

Marina Ivanović<sup>1</sup>, Tamara Galonja Coghill<sup>2</sup>, Saša Janković<sup>3</sup>,  
Miloš B. Rajković<sup>4\*</sup>, Veroslava Stanković<sup>1</sup>, Dušanka  
Paunović<sup>4</sup>, Snežana Zlatanović<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Akademija strukovnih studija Beograd, Odsek Visoka zdravstvena škola, Beograd, <sup>2</sup> Privredna akademija, Fakultet za inženjerski menadžment i ekonomiju, Novi Sad, Srbija, <sup>3</sup> Institut za higijenu i tehnologiju mesa, Beograd, <sup>4</sup> Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Institut za prehrambenu tehnologiju i biohemiju, Beograd, <sup>5</sup> Institut za higijenu i tehnologiju mesa, Beograd, <sup>6</sup> Institut za opštu i fizičku hemiju, Beograd, Srbija

Naučni rad

ISSN 0351-9465, E-ISSN 2466-2585

UDC:638.14.06:638.162:577.1:632.95.028

doi: 10.5937/zasmat21010221

Zastita Materijala 62 (1)  
22 - 33 (2021)

## Analiza uzoraka organski proizvedenog meda i meda proizvedenog na konvencionalni način na području Zapadne Srbije

### IZVOD

Na području Zapadne Srbije izuzetno je zastupljena proizvodnja meda na konvencionalni način. Uprkos prednostima koje donosi organska proizvodnja meda, pčelari se ipak, ne odlučuju na taj korak, bez obzira na teškoće sa plasmanom na inostrano tržište. Osim neospornih nutritivnih vrednosti, med proizveden na konvencionalni način, uz upotrebu agrotehničkih mera i primenu široke palete proizvoda za tretiranje bolesti pčela, u svom sastavu vrlo često sadrži i ostatke opasnih hemijskih jedinjenja, pesticida i antibiotika. Istraživanje je vršeno na području Zapadne Srbije. Obuhvaćeno je pet proizvođača meda, dva koja proizvodnju vrše na organski način i tri sa konvencionalnim načinom rada. Nakon osmatranja terena i pčelinjaka, intervjuisanja proizvođača, uzeti su uzorci meda. Po izvršenim analizama, konstatovano je da je jedan uzorak iz konvencionalne proizvodnje nebezbedan za ljudsku upotrebu, jer sadrži ostatke pesticida – amitraza.

**Ključne reči:** pčelarstvo, med, organsko pčelarenje, ostaci, pesticidi, amitraz

### 1. UVOD

Po domaćoj i stranoj regulativi, „Med je prirodna, slatka supstanca koju proizvode medonosne pčele (*Apis mellifera* L.) preradom nektara biljaka, ili iz sokova sa živih delova biljaka ili sakupljanjem ekskreta insekata koji se hrane sišući sokove sa živih delova biljaka, koji pčele sakupljaju, prerađuju i dodaju sopstvene specifične supstance, dehidriraju i odlažu u ćeliju saća do sazrevanja”. Ova definicija meda data je u „Pravilniku o kvalitetu meda i drugih proizvoda pčela” [1]. Ista definicija data je i u Codex Alimentarius Commission [2] kao i u evropskoj regulativi (Council Directive 2001/110/EC) [2,3]. Definicijama je određeno dvostruko poreklo meda, kao namirnice i biljnog i životinjskog porekla. Takođe iz ovih definicija proizilazi i osnovna podela meda prema poreklu, na nektarski ili cvetni med koji potiče od nektara medonosnog bilja i medljikovac koji potiče uglavnom od medne rose.

\*Autor za korespondenciju: Miloš B. Rajković

E-mail: rajmi@agrif.bg.ac.rs

Rad primljen: 18. 08. 2020.

Rad korigovan: 11. 11. 2020.

Rad prihvaćen: 23. 11. 2020.

Rad je dostupan na sajtu: www.idk.org.rs/casopis

Med je najznačajniji pčelinji primarni proizvod kako u kvantitativnom, tako i u ekonomskom pogledu. Istorija korišćenja meda duga je koliko i istorija čoveka i gotovo da sve prve civilizacije poseduju pisane dokumente o korišćenju meda, kao jednog od izvora hrane, ili kao simbola u religioznim, magijskim i isceliteljskim ritualima [4].

Med predstavlja presičen vodeni rastvor šećera, te su najzastupljeniji sastojci meda ugljeni hidrati i voda (prosečno oko 17%), koji zajedno čine više od 99% meda. Ostatak su proteini (uključujući i enzime), minerali, vitamini, organske kiseline, fenolna jedinjenja (flavonoidi i fenolne kiseline), neka isparljiva jedinjenja, voskovi i razni derivati hlorofila [5]. Iako je udeo ovih supstanci u medu veoma mali (< 1 %), one su zasigurno odgovorne kako za senzorna tako i za specifična svojstva meda (miris, ukus i dr.) [6]. Neke od ovih supstanci u med dodaju pčele, neke vode poreklo od medonosne biljke, a neke nastaju u toku zrenja meda u saću [7].

Sastav meda tesno je povezan sa njegovim botaničkim poreklom, koji je sa druge strane povezano sa geografskom područjem sa kojeg med potiče. Akumulacija fitohemikalija za određenu biljnu vrstu zavisi od klimatskih uslova (sunčeva svetlost i vlaga), karakteristika tla, i prisustva

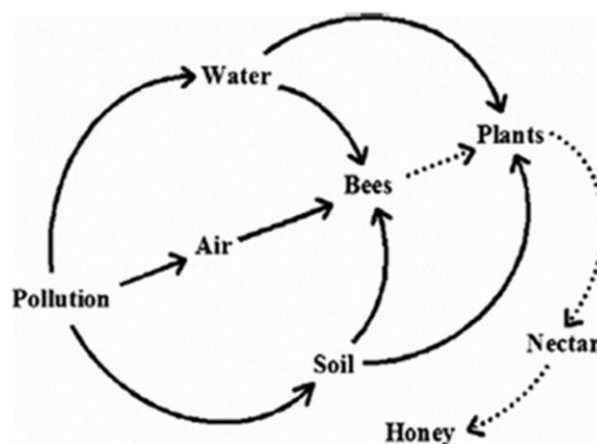
različitih minerala koji potiču iz zemljišta. Akumulacija fitohemikalija u velikoj meri zavisi i od temperatura, genetike kao i od sorte biljne vrste. Ovo sugeriše da zbog prisustva određene flore i raznovrsnosti ekosistema na datoj teritoriji, med može imati jedinstvene karakteristike. S obzirom da je med složeni prirodni proizvod, koji pčele proizvode pod relativno nekontrolisanim uslovima, odgovarajuća karakterizacija uzoraka meda zahteva određivanje većeg broja parametara, što stvara poteškoće u vrednovanju rezultata. Zbog toga se primenom različitih metode multivarijantne hemometrije postiže identifikovanje veze između različitih parametara i pronalaženje trendova koji omogućavaju dalju karakterizaciju. Tokom poslednjih nekoliko decenija u različitim studijama primena multivarijacione hemometrijske analize na fizičko-hemijske parametare, mineralni sastav, šećere, polifenolni profil i aminokiselinski sastav pokazala se kao veoma uspešan, kako za definisanje geografskog porekla, tako i za određivanje botaničkog porekla meda [8-11].

