



UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI
FAKULTET
DEPARTMAN ZA HEMIJU



Valeria Gužvanj

**Prilog karakterizaciji i određivanju nekih
neonikotinoida**

- doktorska disertacija -

Novi Sad, 2006.

Ova doktorska disertacija je rađena u Departmanu za hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu pod rukovodstvom **prof. dr Ferenc Gaála**, dopisnog člana Vojvođanske akademije nauka i umetnosti. Pojedini delovi eksperimentalnog rada su rađeni na Katedri za analitičku hemiju Fakulteta tehničkih i ekonomskih nauka u Budimpešti (Mađarska), u Laboratoriji za zaštitu životne sredine Politehnike Nova Gorica (Slovenija) i u Institutu za zaštitu bilja "dr Pavle Vukasović" Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu.

Pošto sam, kako u toku same izrade, tako i u pisanju ovog rada, imala tu čast i sreću da mi posredno ili neposredno u tome pomaže veći broj lica, prijatna mi je dužnost da im na ovom mestu uputim izraze svoje zahvalnosti.

Temu za doktorsku disertaciju predložio je **prof. dr Ferenc Gaál**. Ovim putem mu izražavam svoju izuzetnu zahvalnost na svestranoj pomoći, korisnim savetima i interesovanju pokazanom pri izradi i pisanju doktorske disertacije i temeljitoj školi analitičke hemije. Zahvalna sam što na njemu svojstven način čeliči moju narav i daje mi priliku i poverenje da radim pored njega kao asistent.

Najiskrenije se zahvaljujem **prof. dr Luki Bjelici** na spremnosti da mi učini dostupnim svoje znanje i istraživačko iskustvo u oblasti analitičke voltametrije i elektrohemije uopšte, kao i stručnost kada su u pitanju stvari jezičke prirode.

Najiskrenije se zahvaljujem **prof. dr Janošu Čanadiju**, na strpljenju i razumevanju prilikom vođenja/praćenja mog početničkih istraživačkih koraka u laboratoriji NMR spektroskopije u Departmanu za hemiju, PMF, Novi Sad.

Od srca se zahvaljujem **prof. dr Sanji Lazić**, na pokazanom interesovanju i iskrenoj podršci, kao i na ukazanoj prilici i poverenju u vezi rada u hromatografskoj laboratoriji u Institutu za zaštitu bilja "Dr Pavle Vukasović" Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu.

Najtoplije se zahvaljujem akademiku **dr Klári Tóth** što mi je omogućila da preko pet meseci radim u Istraživačkoj grupi Mađarske akademije nauka u elektroanalitičkoj laboratoriji Katedre za analitičku hemiju u Budimpešti. Iskreno se zahvaljujem na pokazanom interesovanju, na dragocenim naučnim diskusijama, i spremnosti i dobroj volji da me uvede u "svet senzorike". Zahvaljujem se na ovom vrednom iskustvu, kao i na srdačnom prijemu.

Najtoplije se zahvaljujem **doc. dr Polonci Trebše** i **prof. dr Mladenu Franku**, što su mi omogućili rad u hromatografskoj laboratoriji Politehnike u Novoj Gorici. Od srca hvala na svestranoj pomoći i podstreku tokom rada sa laserskim optotermičkim detektorima. Hvala im za veoma lepu saradnju, i ukazano ogromno poverenje, na srdačnom prijemu i na ovom vrednom iskustvu.

Zahvaljujem se **prof. dr Biljani Abramović** na pokazanom interesovanju i korisnim savetima tokom čitanja radne verzije teksta i interesovanje koje je pokazala za moj rad.

Zahvaljujem se **prof. dr Ljiljani Jovanović** na pokazanom interesovanju za voltametrijske eksperimente i podršci tokom izrade teze u celini.

Zahvaljujem se **dr. Dragici Dumanović** naučnom savetniku za iskrenu pomoć, srdačnost i veoma važne savete iz oblasti polarografije i spektrofotometrije.

Zahvalna sam naučnom saradniku **dr Mihály-u Kádár-u** na pruženoj pomoći i korisnoj saradnji. Zahvalna sam **prof. dr Laposavi Šidanin**, koja me je uvela u mikroskopska istraživanja, kao i stručnom saradniku **Milošu Bokorovu** i **dr Katalin Marthi** na pomoći tokom realizacije SEM i EDS merenja.

Svim članovima elektroanalitičke istraživačke grupe u Budimpešti i hromatografske istraživačke grupe u Novoj Gorici dugujem zahvalnost za prijateljstvo i saradnju. Zahvalnost dugujem i svim svojim drugovima, prijateljima i studentima koji su mi na bilo koji način pomogli u izradi ove disertacije.

Zahvalna sam Mađarskoj akademiji nauka za stipendije ("Domus Hungarica Scientiarum et Artium" i fondacije "HTMT") i farmaceutskoj kući Gedeon Richter LTD za stipendiju.

Najzad, najveću zahvalnost dugujem **mojoj porodici**, koja je u svakom trenutku bila uz mene sa beskrajnom i besprekornom moralnom i potrebnom materijalnom podrškom.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	4
2. TEORIJSKI DEO.....	6
2.1. PESTICIDI I NJIHOVA KLASIFIKACIJA.....	6
2.2. OSOBINE NEONIKOTINOIDA.....	7
2.2.1. Imidaklopid.....	9
2.2.2. Tiametoksam.....	17
2.2.3. Acetamiprid.....	20
2.2.4. Tiaklopid.....	23
2.2.5. Ostali neonicotinoidi.....	28
2.3. ANALITIKA NEONIKOTINOIDA.....	30
2.3.1. Molekulska spektroskopija.....	34
2.3.2. Voltometrijske metode.....	35
2.3.3. Imunoheмиjske metode.....	36
2.3.4. Hromatografske metode.....	37
3. EKSPERIMENTALNI DEO.....	43
3.1. HEMIKALIJE, RASTVORI I ISPITIVANI UZORCI.....	43
3.2. PRIBORI I APARATURE.....	44
3.3. POSTUPCI.....	46
4. REZULTATI I DISKUSIJA.....	53
4.1. SPEKTROFOTOMETRIJSKA ISPITIVANJA I ODREĐIVANJA NEONIKOTINOIDA.....	53

4.1.1. Spektrofotometrijska karakterizacija odabranih neonikotinoida i 6-hloronikotinske kiseline.....	53
4.1.2. Spektrofotometrijsko određivanje neonikotinoida.....	57
4.2. NUKLEARNA MAGNETNA REZONANTNA SPEKTROMETRIJSKA STUDIJA NEONIKOTINOIDA.....	64
4.2.1. Optimizacija uslova rada za karakterizaciju neonikotinoida.....	65
4.2.2. Uticaj pH vrednosti na stabilnost i hidrolizu neonikotinoida.....	69
4.3. VOLTAMETRIJSKA ISPITIVANJA I ODREĐIVANJA NEONIKOTINOIDA.....	74
4.3.1 Voltometrija na živinoj elektrodi.....	74
4.3.2. Voltometrija na elektrodi od staklastog ugljenika.....	88
4.3.3. Voltometrija na bizmut-film elektrodi.....	95
4.3.4. Voltometrija na C14-film elektrodi.....	118
4.4. ISPITIVANJA I ODREĐIVANJA NEONIKOTINOIDA TEČNOM HROMATOGRAFIJOM.....	119
4.4.1. Određivanje neonikotinoida tečnom hromatografijom visoke efikasnosti uz primenu niza detektora dioda.....	121
4.4.2. Određivanje neonikotinoida tečnom hromatografijom visoke efikasnosti uz primenu optotermičkog spektrometrijskog detektora.....	131
5. IZVOD.....	139
6. SUMMARY.....	143
7. LITERATURA.....	147
8. BIOGRAFIJA.....	157
Ključna dokumentacija.....	158

1. UVOD

Neonikotinoidi su relativno novi, veoma raspostranjeni sintetski insekticidi sa specifičnim načinom delovanja. Paralizuju funkcionisanje nervnog sistema na taj način što blokiraju nikotin-acetilholinske receptore na postsinaptičkoj membrani. Prema literaturnim podacima, njihovo dejstvo je selektivno i u manjoj meri su toksični za toplokrvne organizme nego piretroidni, organofosforni i karbamatni insekticidi. Zbog svojih brojnih prednosti, postepeno preuzimaju mesto ovih prvih. U našoj zemlji su do sada registrovana za promet četiri predstavnika ove grupe i to: imidakloprid, tiametoksam, acetamiprid i tiakloprid. Upravo zbog njihove sve šire upotrebe, predstavnici ove grupe su prisutni u neposrednom okruženju, u životnim namirnicama i široj okolini. Novija istraživanja upozoravaju na činjenicu da predstavnici ove grupe jedinjenja u određenim okolnostima mogu da budu prekursori drugih jedinjenja sa još izraženijom biološkom aktivnošću. Nadalje, prema najnovijim informacijama, pored štetnih insekata neonikotinoidi deluju i na korisne vrste, kao što su npr. medonosne pčele.

Radi dobijanja što brže i kvalitetnije informacije o opterećenju životne sredine ovim insekticidima, kao i njihovim ostacima i degradacionim proizvodima, pored materijalno i vremenski zahtevnih metoda, za koje je potrebna visoko-sofisticirana instrumentacija, korisno bi bilo imati i brze metode za prvu procenu stanja. Zadatak ove doktorske disertacije je pre svega pronalaženje i razrada alternativnih, brzih i jednostavnih analitičkih metoda za identifikaciju i određivanje ovih neonikotinoida. Rad se sastoji od sledećih jedinica: *Teorijski deo*, *Eksperimentalni deo*, *Rezultati i diskusija* i *Izvod*.

U *Teorijskom delu* je dat kratak literaturni pregled o pesticidima i njihovoj klasifikaciji, osobinama, kao i analitici neonikotinoida. *Eksperimentalni deo* obuhvata tri poglavlja: Hemikalije, rastvori i ispitivani uzorci, Pribori, aparature i Postupci. *Deo Rezultati i diskusija* se sastoji iz četiri poglavlja. U prvom poglavlju opisane su spektrofotometrijske karakterizacije i određivanja imidakloprida, tiametoksama, acetamiprida, tiakloprida i 6-hloronikotinske kiseline u cilju određivanja više komponenata u smeši. U zavisnosti od kiselinsko-baznih osobina određivanih molekula odabrana je optimalna sredina za rad, određene su radne talasne dužine u slučaju višekomponentnih sistema sa preklapljenim spektrima i ispitana je mogućnost primene derivativne spektrofotometrije radi poboljšanja selektivnosti određivanja. Drugo poglavlje obuhvata NMR spektrometrijska proučavanja odabranih neonikotinoida sa nitro-guanidinskom (imidakloprid i tiametoksam) i cijanoiminskom (tiakloprid i acetamiprid) funkcionalnom grupom,

sa posebnim osvrtom na stabilnost ovih jedinjenja pod uticajem prirodne svetlosti, različite temperature i odabrane pH vrednosti sredine. U okviru disertacije razrađene su metode pogodne za karakterizaciju i praćenje stabilnosti ova četiri insekticida. Treće poglavlje je posvećeno elektroanalitici neonicotinoida. Na bazi podataka dobijenih karakterizacijom ciljnih jedinjenja, razrađene su osetljive i dovoljno selektivne elektroanalitičke metode njihovog određivanja. Ispitivana je mogućnost primene elektroanalitičkih impulsnih tehnika (diferencijalna pulsna polarografija, diferencijalna pulsna voltometrija, kao i pravougaona voltometrija prema Osteryoung-u i Barker-u) u cilju razrade osetljivih metoda određivanja, pogodnih u najboljem slučaju i u uslovima terenskih analiza. Radi izbora odgovarajuće tehnike, metode i optimalne elektrode ispitivana je primenljivost radne elektrode od žive i staklastog ugljenika, kao i elektrode od staklastog ugljenika modifikovane živinim i bizmutovim filmom. Zamena filma žive filmom bizmuta umnogome doprinosi eliminisanju tog visoko-toksičnog metala iz laboratorijske upotrebe i u ovoj oblasti. Kontrola kvaliteta pripremljenih filmova je vršena voltametrijskim tehnikama (ciklička voltometrija, hronoamperometrija) i skenirajućom elektronskom mikroskopijom sa EDS (energy dispersive spectrometer) detektorom. Izvršena je optimizacija pripreme i kondicioniranja elektrode, izbor optimalnog sastava rastvora za elektrodepoziciju, kao i potencijala i vremena depozicije filma. Nadalje, izvršena je optimizacija i ostalih uslova određivanja. Pored upoređivanja razrađenih elektroanalitičkih metoda postignuti rezultati su upoređivani i sa rezultatima spektrofotometrijskih i tečno-hromatografskih određivanja. Metoda pripreme filma je primenjena i pri modifikaciji planarne ugljenične elektrode filmom od bizmuta. S druge strane, ispitana je i mogućnost primene elektrode od staklastog ugljenika modifikovanog organskim filmom, tj. tetradekan-filmom za određivanje tiametoksama. U četvrtom poglavlju opisana je veoma osetljiva i selektivna tečno-hromatografska metoda, razrađena za određivanje imidakloprida, tiametoksama, acetamiprida i tiakloprida, kako pojedinačno, tako i u smeši. Za postizanje visoke osetljivosti detekcije primenjen je detektor na bazi optotermičkih sočiva (thermal lens spectroscopy, TLS). Metoda je upoređena sa tečno-hromatografskom metodom uz detektor od niza dioda (diode-array detector, DAD), rutinskom metodom određivanja ovih insekticida.

Razrađene metode određivanja su testirane na primerima analiza realnih uzoraka rečne vode, krompira, kukuruza, paprike i meda.

2. TEORIJSKI DEO

2.1. PESTICIDI I NJIHOVA KLASIFIKACIJA

Pesticidi su hemijska sredstva koja se upotrebljavaju za:

- Suzbijanje uzročnika biljnih bolesti, štetnih insekata, nematoda, glodara i ptica, algi kao i, za suzbijanje korova ili regulisanje rasta biljaka;
- Uništavanje gljivica;
- Uništavanje insekata i drugih organizama koji prenose izazivače zaraznih bolesti kod ljudi i životinja [1].

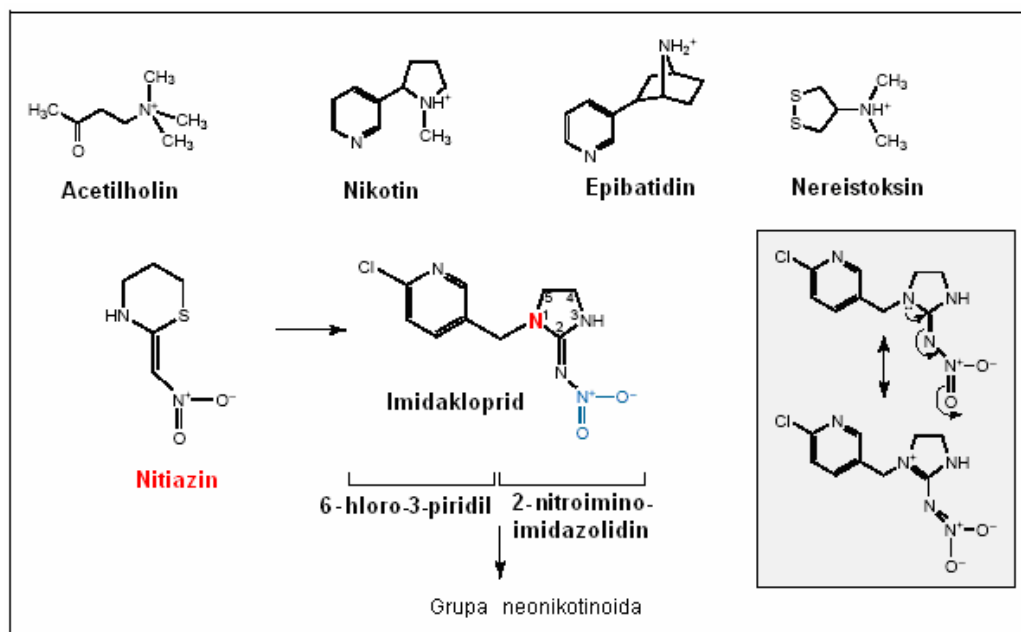
Osnovna klasifikacija pesticida se najčešće zasniva na praktičnoj primeni, odnosno nameni. To znači da se pesticidi koji se upotrebljavaju za suzbijanje predstavnika "životinjskog carstva" u širem smislu klasifikuju kao *zoocidi*, oni koji se koriste za suzbijanje patogenih gljivica klasifikuju se kao *fungicidi*, oni koji se koriste za suzbijanje bakterijskih oboljenja klasifikuju se kao *baktericidi*, dok se oni koji se primenjuju za suzbijanje korova nazivaju *herbicidi*. U klasu zoocida pored akaricida, nematocida i rodenticida spadaju i insekticidi koji služe za suzbijanje štetnih insekata [2,3].

Insekticidi se obično dele prema hemijskom sastavu i prema nameni. Od 1970-tih godina su sintetizovane i komercijalizovane četiri grupe insekticida sa različitim osnovnim strukturnim elementima i, shodno tome, različitim principima delovanja [4].

U zaštiti od štetočina ranije je korišćen ekstrakt duvana, ali se on zbog svoje toksičnosti skoro više i ne upotrebljava. Danas postoje savremenija zaštitna sredstva, od kojih su neka po hemijskoj strukturi slična nikotinu, ali imaju veću efikasnost u borbi protiv štetnih insekata, kao i daleko manju toksičnost za ljudski organizam i životnu sredinu. Tu grupu insekticida čine *neonikotinoide* [3].

2.2. OSOBINE NEONIKOTINOIDA

Neonikotinoidi su novija generacija sintetskih insekticida (tablica 1) sa pretežno bioizosternim farmakofornim nitrometilenskim, nitroiminskim ili cijanoiminskim funkcionalnim grupama [3-7]. Prvi nitrometileni se pominju 1970-tih godina i vode poreklo od 2-(nitrometil)piridina, koji sam ima slabo insekticidno dejstvo [8]. Istraživanja uticaja strukturnih promena ovog prototipnog jedinjenja na insekticidno dejstvo su dovela do sinteze nitiiazina, 2-(nitrometilen)-tetrahydro-1,3-tiazina, pionira iz grupe neonikotinoida (slika 1) [8,9]. Ovo jedinjenje nije imalo široku primenu zbog svoje izrazite foto-osetljivosti [8]. Transformacijom nitiiazina je dobijen prvi dovoljno stabilan neonikotinoid, imidaklopid [9,10].



Slika 1. Prirodni i prvi sintetski ligandi nikotin-acetilholinskih receptora [11]

Na osnovu strukturnog sastava neonikotinoide se dele u sledeće grupe: *nitroguanidinski insekticidi* (imidaklopid, tiametoksam, klotianidin i dinetoforan);

nitrometilenski insekticidi (nitenpiram i nitiazin) i *piridilmetilaminski insekticidi* (acetamiprid, imidaklopid, nitenpiram i tiaklopid) [3-7, 10].

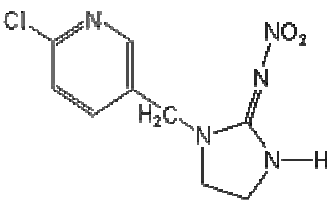
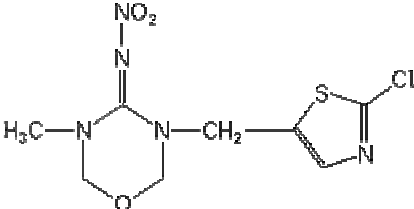
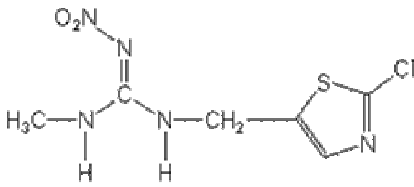
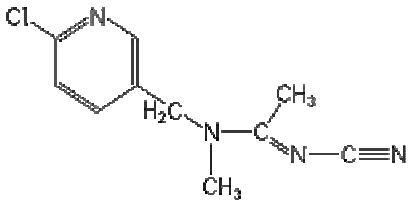
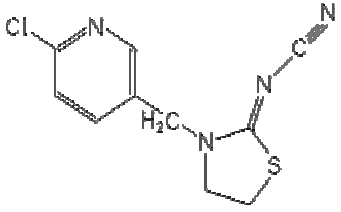
Neonikotinoidi imaju mnoge prednosti u odnosu na piretroidne, organofosfatne i karbamatne insekticide i sve više ih zamenjuju širom sveta. Naime, piretroidi interaguju sa presinaptičkim natrijumovim kanalima kako u kičmenjaka, tako i u insekata. Organofosfati i karbamati deluju tako što inhibišu acetilholin esterazu kičmenjaka, insekata i drugih beskičmenjaka. Suprotno tome, neonikotinoidi deluju slično prirodnim proizvodima- nikotinu, acetilholinu, epibatidinu (slika 1), kao agonisti postsinaptičkih nikotinskih acetilholin-receptora (nAChR) insekta (slika 2). Neonikotinoidi su sto i više puta selektivniji za nAChR insektata nego kičmenjaka [9-20].

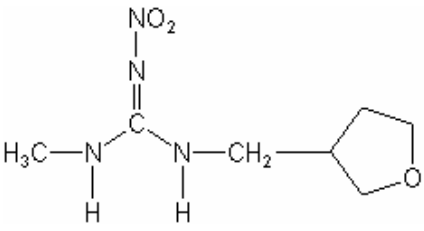
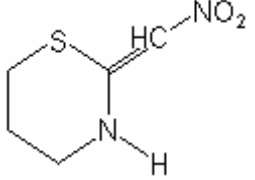
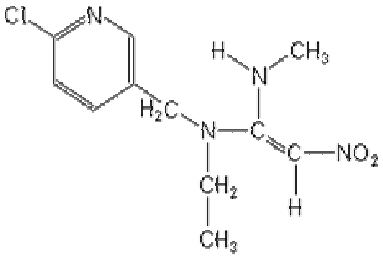
Neonikotinoidi selektivno reaguju sa nikotinskim acetil-holin-receptorom insekata (slika 2a, b) i zbog toga imaju specifično delovanje na njihov nervni sistem (slika 2c, d) [7,9-15]. Ovaj jedinstveni način delovanja čini ih veoma traženim u pokušaju suzbijanja insekata koji su razvili rezistentnost na konvencionalne organofosfatne, karbamatne i piretroidne insekticide. Pretpostavlja se da imaju niže efekte na korisne insekte nego ostali insekticidi, nisku toksičnost za sisare i nemaju teratogeni ili mutageni efekat. Baš zbog njihove selektivne aktivnosti, oni se preporučuju za tretman nekoliko vrsta žitarica, voća, povrća i dr. Kao sistemični i kontaktno aktivni insekticidi, vrlo su efikasni u kontroli Afida (*Afiolidae*) ili lisne vaši, Tripsa (*Trips Tabaci*), krompirove zlatice (*Leptinotarsa Decemlineata*) i ostalih različitih vrsta štetnih insekata [9-15].

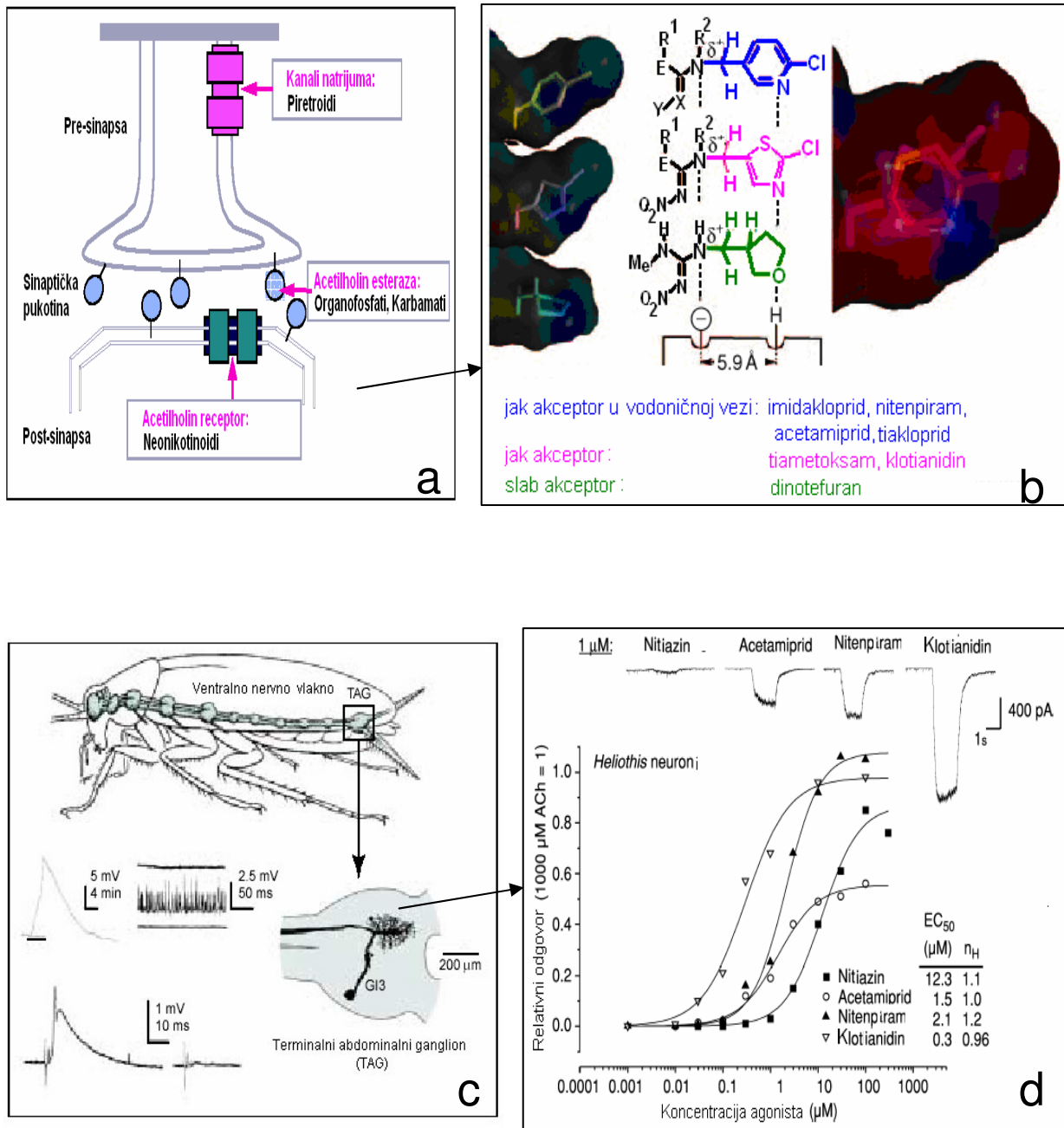
Trenutno su dve generacije neonikotinoidi u širokoj primeni. To su derivati *hlorotiazolila*, kao što je **imidaklopid**, i derivati *tianikotinila*, čiji je predstavnik **tiametoksam**. Na nekim tržištima prisutan je i dinotefuran iz treće generacije ovih jedinjenja.

Nazivi neonikotinoida po IUPAC-u, zajedno sa molekulskim i strukturnim formulama [3,5,10] su dati u tablici 1.

Tablica 1. Neonikotinoidni insekticidi ^{3,4}

Trivijalni naziv	Naziv po IUPAC-u	Molekulska formula	Strukturna formula
Imidakloprid	1-(6-hlor-3-piridilmetil)-N-nitroimidazolin-2-ilidenamin	$C_9H_{10}ClN_5O_2$	
Tiametoksam	3-(2-hlor-tiazol-5-ilmetil)-5-metil-(1,3,5)-oksadiazinan-4-iliden-N,N-nitroamin	$C_8H_{10}ClN_5O_3S$	
Klotianidin	1-(2-hlor-1,3-tiazol-5-ilmetil)-3-metil-2-nitroguanidin	$C_6H_8ClN_5O_2S$	
Acetamiprid	N-1-((6-hlor-3-piridil)metil)-N2-cijano-N1-metil-acetamidin	$C_{10}H_{11}ClN_4$	
Tiakloprid	N-(3-((6-hlor-3-piridinil)-metil)-1,3-tiazolan-2-iliden)cijanid	$C_{10}H_9ClN_4S$	

Dinotefuran	<i>RS</i> -1-metil-2-nitro-3-(tetrahidro-3-furilmetil)guanidin- <i>N</i> -metil- <i>N'</i> -nitro- <i>N''</i> -[(tetrahidro-3-furanil)metil]guanidin	$C_7H_{14}N_4O_3$	
Nitiazin	(<i>E,Z</i>)-2-nitrometilen-1,3-tiazinan	$C_5H_8N_2O_2S$	
Nitenpiram	N-(6-hlor-3-piridilmetil)-N-etil- <i>N'</i> -metil-2-nitrovinilidendiamin	$C_{11}H_{15}ClN_4O_2$	



Slika 2. Mehanizam delovanja neonikotinoida: a) sinapsa sa acetil-holinskim receptorom [11], b) interakcija acetil-holinskog receptora i neonikotinoida [10], c) shematski prikaz nervnog sistema insekata [11], d) odziv sinapse pri ekvimolarnoj koncentraciji neonikotinoida [10]

2.2.1. Imidaklopid

Imidaklopid je prvi sintetski neonikotinoid sa odličnim sistemičnim delovanjem, niskom toksičnošću za toplokrvne organizme i dugim periodom delovanja [3,4,6,10-15,17-22]. Primenjuje se kao sredstvo za prskanje ili močenje za zaštiti različitih vrsta useva, npr. krompira, crnog luka, paprike, paradajza, duvana, hmelja, žitarica, kao i u zaštiti voćnjaka-krušaka, jabuka itd [5]. Zahvaljujući svojoj efikasnosti i pretpostavljenoj umerenoj škodljivosti za životnu sredinu i sisare, imidaklopid se veoma intenzivno primenjuje u celom svetu.

Sintetizovan je 1984. godine u kompaniji "Bayer AG", Leverkusen (Nemačka) i na tržište ga lansirala pod komercijalnim imenima "Admire", "Advantage", "Gaucho" (imidaklopid i pensikuron), "Confidor", "Provado", "Winner", "Prestige" (imidaklopid i teflutrin) i dr [5, 16-22]. Komercijalne formulacije su u vidu vodorastvornog praha (WP), vododisperznih granula (WG) i koncentrovane suspenzije (FS). Primenjuje se u granicama 5,6–14,0 mg/m², što je mnogo manje u odnosu na tradicionalne insekticide [5].

U tablici 2. su prikazane važnije fizičko-hemijske karakteristike imidakloprida.

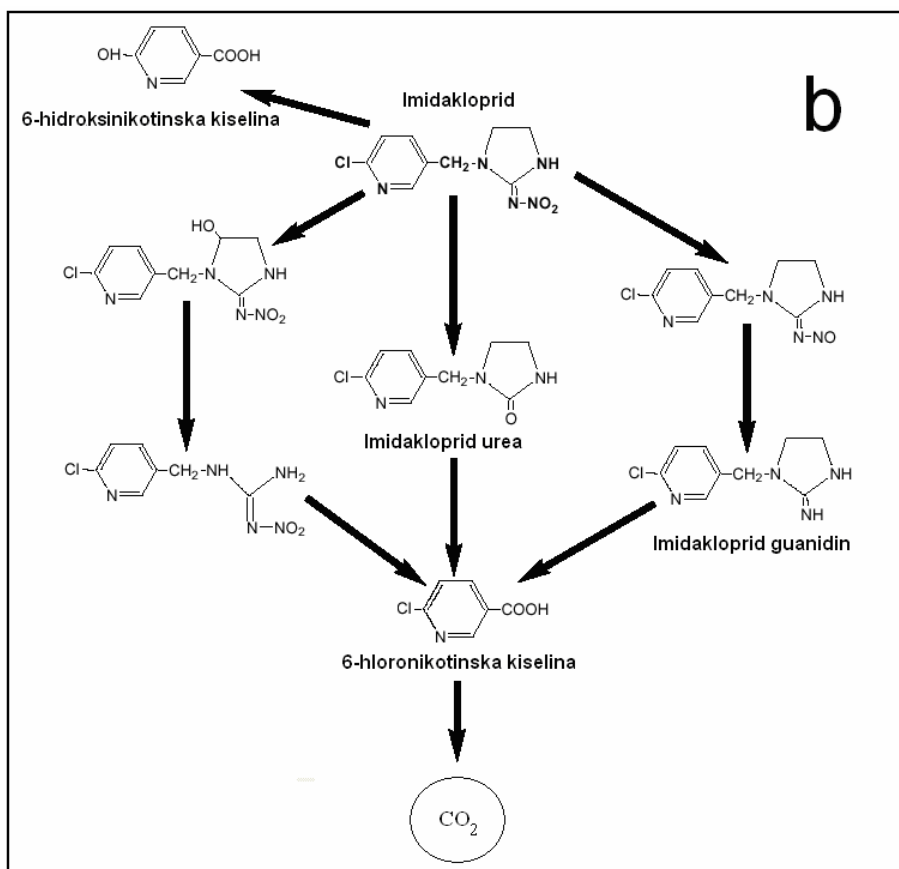
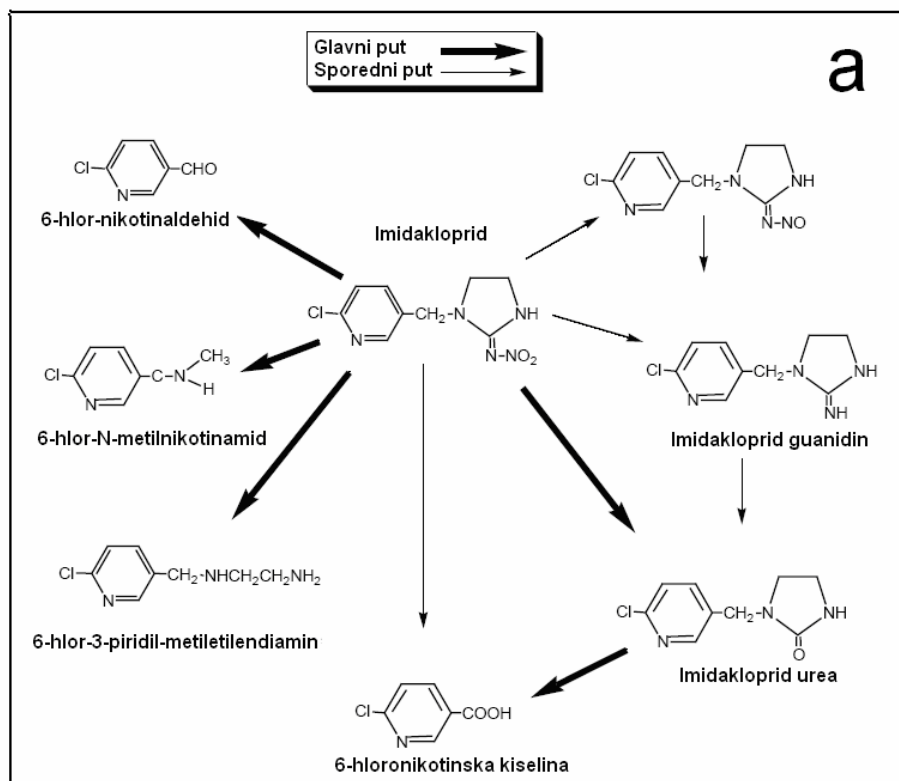
Tablica 2. Važnije fizičko-hemijske karakteristike imidakloprida [10,17,18]

Redni broj	Parametar	Vrednost
1.	Izgled	Bezbojni kristali sa slabim karakterističnim mirisom
2.	Molekulska masa	255,7g/mol
3.	Rastvorljivost na 20 °C, u:	- vodi = 0,61 g/dm ³
		- dihlormetanu = 55 g/dm ³
		- izopropanolu = 1,2 g/dm ³
		- toluenu = 0,68 g/dm ³
		- n – heksanu < 0,1 g/dm ³
4.	Tačka topljenja	144 °C
5.	Napon pare	4 x 10 ⁻⁷ mPa (na 20 °C)
		9 x 10 ⁻⁷ mPa (na 25 °C)
6.	Henry-eva konstanta	2 x 10 ⁻¹⁰ Pa m ³ /mol
7.	Koeficijent raspodele oktanol-voda (K _{ow})	3,7

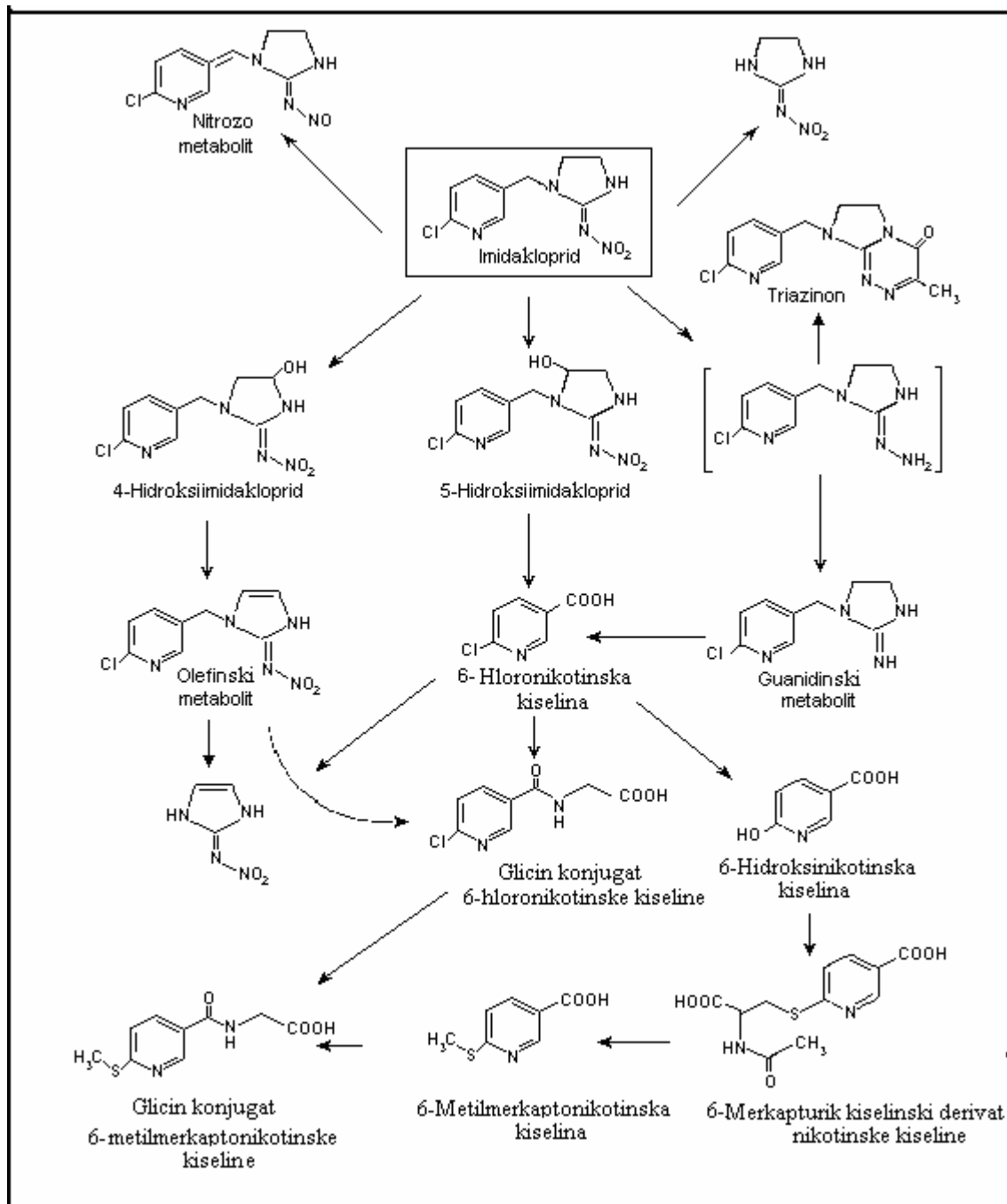
Imidakloprid ima nisku toksičnost za sisare [5, 9-15, 17-22]. Naime, oralna LD₅₀, tj. doza koja izaziva smrt 50% ispitanih eksperimentalnih životinja, za miševe iznosi 100 mg/kg, a za pacove 400 mg/kg [3]. Dermalna LD₅₀ za pacove iznosi više od 5000 mg/kg, dok je inhalaciona LC₅₀ vrednost veća od 5,32 mg/m³ prašine. Nema nadražujući efekat na oči i kožu [5]. U literaturi nisu opisana trovanja imidaklopridom kod ljudi [21]. EPA (Environmental Protection Agency) ga svrstava u "E grupu" karcinogena, tj. u supstance koje nisu karcinogene za ljudski organizam [21]. Ekotoksičnost imidakloprida za vodene organizme je niska. Međutim, otrovan je za ptice [5,11]. Smatra se jako otrovnim za kišne gliste i pčele, pre svega pri direktnom kontaktu (LD₅₀ je 18 ng/pčela [15]).

Toleranca imidakloprida je 0,5 mg/kg za papriku i hmelj, 0,1 mg/kg za merkantilni kukuruz, 0,05 mg/kg za krompir, kukuruz šećerac, šećernu repu, duvan i suncokret. Karenca za papriku iznosi 7, krompira 28, a kod duvana i hmelja 35 dana. Radna karenca je dva dana [5].

Imidakloprid je veoma slabo isparljivo jedinjenje, što potvrđuje njegov nizak napon pare. Takođe, niska vrednost Henry-jeve konstante ukazuje na zanemarljivu isparljivost iz vode. Shodno tome, mala je i verovatnoća disperzije imidakloprida u vazduhu na većoj površini. S druge strane, postoji mogućnost da imidakloprid dospe u površinske i podzemne vode. Naime, istraživanja "Bayer AG" korporacije iz 1997. i 1998. godine ukazuju na prisustvo imidakloprida u podzemnim vodama na oko 5 metara ispod površine na < 1ppb koncentracijskom nivou. Zahvaljujući reakcijama fotodegradacije (shema 1a), prema dosadašnjim podacima, imidakloprid se razlaže do 6-hloronikotinske kiseline, imidakloprid uree, 6-hlor-nikotinaldehida, 6-hlor-N-metilnikotinamida, 6-hlor-3-piridil-metiletildiamina i dr [17-19]. Nadalje, imidakloprid ima nisku tendenciju vezivanja za zemljište. Poluvreme raspadanja imidakloprida iznosi 48-190 dana, zavisno od tipa zemljišta, upotrebe organskog đubriva, prisustva vegetacije i meteoroloških uslova. Imidakloprid se brže razlaže u prisustvu vegetacije ($t_{1/2}$ = 48 dana). Pri fotolizi poluvreme degradacije iznosi 39 dana, a u odsustvu svetlosti oko 229 dana (shema 1b). Ovo poslednje čini imidakloprid pogodnim za tretiranje semena i za druge primene u zemljištu [19].



Shema 1. Fotolitička degradacija imidakloprida u: a) vodi [16] i b) zemljištu [19]

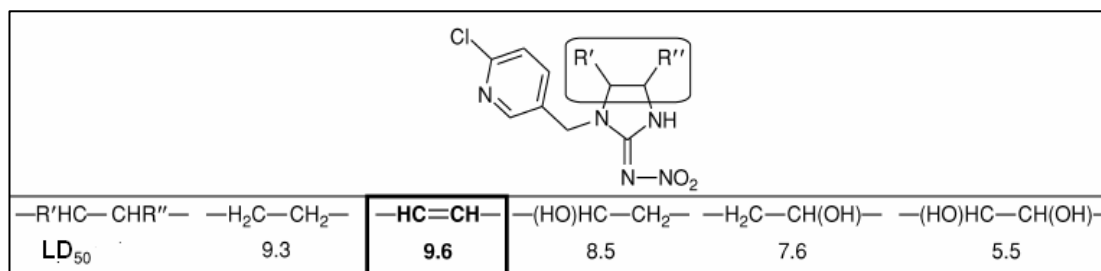


Shema 2. Pretpostavljeni metabolički put imidakloprida kod pacova [22]

Veličina poluvremena života imidakloprida u zemljištu ukazuje na rizik od bioakumulacije. Međutim, visoka tendencija ka fotodegradaciji i njegova rastvorljivost u vodi ukazuju na suprotno, tj. na malu verovatnoću akumulacije imidakloprida u okolini. Treba napomenuti da pored sunčeve svetlosti i mikroorganizmi vode i zemljišta igraju važnu ulogu u degradaciji imidakloprida [17].

Imidakloprid se brzo i skoro potpuno apsorbuje iz gastrointestinalnog trakta pacova, a izlučuje se putem urina (70-80%) i fecesa (20-30%). Oko 96% unete količine se izlučuje u toku 48 sati, i samo se oko 15% eliminiše kao nepromenjena supstanca [16, 17]. Pri biološkoj oksidativnoj razgradnji imidakloprida važnu ulogu ima enzim P450, a u reduktivnoj degradaciji molibdo-flavoenzim aldehid oksidaza, tzv. neonikotinoid nitroreduktaza [13]. Glavni katabolički putevi imidakloprida u biljkama i životinjama (shema 2) su hidroksilacija imidazolidinskog prstena, hidroliza do 6-hloronikotinske kiseline, eliminacija nitro-grupe uz formiranje guanidina i konjugacija 6-hloronikotinske kiseline sa glicinom [18].

Novija istraživanja upozoravaju na činjenicu da imidakloprid u određenim okolnostima može da bude prekursor drugih jedinjenja sa još izraženijom biološkom aktivnošću. Kao što je to prikazano na shemi 3, olefinski derivat imidakloprida ima izraženije fiziološko dejstvo od samog matičnog insekticida.



Shema 3. Biološka aktivnost pojedinih degradacionih proizvoda/metabolita imidakloprida [10]

Pored prirodnih puteva razgradnje, ispitivana je i fotokatalitička degradacija imidakloprida primenom različitih tipova TiO₂ i foto-Fenton-a. Identifikovano je pet degradacionih proizvoda, a potpuna mineralizacija imidakloprida na TiO₂ se postiže nakon 700 min. U poređenju sa TiO₂, foto-Fenton je efikasniji katalikator za razgradnju neonikotinoida [21-23].

2.2.2. Tiametoksam

Tiametoksam je predstavnik druge generacije neonikotinoida. Slično imidaklopridu, ima mnoge prednosti u odnosu na piretroidne, organofosfatne i karbamatne insekticide [5, 10, 16, 26]. Fiziološko dejstvo tiametoksama na ciljne grupe insekticida je znatno izraženije nego što je to slučaj kod prve generacije neonikotinoida.

Važnije fizičko-hemijske karakteristike tiametoksama su prikazane u tablici 3.

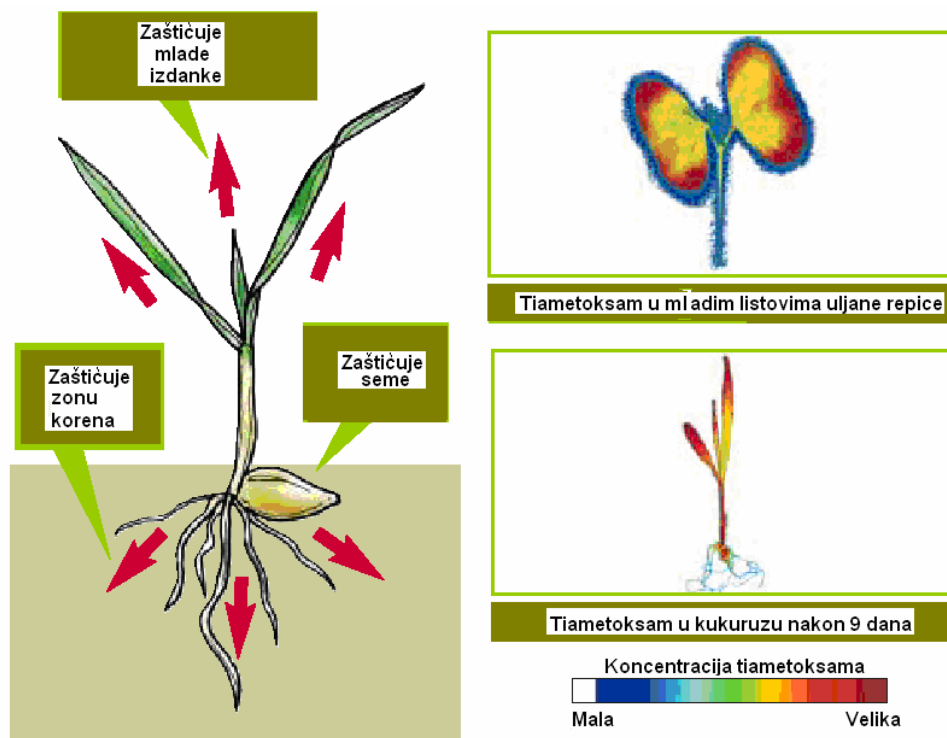
Sintetizovali su ga istraživači Firme Syngenta, Švajcarska. Tokom 2001. godine, tiametoksam je odobren za različitu upotrebu širom severnoameričkog kontinenta i Australije, a od 2003. godine se primenjuje i u Evropskoj Uniji [26]. Često se primenjuje u kombinaciji sa fungicidima, npr. fludiksonilom ili mefenoksamom. Poznat je pod komercijalnim imenima "Actara 25-WG", "Cruiser OSR 322 FS", "Cruiser 350 FS", "Platinum", "Helix", "Centric" i dr.

Toleranca je 0,2 mg/kg za ječam, a 0,05 mg/kg za krompir i pšenica. Karenca je 15 dana za krompir [5, 16, 26].

Tablica 3. Važnije fizičko-hemijske karakteristike tiametoksama [10, 26]

Redni broj	Parametar	Vrednost
1.	Izgled	Kristalni prah
2.	Molekulska masa	291,7g/mol
3.	Rastvorljivost na 20 °C, u: - vodi	= 4,1g/dm ³
4.	Tačka topljenja	139,1 °C
5.	Napon pare	6,6x10 ⁻⁶ mPa (na 25 °C)
6.	Henry-eva konstanta	4,70x 10 ⁻¹⁰ Pa m ³ /mol
7.	Koeficijent raspodele oktanol-voda (K _{ow})	0,74 (na 25°C)

Tiametoksam se često primenjuje kao sredstvo za močenje. Kao što je to ilustrovano na slici 3, tiametoksam štiti seme, ali vrlo lako -kretanjem tečnosti- stiže do mladih izdanaka ili do korenovog sistema [27].



Slika 3. Koncentrisanje tiametoksama u biljkama [27]

Tiametoksam ima nisku toksičnost za sisare. Naime, oralna LD_{50} za miševe iznosi 871 mg/kg, a za pacove 1563 mg/kg [3]. Ne ispoljava nadražujući efekat na oči i kožu [5]. U literaturi nisu objavljena trovanja tiametoksamom kod ljudi [5]. EPA ga svrstava u "E" grupu karcinogena [26]. Toksičnost tiametoksama se odražava na osetljivim vodenim vrstama (sitni račići, embrioni nekih vrsta riba), osama, medonosnim pčelama (LD_{50} je 30 ng/pčela) i na nekim drugim korisnim insektima [5]. Ipak, i pored ovih nedostataka, od tiametoksama se kao i od drugih srodnih neonikotinoida očekuje da zamene organofosfate kao najviše korišćene insekticide širom sveta [16,26]. Tiametoksam ima nisku dermalnu i inhalacionu toksičnost i pri propisanoj upotrebi ne uzrokuje alergijske reakcije kože ili iritaciju očiju sisara.

2.2.3. Acetamiprid

Acetamiprid, pored imidakloprida i nitenpirama, pripada prvoj generaciji insekticida neonikotinoidea i prema tome ima i veoma sličan mehanizam delovanja, odlične sistematske osobine, relativno nisku toksičnost za toplokrvne organizme i dug period delovanja. Ipak, šira pimenljivost acetamiprida u poređenju sa imidaklopridom je verovatno posledica prisustva cijanoiminske grupe umesto nitroguanidinske, koja inače ima centralnu ulogu tokom vezivanja ovog insekticida za širi spektar receptora. Koristi se za zaštitu različitih vrsta useva, npr. krompira, crnog luka, paprike, paradajza, duvana, hmelja, kupusa, žitarica, kruške, pomarandže, trešnje, jabuke i dr [5, 30-35]. Zahvaljujući svojoj efikasnosti u zaštiti useva i relativno niskoj toksičnosti za toplokrvne organizme i životnu sredinu, acetamiprid privlači veliku pažnju kao obećavajući novi insekticid [30-36].

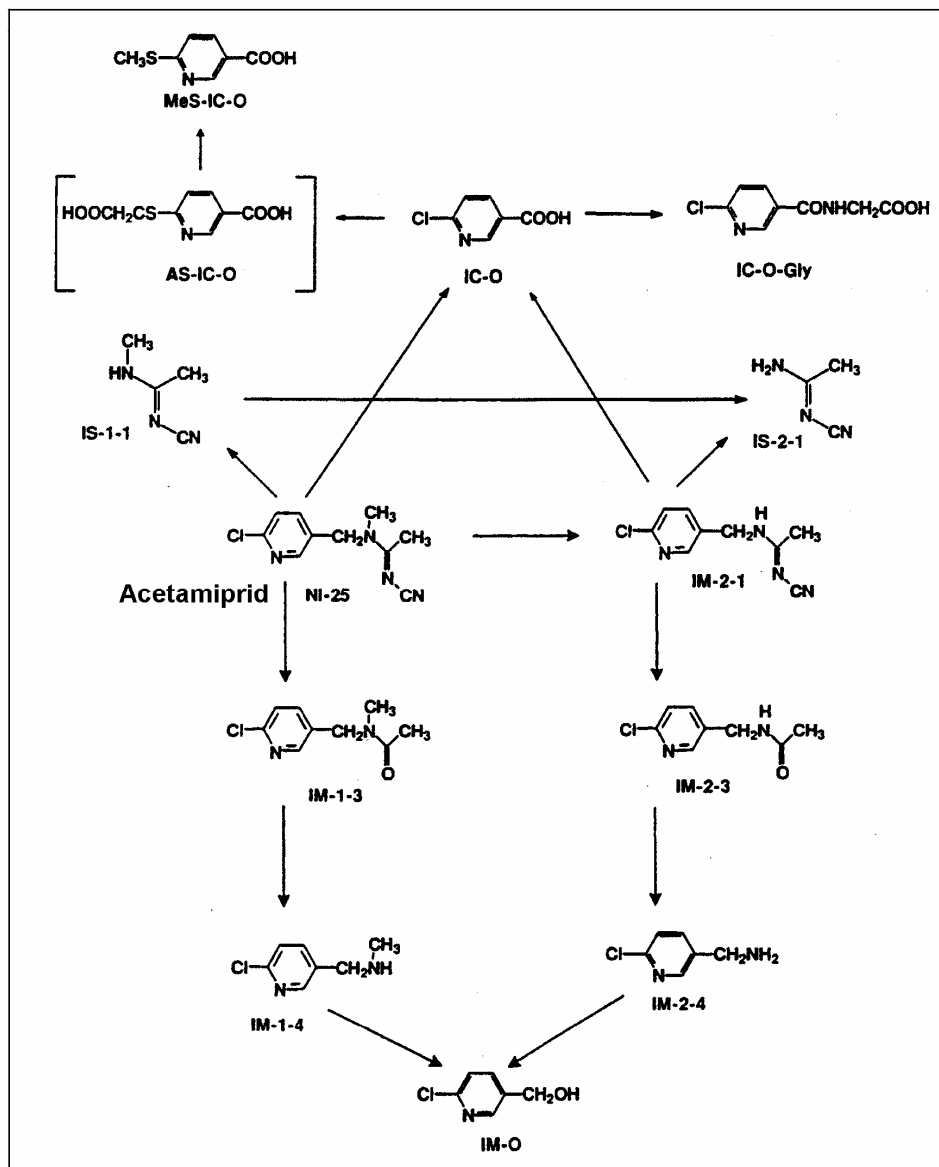
Važnije fizičko-hemijske osobine acetamiprida su prikazane u tablici 4.

Tablica 4. Važnije fizičko-hemijske karakteristike acetamiprida [10,31,33,36]

Redni broj	Parametar	Vrednost
1.	Izgled	Beli kristali sa slabim karakterističnim mirisom
2.	Molekulska masa	222,7g/mol
	Rastvorljivost na 25 °C, u:	
	- vodi	= 4,25 g/dm ³
3.	- dihlormetanu	> 20 g/cm ³
	- benzenu	= 2,44 g/cm ³
	- CS ₂	= 507 μg/cm ³
	- n – heksanu	= 6,56 μg/cm ³
4.	Tačka topljenja	97.6 °C
5.	Napon pare	<1 x 10 ⁻⁶ Pa
6.	Henry-eva konstanta	4,189 x 10 ⁻³ Pa
7.	Koeficijent raspodjele oktanol-voda (K _{ow})	6,27

Kao insekticid je opisan od strane *H. Takahashi et al.* [35] 1992. godine, a prvi put registrovan 1995. godine u Japanu, gde se do danas i najintenzivnije primenjuje. Na tržište ga je lansirala firma "Nippon Soda Co." (Japan) 1995. godine. Poznat je pod komercijalnim imenima "Volley", "Mospilan", "Assail", "Pristine", "Rescate", "Saurus" [31,36]. Formulisan je u vidu vodorastvorljivog praha, vododisperznih granula,

Za sada postoji samo oskudan broj podataka o metaboličkom putu acetamiprida u toplokrvnim organizmima (shema 6). Acetamiprid se dosta brzo i skoro potpuno apsorbuje iz gastrointestinalnog trakta, a izlučuje se putem urina i fecesa. Velika količina se izlučuje u toku 48 sati, dok se oko 15% eliminiše kao nepromenjena supstanca [31].



