 g prethodno homogenizovanog uzoraka maline se odmeri, prenese u bočicu za Head Space i doda 5,0 cm³ kalaj(II)-hlorida. Rastvor kalaj(II)-hlorida priprema se rastvaranjem 15 g SnCl₂ u odgovarajućoj količini hlorovodonične kiseline koncentracije 5 mol/dm³ a zatim se tom kiselinom dopuni rastvor do 1000 cm³.

Bočica za Head Space se odmah zatvori i stavi u vodeno kupatilo na 8°C. Posle 15 min skloni se sa vodenog kupatila i snažno mućka 2 min. Postupak se ponavlja svakih 15 min u toku 1 sata, a zatim se po isteku 1 sata snažno promućka i stavi u gasni hromatograf. Analiza se radi pod istim uslovima kao što je urađena i inicijalna i verifikaciona kalibracija, injektiranjem 1 cm³ gasne faze preko Head Space-a u kolonu gasnog hromatografa.

Standardni rastvor. Standardni rastvor korišćen za kalibracionu krivu je ugljen disulfid (IR spektroskopske čistoće). Osnovni rastvor pravi se odmeravanjem 0,4 do 0,6 g ugljen disulfida u normalni sud od 50 cm³ koji već sadrži malo acetona (AnalaR ili Distol čistoće) i dopuni acetonom do merne crte. Primarni standardni rastvor pravi se od osnovnog u koncentraciji 1 mg/cm³.

Kalibraciona kriva. Odmeri se 5 cm³ destilovane vode, stavi u bocu Head Space i doda 5 cm³ kalaj(II)-hlorida. Dobro se zatvori i kroz teflonski (ili silikonski) zatvarač redom dodaje u bočice 20, 40, 50 i 60 cm³ kalibracionog rastvora, bočice se stave u vodeno kupatilo i pripremaju na isti način kao i uzorci.

Uslovi hromatografisanja. Analize su izvršene na gasnom hromatografu GC-ECD (Gas chromatography with electron capture detector) 5890 Series II preko Head Space-a, Head Space AGILENT 7694E. Kolona koja je korišćena pri ovoj analizi je HP-624 30 m x 0,32 mm x 1,8 μm. Analiza je rađena izotermalno na 35°C u trajanju od 10 min. Temperatura injektora je 100°C.

Uslovi na Head Space su: Vial equilibrium time 2,0 min, pressure time 0,2 min, Loop equilibrium time 0,05 min, T vial 80°C, a T Loop-a 85°C. Temperatura transfer linije je 90°C.

Rezultati i diskusija

Ditiokarbamati su fungicidi, po hemijskom sastavu derivati ditiokarbaminske kiseline, a nalaze se u preparatima Mancozeb i Zineb koji se koriste za zaštitu maline od plesni. Procenjeno je da fungicidi čine oko 6% svih rezidua pesticida u namirnicama. Fungicidi su sredstva koja se koriste u borbi protiv nižih biljaka, plesni i gljivica i čine skoro trećinu svih korišćenih pesticida. Fungicidi su citotoksični što je i osnova njihovog delovanja, ali je, sa aspekta uticaja na zdravlje ljudi, većina poljoprivrednih fungicida kancerogena. Po svojoj hemijskoj strukturi predstavljaju kompleksna jedinjenja u kojima su joni metala vezani za organske radikale, stabilni su u životnoj sredini u dobro štite folijarne strukture. Derivati ditiokarbaminske kiseline su slabo toksični ali su zabeležene alergijske reakcije na koži nakon njihove primene. Neka od ditiokarbamatnih jedinjenja mogu u biljnim i životinjskim organizmima ili tokom prerade i termičke obrade namirnica da pređu u derivate etilen-tiouree koji pokazuju teratogena, mutagena, antitiroidna i kancerogena svojstva. Jedinjenja iz grupe ditiokarbamata izazivaju smanjenje potrošnje kiseonika, inhibiraju sintezu noradrenalina i remete aktivnost nekih enzima. To je i bio razlog zašto se u malini ne smeju naći rezidueje ditiokarbamata, što je i prikazano u tabeli 1, gde su date MRL vrednosti za malinu prema preporuci FAO (Lehotay i Garcia Valverde, 1997; Ruet-Ching Hsu et al., 1991).

Ispitivanja, izvršena u radu su imala za cilj da proveru da li se u malinama koje se proizvode u našoj zemlji nalaze rezidue ditiokarbamata i da li je ona, sa tog aspek-