U okviru Regulative EU 396/2005 [12] i regulative Republike Srbije [13] definisane su MDK za širok spektar pesticida. Pored toga, u Regulativi EU 37/2010 propisane su MDK za ostatke farmakološki aktivnih supstanci u medu [14]. Nedovoljno razvijena svest o rizicima neadekvatne primene ovih hemijskih sredstava, čini da med, kao hranljiva i lekovita hrana koja je poznata i u prirodnoj medicini, gubi svoje osnovne karakteristike i postaje pretnja ljudskom zdravlju. Različite grupe pesticida i veterinarskih lekova su odgovorne za izazivanje malaksalosti, bolova u očima, problema sa kožom i respiratornim sistemom. Neki pesticidi i veterinarski lekovi smatraju se odgovornim za izazivanje određenih vrsta kancera, teratogenih efekata, hromozomskih abnormalnosti i slabljenja imuniteta kod ljudi [15]. Organohlorni preparati se sporo razgrađuju. Mehanizam njihovog dejstva je povećanje oksidativnog stresa i sinteza proinflatornih citokina, oštećenje hormonskog sistema.

Sa aspekta monitoringa životne sredine pčele predstavljaju izvrsne mobilne uzorkivače, ali i bioindikatore hemijskog zagađenja, s obzirom da tokom svog leta dolaze u kontakt sa različitim zagađivačima [16]. Štetno dejstvo raznih kontaminanata se, pre svega, manifestuje visokim stepenom mortaliteta kod pčela, ali se njihovo prisustvo može detektovati i u medu i ostalim pčelinjim proizvodima [17]. Med i ostali pčelinji proizvodi mogu biti kontaminirani indirektno, iz životne sredine ili usled primene agrotehničkih mera, ili direktno, usled neadekvatne pčelarske prakse. Glavni kontaminanti poreklom iz životne sredine su toksični (teški) metali, pesticidi, polihlorovani bifenili (PCB), policiklični aromatični ugljovodonici (PAU),

bakterije, genetski modifikovani organizmi, radioaktivnost, mikotoksini i pirolizidinski alkaloidi kao česti zagađivači polena. Štetne supstance koje se u medu i drugim proizvodima mogu naći usled neadekvatne pčelarske prakse su supstance za kontrolu štetočina i bolesti pčela (akaricidi, antibiotici, pesticidi itd) i teški metali poreklom iz pčelarske opreme i posuđa za skladištenje meda [18-20].

Sadržaj metala u medu je u najvećoj meri određen njegovim botaničkim i geografskim poreklom. Kako su pčele izložene zagađivačima koji se nalaze na površini od oko 7 km<sup>2</sup> u okolini pčelinjaka dolaze u kontakt sa vazduhom, zemljištem i vodom, za očekivati je da med bude koristan pokazatelj zagađenja teškim metalima (slika 1).



Slika 1. Prirodni i antropogeni izvori metala u medu [21]

Figure 1. Natural and anthropogenic sources of metals in honey [21]

Teški metali potiču od industrije, saobraćaja, primene veštačkih đubriva koja sadrže kadmijum, kao i pesticida na bazi žive i arsena, koji se još uvek koriste u nekim zemljama [22,23]. Hemijski sastav, samim tim i sadržaj metala u polenu, takođe zavisi od botaničkog i geografskog porekla, ali i postupka prerade i pčelarskih aktivnosti. Vazduh i zemljište sadrže toksične teške metale, uglavnom olovo i kadmijum. Olovo u nektar ili medljiku dospeva direktno, iz vazduha, za razliku od kadmijuma, koji se iz zemljišta, kroz biljku transportuje u nektar ili medljiku. Međutim, mnoga istraživanja ukazuju na relativno nisku kontaminaciju meda olovom, kadmijumom i pesticidima, što je najverovatnije usled filtrirajućih efekata pčela [18].

Što se tiče zakonske regulative, u pogledu maksimalno dozvoljenih količina (MDK) pojedinih metala u medu, evropski propisi definišu MDK samo za olovo [24], dok su u srpskoj regulativi definisane MDK za Pb, Cd, As, Zn, Fe i Cu [13].

Policiklični aromatični ugljovodonici (PAU ili engl. *polycyclic aromatic hydrocarbons* - PAH) predstavljaju veliku grupu liposolubilnih organskih jedinjenja koja u svojoj strukturi sadrže dva ili više kondenzovanih aromatičnih prstenova. Štetan uticaj PAU na ljudski organizam ispoljava se kroz mutageno i karcinogeno dejstvo [25]. Na osnovu monitoringa uzoraka iz životne sredine Agencija za zaštitu životne sredine SAD (United States Environmental Protection Agency - U.S. EPA) navela je 16 najčešće prisutnih PAH: acenaften, acenaften, antracen, fluoranten, fluoren, naftalen, fenantren, piren, benzo[a]antracen, benzo[b]fluoranten, benzo[k]fluoranten, benzo[ghi]perilen, benzo[a]piren, krizen, dibenz[a,h]antracen i indeno [1,2,3-cd]piren. PAH u hranu dospevaju iz vazduha, vode i zemljišta, ali i usled procesa prerade hrane. Regulatorna komisija Evropske unije broj 835/2011 (*European Commission*, 2011) od 19. avgusta 2011. godine propisala je maksimalno dozvoljene količine (MDK) za benzo[a]piren (BaP) (od 1-5 µg/kg) kao i za sumu benzo[a]pirena, benzo[a]antracena (BaA), benzo[b]fluorantena (BbF) i hrizena (CHR) u različitim vrstama hrane (od 1-35 µg/kg) [26]. Ovakav pristup je obezbedio da se hrana u kojoj benzo[a]piren nije detektovan, ali su prisutni ostali PAH, ne može naći na tržištu.

Što se meda i pčelinjih proizvoda tiče, situacija je slična: do kontaminacije dolazi iz životne sredine, ali i usled pčelarskih aktivnosti kao što je zadimljavanje pčela u košnici u toku rada sa njima ili pri skidanju medišnih nastavaka radi vrcanja meda [27]. Maksimalno dozvoljene količine PAU su, i u evropskoj i u domaćoj regulativi, definisane za namirnice koje sadrže masti i ulja i kod kojih procesi dimljenja ili sušenja mogu dovesti do kontaminacije [13,28,29]. Za med i ostale pčelinje proizvode nisu propisane MDK. Sadržaj ovih jedinjenja je praćen kroz razne studije [27,29-35]. Povišen nivo PAU je zabeležen u uzorcima meda ili drugih pčelinjih proizvoda poreklom iz urbanih, odnosno industrijskih oblasti [30,32].

Organsko pčelarenje podrazumeva poštovanje određenih principa i metoda. U saglasnosti sa prirodom, pčele proizvode med i druge proizvode, a pčelar je tu da oduzme višak tih proizvoda i da pri tom ne ugrozi pčele. Pčelarski proizvodi poprimaju karakter organskog proizvoda ukoliko se poštuju metodi i principi organski primenjivane proizvodnje na propisano postupanje sa pčelinjim društvima i održavanjem njihovog okruženja kao i objekata za preradu i skladištenje u domenu organske poljoprivredne proizvodnje.

Za ispunjavane ovih uslova period konverzije treba da iznosi 12 meseci.

Pčelinjaci moraju biti tako postavljeni da u krugu od 3 km oko košnice, nalazište nektara,

medljike i polena mogu se isključivo eksploatisati od:

- organski gajenih biljaka (ukoliko se na takvim područjima – terenima primenjuje ovaj vid uzgajanja);
- prirodne vegetacije, bez bilo kakvog tretmana hemijskim sredstvima poput zaprašivanja livada i šuma pesticidima ili insekticidima);
- biljaka za čiju se zaštitu koristi veoma mali broj sredstava, a nema tretiranja sintetičkim herbicidima, fungicidima, insekticidima i ostalim štetnim sredstvima za prirodnu sredinu.

Organsko pčelarenje, funkcionišući u skladu sa zakonima prirode, ne remeti prirodnu ravnotežu i dejstvuje u svrhu aktivnog očuvanja životne sredine. Organsko pčelarenje predstavlja povratak tradiciji, povratak zdravim tehnologijama, prednost daje prirodnim materijalima, čime se pojačava prirodna otpornost pčele kao nosioca zajednice. Organskom pčelarenju je primat kvalitet proizvoda, nasuprot kvantitativno orijentisanom industrijalizovanom tipu proizvodnje. Glavni rezultat ovog vida proizvodnje je bezbedan proizvod proizveden u skladu sa zakonima prirode.