Shema 6. Pretpostavljeni metabolički put acetamiprida kod pacova [31]

Fungicidi kao što su piperonil butoksid, triflumizol i propikazol pojačavaju toksičnost acetamiprida 6, 255, odnosno 105 puta, respektivno. S druge strane, metaboliti acetamiprida, kao npr. N-dezmetil acetamiprid, 6-hloro-3-piridinil metanol, 6-hloronikotinska kiselina ne prouzrokuju smrt ni pri dozi od 50 µg/pčela. Ovo je verovatno posledica dejstva enzima P450, koji je odgovoran za oksidativnu detoksikaciju pčela [15].

2.2.4. Tiaklopid

Tiaklopid pripada prvoj generaciji neonikotinoidnih insekticida sintetizovanih u "Bayer-u" i drugi je u nizu njihovih proizvoda. Ima sličan način delovanja kao i ostali insekticidi iz grupe neonikotinoida, a dijapazon primene je najbliži acetamipridu [10, 37-40].

Prvi put su ga opisali *Shiokawa et al.* [37]. Na tržište su ga lansirali firma "Bayer AG" (Nemačka), i "Nihon Bayer Agrochem" (Japan). Prvi put je registrovan u Brazilu 2000. godine. Primenjuje se u zaštiti krompira, povrća, pamuka, bobičastog voća, šećerne repe, pirinča, ukrasnog bilja, suncokreta i dr. [5, 10, 37-40].

Važnije fizičko-hemijske osobine tiakloprida su prikazane u tablici 5.

Tablica 5. Važnije fizičko-hemijske karakteristike tiakloprida [10, 38]

Redni broj	Parametar	Vrednost
1.	Izgled	Beli kristali slabog karakterističnog mirisa
2.	Molekulska masa	252,7g/mol
	Rastvorljivost na 20 °C, u:	
	- vodi	= 185 mg/dm ³
	- dihlormetanu	= 160 g/dm ³
3.	- acetonu	= 64 g/dm ³
	- acetonitrilu	= 52 g/dm ³
	- etil-acetatu	= 9,4 g/dm ³
	- n – heptanu	< 0,1 g/dm ³
4.	Tačka topljenja	136 °C
5.	Napon pare (20 °C)	3 x 10 ⁻¹² hPa
6.	Henry-eva konstanta	4,189 x 10 ⁻¹⁰ Pa m ³ /mol
7.	Koeficijent raspodele oktanol-voda (K _{ow})	1,26

Distribuirana se pod komercijalnim imenima "Bariard", "Calypso" i "Alanto". Formulisan je u vidu vodorastvornog praha, vododisperznih granula, koncentrovanih suspenzija i gotovih smeša za primenu. Pri folijarnoj upotrebi primjenjuje se u količinama 48-218 g/ha [5].

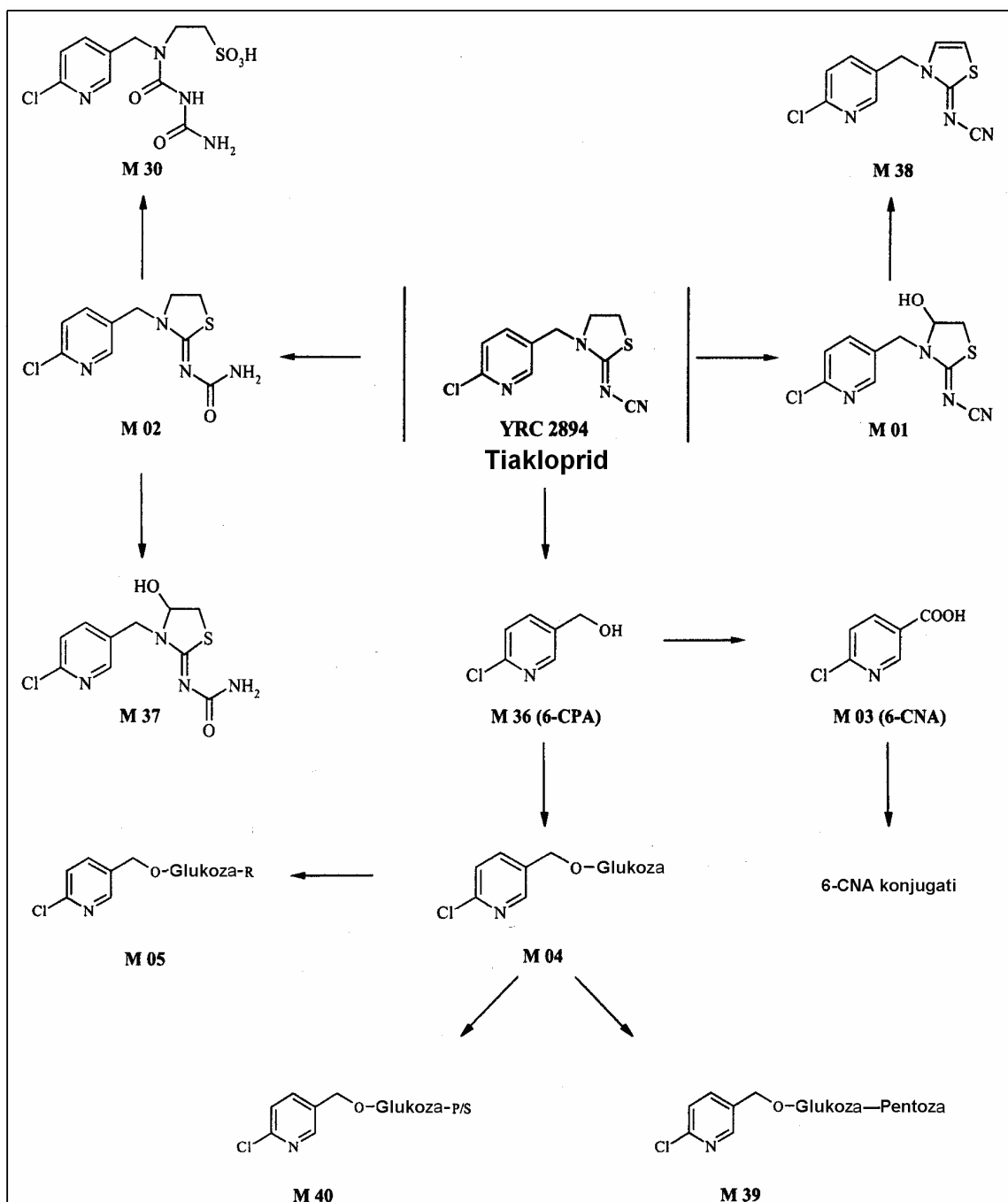
Karenca u slučaju paprike iznosi 7, a u slučaju krompira i suncokreta 21 dan. Toleranca acetamiprida je 0,5 mg/kg za papriku, 0,2 mg/kg jabuku, 0,05 mg/kg krompir i 0,03 mg/kg suncokret [5].

Tiakloprid ima nisku toksičnost za sisare. Naime, oralna LD₅₀ za ženke pacova iznosi 444 mg/kg, a za mužjake 836 mg/kg. Dermalna LD₅₀ za pacova iznosi više od 2000 mg/kg, dok je inhalaciona LC₅₀ (4 h) vrednost veća od 1,22 mg/dm³ prašine. Blago nadražuje kožu [5]. U literaturi nisu objavljena trovanja tiaklopridom kod ljudi. EPA ga svrstava u "E" grupu karcinogena. Toksičnost tiakloprida za vodene organizme je niska. Međutim, otrovan je za ptice. Smatra se veoma otrovnim za kišne gliste i pčele (LD₅₀ 14,6 µg/pčela) [15].

Tiakloprid se dosta brzo i skoro potpuno apsorbuje iz gastrointestinalnog trakta, a izlučuje se putem urina i fecesa. Velika količina se izluči u toku 48 sati, dok se oko 15% eliminiše kao nepromijenjena supstanca [39,40].

Poluvreme raspada u zemljištu pri aerobnim uslovima na 20°C se kreće u intervalu 12-78 dana. Na shemama 7 i 8 su dati glavni metabolitički putevi u zemljištu i biljkama, a na shemi 9 predstavljen je degradacioni put tiakloprida kod pacova [38-40]. Kao što se može zapaziti, u prvom fazama degradacije nastaje tiakloprid urea i tiakloprid guanidin, a njihovi putevi degradacije većinom vode do 6-hloronikotinske kiseline.

Kao i u slučaju ostalih neonikotinoida, degradacija tiakloprida se odvija na sličan način. Naime, može se zaključiti da svi oni imaju veoma sličnu prvu fazu degradacije i u slučaju oksidativnog i u slučaju reduktivnog puta razlaganja.



Shema 8. Pretpostavljeni metabolički put tiakloprida u biljkama [39,40]

2.2.5. Ostali neonikotinoidi

Pored opisanih neonikotinoida postoje još i drugi predstavnici iz ove grupe insekticida (tablica 1).

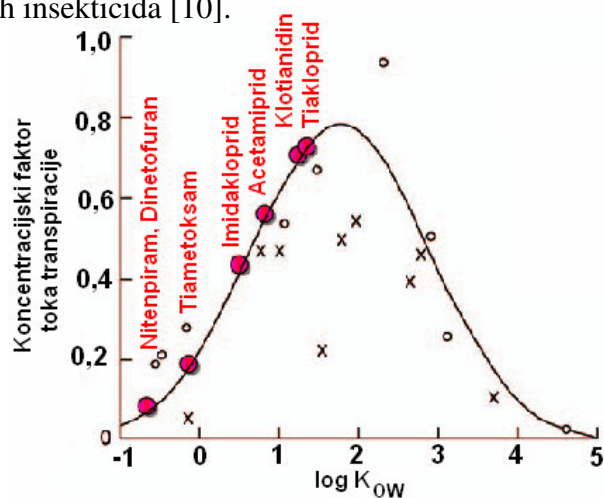
Nitiazin, je pionir iz grupe neonikotinoida [8-10].

Nitenpiram, iz prve generacije neonikotinoida, se veoma dobro rastvara u vodi (840 g/dm^3), dobar je sistemik, i nije fitotoksičan ($\log K_{OW} -0,64$) [10].

Klotianidin, je sistemični insekticid sa alifatičkom nitroguanidinskom farmakoforom i tiazolskim prstenom u svojoj strukturi. Na tržište su ga lansirale firme "Bayer AG" (Nemačka), i "Nihon Bayer Agrochem" (Japan). Distribuira se pod komercijalnim imenima "Dantotus", "Fullswing" i "Poncho". Registrovan je u Japanu, Tajvanu, Kini i državama Severne Amerike, kao i nekim državama Evropske Unije. Primenjuje se kao folijarni sistemik ili sredstvo za močenje. Slabo se rastvara u vodi ($0,327 \text{ g/dm}^3$ na 20°C). Stabilan je u širokom pH intervalu (4,0-9,0), međutim podleže fotolizi. Na osnovu fizičko-hemijskih karakteristika, klotianidin nema visok afinitet prema bioakumulaciji [10, 41].

Dinotefuran, najnoviji iz grupe neonikotinoida, pored alifatične nitroguanidinske farmakofore na mestu tiazolskog prstena sadrži zasićeni aliciklični, tj. supstituisani tetrahidrofuranski prsten. Sintetizovali su ga istraživači firme "Mitsui Chemicals Inc." i distribuira se pod komercijalnim imenima "Starkle" i "Albarin". Dinotefuran predstavlja najnoviji proizvod iz grupe neonikotinoidnih insekticida [10].

Upoređivanjem $\log K_{OW}$ vrednosti aktuelno primenjivanih neonikotinoida i koncentracijskog faktora toka transpiracije biljaka (merilo transpiracije neonikotina u biljkama) možemo zaključiti da zbog svoje lipofilnosti najveći afinitet prema korenovom sistemu imaju klotianidin i tiakloprid, a nasuprot tome ksilenskom nitenpiram i dinotefuran (shema 10) [10].



Shema 10. Zavisnost toka transpiracije neonikotinoida u biljkama (izražen u faktoru koncentracije) od $\log K_{ow}$ ovih insekticida [10]

Posebnu pažnju treba posvetiti i **6-hloronikotinskoj kiselini**, osnovnom prekursoru prve generacije insekticida neonikotinoidea: acetamiprida, nitenpirama, imidakloprida i tiakloprida. U biljkama i zemljištu, degradacija ovih insekticida daje takođe 6-hloronikotinsku kiselinu [42]. Određivanje 6-hloronikotinske kiseline pored ovih jedinjenja može da pruži korisne informacije o načinu lagerovanja komercijalnih formulacija, kvalitetu aktivne komponente pre formulisanja u komercijalni proizvod, stanju životnih namirnica sa aspekta poštovanja karence tokom procesa proizvodnje i distribuiranja voća i povrća. Veoma korisno je i određivanje sadržaja 6-hloronikotinske kiseline u staklenicima i plasticima sa intenzivnim gajenjem povrtarskih kultura pored matičnih insekticida, jer se na taj način može pratiti kvalitet vazduha u tim ambijentima i hronična izloženost radnika. 6-hloronikotinska kiselina ne izaziva smrt pčela ni pri dozi od 50 µg/pčela [10].

Tablica 6. Važnije fizičko-hemijske karakteristike 6-hloronikotinske kiseline [42]

Redni broj	Parametar	Vrednost
1.	Izgled	Žuti kristalni prah
2.	Molekulska masa	291,7g/mol
3.	Rastvorljivost na 20 °C, u: - vodi	= 4,1g/dm ³
4.	Tačka topljenja	139,1 °C
5.	Napon pare	6,6x10 ⁻⁶ mPa (na 25 °C)
6.	Henry-eva konstanta	4,70x 10 ⁻¹⁰ Pa m ³ /mol
7.	Koeficijent raspodele oktanol-voda (K _{ow})	0,74 (na 25°C)

Treba još pomenuti **flonikamid** (*N*-cijanometil-4-(trifluorometil)nikotinamid, C₉H₆F₃N₃O), insekticid, koji se prema literaturi, zbog stukturane i stereochemijske srodnosti, često svrstava u grupu neonikotinoidea. Prema proizvođaču i distributeru ovog jedinjenja, FMC Corporation, prvi je predstavnik piridin-karboksamidnih insekticida [43, 44]. Pretpostavlja se da ima drugačiji, za sada još nerazjašnjen, mehanizam delovanja, i to ga razlikuje od organofosfata, piretroida, karbamata i neonikotinoidea. Glavni metaboliti flonikamida su 4-trifluorometilnikotinska kiselina, 4-trifluorometilnikotinamid i *N*-(4-trifluorometilnikotinoil)-glicin. Registrovan je u Španiji, Portugalu, Engleskoj i pojedinim državama američkog kontinenta. Komercijalno ime mu je "Aria" [43, 44]. Samo se posle detaljnog otkrivanja mehanizma delovanja ovog veoma perspektivnog

insekticida može doneti konačna odluka o tome, da li je ovo jedinjenje piridinkarboksamidna podgrupa neonikotinoida, ili je to prvi predstavnik jedne nove grupe insekticida.

2.3. ANALITIKA NEONIKOTINOIDA

U današnje vreme prisustvo rezidua pesticida (kao i njihovih metabolita) u životnoj sredini i životnim namirnicama je veoma ozbiljan problem. Iz tog razloga su neophodne analitičke metode koje su pogodne za identifikaciju i određivanje različitih pesticida i njihovih metabolita. S obzirom na činjenicu da pesticidi čine veoma različite grupe hemijskih jedinjenja, ne postoji jedinstvena, univerzalna tehnika koja omogućava njihovo brzo i lako određivanje. Ispitivanje hemijskih jedinjenja (među njima i pesticida) u uzorcima različitog porekla sastoji se od nekoliko osnovnih faza:

- definisanje analitičkog problema,
- prikupljanje uzoraka,
- izdvajanje ispitivane supstance,
- analitičko merenje i
- interpretacija rezultata [45].

Da bi se izvršilo ispravno (kvalitetno) poređenje mogućnosti primene različitih instrumentalnih tehnika i metoda za dokazivanje i određivanje malih količina ili niskih koncentracija različitih supstanci, neophodno je poznavati odgovarajuće vrednosti granice detekcije i granice određivanja [45, 46].

Generalno, *granica detekcije* (limit of detection, LOD) se definiše kao najniža koncentracija (ili količina) neke supstance koja može biti pouzdano (sa određenom statističkom sigurnošću) detektovana nekom analitičkom metodom. LOD vrednost, izražena u koncentracionim jedinicama, se izračunava po formuli:

$$\text{LOD} = k_D \sigma / S$$

gde je:

k_D – broj koji je određen odabranim intervalom poverenja (najčešće se uzima da je $k=3$, čemu odgovara interval poverenja od oko 99,86% za model rastvora, a 95% za realne uzorke);

σ - standardna devijacija slepe probe i

S – nagib kalibracionog grafika.

Granica određivanja (limit of quantitation, LOQ) se definiše kao najniža koncentracija (ili količina) neke supstance koja može biti pouzdano (sa određenom statističkom sigurnošću) kvantitativno određena [45, 46].

LOQ, izražena u koncentracionim jedinicama, se izračunava po formuli:

$$\text{LOQ} = k_Q \sigma/S$$

gde je:

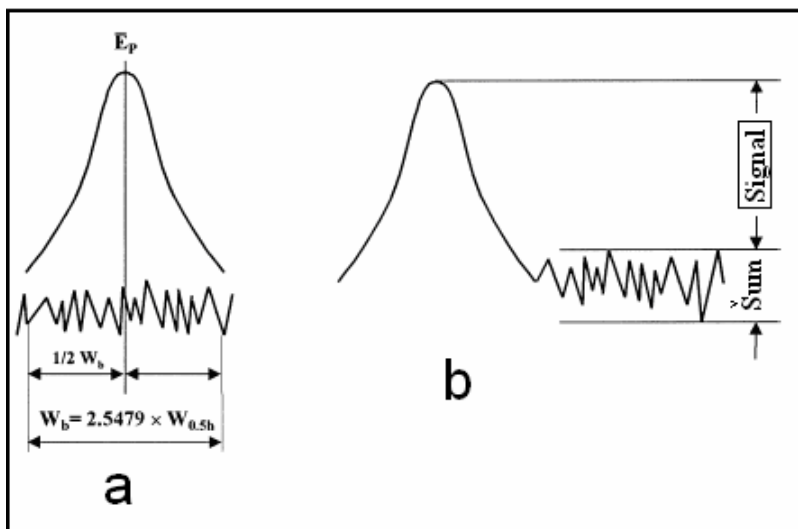
k_Q – broj koji je određen odabranim intervalom poverenja (najčešće se uzima da je $k=10$);

σ - standardna devijacija slepe probe i

S – nagib kalibracionog grafika.

Iako svaka metoda ima svoje specifičnosti, kod svih je *najosteljivije praktično pitanje definisanja signala slepe probe*. U ovom radu u slučaju svih mernih tehnika i metoda ispoštovan je propis IUPAC-a u vezi sa određivanjem LOD i LOQ vrednosti, a za definisanje slepih proba primenjena je metoda [47] predložena od strane IUPAC-a, predstavljena na slici 4a. Širina bazne linije W_b se može odrediti jednoznačnim definisanjem početka i završetka korisnog analitičkog signala i shodno tome vršiti izbor parametara za integraljenje površine. Međutim, u okruženju tih kritičnih graničnih tačaka, značajna je slučajna greška. Naime, to je upravo oblast gde nesigurnost prouzrokuje porast uticaja slučajnog šuma i pojačava njegov uticaj na korisni signal. Ovaj problem je prevaziđen tako što se umesto W_b sa krive očitava $W_{0,5h}$, polovina visine pika, koja ne sadrži informacije šuma i koja sa verovatnoćom od 99,73% omogućava računanje W_b prema sledećem izrazu:

$$W_b = 2,5479 \times W_{0,5h}$$



Slika 4. Merenje signala pika i slepe probe na osnovu IUPAC-ove metode (a) i na osnovu odnosa signal/šum (S/N) (b) [47]

Linearnost odziva detektora. Linearnost se definiše kao mogućnost da se u datom opsegu detekcije signal koji je direktno proporcionalan koncentraciji ili koločini analita. Opseg linearnosti zavisi od prirode analita i tipa detektora. U linearnom delu apsolutna vrednost koeficijenta regresije (S) treba da bude što veća, a odsečak na ordinati me treba značajno da odstupa od nule. Koeficijent regresije predstavlja osetljivost metode, tj. veći nagib omogućuje da mala promena u količini analita proizvede veliku razliku u odgovoru sistema. Odsečak na ordinati predstavlja indikator postojanja problema uticaja matriksa ili gubitka analita (npr. adsorbcija analita na zidova suda, degradacija analita i dr.). Pri ispitivanju linearnosti treba koristiti najmanje pet standardnih rastvora čija koncentracija kreće u opdegu 80-120% od očekivane količine analita.

Dok je cilj regresione analize da omogući sagledavanje očekivane vrednosti zavisno promenljive na osnovu date nezavisno promenljive, cilj korelacije je sagledanje jačine veze između promenljivih izražene koeficijentom korelacije (r) koje se računa po sledećoj formuli:

$$r = \frac{\sum(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum(x_i - \bar{x})^2 (y_i - \bar{y})^2}}$$

gde je:

x_i – pojedinačna vrednost nezavisno promenljive;

\bar{x} – srednja vrednost nezavisno promenljive;

y_i – pojedinačna vrednost zavisno promenljive;

\bar{y} – srednja vrednost zavisno promenljive

Koeficijent korelacije je relativan pokazatelj koji se kreće u intervalu od $-1 \leq r \leq 1$ zavisno od oblika korelacione veze. Pozitivan koeficijent korelacije ukazuje da je veza između promenljivih upravo proporcionalna, a negativan koeficijent korelacije da je obrnuto proporcionalan. Ako postoji potpuna međuzavisnost između promenljivih, onda se njihova veza izjednačuje sa funkcionalnom. U takvoj situaciji koeficijent korelacije je 1 ili -1 što je teorijska mogućnost. U potpunom odsustvu međuzavisnosti, koeficijent korelacije je 0 i to je, isto tako, teorijska mogućnost. Praktično, koeficijent korelacije (r) se kreće između 0 i 1 ili -1 i ukoliko je bliži ± 1 utoliko je jača veza između promenljivih.

Često se izračunava koeficijent determinacije koji predstavlja kvadrat koeficijenta korelacije (r^2). Putem njega se sagledava koliki je udeo promenljive x u ukupnom varijabilitetu promenljive y .

Za rešavanje praktičnih problema, analitičaru stoje na raspolaganju brojne metode čiji izbor najviše zavisi od: hemijske strukture ispitivanog jedinjenja ili grupe jedinjenja, prirode uzorka, potrebne osetljivosti i specifičnosti merenja i broja jedinjenja koje treba odrediti.

Za određivanje neonikotinoidnih insekticida u hrani, poljoprivrednim proizvodima i uzorcima iz okoline (životne sredine), primenjuju se različite tehnike: spektroskopske, elektroanalitičke, imunohemijske i hromatografske.

2.3. 1. Molekulska spektroskopija

Spektrofotometrija u UV oblasti. Ova jednostavna tehnika je bila primenjena za karakterizaciju neonikotinoidea [17, 33, 38]. U literaturi su navedeni apsorpcioni maksimumi svakog neonikotinoidea, a u nekim slučajevima i odgovarajući molarni koeficijenti apsorpcije ovih jedinjenja. Iako bi pri određivanju neonikotinoidea spektrofotometrija mogla da bude samostalna tehnika, na osnovu pretražene literature, nisu nađeni radovi posvećeni ovom zadatku. Međutim, na rutinskom nivou je prisutna u kombinaciji sa hromatografskim metodama razdvajanja u vidu optičkog detektor, kao npr. UV detektor ili detektor sa nizom dioda (diode-array detector, DAD).

Infracrvena spektrometrija. Infracrvena spektrometrija sa Fourier-ovom transformacijom (FT IC) je primenjena za određivanja imidakloprida iz njegovih komercijalnih formulacija. Metoda se zasniva na merenju površine pika između 1577 i 1567 $1/\text{cm}$ ili merenju visine pika na 1572 $1/\text{cm}$. Dobijena LOD je 9 $\mu\text{g/g}$ iz komercijalnih formulacija imidakloprida [48].

Fluorimetrija. Fluorimetrijske metode su veoma selektivne i osetljive zbog visokog S/N odnosa same tehnike. U literaturi se za sada mogu naći samo dva rada od iste grupe autora na temu fluorimetrijskog određivanja imidakloprida [49, 50].

Vílchez et al. [49] predlažu fotohemijski indukovanu fluorimetrijsku (PIF) metodu za osetljivo i brzo određivanje imidakloprida u uzorcima vode, baziranu na hemijskoj modifikaciji imidakloprida (u baznoj sredini pod dejstvom UV zračenja živine lampe) u fluoroforu, jedinjenje koje u vodenoj sredini pokazuje fluorescenciju sa ekscitacionim maksimumom na 334 nm i emisionim maksimumom na 337 nm.

Vílchez et al. [50] su za određivanje imidakloprida razvili i protočnu injekcionu analizu (flow injection analysis, FIA) sa PIF-om, pri čemu su postigli linearni koncentracioni opseg od 1,0-60,0 ng/cm^3 imidakloprida, sa RSD od 2,1% (za 10 ng/cm^3) i granicom detekcije od 0,3 ng/cm^3 .

Nuklearna magnetna rezonantna (NMR) spektrometrija. Ova visoko-sofisticirana tehnika je dosad primenjena kako za karakterizaciju Bayer-ovih neonikotinoida na osnovu ^1H NMR, ^{13}C NMR i ^{15}N NMR spektara [10, 38], tako i za ispitivanje načina vezivanja neonikotinoida i potencijalnih neonikotinoida na receptorska mesta [51].

2.3.2. Voltametrijske metode

Elektroanalitičke metode se sve češće koriste u analizi tragova zbog visoke osetljivosti i selektivnosti same tehnike. Impulsne tehnike, pre svega diferencijalna pulsna polarografija (DPP), diferencijalna pulsna voltametrija (DPV) i pravougaona voltametrija koja se može kombinovati i sa stripping analizom, daju niske granice detekcije [47,52-53], širok dinamički opseg, dobru preciznost, uz niže troškove analize. Njihova osetljivost i selektivnost se mogu poboljšati primenom protočnih sistema ili uključivanjem fotoreaktora. Dakle, analitička voltametrija može da bude alternativa pri rutinskoj analizi elektroaktivnih pesticida.

Navalón et al. [52] ispituju uticaj pH na polarografsko ponašanje imidakloprida primenjujući DPP metodu i istu koriste za određivanje sadržaja imidakloprida u komercijalnim proizvodima "Gaicho". Granica detekcije iznosi 4 ng/cm^3 pri pH 8,0.

Blanc et al. [47] opisuju DPV metodu za određivanje imidakloprida. Granica detekcije iznosi $4,54 \times 10^{-10} \text{ mol/dm}^3$.

Guiberteau et al. [53] su razradili elektroanalitičku metodu za detekciju i određivanje imidakloprida u rečnoj vodi pomoću adsorpcione stripping voltametrije sa pravougaonim talasom na visećoj kapi žive (hanging mercury drop electrode, HMDE) u vodenom rastvoru Britton-Robinson pufera kao pomoćnog elektrolita. Najbolji adsorpcioni uslovi su postignuti pri pH 7,2, akumulacionom potencijalu od -1050 mV (HMDE vs. Ag/AgCl-KCl , 3 mol/dm^3) i akumulacionom vremenu od 50 s. Kalibraciona kriva je linearna u opsegu 2×10^{-8} - $5 \times 10^{-7} \text{ mol/dm}^3$, sa granicom detekcije od $1,6 \times 10^{-8} \text{ mol/dm}^3$ i granicom određivanja od $4,1 \times 10^{-8} \text{ mol/dm}^3$.

2.3.3. Imunohemijske metode

Razvijeni su i enzim-vezujući imunosorbentski testovi (ELISA-test) za određivanje neonikotinoidnih insekticida. ELISA-test je osetljiva i specifična tehnika, jednostavna za izvođenje i pogodna za brza terenska određivanja. Zasniva se na mikrotitracijama, pri čemu se prati obojenost test-rastvora usled prisustva ciljnog jedinjenja. Zahvaljujući specifičnosti i osetljivosti same tehnike, velika pažnja se posvećuje razradi imunohemijskih metoda analize, što potvrđuje veći broj objavljenih radova poslednjih godina [54-58].

Wanatabe et al. [54] razvijaju ELISA metodu baziranu na monoklonalnim antitelima (MoAbS) za određivanje imidakloprida. Direktni kompetitivni ELISA (dc-ELISA) testovi sa pogodnim MoAbS su ispitivani prilikom određivanja imidakloprida u uzorcima voća i povrća, i to bez prečišćavanja.

Kim et al. [55] razvijaju ELISA-test za određivanje tiametoksama. Tri antiseruma su izolovana iz zečeva imunizovanih hapten-KLH konjugatom. Antiserumi su karakterisani indirektnom kompetitivnom ELISA metodom. Ispitana su unakrsna reaktivnost, efekti organskih rastvarača, pH i uticaj jonske jačine. Antiserum je bio specifičan za tiametoksam. Granica detekcije je $0,1 \mu\text{g}/\text{dm}^3$. Metoda je primenjena za određivanje tiametoksama u vodi.

Kim et al. [56] razvijaju ELISA metodu baziranu na monoklonalnim antitelima (MoAbS) za određivanje imidakloprida. Indirektni kompetitivni ELISA (icELISA) testovi sa pogodnim antitelima su primenjeni za određivanje imidakloprida u uzorcima vode i krastavca. Efektivnost metode je od 70 do 120%. Razvijenim icELISA testom sa anti-imidaklopid-MoAbS (E6F3) se može detektovati imidaklopid u koncentraciji od $0,1 \mu\text{g}/\text{dm}^3$.

Wanatabe et al. [57] razvijaju ELISA metodu baziranu na MoAbS za određivanje hloronikotinoidnih insekticida, imidakloprida i acetamiprida, primenom 3-[5-(nitroiminoimidazolidin-1-ilmetil)-2-piridiltio]propion kiselinskog i 3-[5-(*N*-1-cianoiminoetil)-*N*-metilaminoetil-2-piridiltio]propion kiselinskog haptena konjugovanog sa serumskim albuminom bovinom. Direktni kompetitivni ELISA testovi sa pogodnim odgovarajućim MoAbS-ima su primenjeni za određivanje imidakloprida i acetamiprida u voću i povrću bez prečišćavanja uzoraka, pri čemu je postignuta LOD vrednost za imidaklopid i acetamiprid od $3,3 \text{ ng}/\text{cm}^3$ odnosno $1,0 \text{ ng}/\text{cm}^3$.

Watanabe *et al.* [58] razvijaju ELISA metodu baziranu na MoAbS za određivanje hloronikotinoidnih imidakloprida.

Prednosti ELISA testova u odnosu na GC, GC-MS i HPLC metode su njihova osetljivost, specifičnost, jednostavnost izvođenja i kratkoća trajanja analiza.

2.3.4. Hromatografske metode

Na osnovu literaturnih podataka najčešće primenjivana analitička tehnika za određivanje neonikotinoidea je hromatografija, a danas pre svega hromatografija kombinovana sa drugim tehnikama i/ili širokim spektrom detektorskih uređaja. Zbog toga je zadatak ovog kratkog pregleda samo da se opišu metodološki pristupi i aktuelni principi vezani za ovu oblast.

Gasna hromatografija (GC). Razvijene su brojne metode određivanja pesticida koje se zasnivaju na gasnoj hromatografiji. Ipak, veliki je broj i onih jedinjenja, koja se ne mogu direktno pratiti GC tehnikom, jer su nedovoljno isparljiva ili termolabilna. Ovakva jedinjenja se prethodno moraju prevesti u isparljiv oblik. Ovoj grupi pripada i većina neonikotinoidea [10].

Vílchez et al. [59] određuju imidaklopid u uzorcima vode i zemljišta primenom gasne hromatografije sa masenim spektrometrijskim detektorom (GC/MS). Metoda se sastoji od ekstrakcije imidakloprida hloroformom, hidrolize imidakloprida u baznoj sredini i merenja po modu odabranog jona (selected ion mode, SIM). Pri SIM merenjima signali matriksa nisu uticali na rezultat. LOD za uzorke vode je bio 0,16 µg/dm³, a za uzorke zemljišta 1 µg/kg sa RSD od 0,3-1%, uz prinos od 100%. Metoda je primenjena za kontrolu kvaliteta voda i zemljišta Granade.

Navalón et al. [60] razrađuju metodu određivanja imidakloprida u povrću (paradajz, kastavac, paprika i zeleni biber) primenom GC/MS tehnike. Metoda se zasniva na ekstrakciji imidakloprida dihlormetanom, hidrolizi imidakloprida u baznoj sredini i SIM merenjima. Postignuti LOQ je bio 12,5 µg/kg, a RSD na nivou 125 µg/kg je bila 0,7%. Prinos metode je 94,3-105,8%.

Zheng i Liu [61] primenjuju GC/MS tehniku za ispitivanje stabilnosti imidakloprida, za proučavanje njegove hidrolize i identifikaciju degradacionog proizvoda. Hidroliza imidakloprida je najbrža u baznoj sredini, pri čemu je glavni degradacioni proizvod je 1-[(6-hloro-3-piridinil)metil]-2-imidazolidon.

Mateu-Sánchez et al. [62] razvijaju brzu i jednostavnu GC metodu za određivanje acetamiprida u voću i povrću. U svom radu koriste MS i kombinovani MS/MS detektor. Ekstrakciju su vršili etil-acetatom, a sistemom GC-MS/MS su postigli LOQ od 0,001 mg/kg. Postignuti prinos im je bio 82,4-85,7%, a RSD manja od 12,2%.

Tokieda et al. [63] opisuju GC metodu za određivanje acetamiprida i četiri degradaciona proizvoda u uzorcima voća. Ekstrakcija je vršena metanolom, a zatim je izvedena derivatizacija alkalnom hidrolizom, posle čega je sledila oksidacija kalijum-permanganatom i esterifikacija primenom diazometana. Vrednost LOD je bila 0,01 g/kg, a prinos "spajkovanih" uzoraka između 74-92%. Primljeni detektor je bio detektor sa elektronskim zahvatom (electron capture detector).

Tokieda et al. [64] primenjuju već opisanu [55] i modifikovanu GC metodu [56] za određivanje acetamiprida i nekih degradacionih proizvoda iz biljnih uzoraka i zemljišta. Nakon 60 dana biljni uzorci su sadržavali manju količinu acetamiprida od LOD (0,01 g/kg) u slučaju obe metode. U slučaju ispitivanih zemljišta autori su našli da je poluvreme raspada acetamiprida od 1-2 dana.

Tokieda et al. [65] primenjuju GC i modifikovanu GC metodu za proučavanje degradacije acetamiprida u zemljištu.

Tečna hromatografija. Za direktno određivanje teško isparljivih pesticida i njihovih metabolita i degradacionih proizvoda češće se koriste analitičke metode bazirane na tečnoj hromatografiji visoke efikasnosti (HPLC) [66-81] u kombinaciji sa ultravioletnim (UV)-detektorom [66], detektorom od serije dioda (DAD) [67-71], masenim spektrometrom (MS) [71-79], sa detektorom na bazi viseće kapi žive (HMDE) [80] ili drugim voltametrijskim detektorom [81].

Priprema uzoraka za analizu u slučaju HPLC tehnike je takođe složena i skupa, često obuhvata i posebne faze prečišćavanja primarnih/sirovih uzoraka (ekstrakcija, primena pretkolone itd.), ali ipak, zbog nevolatilne prirode neonikotinoda pomenuta tehnika je jedna od pogodnijih, o čemu svedoči i sve veći broj radova.

Ishii et al. [66] razvijaju brzu, osetljivu i pouzdanu HPLC metodu za određivanje rezidua imidakloprida u devet vrsta voća i povrća. Detekcija se vrši UV-detektorom na radnoj talasnoj dužini od 270 nm. Prethodno koncentrisanje uzoraka se vrši na posebnoj koloni. Granica određivanja za voće/povrće, pirinač i zemljište iznose: 0,005; 0,01, odnosno 0,02 mg/kg. Linearni opseg merenja je 1-20 ng/cm³.

Fernández-Alba et al. [67] opisuju HPLC metodu za određivanje rezidua imidakloprida u povrću u opsegu od 0,01-0,60 mg/kg. Detekcija je pomoću DAD na 270 nm. Ispitivana je i kombinacija termosprej-jonizacionog masenog spektrometra sa HPLC tehnikom. Prinos metode iznosi 95%, a standardna devijacija je 4,7%. Dinamički opseg se kreće između 2,0-120,0 ng (0,01-0,60 mg/kg), dok LOD iznosi 0,01 ng/kg.

Martinez-Galera et al. [68] vrše analizu imidakloprida i njegovog glavnog degradacionog proizvoda 6-hloronikotinske kiseline (dva jedinjenja veoma slične polarnosti) u vodi pomoću HPLC/DAD tehnike, kombinujući i elemente hemometrike. Koristeći grafičku tehniku i računarski algoritam zasnovan na trodimenzionalnim matriksima poboljšali su selektivnost metode. Metoda se pokazala zadovoljavajućom za određivanje insekticida i u $\mu\text{g}/\text{dm}^3$ koncentracijskom opsegu, nakon ekstrakcije dihlormetanom sa prinosom od 90-114%. Kao mobilna faza korišćena je smeša acetonitril : 0,01 mol/dm³ fosfatni pufer (pH 3,0, 25:75, v/v). Imidaklopid ima maksimume apsorpcije na 210 i 270 nm. Granice detekcije iznose 0,25 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$ za 6-hloronikotinsku kiselinu i 0,30 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$ za imidaklopid.

Mandić et al. [69] određuju imidaklopid tehnikom HPLC/DAD u uzorcima krompira i luka na Hypersil MOS koloni, sa mobilnom fazom acetonitril : 0,01 mol/dm³ fosfatni pufer (pH 3,15, 25:75, v/v), na radnoj talasnoj dužini detektora od 270 nm. Uzorci krompira su ekstrahovani samo dihlormetanom, dok su uzorci luka pored toga i prečišćeni na LC-Florisil koloni. Postignuti su LOQ vrednosti za krompir od 0,015, a za luk 0,012 mg/kg, sa prinosom od 94-99% i RSD 5%.

Obana et al. [70] su odredili tri insekticida: acetamiprid, imidaklopid i nitenpiram iz biljnih uzoraka u smeši, primenom HPLC/DAD tehnike posle ekstrakcije acetonitriplom. Ekstrakt je filtriran preko anjonsko-izmjenjivačkog filtra (cartridge), zatim preko silikagelskog sistema za filtriranje. Pesticidi su određeni na C-18 koloni sa prinosom od 90% iz "spajkovanog" (0,2 i 2 mg/kg) krompira, paradajza, patlidžana u slučaju

acetamiprida i imidakloprida i 64-84% u slučaju nitenpirama. RSD je u svakom slučaju bila manja od 10%, u granicama određivanja od 0,08-0,14 mg/kg.

Sing et al. [71] primenjuju mikrotalasno-potpomognutu ekstrakciju (microwave-supported extraction) kombinovanu sa ekstrakcijom na čvrstoj fazi za simultano određivanje tiametoksama, imidakloprida i karbendazima u svežem i kuvanom povrću (paprika, krompir, bundeva, paradajz i čili) primenom HPLC/DAD i HPLC/MS tehnike sa LOQ u opsegu od 0,030-0,048 µg/g. Zahvaljujući primeni mikrotalasnog ekstraktora prinos metode je povećan sa 37,2-61,4% na 68,1-106%, uz RSD < 7%. U slučaju kuvanih uzoraka bundeve i paradajza najizraženije smanjenje sadržaja je zapaženo u slučaju karbendazima. U kuvanim matriksima nisu nađeni degradacioni proizvodi.

Blasko et al. [72] opisuju metodu određivanja imidakloprida i još tri pesticida u uzorcima breskve i nektarine kombinacijom tačne hromatografije sa hemijsko-jonizacionim maseno-spektrometrijskim detektorom pri atmosferskom pritisku (LC/APCI/MS), koji prevazilazi većinu nedostataka drugih detektora. Naime, prilikom pripreme za analizu izbegava se dodatno prečišćavanje uzorka, jer prilikom upotrebe MS detektora prisustvo matriksa u uzorcima voća ne predstavlja smetnju. Razrađena metoda ima dinamički opseg od 0,02-2 mg/kg, RSD 14% i prinos 108%.

Hernández et al. [73] predlažu vrlo brzu, osetljivu, specifičnu i automatizovanu metodu za određivanje 35 pesticida (među njima i imidakloprida) u uzorcima zemljišta i površinskih voda. Njihova metoda je bazirana na upotrebi kolone za ekstrakciju na čvrstoj fazi (solid-phase extraction, SPE) spregnute on-line sa LC-ESI (electrospray ionization, ESI)/MS/MS tehnikom. Koristeći samo 1,3 cm³ profiltrirane vode za analizu, najveći deo pesticida se može odrediti i na nivou koncentracije od 25 ng/dm³ pri ukupnom vremenu analize od 18 min. Ova metoda zahvaljujući svojoj brzini, osetljivosti, automatizaciji i odsustvu kompleksnih tretiranja primarnih uzoraka se smatra veoma moćnom analitičkom metodom za određivanje pesticida u vodi.

Obana et al. [74] razvijaju brzu i jednostavnu metodu za simultano određivanje neonikotinoidnih insekticida. Dvanaest različitih uzoraka voća i povrća je ekstrahovano metanolom i prečišćeno uz pomoć ekstrakcionog filtera od grafitizovanog ugljenika ispunjenog sa 20% metanolskim rastvorom. Koncentrovani rastvor, nakon daljeg rastvaranja metanolom, je analiziran na ostatke pesticida pomoću LC/MS u APCI-pozitivnom modu. Relativne standardne devijacije su bile niže od 10% za sve ponovljene

testove. Predložena metoda je brza, lako izvodljiva i mogla bi biti uvrštena u metode redovnog monitoringa ostataka pesticida.

Ferrer et al. [75] opisuju LC/TOF/MS (liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry) metodu za identifikaciju i određivanje acetamiprida, imidakloprida i tiakloprida iz biljnih uzoraka. Primenjena metoda ima LOD od 0,002 do 0,01 mg/kg, a nađene koncentracije su bile u opsegu 0,02-0,17 mg/kg. RSD je iznosila 2-3% tokom jednog dana i 5% u toku većeg broja dana.

Martín et al. [76] primenjuju LC/MS/MS kombinovanu tehniku za određivanje sadržaja acetamiprida u atmosferi sataklenika i plastenika. Adsorpcija pesticida je vršena na Chromosorb-102 koloni vezanoj za personalni uzorkivač vazduha. Primjenjena metoda pokazuje tačnost od 72-92%, preciznost 2-13% i nisku LOD vrednost od nekoliko $\mu\text{g}/\text{dm}^3$.

Seccia et al. [77] razvijaju LC/ESI/MS metodu određivanja četiri neonikotinoidea (imidakloprida, tiametoksama, acetamiprida i tiakloprida) u smeši u uzorcima pijaće vode. Za prečišćavanje uzoraka koriste ekstrakciju na čvrstoj fazi sa LiChrolut EN kolonom. Primjenjena homatografska kolona je bila LichoCart125-4 Lichrosphere 100, a sastav mobilne faze voda-metanol, obe komponente zakišeljene 0,01% sirćetnom kiselinom. Primenjen je linearni gradijent eluiranja. Ovom metodom se neonikotinoide određuju do 30 ng/cm³ sa RSD < 20%.

Fidente et al. [78] primenjuju već navedenu metodu [77] za određivanje pomenuta četiri neonikotinoidea u uzorcima meda, pri čemu za prečišćavanje koriste Extrelut NT20 kolonu. Ovom metodom se neonikotinoide određuju do 0,1 mg/kg sa RSD < 10%.

Muccio et al. [79] primenjuju već navedenu metodu [77, 78] za određivanje pomenuta četiri neonikotinoidea u uzorcima povrća, pri čemu za prečišćavanje koriste takođe Extrelut NT20. Primarnu ekstrakciju neonikotinoidea vrše acetonom, a reekstrakciju dihlormetanom. Kao i u slučaju meda, ovom metodom se neonikotinoide određuju u opsegu od 0,1-0,5 mg/kg sa RSD < 10% i prinosom od 74,5% do 105%, na koncentracijskim nivoima od 0,1 i 1,0 mg/kg.

Ruíz de Erenchun et al. [80] razvijaju HPLC metodu, sa pulsnom reduktivnom amperometrijskom detekcijom za određivanje imidakloprida i njegovog glavnog

degradacionog proizvoda, 6-hloronikotinsku kiselinu, u zemljištu. Granica detekcije ove metode iznosi 4,56 ng/cm³, dinamički opseg 40-40.000 ng/cm³, dok je RSD 3,25%.

Rancan et al. [81] razrađuju hromatografsku metodu sa postkolonskim fotohemijским reaktorom i elektrohemijском detekcijom (LC/hv/EC) za određivanje imidakloprida i njegovih glavnih degradacionih proizvoda (olefinskih i hidroksilnih proizvoda) u "spajkovanim" uzorcima polena, cvetnih uzoraka i pčela. Reversno-fazna kolona C-18, fosfat pufer : CH₃CN (80 : 20, v/v) pri pH 2,9 su optimalni uslovi razdvajanja svih komponenata. Radni kanal reaktora je bio 254 nm, a radni kanal detektora 800 mV. Postignute LOQ vrednosti iznose 0,053-0,904 µg/g uz uspešno razdvajanje degradacionih produkata, što nije slučaj kod uporedne GC/MS tehnike.

Kao što se iz izloženog literaturnog pregleda može uočiti, danas postoje dva glavna pravca razvoja analitičkih tehnika za praćenje neonikotinoidea. U prvu grupu spadaju visoko-sofisticirani, složeni instrumenti sa veoma širokim mogućnostima. Drugi pravac predstavljaju jednostavne tehnike, koje su takođe selektivne, osetljive i pouzdane, ali su predviđene pre svega za testiranja i prve procene stanja. U okviru ove doktorske disertacije pažnja je sa jedne strane posvećena razradi NMR spektrometrijskih i veoma osetljivih hromatografskih (HPLC/DAD i HPLC/TLS) metoda, a sa druge strane razradi jednostavnijih spektrofotometrijskih i voltometrijskih metoda za određivanje neonikotinoidea. U okviru rada razrađena je metoda pripreme ekološki pogodne bizmut-film elektrode na staklastom ugljeniku i na planarnoj ugljeničnoj elektrodi. Efikasnost elektrode je upoređena sa elektrodom modifikovanom filmom od žive. Za ispitivanje površine radnih elektroda primenjena je i (SEM/EDS) metoda. Razrađene metode su testirane za određivanje neonikotinoidea iz komercijalnih formulacija, kao i iz uzoraka krompira, kukuruza, paprike, meda i površinske vode.

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. HEMIKALIJE, RASTVORI I ISPITIVANI UZORCI

Primenjeni standardi su: imidaklopid Pestanal (Riedel-de-Haën, Seelze, Nemačka), čistoće 99,9%, tiametoksam Pestanal (Syngenta, Basel, Švajcarska), čistoće 99,5%, acetamiprid (Dr Ehrenstorfer GmbH, Nemačka), čistoće 99,0%, tiaklopid (Dr Ehrenstorfer GmbH), čistoće 99,5% i 6-hloronikotinska kiselina (Fluka, Nemačka), čistoće > 95,0%. Primarni standardni rastvori imidakloprida, acetamiprida, tiametoksama i tiakloprida su pripremljeni rastvaranjem standarda u dvaputa destilovanoj vodi ili u osnovnom rastvoru pufera, tako da im koncentracija bude 0,50 mg/cm³, sa izuzetkom tiakloprida čija je koncentracija bila 0,15 mg/cm³. Standardni rastvori su čuvani na 4°C u mraku, ne duže od dve nedelje. Standardne serije rastvora pojedinačne komponente ili smeše su pripremane metodom razblaživanja u intervalu koncentracija: 0,000010-0,50 mg/cm³ imidakloprida, acetamiprida i tiametoksama i 0,000010-0,15 mg/cm³ tiakloprida, iz osnovnih rastvora i to neposredno pre početka merenja.

Britton-Robinson puferi su pripremljeni od 0,04 mol/dm³ osnovnog rastvora fosforne (Merck, Darmstadt, Nemačka), borne (Merck) i sirćetne (Merck) kiseline uz dodatak 0,2 mol/dm³ natrijum-hidroksida (Merck) do željene pH vredosti.

Osnovni rastvarači korišćeni u NMR spektrometriji su bili CDCl₃ (Merck), 99,8% i D₂O (Merck) 99,8%.

Hlorovodonična kiselina, kalijum-hlorid, kalijum-bromid, kalijum-nitrat, bizmut(III)-nitrat, bizmut(III)-hlorid i živa(II)-nitrat (Merck) su bili p.a. kvaliteta.

Organski rastvarači: hloroform, dihlormetan i acetonitril su bili J. T. Baker (Mailinckrodt Baker B. V., Holandija).

Aluminijum-oksidi (Kemika, Zagreb, Hrvatska).

Ispitivani uzorci krompira, paprike i kukuruza su gajeni na eksperimentalnim poljima pri kontrolisanim uslovima. Uzorci meda su prikupljeni sa različitih lokaliteta Republike Srbije. Rečna voda je bila uzorkovana iz reke Vipava, Slovenija.

3.2. PRIBORI I APARATURE

Spektrofotometrija. Spektrofotometrijska merenja su rađena na jednozračnom spektrofotometru ANTHELIE Data Spectrophotometer (SECOMAM, Francuska), sa konstantnom širinom razreza (2 nm) i računarskom kontrolom (Anthely 2,1, SECOMAM). Primenjene su kvarcne kivete (SECOMAM) debljine 1 cm.

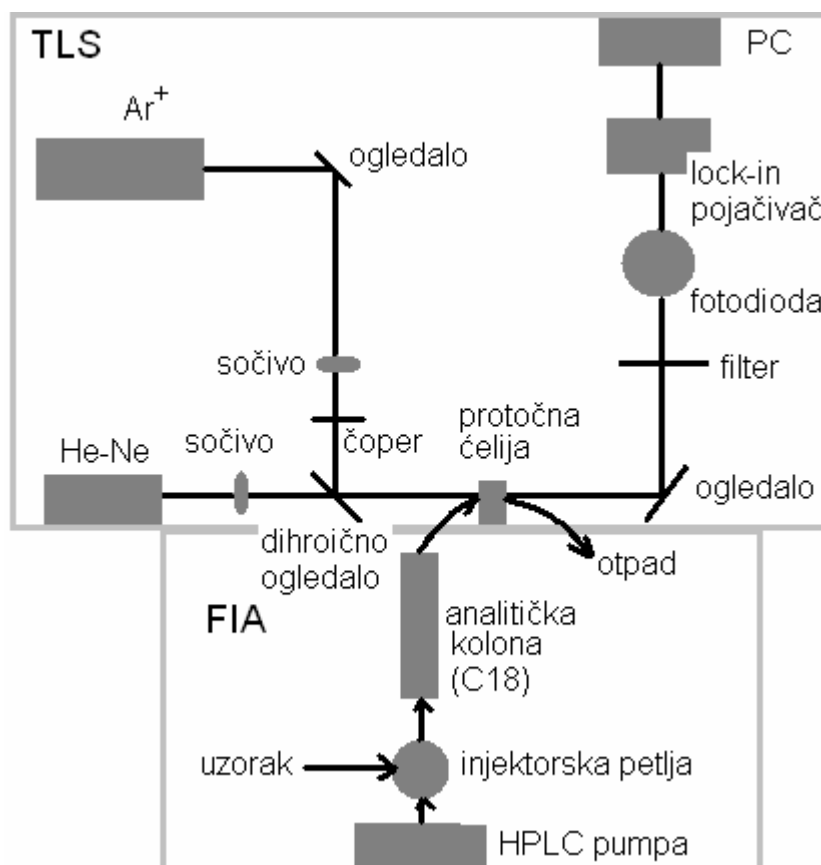
NMR spektrometrija. NMR spektrometrijska merenja su rađena na Bruker AC-250 instrumentu. Magnet ovog instrumenta je "Cryomagnet" (Spectrospin and Oxford Instruments) koji daje homogeno magnetno polje jačine 5,87 T (B_0). Računar ASPECT 3000 sa Furijevom transformacijom, kao integralni deo spektrometra upravlja radom svih delova spektrometra i obrađuje podatke. Kao softver je korišćen Brukerov paket, verzija DISNMR94.

Sva merenja su rađena u regularnim 5 mm NMR (Aldrich, USA) kivetama, a merna glava je bila QNP (Quadro Nucleus Probe).

Tečna hromatografija visoke efikasnosti. Hromatogrami su snimani na Agilent 1100 tečnom hromatografu (Agilent Technologis Inc., USA) primenom Zorbax Eclipse XDB-C18 (150 mm × 4,6mm, 3,5 μ m), Pinnacle ODS (250 mm × 4,6 mm, 5 μ m) i Agilent (250 mm × 4,6 mm, 5 μ m) kolona i detektora od niza dioda, DAD (Agilent Technologies Inc., USA), kao i detektora na bazi optotermičkih sočiva (*thermal lens spectroscopy*, TLS).

TLS merenja su rađena na dvozračnom optotermičkom spektrometru (pumpa/proba konfiguracija) (slika 5) [82]. Frekvencijski udvostručen Ar-jon laser (Coherent, Sabre MotoFred) radne talasne dužine od 244 nm je primenjen kao izvor ekscitacije (zrak "pumpanja"). Zrak "pumpanja" je moduliran sa mehaničkim čoperom promenljive brzine (Scientific Instruments, Model 300). He-Ne laser (Uniphase, Model 1103P) je primenjivan kao probni zrak. Posle fokusiranja zrak "pumpanja" sa sočivom žižne daljine 100 mm, kolinearna propagacija/širenje zraka "pumpanja" i zraka probe je dobijena pomoću razdelnika (splitera). Fluktuacija intenziteta probnog zraka je merena pomoću silikonske fotodiode (Laser Components, OSD 5-E) locirane na 2 metra od protočne

ćelije. Crveni filter i mikrokanal su smešteni ispred fotodiode. Izlaz sa fotodiode je vezan na sinhronizovani pojačivač (Stanford Research, Model SR510) koji je vezan za PC (personal computer), gde se HPLC/TLS hromatogrami beleže kao vremenski-zavisne promene intenziteta zraka probe. Injekciona protočna kvarcna kiveta je primenjena da se dobije stabilan sastav analita. Sva merenja su rađena u mraku.



Slika 5. Konfiguracija HPLC (ili FIA)/TLS sistema [82]

Voltometrija. Polarogrami su snimani primenom polarografa Metrohm Polarecord Model 626 i električnog kontrolera za regulaciju isticanje kapi žive 663 VA (Herisau, Švajcarska). U troelektrodnom sistemu, pored opisane živine radne elektrode, primenjene su i zasićena kalomelova elektroda (ZKE) kao referentna i šipka od staklastog ugljenika kao pomoćna elektroda.

Voltametrijska merenja su izvođena na voltametrijskom uređaju Amel System 5000-EasyScan v. 2,37, (Milano, Italija) i elektrohemijskom analizatoru BAS-100B/W (Bioanalytical Systems, USA). Primenjeni troelektrodni sistem se sastojao od radne elektrode od staklastog ugljenika (Tokai, HTT 3000°C ili CH Instruments, USA), referentne ZKE (Iskra, Kranj, Slovenija) ili Ag/AgCl/ 3 mol/dm³ KCl elektrode (CH Instruments, USA) i platinske pomoćne elektrode velike površine i visoke čistoće (99,99%).

Skenirajuća elektronska mikroskopija sa detektorom na bazi energetske disperzije (SEM/EDS). SEM rezultati su dobijeni primenom JSM-5500LV (JEOL, Japan) i JSM-6460LV (JEOL, Japan) instrumenata. EDS merenja su rađena pomoću INCAx-sight detektora i "INAx-stream" pulsnog procesora (Oxford Instrument, Engleska).