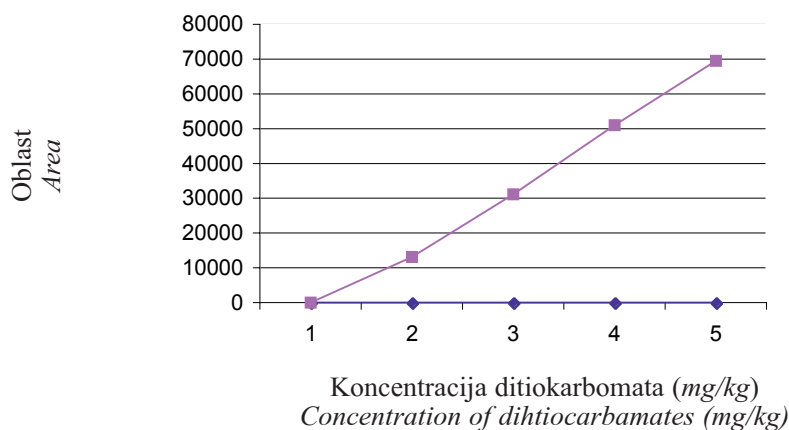
Tab. 1. Specifikacija FAO za MRL (u mg/kg) u malinama
Specification of FAO for MRL (in mg/kg) in raspberries

Pesticid <i>Pesticide</i>	MRL <i>Maximum residue limit</i>
2,4-D	0,1
Carbaryl	10
Chlorpyrifos	0,2
Diazinon	0,2
Dichlorofluanid	15
Imazalil	2
Iprodione	30
Malathion	8
Metalaxyl	0,2
Parathion-methyl	0,01
Permethrin	1
Pirimicarb	0,5
Pirimiphos-methyk	1
Procymidone	10
Thiophanate-methyl	5
Triadimefon	1
Triadimenol	0,5
Vincozolin	5

ta, pouzdana za ishranu.

Kalibraciona kriva za određivanje ditiokarbamata prikazana je na grafikonu 1., a rezultati određivanja sadržaja ditiokarbamata u uzorcima smrznute maline prikazani su u tabeli 2.

Rezultati određivanja ditiokarbamata u malini uzorkovanih iz različitih hladnjača ukazuju da, shodno zakonu o zdravstvenoj ispravnosti životnih namirnica i



Graf. 1. Kalibraciona kriva za određivanje sadržaja ditiokarbamata u malini
Graph 1. Calibration curves for determination of content of dithiocarbamates in raspberry

Tab. 2. Rezultati određivanja ditiokarbamata u uzorcima smrznute maline*
Results of the analysis of dithiocarbamates in samples of frozen raspberries

Vrsta uzorka <i>Sort of sample</i>	Godina uzorkovanja <i>Year</i>	Ditiokarbamati (u mg/kg) <i>Dithiocarbamates (in mg/kg)</i>
Zamrznuta malina iz hladnjače „Guča“ <i>Frozen raspberry from 'Guča' cold storage</i>	2000	< 0,05
	2001	< 0,05
Zamrznuta malina iz hladnjače „Pecka“ <i>Frozen raspberry from 'Pecka' cold storage</i>	2000	< 0,05
	2001	< 0,05
Zamrznuta malina iz hladnjače „Kotraž“ <i>Frozen raspberry from 'Kotraza' cold storage</i>	2000	< 0,05
	2001	< 0,05
Zamrznuta malina iz hladnjače „Čačak“ <i>Frozen raspberry from 'Čačak' cold storage</i>	15.02-21.02.2001.	0,1-0,23
	24.02.2001.	0,05-0,23
	23.07.2001.	< 0,05
Zamrznuta malina iz hladnjače „Arlja“ <i>Frozen raspberry from 'Arlje' cold storage</i>	23.07.	< 0,05

* Ditiokarbamati (Maneb, Mancozeb, Methiram, Propineb, Thiram, Zineb, kao CS₂ podgrupa).

predmeta opšte upotrebe (Službeni list SFRJ, 1991), Pravilnika o količini pesticida i drugih otrovnih materija, hormona, antibiotika i mikotoksina, koji se mogu naći u životnim namirnicama (Službeni list SRJ, 1992), ditiokarbamati u uzorcima ne nalaze se uvek u granicama koje su manje od Zakonom dozvoljenih količina.

Iako je većina uzoraka ispitivanih malina sadržala ditiokarbamate ispod tragova detekcije (0,05 mg/kg), što znači da je malina bila ispravna za upotrebu, pojedini uzorci maline, naročito proizvedene tokom 2001. god., uzorkovanih iz hladnjače „Čačak“, sadržali su ditiokarbamate u količinama koje su višestruko premašivale dozvoljene vrednosti, od 0,07 do 0,23 mg/kg.

Takođe, dobijeni rezultati određivanja ditiokarbamata ukazuju da ne postoji kontinuitet u kontaminaciji malina koje se proizvode u našoj zemlji, u jednom dužem vremenskom intervalu, tokom 2000., 2001. Uzorci ispitivani tokom 2002. god., nisu ukazali na kontaminaciju ditiokarbamatom. Ovi rezultati ukazuju na nepravilno korišćenje fungicida koji sadrže ditiokarbamate, od strane pojedinih proizvođača (koriste naročito Mancozeb i Zineb) zbog čega je neophodno da, uz određivanje agrotehničkih mera koje poboljšavaju prinos i kvalitet maline, istovremeno treba vršiti i edukaciju naročito individualnih proizvođača, radi očuvanja zdravstvene ispravnosti ovog izuzetnog voća, po čijoj proizvodnji Srbija poslednjih godina preuzima primat u Evropi.