Cilj ovog rada je da se prikaže mogućnost dospevanja pojedinih zagađujućih materija u krajnji pčelinji proizvod - med i ukaže na vrednosti povratka prirodi i tradicionalnim načinima proizvodnje. Proizvodnjom na organski način, osim hranljivih vrednosti, srpski med bi, hemijski ispravan i zdravstveno bezbedan, postao konkurentan i na zahtevnom inostranom tržištu, a područje zapadne Srbije sa svojim bogatstvom vrsta ekološki značajno i atraktivno.

## 2. EKSPERIMENTALNI DEO

Istraživanje je vršeno na području Zapadne Srbije u periodu jun-avgust 2014. godine. Obuhvaćeno je pet pčelinjaka, od koji su dva organska, smeštena na teritoriji Nacionalnog parka „Tara“, a ostala tri pripadaju konvencionalnom tipu proizvodnje i stacionirana su na teritoriji opštine Priboj. U cilju utvrđivanja različitosti pristupa proizvodnji i plasmanu proizvoda, izvršeno je neposredno osmatranje terena i intervjuisanje proizvođača. Pitanja su bila jasna, nedvosmislena, prilagođena pretpostavljenom nivou znanja, dizajnirana na osnovu dosadašnjih iskustava, važećih zakona i pravilnika. Nakon prikupljenih podataka, med je uzorkovan na sledeći način: vrcanjem, ceđenjem, a potom sipanjem u originalu ambalažu proizvođača (PVC posuda sa zavrtnjem) i analiziran na prisustvo rezidua *streptomicina*, *tetraciklina*, *sulfonamida*, *kumafosa* i *amitraza*.

Ispitivanje ispravnosti vršeno u Institutu za higijenu i tehnologiju mesa, Beograd, metodom

tečne hromatografije. Tečna hromatografija sa tandem masenim detektorima (LC-MS/MS) je opšteprihvaćen „zlatni standard” u praćenju koncentracije lekova u terapiji - TDM (engl. *Therapeutic drug monitoring*) i toksikološkim ispitivanjima [36].

Priprema uzorka za analizu na prisustvo *streptomycina* vršena je tako što je 5 g uzorka meda homogenizovano sa 5% TCA (trihlorosirćetna kiselina) i 0,2 mol/dm<sup>3</sup> HFBA (heptafluorobuterna kiselina). Nakon centrifugiranja vršena je ekstrakcija u čvrstoj fazi (engl. *Solid Phase Extraction* – SPE). Eluiranje je vršeno sa smešom CH<sub>3</sub>CN:0,2 mol/dm<sup>3</sup> HFBA (heptafluorobuterna kiselina) = 80 : 20. Upareni eluat je dopunjen do 1 cm<sup>3</sup> sa 0,02 mol/dm<sup>3</sup> HFBA i korišćen je za injektovanje u HPLC. Pretkolona i kolona: reverzno-fazna C<sub>18</sub> 100 mm x 2,1 mm, veličina čestica 3,5 μm; mobilna faza: 20 mM HFBA u smeši CH<sub>3</sub>CN : H<sub>2</sub>O = 95:5 (A) : 20 mM HFBA u smeši CH<sub>3</sub>CN : H<sub>2</sub>O = 50 : 50 (C).

Prikaz gradijenta korišćenog u hromatografskom određivanju *streptomycina* dat je u tabelama 1 i 2. Temperatura kolone 40°C; pozitivni mod jonizacije; kapilarni napon 3,2 kV.

Tabela 1. Odnos mobilnih faza u određenom vremenu hromatografisanja

Table 1. The ratio of mobile phases at a given chromatography time

Vreme (min)	Protok (cm <sup>3</sup> /min)	Mobilna faza A, (%)	Mobilna faza C, (%)
0	0,3	100	0
3	0,3	70	30
4	0,3	100	0
7	0,3	100	0

Tabela 2. Masa streptomycina, mase njegovih fragmenata, kao i napon na konu masenog detektora

Table 2. The mass of streptomycin, the masses of its fragments, and the voltage at the cons of the mass detector

MRM mode	Prekursor jon	Fragmentni jon	Napon na konu, (V)
streptomycin	582,2	176,2	35
		246,2	35
		263,2	35
		540,2	35

Uzorak za dokazivanje prisustva *tetraciklina* pripremljen je tako što je u 1,0 g meda dodato 0,5 cm<sup>3</sup> Na-fosfatnog pufera (0,1 mol/dm<sup>3</sup>, rN 8) i dobro promešano na Vortex-u. Dodat je 1 cm<sup>3</sup> acetonitrila i ponovo homogenizovano. Nakon

centrifugiranja talogu je dodata 10% TCA (trihlorosirćetna kiselina) i acetonitril. Supernatantu nakon centrifugiranja dodat je 12,5% amonijum-hidroksid. Rastvor je zatim uparen do suva, rekonstituisan u mobilne faze. Za analizu *tetraciklina* korišćeni su: kolona i pretkolona reverzno-fazna C<sub>18</sub> 100 x 2,1 mm; 3,5 μm; temperatura 35±5°C; Mobilna faza A: 0,1% HCOOH u vodi – 50%, V: 0,1% HCOOH u acetonitrilu – 50%; Protok je bio 0,25 cm<sup>3</sup>/min, a kao detektor je korišćen tripl kvadropolni maseni detektor; pozitivni mod jonizacije; kapilarni napon 3,35 kV; argon kao kolizioni gas; napon na konu 37 V.

Tranzicije:

Doksiciklin: 444,9 > 428 i 444,9 > 154

Hlortetraciklin: 478,9 > 443,9 i 478,9 > 154

Oksitetraciklin: 460,9 > 426 i 460,9 > 127

Tetraciklin: 449,9 > 410 i 449,9 > 154

Priprema uzorka za analizu na *sulfonamide* vršena je na sledeći način: u 1 g meda dodata je HCl koncentracije 2 mol/dm<sup>3</sup> i limunska kiselina koncentracije 0,3 mol/dm<sup>3</sup>. Uzorak je kvantitativno prenesen na SPE (engl. *Solid Phase Extraction*) kolonice. *Tetraciklini* su sa kolona eluirani sa rastvorom amonijaka u metanolu. Eluat je uparen do suva. Suvi ostatak, rastvoren u mobilnoj fazi, injektovan je u HPLC.

Uslovi za LC-MS/MS određivanje: Kolona: reverzno-fazna C – 18 T = 35°C; Mobilna faza: A: 0,1% HCOOH u vodi 40%, V: 0,1% HCOOH u acetonitrilu 60%; Protok: 0,2 cm<sup>3</sup>/min izokratno; Detektor: MS-MS, pozitivni mod jonizacije; Kapilarni napon: 3.5 kV; kolizioni gas: argon.

Mase molekula svakog ispitivanog sulfonamida, mase njihovih fragmenata, kao i napon na konu masenog detektora, prikazane su u tabeli 3.

Metoda za detekciju *kumafosa* je zasnovana na ekstrakciji *kumafosa* iz uzoraka pomoću acetonitrila i tečno-tečnom razdvajanju u prisustvu MgSO<sub>4</sub> i NaCl. Supernatant je prečišćen tehnikom disperzivne čvrsto fazne ekstrakcije (dSPE). Nakon ekstrakcije i prečišćavanja pesticidi su identifikovani i kvantifikovani primenom tečne hromatografije sa tripl kvadropolnim masenim detektorom (LCMS/MS). Uslovi za LC analizu bili su: pretkolona: Security Guard ULTRA Cartridges UHPLC C<sub>18</sub> for 2.1 mm ID Columns (Phenomenex); kolona: ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub> veličina čestica 1,7 μm, 2,1x50 mm (Waters); mobilna faza: A: 0,1% HCOOH/H<sub>2</sub>O – 30%, V: ACN – 70%; protok: 0,350 cm<sup>3</sup>/min; temperatura kolone: 30 ± 2°C; pozitivni mod jonizacije; tranzicije za *kumafos*: 363 → 177 i 363 → 227 i 363 → 307; kapilarni napon: 3.00 kV; napon na konu: 30V; kolizioni gas: argon.