Merenje pH vrednosti. Za podešavanje i kontrolu pH vrednosti pufera i pripremljenih rastvora analita i uzoraka primenjen je analogni pH–metar tipa Iskra (Kranj, Slovenija) ili digitalni pH–metri Horiba F-16 (Japan) i Radiometer (Danska) u kombinaciji sa staklenom elektrodom (Metrohm, cat. No 6.0220.100, Švajcarska) ili kombinovanom staklenom elektrodom Jenway (Engleska).

3.3. POSTUPCI

Spektrofotometrija. Za ispitivanje uticaja pH –vrednosti sredine na spektrofotometrijske signale četiri neonikotinoidea i 6-hloronikotinske kiseline pripremljeni su rastvori iste koncentracije (oko 1 x 10⁻⁴ mol/dm³) različite pH vredosti u intervalu od 2,0 do 12,0. Apsorpcioni spektri su snimani u intervalu talasnih dužina 200-400 nm. Za slepu probu je proglašen onaj rastvor pufera kojim je podešen pH rastvora analita za merenje.

Optimizovana spektrofotometrijska merenja su rađena u kiveti debljine sloja od 1 cm, pri pH 7,0. Pri snimanju apsorbancija rastvora za kalibracione krive su primenjeni rastvori koncentracija na nivou od µg/cm³.

Radi razdvajanja analitičkih signala pri određivanju neonikotinoidea i 6-hloronikotinske kiseline ili dva neonikotinoidea u smeši ispitana je mogućnost primene

derivativne spektrofotometrije sa mogućnošću matematičkog filtriranja šumova (metoda pokretnih prozora i polinomijalno glačanje primenom softverskog paketa Origin 7,0).

NMR spektrometrija. Pre početka ispitivanja stabilnosti i dinamike hidrolize insekticida neonikotinoida primenjeno stakleno posuđe je podvrgnuto sterilizaciji. Svi vodeni rastvori su bili pripremani u dvaput destilovanoj vodi.

Vodeni rastvori imidakloprida, tiametoksama, acetamiprida i tiakloprida su pripremani rastvaranjem odgovarajućeg insekticida u smeši Britton-Robinson pufera odabrane pH vrednosti (4,0; 7,0 i 9,0) i D₂O (1 : 1, v/v), tako da se dobiju zasićeni rastvori odabranih jedinjenja na sobnoj temperaturi (23°C). Pripremljeni rastvori insekticida su čuvani u hermetički zatvorenim 5-mm NMR cevčicama na 23°C. Radi postizanja uslova što sličnijih prirodnim, uzorci su čuvani u uslovima prirodne insolacije tokom četiri meseca. Praćenje stanja jedinjenja prve dve nedelje je vršeno svakog trećeg, a kasnije svakog sedmog dana, bez otvaranja NMR cevčica.

Eksperimenti ispitivanja stabilnosti na 23°C su ponovljeni i sa razblaženim rastvorima insekticida (koncentracije 0,01 mg/cm³), pri čemu je za svaki ispitivani vremenski interval uzet alikvot uzorka od 10,00 cm³, tri puta ekstrahovan pomoću 5 cm³ CHCl₃ i uparen do suva na sobnoj temperaturi. Suvi ostatak je rekonstituisan u 0,5 cm³ CDCl₃ i meren prethodno optimizovanom NMR spektrometrijskom metodom. Hemijska pomeranja (u ppm) su data u odnosu na interni standard TMS.

Za snimanje pufer/D₂O sredine primenjena je tehnika potiskivanja/zasićenja signala vode (water suppress technique), dok su za CDCl₃ sisteme snimljeni uobičajeni ¹H NMR spektri. Optimalni merni parametri za snimanje ¹H NMR spektara su bili: temperatura uzoraka 23 °C, relaksaciono vreme 0,5 s, broj tačaka 32 K, vremenski domen 32 K, broj preliminarnih skenova 2, dužina pulsa 2,0 μs, vreme akvizicije 3,28 s, širina spektralnog prozora 5000 Hz (što je rezultiralo digitalnom rezolucijom (HZ/PT) od 0,318 Hz/broj tačaka), faktor LB = 0,2. Brojevi skenova, tj. ponavljanja su bili: 32, 64, 128 i 256 za tiametoksam, acetamiprid, imidakloprid i tiakloprid, redom.

Ispitivana je i stabilnost ovih jedinjenja u već pomenutim pufer/D₂O sistemima u zavisnosti od pH i temperature u širokom intervalu (20; 30; 40; 50; 60 i 70°C). Perzistentnost i dinamika hidrolize su praćeni na osnovu smanjenja intenziteta karakterističnih signala protonskih spektara polaznih jedinjenja. Naime, stepen hidrolize je računat na osnovu upoređivanja površine signala osnovnog jedinjenja i/ili nastalih

signala u procesu hidrolize sa signalom prisutne sirćetne kiseline/acetata iz Britton-Robinson pufera.

Smeše odgovarajućih Britton-Robinson pufera (4,0; 7,0 i 9,0) i D₂O (1 : 1, v/v) su služile kao slepe probe.

HPLC. *HPLC/DAD* metoda određivanja sadržaja jedne komponente je slična metodi proizvođača (Certificate of Analysis, Riedel-de Haën). Kolona je reversno-fazna C-18, a mobilna faza je 6 : 4, v/v voda (sa sadržajem 0,2 % fosforne kiseline) : acetonitril. Ostali parametri su bili: brzina protoka 0,5 cm³/min ili 1,0 cm³/min u zavisnosti od tipa kolone, temperatura kolone 28°C, a zapremina petlje 5,00; 10,0 i 20,0 µL. Linearost odziva detektora je testirana u oblasti 100-25000 ng/cm³ ispitivanih neonikotinoida. Ponovljivost merenja je ispitana na koncentracijskom nivou od 500 ng/cm³ svih primenjenih standarda, na bazi šest merenja, pri čemu relativna standardna devijacija retencionog vremena nije prelazila 0,9% a površina pika 2,0 %.

Izokratsko razdvajanje neonikotinoida je rađeno na Pinnacle ODS (250 mm × 4,6 mm, 5 µm) koloni (Restek Corporation, Cally 911457) i Agilent (250 mm × 4,6 mm, 5 µm) koloni. Mobilna faza je bila 7:3 (v/v) voda (0,2% fosforna kiselina):acetonitril, brzina protoka 1,0 cm³/min, temperatura kolone 28 °C, a zapremina petlje 20,0 µL. Uzorci su injektovani pomoću auto-samplera (Agilent 1100). Tiametoksam, imidaklopid, acetamiprid i tiaklopid su određivani na 254, 270, 245 i 242 nm.

Eksperimenti ispitivanja stabilnosti sva četiri neonikotinoida (koncentracije 0,01 mg/cm³) pri različitim pH vrednostima (4,0; 7,0 i 9,0) na 23°C tokom četiri meseca su opisana u okviru NMR spektrometrijskih merenja. Obe tehnike su rađene paralelno, s tim da su alikvoti uzorka posle filtriranja membranskim filterima 0,45-µm, direktno mereni. Praćenje toka hidrolize je vršeno i u baznoj sredini pri pH 9,0 i 12,0 na 60°C u toku 5 h.

Pri *HPLC/TLS* merenjima pojedinačni primarni osnovni rastvori (200,0 µg/cm³) svakog neonikotinoida su pripremani u mobilnoj fazi. Jednokomponentni standardni rastvori (20,0 µg/cm³) su pripremani razblaživanjem svakog primarnog standardnog rastvora mobilnom fazom. Višekomponentni rastvori (2,5-2500 µg/dm³) su pripremani dnevno, mešanjem alikvota jednokomponentnih rastvora neonikotinoida i razblaživani mobilnom fazom.

Izokratsko razdvajanje neonikotinoida je rađeno na Pinnacle ODS koloni. Mobilna faza je bila 7:3 (v/v) voda (0,2% fosforna kiselina) : acetonitril, brzina protoka 1,0

cm³/min, temperatura kolone 28°C, a zapremina petlje 20,0 µL uz ručno unošenje uzoraka. Optimalni uslovi rada TLS detektora su bili: frekvencija čopera 80 Hz i "lock-in" vremenska konstanta 1s, uz snagu UV lasera od 100 W.

Voltometrija. *Živina radna elektroda* za direktnu polarografiju (direct current polarography, DCP) je bila kapljuća živina elektroda (KŽE), za diferencijalnu pulsnu polarografiju (DPP) kapljuća živina elektroda stalne površine (static mercury drop electrode, SMDE) i za voltametrijska merenja sa linearnom promenom potencijala (LSV) viseća kap žive (hanging mercury drop electrode, HMDE).

Elektroda od staklastog ugljenika (GCE) radi obnavljanja površine je pre svakog merenja ili pre svakog nanošenja filma polirana vodenom suspenzijom aluminijum-oksida različitog granulometrijskog sastava i na kraju primenom suspenzije čestica prečnika 0,3 µm. Nakon poliranja elektroda je detaljno prana pod mlazom dvaputa destilovane vode, a zatim tretirana radi uklanjanja eventualno zaostalih čestica aluminijum-oksida u ultrazvučnom kupatilu u toku četiri do pet minuta. Elektroda je na kraju sušena hartijom za ceđenje. Radi postizanja kvalitetnijih signala, pored poliranja, primenjena je i *ex situ* elektrohemijska aktivacija. Naime, neposredno pre merenja ili nanošenja filma GCE je podvrgavana *ex situ* cikliranju potencijala (10 ciklusa) u intervalu od 0,20 do -1,60 V/ZKE, u posebnoj elektrohemijskoj ćeliji sa osnovnim elektrolitom odgovarajuće pH vrednosti ili sa rastvorom za elektrodepoziciju.

Film od žive (MFE) na staklastom ugljeniku je dobijen elektrodepozicijom žive iz rastvora Hg(NO₃)₂ koncentracije 25 mg/dm³ pri pH 3,0 (podešenom pomoću azotne kiseline). Pre depozicije filma GCE je "aktivirana" cikliranjem potencijala (10 ciklusa) u rastvoru za elektrodepoziciju u intervalu potencijala od +0,20 V do -1,90 V. Elektrodepozicija je vršena pri konstantnom potencijalu od -1,00 V u trajanju od 90 s i praćena snimanjem hronoamperometrijskih krivih. Površina GCE je obnavljana primenom potencijala od +0,40 V i glačanjem.

Bizmut-film elektroda (BiFE) je ispitivanjem dva različita rastvora za elektrodepoziciju je dobijanja BiFE što bolje karakteristike. Prvi rastvor primenjen za *ex situ* depoziciju, sastoji se od acetatnog pufera (pH 4,5) i 5 mg/dm³ Bi(III)-jona. Potencijal elektrodepozicije je bio -1,00 V, a depozicija vršena uz mešanje rastvora u trajanju od 60 s. Drugi postupak je takođe izvođen *ex situ* uz primenu rastvora za elektrodepoziciju koji se sastoji od 0,02 mol/dm³ Bi(NO₃)₃, 1 mol/dm³ HCl i 0,5 mol/dm³ KBr. Optimalni

potencijal elektrolize je bio -0,25 V, vreme elektrolize 60 s u mirnom rastvoru. Posle nanošenja filma BiFE se obavezno prana pomoću 1 mol/dm³ HCl rastvora. Pre početka elektrodepozicije GCE se obavezno aktivira cikliranjem potencijala u opsegu potencijala od 0,00 V do -0,60 V u oba slučaja. Površina GCE je obnavljana primenom potencijala od +0,20 V i glačanjem.

Planarna bizmut-film elektroda (PBiFE) na osnovni ugljenične elektrode je prana i aktivirana elektrohemijским cikliranjem bez glačanja površine. Priprema filma od bizmuta je bila slična gore opisanom postupku.

Tetradekan-film elektroda (C-14FE) je dobijena nanošenjem dve kapi *n*-alkana u rastvoru heksana na površinu suve, prethodno glačane i etanolom prane GCE. Film je sušen uz ravnomerno okretanje elektrode.

Polarografska merenja su vršena snimanjem pri brzini polarizacije (v) od 5 mV/s u slučajevima DCP i DPP i u intervalu 5-50 mV/s u slučaju LSV tehnika. Optimalna amplituda pulsa (ΔE) za DPP je bila 50 mV.

Za polarografska merenja neonikotinoide i 6-hloronikotinske kiseline primenjena je elektrohemijška ćelija zapremine 100 cm³. Za polarografsku karakterizaciju pripremljeni su rastvori koncentracije oko 10⁻³ mol/dm³, a za njihovo određivanje 31,1-470 ng/cm³. I u jednom i u drugom slučaju u odmerni sud je dodato i 10 cm³ osnovnog elektrolita u vidu Britton-Robinson pufera (za karakterizaciju pH 2,0-9,0, a za određivanje pH 8,0). Kroz rastvor u elektrohemijškoj ćeliji je provoden azot u toku 5 min, radi eliminisanja kiseonika, a zatim snimane DC i DPP krive u inertoj atmosferi.

Ostala voltametrijska merenja uz primenu radnih elektroda na bazi ugljenika ili modifikovanih radnih elektroda su rađena u elektrohemijškoj ćeliji od 5 cm³ u sredini osnovnog elektrolita.

GCE. Posle *ex situ* tretmana i snimanja voltamograma slepe probe vršeno je snimanje voltamograma analita u opsegu koncentracija 0,028-0,50 mg/cm³. Kao osnova merenja uzimana je površina redukcionog pika dobijenog tokom prvog ciklusa, koja je proporcionalna koncentraciji ispitivane supstance. Površine su računane kao razlike površine uzorka i slepe probe. Svi voltamogrami su snimljeni na sobnoj temperaturi u mirujućem rastvoru u inertoj atmosferi azota, što je postignuto 10-minutnim prođuvavanjem azota kroz rastvor.

U slučaju filmom modifikovanih elektroda tiametoksam u model sistemima i realnim uzorcima je određivan u zapremini od 10,0 ili 1,00 cm³ i Britton-Robinson pufera. Rastvori su tretirani sa azotom (Linde, 99,999%) 6 min. Posle snimanja bazne linije,

dodat je alikvot standardnog rastvora tiametoksama i izvršeno merenje. Svi podaci su dobijeni na sobnoj temperaturi.

Skenirajuća elektronska mikroskopija. Površine GCE, planarne ugljenične elektrode, BiFE i PBiFE su proučavane primenom napona od 20 kV. Pre SEM ispitivanja, BiFE dobijena na -0,25 V je tertirana 1 mol/dm³ HCl, kondicionirana elektrohemijским cikliranjem u rastvoru Britton-Robinson pufera (pH 8,0), sušena i posmatrana. Zbog mehaničke nestabilnosti, BiFE dobijena na -1,00 V je osušena i posmatrana bez pranja. EDS merenja su rađena na reprezentativnom površinskom segmentu.

Priprema uzoraka. *Priprema uzoraka pesticida različitih formulacija za analizu.* Za polarografska merenja, zapremina od 1,0 cm³ komercijalne formulacije Cruiser OSR 322 FS ili Cruiser 350 FS je razblažena 1 : 100.000 dvaputa destilovanom vodom. Odgovarajuća količina, prethodno dobro usitnjenog uzorka Actara 25-WG je rastvorena u vodi u odmernom sudu od 200 cm³. Zapremina od 1,00 cm³ rastvora je prenešena u odmerni sud od 50,0 cm³, dodato 10,0 cm³ Britton-Robinson pufera (pH 8,0) i dopunjeno do crte. U slučaju Actara 25-WG, finalna koncentracija tiametoksama za određivanje je bila 117 ng/cm³. Analogna spektrofotometrijska i HPLC/DAD merenja su rađena samo sa 10-struko koncentrovanijim rastvorima. Metoda standardnog dodatka je primenjena radi eliminisanja efekata matriksa. Za HPLC merenja uzorci su filtrirani primenom 0,45- μ m membranskog filtera (Milipore, Bedford, MA, USA).

Priprema realnih uzoraka za analizu. Uzorci krompira i paprike su dobijeni sa eksperimentalnih polja sa netretiranim i tretiranim režimom gajenja. U slučaju voltametrijskih eksperimenata i komparativnih HPLC/DAD merenja uzorci krompira (2 kg) su bili sledeći: uzorak-1, (neprskan krompir), uzorak-2 (krompir prskan nekoliko puta sa Actara 25-WG) i uzorak-3 (uzorak-1 "spajkovani" rastvorom Actara 25-WG). Krompir je opran destilovanom vodom i osušen na sobnoj temperaturi. U svim slučajevima je reprezentativna količina uzorka od 200 g usitnjena i homogenizovana u konvencionalnom blenderu ili centrifugi u trajanju od 2 min. Za utvrđivanje prinosa 50 g homogenat krompira (uzorak-1) je "spajkovani" alikvotom tako da sadržaj tiametoksama bude 0,05 i 0,5 mg po kg krompira (uzorak-3). Svi uzorci su mirovali 1 h, zatim je dodato 50 cm³ CH₂Cl₂ i oko 2 g natrijum-hlorida. Uzorci su pažljivo mučkani ručno u trajanju od 1 h,

zatim filtrirani i tečne faze (vodena i organska) su spojene. Čvrsta faza je još dva puta ekstrahovana pomoću 10 cm³ CH₂Cl₂ i svi ekstrakti su spojeni. Dobijena tečna faza je zatim tretirana u levku za razdvajanje. Tečno-tečna ekstrakcija je ponovljena tri puta sa po 20 cm³ CH₂Cl₂. Prikupljena organska faza je uparena na vakuum uparivaču na 25°C skoro do suva. Poslednja faza sušenja je rađena primenom azota. Rekonstituisanje uzoraka je vršeno u 1,00 cm³ rastvora Britton-Robinson pufera pH 8,0 uz ultrasonifikaciju. Za komparativna HPLC/DAD merenja, količina homogenizovanih uzoraka je iznosila 10 g, a rekonstituisani uzorci su filtrirani primenom membranskih filtera od 0,45-µm (Milipore, Bedford, MA, USA).

Uzorci kukuruza su tretirani pesticidom Cruiser OSR 322 FS, sredstvom za močenje na bazi tiametoksama. Metoda ekstrakcije i rekonstituisanje uzoraka je bila ista kao gore.

Za HPLC/TLS merenja i komparativnu HPLC/DAD metodu masa homogenizovanih uzoraka je bila 10 g. Uzorci paprike i krompira su bili: uzorak-1 (neprskan, S-1) i uzorak-2 ("spajkovan" različitim alikvotima rastvora standarde smeše četiri neonikotinoide, S-2). Prinos je određen na osnovu dva nivoa finalnih koncentracija od 0,025 i 0,10 mg neonikotinoide po kg krompira ili paprike. Ekstrakcija uzoraka je bila identična sa gore opisanom, s tim da je rekonstituisanje uzoraka vršeno u mobilnoj fazi.

Alikvot rečne vode (Vipava, Slovenija) je "spajkovan" različitim alikvotima rastvora standardne smeše četiri neonikotinoide. Neonikotinoide iz vode nisu ekstrahovani, već su posle filtriranja uzoraka membranskim filterima (0,45-µm), direktno određivani.

Validnost analitičkih metoda. Linearnost odziva voltametrijskih, spektrofotometrijskih i hromatografskih metoda je ispitivana merenjem u rastvorima uzoraka pet različitih koncentracija. Granica detekcije i granica određivanja su na osnovu eksperimentalnih podataka određene računskim putem [45-47]. Reproductivnost merenja u slučaju svih ispitivanih jedinjenja je određena na tri nivoa koncentracije, na osnovu serija signala od šest merenja po svakoj određenoj koncentraciji i dobijenoj RSD. U slučaju novih metoda uvek je izvršeno i upoređivanje sa opšte-prihvaćenom standardnom HPLC/DAD metodom određivanja neonikotinoide.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Spektrofotometrijska ispitivanja i određivanja neonikotinoida

4.1.1. Spektrofotometrijska karakterizacija odabranih neonikotinoida i 6-hloronikotinske kiseline

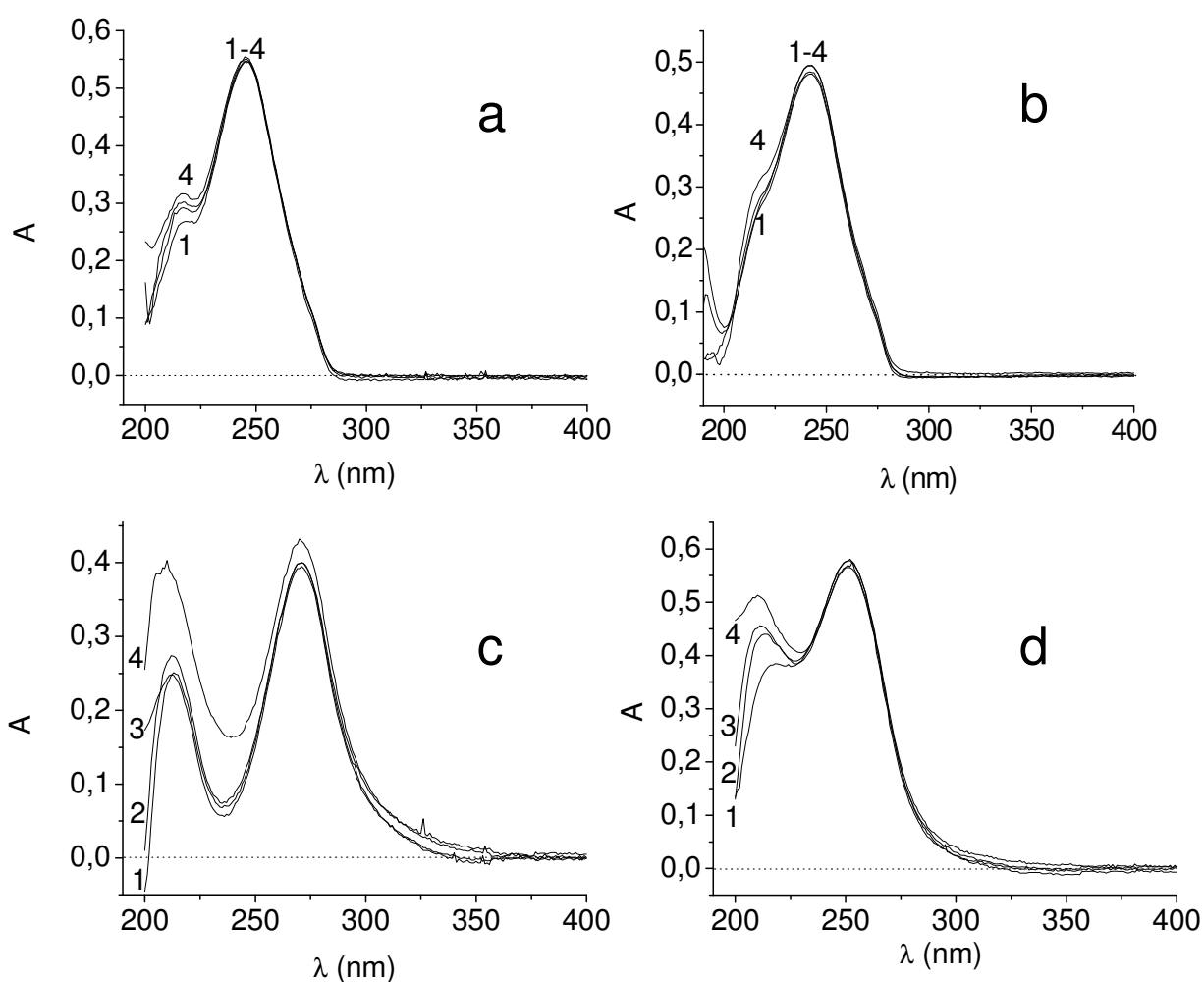
U elektronskoj spektroskopiji spektralne trake proučavanih neonikotinoida se javljaju usled apsorpcije molekula u UV oblasti, uglavnom zahvaljujući $n-\pi^*$ i $\pi-\pi^*$ elektronskim prelazima određenih strukturnih fragmenata. Naime, iz literature je opšte poznato [83-87] da je za piridinski prsten (prisutan u strukturi imidakloprida, tiakloprida i acetamiprida i 6-hloronikotinske kiseline) svojstven $\pi-\pi^*$ elektronski prelaz, što se manifestuje u vidu šire apsorpcione trake na oko 260 nm. Nitroguanidinska grupa tiametoksama i imidakloprida, cijanoiminska funkcionalna grupa acetamiprida i tiakloprida, kao i karboksilna grupa 6-hloronikotinske kiseline, mogu da imaju $n-\pi^*$ (oko 218 nm) i $\pi-\pi^*$ elektronske prelaze [83-87], a heteroatomi N, O, Cl prisutni u osnovnom ugljeničnom skeletu ili na mestu supstituenta usled $n-\pi^*$ prelaza takođe mogu imati apsorpcionu traku [83-87].

Radi poznavanja optičkih osobina i optimizacije postupaka određivanja ispitivanih jedinjenja, neophodna je bila prethodna spektrofotometrijska karakterizacija u širokom opsegu pH vrednosti, kao i ispitivanje stabilnosti analita.

Na osnovu snimljenih spektara rastvora acetamiprida iste koncentracije pri različitim pH vrednostima (slika 6a) može se zaključiti da jedinjenje ima dva spojena maksimuma u UV oblasti u intervalu pH vrednosti Britton-Robinson pufera 2,0–12,0. Apsorpcioni maksimumi acetamiprida pri pH 7,0 se nalaze na 218 i 245 nm, pri čemu je drugi intenzivniji. Nije zapaženo značajnije pomeranje apsorpcionih traka u spektru u zavisnosti od pH vrednosti sredine. Intenzitet apsorpcije u veoma maloj meri zavisi od pH vrednosti u kiselj i neutralnoj sredinji, a samo malo više u oblasti $\text{pH} > 8,0$ [88].

Tiakloprid (slika 6b) ima veoma sličan UV spektar kao acetamiprid, što se može pripisati sličnosti njihovih optički aktivnih fragmenata. Apsorpcioni maksimumi se nalaze na 217 i 242 nm, oba maksimuma su spojena u jednu široku traku pri čemu drugi maksimum je znatno izraženiji.

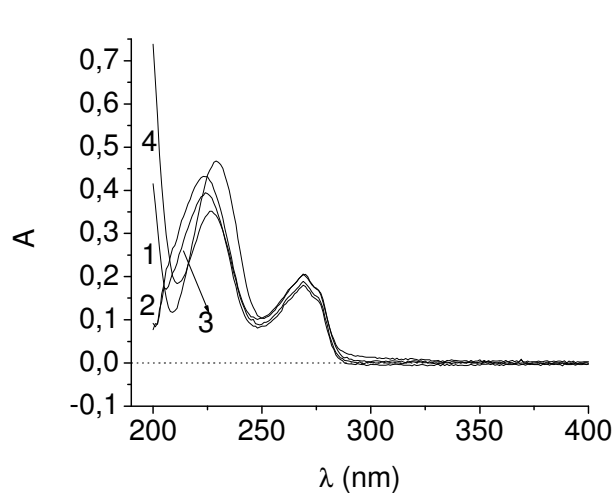
U spektru imidakloprida (slika 6c) prisutne su dve diskretne apsorpcione trake sa maksimumima na 212 i 270 nm, od kojih je drugi intenzivniji. Spektar tiametoksama, takođe, ima dva maksimuma, na 212 i 254 nm (slika 6d): prvi maksimum pokazuje blagi hipsokromni efekat (pomeranje apsorpcione trake prema manjim talasnim dužinama), a drugi maksimum je intenzivniji [88, 89].



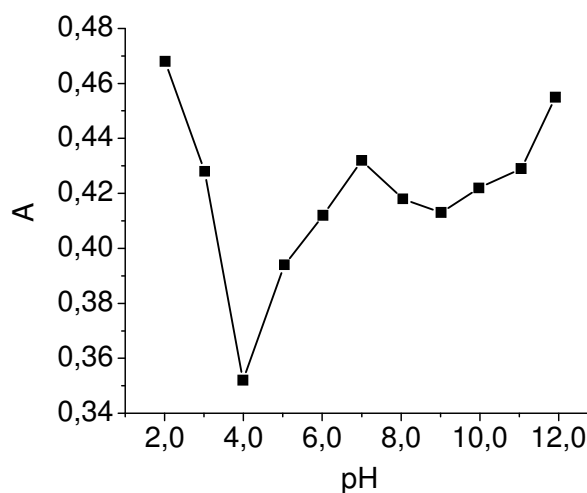
Slika 6. Apsorpcioni spektri acetamiprida (a), tiakloprida (b), imidakloprida (c) i tiametoksama (d) pri pH vrednostima sredine: 1) 2,0; 2) 4,0; 3) 7,0; 4) 9,0. Koncentracija neonikotinoida oko 1×10^{-4} mol/dm³

Spektar 6-hloronikotinske kiseline (slika 7) ima dve diskretne, dobro definisane trake sa apsorpcionim maksimumima na 224 i 269 nm (kriva 2), pri čemu je prva traka znatno

intenzivnija. Nađeno je da oblik spektra i intenzitet maksimuma apsorpcije značajno zavise od pH vrednosti sredine (slika 8), naročito pri $\text{pH} < 4,0$. Prva od apsorpcionih traka u spektru pokazuje hipsohromni efekat, što se vidi na slici 7.

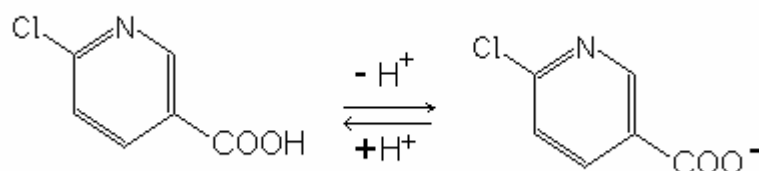


Slika 7. Absorpcioni spektri 6-hloronikotinske kiseline pri različitim pH vrednostima: 1) 2,0; 2) 7,0; 3) 5,0; 4) 4,0; $c = 5,73 \mu\text{g}/\text{cm}^3$



Slika 8. Zavisnost intenziteta maksimuma apsorpcije 6-hloronikotinske kiseline od pH sredine; $\lambda = 224 \text{ nm}$; $c = 5,73 \mu\text{g}/\text{cm}^3$

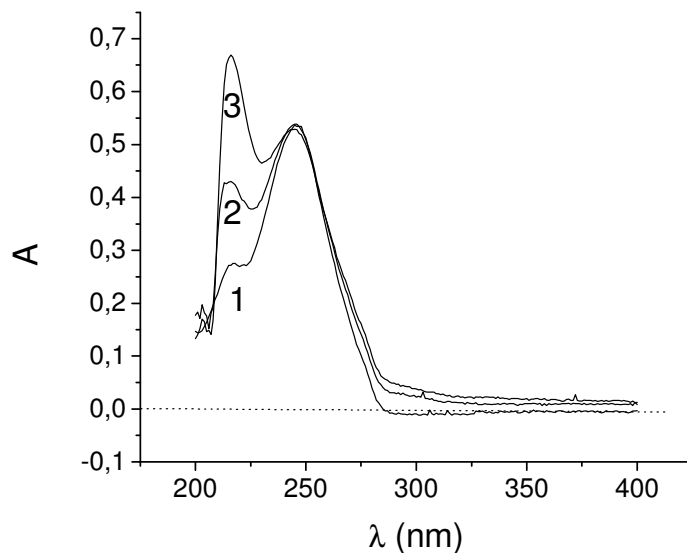
U ispitivanom sistemu postoji kiselinsko-bazna ravnoteža prema shemi 11.



Shema 11. Kiselinsko-bazna ravnoteža molekula 6-hloronikotinske kiseline

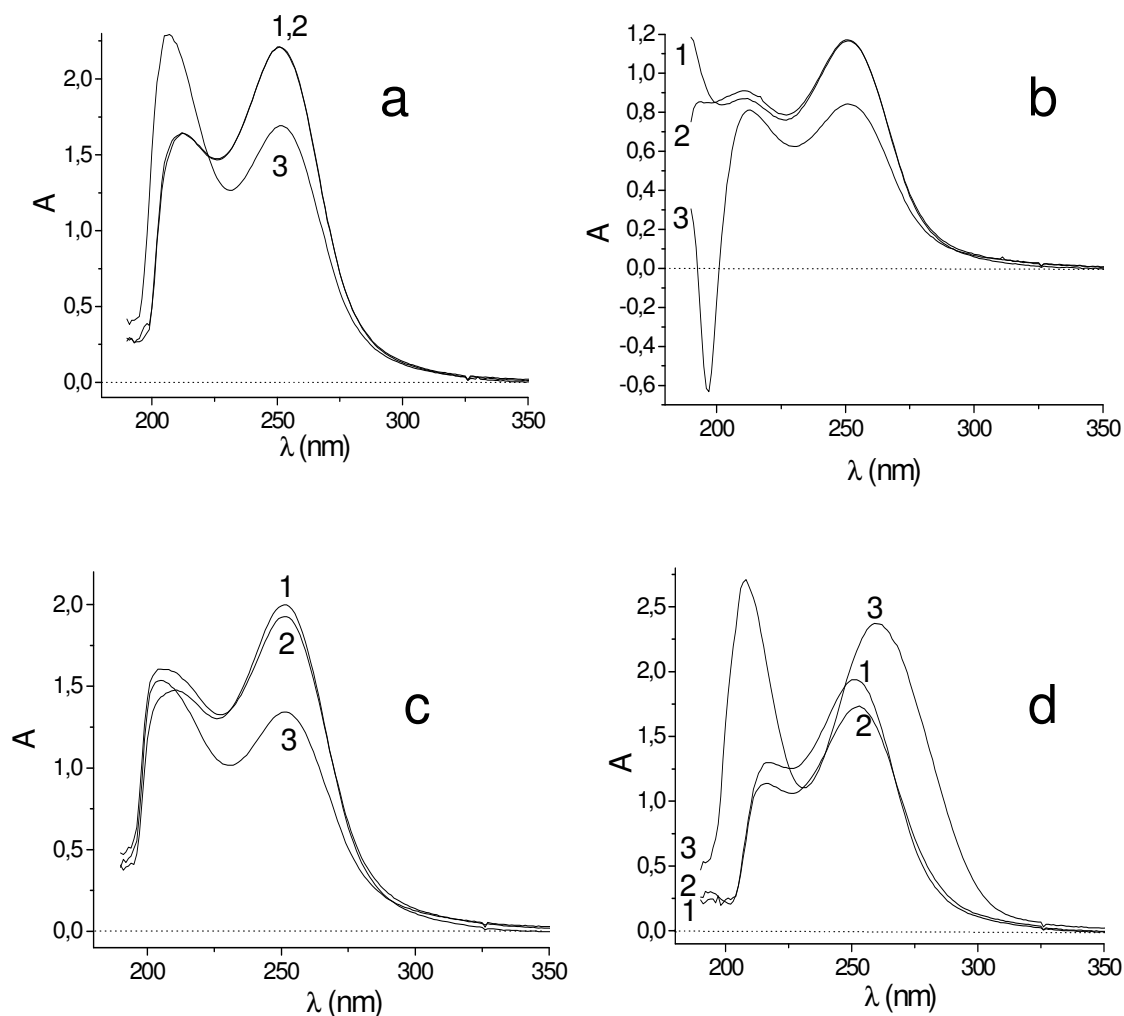
Ispitivanje stabilnosti neonicotinoida doprinelo je optimizaciji postupka njihovih određivanja. Iako pri $\text{pH} > 9,0$ acetamiprid ima najveće vrednosti apsorpcije, što je preduslov za postizanje veoma niske vrednosti detekcije, nakon detaljnijeg ispitivanja analita u oblasti pH 10-12 može se zapaziti da dolazi do postepene promene oblika prvobitno dobijenog signala, kao što je to evidentno sa slike 9. Naime, upoređujući krivu 1, koja predstavlja početno stanje, sa krivima 2 i 3 snimljenim nakon pola sata (2) i sat vremena (3) stajanja, može se zaključiti da je došlo do postepene promene oblika i

intenziteta signala, što je najizraženije kod prvog apsorpcionog maksimuma. Ova promena spektra je verovatno posledica postepene alkalne hidrolize ispitivanog jedinjenja.



Slika 9. Spektar acetamiprida pri pH 11,0 snimljen u različitim vremenskim intervalima: 1) 0 s; 2) 30 min i 3) 60 min

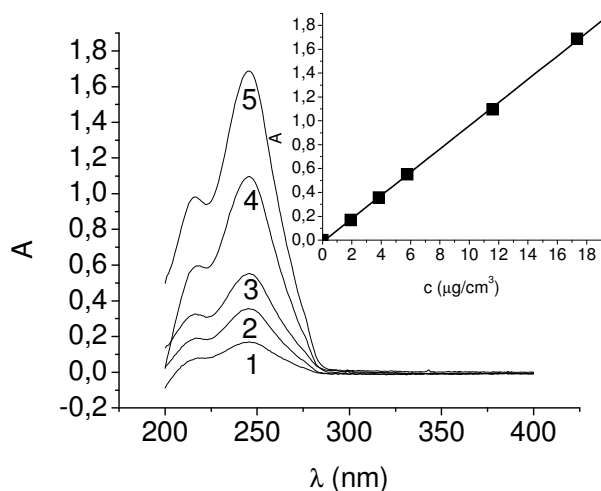
Praćenje stabilnosti neonikotinoida tokom dužeg perioda stajanja (u našem slučaju šest meseci) u rastvorima Britton-Robinson pufera različite pH vrednosti (2,0, 5,0, 7,0 i 9,0) je izvedeno spektrofotometrijski, što je prikazano na primeru tiametoksama, čiji je spektar prikazan na slici 10. Kao što to pokazuju krive 1 i 2, tokom prvih nedelju dana stajanja u kiseljoj (a, b) i neutralnoj (c) sredini, na spektrima tiametoksama nema značajnijih promena, dok u baznoj sredini (d) to nije slučaj. Najizraženija promena u spektru se javlja pri pH 9,0, gde dolazi do smanjenja intenziteta spektralnih traka nakon nedelju dana, kao i do pomeranja apsorpcionih maksimuma. Nakon 6 meseci stajanja svi spektri su izmenjeni, što potvrđuje promenu osnovnog jedinjenja u svim ispitivanim rastvorima. Imidakloprid, jedinjenje sa identičnom nitroguanidinskom funkcionalnom grupom kao i tiametoksam, pokazuje veoma slično ponašanje, s tim da se promene pri pH 9,0 javljaju kasnije u odnosu na tiametoksam. Na osnovu izloženog, vidljivo je da spektrofotometrija može da bude primenjena kao jedna brza, jednostavna, ekonomična i ekološki pogodna tehnika za dobijanje primarne informacije o stanju ovih jedinjenja u rastvorima.



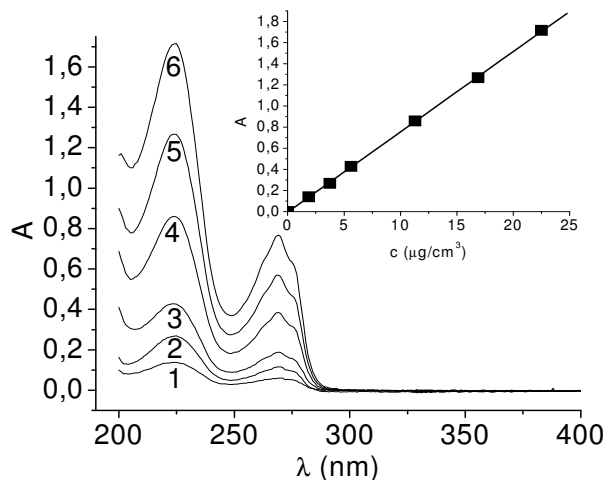
Slika 10. Spektri tiامتoksama snimljeni pri pH vrednostima a) 2,0; b) 5,0; c) 7,0 i d) 9,0 u različitim vremenskim intervalima: 1) 0 minuta; 2) 7 dana i 3) šest meseci

4.1.2. Spektrofotometrijsko određivanje neonikotinoida

Pojedinačna određivanja. Pri postupku izbora pH-vrednosti, zbog dovoljno intenzivnih signala i stabilnosti ispitivanih jedinjenja, za sva merenja je odabrana pH vrednost 7,0. Treba, međutim, naglasiti da su spektrofotometrijska određivanja moguća i u kiseljoj sredini. Za određivanje acetamiprida, tiakloprida, imidakloprida, tiامتoksama i 6-hloronikotinske kiseline odabrane su radne talasne dužine od 245, 242, 270, 254 i 224 nm, redom. Radi ispitivanja veličine linearnog opsega merenja predstavljene su apsorbancije ispitivanih jedinjenja u zavisnosti od njihove koncentracije, kako je to prikazano na primerima acetamiprida (slika 11) i 6-hloronikotinske kiseline (slika 12) [88, 89].



Slika 11. Absorpcioni spektar acetamiprida u zavisnosti od koncentracije pri pH 7,0 i odgovarajuća kalibraciona prava. Opseg koncentracija: 1 - 18,4 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$



Slika 12. Absorpcioni spektar 6-hloronikotinske kiseline u zavisnosti od koncentracije pri pH 7,0 i odgovarajuća kalibraciona prava. Opseg koncentracija 1,88 - 16,9 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$

Dobijeni analitički parametri metode su predstavljeni u tablici 7.

Tablica 7. Analitički parametri spektrofotometrijskog određivanja acetamiprida, tiakloprida, imidakloprida, tiametoksama i 6-hloronikotinske kiseline

Parametar	Ispitivano jedinjenje				
	Acetamiprid	Tiaklopid	Imidaklopid	Tiametoksam	6-hloronikotinska kiselina
Radna talasna dužina [nm]	245	242	270	254	224
Interval koncentracija [$\mu\text{g}/\text{cm}^3$]	0,10-22,9	0,10-21,9	0,12-30,0	0,26-30,0	0,30-22,5
Odsečak [rel. jed.]	-0,014	-0,021	0,033	0,013	-0,006
Koeficijent pravca [rel. jed./ $\mu\text{g}/\text{cm}^3$]	0,0973	0,0883	0,1100	0,0531	0,0761
Koeficijent korelacije	0,999	0,999	0,999	0,999	0,999
LOD [$\mu\text{g}/\text{cm}^3$]	0,04	0,04	0,04	0,08	0,10
LOQ [$\mu\text{g}/\text{cm}^3$]	0,12	0,12	0,12	0,26	0,30
Preciznost [RSD%] ^a	0,23	0,41	0,56	0,80	0,36

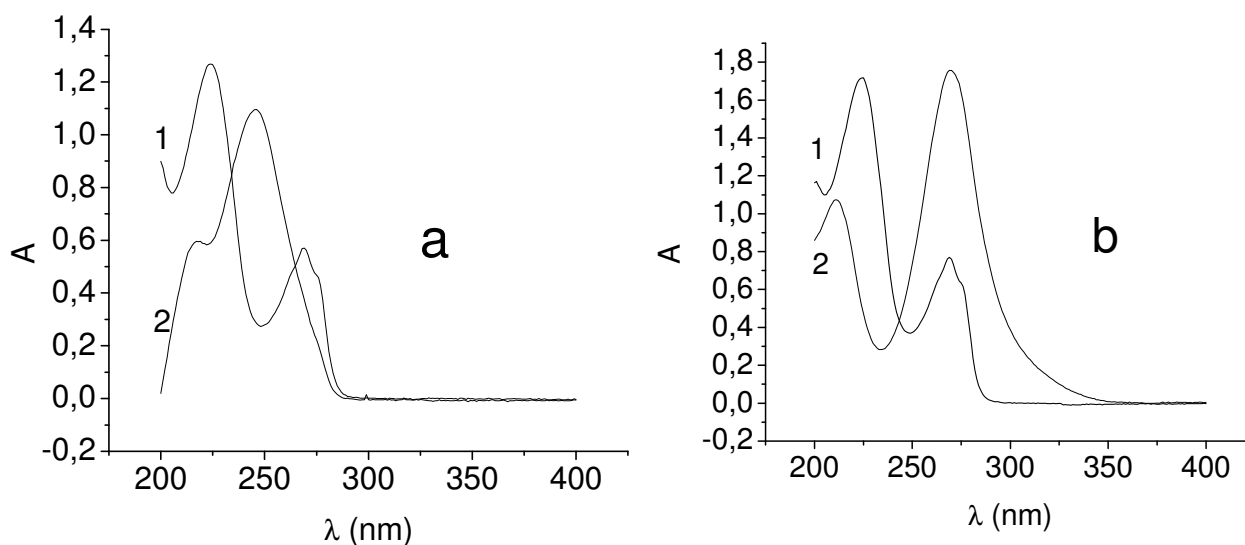
^a Broj merenja (n = 6)

Na osnovu podataka iz tablice 7 se može zaključiti da se spektrofotometrijsko određivanje četiri neonicotinoida i 6-hloronikotinske kiseline može izvršiti u oblasti tragova i da je u svim slučajevima postignuta slična osetljivost.

Spektrofotometrijska određivanja neonikotinoida i 6-hloronikotinske kiseline u smeši.

Upoređivanjem apsorpcionih spektara neonikotinoida i 6-hloronikotinske kiseline (slika 13) može se zapaziti da se spektri preklapaju. Superponiranje signala onemogućava određivanje neonikotinoida i/ili degradacionog proizvoda, bez prethodne pripreme/razdvajanja dva analita [86,87].

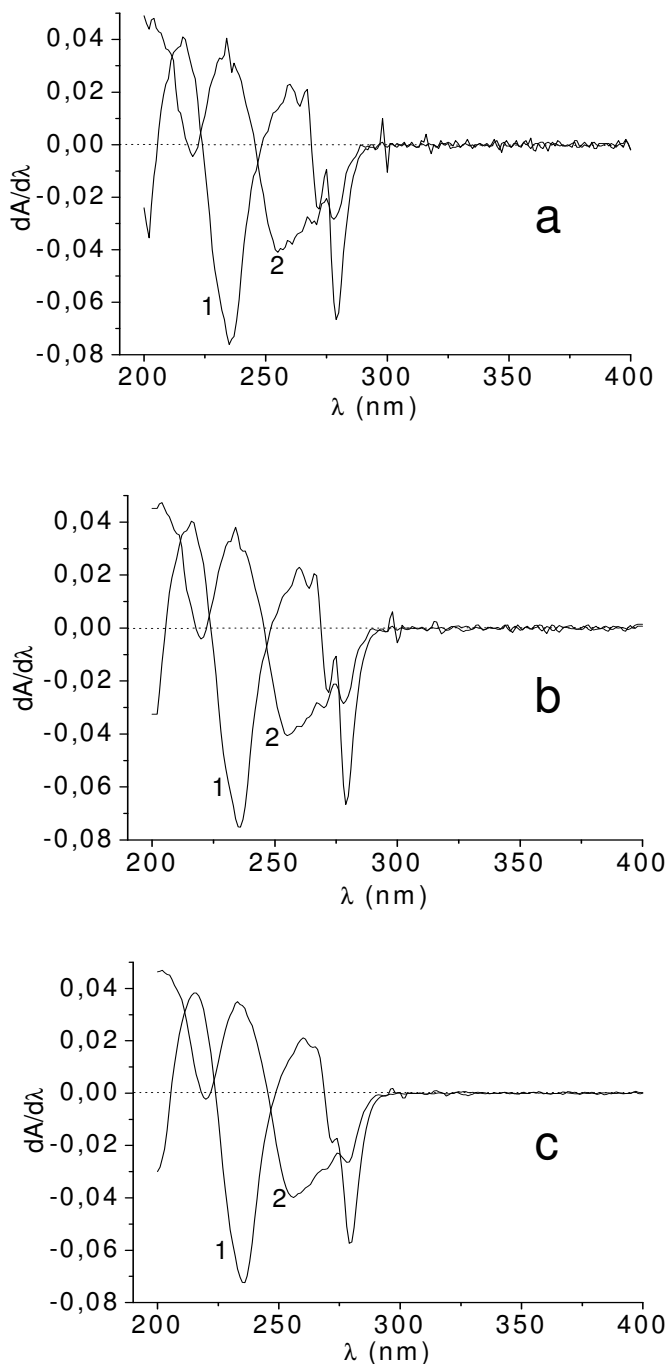
U takvim slučajevima se za razdvajanje dva ili većeg broja sličnih jedinjenja mogu primeniti matematičke metode, kao npr. derivativna spektrofotometrija [86,87], metoda određivanja H tačke i analiza varijanse.



Slika 13. Apsorpcioni spektri 6-hloronikotinske kiseline (a i b, 1), acetamiprida (a, 2) i imidakloprida (b, 2). pH = 7,0 [88, 89]

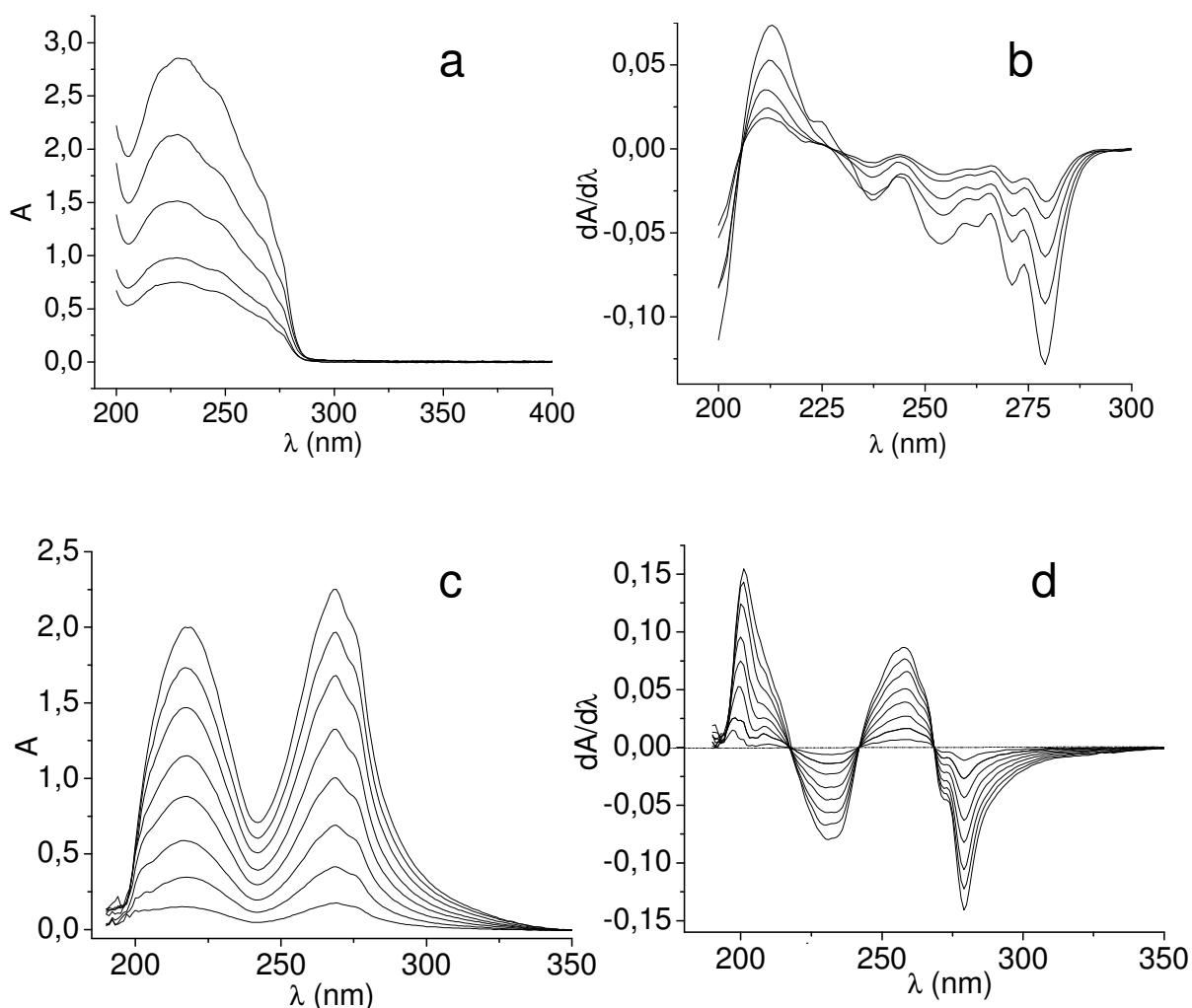
Ispitivana je mogućnost primene derivativne spektrofotometrije za razdvajanje analitičkih signala acetamiprida i 6-hloronikotinske kiseline (slika 14), kao i imidakloprida i 6-hloronikotinske kiseline. Apsorpcioni spektri su preračunati u njihove prve ili više izvode. Određivanjem nule tako dobijenih funkcija mogu se definisati talasne dužine pri kojima derivirani spektar druge komponente ima merljiv signal. Postupak se ponavlja i za drugu komponentu. Koncentracija ispitivane komponente se meri na talasnoj dužini gde derivativni spektar druge komponente seče ordinatu, a pri tome određivana komponenta ima merljiv, dobro definisan, signal. U slučaju acetamiprida i 6-hloronikotinske kiseline na osnovu derivativnih spektara može se zaključiti da su optimalne radne talasne dužine pri određivanju acetamiprida 269 nm, a 6-hloronikotinske kiseline 218 nm (slika 14a). Upoređujući derivativne spektre sa višim derivativnim

spektrima može se zaključiti da se na derivativnim spektrima prvog reda jednoznačno mogu odrediti dve radne talasne dužine koje omogućavaju određivanje oba analita jednog pored drugog. Pri računanju prvog izvoda dolazi do pojačanja šumova, što nepovoljno utiče na preciznost određivanja (slika 14a).



Slika 14. Derivativni (a), polinomijalno glačani derivativni (b) i metodom pokretnih prozora glačani derivativni (c) spektri 6-hloronikotinske kiseline (1) i acetamidiprida (2). Radni uslovi: c (acetamidiprid) = $11,35 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ i c (6-hloronikotinska kiselina) = $16,90 \mu\text{g}/\text{cm}^3$, $\text{pH} = 7,0$ [88]

Radi eliminisanja šumova izvršena je i optimizacija matematičkog filtriranja, što može da dovede do poboljšanja preciznosti merenja. Ispitivane su dve metode filtriranja: glačanje metodom pokretnih prozora i polinomijalno glačanje. Na osnovu rezultata ispitivanja može se zaključiti da polinomijalno glačanje (slika 14b) ne uklanja igličaste šumove, dok metoda pokretnih prozora (slika 14c) uspešnije glača funkcije bez drugih značajnih promena na derivativnim spektrima. Za optimalnu metodu filtriranja odabrana je metoda pokretnih prozora, pri čemu broj uzetih tačaka iznosi 5. Na slici 15 su predstavljeni apsorpcioni spektri (a, c) i derivativni apsorpcioni spektri (b, d) snimljeni za rastvore binarnih smeša acetamiprida i 6-hloronikotinske kiseline (a, b), kao i imidakloprida i 6-hloronikotinske kiseline (c, d).



Slika 15. Apsorpcioni spektri (a, c) i odgovarajući derivativni apsorpcioni spektri (b, d) smeša acetamiprida i 6-hloronikotinske kiseline (a, b) i smeša imidakloprida i 6-hloronikotinske kiseline (c,d)

Radi utvrđivanja linearnog opsega merenja na odabranim radnim talasnim dužinama određena je zavisnost $dA/d\lambda$ acetamiprida, i 6-hloronikotinske kiseline, kao i $dA/d\lambda$ imidakloprida i 6-hloronikotinske kiseline od njihove koncentracije (tablica 8). Ista metoda je primenljiva i za tiakloprid u prisustvu 6-hloronikotinske kiseline.

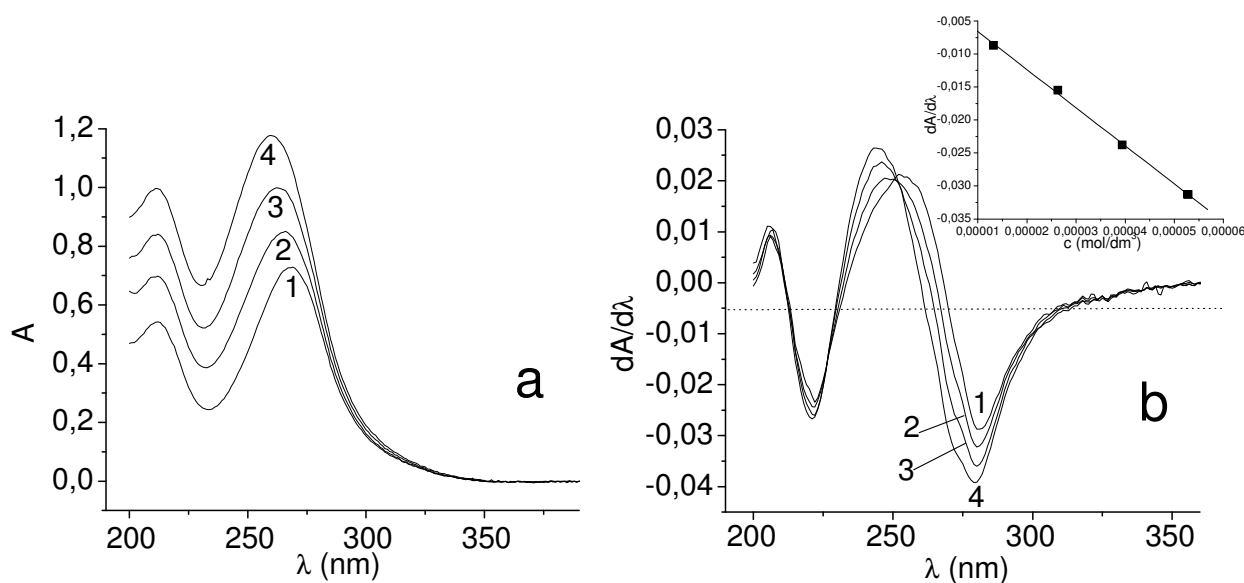
Razrađene derivativne spektrofotometrijske metode su pouzdane, dovoljno precizne, osetljive i selektivne, te se mogu primeniti za određivanje sadržaja neonikotinoida i prekursora/degradacionog proizvoda u smeši.