Zaključak

Malina (*Rubus idaeus*) je, posle jagode, najznačajnija jagodasta voćka, a poslednjih godina najbolji izvozni proizvod (*trade mark*) naše zemlje.

Iz tih razloga treba naročitu pažnju posvetiti i njenom kvalitetu kao i zdravstvenoj ispravnosti, usled korišćenja hemijskih preparata usmerenih pre svega na njenu otpornost i izdržljivost prema svim mogućim bolestima i štetočinama.

Pun uspeh u gajenju može se očekivati samo ako se dobro poznaju moguće bolesti i štetočine malina i ako se primene poznate mere zaštite od njih, ali samo u skladu sa preporukama i stručnjaka za zaštitu bilja, i prema zakonskim preporukama.

Nepravilno korišćenje preparata za zaštitu malina može dovesti od toga da se u malinama nađu i ostaci veoma opasnih (uglavnom kancerogenih) supstanci čije prisustvo nije dozvoljeno nijednim zakonom, ili je limitirano na veoma niski nivo (reda veličine ppm). Prisustvo u bilo kojoj koncentraciji ovih supstanci nepovoljno utiče i na zdravstvenu ispravnost maline, bez obzira na njen kvalitet, ali i na njen marketinški tretman koji je veoma bitan za prodaju, naročito na inostranom tržištu.

Primljeno: 30. 10. 2003.

Prihvaćeno: 21. 01. 2004.

Literatura

- Dithiocarbamate fungicides. *Analyst*, 1981, 106: 782-787.
- Lehotay, S.J., Garcia Valverde, A. (1997): Evaluation of different solid-phase Traps for automated collection and clean-up in the analysis of multiple pesticides in fruits and vegetables after supercritical-fluid extraction. *Journal of Chromatography A*, 751(1): 69-84.
- Ministry of Public Health, Welfare and Sport (1996): Analytical Methods for Pesticide Residues in Foodstuffs, Sixth edition, The Netherlands, Multi-residue Method 5 (Dithiocarbamates).
- Newsome, W.H. (1974): A method for determining ethylenebis (dithiocarbamate) residues in food crops as bis (trifluoroacetamido) ethane. *J. Agric. Food Chem.*, 22(5): 886-889.
- Pantelić, M. (1982): Gajenje jagode i maline. Mala poljoprivredna biblioteka, Beograd, XVII(184), 10: 39-62.
- Ruei-Ching, H., Biggs, I., Saini, N.K. (1991): Solid-Phase Extraction Cleanup of Halogenated Organic pesticides. *J. Agric. Food Chem.*, 39: 1658-1666.
- Službeni list SFRJ (1991): Zakon o zdravstvenoj ispravnosti životnih namirnica i predmeta opšte upotrebe, br. 53/91.
- Službeni list SRJ (1992): Pravilnik o količinama pesticida, metala i metaloida i drugih otrovnih supstancija, hemioterapeutika, anabolika i drugih supstancija koje se mogu nalaziti u namirnicama. br. 5: 67-85.
- Winell, B. (1975): Ditiokarbamatrester i frukt bar, gronsaker och potatis. *Var foda*, 2: 1-9.

ASSESSMENT OF DITHIOCARBAMATES IN RASPBERRY (*Rubus idaeus* L.)
BY GAS CHROMATOGRAPH VIA HEAD SPACE

Divna Kovačević¹, Anka Jovanović², Mira Pucarević³, Miloš B. Rajković¹

¹*The Faculty of Agriculture, Zemun-Belgrade*

²*City Public-Health Institute, Belgrade*

³*The Institute for Farming and Vegetable Growing, Novi Sad*

Summary

Dithiocarbamates are fungicides; in terms of chemical composition they are derivatives of dithiocarbamic acid and are ingredients of Mancozeb and Zineb, which are used for raspberry control against mold. The stated chemicals are to be used up to the flowering onset. The application is non-conform during fruit development. The presence of dithiocarbamates in raspberry is prohibited by the regulation.

Nevertheless, the presence was recorded in some raspberry samples, which resulted from the application during fruit ripening. The stated neither improve fruit quality nor protect it from decline. Hence, specific consignments of exported frozen berries were turned down in EU countries.

The paper depicts the method for the assessment of pesticide residues (dithiocarbamates) by gas chromatograph via Head Space, which was used for the evaluation of frozen raspberry taken from differing cold stores in 2000 and 2001. Although most samples contained dithiocarbamates below detection levels (0.05 mg/kg), i.e. raspberry was prepared for usage, specific samples, in particular those used in 2001, contained the rates of dithiocarbamates which significantly surpassed allowed values: from 0.07 to 0.23 mg/kg. These results prove improper application of fungicides which contain dithiocarbamates. Therefore, it is essential to determine the cultural practices which will improve yield and fruit quality. Training, in particular of individual producers, should concurrently be done, as to preserve health status of this precious fruit crop, the production of which ranks first in Europe.

Author's address:

Dr Miloš B. Rajković
Poljoprivredni fakultet
Nemanjina 6
11080 Zemun-Beograd
Srbija i Crna Gora