Tabela 3 Mase molekula sulfonamida i njihovih fragmenata, napon na konu masenog detektora

Table 3. Masses of sulfonamide molecules and their fragments, voltage at cons of mass detector

	Tranzicije	Napon na konu (V)
Sulfatiazol	256 > 92,0 256 > 108,0 256 > 156,0	30
Sulfakvinoksalin	301 > 92,0 301 > 108,0 301 > 156,0	30
Sulfahloropiridazin	285 > 92,0 285 > 156,0	28
Sulfapiridin	250 > 92,0 250 > 108,0 250 > 156,0 250 > 184,0	30
Sulfadiazin	251 > 92,0 251 > 108,0 251 > 156,0	28
Sulfanilamid	173 > 92,0 173 > 132,0 173 > 156,0	30
Sulfafenazol	314,4 > 92,0 314,4 > 156,0	35
Sulfamonometoksin	281 > 92,0 281 > 108,0 281 > 156,0	30
Sulfisoksazol	268 > 91,8 268 > 108,0 268 > 113,1 268 > 155,8	25
Sulfadimetoksin	311,1 > 92,0 311,1 > 108,0 311,1 > 156,0	35
Sulfametazin	279 > 92,0 279 > 124,0 279 > 156,0 279 > 186,1	30

Priprema uzorka kod amitraza vršena je metodom koja se zasniva na ekstrakciji amitraza iz meda pomoću smeše natrijum-hidroksida, n-heksana i izo-propil alkohola i njegovom tečno-tečnom razdvajanju u organsku fazu. Nakon ekstrakcije amitraz je identifikovan i kvantifikovan primenom tečne hromatografije sa tripl kvadropolnim masenim detektorom (LCMS/MS).

Uslovi za LC analizu su bili: pretkolona: Security Guard Cartridges Gemini C18 4x2.0 mm ID (Phenomenex); kolona: Thermoscientific Hpersil GOLD C18 veličina čestica 3  $\mu\text{m}$ , 2,1x100 mm (Thermo); mobilna faza: A: 10 mMCH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> - 30%, B: ACN – 70%; protok: 0,250 cm<sup>3</sup>/min; temperatura kolone: 30  $\pm$  2°C; pozitivni mod jonizacije; tranzicije za amitraz: 294,2  $\rightarrow$  163,0 i 294,2  $\rightarrow$  253,0; kapilarni napon: 4.80 kV; napon na konu: 30V; kolisioni gas: argon.

### 3. REZULTATI I DISKUSIJA

Nakon izvršenih laboratorijskih ispitivanja konstatovano je da u uzorcima meda uzorkovanim u pčelinjacima 1-4 nema traženih kontaminatora (zagađivača) preko graničnih vrednosti.

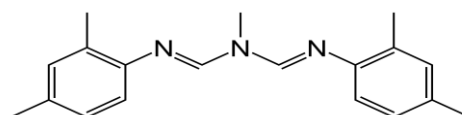
U uzorku meda broj 5, uzetom u pčelinjaku sa konvencionalnim načinom pčelarenja, konstatovano prisustvo pesticida amitraza u nivou 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  što predstavlja graničnu vrednost detekcije (tabela 4).

Tabela 4. Rezultati ispitivanja uzoraka meda (u  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )

Table 4. Test results of honey samples (in  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )

Supstanca/med	1	2	3	4	5
streptomycin	<10	<10	<10	<10	<10
tetraciklini	<20	<20	<20	<20	<20
sulfonamidi	<10	<10	<10	<10	<10
kumafos	<10	<10	<10	<10	<10
amitraz	<5	<5	<5	<5	<b>10</b>

Amitraz (C<sub>19</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>) (Bivarol, Mitac, Varamit, Hemovar, Varolik) je nesistemski akaricid i insekticid, prvobitno sintetisan u kompaniji Boots Co. u Engleskoj 1969. godine, široko korišćen u pčelarstvu još od početka 80-tih godina XX veka (slika 2). Amitraz deluje kao repelant insekata, insekticid i kao pesticidni pojačavač [37].



Slika 2. Amitraz (C<sub>19</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>) - N,N'-[(metilimino)dimetilidid]di-2,4-ksilidin.

Figure 2. Amitraz (C<sub>19</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>) - N,N'-[(Methylimino)dimethylidyne]di-2,4-xylidine

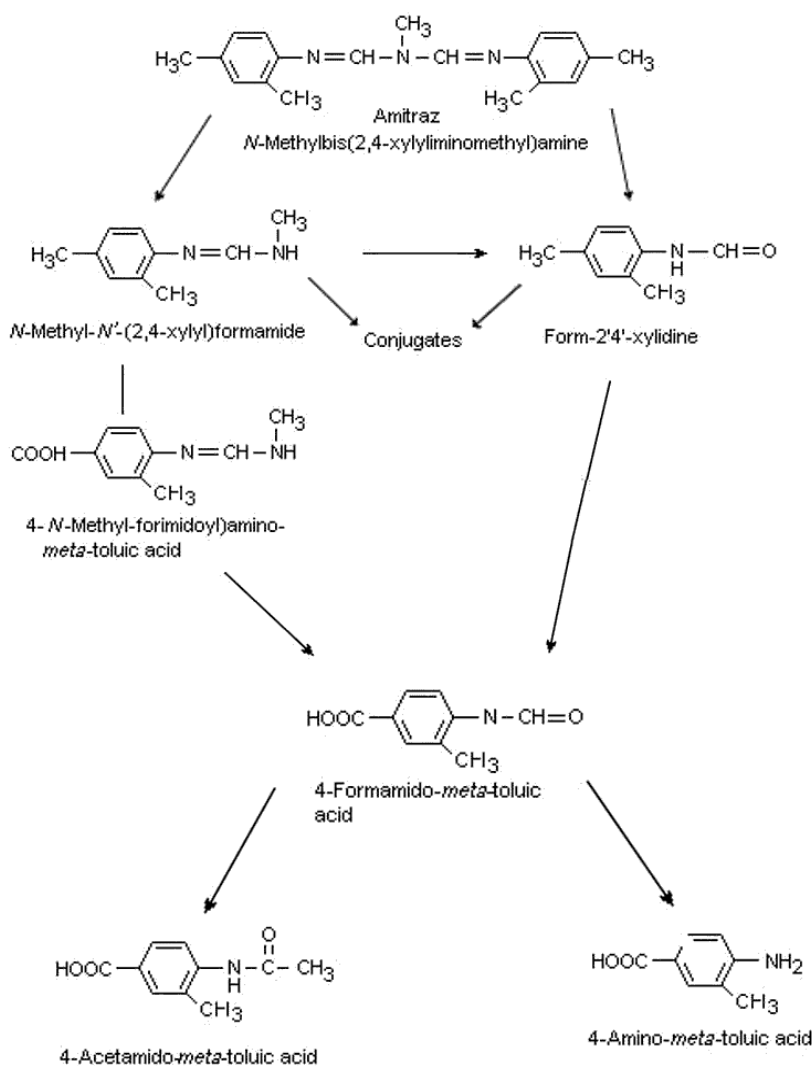
Amitraz je alfa-adrenergički agonist, ligand oktopaminskog receptora centralnog nervnog sistema i inhibitor monoaminske oksidaze i prostaglandinske sinteze. Dovodi do prekomernog pobuđivanja i konsekvantno paralize i smrti insekata. *Amitraz* je manje štetan za sisare, te je između ostalog poznat kao insekticid protiv infestacije pasa gnjidama ili krpeljima. Brzo razlaganje na metabolite u pčeli i visoka akaricidna aktivnost omogućuju njegovu široku primenu u pčelarstvu.