Tablica 8. Analitički parametri spektrofotometrijskog određivanja acetamiprida i 6-hloronikotinske kiseline kao i imidakloprida i 6-hloronikotinske kiseline u smeši

Parametar	Ispitivano jedinjenje			
	Acetamiprid	6-hloronikotinska kiselina	Imidakloprid	6-hloronikotinska kiselina
Radna talasna dužina [nm]	269	218	249	236
Interval koncentracija [$\mu\text{g}/\text{cm}^3$]	0,54-28,9	0,42-28,2	1,07-25,0	0,58-25,0
Odsečak [rel. jed.]	-0,0019	-0,0035	0,0009	-0,0006
Koeficijent pravca [rel. jed./[$\mu\text{g}/\text{cm}^3$]]	-0,0020	0,0022	0,0024	-0,0031
Koeficijent korelacije	0,996	0,995	0,999	-0,999
LOD [$\mu\text{g}/\text{cm}^3$]	0,16	0,13	0,32	0,17
LOQ [$\mu\text{g}/\text{cm}^3$]	0,54	0,42	1,07	0,58
Preciznost [RSD%] ^a	1,2	1,0	1,23	0,96

^a Broj merenja (n = 6)

Određivanje dva neonikotinoid [90]. Pored razlikovanja neonikotinoida od degradacionog proizvoda, derivativna spektrofotometrija je primenljiva i za određivanje dva neonikotinoida, npr. imidakloprida i tiametoksama, u smeši (slika 16). U cilju utvrđivanja linearnog opsega merenja na odabranim radnim talasnim dužinama određena je zavisnost $dA/d\lambda$ tiametoksama od njegove koncentracije pri stalnoj koncentraciji imidakloprida i obrnuto (tablica 9).



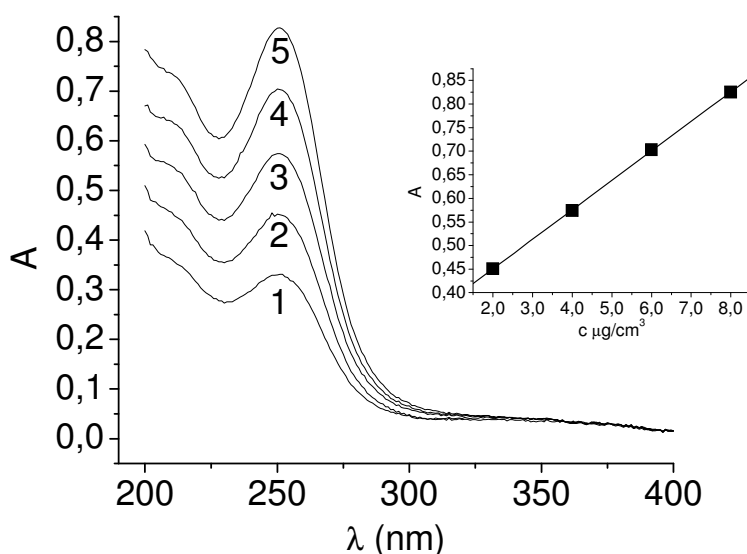
Slika 16. Apsorpcioni spektri rastvora imidakloprida i tiametoksama (a), glačani derivativni spektri (b) i odgovarajuća kalibraciona kriva. Odnos imidakloprid: tiametoksam: 1) 1:0,54; 2) 1:1,08; 3) 1:1,62; 4) 1:2,17; pH 7,0 [90]

Tablici 9. Analitički parametri spektrofotometrijskog određivanja imidakloprida i tiametoksama u smeši [90]

Parametri	Derivativna spektrofotometrija	
	tiametoksam (1,00) : imidakloprid (0,31 - 0,93)	imidakloprid (1,00) : tiametoksam (0,54 - 2,17)
Radna talasna dužina [nm]	227	270
Linearni opseg [mol/dm ³]	$4,3 \times 10^{-6}$ - $5,9 \times 10^{-5}$	$3,7 \times 10^{-6}$ - $5,1 \times 10^{-5}$
Odsečak na ordinati [rel.jed.]	0,0002	0,0004
Koeficijent pravca [dm ³ /mol]	-577,0	-500
Koeficijent korelacije	0,998	0,999
LOD [mol/dm ³]	$1,3 \times 10^{-6}$	$1,1 \times 10^{-6}$
LOQ [mol/dm ³]	$4,3 \times 10^{-6}$	$3,7 \times 10^{-6}$
Preciznost [RSD%]	1,0	1,4

^a Broj merenja (n = 6)

Analiza realnih uzoraka. Spektrofotometrijska merenja se mogu primeniti i za određivanje sadržaja aktivnih komponenata iz nekih formulacija npr. tiametoksama iz Cruiser 350 FS (slika 17), Actara 25-WG i Cruiser OSR 322FS (rezultati predstavljeni na strani 79) [91].



Slika 17. Spektri Cruiser 350 FS sa aktivnom komponentom tiametoksam (1) i standardnim dodacima tiametoksama (2-5) i odgovarajuća kalibraciona kriva

Međutim, pored ovih jednostavnih komercijalnih formulacija tiametoksama, postoje i složeniji sistemi sa drugim aktivnim komponentama ili puniocima. Takav primer je Volley, koji pored acetamiprida sadrži i druge optički aktivne komponente, zbog čega nije moguće direktno spektrofotometrijsko određivanje ovog neonikotinoida. Pored toga, ekstrakti realnih uzoraka su takođe često složeni. Zbog tih razloga dalji zadatak u ovom domenu biće razrada jednostavnih, osetljivih, brzih, pouzdanih i ekološki pogodnih derivativih i drugih hemometrijski obrađenih spektrofotometrijskih metoda analize ovih jedinjenja u kompleksnim matriksima.

4.2. Nuklearna magnetna rezonantna spektrometrijska studija neonikotinoida

Nuklearna magnetna spektrometrija (NMR) je u osnovi jedan oblik rezonantne spektroskopije, gde pod određenim uslovima u magnetnom polju uzorak apsorbuje elektromagnetno zračenje iz oblasti radio talasa frekvencije uslovljene karakteristikama uzorka [84, 92]. NMR spektrometrija je složena, fundamentalna tehnika i primenjuje se pre svega za određivanje strukture organskih molekula, od malih molekulskih masa do velikih aglomerata, kako novosintetizovanih, tako i molekula izolivanih iz prirode [92, 93]. Pored ove funkcije ona je već od ranije primenjivana za praćenje dinamičkih i

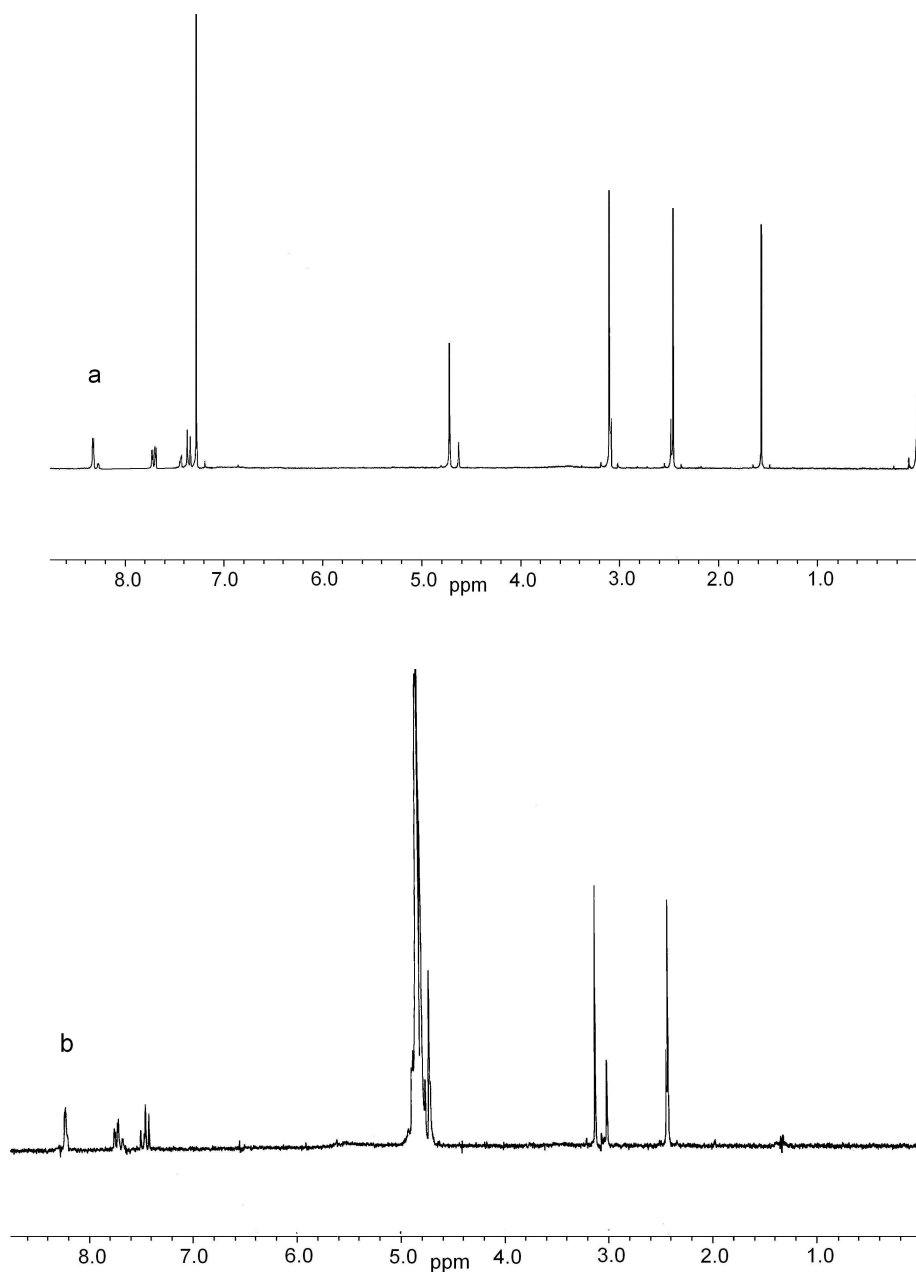
kinetičkih parametara hemijskih sistema, npr. ispitivanje stabilnosti lekova i pratećih nečistoća [94, 95], proučavanje mehanizma fotokatalitičke degradacije perzistentnih herbicida [96] i fungicida [97] i dr.

Stoga je zadatak ovom delu rada bio ispitivanje stabilnosti predmetnih neonikotinoida i praćenje njihove degradacije.

4. 2.1. Optimizacija uslova rada za karakterizaciju neonikotinoida

Utvrđeni su karakteristični ^1H NMR signali ispitivanih neonikotinoida u CDCl_3 i to [δ_{H} (ppm)]: **tiakloprid** [3,39 (*t*, *J* 7,5 Hz, 2H, H-5, Tia.), 3,79 (*t*, *J* 7,5 Hz, 2H, H-4, Tia.), 4,62 (*s*, 2H, CH_2), 7,37 (*d*, *J* 8,2 Hz, 1H, H-5), 7,67 (*dd*, *J*₁ 8,2 Hz, *J*₂ 2,5 Hz, 1H, H-4), 8,31 (*d*, *J* 2,5 Hz, 1H, H-2)]; **acetamiprid** [2,46 (*s*, 3H, $\text{C}(\text{CH}_3)$), 3,10 (*s*, 3H, $\text{N}(\text{CH}_3)$), 4,71 (*s*, 2H, $\text{N}(\text{CH}_2)$), 7,33 (*d*, *J* 7,5 Hz, 1H, H-5), 7,69 (*dd*, *J*₁ 8,2 Hz, *J*₂ 2,5 Hz, 1H, H-4), 8,31 (*d*, *J* 2,5 Hz, 1H, H-2)]; **tiametoksam** [3,05 (*s*, 3H, $\text{N}(\text{CH}_3)$), 4,75 (*s*, 2H, $\text{N}(\text{CH}_2)$), 4,88 (*s*, 4H, H-2, H-6), 7,48 (*s*, 1H, H-4, Tia.) i **imidakloprid** [3,53 (*t*, *J* 7,5 Hz, 2H, H-4, Imid.), 3,81 (*t*, *J* 7,5 Hz, 2H, H-5, Imid.), 4,55 (*s*, 2H, $\text{N}(\text{CH}_2)$), 7,36 (*d*, *J* 8,2 Hz, 1H, H-5), 7,71 (*dd*, *J*₁ 7,5 Hz, *J*₂ 2,5 Hz, 1H, H-4), 8,20 (*s*, 1H, NH, Imid.), 8,33 (*d*, *J* 2,5 Hz, 1H, H-2)]. [98, 99]

Slika 18 prikazuje ^1H NMR spektar acetamiprida snimljen u rastvorima CDCl_3 (a) i D_2O (b). Dobijeni signali ukazuju na prisustvo dva konfiguraciona izomera, od kojih je jedan termodinamički stabilniji. Naime, u CDCl_3 , četiri signala metil-grupe se mogu razlikovati u intervalu od 2,46 do 3,10 ppm, od kojih su dva singleta intenzivna i dva manje intenzivna sa oko 20% intenziteta većih signala. Pored signala aromatičnog dela glavne komponente (δ interval 7,33–8,31 ppm) u istoj spektralnoj oblasti se nalaze i odgovarajući signali za sporednu komponentu, tj. manje prisutan izomer, sa izuzetkom signala na 7,69 ppm, što je verovatno posledica preklapanja dubletskih signala oba izomera (slika 18a) [99].



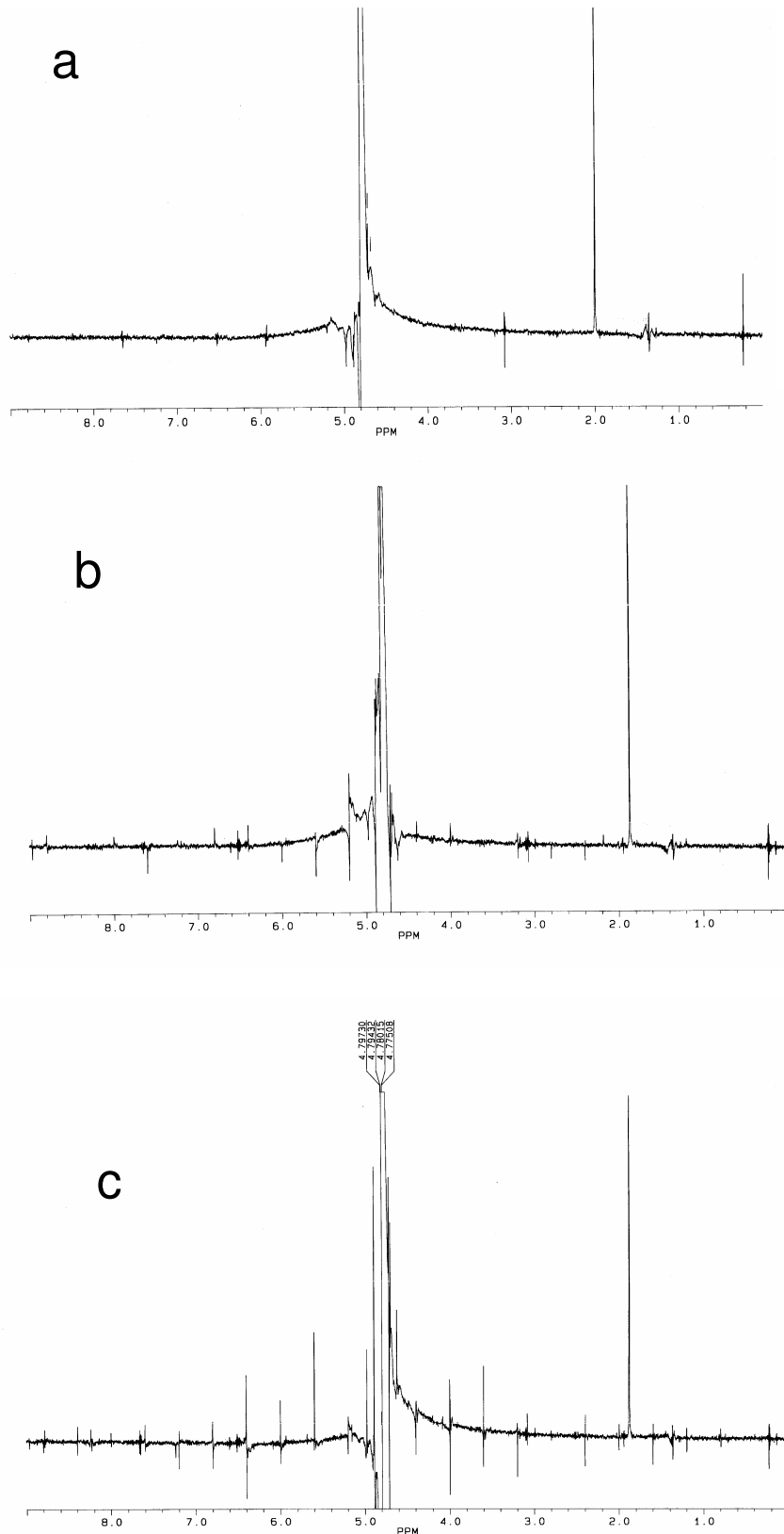
Slika 18. NMR spektar acetamiprida u: a) CDCl₃ i b) D₂O [99]

Podaci za termodinamički stabilniju komponentu su već navedeni (vidi gore), a hemijska pomeranja termodinamički manje stabilnog jedinjenja su sledeća [δ_{H} (ppm)]: [2,47 (*s*, 3H, C(CH₃)), 3,09 (*s*, 3H, N(CH₃)), 4,62 (*s*, 2H, N(CH₂)), 7,42 (*d*, *J* 4 Hz, 1H, H-5), 8,26 (*s*, 1H, H-2)]. Slično tome, u D₂O (slika 18b), sporedna komponenta, sa hemijskim pomeranjima od 2,43 ppm i 3,00 ppm, predstavlja 25% od glavne komponente. Protonski signali aromatičnog prstena sporedne komponente (δ opseg 7,42–8,26 ppm) se preklapaju sa signalima glavne komponente. Ova zapažanja su potvrđena i HPLC tehnikom. Naime, iako je ispitivani acetamiprid bio HPLC analitički

standard, referentni materijal, njegova čistoća je proverena hromatografskim postupkom preporučenim od proizvođača. Dakle, prisustvo dve komponente (glavne i sporedne) se može objasniti postojanjem dve izomerne forme acetamiprida. Ova pojava nije zapažena kod ostalih proučavanih neonikotinoida. U slučaju tiakloprida podaci zasnovani na NMR i rentgenostrukturnim [10] ispitivanjima su u saglasnosti sa ovde opisanim [99].

NMR spektri u CDCl_3 se lakše mogu snimiti zbog veće rastvorljivosti neonikotinoida, naročito imidakloprida i tiakloprida, koji su u vodenoj sredini preko 10 puta manje rastvorljivi od ostala dva ispitivana neonikotinoida. Druga prednost ovog organskog rastvarača je odsustvo širokog i intenzivnog signala sa δ_{max} na 4,8 ppm, što obavezno prati vodene rastvore i često dovodi do prekrivanja korisnih signala ispitivanog uzorka. Iako CDCl_3 kao sredina za rad ima svoje prednosti, smeša D_2O -vodeni rastvor Britton-Robinson pufera (1:1) je odabrana kao sredina za dalja ispitivanja zbog postizanja eksperimentalnih uslova sličnih prirodnim uslovima. Naime, navedena vodena sredina omogućava direktno praćenje stabilnosti neonikotinoida bez dodatnih priprema uzoraka. Zbog izbora radne sredine, kao što je to gore navedeno, javlja se veoma intenzivni i širok HOD signal sa δ_{max} na 4,8 ppm. Radi saturacije protona iz vode primenjena je tehnika potiskivanja signala vode (water-suppressed technique), što je dovelo do značajnog smanjenja nepoželjnog signala rastvarača i prouzrokovalo da samo signali u intervalu 4,6 to 5,0 ppm (uobičajeno za CH_2 protone) budu prekriveni rezidualnim signalom vode. Ova tehnika je ranije bila primenjena pri proučavanju stabilnosti lekova u vodi [94, 95].

Kao što to prikazuje slika 19, slepa proba, koja sadrži samo Britton-Robinson pufer pH 4,0 (a), 7,0 (b) i 9,0(c) i D_2O , daje isključivo jedan oštar metil-singlet na 1,9 ppm, koji ostaje nepromenjen tokom celog eksperimenta. Treba istaći da spektri D_2O -vodeni pufer (1:1) rastvora slepih proba sadrže artefakte/šumove koji se ne mogu fazno korigovati i koji su permanentno prisutni i sa povećanjem broja skeniranja. Ova pojava najviše dolazi do izražaja pri pH 9,0 (slike 19c i 20c) i verovatno je posledica veće koncentracije NaOH u rastvoru. Slični artefakti nisu zapaženi u spektru čiste D_2O (slika 18b). Korisni signali se mogu lako prepoznati prema obliku, položaju i mogućnosti podešavanja faze [99].



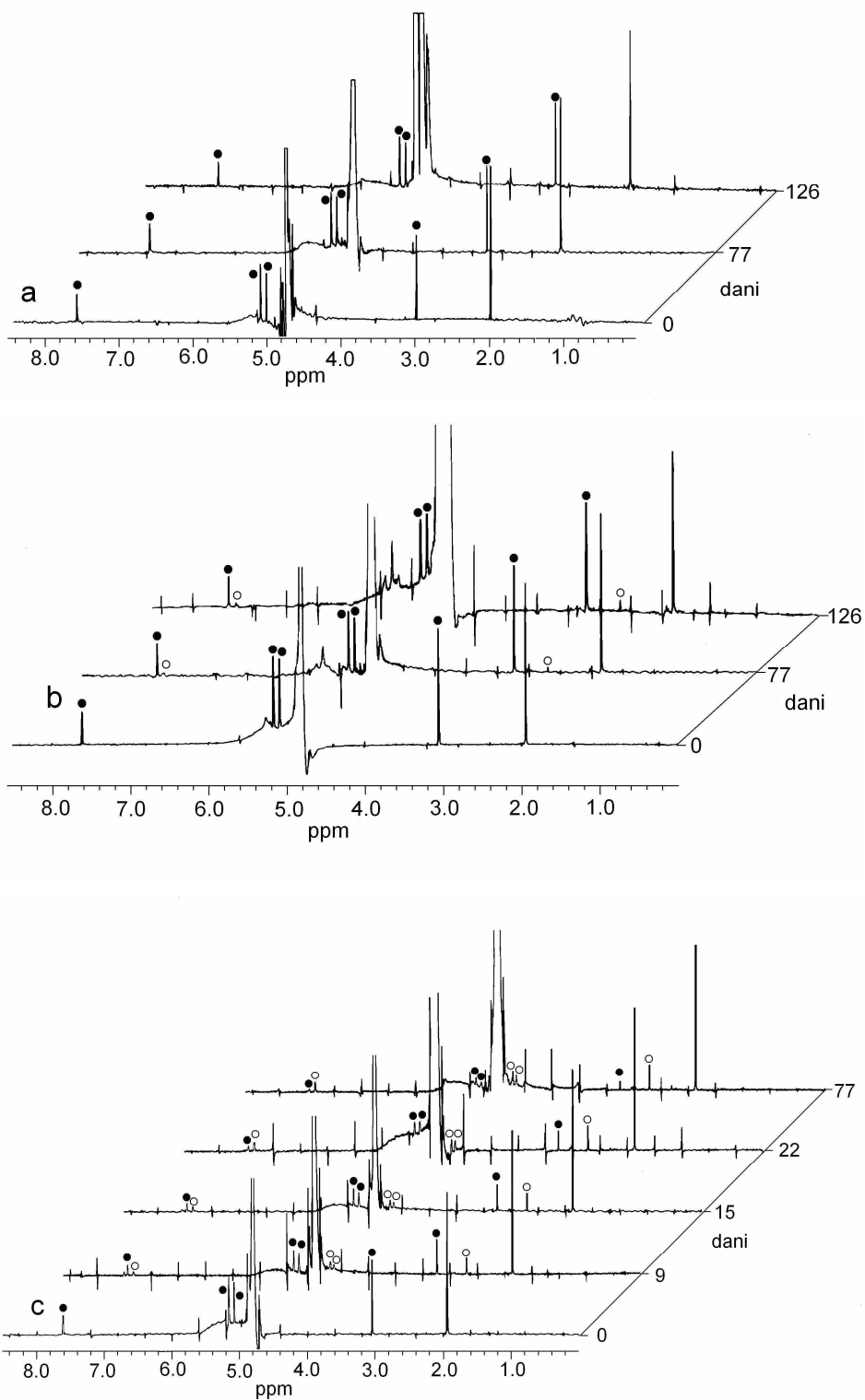
Slika 19. Spektri slepih proba Britton-Robinson pufer - D₂O (1:1) različite pH vrednosti: a) 4,0; b) 7,0 i c) 9,0

4.2.2. Uticaj pH vrednosti sredine na stabilnost i hidrolizu neonikotinoida

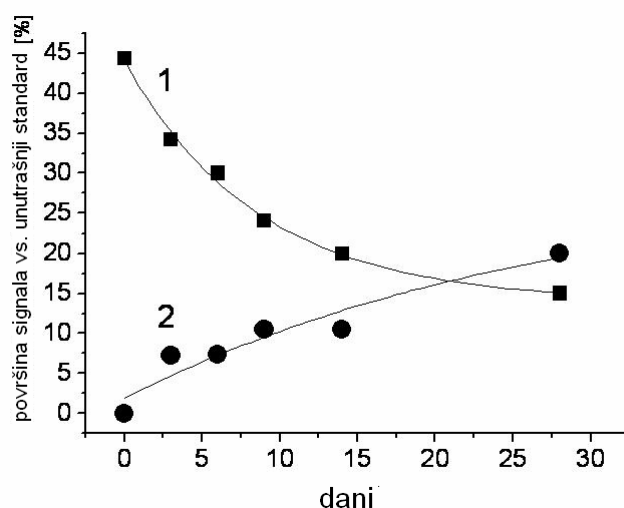
Slika 20 prikazuje ^1H NMR spektralni profil tiametoksama u uslovima hidrolize pri pH 4,0 (a), 7,0 (b) and 9,0 (c). Tiametoksam je najstabilniji pri pH 4,0, bez promene signala tokom četiri meseca. Pri pH 7,0, tokom pet nedelja nije bilo značajnijih promena a zatim se zapažaju prve promene. Naime, intenzitet matičnih signala aromatičnog prstena pri 7,60 ppm veoma sporo opada, a takođe i intenzitet dva singletna signala šestočlanog heterocikločnog prstena pri 5,02 i 5,10 ppm. Spektar snimljen nakon 77 dana sadrži nove dobro definisane signale, koji verovatno pripadaju intermedijeru/intermedijerima hidrolize. Dakle, tiametoksam hidrolizuje veoma sporo u kiseljoj i sporo u neutralnoj sredini; samo oko 3% od početnog sadržaja je hidrolizovano tokom tri meseca pri pH 7,0. Ovo nije slučaj u baznoj sredini pri pH 9,0. Hidroliza je mnogo brža, što potvrđuju novi signali prisutni već nakon prva tri dana (slika 20c). Praćeni polazni singletni signali se menjaju, kao što se može videti na osnovu smanjenja karakterističnih singletnih signala na 3,00; 5,02; 5,10 i 7,60 ppm. Istovremeno, jedan glavni intermedijer je identifikovan sa singletnim signalima na 2,60; 4,52; 4,57 i 7,53 ppm [99].

Vremenska zavisnost opadanja singletnog signala na 5,10 ppm pri pH 9,0 je prikazana na slikama 20c i 21 (kriva 1). Podaci ukazuju na činjenicu da se dinamika alkalne hidrolize tiametoksama može opisati kinetikom prvog reda. Takođe, može se uočiti da se nakon prvih 15 dana hidrolize brzina hidrolize menja, tj. smanjuje se. Analitički pristup ukazuje na prisustvo samo jednog glavnog degradacionog proizvoda (slika 20c i slika 21, kriva 2), pored kojeg je prisutna i jedan sporedni proizvod [95].

Imidaklopid, jedinjenje sa identičnom nitro-guanidinskom funkcionalnom grupom, ima slične osobine kao tiametoksam. Ipak, imidaklopid je stabilniji u baznoj sredini, i njegova hidroliza počinje nakon 5 dana. U kiseljoj i neutralnoj sredini (pH 4,0 i 7,0) pokazuje stabilnost tokom četiri meseca posmatranja. Na osnovu praćenja hidrolize NMR tehnikom može se pretpostaviti da se u alkalnoj sredini javlja samo jedan glavni proizvod hidrolize [δ_{H} (ppm): 3,56; 3,64; 4,45; 7,51; 7,80; 8,15; 8,27], što je u saglasnosti sa ranijim istraživanjima drugih autora [59, 61].



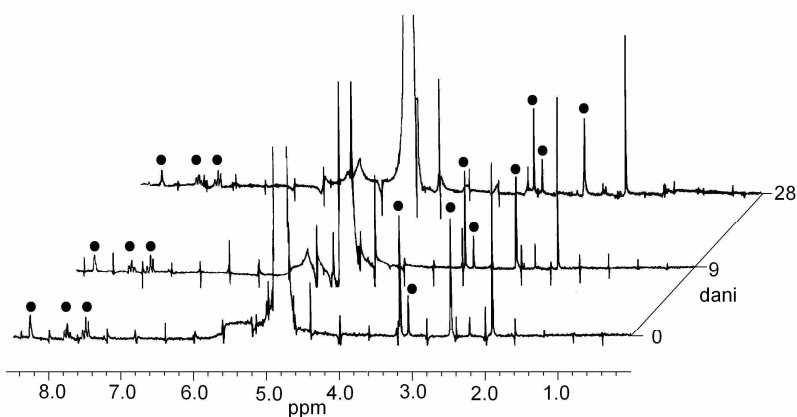
Slika 20. ^1H NMR spektralni profili tiametoksama snimljeni tehnikom potiskivanja signala vode u različitim vremenskim intervalima pri različitim pH vrednostima: a) 4,0; b) 7,0 i c) 9,0. ● signali polaznog jedinjenja i ○ novi signali [99]



Slika 21. Zavisnost intenziteta ^1H signala zasićenog šestočlanog heterocikličnog prstena tiametoksama od vremena hidrolize na pH 9,0: 1) smanjenje intenziteta signala polaznog jedinjenja na 5,10 ppm i 2) povećanje intenziteta odgovarajućeg signala iz proizvoda na 4,57 ppm [99]

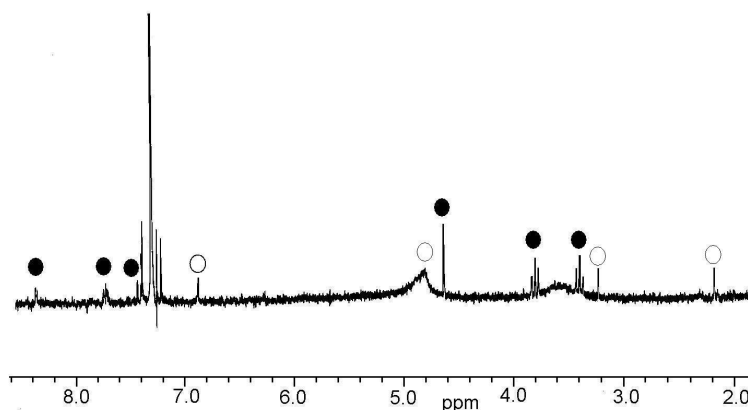
Imajući u vidu prirodu ova dva veoma slična jedinjenja (imidakloprid i tiametoksam), dinamiku smanjenja signala matičnih jedinjenja i povećanja novih signala, kao i poznate podatke iz literature vezane za ispitivanje stabilnosti imidakloprida [59, 61], može se pretpostaviti i mogući glavni smer hidrolize. Naime, jaka elektron-akceptorska NO_2 grupa pojačava elektrofilnost azometinskog ugljenika iz nitroguanidinske funkcionalne grupe, gde se verovatno lako odigrava nukleofilni napad OH^- jona [99].

Acetamiprid, jedinjenje sa cijanoiminskom funkcionalnom grupom, je manje stabilan u kiseljoj sredini nego tiametoksam i imidakloprid. S druge strane, pri pH 9,0 (slika 22), prve značajne promene osnovnog spektra se mogu zapaziti nakon već 30 dana.



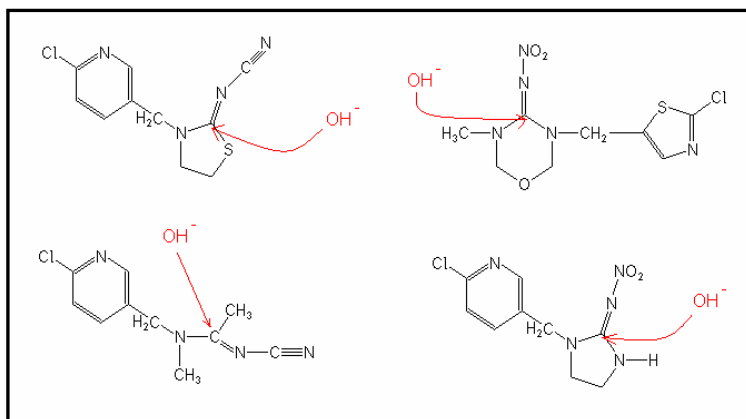
Slika 22. ^1H -NMR spektralni profili acetamiprida snimljeni tehnikom potiskivanja signala vode u različitim vremenskim intervalima u sistemu D_2O -Britton-Robinson pufer pH 9,0 [99]

Zbog male rastvorljivosti tiakloprida u vodi ($0,185 \text{ g/dm}^3$ na 20°C), istraživanja vezana za njegovu stabilnost u rastvorima Britton-Robinson pufera primenom ^1H NMR spektrometrije su moguća, ali otežana, što se reflektuje na preciznosti merenja. Radi poboljšanja osetljivosti i tačnosti metode izvršeno je prethodno koncentrisanje polaznog jedinjenja omoću dihlormetana. Uzet je veći alikvot rastvora i izvršena ekstrakcija organskim rastvaračem, a zatim je ekstrakt uparavan na 23°C do suva. Suvi ostatak je rekonstituisan u CDCl_3 . Slika 23 prikazuje ^1H NMR spektar rezidua tiakloprida nakon 60 dana stajanja pri pH 9,0, dobijen nakon kolektovanja. Kao što se može uočiti, matično jedinjenje se nalazi i dalje u merljivim količinama: [δ_{H} (ppm): 3,39 (*t*, *J* 7,5 Hz, 2H, H-5, Tia.), 3,79 (*t*, *J* 7,5 Hz, 2H, H-4, Tia.), 4,62 (*s*, 2H, CH_2), 7,37 (*d*, *J* 8,2 Hz, 1H, H-5), 7,67 (*dd*, *J*₁ 8,2 Hz, *J*₂ 2,5 Hz, 1H, H-4), 8,31 (*d*, *J* 2,5 Hz, 1H, H-2)] [99].



Slika 23. ^1H -NMR spektar tiakloprida u CDCl_3 , snimljen nakon dva meseca hidrolize pri pH 9,0. Uzorak za merenje je obogaćen postupkom ekstrakcije. • signali polaznog jedinjenja i ○ novi signali [99]

Uopšteno, u slučaju imidakloprida, tiametoksama i tiakloprida, protonski signali heterocikličnog aromatičnog prstena su dobrim delom nepromenjeni, tako se može zaključiti da pri gore navedenim uslovima hidrolize aromatično jezgro ne trpi značajnije promene. Dalje, sva ispitivana jedinjenja imaju elektron-akceptorske funkcionalne grupe, bilo u vidu nitro-guanidinske ili cijanoiminske grupe, u blizini nezasićene ugljenikove atome koji su podložni nukleofilnom napadu (shema 12). Proizvodi nukleofilnih napada i nastajanje fragmentacionih intermedijera se daju detektovati i identifikovati NMR spektrometrijom. Dinamika i put hidrolize ispitivanih jedinjenja zavise od pH vrednosti sredine i od prirode funkcionalnih grupa u blizini pomenutih centara [99].



Shema 12. Pretpostavljeni nukleofilni napad pri hidrolizi neonikotinoida

Ekstrakcijom i prekoncentrisanjem dobijeni uzorci, mereni u CDCl_3 , pokazuju iste rezultate. Eksperimenti u kojima je ispitivan uticaj povećanja temperature ukazuju na to da su tri jedinjenja stabilna pri pH 4,0 i 7,0 i do 80°C . Tiametoksam je postojan pri pH 4,0, međutim, pri pH 7,0 na 80°C počinje njegova hidroliza. Pri pH 9,0 dolazi do hidrolize svih ispitivanih jedinjenja osim tiakloprida, pri čemu se može pratiti i dinamika hidrolize jedinjenja. Pored toga iz dobivenih podataka postoji mogućnost računanja energija aktivacije proučavanih jedinjenja. Preliminarna istraživanja u vezi određivanja aktivacione energije pokazuju da tiametoksam ima najnižu aktivacionu energiju sa oko 29 kJ/mol , a imidakloprid oko 38 kJ/mol , što je u slaglasnosti sa literaturnim podacima za imidakloprid [61]. U vezi ovih rezultata potrebna su detaljnija i dalja ispitivanja.

Preliminarni eksperimenti hidrolize na 60°C u umereno baznoj (pH 9,0) i baznoj (pH 12,0) sredini u trajanju od 5 h, dali su dodatne informacije o degradacionim proizvodima ovih insekticida.

Iz svega izloženog se može zaključiti da dalji zadaci ispitivanja u ovoj oblasti mogli bi da se odnose na snimanje ^{13}C -NMR spektara glavnih degradacionih proizvoda i ispitivanje mogućnosti primene ^{13}C -NMR i ^{15}N -NMR tehnika za praćenje promene polaznih jedinjenja, tako i na identifikaciju degradacionih proizvoda. Takođe se planira i intenzivna primena FT IC metode [48] za paralelno praćenje postojanosti neonikotinoida. Preliminarna FT IC merenja potvrđuju mogućnost određivanja ovih insekticida u dihlormetanu ili hloroformu, posle ekstrakcije analita iz vodene sredine. Primenljivost ovih metoda treba da bude testirana planiranim fotokatalitičkim degradacionim eksperimentima neonikotinoida.

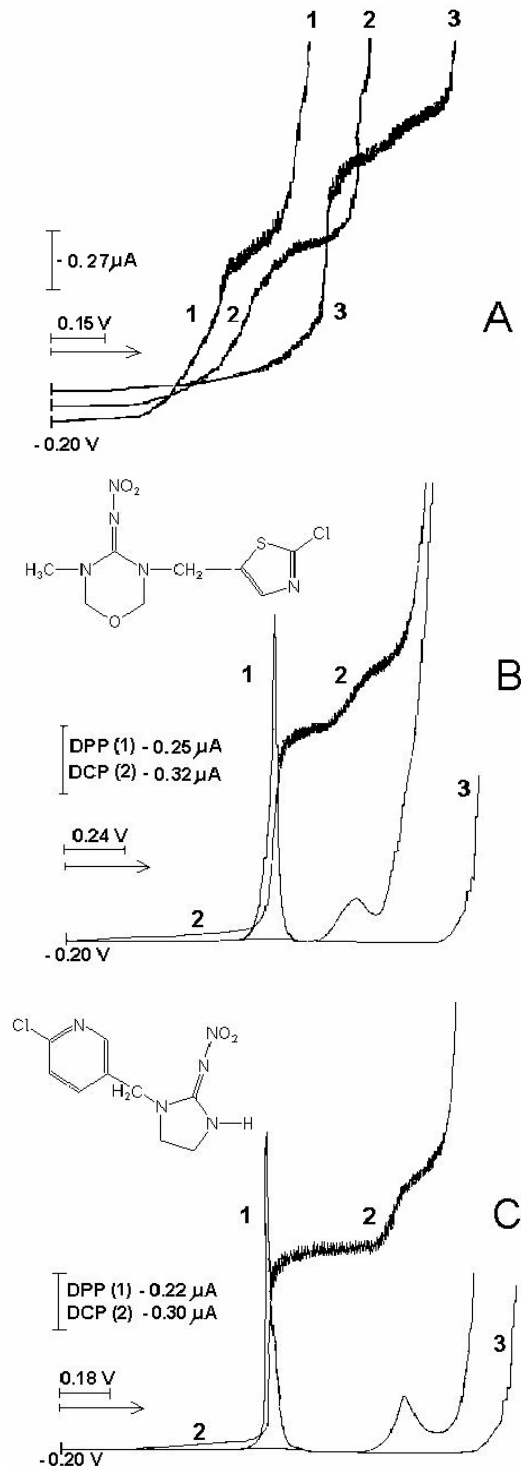
4.3. Voltametrijska ispitivanja i određivanja neonikotinoida

Generalno, voltametrija je široko primenjivana brza i jednostavna tehnika u analitici pesticida, lekova i dr. [100-104]. Voltametrijski signali elektroaktivnih jedinjenja zavise od prirode primenjenih radnih elektroda, načina polarizacije, ispitivanog analita, prirode osnovnog elektrolita i dr. [103-106].

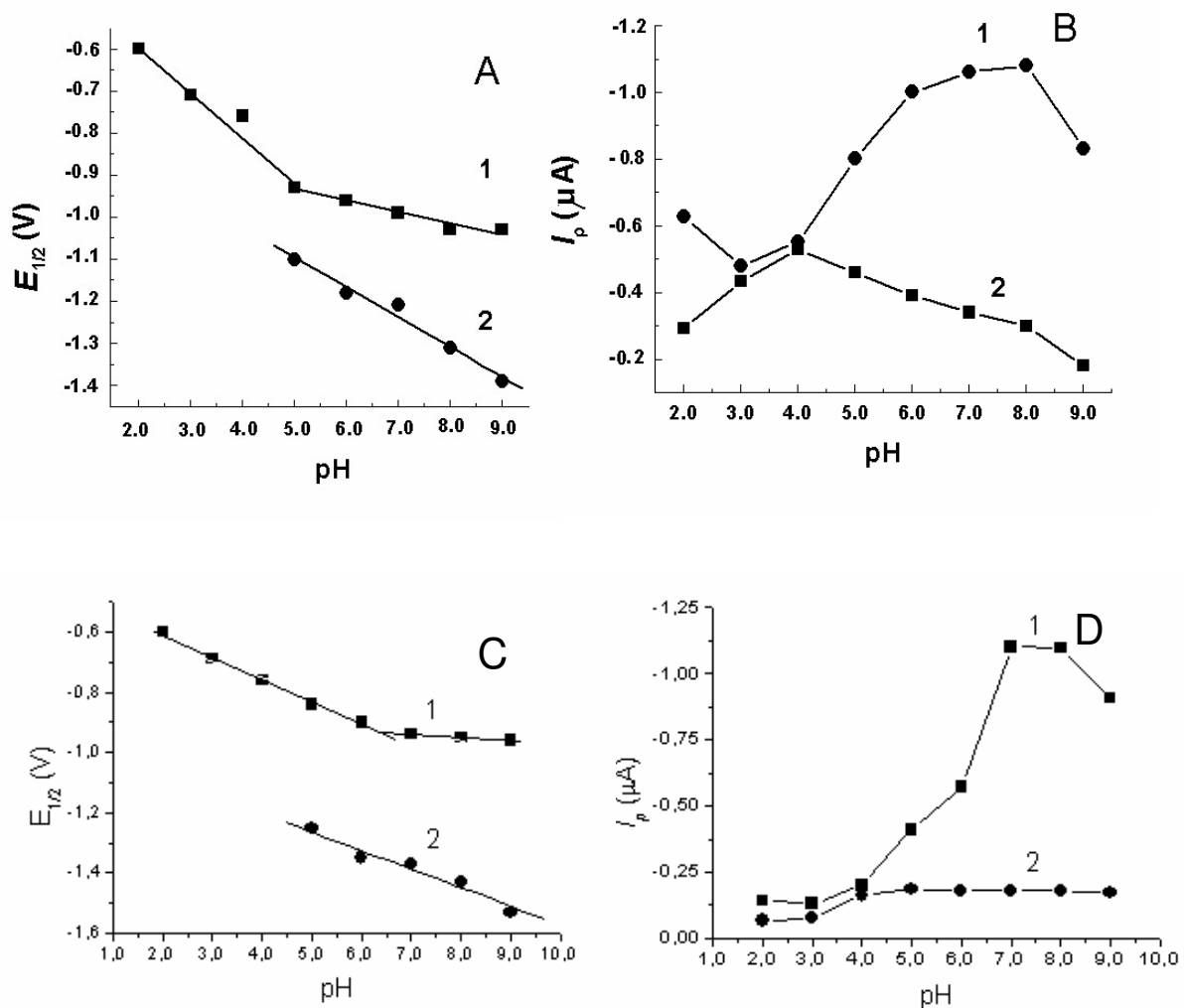
4.3.1. Voltametrija na živinoj elektrodi

Polarografska karakterizacija neonikotinoida sa nitro-guanidinskom funkcionalnom grupom. Tiametoksam sadrži elektroaktivnu funkcionalnu grupu i zbog toga se može očekivati njegov polarografski redukcionni talas na KŽE. Pri nižim pH vrednostima (2,0–4,0) talas je slabo izražen, što je karakteristično za kompleksne ireverzibilne procese i sukcesivni transfer elektrona (slika 24 A, krive 1 i 2). Međutim, pri višim pH vrednostima ireverzibilnost talasa se smanjuje, i javlja se novi redukcionni talas (slika 24A, kriva 3 i slika 24B, kriva 2). Pri istim uslovima rada veoma slično voltametrijsko ponašanje pokazuje i imidakloprid (slika 24C), sa identičnom nitro-guanidinskom grupom, što je već bilo ranije opisano od strane *Navalón et al.* [52]. Na osnovu upoređivanja polarografskih talasa oba jedinjenja snimljenih u ekvimolarnim rastvorima i pri identičnim uslovima rada može se zaključiti da su broj elektrona (n_a) i mehanizam redukcije isti kod oba jedinjenja. Naime, polarografski talasi oba jedinjenja su jednake visine, istog oblika i odgovaraju četvoro- i dvo-elektronskim izmenama ($\text{pH} > 5,0$). Kod oba neonikotinoida pri $\text{pH} > 5,0$ polutalasnii potencijal ($E_{1/2}$) drugog talasa više zavisi od pH vrednosti nego prvi. Polutalasnii potencijal oba redukcionna talasa se pomera ka negativnijim vrednostima potencijala pri povećanju pH vrednosti (slika 25A). Ova osobina ukazuje na uključenost protona u elektrodnu reakciju. Na prikazanoj zavisnosti $E_{1/2}$ -pH (slika 25A, kriva 1) nalaze se dva linearna dela sa prevojnou tačkom pri pH 5 i sa koeficijentou pravca za prvi deo 82 mV/pH, a za drugi 20 mV/pH. Može se pretpostaviti da u kiselijim sredinama prvi talas predstavlja zbir dva sukcesivna stupnja redukcije veoma bliskih potencijala. Pošto druga faza više zavisi od koncentracije protona, redukcionni proces postaje sporiji pri višim pH vrednostima ($\text{pH} > 5,0$), što se reflektuje kao cepanje talasa. Ovo je predstavljeno na slici 24A i B, pri čemu je $E_{1/2}$ -pH

zavisnost prikazana na slici 25A. Ova pojava je verovatno posledica promene sporog stupnja u procesu redukcije, kao što je već ranije zapaženo od strane više istraživača [107-120]. Koeficijent pravca $E_{1/2}$ -pH krive za drugi talas je 71 mV/pH (slika 25A, kriva 2).



Slika 24. Tipični DC (A, B(2), C(2)) i DP (B(1), C(1)) polarogrami tiametoksama (A, B) i imidakloprida (C) dobijeni pri $c = 0,03 \text{ mg/cm}^3$ aktivne komponente, $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$ i pri sledećim pH vrednostima: A) 2,0 (1), 4,0 (2) 6,0 (3); B) 8,0 i C) 8,0; kriva 3 (B i C) je DP polarogram slepe probe [91]



Slika 25. Uticaj pH vrednosti na $E_{1/2}$ (A, C) i I_p (B, D) rastvora tiametoksama (A, B) i imidakloprida (C, D) $c = 0,03 \text{ mg/cm}^3$: 1) prvi talas/redukcioni pik, 2) drugi talas/redukcioni pik [91]

Zavisnost potencijala od $\log I/(I_d-I)$ za dva ireverzibilna talasa tiametoksama pri različitim pH vrednostima (5,0–9,0) je linearna, sa približim vrednostima $59/\alpha n_a$, na osnovu relacije [115]:

$$E = E_{1/2} - [(59/\alpha n_a)] \times [\log I/(I_d-I)] \quad (1)$$

Između pH 5,0–9,0, računane vrednosti za αn_a su 0,96 i 1,20, a koeficijenti prenosa (α) $0,24 \pm 0,08$ i $0,60 \pm 0,10$, što potvrđuje da u ireverzibilnom procesu redukcije u prvom stupnju učestvuju četiri, a u drugom dva elektrona. Broj jona vodonika (z_H^+) koji

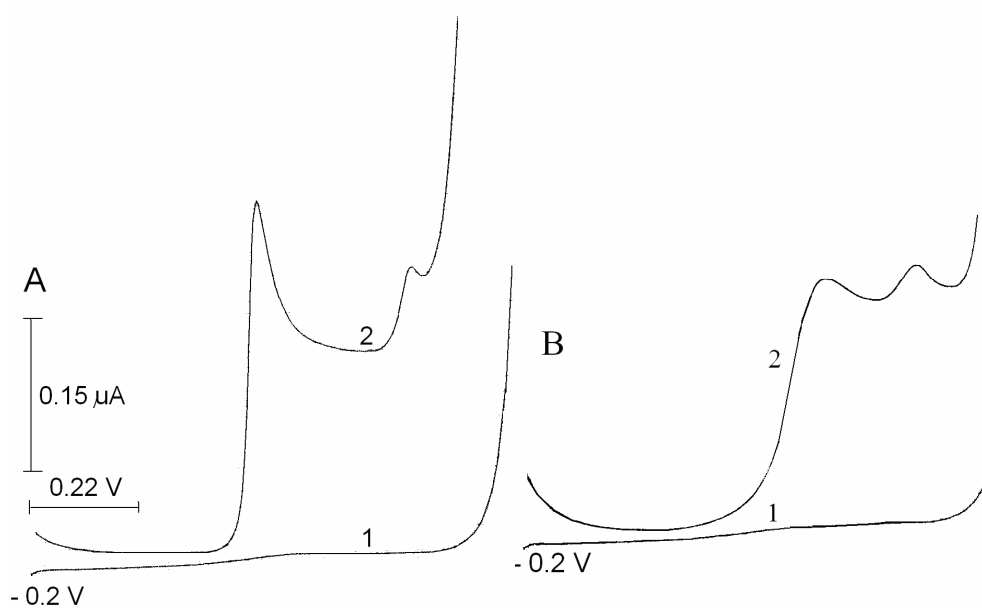
učestvuju u sporom stupnju procesa je računat na osnovu koeficijenta pravca zavisnosti $E - \log(I/(I_d - I))$ i $E_{1/2} - \text{pH}$ [115] u opsegu $\text{pH } 5,0-9,0$ po sledećoj jednačini:

$$\partial E_{1/2} / \partial \text{pH} = - (59/\alpha n_a) z_{\text{H}^+} \quad (2)$$

Na osnovu rezultata može se pretpostaviti da jedan i dva protona učestvuju u sporim stupnjevima prvog i drugog talasa redukcije tiametoksama.

Dva dobijena talasa odgovaraju redukciji nitro-grupe [107-120]. Prvi talas odgovara četvoroelektronskoj izmeni i dobijanju hidroksilaminskog derivata, a drugi dvoelektronskoj izmeni (drugi redukcionni signal je po intenzitetu polovina od prvog signala, što takođe ukazuje na odnos izmenjenih elektrona tokom ukupnog procesa redukcije). Drugi talas se može pripisati redukciji hidroksilamina u odgovarajući amin ili redukciji azometinske grupe polaznog jedinjenja.

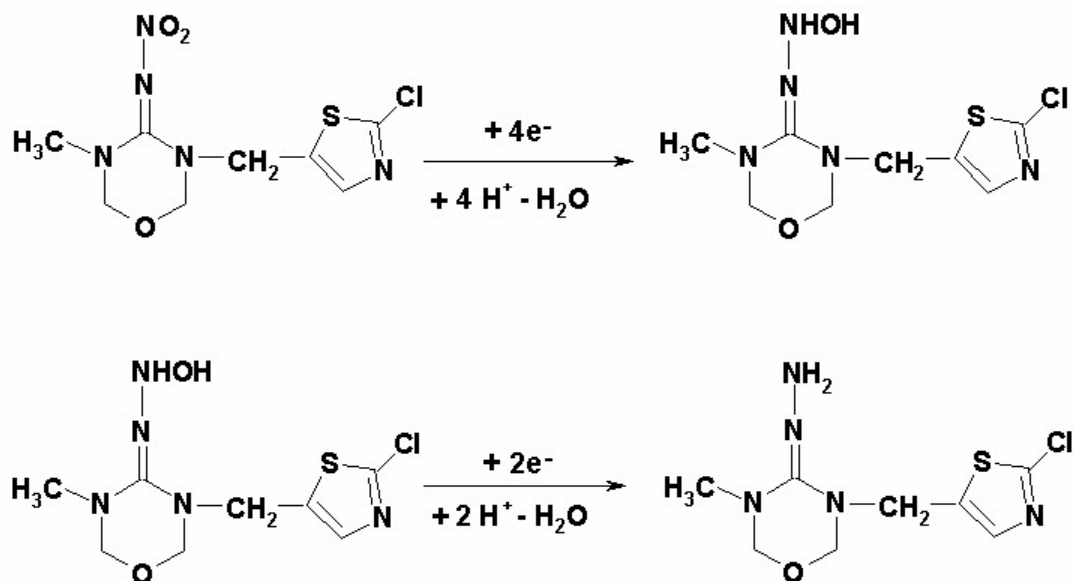
Pretpostavljeni mehanizam redukcije je potvrđen i primenom LSV tehnike na HMDE (slika 26).



Slika 26. LSV krive imidakloprida (A, kriv 2) i tiametoksama (B, kriva 2), snimljene na HMDE pri $\text{pH } 8,0$ uz $v = 100 \text{ mV/s}$. Krive 1 su odgovarajuće slepe probe

Pored voltametrijske karakterizacije imidakloprida i tiametoksama zadatak je bio i razrada odgovarajuće osetljive metode određivanja, pre svega još neispitivanog tiametoksama u realnim uzorcima, zbog čega su rađena DPP ispitivanja. DP polarogrami tiametoksama snimljeni pri pH 8,0 su prikazani na slici 24B. U opsegu pH 2,0–9,0 postoje dva jasno definisana katodna pika na -0,2 i -1,5 V. Pri višim pH vrednostima (7,0–9,0) prisutan je i treći pik na oko -1,6 V. Kao što se može videti sa slike 25B, intenzitet struje (I_p) je najveći u intervalu pH 6,0–9,0 za prvi pik i pri pH 3,0–5,0 za drugi. Pošto je I_p vrednost za prvi pik viša, upravo ovaj signal je primenjen za analitičke svrhe pri pH 8,0. Treba napomenuti da su prvi i drugi pik u potpunosti razdvojeni na pH > 7,5 [91].

U skladu sa gorenavedenim činjenicama, moguće je postulirati reakcionu shemu ireverzibilne redukcije tiametoksama (shema 13), što je u saglasnosti sa već ranije opisanim mehanizmima elektrohemijske redukcije sličnih jedinjenja [107-120].



Shema 13. Mehanizam redukcije tiametoksama na elektrodi od žive

Određivanje tiametoksama i imidakloprida. Kao što je već navedeno, pri pH 8,0 vrednost I_p je veća za prvi nego za drugi pik, i zato je ovaj izabran za analitički signal. Radi optimizacije eksperimentalnih uslova merenja, amplituda impulsa, vreme isticanja kapi i brzina promene potencijala su ispitani pojedinačno, varirajući jedan od navedenih

parametara i držeći stalnim ostale parametre. Ispitivani intervali: amplituda pulsa 10–50 mV, vreme isticanja kapi 1–3 s i brzina polarizacije 2–50 mV/s. Intenzitet struje pika raste sa porastom vremena isticanja kapi i porastom amplitude pulsa, ali oblik (oštrina) pika se deformiše sa povećanjem brzine promene potencijala. Zbog toga su odabrani optimalni uslovi merenja: $v = 5$ mV/s; $\Delta E = 50$ mV i $t = 3$ s [91].