Kretanje vrednosti *amitraza* u medu u Srbiji je između 10 i 60 µg/kg [38]. *Amitraz* je akaricid koji pčelari koriste u košnici radi suzbijanja parazita *Varoe* koji ugrožava pčele. Mnogi preparati koji se koriste na domaćem tržištu sadrže *amitraz*. Korišćenje *amitraza* podrazumeva rizik da se kontaminira med. Većina sintetičkih akaricida su lipofilni i nakupljaju se u pčelinjem vosku, dok su u

medu ostaci relativno niski i leže uglavnom ispod granica ostataka utvrđenih zakonom [38].

*Amitraz* u košnici, u primenjenoj koncentraciji za lečenje pčela je umereno toksičan za čoveka (spada u treću grupu pesticida po toksičnosti). Međutim, *amitraz* je nestabilan i brzo se razgrađuje u košnici ali je bitno da se *amitraz* razgrađuje na niz metabolita od kojih su neki toksičniji i za ljude i za pčele. To je i razlog što je *amitraz* poslednjih godina skoro napušten, što zbog jeftinih i efikasnih lako primenljivih štapića na bazi fluvalinata, što zbog pojave rezistencije na njega. Ali, upravo zbog masovne i na pojedinim područjima katastrofalne rezistencije varoe na fluvalinat, nanovo se uvodi u upotrebu jer se posle dužeg neupotrebljavanja opet pokazao efikasnim.

Mehanizam razgradnje *amitraza* u živom organizmu prikazan je na slici 3 [39,40].



Slika 3. Mehanizam razgradnje amitraza u telu živog organizma [39,40]

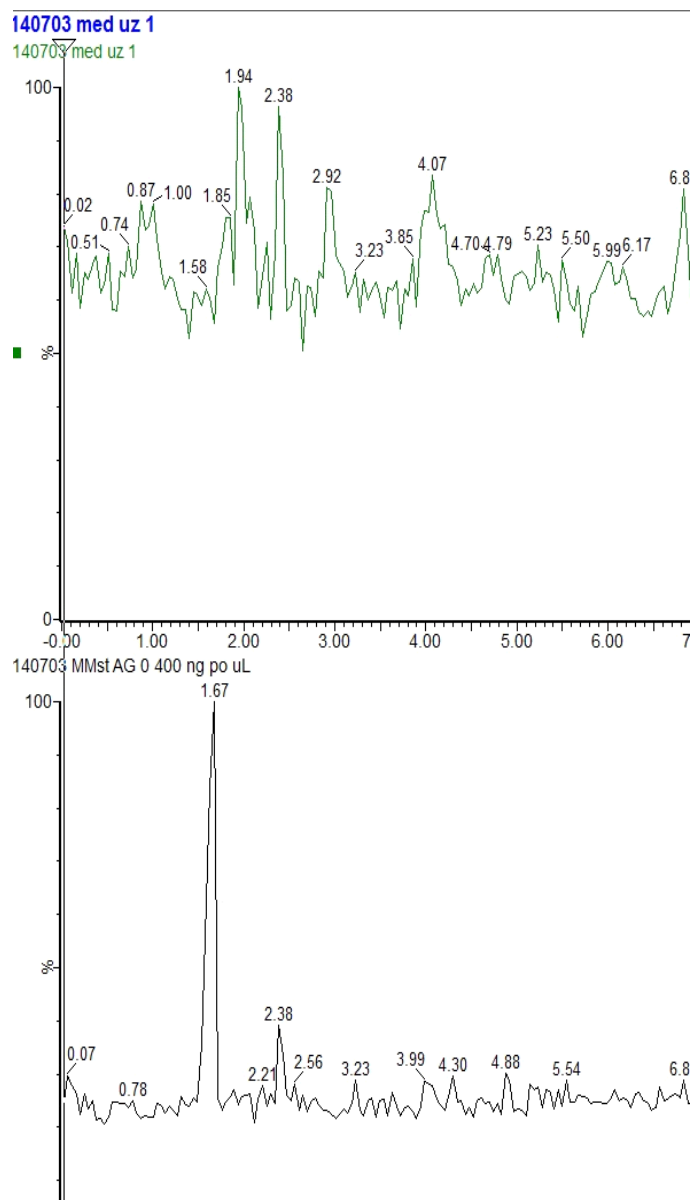
Figure 3. Mechanism of decomposition of amitraz in the body of a living organism [39,40]

Proizvodi degradacije amitraza u živom organizmu su 2,4-dimetilfenilformamid (DMF) i N-2,4-dimetilfenil-n-metiloid (engl. *dimethylphenyl-n-metiloid* - DMPF) i male količine dimetil-acetamida (engl. *dimethylacetamide* - DMA ili DMAc). Istraživanja poluživota razgradnje amitraza u medu i vosku su pokazala da je u pčelinjem vosku amitraz skoro potpuno razgrađen u roku od jednog dana, a u medu u roku od 10 dana. Ali, otkriveno je da DMF kao glavni proizvod razgradnje ostaje i u vosku i u medu, a njegova toksičnost kod sisara je veća nego kod amitraza [37,41].

Na taj način je problematična strana amitrazom

kontaminiranog voska u njegovoj primeni u medicini, a naročito u kozmetici, budući da je liposolubiln i kao takav ulazi u strukturu voska.

Laboratorije *Intertek* i *Quality Service International* obavestile su da se od januara 2018. godine primenjuje nova metoda za analiziranje amitraza koja utvrđuje značajno veće vrednosti za amitraz jer se u obzir uzimaju i individualne vrednosti za tri metabolita amitraza: DMPF, DMF i DMA. To znači da pored zakonski regulisanog sadržaja amitraza laboratorije sada eksplicitno izveštavaju i sadržaj tri metabolita amitraza (ostataka nakon razgradnje).



Slika 4. Streptomycin u uzorku meda broj 1

Figure 4. Streptomycin in honey sample no. 1

*Amitraz* je zakonski regulisan u EU sa maksimalnim nivoom ostataka (MRL) od 200 µg/kg (37/2010EU,396/2005EC), što znači 200 delova na milijardu delova meda. Treba napomenuti da uprkos uspostavljanju MRL-a, ostaci *amitraza* nisu prihvatljivi u nekim zemljama kao što su Italija, Francuska, Japan i Nemačka. Ove zemlje zahtevaju da kvalitet meda bude takav da se *amitraz* uopšte ne detektuje u medu, odnosno da njegova vrednost bude manja od 10 µg/kg. To znači da u medu ne sme biti ni *amitraza* ali ni proizvoda razgradnje.

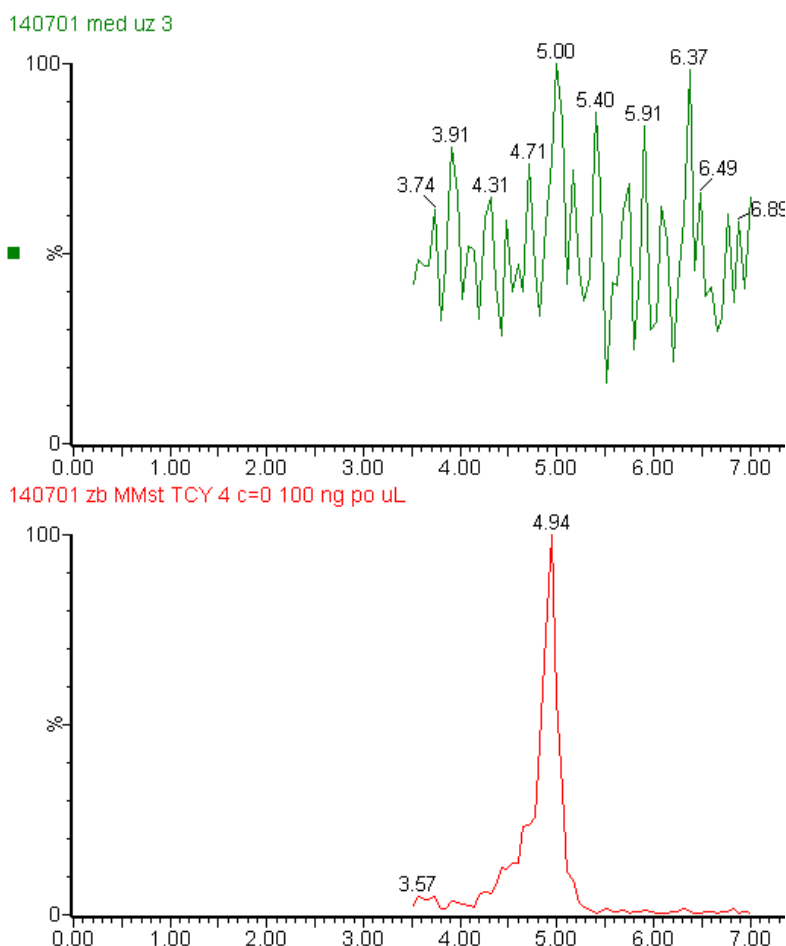
Pčelinje društvo od kog je uzet uzorak meda sa detektovanim *amitrazom* je kapaciteta 20 košnica. U prethodnom periodu od bolesti su bile zastupljene: nozemoza, varoa, krečno leglo. Tretirane su između ostalog, *amitrazom*, što se iskazalo i u rezultatima ove analize.

U blizini od 500 m vrši se tretiranje malina i drugog voća, a na udaljenosti od 300 m nalaze se

drugi pčelinjaci sa konvencionalnim načinom proizvodnje, što takođe može negativno uticati na ispravnost krajnjeg produkta pčela. Kao krajnji rezultat dobijen je zdravstveno nebezbedan proizvod, med koji nije za ljudsku upotrebu. Bez obzira što se radi o graničnoj vrednosti, uzimajući u obzir negativne efekte pesticida na pčele i čoveka, značaj konstatovanog se ne sme umanjiti.

Ostaci malationa i kumafosa nisu detektovani ni u jednom uzorku meda ili propolisa, osim *amitraza* koji je detektovan u uzorku meda broj 5, uzetom u pčelinjaku sa konvencionalnim načinom pčelarenja u kome je konstatovano prisustvo pesticida *amitraza* u nivou 10 µg/kg.

Na slici 4. prikazan je hromatogram uzorka meda broj 1 (bez *streptomicina*) i hromatogram standarda *streptomicina* koncentracije 0,4 ng/µl (pik na 1.67 min). Po očitavanju konstatuje se da u prikazanom uzorku meda nema *streptomicina*.

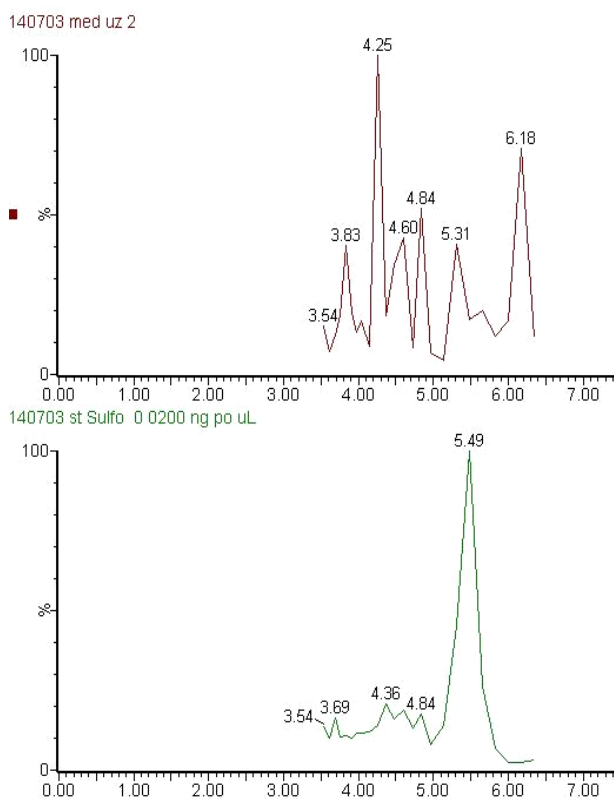


Slika 5. Tetraciklin u uzorku meda broj 3

Figure 5. Tetracycline in honey sample no. 3



Na slici 5. prikazan je hromatogram uzorka meda broj 3, dok donji hromatogram na istom grafikonu predstavlja standard *tetraciklina* koncentracije 0,1 ng/μL (pik na 4.94 min). Na dijagramu se uočava jak pik na 5,00 što možda ukazuje na prisustvo *tetraciklina*, s obzirom da je, zbog složenosti uzorka, moglo doći do blagog pomeranja signala jedinjenja.



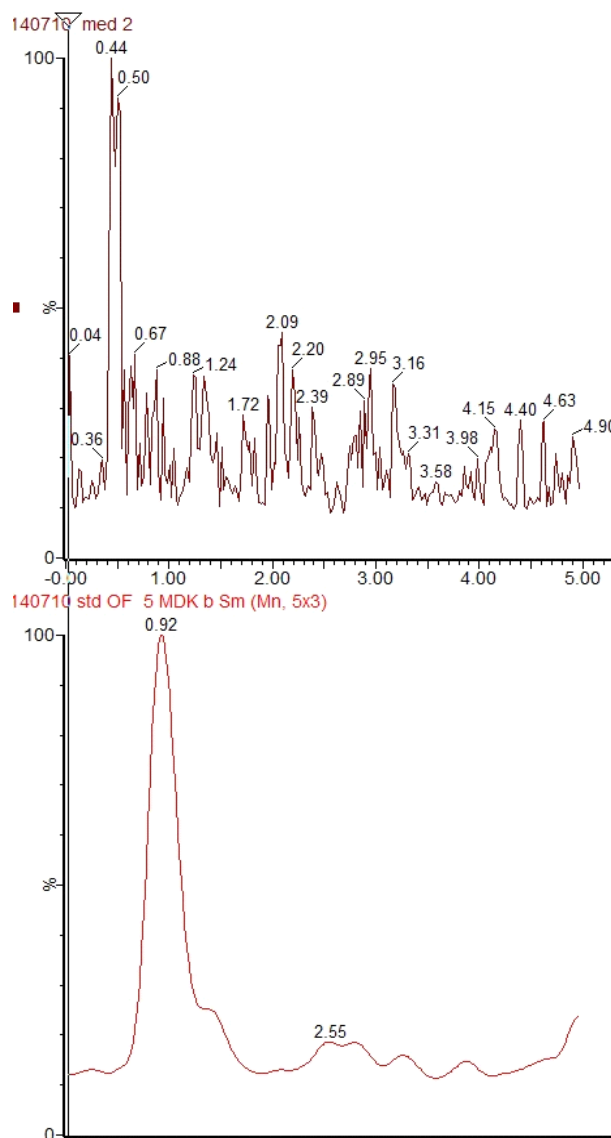
Slika 6. Sulfonamidi u uzorku meda broj 2

Figure 6. Sulfonamides in honey sample no. 2

Na slici 6. prikazan je hromatogram uzorka meda broj 2 (bez sulfonamida) i hromatogram standarda sulfametazina koncentracije 0,02 ng/μL (pik na 5.49 min)

Na slici 7. prikazan je hromatograma uzorka meda broj 2 (bez *kumafosa*) ispod kog je prikazan hromatogram standarda *kumafosa* koncentracije 0,4 ng/μL (pik na 0,92 min).

Slika 8. prikazuje hromatogram broj 5 u kom je dokazano prisustvo *amitraza* (pik na 5,38) sa uporednim hromatogramom standarda *amitraza* koncentracije 0,2 ng/μL (pik na 5,47 min).