Kalibraciona kriva dobijena DPP metodom pri optimalnim eksperimentalnim uslovima za model-rastvora tiametoksama pokazuje linearnu zavisnost u ppb oblasti. Kontrola preciznosti metode je izvršena na tri nivoa koncentracija (58,8 ng/cm³, 112 ng/cm³ i 470 ng/cm³), pri čemu maksimalna RSD vrednost nije premašivala 1,6 %. Vrednosti LOD i LOQ za tiametoksam (tablica 10) su na istoj skali osetljivosti kao što su to našli i drugi autori primenom DPP [52] i adsorptivne pravougaone stripping voltametrije [47,53] za određivanje imidakloprida.

Tablica 10. Uporedni analitički parametri DPP, UV-spektrofotometrijske i HPLC/DAD metode za određivanje tiametoksama [91]

Parametri	Metode određivanja		
	Diferencijalna pulsna polarografija	UV- spektrofotometrija	HPLC/DAD
Linearni opseg [ng/cm ³]	31,1 - 470	260-30.000	280-25.000
Odsečak	0,00 nA	-0,0013	0,569
Koeficijent pravca	0,0212 nA cm ³ /ng	5,3 x 10 ⁻⁵ cm ³ /ng	0,0673 cm ³ /ng
Koeficijent korelacije	0,999	0,999	0,999
LOD [ng/cm ³]	9,3	80	85
LOQ [ng/cm ³]	31,1	260	280
Preciznost [RSD %] ^a	1,6	0,8	1,9

^a Broj merenja (n = 6)

Rezultati DPP merenja sadržaja tiametoksama su upoređeni sa spektrofotometrijskim rezultatima i rezultatima HPLC/DAD metode. Pokazalo se da je LOD vrednost dobijena

primenom DPP metode za skoro jedan red veličine (tačnije, 9 puta) niža od odgovarajućih vrednosti dobijenih pri spektrofotometrijskim i HPLC/DAD određivanjima, a istog je reda veličine sa rezultatima dobijenim HPLC/TLS metodom [91].

Analiza komercijalnih formulacija. Ispitivane su tri različite komercijalne formulacije tiametoksama - Actara 25-WG, Cruiser OSR 322 FS i Cruiser 350 FS. Tiametoksam je određen metodom standardnog dodatka radi eliminisanja efekata matriksa. DPP krive snimljene pri određivanju tiametoksama u uzorku Actara 25-WG, kao i kriva za slepu probu, su prikazane na slici 27A. Rezultati određivanja, predstavljeni u tablici 11, pokazuju dobro slaganje rezultatima komparativnih metoda - spektrofotometrije i HPLC/DAD, kao i sa nominalnim sadržajem navedenim od strane proizvođača (Syngenta) [91].

Tablica 11. Sadržaj tiametoksama u odabranim formulacijama pesticida ($n = 6$) [91]

Formulacija pesticida	Metoda određivanja					
	Diferencijalna pulsna polarografija		UV- spektrofotometrija		HPLC/DAD	
	nađeno	RSD	nađeno	RSD	nađeno	RSD
	[g/kg]	[%]	[g/kg]	[%]	[g/kg]	[%]
Actara 25-WG ^a	248,3	1,8	251,5	1,1	249,7	1,9
Cruiser OSR 322FS ^b	277,5	2,4	289,1	2,2	282,4	2,5
Cruiser 350 FS ^c	352,6	2,1	360,1	2,1	356,1	2,2

Broj merenja ($n = 6$)

Nominalne vrednosti sadržaja aktivne komponente tiametoksam u formulacijama pesticida:

^a 250 g tiametoksam po kg,

^b 280 g tiametoksam po dm^3 ,

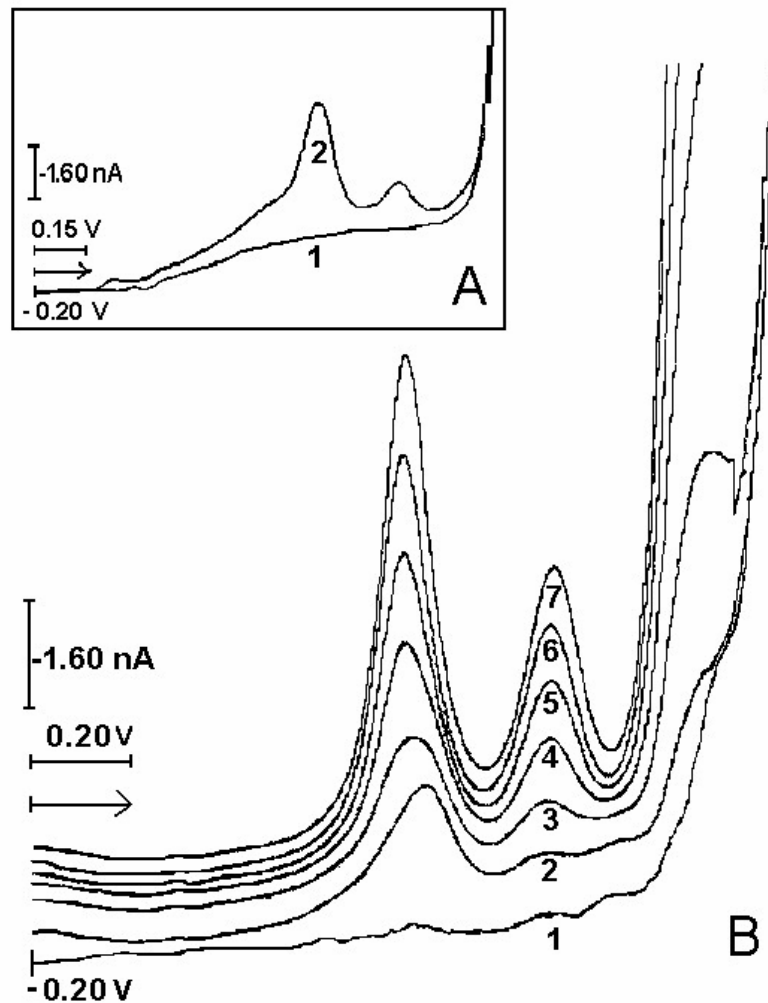
^c 350 g tiametoksam po dm^3 .

Analiza realnog uzorka. Tretirani i "spajkovani" uzorci sa sadržajem tiametoksama su analizirani razrađenom DPP i uporednom HPLC/DAD metodom. Uzorci krompira i kukuruza su pripremljeni i analizirani kao što je opisano u Eksperimentalnom delu rada.

Prinos tiametoksama za "spajkovane" uzorke je varirao u intervalu 86–95% sa RSD manjom od 5,5 % (tablica 12). Kao što se može videti sa slike 27B (krive 1 i 2), tiametoksam se može odrediti bez nepoželjenih interferencija ekstrakta matriksa. Za određivanje rezidua tiametoksama primenjena je metoda standardnog dodatka (krive 3–7). Slične DPP krive su dobijene i za uzorke kukuruza. U realnim uzorcima direktna analiza je moguća ako je sadržaj tiametoksama 40 ng/cm³ ili veći. Radi određivanja nižeg sadržaja potrebna je faza prethodnog koncentrisanja. Nasuprot DPP metodi, hromatografske i spektrofotometrijske metode određivanja tiametoksama u realnim uzorcima je moguće primeniti samo uz prečišćavanje primarnih uzoraka [91].

U uzorcima krompira i kukuruza nađeno je 0,07 mg/kg i 0,12 mg/kg tiametoksama, redom (tablica 12). Rezultati dobijeni DPP metodom se slažu sa podacima dobijenim HPLC/DAD metodom [91].

Pri određivanju sadržaja tiametoksama u komercijanim formulacijama dobijena je bolja preciznost merenja nego u slučaju uzoraka kukuruza i krompira (tablice 11 i 12). S druge strane, preciznost je nešto niža u slučaju određivanja tiametoksama u sredstvima za močenje (Cruiser OSR 322 FS i Cruiser 350 FS) u poređenju sa Actara 25-WG, što je verovatno posledica uzorkovanja viskoznih i lepljivih uzoraka Cruiser-a. Nešto niži prinos i relativno visoka RSD u slučaju određivanja tiametoksama iz realnih uzoraka (tretiranih i "spajkovanih") se mogu objasniti gubicima nastalim tokom ekstrakcije [91].



Slika 27. DP polarogrami tiametoksama u uzorcima Actara 25-WG (A) i krompira (B). A) Actara 25-WG uzorak: 1) slepa proba, 2) 117 ng/cm^3 tiametoksam; pH 8,0 i B) uzorci krompira: 1) ekstrakt slepe probe, 2) realni uzorak ($72,8 \text{ ng/cm}^3$), 3-7) DP polarogrami realnog uzorka sa standardnim dodacima tiametoksama u rastućem nizu: 3) 10 ng/cm^3 ; 4) 50 ng/cm^3 ; 5) 100 ng/cm^3 ; 6) 200 ng/cm^3 ; 7) 250 ng/cm^3 ; pH 8,0. Krive 1-7 su pomerene u vertikalnom pravcu [91]

Tablica 12. Sadržaj tiametoksama u nekim realnim uzorcima [91]

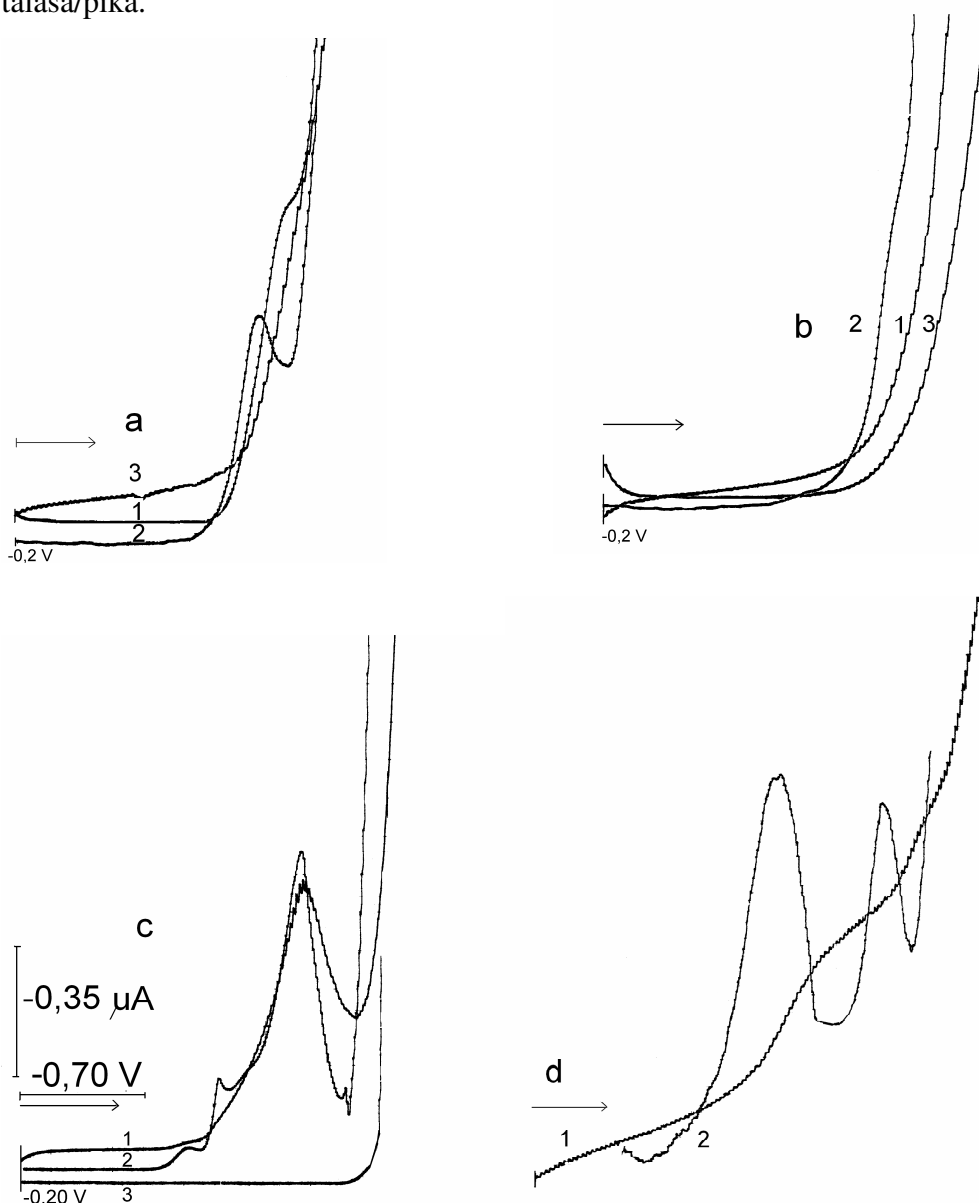
Uzorci	Metoda određivanja			
	DPP		HPLC/DAD	
	krompir	kukuruz	krompir	kukuruz
Realni uzorak [mg/kg]	0,07	0,12	0,07	0,11
RSD [%]	5,5	3,8	5,7	4,2
Tretiran uzorak [mg/kg]	0,05	0,05	0,05	0,05
Prosečni prinos* [%]	86,9	93,2	87,2	94,0
RSD [%]	4,9	3,1	5,3	3,6
Tretiran uzorak [mg/kg]	0,5	0,5	0,5	0,5
Prosečni prinos* [%]	91,4	94,8	92,0	94,3
RSD [%]	3,2	2,7	3,4	2,8

*prosek 3 ponavljanja.

Zadovoljavajući prinos i podaci za RSD pokazuju dobru tačnost i preciznost razrađene DPP metode. Mogućnost brzog obnavljanja elektrode (SMDE) sprečava ili smanjuje adsorpciju nečistoća na površini, i čime se, donekle, sprečava pasivacija elektrode. Razrađena metoda je veoma osetljiva, jednostavna, relativno brza i jeftina, i predstavlja odličnu alternativu za brzo određivanje tiametoksama u komercijalnim formulacijama i realnim uzorcima. Zbog navedenih prednosti ova metoda može da nađe i dalje primene u praćenju/testiranju kvaliteta životne sredine [91].

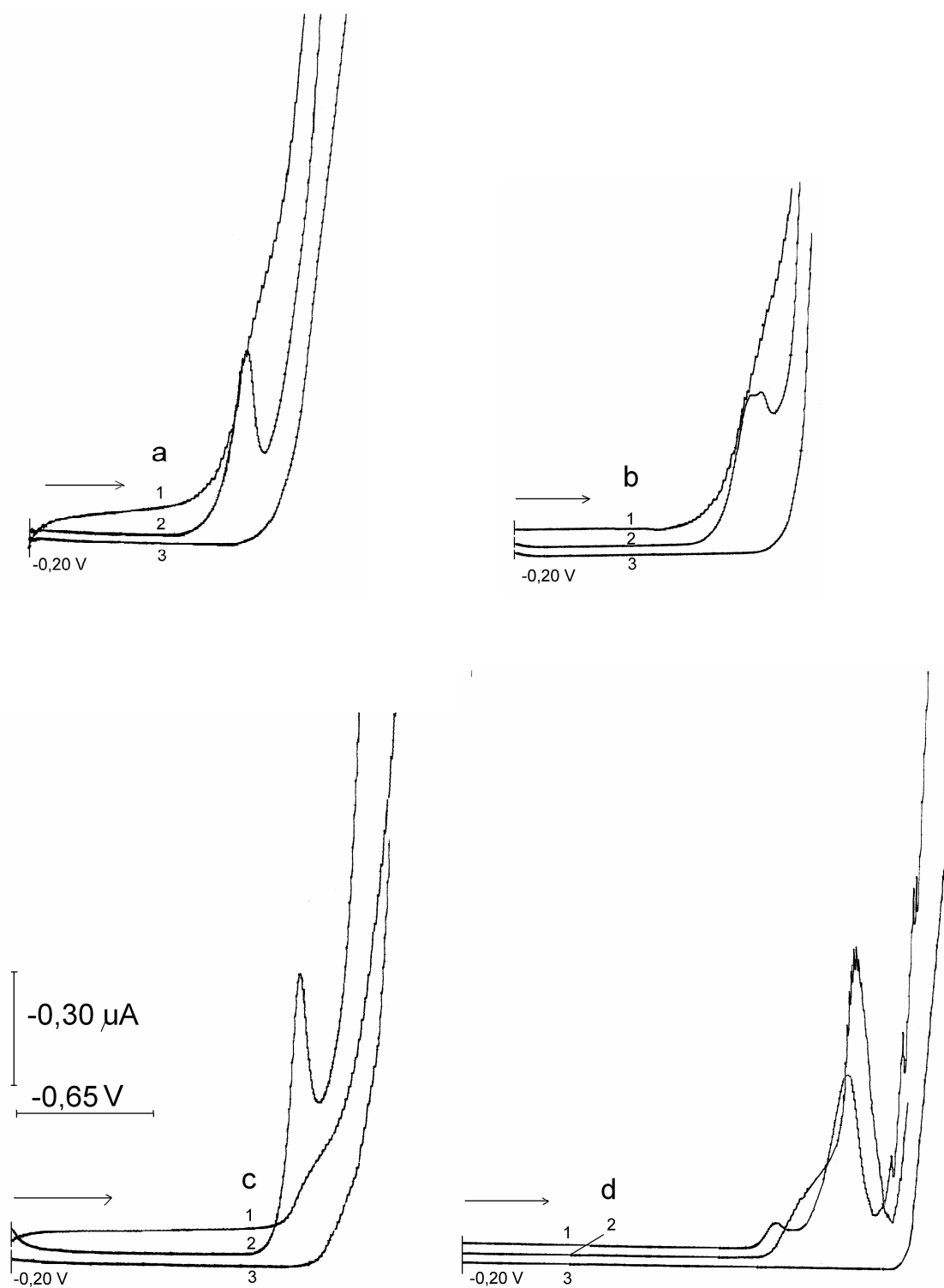
Polarografijska karakterizacija neonikotinoidea sa cijanoiminskom funkcionalnom grupom. Cijanoiminska funkcionalna grupa je elektroaktivna, sa negativnijim redoks potencijalom od nitroguanidinske grupe. Na osnovu snimljenih DC i DP polarograma (slika 28) može se zapaziti da se acetamiprid redukuje u kiseloj sredini pri pH 2,0 i 3,0 (slika 28A, krive 1 i 2). U oblasti pH 4,0-6,0 dolazi do preklapanja redukcionog signala sa signalom izdvajanja vodonika (slika 28B, krive 1 i 2). S druge strane, pri pH 7,0 i 8,0, pored osnovnog pika redukcije, prisutan je i veoma intenzivni, verovatno katalitički signal redukcije protona (slika 28C, krive 1 i 2). DCP i DPP krive za rastvor pH 9,0 (slika

28D, krive 1 i 2) menjaju svoj oblik, pri čemu se mogu zapaziti dva redukciona talasa/pika.



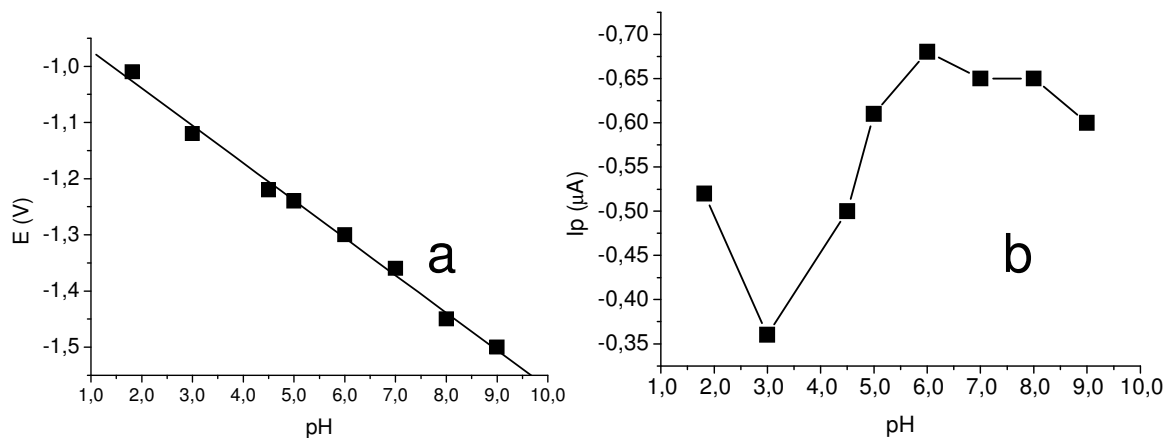
Slika 28. DC (1) i DPP (2) krive redukcije acetamiprida ($1 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$) u Britton-Robinson puferu različite pH vrednosti: a) 2,0 b) 4,0, c) 7,0 i d) 9,0. $v = 5 \text{ mV/s}$. Kriva 3 je slepa proba

Tiakloprid (slika 29) pokazuje donekle slično polarografsko ponašanje kao acetamiprid, s tim da pri pH 3,0 i 4,0 nema potpunog gubitka redukcionog talasa. Pri pH 5,0-8,0 javlja se redukциони signal većeg intenziteta nego u kiseloj sredini. U baznoj sredini pri pH 9,0 tiakloprid ima isti redukциони talas kao acetamiprid pri pH 7,0 i 8,0. U slučaju tiakloprida postoji mogućnost određivanja E_p -pH i I_p -pH zavisnosti.



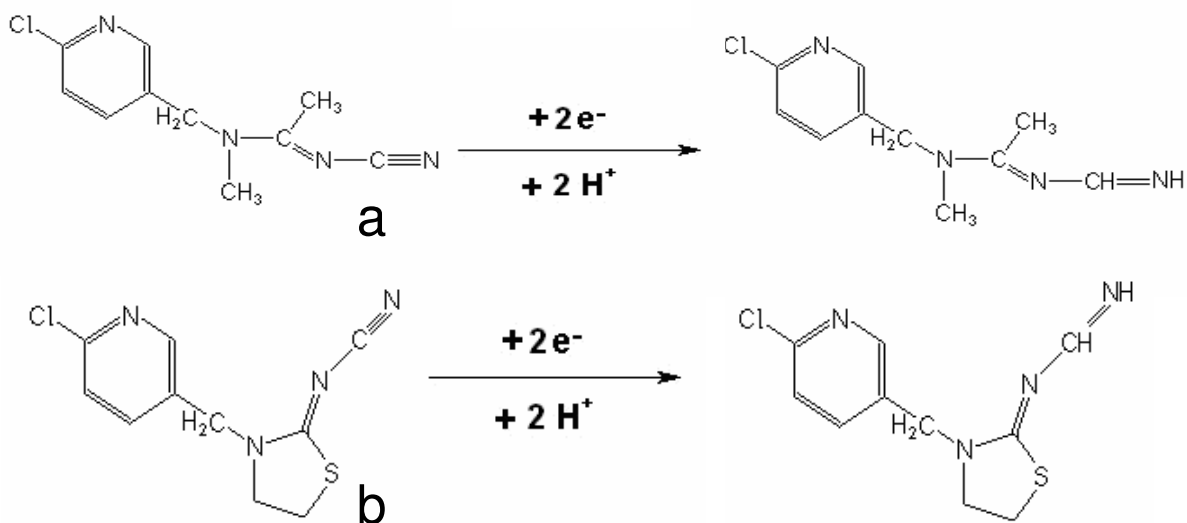
Slika 29 DC (1) i DPP (2) krive redukcije tiakloprida ($1 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$) u Britton-Robinson puferu različite pH vrednosti: a) 2,0 b) 4,0, c) 7,0 i d) 9,0. $v = 5 \text{ mV/s}$. Kriva 3 je slepa proba

Koeficijent pravca $E_{1/2}$ -pH krive za redukcionu talas tiakloprida je 68 mV/pH (slika 30A), što ukazuje na učešće protona u redukciji. Za svrhe DPP, optimalna pH vrednost sredine je 6,0 (slika 30B).



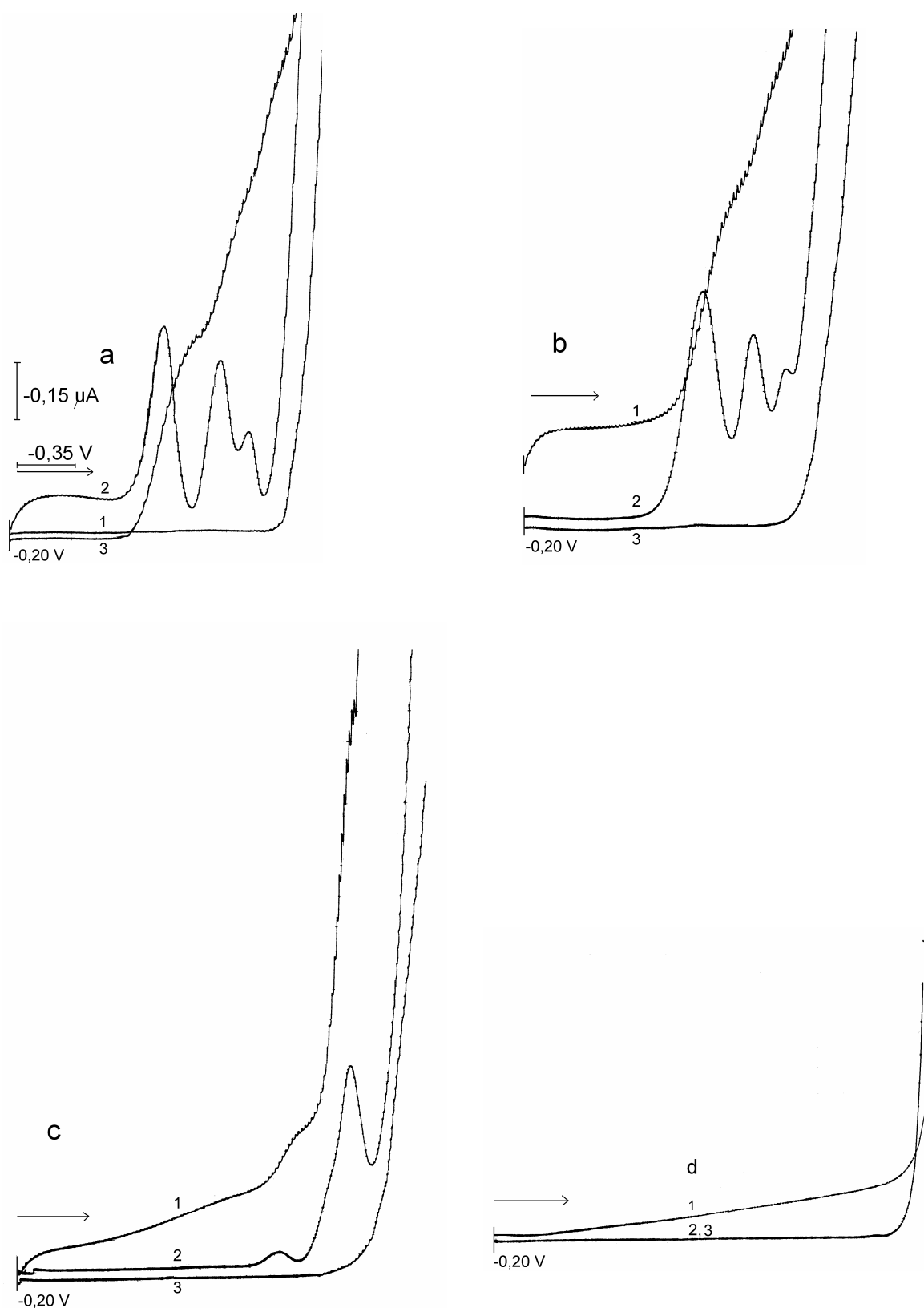
Slika 30. Uticaj pH vrednosti sredine na $E_{1/2}$ (a) i I_p (b) rastvora tiakloprida

Pretpostavljeni mehanizam redukcije se može predstaviti shemom 14:



U slučaju 6-hloronikotinske kiseline (slika 31) u kiselj sredini mogu se razlikovati tri DCP i DPP talasa na krivima. U neutralnoj sredini dolazi do izmene oblika polarograma, a u baznoj sredini se ne može zapaziti redukcionu pik.

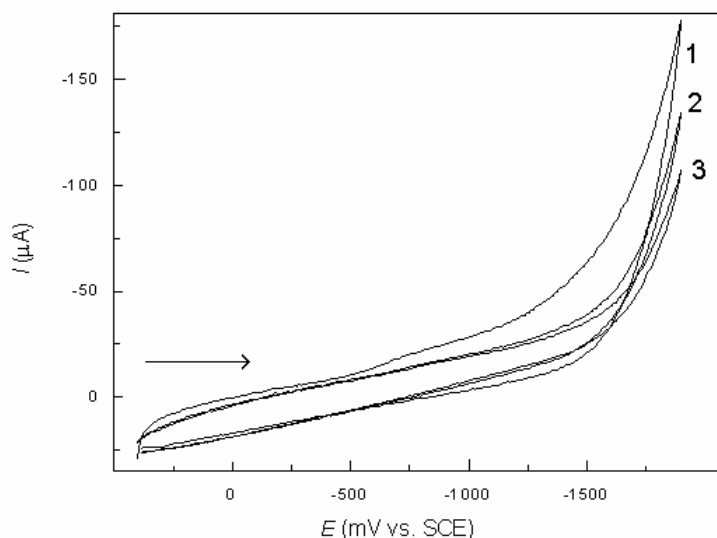
Radi detaljnijeg proučavanja elektrohemijjskih reakcija planiraju se eksperimenti makroelektrolize uz dokazivanje strukture proizvoda elektrohemijjske redukcije.



Slika 31. DC (1) i DPP (2) krive redukcije 6-hloronikotinske kiseline ($1 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$) u Britton-Robinson puferu različite pH vrednosti: a) 2,0 b) 4,0, c) 7,0 i d) 9,0. $v = 5 \text{ mV/s}$. Kriva 3 je slepa proba

4.3.2. Voltometrija na elektrodi od staklastog ugljenika

Optimizacija metode. Kao što je to već ranije bilo opisano [104-106], a kasnije više puta potvrđeno, uključujući i nedavno objavljeni rad autora *Chen-a i McCreery-a* [103, 121], način pripreme površine GCE je značajan i do te mere da praktično određuje elektrohemijsku/analitičku primenu elektrode. U cilju voltametrijske karakterizacije i pronalaženja što jednostavnije, tačnije, osjetljivije, reproduktivnije i preciznije elektroanalitičke metode određivanja tiametoksama i imidakloprida ispitivane su dve jednostavne metode aktivacije površine GCE u intervalu pH 2,0-9,0 i to mehaničke i kombinovane metode, koja obuhvata uzastopnu mehaničku i elektrohemijsku *ex situ* pripremu. Skoro svi postupci aktivacije površine GCE počinju mehaničkom obradom, tj. poliranjem. Ona može da bude samostalna metoda [122] ili se zbog prirode ispitivanog sistema primenjuje u kombinaciji sa drugom tehnikom, npr. elektrohemijskom aktivacijom, što podrazumeva ciklično menjanje potencijala GCE u okviru dovoljno širokog opsega potencijala. [104, 106]. Sa slike 32 se može videti da u slučaju rastvora osnovnog elektrolita pripremljenog od Britton-Robinson pufera pH 7,0 elektrohemijski pretretirana elektroda (kriva 2) pokazuje oko 150 mV nižu prenapetost izdvajanja vodonika nego sveže polirana elektroda (kriva 1), pri čemu je i osnovna struja značajno niža. Inače, ova pojava je prisutna u čitavom intervalu ispitivanih pH vrednosti. U okviru *ex situ* pretretmana, upoređujući efekat različitog broja primenjenih ciklusa u osnovnom elektrolitu, može se zaključiti da su voltamogrami dobijeni nakon desetog (kriva 2) i tridesetog (kriva 3) uzastopnog ciklusa veoma slični [123].



Slika 32. Efekat mehaničke i kombinovane aktivacije GCE u rastvoru osnovnog elektrolita pH 7,0: 1) sveže polirana elektroda, 2) deseti ciklus, 3) trideseti ciklus, $v = 500 \text{ mV/s}$ [123]

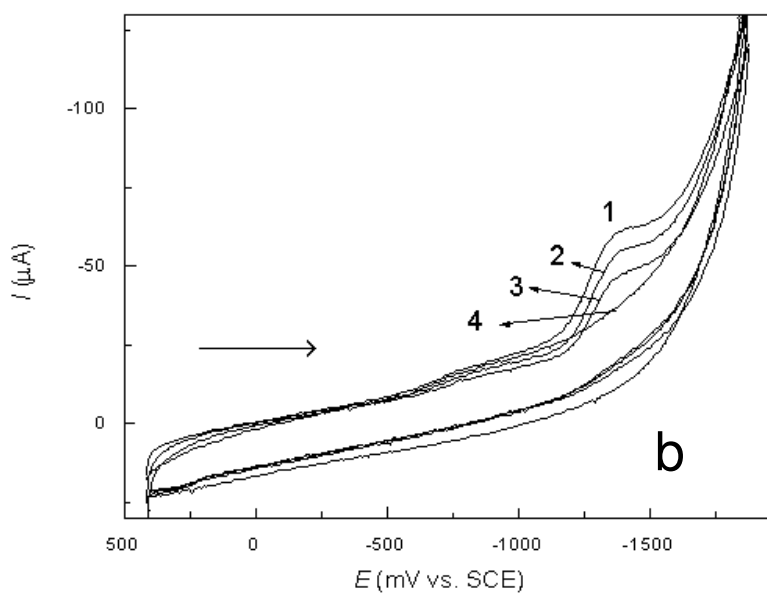
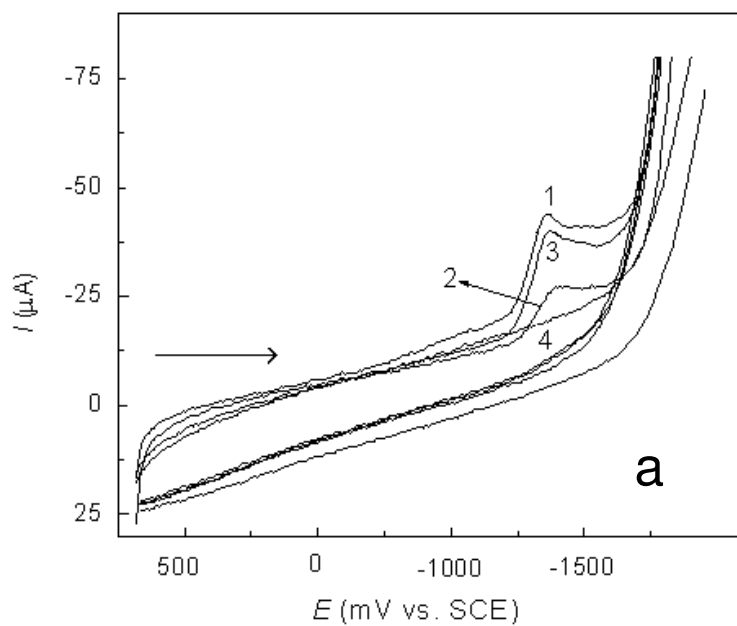
Na osnovu povoljnijeg oblika i intenziteta osnovne struje dobijene kombinovanim pretretmanom, ova metoda ima prednost nad mehaničkim kondicioniranjem [123].

Kao što se može videti sa slike 33, katodni pik ispitivanog molekula se javlja na oko -1,2 V, bez oksidacionog pika u povratnom smeru polarizacije, što potvrđuje ireverzibilnu prirodu redukcije (slika 33A i B). Veći broj uzastopnih ciklusa potencijala GCE u opsegu potencijala elektrohemijske aktivacije u rastvorima ispitivanih jedinjenja uzrokuje pomeranje voltametrijskih maksimuma ka negativnijim vrednostima i opadanje intenziteta struje redukcije. Takođe, čak i nakon mešanja rastvora, prisutno je značajno opadanje intenziteta struje redukcije, što ukazuje na mogućnost blokiranja elektroaktivnih centara usled pretpostavljene adsorpcije ispitivanih molekula na površini radne elektrode u oba slučaja [123].

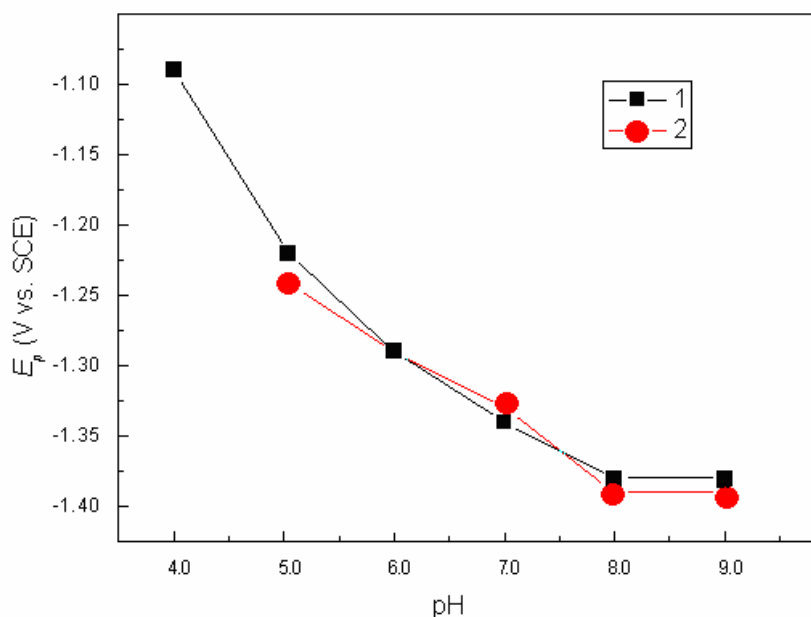
Na prisutan afinitet tiametoksama i imidakloprida prema GCE ukazuje i činjenica da nakon 30 minuta stajanja elektrode u rastvorima pomenutih analita dolazi do potpunog gubitka redukcionog pika i promene bazne linije [123].

Upoređujući RSD površine redukcionih pikova niza voltamograma snimljenih za model-rastvorima imidakloprida i tiametoksama, primenom vlažno polirane radne i kombinovano pretretirane GCE može se zaključiti da kombinovani pretretman signale čini dva puta reproduktivnijim (tablica 13). U slučaju suvo polirane elektrode dobijeni signali su intenzivniji, ali nedovoljno reproduktivni. Ranija istraživanja su pokazala da se pri redukciji nitrobenzola takođe dobija reproduktivniji pik primenom kombinovanog pretretmana elektrode [124].

S obzirom na činjenicu da voltametrijsko ponašanje imidakloprida i tiametoksama zavisi i od pH sredine, neophodno je bilo izvršiti detaljnija ispitivanja u širokom opsegu pH vredosti osnovnog elektrolita, Britton-Robinson pufera. Pri pH vrednosti nižoj od 3,0 u slučaju imidakloprida se ne zapaža redukcionni pik (slika 34). S druge strane, redukcionni pik tiametoksama se javlja samo pri pH iznad 4,0. Pomeranje maksimuma potencijala pika pokazuje linearnu zavisnost od pH vrednosti sa prevojnou tačkom na pH 8,0 za oba insekticida, a intenzitet struje pika značajnije raste od pH 7,0. Imidaklopid lako hidrolizuje u baznoj sredini, dok je u neutralnoj i kiselijoj sredini stabilniji. Stoga je pH-vrednost 7,0 uzeta kao optimalna za određivanje imidakloprida. Slična priroda zavisnosti E_p -pH za oba neonikotinoidea pri i pH iznad 4,0 ukazuje na veoma slično elektrohemijsko ponašanje ovih jedinjenja u pomenutoj oblasti pH vredosti.



Slika 33. Uzastopno snimljeni ciklički voltamogrami $1 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$ imidakloprida (a) i $1 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$ tiametoksama (b) pri pH 7,0, $v = 500 \text{ m/s}$: 1) prvi; 2) drugi; 3) treći ciklus i 4) slepa proba [123,125]



Slika 34. Zavisnost maksimuma potencijala od pH vrednosti osnovnog elektrolita za imidakloprid (1) i tiametoksam (2), $c = 1 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$, $v = 500 \text{ mV/s}$ [123]

Kriva $\log i_p$ - $\log v$ pokazuje linearnu zavisnost u intervalu brzine polarizacije 25-200 mV/s pri pH 7,0, sa koeficijentom pravca 0,98 za imidakloprid i 0,97 za tiametoksam, redom. Maksimumi potencijala su pomereni u negativnom smeru prema sledećim jednačinama: $E_p \text{ (V)} = 1,2 + 0,002 v \text{ (mV/s)}$, $r = 1,00$ za imidakloprid i $E_p \text{ (V)} = 1,1 + 0,01 v \text{ (mV/s)}$, $r = 0,98$ za tiametoksam. Pri većim brzinama polarizacije intenzitet struje raste brže. Sve navedeno takođe potvrđuje ireverzibilnu prirodu elektrodnog procesa. Dobro definisan, reproduktivan i intenzivan pik se dobija pri brzini polarizacije od 500 mV/s, što je i primenjeno za određivanje neonikotinoide ovim postupkom [123].

Na osnovu literature [52, 53], redukcija imidakloprida na živinoj elektrodi se odvija u dva pika u intervalu potencijala pH 2,0-11,0. Ovi signali su u saglasnosti sa onima koji su opisani ranije za redukciju nitro-grupe nekih pesticida. U strukturi gore-ispitivanih neonikotinoide verovatno je nitro-grupa najpodložnija redukciji, pa se i dobijeni pikovi mogu pripisati redukciji te funkcionalne grupe.

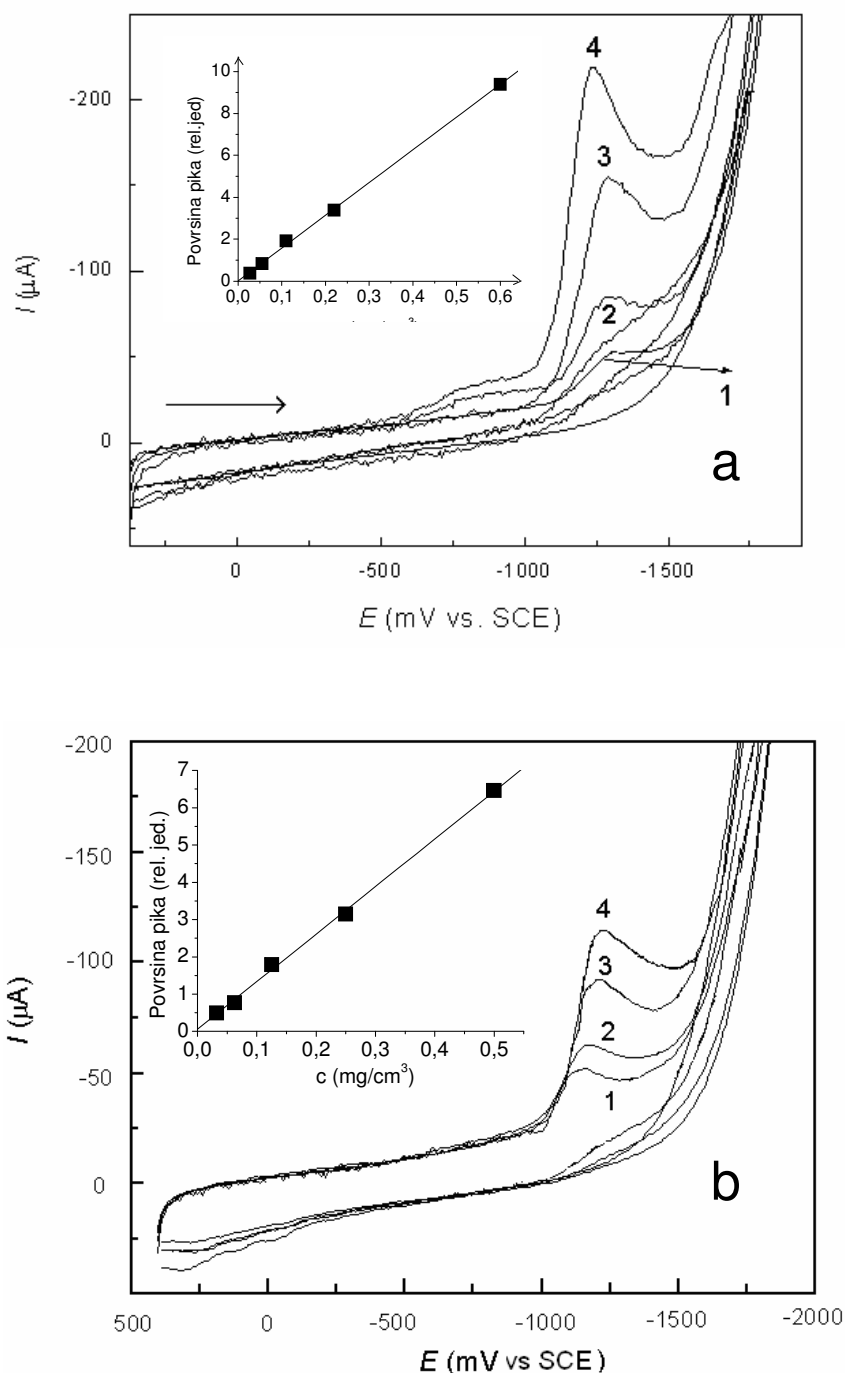
Voltametrijsko određivanje imidakloprida i tiametoksama. Kvantitativno određivanje oba neonikatinoida se zasniva na linearnoj zavisnosti površine pika od koncentracije. (slika 35 i tablica 13). U optimizovanom postupku pri pH 7,0 i 500 mV/s, voltametrijski odzivi pokazuju linearnu zavisnost u intervalu koncentracija od 0,025 do 0,50 mg/cm³ za oba neonikotinoidea (tablica 13).

Tablica 13. Analitički parametri voltametrijske metode određivanja imidakloprida i tiametoksama primenom GCE [123]

Parametri	Ispitivana supstanca	
	Imidakloprid	Tiametoksam
Dinamički interval koncentracija [mg/cm ³]	0,028-0,50	0,028 – 0,50
Odsečak [rel.jed.]	0,018	0,058
Koeficijent pravca [rel.jed/[mg/cm ³]]	15,62	12,75
Koeficijent korelacije	0,999	0,999
LOD [mg/cm ³]	0,0077	0,0094
LOQ [mg/cm ³]	0,026	0,028
Preciznost [RSD%] ^a	2,1	2,5

^aBroj merenja (n = 6).

Ispitivanje preciznosti je vršeno primenom dve koncentracije (0,060 i 0,50 mg/cm³) kako imidakloprida, tako i tiametoksama. Maksimalna vrednost za RSD je 2,1 i 2,5% za imidakloprid i tiametoksam, redom (tablica 13) [123].



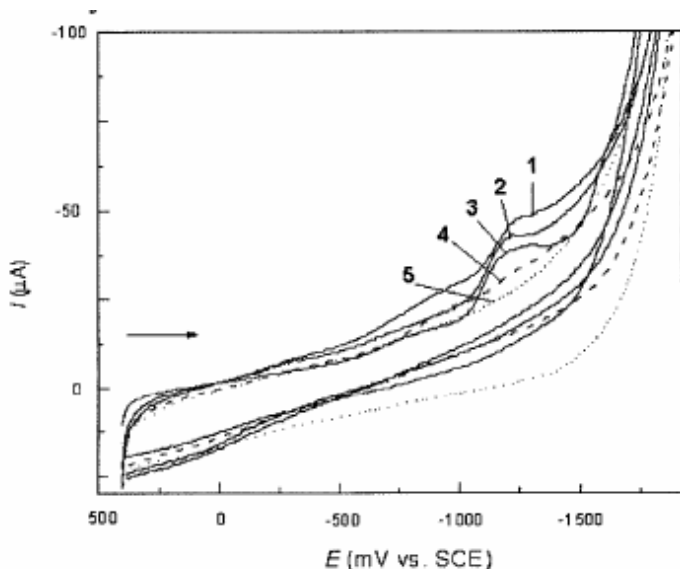
Slika 35. Voltamogrami ($v = 500 \text{ mV/s}$) snimljeni primenom GCE za različite koncentracije: a) imidakloprida (1) 0,050; 2) 0,11; 3) 0,22 i 4) 0,40 mg/cm^3 [123] i b) tiametoksama (1) 0,032; 2) 0,062; 3) 0,12 i 4) 0,25 mg/cm^3 . pH 7,0

Određivanje imidakloprida i tiametoksama u uzorcima krompira primenom GCE.

Primenljivost voltametrijskog postupka za određivanje imidakloprida i tiametoksama je testirana na različitim uzorcima krompira. Prinos ekstrakcije imidakloprida/tiametoksama u intervalu od 95 to 102 % iz "spajkovanih" (0,05 mg/kg and 0,1 mg/kg) uzoraka se

pokazao zadovoljavajućim pri određivanju ovih neonikotinoidea. Kao što se može videti sa slike 36, matriks krompira dobijen iz ekstrakta neprskanog krompira (kriva 5) ne pokazuje blokirajući efekat na elektrodnu površinu i ne sadrži druge elektroaktivne vrste koje bi onemogućavale ili ometale voltametrijsko određivanje ovih neonikotinoidea. Kalibraciona kriva ima linearnu zavisnot u istom opsegu kao i kod model-sistema. Na osnovu voltametrijskih određivanja, krompir sa eksperimentalnih polja prskan formulacijama pesticida (slika 36, krive 1 i 3) sadrži dvostruku veću količinu od dozvoljene (0,05 mg/kg). Uzorak nabavljen na gradskoj pijaci sadrži 0,09 mg imidakloprid po kg krompira (slika 36, kriva 2) [123].

Ispitivan je takođe i uticaja drugih insekticida prisutnih na našem tržištu (Z Stop, Bancol 50-WP), korišćenih u režimu prskanja krompira, na oblik voltamograma. Zaključeno je da ne postoje značajnije interferencije signala, što se može objasniti odsustvom elektroaktivne grupe slične nitro-guanidinskoj grupi koja bi se, prema tome, redukovala pri bliskom potencijalu [123]. Takođe se ne mogu zapaziti redukcioni signali nakon kuvanja krompira, što je posledica termičke nestabilnosti/razgradnje tiametoksama na visokim temperaturama (100 °C). Dobar prinos i niska relativna standardna devijacija metode su razlozi visokoj tačnosti i preciznosti metode. Metoda je jednostavna, laka, pristupačna, ekološki povoljna i zato je pogodna za analitičke svrhe [123].



Slika 36. Voltamogrami uzoraka krompira: uzorak tretiran primenom Actara 25-WG (1), nasumice odabran uzorak na gradskoj pijaci Novog Sada, (2), uzorak tretiran primenom Confidor 200-SL (3), uzorak tretiran sa Bancol 50-WP i bioinsekticidom Z Stop, (4), i netretirani uzorak (5), pH 7,0, $v = 500 \text{ mV/s}$ [123]

Tokom ispitivanja redukcije acetamiprida i tiakloprida nisu zapaženi redukcioni pikovi ovih jedinjenja, što se može objasniti negativnijim potencijalom redukcije cijano grupe od granice opsega primenljivog potencijala GCE.

4.3.3. Voltometrija na bizmut-film elektrodi

Elektroda od bizmuta je već od ranije poznata i rado je bila primenjivana za voltametrijska određivanja [126-130]. Renesansa primene različitih oblika "bizmut-elektroda" traje već punih šest godina pre svega sa ciljem pronalaženja ekološki pogodnih zamena elektrodama na bazi ugljenika modifikovanih filmom od žive [131, 132].

Priprema i karakterizacija BiFE. Kao što je poznato, granica detekcije i reproduktivnost voltametrijskih merenja zavisi od morfologije elektrodne površine formirane depozicijom filma, o čemu postoje detaljni literaturni podaci koji se odnose na film od žive [133, 134]. Na osnovu literaturnih podataka [135-144] BiFE se primarno primenjuje za anodna određivanja. Iako je katodna analitička primena BiFE već poznata [145-147], nema dovoljno informacije o pripremi BiFE za direktna katodna određivanja organskih jedinjenja. Zato su izvršeni eksperimenti optimizacije uslova (priprema GCE, sastav rastvora za elektrodepoziciju, potencijal elektrodepozicije, kondicioniranje BiFE) za dobijanje filma primenljivog u analitičke svrhe [148-150]. U tim istraživanjima su primenjene dve elektrohemijske tehnike- ciklička voltometrija i hronoamperometrija. Naime, one služe kako za pretretman GCE i elektrodepoziciju filma od bizmuta, tako i kao načini kontrole kvaliteta i kondicioniranje filma. SEM metoda spregnuta sa EDS detektorom je primenjen kao komplementarna tehnika za ispitivanje morfologije elektrodne površine BiFE i za praćenje raspodele elemenata na površini.

Postupci mehaničke i elektrohemijske pripreme su bili primenjeni u svrhu kondicioniranja GCE pre elektrodepozicije filma. Hronoamperometrijske krive snimljene za proces elektrodepozicije pokazuju da sinergizam oba tipa kondicioniranja vodi upravo do najbolje pripremljene GCE površine za reproduktivno dobijanje filma. Može se pretpostaviti da se kombinovanim pretretmanom postiže kako čišćenje površine, tako i kondicioniranje funkcionalnih grupa na površini GCE.

Važan parametar koji utiče na tip obrazovanja filma je i sastav rastvora za elektrodepoziciju. Najpristupačniji izvori Bi(III) jona su jednostavne soli kao što su $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ i BiCl_3 . Ipak, nekompleksirani Bi(III) joni veoma lako hidrolizuju, obrazujući u vodi nerastvorljiva jedinjenja (npr. BiOCl), koji se uglavnom dobro rastvaraju u koncentrovanijim rastvorima HCl. Zbog sprečavanja hidrolize, samo kisela sredina može da bude odgovarajuća za elektrodepoziciju. Dodatkom bromida ili hlorida u zakišljeni rastvor, Bi(III) joni grade stabilne komplekse. Hronoamperometrijske krive i

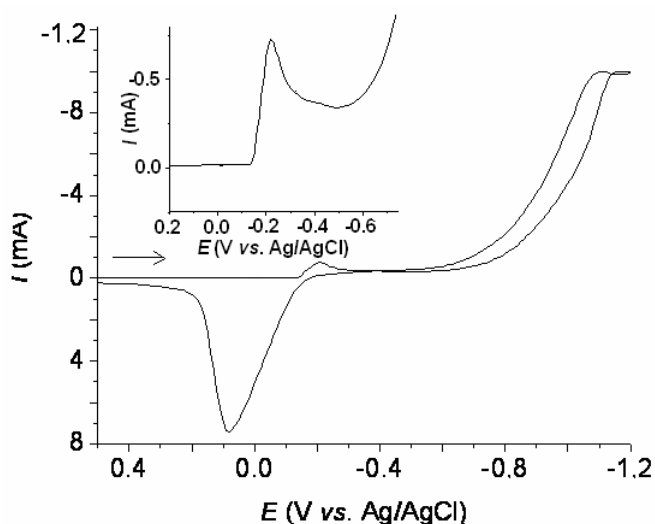
SEM ispitivanja površine pokazuju da je rastvor sastava $0,02 \text{ mol/dm}^3 \text{ Bi(NO}_3)_3$, $1 \text{ mol/dm}^3 \text{ HCl}$ i $0,5 \text{ mol/dm}^3 \text{ KBr}$ najpogodniji za brzu i reproduktivnu depoziciju filma bizmuta.

Ciklički voltamogrami (slika 37) pokazuju da se zadovoljavajuće pokrivanje GCE supstrata bizmut-filmom može postići na potencijalu depozicije $< -0,20 \text{ V}$. Zbog relativno visoke koncentracije kompleksa bizmuta, elektrodepozicija se izvodi bez mešanja rastvora, a proces je, kao što je već naglašeno, praćen/kontrolisan hronoamperometrijski. Na osnovu snimljenih hronoamperometrijskih krivih (slika 38) može se kontrolisati/računati kvalitet bizmut-filma i lako se mogu otkriti greške tokom elektrolize. Na osnovu literaturnih podataka, za direktna katodna određivanja najpogodniji je potencijal elektrodepozicije od $-1,00 \text{ V}$ [146, 147] i $-0,28 \text{ V}$ za katodnu adsorptivnu striping voltometriju [145]. Ipak, naši eksperimenti pokazuju da je optimalni potencijal elektrodepozicije $-0,25 \text{ V}$. Naime, ciklički voltamogrami snimljeni u istom rastvoru osnovnog elektrolita (Britton-Robinson pufer pH 8,0) primenom BiFE pripremljenih na $-0,25 \text{ V}$ i $-0,28 \text{ V}$ pokazuju da je osnovna struja pet puta manja u slučaju elektrodepozicije pri negativnijim vrednostima potencijala. To svakako utiče na osetljivost metode pri određivanju elektroaktivne vrste, koja upravo u tom intervalu ima redukcionni pik [150].

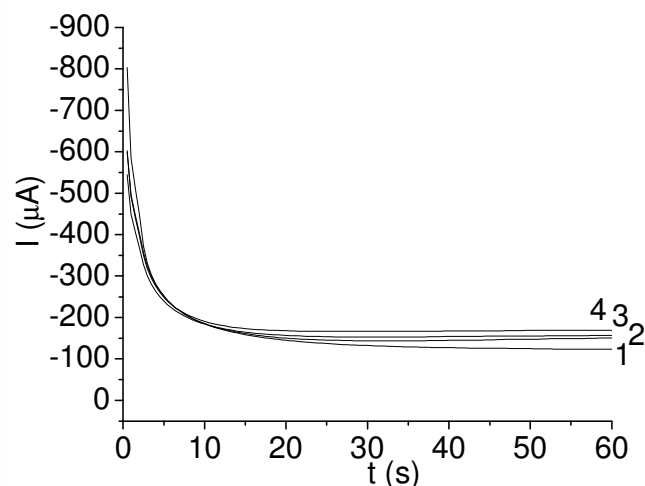
Paralelno pomeranje bazne linije u toku uzastopnih merenja je zapaženo tokom primene BiFE pripremljene na $-0,28 \text{ V}$ [145]. Nestabilnost bazne linije je verovatno posledica formiranja oksidnog sloja na površini BiFE, i ta pojava otežava pouzdano određivanje tiametoksama. Zato smo, radi stabilizovanja bazne linije, primenili kondicioniranje BiFE, tj. izvršili cikliranje potencijala u osnovnom elektrolitu (slika 39). Film dobijeni pri $-0,25 \text{ V}$ ostaje stabilan nakon kondicioniranja, sa veoma malom osnovnom strujom i sa stabilnom baznom linijom, čak i nakon 75 uzastopnih merenja [150]. Radi bolje fizičke karakterizacije BiFE, SEM mikrografi su snimljeni za filmove dobijene pri različitim vrednostima potencijala elektrodepozicije. Ranija mikroskopska [148,150, 151, 152] i spektroelektrohemijska [151] istraživanja su pokazala da se bizmut izdvaja u različitim geometrijskim strukturama, u zavisnosti od potencijala elektrodepozicije iako je primenjena ista količina elektriciteta. Slike 40-42, snimljene pri različitim uvećanjima, prikazuju mikrografe koji odgovaraju čistoj, pripremljenoj površini GCE (slika 40a i b) i filmovima dobijenim pri $-0,25 \text{ V}$ (slika 40c i d i slika 41) i pri $-1,0 \text{ V}$ (slika 40e, f i slika 42), pri istom vremenu elektrodepozicije. Očigledno je da su formirani filmovi u slučajevima slike 41 i 42 različiti. Naime, film pripremljen na

-0,25 V se može okarakterisati nukleusima dimenzija 16-40 μm koji su i stohastički raspoređeni po površini [150].

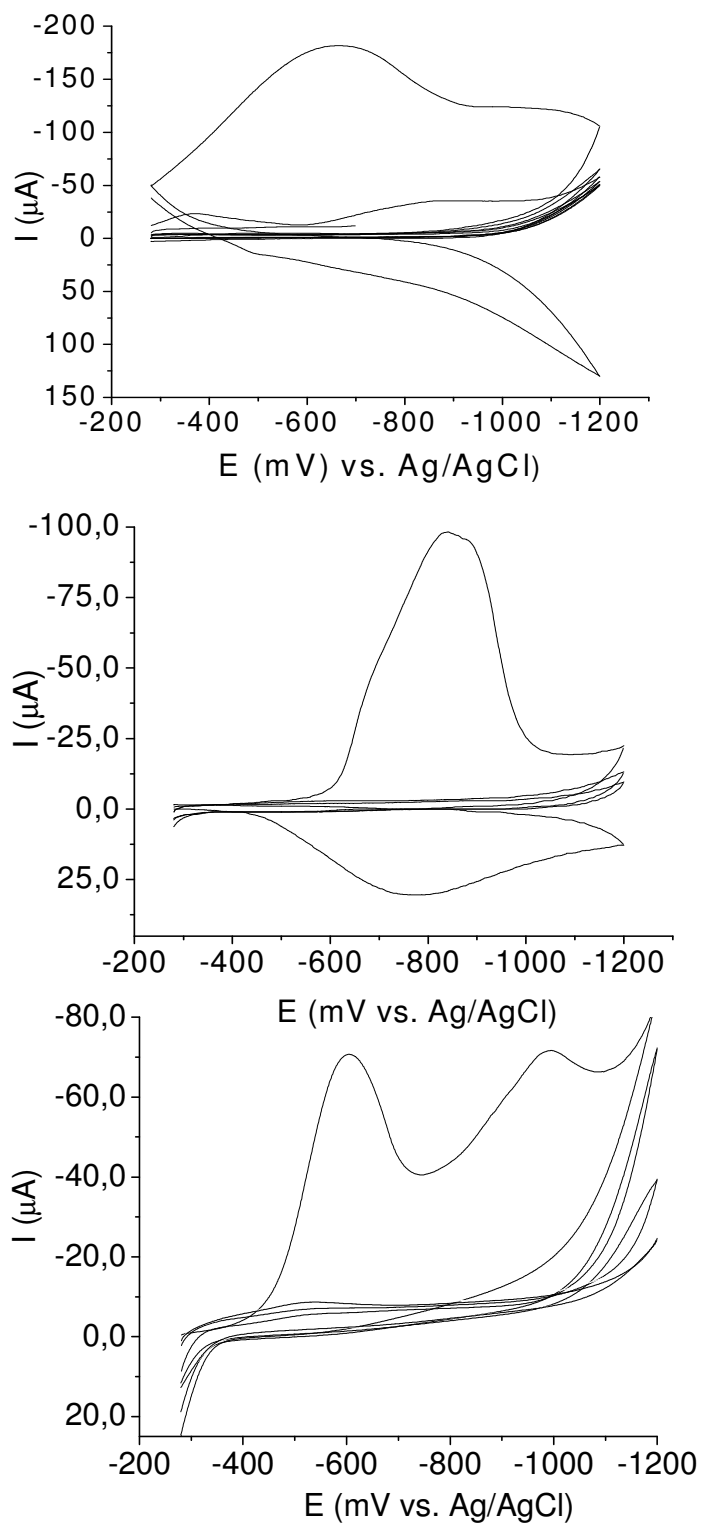
Nakon kondicioniranja filma pripremljenog na -0,25 mV dobija se uniformna raspodela bizmuta (slike 43 i 44). Film se sastoji od nasumice raspoređenih aglomerata vlakana bizmuta. Dakle, u zavisnosti od potencijala elektrodepozicije količina, oblik i raspodela kristala je različita, što uzrokuje različite morfologije i različitu boju nastalih filmova. Pri -1,00 V redukcija Bi(III) je brža, dobijeni film je crn i kompaktniji, pri čemu se mogu zapaziti dve dominantne strukturne jedinice (slika 42). Film je deblji, sa lošom adhezijom i često bez električnog kontakta sa osnovnim elektrolitom. Nasuprot tome, svetlo-sivi film dobijen na potencijalu od -0,25V je kvalitetniji i zato je primenljiv za analitičke svrhe [150].



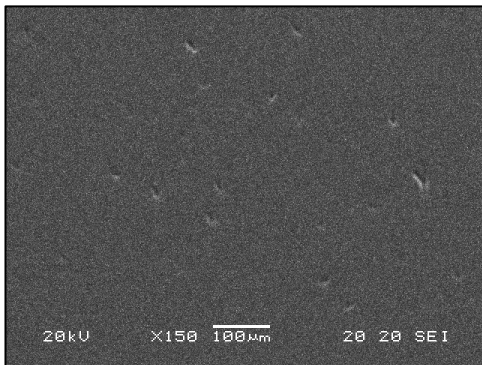
Slika 39. Ciklički voltamogrami dobijeni primenom GCE u rastvoru $1,0 \text{ mol/dm}^3 \text{ HCl}$, $0,02 \text{ mol/dm}^3 \text{ Bi(NO}_3)_3$ i $0,5 \text{ mol/dm}^3 \text{ KBr}$



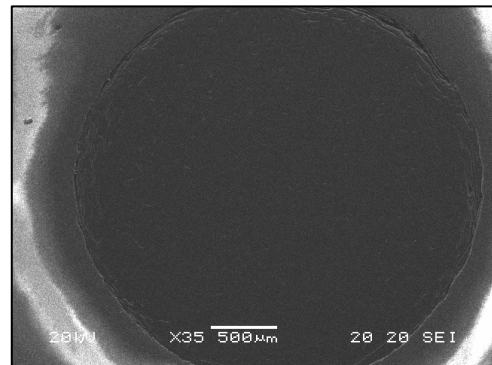
Slika 40. Hronoamperometrijske krive formiranja BiFE u osnovnom elektrolitu: $1,0 \text{ mol/dm}^3 \text{ HCl}$, $0,02 \text{ mol/dm}^3 \text{ Bi(NO}_3)_3$, $0,5 \text{ mol/dm}^3 \text{ KBr}$; potencijal depozicije - 0,25 V vs. Ag/AgCl, $3 \text{ mol/dm}^3 \text{ KCl}$. Brojevi pokazuju redne brojeve uzastopno nanetih filmova



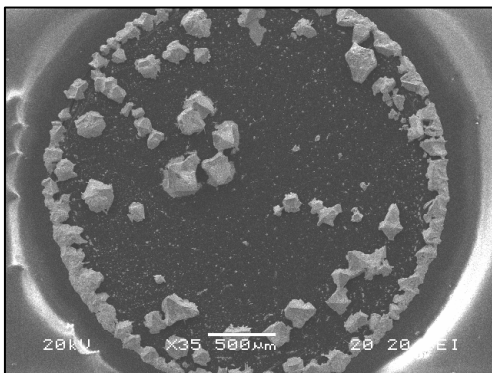
Slika 39. Ciklički voltamogrami snimljeni neposredno posle pripreme BiFE na -0,25 V u rastvorima različite pH vrednosti: a) 4,0; b) 8,0 i c) 9,0



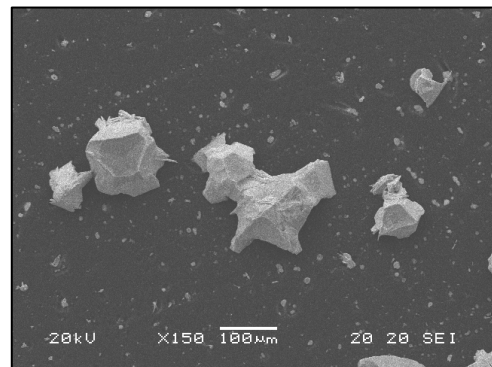
a)



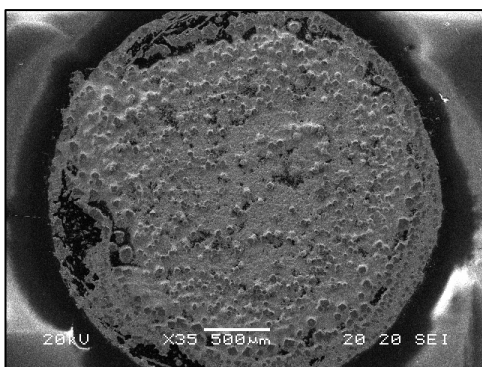
b)



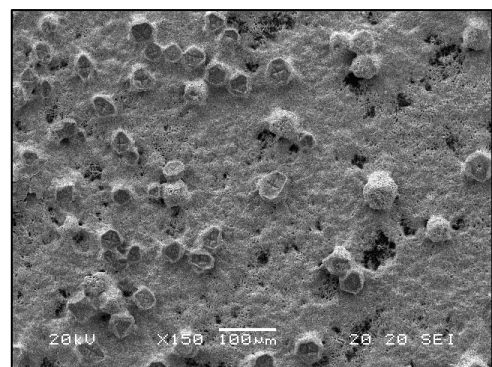
c)



d)

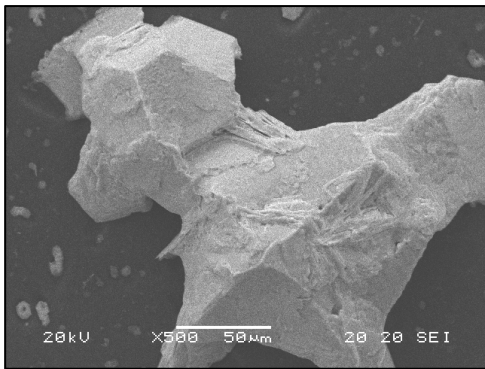


e)

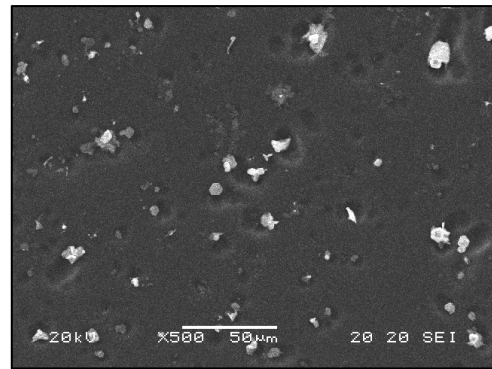


f)

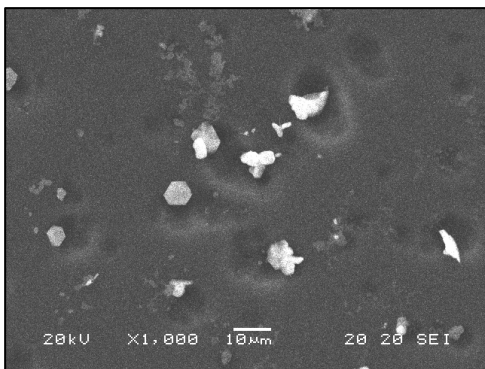
Slika 40. SEM snimci morfologije površine GCE (a i b) i BiFE (c-f) pripremljene na $-0,25$ V (c i d) i $-1,00$ V (d i f)



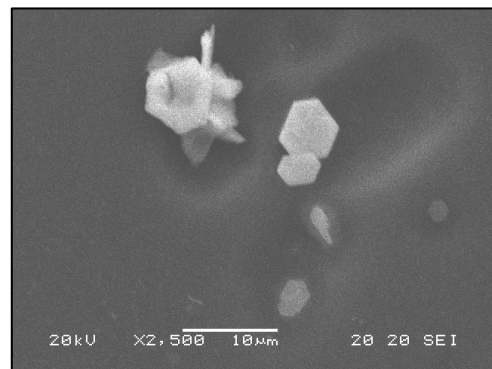
a)



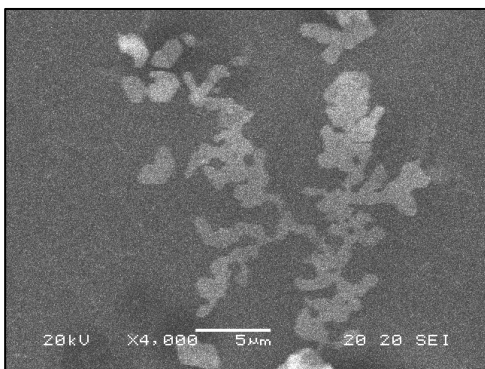
b)



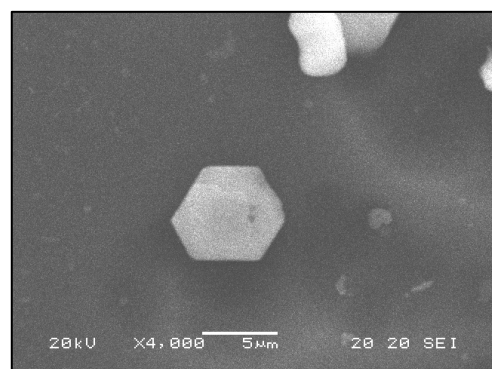
c)



d)

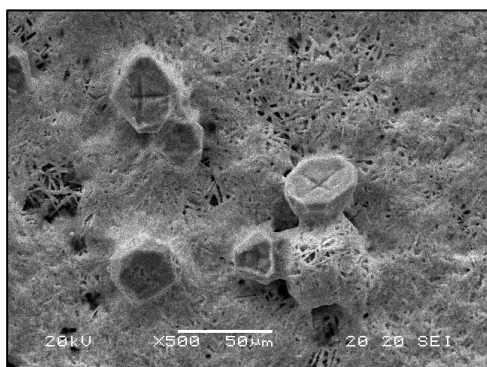


e)

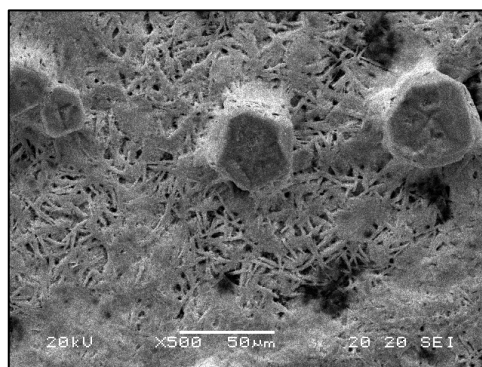


f)

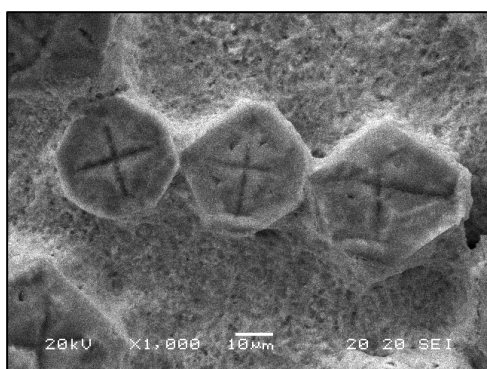
Slika 41. SEM snimci morfologije površine BiFE pripravljene na $-0,25$ V dobijeni pri različitim uvećanjima: 500 (a i b); 1000 (c); 2500 (d) i 4000 (e i f)



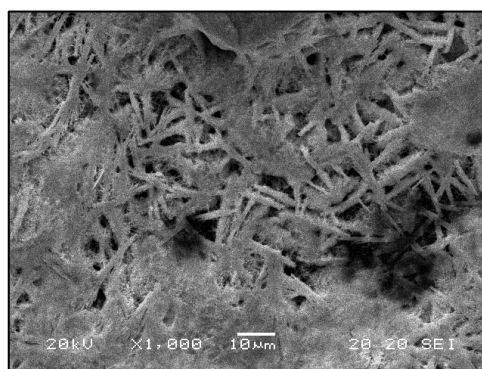
a)



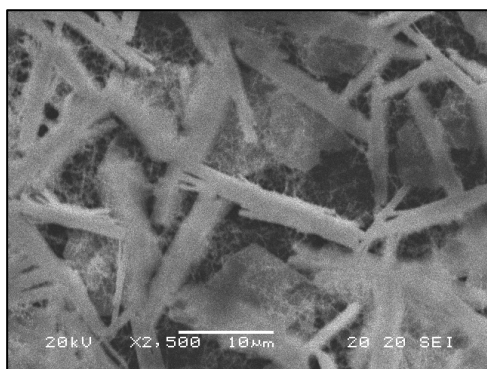
b)



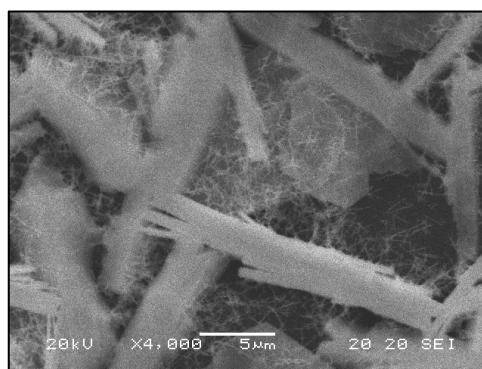
c)



d)

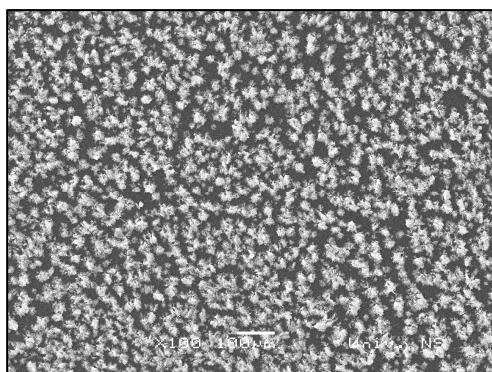


e)

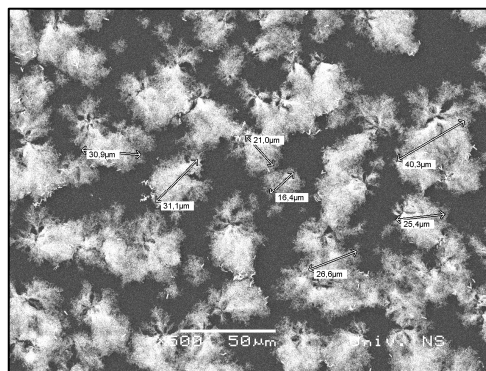


d)

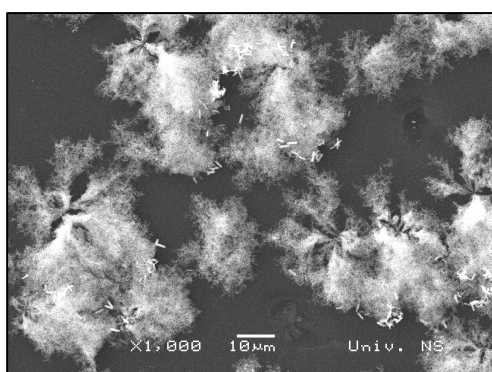
Slika 42. SEM snimci morfologije površine BiFE pripremljene na $-1,00$ V dobijeni pri različitim uvećanjima: 500 (a i b); 1000 (c i d); 2500 (e) i 4000 (f)



a)



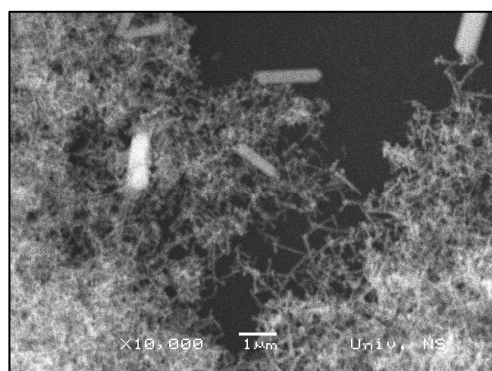
b)



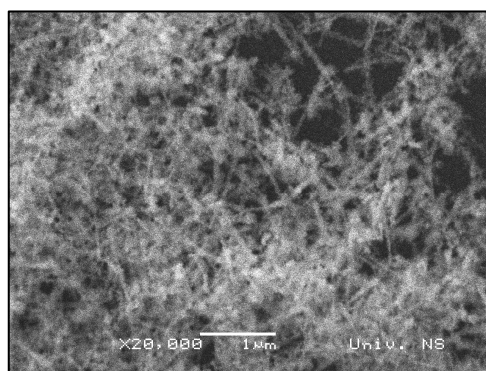
c)



d)

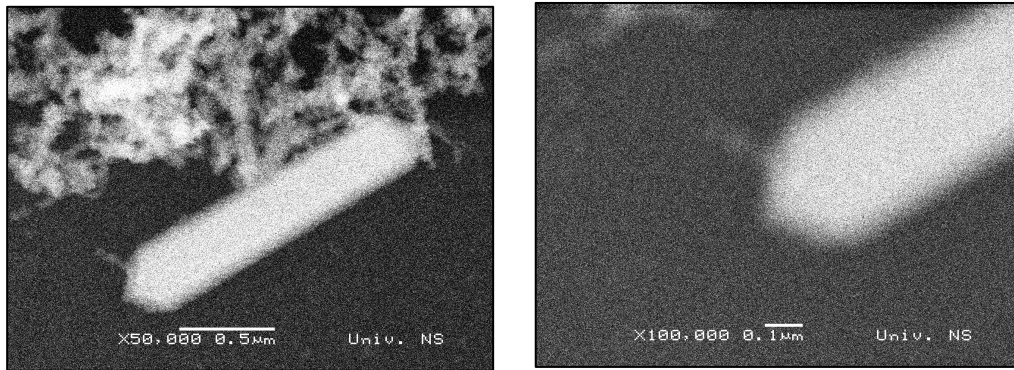


e)



f)

Slika 43. SEM snimci morfologije površine BiFE pripravljene na $-0,25$ V i kondicionirane površine dobijene pri različitim uvećanjima: 500 (a i b); 1000 (c); 2500 (d) i 4000 (e i f)



a)

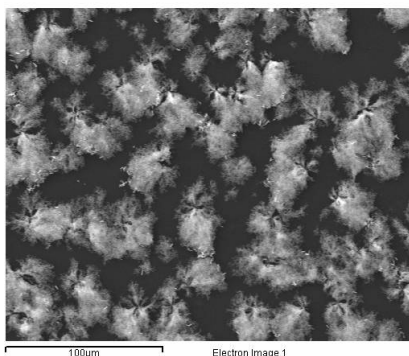
b)

Slika 44. SEM snimci morfologije površine BiFE pripremljenog na $-0,25$ V pri različitim uvećanjima: 50 000 (a) i 100 000 (b)

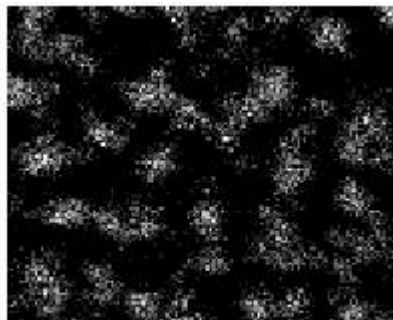
EDS merenja na reprezentativno odabranoj površini (slika 45a) pokazuju formiranje nukleusa bizmuta (slika 45b) na GCE supstratu (Slika 45c) i prisustvo značajne količine kiseonika (slika 45d). Ovaj poslednji je raspoređen po celoj površini elektrode i njegova raspodela izražena u procentima je veća na mestima bizmuta, verovatno zbog formiranja sloja bismut(III)-oksida tokom sušenja elektrode u atmosferi vazduha. EDS merenja duž reprezentativno odabrane linije (slika 46a) takođe pokazuju prisustvo nukleusa bizmuta (slika 46b) na GCE supstratu (slika 46c) i prisustvo veće količine kiseonika, naročito na nukleusima bizmuta (slika 46d).

Generalno, rezultati dobijeni EDS merenjima pokazuju da na elektrodnoj površini ima najviše ugljenika (oko 63%) a zatim bizmuta (oko 22%), kiseonika (oko 14%), dok ostatak (oko 1%) čine nečistoće [150].

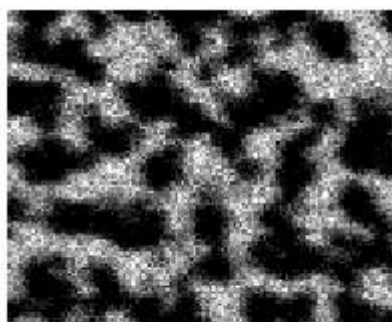
a)



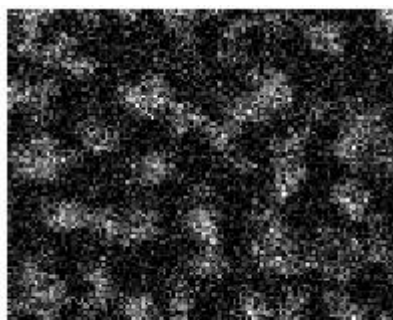
b)



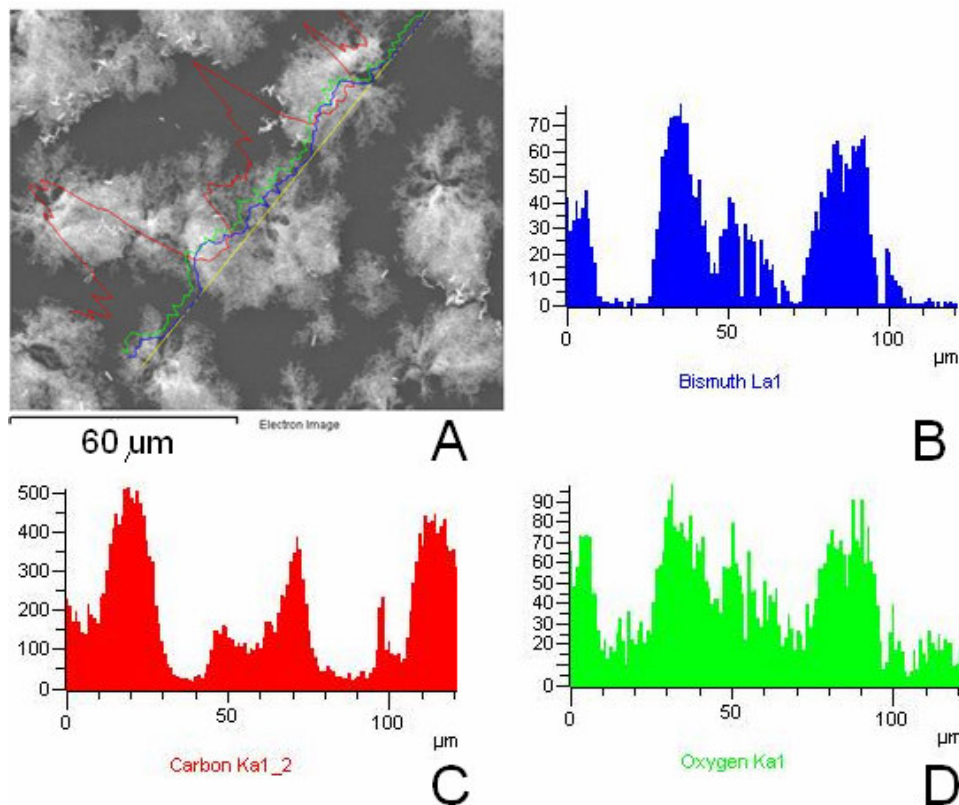
c)



d)

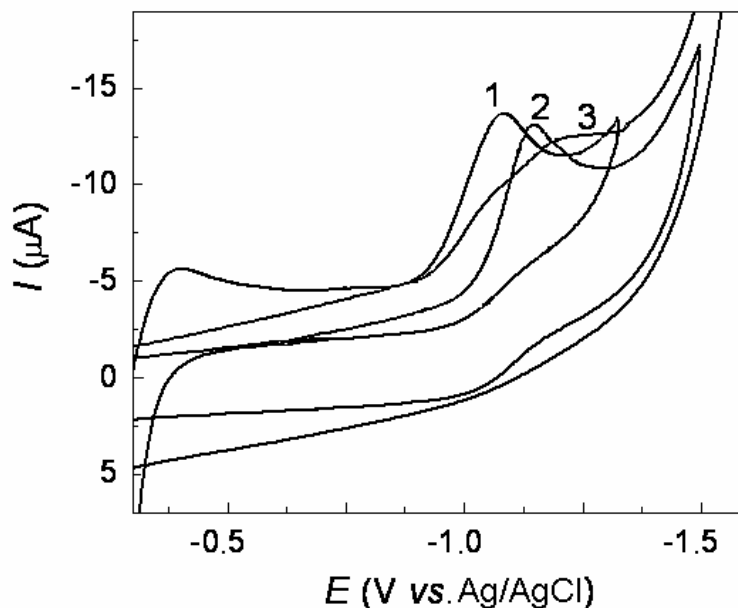


Slika 45. EDS rezultati ispitivanja površine BiFE pripremljene na $-0,25$ V i kondicionirane u osnovnom elektrolitu Britton-Robinson pufera pH 8,0: a) SEM površina BiFE, b) raspodela bizmuta, c) raspodela ugljenika, d) raspodela kiseonika



Slika 46. EDS rezultati ispitivanja BiFE pripremljene na $-0,25$ V i kondicionirane u osnovnom elektrolitu Britton-Robinson pufera pH 8,0: a) SEM/EDS površine BiFE, b) raspodela bizmuta, c) raspodela ugljenika, d) raspodela kiseonika [150]

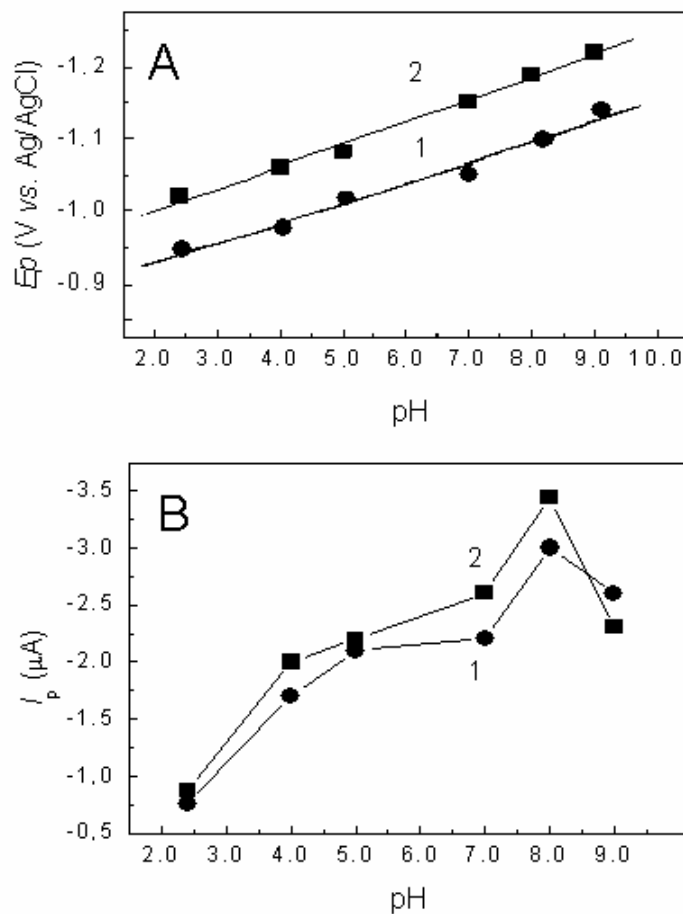
Voltametrijska primena BiFE. Primenljivost optimizovane BiFE je ispitan za određivanje tiametoksama. Voltametrijski odziv dobijen primenom BiFE je upoređen sa odzivima dobijenim primenom MFE i GCE. Ciklički voltamogrami redukcije tiametoksama prikazani na slici 47 su dobijeni primenom BiFE (kriva 1), MFE (kriva 2) i GCE (kriva 3). U svim slučajevima prisutan je samo jedan katodni pik na oko $-1,0$ V, bez reversnog anodnog pika, što ukazuje na ireverzibilnu prirodu elektrodne reakcije. Na osnovu prethodno opisanih polarografskih rezultata [91], može se pretpostaviti da redukcionni pik pripada redukciji tiametoksama. Prednost BiFE i MFE u odnosu na GCE je očigledna. Naime, u slučaju filmom-modifikovanih elektroda oblik redukcionnih pikova je tačno definisan, strujni pik (I_p) je oko četiri puta intenzivniji nego u slučaju GCE. Tako modifikovane elektrode su znatno osjetljivije od sveže glačane GCE. Iako je potencijal pika (E_p) u slučaju MFE pomeren za oko 100 mV u negativnijom smeru u poređenju sa BiFE, ipak se može zaključiti da je reč o istoj elektrohemijskoj reakciji na obe elektrode.



Slika 47. Ciklički voltamogrami tiametoksama dobijeni pomoću: 1) BiFE; 2) MFE i 3) GCE pri pH 8,0, $v = 100 \text{ mV/s}$; $c = 50 \text{ } \mu\text{g/cm}^3$ [150]

U cilju ispitivanja zavisnosti potencijala pika (slika 48A), kao i intenziteta pika struje, od pH vrednosti sredine za redukciju tiametoksama na BiFE i MFE snimljeni su ciklički voltamogrami u rastvoru Britton-Robinson pufera u intervalu pH vrednosti 2,0–9,0. Oštrij i simetričniji pikovi su dobijeni pri pH 8,0 za obe filmom modifikovane elektrode u odnosu na GCE, pri čemu se potencijal pika pomera ka negativnijim vrednostima sa porastom pH vrednosti. Zavisnosti E_p od pH su linearne i mogu se opisati jednačinama: $-E_p = 0,029 \text{ pH} + 0,94$ za MFE i $-E_p = 0,031 \text{ pH} + 0,94$ za BiFE, ($r > 0,989$) (slika 48A). Generalni linearni trend ukazuje na to da protonacija ima svoju ulogu u elektrodnom procesu tokom procesa redukcije [115]. Kao što se može zaključiti na osnovu ponovljenih cikličkih voltamograma posle mešanja rastvora, katodni redukcionni pik se menja zanemarljivo posle prvog ciklusa, što ukazuje na to da se tiametoksam ne adsorbuje spontano i značajno na MFE i BiFE. Variranjem brzine polarizacije u opsegu od 10 do 500 mV/s se dobija linearna zavisnost između visine pika i kvadratnog korena brzine promene potencijala ($r > 0,981$) za obe filmom modifikovane elektrode.

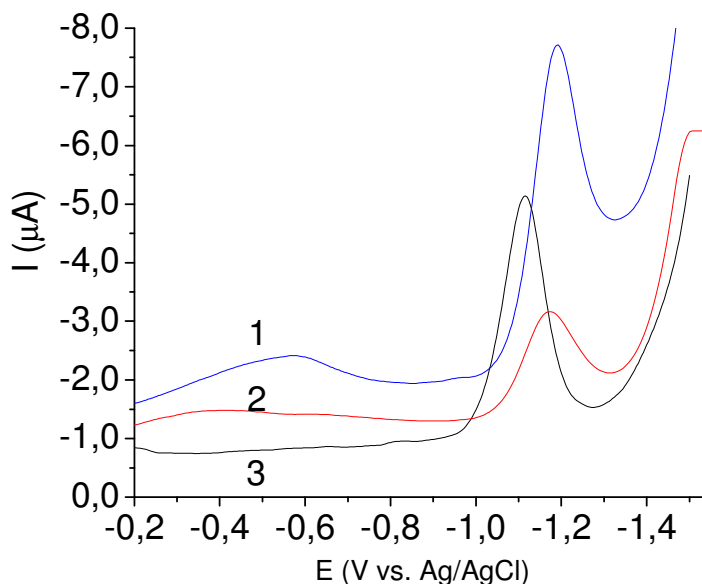
Uticao pH vrednosti na intenzitet pika struje je predstavljen na slici 48B. Kao što se može videti, vrednost I_p je najveća pri pH 8,0, tako je ova vrednost odabrana kao optimalna za određivanje tiametoksama. Ovi podaci se dobro slažu sa onima koji su dobijeni primenom SMDE.



Slika 48. Uticaj pH na $E_{1/2}$ (CV, A) i I_p (DPV, B): 1) BiFE, 2) MFE. $v = 100 \text{ mV/s}$, $c = 50 \mu\text{g/cm}^3$ [150]

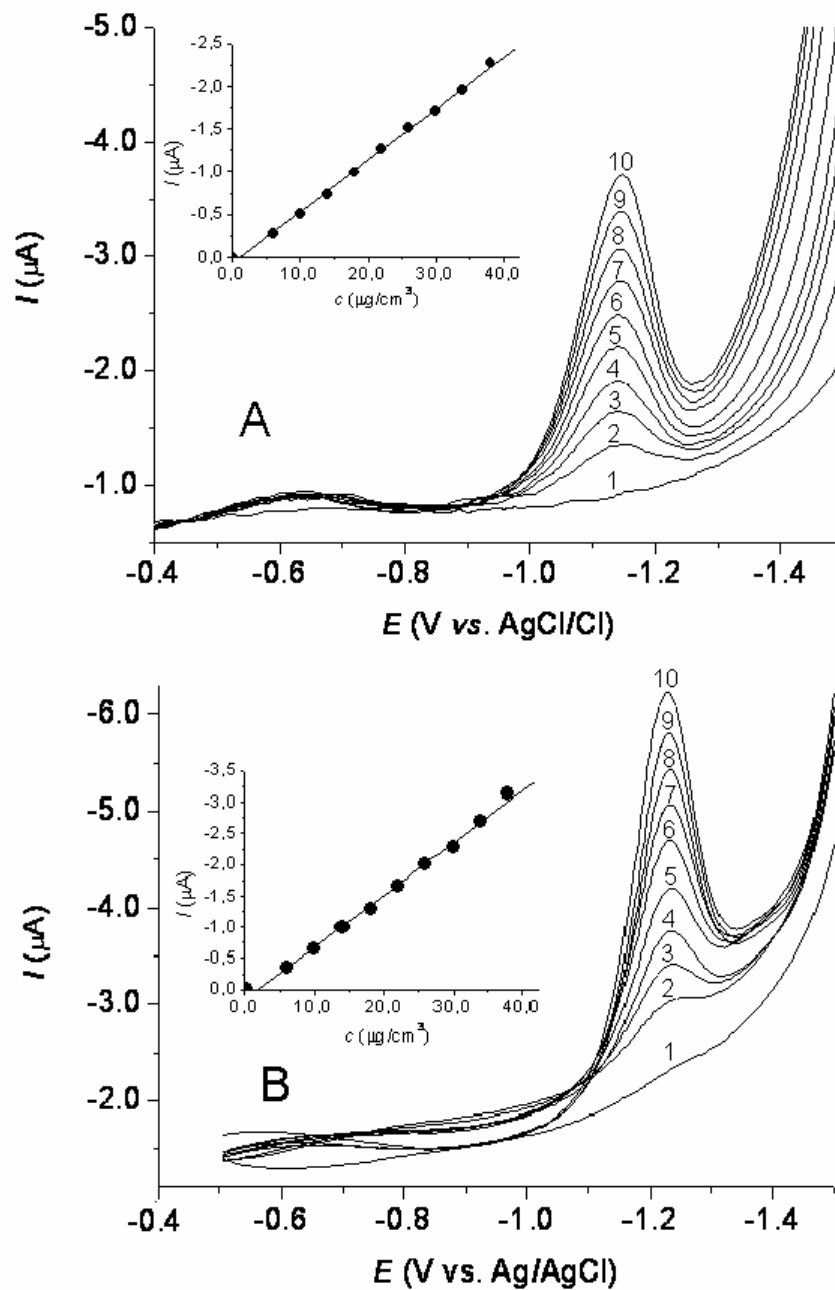
U cilju iznalaženja optimalne metode određivanja tiametoksama upoređene su tri osjetljive impulsne tehnike. Na slici 49 su prikazani voltamogrami dobijeni pomoću Barker-ove pravaugaone voltometrije (Barker square-wave voltammetry, BSWV) (kriva 1), Osteryoung-ove pravaugaone voltometrije (Osteryoung square-wave voltammetry, OSWV) (kriva 2) i diferencijalne pulsne voltometrije, (differential pulse voltammetry, DPV) (kriva 3). Na osnovu oblika i intenziteta dobijenih signala, DPV metoda je odabrana za analitičke svrhe. Radi dobijanja dobro definisanih DPV signala, neophodno je bilo optimizovati amplitudu i širinu pulsa. Uopšteno gledano, intenzitet struje redukcionog pika tiametoksama raste srazmerno sa povećanjem amplitude pulsa, ali osnovna struja i poluširina pika takođe rastu. Pošto je najbolje definisan pik dobijen pri amplitudi pulsa od 50 -mV, upravo ta vrednost je primenjena kao optimalna. Smanjenje

visine pika i njegovo proširenje je zapaženo sa porastom širine pulsa od 20 do 100 ms. Zato je jedan relativno uzak puls od 50 ms je odabran radi eliminisanja distorzije pika. Optimalna vrednost brzine promene potencijala za određivanje tiametoksama pomoću obe modifikovane elektrode je bila 25 mV/s.



Slika 49. Voltamogrami tiametoksama dobijeni pomoću tri impulsne tehnike: 1) Barker-ova pravaugaona voltametrija, 2) Osteryoung-ova pravaugaona voltametrija i 3) diferencijalna pulsna voltametrija

Kvantitativno određivanje je zasnovano na linearnoj zavisnosti između intenziteta pika struje i koncentracije analita (slika 50). Analitički parametri za obe elektrode su prikazani u tablici 14. Reproductivnost analitičkih signala je određena je na osnovu šest uzastopnih merenja iste koncentracije tiametoksama ($2,5 \mu\text{g}/\text{cm}^3$) primenom BiFE i MFE, pri čemu su mereni I_p signali. Kao što se može videti (tablica 14), nešto bolja preciznost je dobijena u slučaju MFE. Obe elektrode su primenljive na $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ nivou koncentracija, a karakteristike optimizovane metode se mogu uporediti sa komparativnom HPLC/DAD metodom. Upoređivanjem analitičkih parametara filmom modifikovane elektrode sa parametrima elektrohemijski pretretirane GCE [123] može se zaključiti da je vrednost LOD prvih elektroda dvadeset puta niža, a preciznost oko dva puta veća [150].



Slika 50. DP voltamogrami snimljeni za različite koncentracije tiametoksama ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$) primenom A) BiFE [150] i B) MFE [150, 153]: 1) slepa proba, 2) 6,00; 3) 10,0; 4) 14,0; 5) 18,0; 6) 22,0; 7) 26,0; 8) 30,0; 9) 34,0 i 10) 38,0 i odgovarajuće kalibracione krive. Uslovi merenja: puls amplitude 50 mV, širina pulsa 50 ms, brzina polarizacije 25 mV/s, pufer pH 8,0

Tablica 14. Analitički parametri DPV na filmom-modifikovanim elektrodama i komparativne HPLC/DAD metode [150]

Parametar	Metoda		
	BiFE-DPV	MFE-DPV	HPLC/DAD
Linearni opseg [$\mu\text{g}/\text{cm}^3$]	1,26-45,0	0,77-45,0	0,28-25,0
Odsečak	-0,067 μA	-0,13 μA	0,57
Koeficijent pravca	0,06 $\mu\text{A cm}^3/\mu\text{g}$	0,08 $\mu\text{A cm}^3/\mu\text{g}$	0,07 $\text{cm}^3/\mu\text{g}$
Korelacioni koeficijent	0,999	0,999	0,999
LOD [$\mu\text{g}/\text{cm}^3$]	0,38	0,26	0,08
LOQ [$\mu\text{g}/\text{cm}^3$]	1,26	0,77	0,28
Preciznost [RSD%] ^a	1,5	1,2	1,9

^aBroj merenja (n = 6).

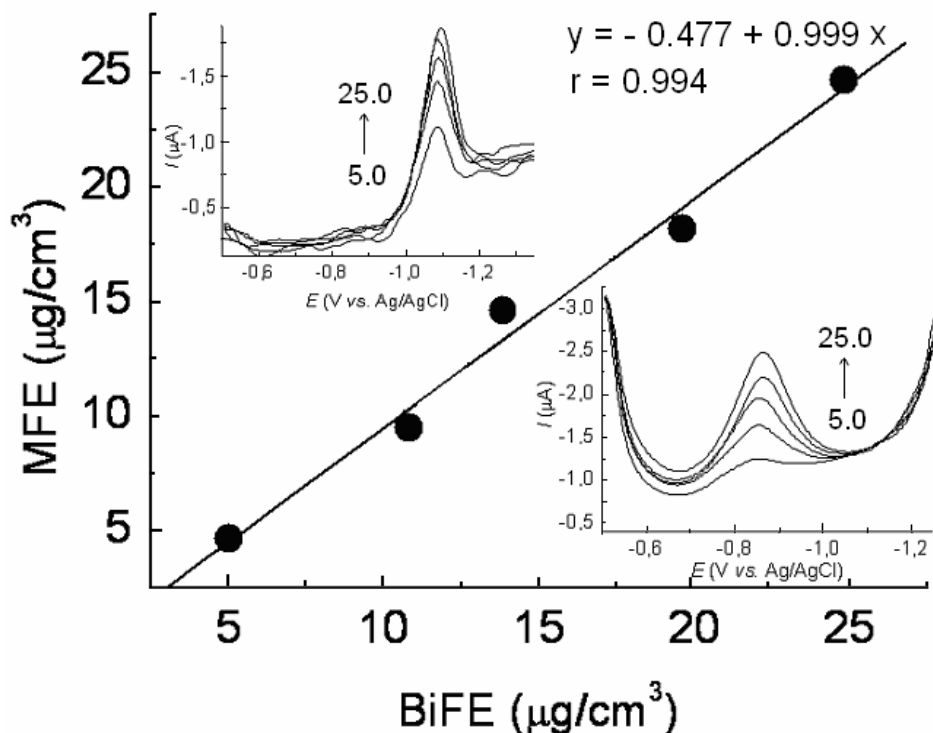
Poređenje BiFE i MFE u analizi realnih uzoraka. Radi ispitivanja primenljivosti filmom modifikovanih elektroda uzorci slepih proba krompira i kukuruza (uzorak 1) su "spajkovani" na dva nivoa radi ispitivanja prinosa metode (uzorak 3). Realni prskani uzorci (uzorak 2) su analizirani na isti način (videti Eksperimentalni deo). Može se zaključiti da je predložena metoda jednostavna, brza i osetljiva, a dobijeni rezultati se dobro slažu sa podacima dobijenim komparativnom HPLC/DAD metodom. Nadalje, pošto je ekstrakcija izvodljiva i ručnim putem (u levku za razdvajanje) ovo može biti brza metoda za procenu stanja pri terenskim okolnostima. Tablica 15 prikazuje tačnost metoda primenjenih za određivanje tiametoksama u dva tipa uzoraka. Dobijeni prinosi su u intervalu 85%-95%, a rezultati pokazuju da se dodate količine tiametoksama kvantitativno mogu odrediti.

Tablica 15. Određivanje tiametoksama u nekim realnim uzorcima [150]

Uzorci	Metoda određivanja					
	DPV-BiFE		DPV-MFE		HPLC/DAD	
	Krompir	Kukuruz	Krompir	Kukuruz	Krompir	Krompir
Realni uzorak [mg/kg]	0,07	0,11	0,07	0,11	0,07	0,11
RSD[%]	5,7	4,1	5,2	3,8	5,7	4,2
Tretiran uzorak [mg/kg]	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Prosečni prinos* [%]	85,0	91,4	87,2	91,9	87,2	94,0
RSD[%]	5,9	4,7	5,6	4,3	5,3	3,6
Tretiran uzorak [mg/kg]	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Prosečni prinos* [%]	88,7	93,4	89,3	94,0	92,0	94,3
RSD[%]	3,7	3,1	3,4	2,9	3,4	2,8

* Broj merenja (n = 3).

U cilju proučavanja efikasnosti BiFE, primenjeno je i korelacijsko ispitivanje. Slika 51 prikazuje podatke dobijene primenom BiFE i MFE za analizu pet uzoraka kukuruza sa različitim sadržajem tiametoksama (5,0–25,0 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$). Evidentno je da postoji visok stepen korelacije između metode BiFE i MFE ($r = 0,994$) za ispitivane uzorke kukuruza. Takođe se dobra korelacija ($r = 0,992$) dobija i za krompir. Obe pomenute metode imaju veću brzinu analize uzoraka od odgovarajuće HPLC tehnike i obe metode su primenljive za laboratorijska i terenska ispitivanja stanja sredine [150].

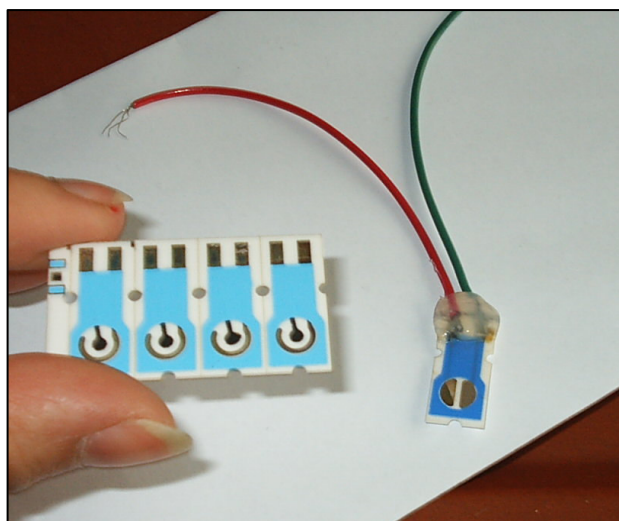


Slika 51. Korelacija rezultata dobijenih pomoću BiFE i MFE pri određivanju tiametoksama u uzorcima kukuruza i odgovarajuće DPV krive snimljene pri pH 8,0 [150]

Ostaci tiametoksama su nađeni u uzorcima tretiranog krompira i kukuruza sa srednjim vrednostima sadržaja od 0,07 i 0,11 mg/kg (tablica 15). Evidentno je da su rezultati dobijeni optimizovanom DP voltametrijskom metodom u saglasnosti sa podacima komparativne HPLC/DAD metode.

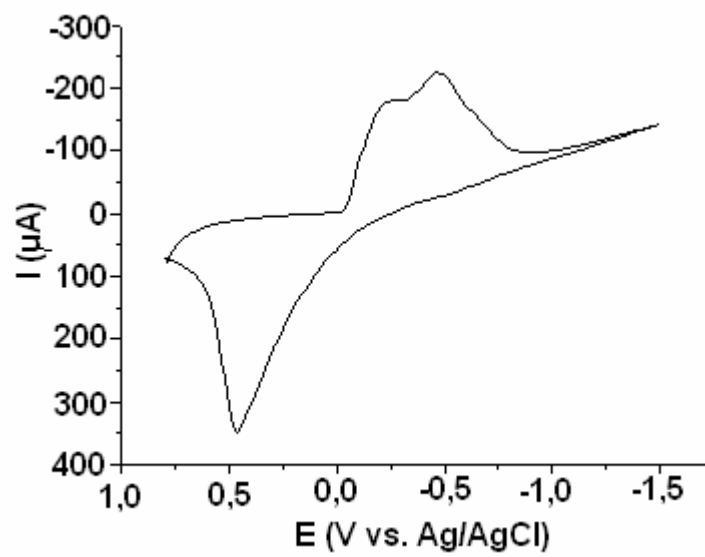
Ovi eksperimenti pokazuju da je BiFE potencijalno interesantna i perspektivna elektroda za analitičke primene i da je uporedljiva sa MFE. Ipak, dodatna ispitivanja su potrebna radi detaljnijeg upoznavanja ovog netoksičnog elektrodnog materijala, potencijalno sposobnog da zameni toksični film od žive [150].

Planarna bizmut-film elektroda. Najzad, ispitivana je i mogućnost pripreme planarne ugljениčne elektrode modifikovane filmom bizmuta (slika 52). Postupak rada odgovara već opisanom za BiFE. Ukratko, ciklički voltamogrami (slika 53) su snimljeni u rastvoru za depoziciju bizmuta radi utvrđivanja optimalnog potencijala za pripremu PBiFE. SEM snimci (slike 54-56) pokazuju homogenost filma bizmuta. Kristali su drugačijeg oblika u poređenju sa BiFE, što je verovatno posledica različitosti osnovnih ugljениčnih supstrata tj. elektrode.

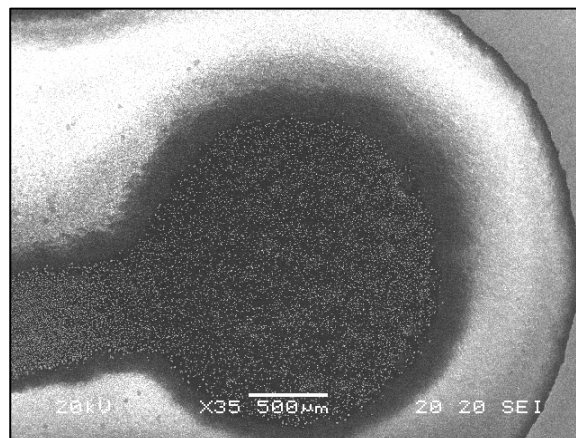


Slika 52. Planarne ugljениčne elektrode (screen printed electrode)

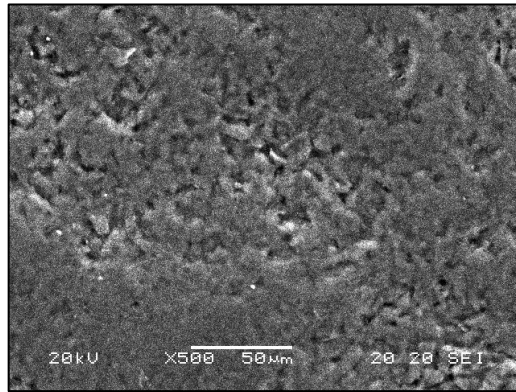
I ovu površinu je potrebno podvrći kondicioniranju u osnovnom rastvoru radi uklanjanja oksidnog sloja sa površine elektrode (slika 57). Modifikovana i kondicionirana elektroda je testirana za određivanje tiametoksama iz realnih uzoraka krompira (slika 58). Pokazalo se da je PBiFE je oko 3 puta manje osetljiva od BiFE. Ipak, PBiFE bi mogla biti pogodna za terenske analize.