Slika 7. Kumafos u uzorku meda broj 2

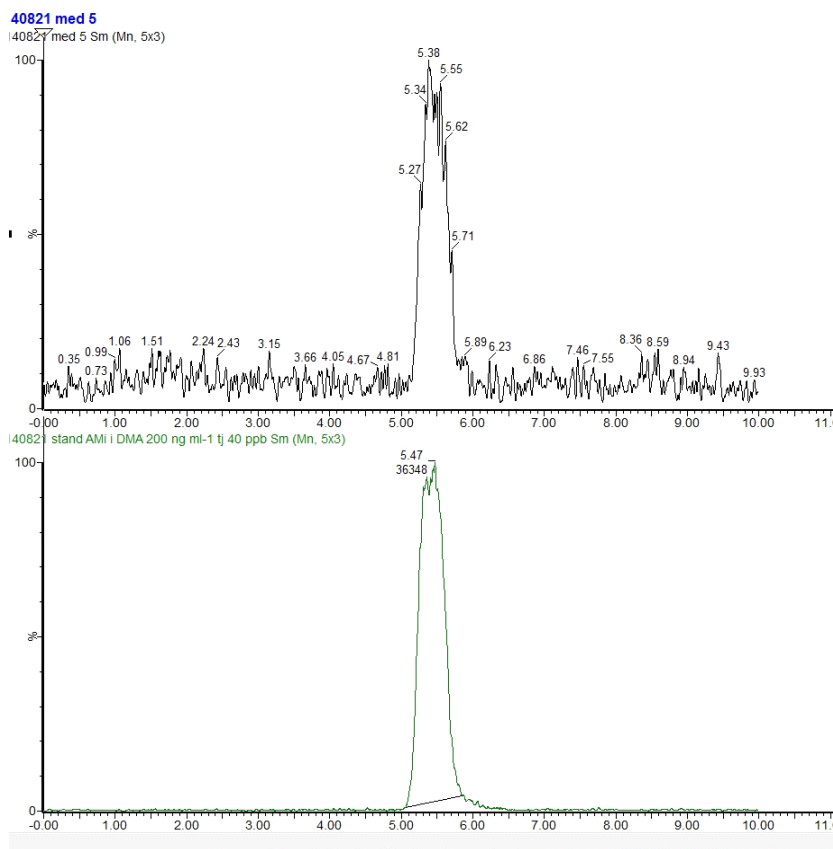
Figure 7. Coumaphos in honey sample no. 2

#### 4. ZAKLJUČAK

Zakonodavstvo jasno precizira obaveze i dužnosti proizvođača hrane. Ipak, nesvesni štetnosti određenih tehnologija zasnovanih isključivo na sticanju ekonomske dobiti, veliki broj proizvođača na tržište plasira proizvod štetan po zdravlje sadašnjih i budućih generacija. Sam čovek, svojim voljnim i nevoljnim aktivnostima, urušavajući zdravlje prirode, ima destruktivan uticaj na sve stanovnike planete. Nekontrolisana upotreba hemijskih sredstava pri zaštiti bilja, kao i druge hemikalije koje kruže u lancima ishrane, upotreba GMO proizvoda, velikom brzinom vode ka uništenju pčela, najvažnijih polinatora, što konsekvantno (posle-

dično) dovodi do rizika za opstanak ljudske vrste. Med proizveden na organski način i lišen rezidua štetnih hemijskih sredstava, svojom nutritivnom

vrednošću i bogatstvom ukusa predstavlja garant kvaliteta i okrepljujuće (blagodatno) deluje na ljudsko zdravlje.



Slika 8. Amitraz u uzorku meda broj 5

Figure 8. Amitraz in honey sample no. 5

Nakon izvršenih istraživanja, potkrepljeno analitičkim metodama u uzorku meda iz konvencionalnog tipa proizvodnje, konstatovano je prisustvo pesticida *amitraz*, čime je potvrđena pretpostavka da prekomerna, nestručna upotreba hemijskih sredstava može imati negativne efekte u vidu neispravnosti krajnjeg produkta namenjenog ljudskoj ishrani. Ovakav med se ne može prodati u Nemačkoj, Francuskoj, Japanu i Italiji. Na osnovu podataka iz 2018. godine kada je iz Srbije ukupno izvezeno 2.745 t meda, od toga 717 t u Italiju, 360 t u Nemačku i 23 tone u Francusku dolazi se do podatka da se Srbija suočava sa gubitkom 40% tržišta koje je imala samo zbog upotrebe amitraza.

Kod druga dva konvencionalna proizvođača i dva organska, nisu detektovani ostaci traženih antibiotika i pesticida, čime se potvrđuje pretpostavka da ekološki svesni proizvođači, čak iako pripadaju konvencionalnom tipu, mogu proizvesti bezbedan proizvod.

Teritorija Srbije sa nacionalnim parkovima predstavlja pogodan teren za organsko pčelarenje, čime se daje šansa srpskim pčelarima da svoje proizvode plasiraju na zahtevno inostrano tržište po znatno višim cenama. Uvođenjem ekoloških standarda u proizvodnji meda i pčelinjih proizvoda, Srbija bi, zbog bogatstva biljnog sveta, reliktnih, endemičnih vrsta, mogla postati konkurentna na svetskom tržištu i unaprediti tržišni lanac, te konsolidovati ponudu ove privredne grane.

#### Zahvalnica (Acknowledgements)

Rad je nastao kao rezultat istraživanja u okviru ugovora o realizaciji i finansiranju naučnoistraživačkog rada u 2020. između Poljoprivrednog fakulteta u Beogradu i Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, evidencioni broj ugovora: 451-03-68/2020-14/200116.