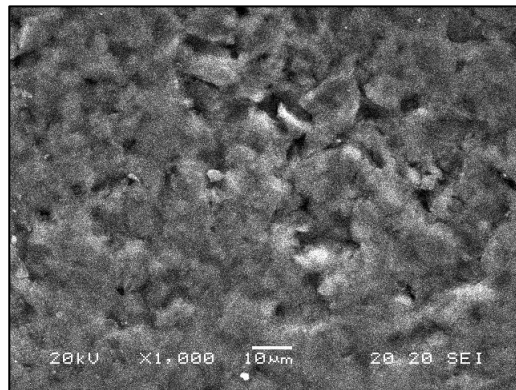
Slika 53. Ciklički voltamogram snimljen u optimizovanom sastavu rastvora za pripremu filma. $v = 25 \text{ mV/s}$



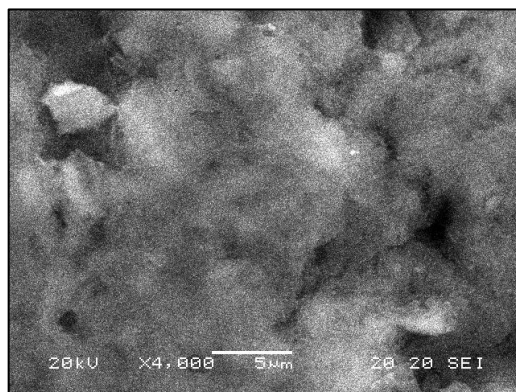
Slika 54. SEM snimak površine PBiFE pri uvećanja 35



a)

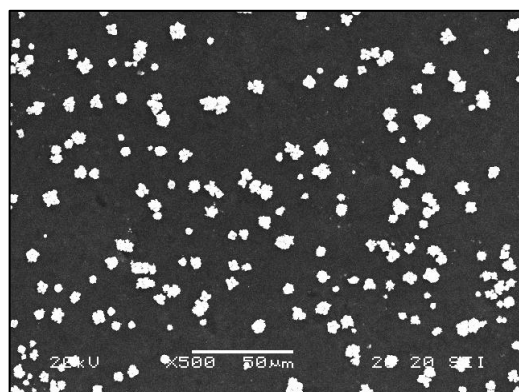


b)

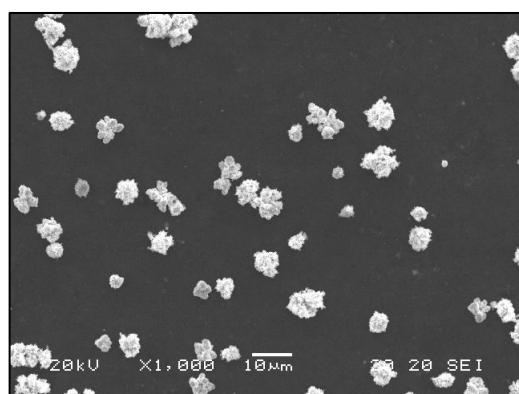


c)

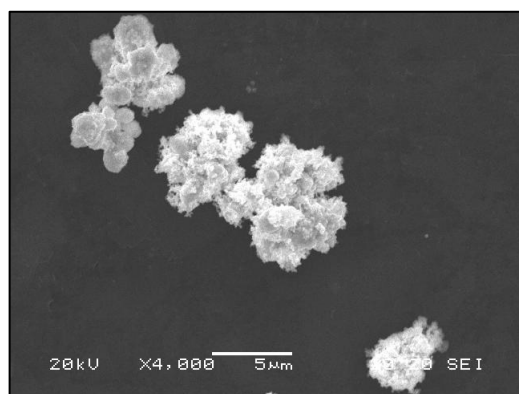
Slika 55 . SEM snimci površine planarne ugljenične elektrode pri različitim uvećanjima: 500 (a), 1000 (b) i 4000 (c)



a)

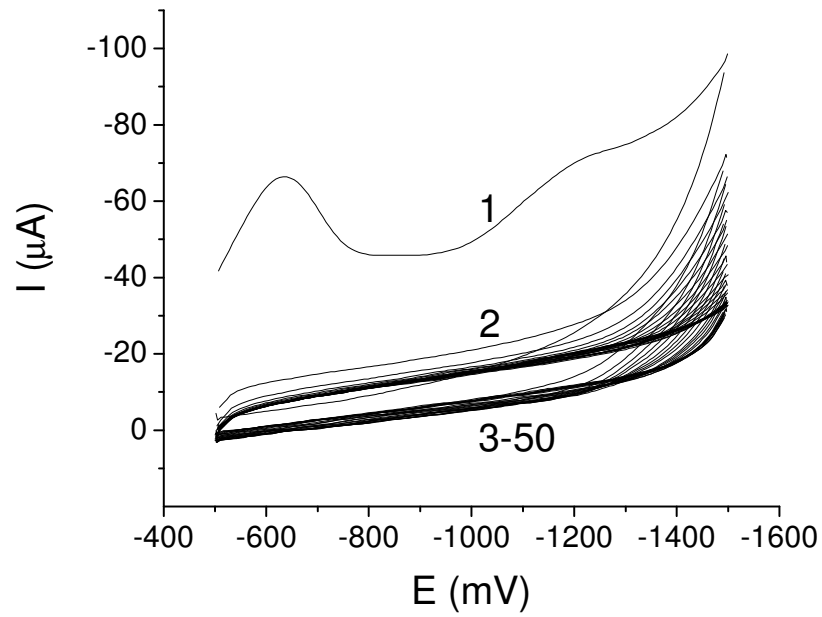


b)

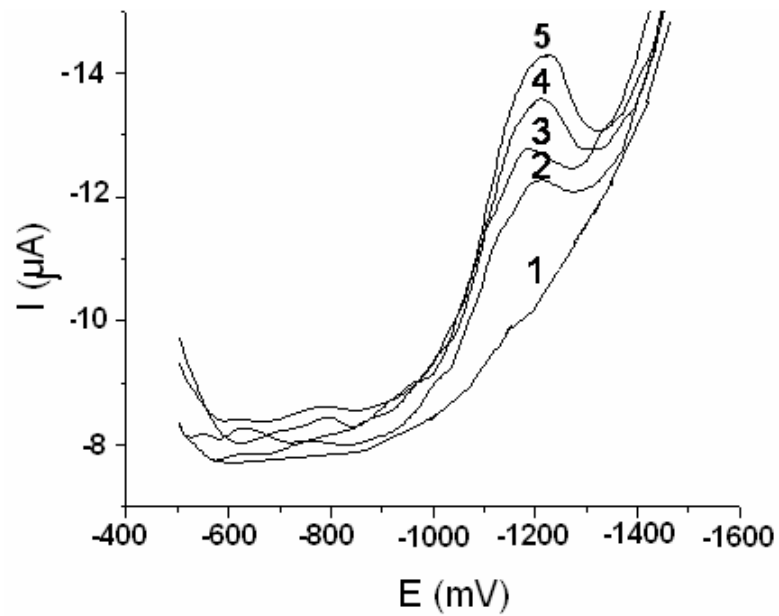


c)

Slika 56. SEM snimci površine PBiFE pripravljene pri $-0,25$ V na planarnoj elektrodi pri različitim uvećanjima: 500 (a), 1000 (b) i 4000 (c)



Slika 57. Ciklički voltamogrami kondicioniranja PBiFE. $v = 100 \text{ mV}$



Slika 58. DVP krompira tretiranog tiametoksamom i standardni dodaci tiametoksama na PBiFE na planarnoj elektrodi

4.3.4. Voltometrija na C14-film elektrodi

Vođeni idejom *Xu et al.* [154], koji su primenili staklasti ugljenik modifikovan *n*-heksadekanom za LSV određivanje parationa u linearnom opsegu 8×10^{-8} - 2×10^{-5} mol/dm³, ispitivali smo mogućnost primene alkanskim filmom modifikovane elektrode od staklastog ugljenika za određivanje insekticida neonikotinoida sa nitroguanidinskom funkcionalnom grupom.

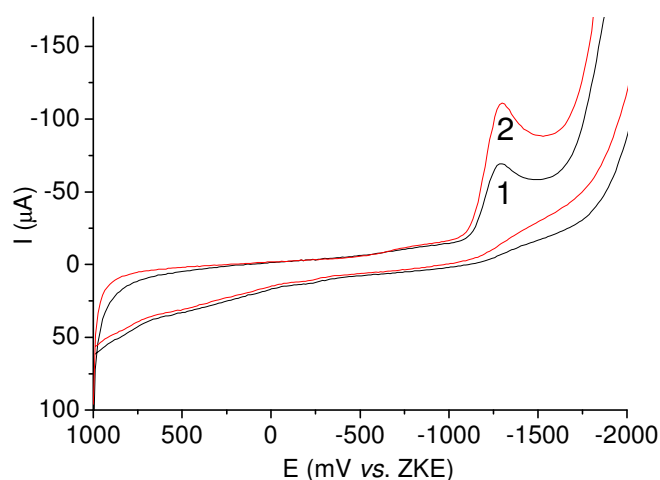
Tokom preliminarne optimizacije metode, izabran je optimalni *n*-alkan, razrađena je metoda pripreme GCE površine, razrađen je postupak pripreme filma, odabran je osnovni elektrolit i pronađen odgovarajući potencijal depozicije za adsorptivnu striping voltometriju.

Od tri ispitivana *n*-alkana (*n*-dodekan, *n*-tetradekan i *n*-heksadekan), *n*-tetradekan se pokazao najpogodnijim za pripremu C14-film elektrode. U slučaju ostala dva alkana su dobijeni manje oštri pikovi.

Elektroda od staklastog ugljenika se glača na uobičajen način suspenzijom aluminijum oksida, čisti u ultrazvučnom kupatilu, zatim se suši i pere alkoholom i kasnije sa dihlormetanom. Nasuprot pripremi BiFE, kod ovakvog tipa filma elektrohemijsko kondicioniranje u vidu cikliranja elektrodnog potencijala ne pospešuje adsorpciju filma. Ovo se može objasniti činjenicom, da elektrohemijskim kondicioniranjem površina GCE postaje hidrofilnija u odnosu na površinu pripremljenu isključivo glačanjem. Kod *n*-alkanskih filmova hidrofobne interakcije površine GCE i jedinjenja mogu da pospešuju adsorpciju filma.

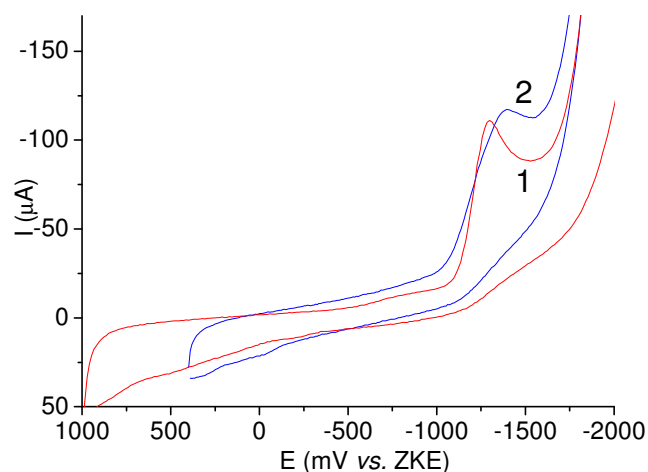
Odgovarajuća zapremina *n*-tetradekana se rastvara u hloroformu ($0,001 \text{ cm}^3 : 1 \text{ cm}^3$). Zapremina od $0,03 \text{ cm}^3$ se nanese na površinu pripremljenog staklastog ugljenika. Tokom sušenja (koje obično traje manje od 5 minuta) elektroda treba da se rotira radi ravnomerne raspodele filma. Veća količina *n*-tetradekana prouzrokuje smanjenje intenziteta signala redukcije tiametoksama.

Za osnovni elektrolit odabran je Britton-Robinson pufer, a intenzivni signali su dobijeni pri pH 7,0. Na slici 59 je predstavljen efekat akumulacije tiametoksama na optimalnom potencijalu od -1,0 V. Upoređujući krivu 1, snimljenu bez depozicije, i krivu 2, snimljenu posle depozicije od 5 min može se zaključiti da opisana akumulacija povećava signal redukcije oko 1,8 puta, iako je prisutna veća količina tiametoksama.



Slika 59. Redukcioni pik tiametoksama snimljen C14-film-elektrodom: 1) bez akumulacije tiametoksama, 2) posle 5 min akumulacije na $-1,0$ V. $c = 0,25$ mg/cm³, pH 7,0, $v = 500$ mV/s.

Voltametrijski odziv dobijen primenom C14-film-elektrode je upoređen sa odzivima dobijenim primenom GCE. Ciklički voltamogrami redukcije tiametoksama prikazani na slici 60 su dobijeni primenom C14-film-elektrode (kriva 1) i GCE (kriva 2). Prednost C14-film-elektrode u odnosu na GCE je očigledna. Naime, u slučaju filmom modifikovane elektrode oblik redukcionog pika je tačno definisan i simetričan, a strujni pik (I_p) je oko 3,5 puta viši nego u slučaju GCE.



Slika 60. Ciklički voltamogrami tiametoksama dobijeni pomoću: 1) C14-film elektrode i 2) GCE pri pH 7,0, $v = 500$ mV/s; $c = 0,25$ mg/cm³

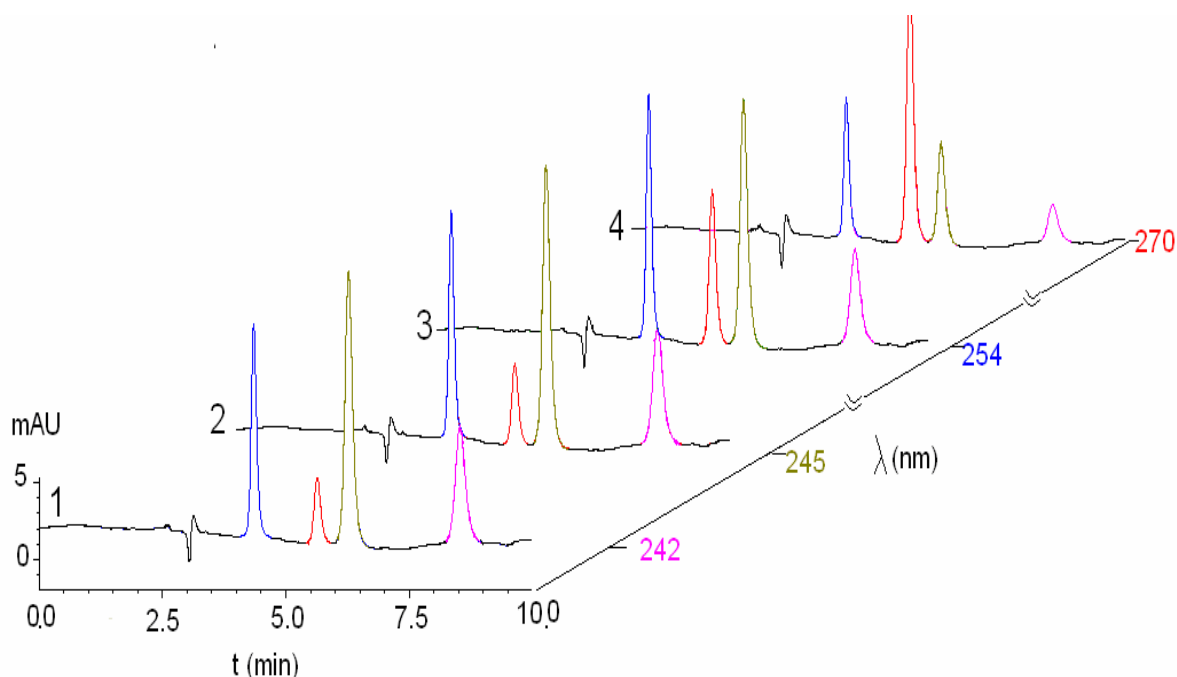
Na osnovu ovih prvih rezultata ispitivanja podobnosti C14-film-elektrode za određivanje tiametoksama preliminarno se može videti da elektroda ima dobre i potencijalne performanse koje bi trebalo istraživati. Dalja istraživanja u vezi pronalaženja načina detekcije i određivanja pojedinih neonikotinoida trebalo bi da obuhvate i jednostavne organske filmove, kao npr. C14 ili jonske polimere (NAFION) kao i jonske tečnosti u eventualnoj kombinaciji sa BiFE ili drugim metal-film elektrodama.

4.4. TEČNO HROMATOGRFSKO ISPITIVANJE I ODREĐIVANJE NEONIKOTINOIDA

Hromatografske metode su najbrojnije analitičke metode za određivanje neonikotinoida. Ova tehnika pruža mogućnost ispitivanja stabilnosti i praćenja hidrolize neonikotinoida, kao i selektivnog i osetljivog određivanja ciljnih jedinjenja iz jednostavnijih i složenijih uzoraka, pojedinačno ili u njihovim višekomponentnim smešama.

4.4.1. Ispitivanje stabilnosti neonikotinoida tečnom hromatografijom visoke efikasnosti uz primenu detektora niza dioda

Kao što je to već ranije prikazano, većina hromatografskih metoda za određivanja neonikotinoida se zasniva na reversno-faznoj hromatografiji uz primenu C-18 kolone i mobilne faze voda (0,2% fosforna kiselina) : acetonitril. Detekcija korisnih signala se vrši na osnovu optičkih signala, tj. diodnim nizom detektora (diode-array detector, DAD), na odabranim radnim talasnim dužinama 254, 270, 245 i 242 nm za tiametoksam, imidaklopid, acetamirid i tiaklopid, kao što je prikazano na slici 61.



Slika 61. Optimalne radne talasne dužine za DAD detektor pri analizi višekomponentnog model-sistema neonicotinoida: 1) tiakloprid, 242 nm; 2) acetamiprid, 245 nm; 3) tiametoksam, 254 nm, 4) imidakloprid, 270 nm. Mobilna faza 7:3, v/v voda (0,2% fosforna kiselina) : acetonitril

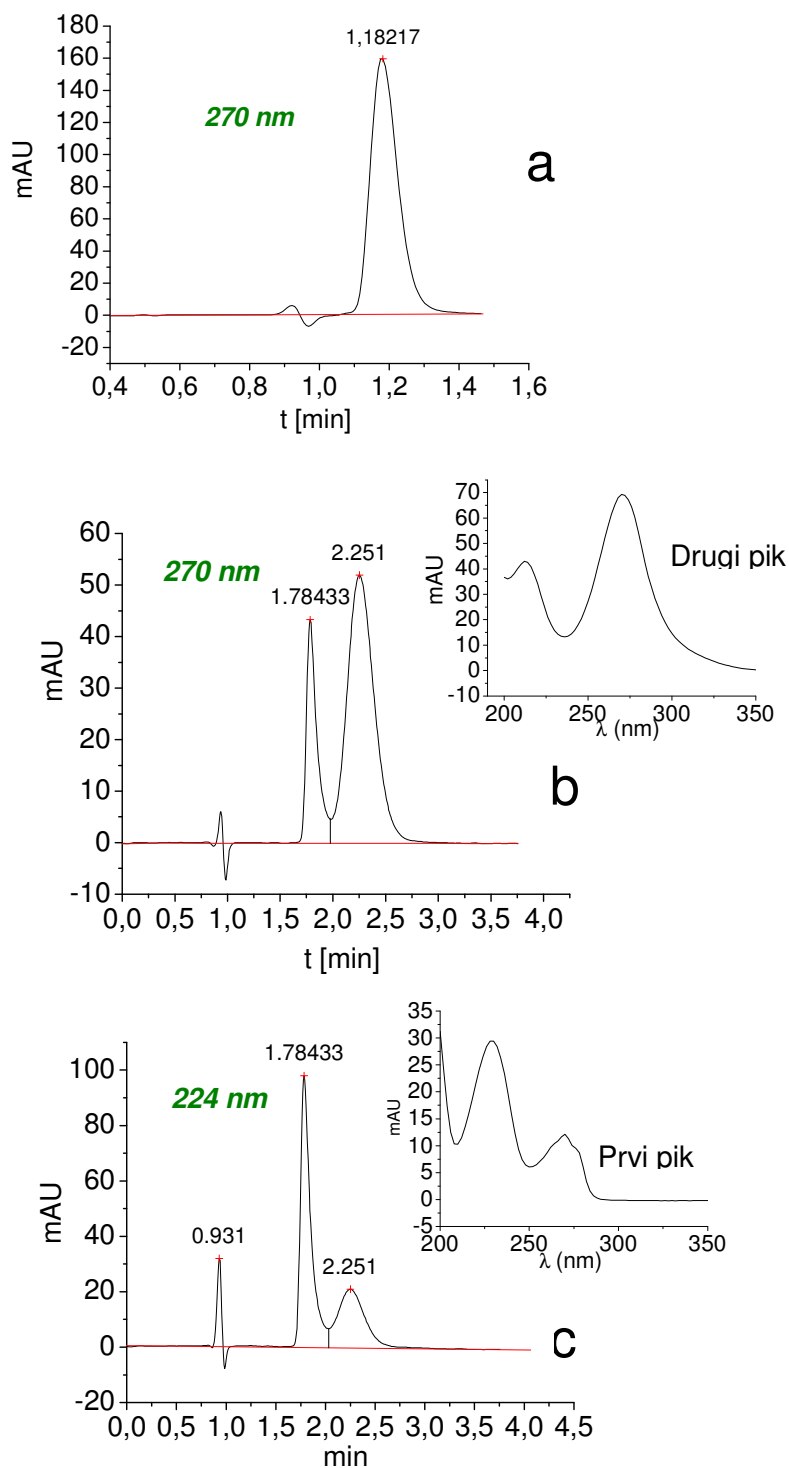
Eksperimenti ispitivanja stabilnosti. Optimizovana HPLC/DAD tehnika se pokazala kao pogodna za pojedinačno praćenje stabilnosti četiri ispitivana neonicotinoida. Nađeni optimalni sastav mobilne faze je voda (0,2% fosforna kiselina): acetonitril, 15 : 85, (v/v), protok 1 cm³/min, pri čemu jedinjenja polarnija od neonicotinoida imaju kraća retenciona vremena od samih polaznih jedinjenja. Pri navedenom sastavu mobilne faze mogu se dobiti zadovoljavajuća razdvajanja jedinjenja veoma slične polarnosti. Kao potvrda ovome može se navesti primer 6-hloronikotinske kiseline i imidakloprida (slika 62a). Naime, literaturni podaci govore o tome da je zbog slične polarnosti teško postići razdvajanje ova dva jedinjenja [68]. Pokazalo se da je pomenuta mobilna faza pogodna za semikvantitativno razdvajanje ova dva jedinjenja (slika 62b i c).

Pri ispitivanju stabilnosti četiri neonicotinoida HPLC/DAD se pokazala kao pogodna kvalitativna i kvantitativna metoda za praćenje stanja sistema (slike 63-66). Tokom

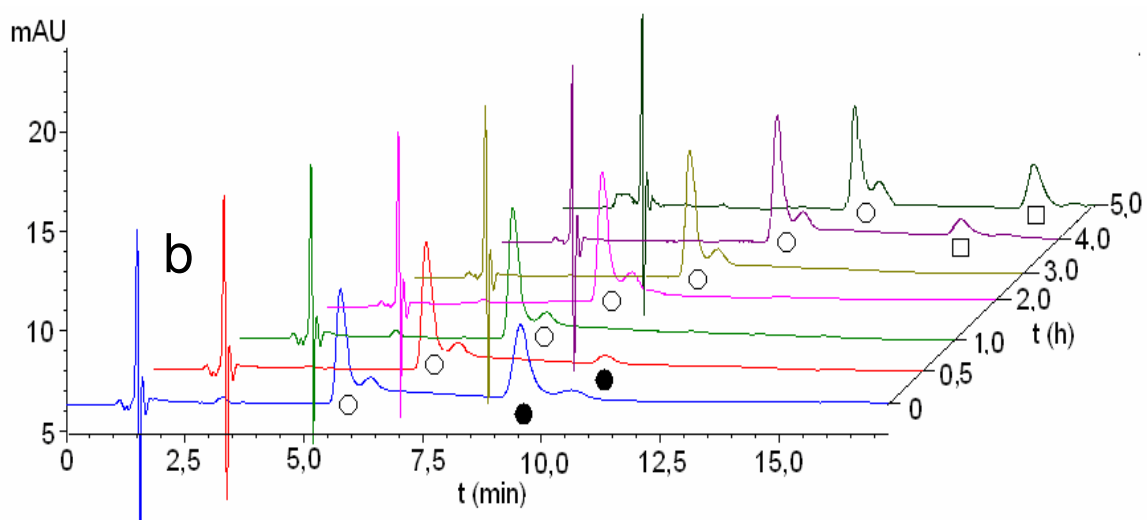
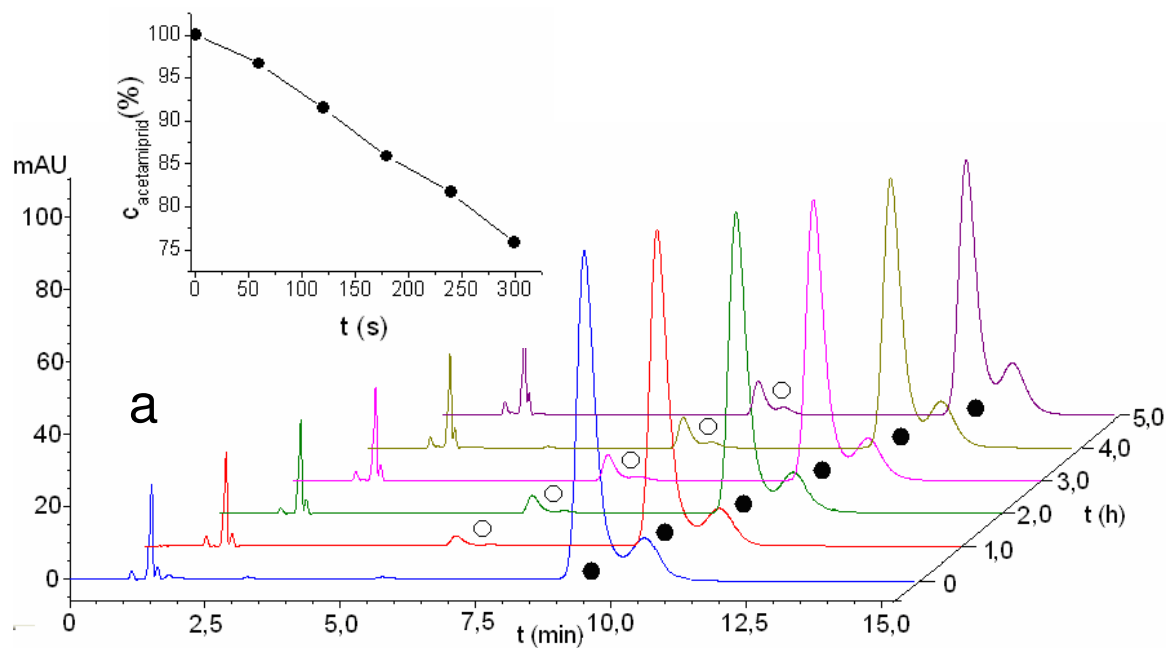
ispitivanja stabilnosti dobijaju se informacije o prisutnom broju jedinjenja. Na osnovu retencionih vremena mogu se izvesti zaključci o polaritetu jedinjenja, a na osnovu UV spektara pojedinačnih pikova i ranijih preliminarnih ispitivanja pomoću derivativne UV spektrofotometrije mogu se i kvalitativno pratiti pojedine komponente. Naime, UV spektri snimljeni paralelno sa hromatogramima mogu pokazati da li je reč o pik koji sadrži samo jednu komponentu (neonikotinoid ili degradacioni proizvod) ili ne. Na osnovu kvantitativnih podataka može se odrediti i dinamika hidrolize i energija aktivacije.

U slučaju acetamiprida (slika 63) pri pH 9,0 (a) tokom prvih sat vremena hidrolize pored polaznog jedinjenja javlja se jedan manji pik sa retencionim vremenom 5,71 min. U prvih sat vremena pri pH 12,0 (b) dolazi do potpune hidrolize acetamiprida. Glavni degradacioni proizvod je prisutan i nakon pet sati hidrolize, ali nakon trećeg sata podleže daljoj hidrolizi, što potvrđuje smanjenje intenziteta signala na 5,71 i pojava novog signala. Tiakloprid, 16,12 min, (slika 64) je stabilan pri pH 9,0 (a) i 12 (b) tokom četiri sata alkalne hidrolize na 60°C. Imidakloprid (slika 65) je relativno stabilan pri pH 9,0 (a), dok se u potpunosti hidrolizuje pri pH 12,0 (b) u roku od 1,5 h. Glavni degradacioni proizvod je polarniji od imidakloprida, sa retencionim vremenom 5,08 min. Tiametoksam (slika 66) je najnestabilnije jedinjenje pri pH 9,0 (a). Naime, posle četiri sata njegove hidrolize ostaje manje od 20% polaznog jedinjenja. Mogu se zapaziti dva degradaciona proizvoda sa retencionim vremenima 5,82 i 7,05 min. Pri pH 12 (b) na 60°C izvršena je trenutna alkalna hidroliza, nastaje jedan pik/degradacioni proizvod sa retencionim vremenom 5,82 min [155].

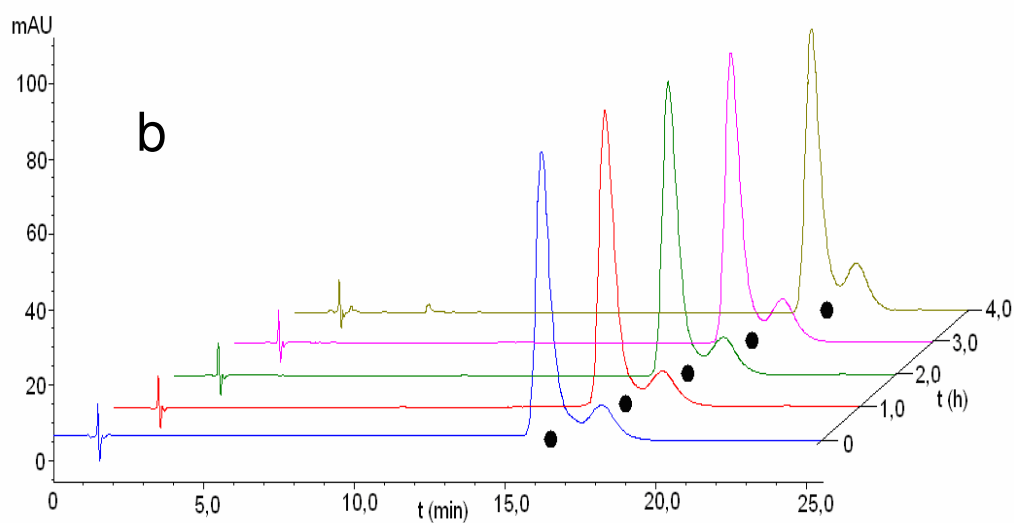
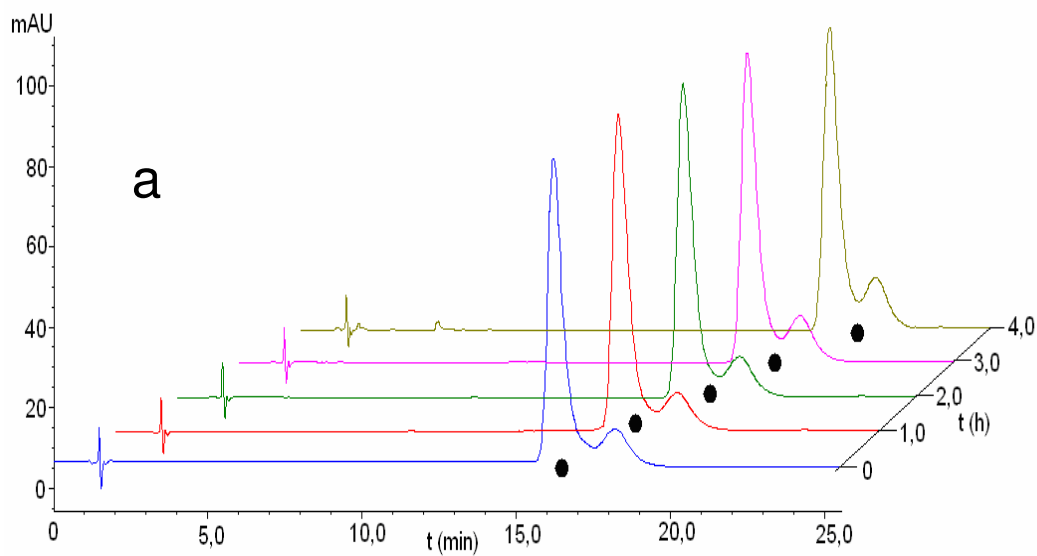
Rezultati dobijeni HPLC/DAD tehnikom su u dobroj saglasnosti sa onima dobijenim NMR merenjima.



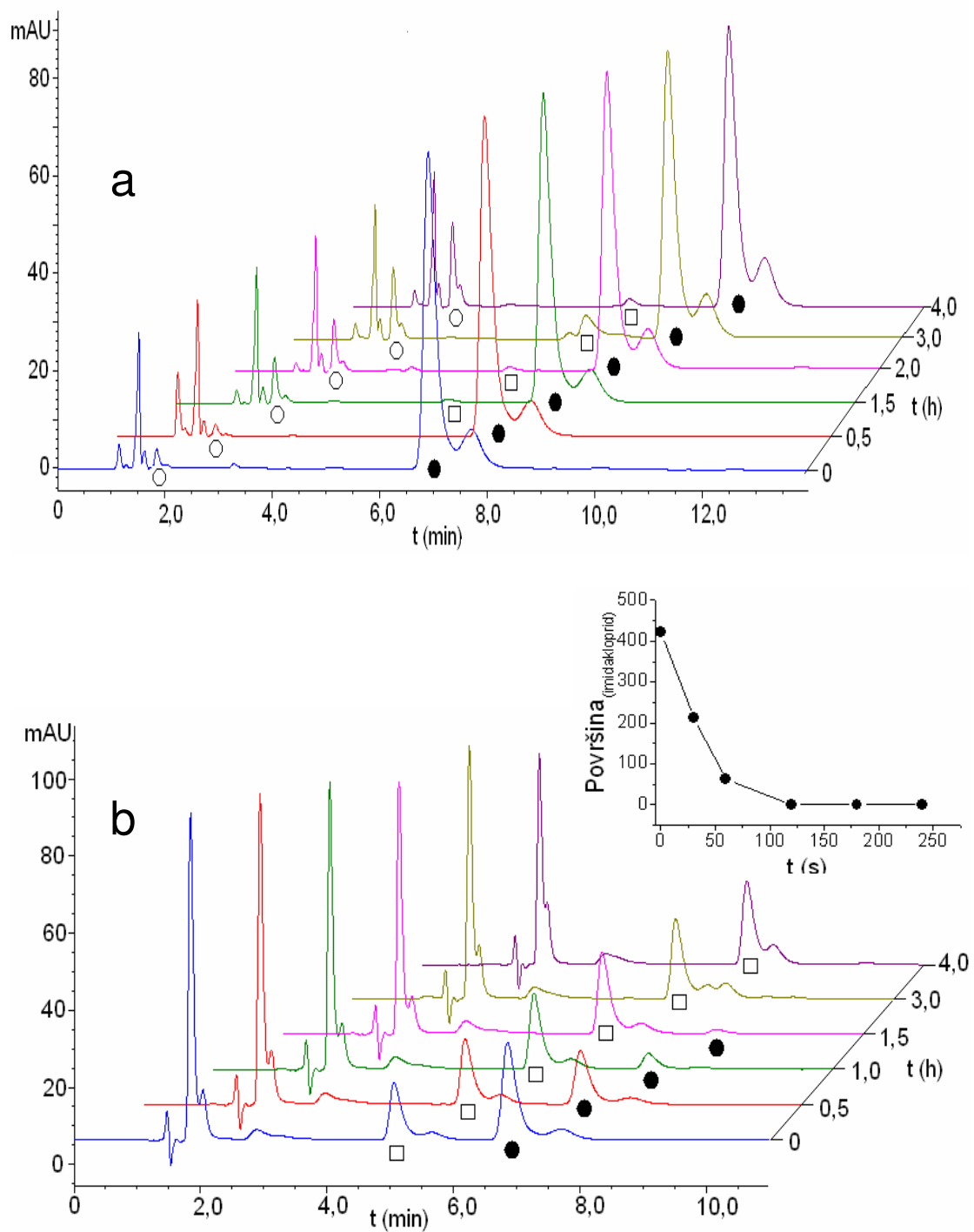
Slika 62. Uticaj sastava mobilne faze na hromatograme imidakloprida i 6-hloronikotinske kiseline: a) voda (0,2% fosforna kiselina): acetonirtil, 40 : 60, (v/v), 270 nm, b) voda (0,2% fosforna kiselina): acetonirtil, 15 : 85, (v/v), 270 nm i c) voda (0,2% fosforna kiselina): acetonirtil, 15 : 85, (v/v), 224 nm i paralelno snimljeni UV spektri pikova. Zorbax kolona.



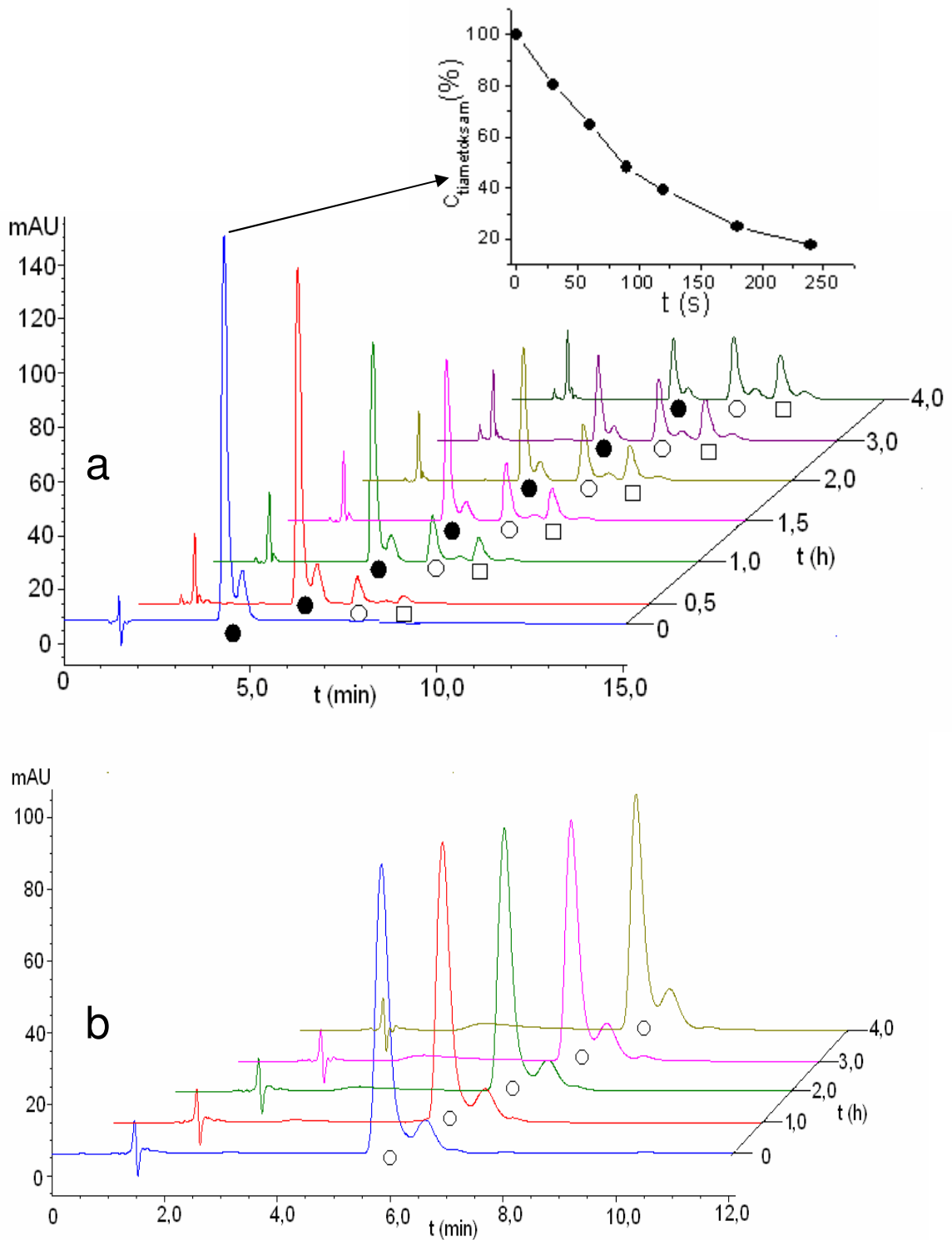
Slika 63. Hromatografski profili acetamiprida u različitim vremenskim intervalima na 60 °C pri različitim vrednostima pH: a) 9,0, $\lambda=224$ nm i b) 12,0, $\lambda=245$ nm. ● signal polaznog jedinjenja i O, □ novi signali



Slika 64. Hromatografski profili tiakloprida u različitim vremenskim intervalima na 60 °C pri različitim vrednostima pH: a) 9,0, i b) 12,0. ● signal matičnog jedinjenja, $\lambda=242$ nm



Slika 65. Hromatografski profili imidakloprida u različitim vremenskim intervalima na 60 °C pri različitim vrednostima pH: a) 9,0, $\lambda = 224$ nm i b) 12,0, $\lambda = 270$ nm. ● signal polaznog jedinjenja i O, □ novi signali



Slika 66. Hromatografski profili tiametoksama u različitim vremenskim intervalima na 60 °C pri različitim vrednostima pH: a) 9,0, $\lambda = 224 \text{ nm}$ i b) 12,0, $\lambda = 245 \text{ nm}$. ● signal polaznog jedinjenja i ○, □ novi signali

Na osnovu krive hidrolize ($f(t)$, $\ln c$) računane sa hromatografskih profila, može se zaključiti da krive odgovaraju kinetici prvog reda, i da je moguće odrediti koeficijent pravca (k) prema opštoj jednačini:

$$\ln c = -kt + B$$

gde je

c - koncentracija matičnog jedinjenja

t - vreme

k - konstanta hidrolize i

B - odsečak na ordinati.

Primenom Arrhenius-ove jednačine mogu se izračunati energije aktivacije za hidrolizu neonikotinoida:

$$\ln k = \frac{E_a}{RT} + B$$

gde je

E_a - energija aktivacije

R - univerzalna gasna konstanta

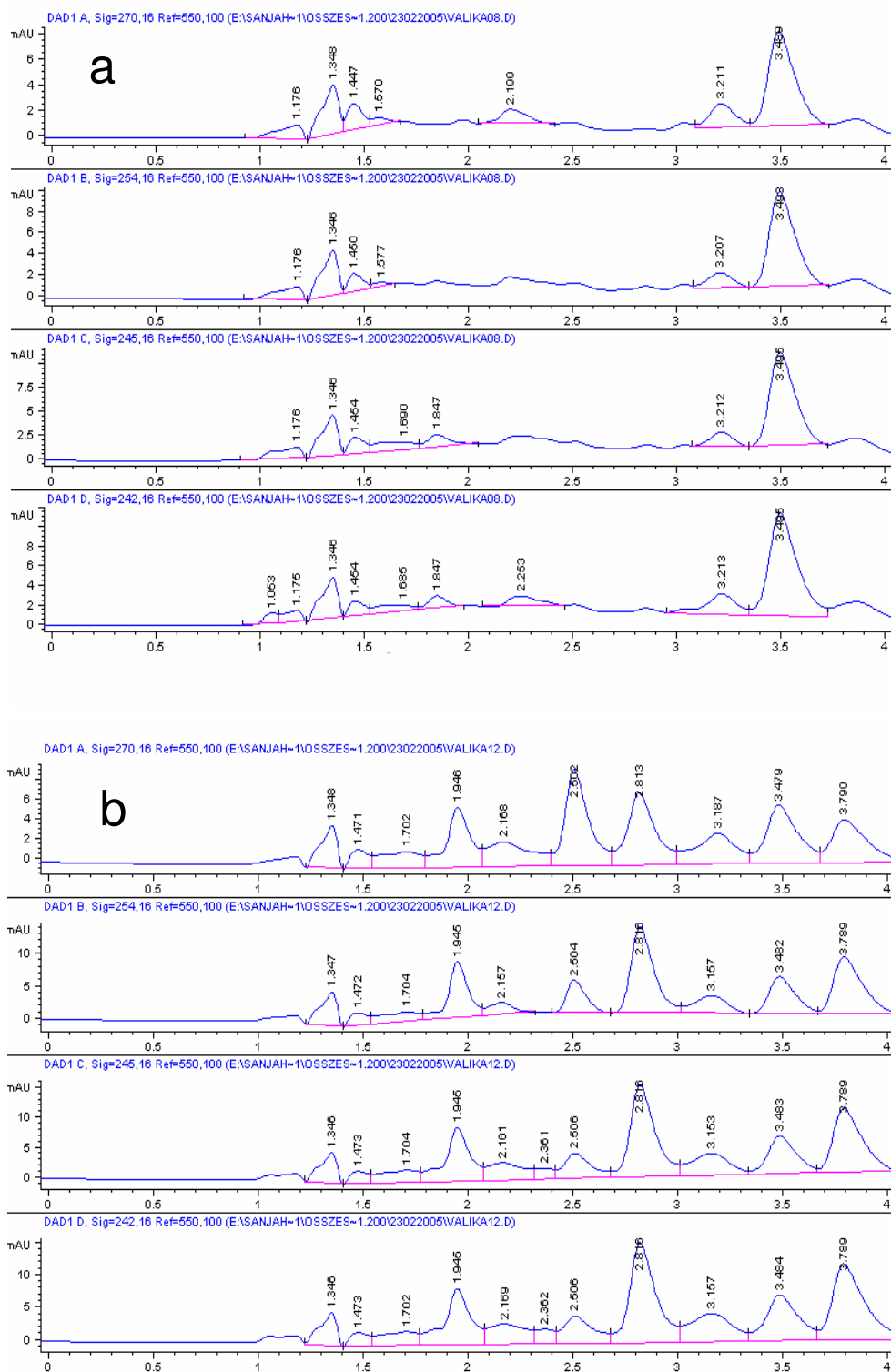
T - temperatura

Na osnovu kombinacije ovih jednačina E_a za acetamiprid pri pH 9,0 iznosi 31,7 kJ/mol, a pri pH 12,0 ista je 18 kJ/mol. U slučaju imidakloprida pri pH 9,0, E_a je veća, a pri pH 12,0 znatno niža i iznosi 22,5 kJ/mol. Tiametoksam je najmanje stabilan u baznoj sredini, što potvrđuje i izračunata E_a od 26,30 kJ/mol pri pH 9,0. U slučaju pH 12 i 60 °C tiametoksam se momentalno transformiše u manje polarni degradacioni proizvod. Tiakloprid, sa neizmenjenim pikom je verovatno najstabilniji od navedenih jedinjenja.

Analitički aspekt primene HPLC/DAD tehnike. Rezultati određivanja neonikotinoidea, razrađenim metodama, pre svega tiametoksama, iz različitih formulacija, kao i uzoraka krompira, kukuruza i rečne vode su navedeni u diskusiji na odgovarajućim stranama u okviru tumačenja drugih metoda (strana 77, 80, 107, 108, 130, 134), jer je HPLC/DAD uvek bila komparativna metoda.

Pored toga, razrađena je i rutinska metoda određivanja četiri neonikotinoidea u smeši u medu, primenom kombinovane tečno-tečne ekstrakcije i ekstrakcije na čvrstoj fazi. "Spajkovani" uzorci meda (0,4 and 1,0 mg neonikotinooid/kg), rastvoreni u vodi, su preliminarno ekstrahovani dihlormetanom i upareni na vakuum-uparivaču. Suvi ostatak je rekonstituisan u vodi i pet različitih kolona za prečišćavanje (Strata C18-E, Strata FL-PR, Strata X, EXTrelut[®]NT20 and Waters Sep Pak C18) je ispitano za daljnja prečišćavanja matriksa. Rezultati ekstrakcija su upoređivani sa podacima dobijenim klasičnom dihlormetanskom ekstrakcijom i ekstrakcijom na čvrstoj fazi bez preliminarne ekstrakcije. Može se zaključiti da ni tečno-tečna ekstrakcija, ni kolone za prečišćavanje same nisu obezbeđivale dovoljno selektivno razdvajanje. Kod kolona manjih kapaciteta direktno nanošenje meda u vodi je problematično i zbog toga, što dolazi do začepjenja kolona. Nađeno je da je Strata C18-E kolona najbolja za prečišćavanje (prinos 76-95%) u kombinaciji sa preliminarnom dihlormetanskom ekstrakcijom. Kolona se kondicionira pomoću 5 ml metanola, pere pomoću 10 ml vode, i uzorak se nanese u vidu vodenog rastvora (5 ml). Kolona je prana pomoću 6 ml vode, zatim je osušena. Neonikotinoidi su eluirani pomoću 4 ml metanola. U vodu za pranje kolone ne treba dodati metanol, jer dolazi do preranog eluiranja najpolarnijeg jedinjenja, tiametoksama, a delimično i imidaklorida. Dobijena RSD vrednost je u svim slučajevima bila ispod 10%.

Na slici 67a su prikazani hromatogrami prečišćenog matriksa slepe probe, a na slici 67b hromatogrami "spajkovanih" uzoraka meda, dobijeni na četiri odabrane radne talasne dužine. Kao što se može videti, matriks je prečišćen selektivno. Prisutni pikovi zbog položaja svojih retencionih vremena ne smetaju pri određivanju četiri neonikotinoidea iz meda, dakle komponente matriksa se ne koeluiraju sa neonikotinooidima. Metoda je u fazi dalje razrade [156,157].



Slika 67. Hromatogrami a) prečišćenog matriksa slepe probe i b) "spajkovanih" uzoraka meda dobijeni na četiri odabrane radne talasne dužine.

4.4.2. Određivanje neonikotinoida tečnom hromatografijom visoke efikasnosti uz primenu optotermičkog spektrometrijskog detektora

Optimizacija HPLC/TLS metode. TLS je nespecifična detekciona tehnika tragova i zbog toga se javlja potreba za prethodnim razdvajanjem pojedinih komponenata analita uobičajenom tečno-hromatografskom tehnikom [82, 158-161]. Zbog same prirode TLS tehnike jedina primenljiva metoda je izokratska. Na osnovu literature, smeša vode i acetonitrila se često primenjuje kao mobilna faza pri određivanju neonikotinoida na reversnoj fazi na C-18 koloni. Pri optimizaciji sastava mobilne faze nađeno je da se povećanjem zapreminskog udela acetonitrila, npr. 4 : 6 (v/v) voda (0,2% fosforna kiselina): acetonitril, povećava osetljivost metode, što je u skladu sa jednačinom, koja opisuje optotermički efekat na sledeći način [82]:

$$\frac{\Delta I}{I} = \frac{2,303 AP (-\delta n/\delta T)}{1,91 \lambda k} = 2,303 AE$$

$$E = \frac{P (-\delta n/\delta T)}{1,91 \lambda k}$$

gde je:

$\delta n/\delta T$ - temperaturni koeficijent indeksa refrakcije

k - termička provodljivost

A - apsorbancija

E - uvećanje

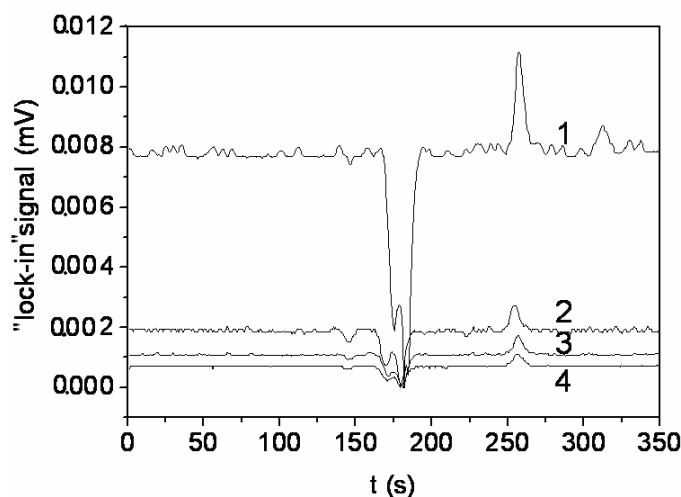
P - snaga ekscitacionog lasera

λ - radna talasna dužina "lasera pumpanja"

S druge strane, povećanjem sadržaja acetonitrila smanjuje se efikasnost razdvajanja, što može da dovede do koelucije jedinjenja. Ova pojava je najizraženija u slučaju imidakloprida i acetamiprida, dva neonikotinoida sa bliskim retencionim vremenima. Shodno iznetim činjenicama, odnos 3 : 7 (v/v) voda (0,2% fosforna kiselina): acetonitril može da bude optimalni sastav mobilne faze pri izokratskim uslovima razdvajanja četiri insekticida, tj. za dobijanje oštarih, simetričnih, diskretnih signala [162,163].

Ranija istraživanja su ukazala na činjenicu da prisustvo fosforne kiseline dovodi do oštarih, simetričnih pikova, što direktno utiče na efikasnost razdvajanja. S druge strane, odavno je poznato da prisustvo veće količine fosforne kiseline može da nepovoljno utiče na S/N odnos. Optimizacijom sastava mobilne faze našli smo da sadržaj fosforne kiseline $\leq 0,2\%$ nije imao znatnijeg uticaja na rast nivoa šuma [162, 163].

Nasuprot TLS merenjima u statičnim sistemima, fluktuacija u protoku eluenta umnogome utiče na stabilnost HPLC/TLS signala. Ključni TLS parametri kao što su frekvencija modulacije i vremenska konstanta sinhronog pojačivača treba da budu pažljivo optimizovani radi povećanja S/N odnosa. Kao što to eksperimenti pokazuju, izborom duže vremenske konstante sinhronog pojačivača (do 3 s), signali su usrednjeni tokom dužeg vremenskog intervala i šum se redukuje. S druge strane, upravo zbog dužeg perioda usrednjavanja, signali su širi, gube oštrinu i sistematski se pomeraju ka većim retencionim vremenima. Zato je za optimalnu vremensku konstantu odabran je 1 s [163].



Slika 68. Uticaj modulacione frekvencije na analitički signal i S/N odnos. Uzorak: $200 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ imidaklopid; $P = 100 \text{ mW}$; vremenska konstanta 1 s; f (Hz): (1) 12,5, (2) 60, (3) 80 i (4) 120. Mobilna faza 6:4, v/v voda (0,2% fosforna kiselina) : acetonitril [108]

Dodatna poboljšanja S/N odnosa su dobijena optimizacijom modulacione frekvencije ekscitacionog laserkog snopa. S/N odnos ispitivanog HPLC/TLS signala se poboljšava ako se modulaciona frekvencija menja od 12,5 do 120 Hz (slika 68). S druge strane, pri višim vrednostima modulacione frekvencije, usled smanjenja ekscitacionog perioda, dolazi i do smanjenja visine pika. Uravnotežavanje ove dve pojave se može postići na 80 Hz i zbog toga je ova frekvencija odabrana kao optimalna za rad. Optimalna snaga lasera je 100 W [163].

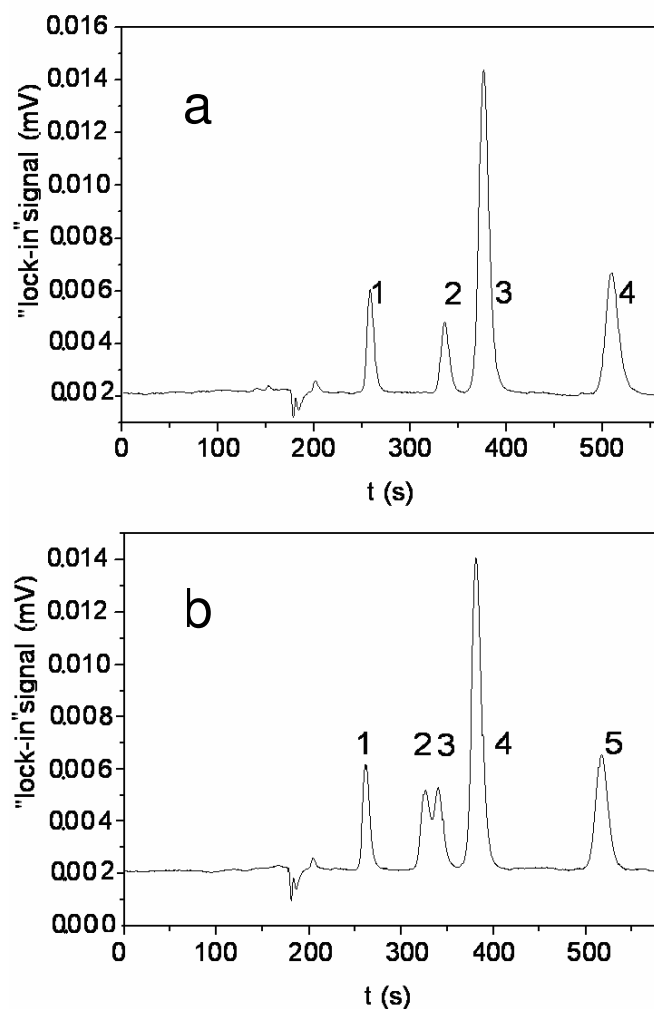
Određivanje insekticida neonikotinoidea. Retenciona vremena (t_R) i reproduktivnost (RSD) određeni za pojedinačne komponente metodom HPLC/TLS i uporednom HPLC/DAD tehnikom su predstavljeni u tablici 16 [163].