## 5. LITERATURA

- [1] Službeni glasnik Republike Srbije (2015) Pravilnik o kvalitetu meda i drugih proizvoda pčela, broj 101.
- [2] Codex Alimentarius Commission (2001) Revised codex standard for honey. Codex Standard 12-1981. Rome: FAO and WHO. Codex Standard 12-1981.
- [3] J.Wang, X.L.Qing (2011) Chemical Composition, Characterization, and Differentiation of Honey Botanical and Geographical Origins, (Chapter 3), In Taylor, S.L. (Ed.). *Advances in Food and Nutrition Research*, 62, 89-137. Amsterdam, Holland: Elsevier.
- [4] S.Bogdanov (2010) The Book of Honey, Chapter 1, A Short History of Honey, Bee Product Science.
- [5] J.Tewari, J.Irudayaraj (2004) Quantification of saccharides in multiple floral honeys using Fourier transform infrared microattenuated total reflectance spectroscopy, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3237-3243.
- [6] R.S.Singhal, P.R.Kulkarni, D.V.Rege (1997) Handbook of Indices of Food Quality and Authenticity. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, p. 358-379.
- [7] B.Burlando, L.Cornara (2013) Honey in dermatology and skin care: a review, *Journal of Cosmetic Dermatology*, 12(4), 306-313.
- [8] T.Cajka, J.Hajšlová, J.Cochran, K.Holadová, E.Klimánková (2007) Solid phase microextraction-comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry for the analysis of honey volatiles, *Journal of Separation Science*, 30, 534-546.
- [9] T.Cajka, J.Hajšlova, F.Pudil, K.Riddellova (2009) Traceability of honey origin based on volatiles pattern processing by artificial neural networks, *Journal of Chromatography A*, 1216(9), 1458-1462.
- [10] A.Bentabol Manzanares, Z.H.García, B.R.Galdón, E.R.Rodríguez, C.D.Romero (2011) Differentiation of blossom and honeydew honeys using multivariate analysis on the physicochemical parameters and sugar composition, *Food Chemistry*, 126(2), 664-672.
- [11] I.Stanimirova, B.Üstün, T.Cajka, K.Riddellova, J.Hajšlova, L.M.C.Buydens, B.Walczak (2010) Tracing the geographical origin of honeys based on volatile compounds profiles assessment using pattern recognition techniques, *Food Chemistry*, 118(1), 171-171.
- [12] Regulation (EC) No 396/2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC (OJ L 70, 16.03.2005).
- [13] Pravilnik o maksimalno dozvoljenim količinama ostataka sredstava za zaštitu bilja u hrani i hrani za životinje i o hrani i hrani za životinje za koju se utvrđuju maksimalno dozvoljene količine ostataka sredstava za zaštitu bilja (Sl. glasnik RS 22/18; Sl. glasnik RS 29/14, sa svim izmenama i dopunama).
- [14] Commission Regulation (EU) No 37/2010 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin (OJ L 15, 20.01.2010)
- [15] B.D.Banerjee (1999) The influence of various factors on immune toxicity assessment of pesticide chemicals, *Toxicology Letters*, 107, 21-31.
- [16] J.Devillers (2003) The ecological importance of honey bees and their relevance to ecotoxicology. In *Honey Bees* (p. 15-25). CRC Press.
- [17] Ž.Bargańska, M.Ślebioda, J.Namieśnik (2016) Honey bees and their products: Bioindicators of environmental contamination, *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 46(3), 235-248.
- [18] S.Bogdanov (2006) Contaminants of bee products, *Apidologie*, 37(1), 1-18.
- [19] N.Al-Waili, K.Salom, A.Al-Ghamdi, M.J.Ansari (2012) Antibiotic, pesticide, and microbial contaminants of honey: human health hazards, *The Scientific World Journal*, 2012.
- [20] E.Sitarz-Palczak, J.Kalembkiewicz, D.Galas (2015) Evaluation of the Content of Selected Heavy Metals in Samples of Polish Honeys, *Journal of Ecological Engineering*, 16(3), 130-138.
- [21] L.Elflein, K.P.Raezke (2008) Improved detection of honey adulteration by measuring differences between <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C stable carbon isotope ratios of protein and sugar compounds with a combination of elemental analyzer-isotope ratio mass spectrometry and liquid chromatography-isotope ratio mass spectrometry (<sup>13</sup>C-EA/LC-IRMS), *Apidologie*, 39(5), 574-587.
- [22] A.Terrab, A.F.Recamales, D.Hernanz, F.J.Heredia (2004) Characterisation of Spanish thyme honeys by their physicochemical characteristics and mineral contents, *Food Chemistry*, 88(4), 537-542.
- [23] M.N. Islam, M.I. Khalil, M.A. Islam, S.H. Gan (2014) Toxic compounds in honey, *Journal of Applied Toxicology*, 34(7), 733-742.
- [24] Commission Regulation (EU) 2015/1005 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of lead in certain foodstuffs (OJ L 161, 26.6.2015).
- [25] I.Tongo, O.Ogbeide, L.Ezemonye (2017) Human health risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in smoked fish species from markets in Southern Nigeria, *Toxicology Reports*, 4, 55-61.
- [26] European Commission (2011) Commission Regulation (EU) No 835/2011 of 19 August 2011 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels for polycyclic aromatic hydrocarbons in foodstuffs. Official Journal of the European Union, L215, 4-8.
- [27] Z.Zelinkova, T.Wenzl (2015) EU marker polycyclic aromatic hydrocarbons in food supplements: analytical approach and occurrence, *Food Additives & Contaminants: Part A*, 32(11), 1914-1926.
- [28] Z.Zelinkova, T.Wenzl (2015) The occurrence of 16 EPA PAHs in food-a review, *Polycyclic Aromatic Compounds*, 35(2-4), 248-284.
- [29] P.Batelková, I.Borkovcová, O.Čelechovská, L.Vorlová, K.Bartáková (2012) Polycyclic aromatic

- hydrocarbons and risk elements in honey from the South Moravian region (Czech Republic), *Acta Veterinaria Brno*, 81(2), 169-174.
- [30] U.Horn, B.Martius (1997) Die Belastung von Honigen mit polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen in der Region Altenburg [The loading of honeys with polycyclic aromatic hydrocarbons in Altenburg region], *Apidologie*, 28, 173-174.
- [31] B.Albero, C.Sánchez-Brunete, J.L.Tadeo (2003) Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in honey by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography/mass spectrometry, *Journal of AOAC International*, 86(3), 576-582.
- [32] S.Dobrinás, S.Birghila, V.Coatu (2008) Assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in honey and propolis produced from various flowering trees and plants in Romania, *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(1), 71-77.
- [33] M.Perugini, G.Di Serafino, A.Giacomelli, P. Medrzycki, A.G.Sabatini, L.Persano Oddo, M.Amorena (2009) Monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons in bees (*Apis mellifera*) and honey in urban areas and wildlife reserves, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(16), 7440-7444.
- [34] O.Lambert, B.Veyrand, S.Durand, P.Marchand, B. Le Bizec, M.Piroux, H.Pouliquen (2012) Polycyclic aromatic hydrocarbons: bees, honey and pollen as sentinels for environmental chemical contaminants, *Chemosphere*, 86(1), 98-104.
- [35] A.Ciemniak, A.Witczak, K.Mocek (2013) Assessment of honey contamination with polycyclic aromatic hydrocarbons, *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 48(11), 993-998.
- [36] C.P.Chou et al. (2004) Solid-Phase Extraction and GC-MSD Determination of Amitraz and Metabolites in Urine, *Journal of Food and Drug Analysis*, 12(3), 212-216.
- [37] E.Corta, A.Bakkali, L.A.Berrueta, B.Gallo, F. Vicente (1999) Kinetics and mechanism of amitraz hydrolysis in aqueous media by HPLC and GC-MS, *Talanta*, 48(1), 189-199.
- [38] „Amitraz u medu – rampa za izvoz srpskog proizvoda” Available at: <https://agrosmart.net/2019/11/25/amitraz-u-medu-rampa-za-izvor-srpskog-proizvoda/>
- [39] R.M.Hollingworth (1976) Chemistry, biological activity, and uses of formamidine pesticides, *Environmental Health Perspectives*, 14, 57-69.
- [40] A.Thomas, T.A.U.Unger (1996) *Pesticide synthesis handbook*, New Jersey: Noyes Publications, p. 836.
- [41] A.C.Pierpoint, et al. (1997) Kinetics and Mechanism of Amitraz Hydrolysis, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(5), 1937-1939.

## ABSTRACT

### SAMPLE ANALYSIS OF ORGANICALLY PRODUCED HONEY AND CONVENTIONALLY PRODUCED HONEY IN WESTERN SERBIA

*Conventional method of honey production is widely spread in the area of western Serbia. Despite the advantages of honey production in an organic manner, beekeepers are still hesitant to take this step, regardless of the difficulties with placement of such honey on the foreign market, so their products are mainly sold on the domestic market. Besides the undeniable nutritional value, honey produced in the conventional way with proper use of agro technical measures and implementation of the wide range of products in the treatment of bee diseases, in its composition very often contain residues of hazardous chemical compounds, pesticides, antibiotics. Research on four qualitative differences of the content of certain substances between the conventional and organic honey producers has been conducted in western Serbia. The research obtained five manufacturers, out of which two were engaged in organic manner of production, while the remaining three dealt with the conventional honey production. After examining the area and the apiaries in question, interviews with honeybee producers, the sampling of honey took place. Upon performed analysis, it was concluded that one conventionally produced sample of honey was not safe for human consumption, due to presence of pesticides.*

**Keywords:** beekeeping, honey, organic beekeeping, residues, pesticides, amitraz

*Scientific paper*

*Paper received: 18. 08. 2020.*

*Paper corrected: 11. 11. 2020.*

*Paper accepted: 23. 11. 2020.*

*Paper is available on the website: [www.idk.prg.rs/journal](http://www.idk.prg.rs/journal)*