Tablica 16. Retenciona vremena i reproduktivnost određivanja neonikotinoidea primenom HPLC/TLS i HPLC/DAD tehnika ($n= 6$) [163]

Insekticid	Tehnika			
	HPLC/TLS		HPLC/DAD	
	t_R (s)	RSD (%)	t_R (s)	RSD (%)
Tiametoksam	261,0	0,12	257,8	0,10
Imidaklopid	342,4	0,66	337,4	0,12
Acetamiprid	391,9	0,33	373,1	0,10
Tiaklopid	510,6	0,57	511,6	0,22

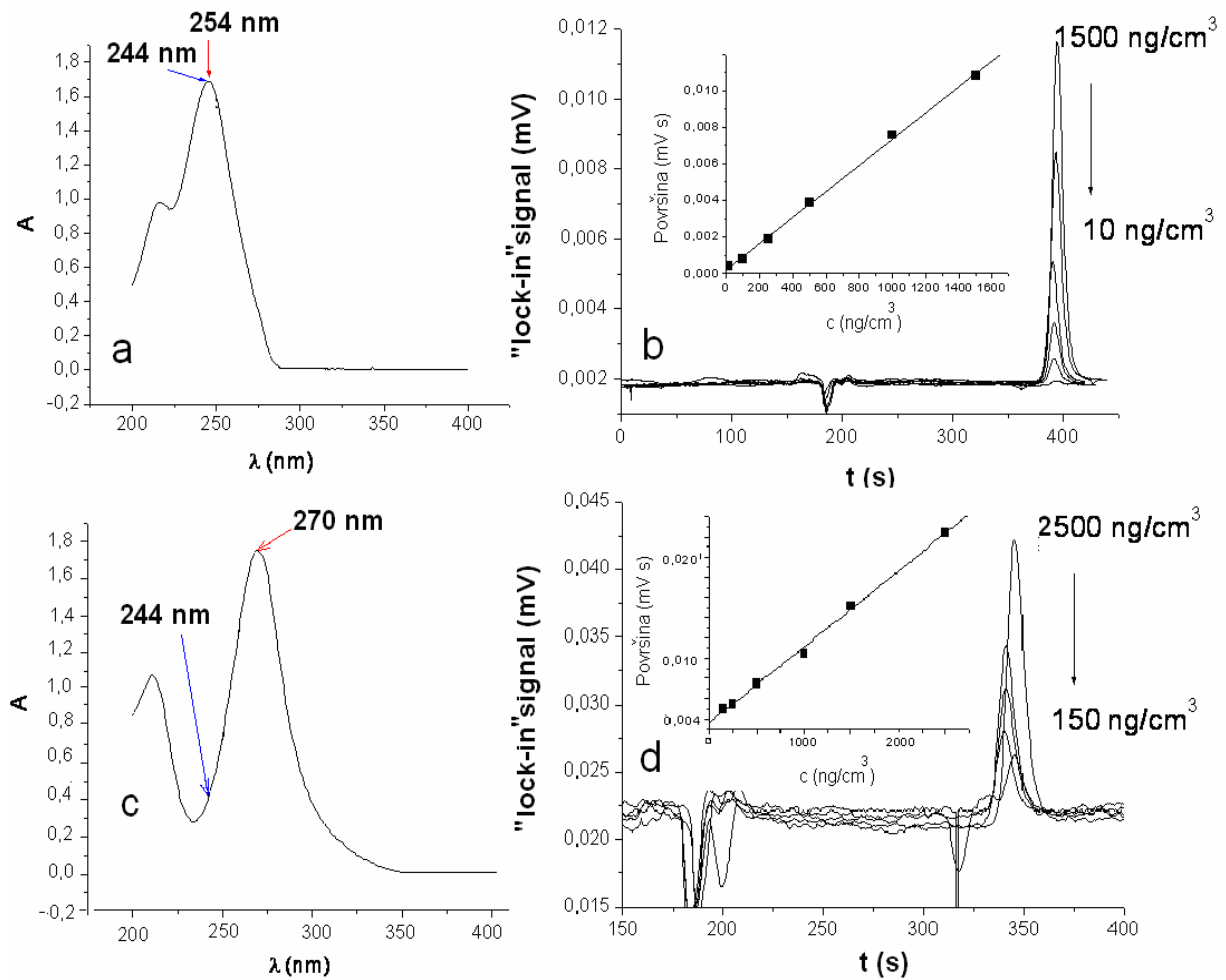
Ispitivanje efikasnosti razdvajanja i određivanja neonikotinoidea je izvršeno optimizovanom HPLC/TLS metodom. Kao što se može videti sa slike 69a, dobijena retenciona vremena su veoma slična onima koja su dobijena za individualne komponente, sa efikasnošću razdvajanja većom od 1,5. Rezultati su u saglasnosti sa podacima dobijenim HPLC/DAD tehnikom. U slučaju 6-hloronikotinske kiseline i imidakloprida postignuto je samo parcijalno razdvajanje (slika 69b, pikovi 2 i 3) [163].

Kvantitativno određivanje se zasniva na linearnoj zavisnosti između površine pika i odgovarajuće koncentracije neonikotinoidea. Analitički parametri su prikazani u tablici 10. Reproductivnost HPLC/TLS odziva je računata na osnovu šest ponovljenih merenja jedne serije (100 ng/cm³), pri čemu je računanje vršeno na osnovu odgovarajućih površina. Rezultati su u saglasnosti sa onima dobijenim HPLC/DAD tehnikom [163].



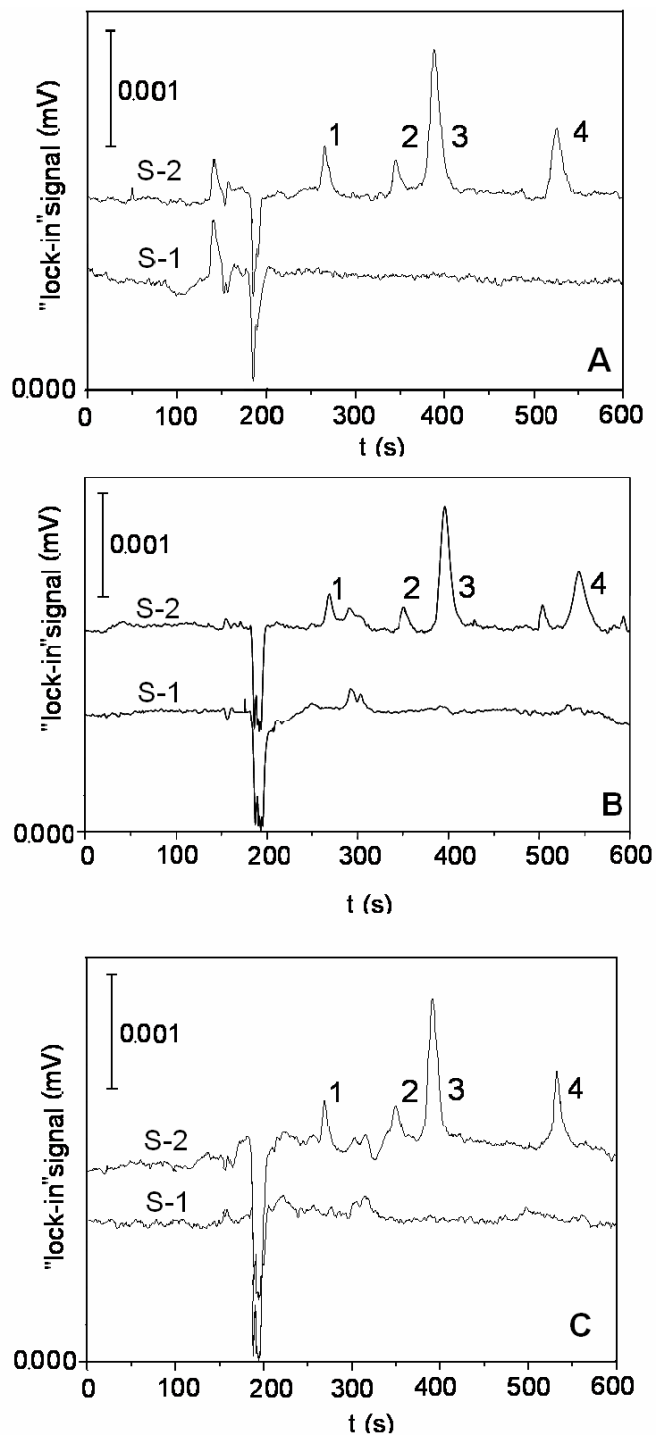
Slika 69. HPLC/TLS signali $1 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ rezidua analita: a) tiametoksam (1); imidakloprid (2); acetamiprid (3) i tiakloprid (4) [108] i b) tiametoksam (1); 6-hloronikotinska kiselina (2); imidakloprid (3) acetamiprid (4) i tiakloprid (5). $P = 100 \text{ mW}$, vremenska konstanta 1 s ; $f = 80 \text{ Hz}$, mobilna faza $7 : 3$, v/v voda (0,2% fosforna kiselina) : acetonitril

Kao što se može zaključiti na osnovu slike 70 i tablice 17, TLS tehnika je osetljiva na ppb nivou. U slučaju imidakloprida (slika 70, c i d) i tiametoksama analitički parametri dobijeni TLS i DAD detektorima su u dobroj saglasnosti. Veoma visoka osetljivost, dobijena u slučaju acetamiprida i tiakloprida se može objasniti činjenicom da ova jedinjenja imaju apsorpcione maksimume na 245 (slika 70, a i b) i 242 nm, koji su veoma bliski radnoj talasnoj dužini ekscitacionog lasera, šta nije slučaj pri određivanju imidakloprida (slika 70, c i d). LOQ vrednosti acetamiprida i tiakloprida dobijena TLS tehnikom, koja je poznata po svojoj osetljivosti i preko $10^{-7} \text{ mol}/\text{dm}^3$, su oko 10 puta niže u poređenju sa rezultatima dobijenim DAD tehnikom [163].



Slika 70. Odnos radne talasne dužine ekscitacionog lasera i maksimuma apsorpcije acetamiprida (a) i imidakloprida (c) i odgovarajući hromatogrami sa insertovanim kalibracionim dijagramima za acetamiprid (b) i imidakloprid (d)

Primenljivost optimizovane HPLC/TLs tehnike je ispitana na primeru određivanje četiri neonicotinoida (slika 71) u tretiranim uzorcima vode reke Vipave (a), paprike (b) i krompira (c) [163].



Slika 71. HPLC/TLS signali ekstrakta površinske rečne vode Vipave (a), paprike (b) i krompira (c), pri čemu netretirani uzorci nose naznaku S-1, a tretirani 100 ng/cm^3 neonikotinoida S-2: (1) tiametoksam; (2) imidakloprid; (3) acetamiprid i (4) tiakloprid; $P = 100 \text{ mW}$, vremenska konstanta 1 s ; $f = 80 \text{ Hz}$, mobilna faza 7:3, v/v voda (0,2% fosforna kiselina) : acetonitril. Kriva (S-2) je vertikalno pomerena [163]

Efikasnost postupka analize je proverena putem testova prinosa u slučajevima krompira, paprike i rečne vode uz dva različita standardna dodatka (0,025 i 0,1 višekomponentni sistem mg/kg biljni materijal ili mg/dm³ voda), kao što je to navedeno u eksperimentalnom delu. Insekticidi iz biljnog materijala su ekstrahovani dihlormetanom. Srednja vrednosti prinosa u intervalu 78–93% i RSD od 2,9 do 5,3%, potvrđuju da se ispitivani pesticidi efikasno mogu ekstrahovati dihlormetanom. Slika 71 prikazuje HPLC/TLS signale dobijene za ekstrakt slepe probe paprike (kriva S-1) i uzorka paprike "spajkovanog" standardnim rastvorom četiri insekticida (kriva S-2). Kao što se može videti, posle ekstrakcije i razdvajanja nema komponenata koje se koeluiraju i interferiraju sa ispitivanim jedinjenjima kod rečne vode i paprike, a donekle i kod uzoraka krompira [163].

Koncentracije od 0,01 mg imidakloprida, tiametoksama po kilogramu krompira ili paprike, 0,002 mg acetamiprid/kg i 0,004 mg tiakloprid/kg, se mogu definisati kao granica određivanja metode; niže koncentracije ne rezultuju uvek u dobro definisanim pikovima i prema tome ovi sadržaji se mogu smatrati kao LOQ vrednosti. Ovaj nivo osetljivosti je dovoljan za određivanje tragova neonikatinoida o ovakvim tipovima uzoraka [163].

Osetljivost opisane TLS tehnike detekcije nadmašuje DAD tehniku, naročito u slučaju određivanja acetamiprida i tiakloprida (Tablica 18). Prednosti su evidentne zbog niske vrednosti LOQ i male potrebne količine uzorka za analizu, što ujedno i pojednostavljuje i ubrzava obradu uzoraka.

Tablica 17. Analitički parametri HPLC/TLS i HPLC/DAD određivanja [163]

Insekticid	Metoda					
	HPLC/TLS			HPLC/DAD		
	LOD (µg/dm ³)	LOQ (µg/dm ³)	RSD (%)	LOD (µg/dm ³)	LOQ (µg/dm ³)	RSD (%)
Tiametoksam	15	50	0,9	39	130	0,9
Imidakloprid	27	89	1,1	27	89	1,1
Acetamiprid	3,2	10	0,8	26	85	0,8
Tiakloprid	7,5	25	0,7	23	76	0,9

Zbog svih navedenih prednosti može se očekivati da ova metoda nađe širu primenu u oblasti zaštite životne sredine i analizi bioloških uzoraka [163].

Shodno postavljenom zadatku u ovoj doktorskoj disertaciji je izvršena karakterizacija i razradene metode određivanja odabranih neonikotinoida (imidakloprida, tiametoksama, acetamiprida i tiakloprida) kao i 6-hloronikotinske kiseline, kao glavnog proizvoda njihove degradacije. Postupci određivanja su razrađeni za model-sisteme, formulacije pojedinih neonikotinoida i nekim slučajevima i u realnim uzorcima (krompir, paprika, kukuruz i rečna voda). Većina dobijenih rezultata bila je saopštena na naučnim skupovima [88-90, 98, 148, 149, 153, 155-157, 162] i objavljena u časopisima [91,99, 123, 150, 163].

5. IZVOD

Neonikotinoidi predstavljaju relativno novu grupu sistemskih insekticida sa specifičnim načinom delovanja. Do 2004. godine, u Evropskoj Uniji i našoj zemlji je bila registrovana primena četiri neonikotinoida: imidaklopid, tiametoksam, acetamiprid i tiaklopid. Zbog njihove široke upotrebe, ova jedinjenja i njihovi rezidui predstavljaju ozbiljnu opasnost za životnu sredinu, te je njihovo određivanje veoma važno za kontrolu životne sredine i namirnica. Zato smo u ovom radu postavili sebi za cilj da razradimo pogodne brze metode za određivanje navedena četiri neonikotinoida, kao i 6-hloronikotinske kiseline kao glavnog proizvoda njihove degradacije, s izuzetkom tiametoksama.

1. Razrađena je brza i jeftina spektrofotometrijska metoda za simultano određivanje acetamiprida/imidakloprida i 6-hloronikotinske kiseline u njihovim smešama. Zbog preklapanja njihovih spektara nultog reda, razrađen je postupak određivanja zasnovan na prvim izvodima. Za spektrofotometrijsko određivanje acetamiprida i 6-hloronikotinske kiseline korišćen je prvi izvod vrednosti apsorbancije na 269 i 218 nm u opsegu od 0,54-28,9 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$, odnosno 0,42-28,2 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$. Takođe je razrađena uporedna tačno-hromatografska metoda visoke efikasnosti (HPLC) sa obrnutom fazom za određivanje acetamiprida i 6-hloronikotinske kiseline. Kvantitativno određivanje je postignuto primenom detektora sa nizom dioda (DAD) na 254 nm. Kalibracioni dijagrami su linearni u koncentracionom opsegu 0,44-28,9 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ za acetamiprid i 0,83-28,2 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ za 6-hloronikotinskuom kiselinuom u njihovim smešama. Rezultati dobijeni spektrofotometrijskom i hromatografskom metodom pokazuju odgovarajuću tačnost, preciznost i ponovljivost. Na osnovu statističkog poređenja, nema značajnih razlika između razvijenih metoda.

Postojanost gornjih neonikotinoida je ispitivana jednostavnom UV-spektrofotometrijskom tehnikom pri različitim pH vrednostima (Britton-Robinson puferi pH 4,0, 7,0 i 9,0) u eksperimentima koji su trajali šest meseci.

2. Postojanost i kinetika hidrolize gornjih neonikotinoida je ispitivana primenom NMR tehnike pri različitim pH vrednostima (Britton-Robinson puferi pH 4,0, 7,0 i 9,0) u eksperimentima koji su trajali četiri meseca na 23° C, pod uslovima osvetljavanja sličnim prirodnima. Svi neonikotinoidi su bili stabilni u kiselim i neutralnim sredinama u toku dva meseca ali su lako hidrolizovali u baznoj sredini. Brzina hidrolize u baznoj sredini

(pH 9,0-12,0) se povećavala sa povećanjem pH i temperature (23-80°C). U slučajevima imidakloprida i acetamiprida identifikovan je jedan glavni proizvod hidrolize, a u slučaju tiametoksama nađen je još i jedan minorni proizvod. Izračunate su i odgovarajuće vrednosti energije aktivacije. Predstavljeni ¹H NMR spektri dobijeni uz potiskivanje signala vode pokazali su da hidroliza u smeši D₂O i Britton-Robinson pufera (pH 4,0, 7,0 i 9,0) bitno zavisi od pH sredine. Pošto svi ispitivani molekuli imaju elektron-akceptorske grupe, razlika u brzini i putu hidrolize je određena dodatno prirodom funkcionalne grupe u susedstvu ugljenikovog centra koji može biti cilj nukleofilnog napada. Najmanju postojanost je pokazao tiametoksam pri pH 9,0.

Ovo ispitivanje je pokazalo da NMR tehnika snimanja vremenski-zavisnih spektara može biti uspešno primenjena za praćenje postojanosti ispitivanih neonicotinoida i da takođe obezbedi kvalitativne i kvantitativne informacije o njihovim degradacionim proizvodima. Dobijeni rezultati mogu poslužiti kao osnova za razvijanje analitičkih metoda za određivanje ovih jedinjenja.

3. Razvijena je tečno-hromatografska metoda kombinovana sa ekstrakcijom na čvrstoj fazi za rutinsko određivanje četiri neonicotinoida (imidakloprid, tiametoksam, acetamiprid i tiakloprid) u komercijalnim uzorcima meda. Uzorci meda sa dodatim neonicotinoidom (0,4 i 1,0 mg nikotinoid/kg) rastvoreni u vodi su bili preliminarno ekstrahovani pomoću dihlormetana i upareni. Ostatak je bio rastvoren u destilovanoj vodi i četiri različite katridž-kolone (Strata C18-E, Strata FL-PR, Strata X, Extrelut® NT20 i Waters Sep Pak C18) su bile primenjene za prečišćavanje rekonstituisanog matriksa. Rezultati su upoređivani sa klasičnom dihlormetanskom ekstrakcijom i prečišćavanjem na čvrstoj fazi bez preliminarne ekstrakcije. Nijedan od postupaka nije dao željenu selektivnost. Najbolje iskorišćenje (76-95%) je postignuto primenom kolone Strata C18-E. Dobijena relativna standardna devijacija (RSD) je bila ispod 10%.

4. Cilj ovih ispitivanja je takođe bio da se odrede tragovi neonicotinoida metodom tačne hromatografije kombinovane sa spektrometrijom na bazi detektora sa termičkim sočivima. Ova metoda analize više rezidua se zasniva na razdvajanju na obrnutoj fazi (kolona C₁₈), izokratskom razblaživanju i kolinearnom dvostrukom zraku TLS detektora. Vremena zadržavanja tiametoksama, imidakloprida, acetamiprida i tiakloprida su bila 4,3, 5,7, 6,4 i 8,6 min, uz odgovarajuće granice određivanja (LOQ) od 50,0, 100, 10,0 i 25,0 ng/cm³, što daje dobro slaganje sa rezultatima dobijenim uz primenu DAD. Vrednosti LOQ za acetamiprid i tiakloprid dobijene uz TLS, koja omogućava da se mere apsorbancije čak i do 10⁻⁷ mol/dm³, su bile 10 puta niže u poređenju sa onima dobijenim

uz pomoć DAD. Primenljivost razrađenog postupka je bila proverena na "spajkovanim" uzorcima rečne vode, krompira i paprike. Razrađeni HPLC/TLS postupak poslužio je za određivanje četiri neonikotinoidea u njihovoj smeši. Postupak omogućava osetljivo, selektivno i reproduktivno određivanje tragova ovih neonikotinoidnih pesticida i u nekim slučajevima se pokazao boljim od HPLC/DAD metode. Naime, vrednosti granice detekcije (LOD) i LOQ su niže za 2,5-8,5 puta za tiametoksam, acetamiprid i tiakloprid u poređenju sa HPLC/DAD, uz slične vrednosti RSD. Metoda je bila uspešno primenjena za određivanje neonikotinoidea u nekoliko realnih uzoraka i HPLC/TLS rezultati su bili poredljivi sa onima dobijenim metodom HPLC/DAD (maksimalno odstupanje između metoda 15%). Efikasnost ekstrakcije u slučaju paprike bila je 84-93%. Prema tome, HPLC/TLS metoda predstavlja korisnu metodu za brzo određivanje neonikotinoidnih pesticida. Stoga, metoda može naći svoju dalju primenu u analizi realnih uzoraka na ppb nivou i ona predstavlja obećavajuću tehniku za određivanje neonikotinoidea u biološkim uzorcima.

5. Razrađena je jednostavna diferencijalno-pulsna polarografska (DPP) metoda za brzo određivanje tiametoksama u njegovim komercijalnim formulacijama i nekim realnim uzorcima. Polarografska karakterizacija tiametoksama sugerise 4-elektronski redukcionni proces pri pH 8,0, pri čemu nastaje hidrosilamin kao reakcionni proizvod, koji se dalje redukuje u dvoelektronskom koraku, dajući amin. Prvi pik redukcije je iskorišćen za kvantitativna merenja. Razrađena DPP metoda omogućava osetljivo određivanje tiametoksama uz odgovarajuću reproduktivnost i iskorišćenje. Metoda je bila uspešno primenjena za određivanje tiametoksama u komercijalnim formulacijama i nekoliko realnih uzoraka. DPP rezultati su bili uporedljivi sa onima dobijenim standardnom metodom tečne hromatografije. Metoda je mogla da se primeni bez koraka prečišćavanja ekstrakta tiametoksama u komercijalnim formulacijama i realnim uzorcima. Prema tome, razvijena DPP metoda predstavlja koristan alternativni način određivanja tiametoksama. Metoda može naći primenu za određivanje ovog neonikotinoidea na ppb nivou.

6. Takođe je razrađena i jednostavna voltametrijska metoda uz primenu elektrode od staklastog ugljenika (GCE) za određivanje dva člana grupe neonikotinoidea - imidakloprida i tiametoksama. Eksperimenti su pokazali da voltametrijski odziv zavisi od načina pripreme elektrodne površine i načina polarizacije. Dobijen je linearni odziv u opsegu od 0,025 do 0,50 mg/cm³ za oba analita. Vrednosti LOD su bile 0,0077 mg/cm³ za imidakloprid i 0,0085 mg/cm³ za tiametoksam, uz LOQ vrednosti od 0,026 mg/cm³ i

0,028 mg/cm³, respektivno. Metoda je primenjena za određivanje ovih neonikotinoida u uzorcima krompira koji je bio prskan komercijalnim formulacijama imidakloprida i tiametoksama Confidor 200-SL ili Actara 25-WG. Ogledi iskorišćenja su dali rezultate u opsegu 95-102% za dva neonikotinoida.

7. Bizmut-film elektroda (BiFE) je bila uspešno primenjena za voltametrijsko određivanje tiametoksama. Preduslov za dobro funkcionisanje elektrode jeste nanošenje filma iz vrlo kiselog, relativno koncentrovanog Bi(III) rastvora koji sadrži bromid, pri čemu je smanjen efekat hidrolize. Odgovarajuća priprema GCE kao podloge poboljšava reproduktivnost filma i odgovarajuće kondicioniranje BiFE sprečava nestabilnost bazne linije koja potiče verovatno od prisutnog bizmut-oksida, što je potvrđeno elektronskom mikroskopijom uz primenu detektora na bazi energetske disperzije (EDS).

Metodom diferencijalne pulsne voltametrije (DPV) je određen tiametoksam u Britton-Robinson puferu pH 8,0, pri čemu je dobijen linearni opseg u granicama od 1,26 do 45,0 µg/cm³, uz odgovarajuće LOD i LOQ vrednosti od 0,38 i 1,26 µg/cm³. Analitička primenljivost BiFE se približava onoj dobijenoj za živinu elektrodu i upoređljiva je sa HPLC/DAD metodom. Razvijeni postupak bi mogao biti primenjen u analitici životne sredine za određivanje tiametoksama u uzorcima povrća bez prethodnog prečišćavanja uzorka, čime se dobija ušteda u vremenu i novcu, a takođe se štiti i životna sredina.

Većina dobijenih rezultata bila je saopštena na naučnim skupovima i objavljena u časopisima.

6. SUMMARY

Neonicotinoids are a relatively new class of systemic insecticides with a distinct mode of action. In European Union and in our country, the use of four neonicotinoids, viz. imidacloprid, thiamethoxam, acetamiprid and thiacloprid, have been approved by 2004. Because of their wide use, these compounds and their residues represent a serious environmental threat. Thus, their determination is important for controlling both the environment and food. Because of that the aim of this work was to characterize the above neonicotinoids and develop fast and simple methods for their determination as well as for 6-chloronicotinic acid as the main product of their degradation, with the exception of thiamethoxam.

1. As first, we wanted to develop a rapid and inexpensive spectrophotometric method for simultaneous determination of acetamiprid/imidacloprid and 6-chloronicotinic acid in their mixtures. Due to the overlapping of their zero-order spectra, the first-order derivative spectrophotometric method was developed for this purpose. Acetamiprid and 6-chloronicotinic acid were determined based on first-order derivative absorbance values at 269 nm and 218 nm in the ranges of 0.54-28.9 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ and 0.42-28.2 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$, respectively. A comparative reversed-phase chromatographic method for the determination of acetamiprid and 6-chloronicotinic acid was described too. Quantitation was achieved by diode-array detection at 254 nm. Calibration curves were linear over the concentration ranges of 0.44-28.9 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ and 0.83-28.2 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ for acetamiprid and its mixture with 6-chloronicotinic acid, respectively. Results obtained by spectrophotometric and chromatographic methods showed adequate accuracy, precision and repeatability.

Persistence of the above insecticides was studied by simple UV spectrophotometric technique, at different pHs (Britton-Robinson buffers 4.0, 7.0 and 9.0) in the experiments lasting six months.

2. The persistence and kinetics of the hydrolysis of the above neonicotinoids were studied by NMR technique, at different pHs (Britton-Robinson buffers 4.0, 7.0 and 9.0) in experiments lasting four months at 23°C, under the insolation conditions similar to the

natural ones. All neonicotinoids were stable in acidic and neutral media during two months, but hydrolyzed readily in alkaline media. The hydrolysis rate in alkaline media (pH 9.0 - 12.0) increased with the increase in pH and temperature (23-80°C). In the cases of imidacloprid and acetamiprid, one main hydrolysis product was identified, but in the case of thiamethoxam an additional minor product was observed. The activation energy values for the hydrolysis is calculated. The presented water-suppressed ¹H NMR spectrometric study showed that their hydrolysis in the mixture of D₂O and Britton-Robinson buffers (pH 4.0, 7.0 and 9.0) is essentially dependent of the pH of the medium. As all investigated molecules have electron-withdrawing groups, the difference in the rate and pathway of hydrolysis are additionally determined by the nature of the functional groups in the vicinity of the carbon center that can be a target for the nucleophilic attack. The lowest persistence showed thiamethoxam at pH 9.0.

This study demonstrated that the applied NMR technique of recording time-dependent spectra can be successfully used to monitor the persistence of the investigated neonicotinoids, and also provide qualitative and quantitative information about their degradation products. The obtained results can serve as a basis for the development of other analytical methods for the determination of these pesticides.

3. A liquid chromatographic HPLC method combined with solid-phase extraction for routine simultaneous determination of the four neonicotinoids (imidacloprid, thiamethoxam, acetamiprid and thiacloprid) in commercial honey samples was developed. Fortified honey samples (0.4 and 1.0 mg neonicotinoid/kg), dissolved in water were preliminarily extracted with dichloromethane and evaporated. The residue was redissolved in distilled water, and five different cartridge-column (Strata C18-E, Strata FL-PR, Strata X, EXtrelut@NT20 and Waters Sep Pak C18) were evaluated for the clean-up of the reconstituted matrix. The results were compared with classical dichloromethane extraction and solid-phase clean-up without preliminary extraction. Neither liquid-liquid extraction nor solid-phase clean-up showed a desired selectivity. The best recovery results (76-95%) were obtained using Strata C18-E. The obtained relative standard deviations (RSD) were less than 10%.

4. Also, we succeeded in determining the trace amounts of investigated neonicotinoids by HPLC coupled with thermal lens spectrometric (TLS) detector. This multiresidue analysis is based on the reversed phase separation (C₁₈ column), isocratic elution and collinear dual beam TLS detection. The retention times of thiamethoxam, imidacloprid, acetamiprid and thiacloprid were 4.3, 5.7, 6.4 and 8.6 min, while the limit

of quantitation (LOQ) values were 50.0, 100, 10.0, and 25.0 ng/cm³, respectively, and they compared well with those obtained by the same method using a diode-array detector (DAD). The LOQs for acetamiprid and thiacloprid provided by TLS technique, allowing measurements of absorbances as low as 10⁻⁷ mol/dm³, are, however, up to 10 times lower compared to DAD. The applicability of the developed procedure was tested on spiked river water, potato, and pepper samples. A simple and sensitive HPLC/TLS analytical method was elaborated for a simultaneous determination of the four neonicotinoid insecticides in their mixtures. The developed HPLC/TLS method allows sensitive, selective, and reproducible trace-level determination of these four neonicotinoids and in some cases surpasses the comparative HPLC/DAD method. Namely, the LODs and LOQs are lower by 2.5–8.5 times for thiamethoxam, acetamiprid and thiacloprid, compared to HPLC/DAD, with similar RSDs. The method was successfully tested for the determination of insecticides in several real samples and the HPLC/TLS results were comparable with HPLC/DAD data (max. 15% discrepancy). Extraction efficiencies from spiked potato and pepper samples of 84–93% were achieved. Thus, it can be concluded that the developed HPLC/TLS method represents a useful tool for a sensitive and rapid determination of neonicotinoid insecticides. Hence, the method may find further application in the analysis of real samples of these insecticides at a ppb level, and HPLC/TLS appears to be a promising technique for sensitive determination of neonicotinoids in biological samples.

5. A simple differential pulse polarographic method was elaborated for the rapid determination of thiamethoxam in commercial formulations and some real samples. The polarographic characterization of thiamethoxam suggests a four-electron reduction process at pH 8.0, resulting in a hydroxylamine derivative as reaction product, which is further reduced in a two-electron transfer, yielding an amine derivative. The first reduction peak was used for the quantitative measurements. The elaborated DPP method allows sensitive, trace-level determination of thiamethoxam, providing an adequate reproducibility and recovery. The method was successfully tested for the determination of thiamethoxam in commercial formulations and a few real samples. The DPP results were comparable with standard HPLC data. The method could be applied without a clean-up step of the thiamethoxam extracts in commercial formulations and in some real samples. Thus, it can be concluded that the developed DPP method represents a useful alternative

tool for thiamethoxam determination. Hence, the method may find its further application in the field of real samples at a ppb level of thiamethoxam.

6. A simple voltammetric method using glassy carbon working electrode was developed for the determination of: imidacloprid and thiamethoxam. The experiments showed that the voltammetric response depends on the mode of electrode surface pretreatment, and polarization mode. The response appeared to be linear in the range from 0.025 to 0.50 mg/cm³ for both analytes. The LOD was 0.0077 mg/cm³ for imidacloprid and 0.0085 mg/cm³ for thiamethoxam, the LOQ was 0.026 mg/cm³ and 0.028 mg/cm³, respectively. The developed method was applied to determine these insecticides in potato sample sprayed with Confidor 200-SL or Actara 25-WG, commercial formulations of imidacloprid and thiamethoxam. Recovery trial was performed to assess accuracy of the results, the recovery values being between 95-102% for both of neonicotinoids.

7. The bismuth-film electrode (BiFE) can be successfully applied for a direct voltammetric determination of thiamethoxam. A prerequisite for good electrode functioning is the plating in a bromide-modified strongly acidic relatively, concentrated Bi(III) solution, to minimize the risk of hydrolysis. The appropriate conditioning of the GCE improved the film reproducibility, and the BiFE conditioning prevented the baseline instability caused probably by the bismuth-oxide layer, which was confirmed by EDS measurements.

Thiamethoxam was determined by differential pulse measurements in a Britton-Robinson buffer pH 8.0 with the linearity of response from 1.26 to 45.0 µg/cm³ and the respective LOD and LOQ values of 0.38 and 1.26 µg/cm³. The analytical performance of BiFE approaches that of mercury electrode and compare well with the HPLC/DAD measurements. The developed procedure might be a convenient environment-friendly screening method for the determination of thiamethoxam in vegetables, even without sample clean-up, which saves time, money and environment.

The majority of the presented results have been presented at scientific meetings and published in the corresponding journals.

7. LITERATURA

- [1] M. P. Milošević, S. Lj. Vitorović, Osnovi toksikologije sa elementima ekotoksikologije, Naučna Knjga, Beograd, 1992. str. 161-165.
- [2] Savezni Zavod za Zdravstvenu Zaštitu, Pesticidi u hrani (Standardne metode za određivanje ostataka pesticida u namirnicama) I deo, Niro "Privredni pregeled", Beograd, 1989.
- [3] [http:// www.alanwood.net /pesticides/class_insecticides. htm](http://www.alanwood.net/pesticides/class_insecticides.htm)
- [4] U. Müller, *Pure Appl. Chem.*, 74 (2002) 2241.
- [5] N. V. Mitić, S. Savčić-Petrić, Pesticidi u poljoprivredi i šumarstvu u Jugoslaviji, 2002., Društvo za zaštitu bilja Srbije, Beograd, 2002.
- [6] C. Tomlin The Pesticide Manual: a World Compendium, 12th edition, British Crop Protection Council, 2000, Farnham, United Kingdom.
- [7] G. W. Ware, D. M. Whitacre (2004), An Introduction to Insecticides, 4rd Edition, online <http://ipmworld.umn.edu/chapters/ware.htm>
- [8] S. B. Soloway, Nitromethylene insecticides. In *Advances in Pesticide Science* (Part II) (Geissbühler, H. *et al.*, eds), 1979, pp. 206–217, Pergamon Press
- [9] S. Kagabu, *Rev. Toxicol.*, 1 (1997) 75.
- [10] P. Jeschke and R. Nauen, Neonicotinoid insecticides (2005), online http://books.elsevier.com/bookscat/samples/044451516X/look_Inside/07~article_5.3.-neonicotinoid_insecticides.pdf
- [11] K. Matsuda, S. D. Buckingham, D. Kleier, J. J. Rauh, M. Grauso, D. B. Sattelle, *Trends Pharm. Sci.*, 22 (2001) 573.
- [12] M. Tomizawa, J. E. Casida, *Ann. Rev. Entomo.*, 48 (2003) 339.
- [13] R. Dick, D. Kanne, J. E. Casida, *Chem. Res. Toxicol.*, 18 (2005) 317.
- [14] P. Wiesner, H. Kayser, *J. Biochem. Molec. Tox.*, 14 (2000) 221.

- [15] T. Iwasa, N. Motoyama, J. T. Ambrose, R. M. Roe, *Crop Prot.* 23 (2004) 371.
- [16] Novartis , Thiamethoxam: Pro-Active R-Management, online www.irac_online.org/documents/prespub/almerianovartis.pdf
- [17] F. J. Placke, E. Weber, *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*, 46 (1993) 109.
- [18] J. Applegate, P. Babczinski, M. Deall, E von Franck, S. Howard, J. Khöler, W. Krämer, B.K. Krüger, U. Triebel, K. Sturm, *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*, 55 (2002) 3.
- [19] J. Barcey, Environmental Fate of Imidacloprid, online <http://ace.ace.orst.edu/info/extoxnet/pips/imidaclo.pdf>
- [20] Extoxnet PIP-imidacloprid (2001),
online <http://ace.ace.orst.edu/info/extoxnet/pips/imidaclo.htm>
- [21] <http://www.epa.gov/opprd001/workplan/fy03finaldecisions.pdf>
- [22] R. Solecki, Pesticide residues in food 2001, Toxicological evaluations, Imidacloprid
[Online <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/2001pr07.htm>]
- [23] S. Malato, J. Blanco, A. Campos , J. Cáceres , C. Guillard, J. M. Herrmann, A. R. Fernández-Alba, *Appl. Catal. B: Environ.*, 42 (2003) 349.
- [24] S. Malato, J. Blanco, J. Cáceres, A. R. Fernández-Alba, A. Aügera, A. Rodriguez, *Catalysis Today*, 76 (2002) 209.
- [25] A. Aügera, E. Almansa, S. Malato, M. I. Maldondo, A. R. Fernández-Alba, *Analyst*, 26 (1998) 245
- [26] Antunes-Kenyon S E, Kennedy G Thiamethoxam: A new active ingredient review, Massachusetts Pesticide Board, 2001, online http://www.state.ma.us/dfa/pesticides/water/REVIEW_THIAMETHOXAM.pdf
- [27] www.singenta-cop.uk
- [28] B. J. Shwartz, F. K. Sparrow, N. E. Heard, B. M. Thede, *J. Agric. Food Chem.*, 48 (2000) 4671.
- [29] S. Campbell, L. Chen, J. Yu, Q. X. Li, *J. Agric. Food Chem.*, 53 (2005) 5376.
- [30] R. Nauen, U. Ebbinghaus-Kintscher, V. L. Salgado, M. Kausmann, *Pest. Biochem. Physiol.*, 76 (2003) 55.
- [31] Regulatory Note, Pest Management Regulatory Agency, Canada, Reg, 2002-05
- [32] Official Journal of European Union, 6.10.2004.

- [33] <http://www.agrochemchina.com/acetamiprid.htm>
- [34] J. L. Brunet, A. Baldiou, L. Belzunces, *Pest. Men. Sci.*, 61 (2005) 742.
- [35] H. Takahashi, J. Isui, M. Takakusa, M. Matsuda, H. Zoneda, *Proc. Br. Crop. Ref. Conf. Dis.*, 1 (1992) 85.
- [36] Acetamiprid, Pesticide Tolerance, U.S. Environmental Protection Agency [on line <http://www.epa.gov/fedrgstr/EPA-PEST/2005/April/Day-13/p7225.htm>]
- [37] European Commission, Acetamiprid, SANCO/1392/2001-Final.
- [38] P. Jeschke, K. Moriya, R. Lantsch, H. Seifert, W. Lindner, K. Jelic, A. Göhr, M. E. Beck, W. Etzel, *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*, 54 (2001) 147
- [39] F. J. Placke, R. Schöning, *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*, 54 (2001) 261.
- [40] J. Krohn, *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*, 54 (2001) 281.
- [41] W. Andresch, M. Schwarz, *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*, 56 (2003) 147.
- [42] www.Chemicalland21.com/lifescience/foco/6-chloronicotinic%20acid.htm
- [43] Flonicamid [online <http://www.fluoridealert.org/pesticides/flonicamid-page.htm>]
- [44] R. Nauen, T. Bretschneider, *Pesticide Outlook*, 12 (2002), 241.
- [45] R. Kellner, J. M. Mermet, M. Otto, H. M. Widmer (Ed.), *Analytical Chemistry*, Wiley-CHV, Weinheim, 1998.
- [46] B. Abramović, *Mikroanaliza, Odabrana poglavlja*, Univerzitet u Novom Sadu, PMF, Novi Sad, 2000, str.15-17
- [47] R. Blanc, A. González-Casado, A. Navalón, J. L. Vílchez, *Anal. Chim. Acta*, 403 (2000) 117
- [48] G. Quintas, S. Armenta, S. Garrigues, M. Guardia, *J. Braz. Chem. Soc.*, 15 (2004), 307.
- [49] J. L. Vílchez, R. El-Khattabi, R. Blanc, A. Navalón, *Anal. Chim. Acta*, 371 (1998) 247.
- [50] J. L. Vílchez, M. C. Valencia, A. Navalón, B. Molinero- Morales, L. F. Capitán-Vallvey *Anal. Chim. Acta*, 439 (2001) 299.
- [51] J. G. Samaritoni, D. A. Demeter, J. M. Gifford, G. B. Watson, M. S. Kempe, T. J. Bruce, *J Agric. Food Chem.*, 51 (2003) 3035.
- [52] A. Navalón, R. El-Khattabi, A. González-Casado, J. L. Vílchez, *Mikrochim. Acta*, 130 (1999) 261.

- [53] A. Guiberteau, T. Galeano, N. Mora, P. Parrilla, F. Salinas, *Talanta*, 53 (2001) 943.
- [54] E. Watanabe, H. Eun, K. Baba, T. Arao, Y. Ishii, S. Endo, M. Ueji, *J. Agric. Food Chem.*, 52 (2004) 2756.
- [55] H. J. Kim, S. Liu, Y. S. Keum, Q. X. Li, *J. Agric. Food Chem.*, 51 (2003) 1823.
- [56] H. J. Kim, W. L. Shelver, Q. X. Li, *Anal. Chim. Acta*, 509 (2004) 111.
- [57] S. Wanatabe, S. Ito, Y. Kamata, N. Omoda, T. Yamazaki, H. Munakata, T. Kaneko, Y. Yuasa, *Anal. Chim. Acta*, 427 (2001) 211.
- [58] E. Watanabe, H. Eun, K. Baba, T. Arao, Y. Ishii, S. Endo, M. Ueji, *Anal. Chim. Acta*, 521 (2004) 45.
- [59] J. L. Vílchez, R. El-Khattabi, J. Fernández, A. González-Casado, A. Navalón, *J. Chromatogr. A*, 746 (1996) 289.
- [60] A. Navalón, A. González-Casado, R. El-Khattabi, J. L. Vílchez, A. R. Fernández-Alba, *Analyst*, 122 (1997) 579.
- [61] K. Zheng, W. Liu, *Pestic. Sci.*, 55 (1999) 482.
- [62] M. Mateau-Sánchez, M. Moreno, F. J. Arrebola, J. L. Martínez-Vidal, *Anal. Sci.*, 19 (2003) 701.
- [63] M. Tokieda, M. Ozawa, S. Kobayashi, T. Gomyo, *J. Pest. Sci.*, 22 (1999) 77.
- [64] M. Tokieda, M. Ozawa, S. Kobayashi, T. Gomyo, *J. Pest. Sci.*, 24 (1999) 115.
- [65] M. Tokieda, M. Ozawa, T. Gomyo, *J. Pest. Sci.*, 24 (1999) 181.
- [66] Y. Ishii, I. Kobori, Y. Araki, S. Kuroguchi, K. Iwaya, S. Kagabu *J. Agric. Food Chem.*, 42 (1994) 2917.
- [67] A. R. Fernández-Alba, A. Valverde, A. Agüera, M. Contreras, S. Chiron, *J. Chromatogr. A*, 721 (1996) 97.
- [68] M. Martínez Galera, A. Garrido Frenich, J. L. Martínez Vidal, P. Parrilla Vázquez, *J. Chromatogr. A*, 799 (1998) 149.
- [69] A. I. Mandić, S. D. Lazić, Sz. N. Ökrész, F. F. Gaál, *J. Anal. Chem.* 60 (2005) 1134.
- [70] H. Obana, M. Okihashi, K. Akutsu, Y. Kitagawa, S. Hori, *J. Agric. Food Chem.*, 50 (2002) 4464.

- [71] S. B. Singh, G. D. Foster, S. U. Khan, *J. Agric. Food Chem.* 52, (2004) 105.
- [72] C. Blasco, M. Fernández, Y. Picó, G. Font, J. Mañes, *Anal. Chim. Acta* 461 (2002) 109.
- [73] F. Hernández, J. V. Sancho, O. Pozo, A. Lara, E. Pitarch, *J. Chromatogr. A* 939 (2001) 1.
- [74] H. Obana, M. Okihashi, K. Akutsu, Y. Kitagawa, S. Hori, *J. Agric. Food Chem.*, 51 (2003) 2501.
- [75] I. Ferrer, E. M. Thruman, A. A. R. Fernández-Alba, *Anal. Chem.*, 77 (2005) 2818.
- [76] A. Martín, J. L. Martínez Vidal, F. J. Egea Gonzalez, A. Garrido Frenich, C. R. Glass, M. Sykes, *J. Chromatogr. B* 804 (2004) 269.
- [77] S. Seccia, P. Fidente, D. Barbini Attard, P. Morrica, *J. Chromatogr. A*, 553 (2005) 21.
- [78] P. Fidente, S. Seccia, F. Vanni, P. Morrica, *J. Chromatogr. A*, 1094 (2005) 175.
- [79] A. Muccio, P. Fidente, D. A. Barbini, R. Dommarco, S. Seccia, P. Morrica, *J. Chromatogr. A*, 1108 (2006) 1.
- [80] N. Ruíz de Erenchun, Z. Gómez de Balugera, M. A. Goicolea, R. J. Barrio, *Anal. Chim. Acta*, 349 (1997) 199.
- [81] M. Rancan, G. A. Sabatini, G. Achilli, C. G. Galletti, *Anal. Chim Acta*, 555 (2006) 20.
- [82] M. Šikovec, M. Franko, M. Novič, M. Veber, *J. Chromatogr. A*, 920 (2001) 119.
- [83] D. A. Skoog, F. J. Holler, T. A. Nieman, *Principles of Instrumental Analysis*, fifth Ed, , HarcourtBrace College Publisher, Philadelphia, 1998.
- [84] S. Milosavljević, *Strukturne instrumentalne metode*, Hemijski fakultet, Beograd, 1994
- [85] UV/VIS Spektroskopie, *Acf.Biol./Pharm*, 99-119, online, www.hs_niederrhein.de/fb01/Hauptstudium/Instrumentelle_Analytika/praktikum_lack/UVVISLLA.pdf
- [86] C. B. Ojeda, F. Sanchez Rojas, *Anal. Chim. Acta*, 518 (2004) 1.
- [87] J. Karpińska, *Talanta*, 64 (2004) 801.

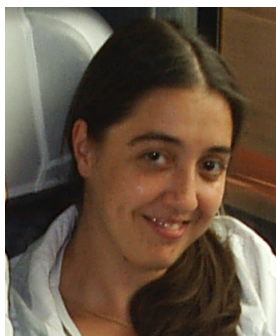
- [88] F. Gaál, V. Guzsvány, S. Lazić, N. Vidaković, *Proc. of the 12th Symposium on Analytical and Environmental Problems*, SZAB, Szeged (2005) 88-92.
- [89] F. F. Gaál, V. J. Guzsvány, Sz. N. Ökrész, L. J. Bjelica, *XXXXII Savetovanje Srpskog hemijskog društva*, Novi Sad (2004) AH-3U, 13.
- [90] V. Guzsvány, F. Gaál, S. Lazić, Zs. Papp, *XXXXIII Savetovanje Srpskog hemijskog društva*, Beograd (2005) AHp-8, 94-97.
- [91] V. Guzsvány, M. Kádár, F. Gaál, K. Tóth, L. Bjelica, *Microchim. Acta*, on line 30.03.2006
- [92] R. M. Silverstein, F. X. Webster, D. J. Kiemle, *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, Wiley-VCH, Seventh Ed, 2005.
- [93] J. Čanadi, *Doktorska disertacija*, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad, 1987.
- [94] A. J. Ferdous, N. A. Dickinson, R. D. Waigh, *J. Pharm. Pharmacol.*, 43 (1991) 860.
- [95] A. J. Ferdous, R. D. Waigh, *J. Pharm. Pharmacol.*, 45 (1993) 559.
- [96] A. Topalov, D. Molnár-Gábor, J. Csanádi, *Water Res.*, 33 (1999) 1371.
- [97] A. S. Topalov, D. V. Šojić, D. Molnár-Gábor, B. F. Abramović, M. I. Čomor, *Appl. Catal. B: Environ.*, 54 (2004) 125.
- [98] V. Guzsvány, J. Csanádi, F. Gaál, *The 14th International Symposium "Spectroscopy in Theory and Practice"* Nova Gorica (2005) 53.
- [99] V. Guzsvány, J. Csanádi, F. Gaál, *Acta Chim. Slov.*, 53 (2006) 52.
- [100] M. R. Smyth, J. G. Vos, *Analytical Voltammetry*, Wilsons and Wilsons, 1992.
- [101] Kh. Z. Brainina, N. A. Malakhova, N. Zu. Stojko, *J. Anal. Chem.*, 368 (2000) 307
- [102] J. Wang, *Analytical Electro chemistry*, Wiley-VCH, Second Ed, 2000.
- [103] R. L. McCreery, (1991) in: *Electroanalytical Chemistry*, Dekker, New York, 221.
- [104] L. J. Bjelica, *Doktorska disertacija*, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad, 1979.
- [105] Bjelica, L. J., Parson, R., Reeves, R. M., *Croat. Chem. Acta*, 53 (1980) 211.
- [106] L.J Bjelica, R. Parsons, R.M. Reeves, in: *Electrode Processes, 1979*, (Eds. Bruckenstein, S., McIntyre, J. D. E., Miller, B., Yeager, E.), The Electrochemical Society: Princeton, NJ. 1980, 190.

- [107] P. Zuman, Z. Fijalek, *Electroanalysis*, 5 (1993) 53
- [108] D. Dumanović, J. Jovanović, D. Sužnjević, M. Erceg, P. Zuman *Electroanalysis*, 4 (1992) 795.
- [109] D. Dumanović, J. Jovanović, D. Sužnjević, M. Erceg, P. Zuman, *Electroanalysis*, 4 (1992) 871.
- [110] D. Dumanović, J. Jovanović, D. Sužnjević, M. Erceg, P. Zuman, *Electroanalysis*, 4 (1992) 889.
- [111] C. Karakus, P. J. Zuman, *Electroanal. Chem.*, 396 (1992) 499.
- [112] P. Zuman, Z. Fijalek, D. Dumanović, S. Sužnjević, *Electroanalysis*, 4 (1992) 783.
- [113] P. Zuman, E. Rupp, *Electroanalysis*, 7 (1995) 132
- [114] D. Dumanović, J. Jovanović, B. Marjanović, P. Zuman, *Electroanalysis*, 5 (1993) 47.
- [115] A. J. Bard, R. L. Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, 2nd edn., John Wiley & Sons, New York, 2001, p 202.
- [116] M. Kotouček, M. Opravilová, *Anal. Chim. Acta*, 329 (1996) 73.
- [117] L. J. Núñez-Vergara, M. Bbonta, P. A. Navarrete—Encina, J. A. Squella, *Electrochim. Acta*, 46 (2001) 4289.
- [118] K. Pecková, J. Barek, J. C. Moreira, J. Zima, *Anal. Bioanal. Chem.*, 381 (2005) 520.
- [119] J. Barek, J. Zima, J. C. Moreira, A Muck, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 65 (2000) 1888.
- [120] G. B. El-Hefnawey, I. S. El-Hallag, E. M. Ghoneim, M. M. Ghoneim, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 34 (2004) 75.
- [121] P. Chen, R.L. McCreery, *Anal. Chem.*, 68 (1996) 3958.
- [122] G.N. Kamau, W.S. Willis, J.F. Rusling, *Anal. Chem.*, 57 (1985) 545.
- [123] V. J. Guzsvány, F. F. Gaál , L. J. Bjelica, Sz. N. Ökrész, *J. Serb. Chem. Soc.*, 70 (2005) 735.
- [124] R. Vasquez, M. Hono, A. Kitani, K. Sasaki, *J. Electroanal. Chem.*, 196 (1985) 397.

- [125] F. F. Gaál, V. J. Guzsvány, Sz. N. Ökrész, L. J. Bjelica, B. F. Abramović, *Proc. of the 10th Symposium on Analytical and Environmental Problems*, SZAB, Szeged, (2003) 195-199.
- [126] M. S. Jovanović, F. F. Gaál, L. J. Bjelica, *Z. Anal. Chem.*, 255 (1971) 277.
- [127] M. S. Jovanović, F. F. Gaál, L. J. Bjelica, *Microchim. Acta* (Wien), (1971) 778.
- [128] F. F. Gaál, J. S. Siriški, M. S. Jovanović, B. Đ. Branovački, *Z. Anal. Chem.*, 260 (1972) 361.
- [129] L. J. Bjelica, *Diplomski rad*, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad, 1968.
- [130] U. Palm, A. Alumaa, *J. Electroanal. Chem.*, 90 (1978) 219.
- [131] J. Wang, *Electroanalysis*, 17 (2005) 1341.
- [132] A. Economou, *Trends Anal. Chem.*, 24 (2005) 334.
- [133] Florence, T. M., *Anal. Chim. Acta*, 119 (1980) 217.
- [134] Y.C. Tsai, J. Davis, R. G. Compton, S. Ito, N. Ono, *Electroanalysis*, 13 (2001) 7.
- [135] E. A. Hutton, S. B. Hočevar, B. Ogorevc, *Anal. Chim. Acta*, 537 (2005) 285.
- [136] J. Wang, J. Lu, S. B. Hočevar, P. A. M. Farias, B. Ogorevc, *Anal. Chem.*, 72 (2000) 3218.
- [137] J. Wang, J. Lu, S. B. Hočevar, B. Ogorevc, *Electroanalysis*, 13 (2001) 13.
- [138] J. Wang, J. Lu, Ü. A. Kirgöz, S. B. Hocevar, B. Ogorevc, *Anal. Chim. Acta.*, 434 (2001) 29.
- [139] S. B. Hočevar, B. Ogorevc, J. Wang, B. Pihlar, *Electroanalysis*, 14 (2002) 1707.
- [140] S. B. Hočevar, J. Wang, R. P. Deo, B. Ogorevc, *Electroanalysis*, 14 (2002) 112.
- [141] K. Vytrás, I. Švancara, R. Metelka, *Electroanalysis*, 14 (2002) 1359.
- [142] A. Krolicka, A. Bobrowski, K. Kalcher, J. Mocak, I. Svancara, K. Vytras, *Electroanalysis*, 15 (2003) 1859.
- [143] L. Lin, N. S. Lawrence, S. Thongngamdee, J. Wang, Y. Lin, *Talanta*, 65 (2005) 144.
- [144] E. Chatzitheodorou, A. Economou, A. Voulgaropoulos, *Electroanalysis*, 16 (2004) 1745.
- [145] A. Królicka, A. Bobrowski, *Electrochem. Commun.*, 6 (2004) 99.
- [146] E. A. Hutton, B. Ogorevc, M. R. Smyth, *Electroanalysis*, 16 (2004) 1616.

- [147] E. A. Hutton, B. Ogorevc, S. B. Hočevár, F. Weldon, M. R. Smyth, J. Wang, *Electrochem. Commun.*, 3 (2001) 707.
- [148] V. Guzsvány, M. Kádár, F. Gaál, K. Tóth, *The 10th International Conference of Chemistry*, Kluj, 2004, 100-104.
- [149] V. Guzsvány, M. Kádár, F. Gaál, K. Tóth, L. Bjelica, *International Conference on Electrochemical sensors-Mátrafüred 05*, November 13-18, Mátrafüred, 2005, 60-61.
- [150] V. Guzsvány, M. Kádár, F. Gaál, L. Bjelica, K. Tóth, *Electroanalysis*, (2006) (u štampi)
- [151] S. I. Córdoba de Torresi, I. A. Carlos, *J. Electroanal. Chem.*, 414 (1996) 11.
- [152] I. Svancara, L. Baldrinova, M. Vlcek, R. Metelka, K. Vytrás, *Electroanalysis*, 17 (2005) 120.
- [153] V. Guzsvány, M. Kádár, F. Gaál, L. Bjelica, K. Tóth, *Proc. of the 11th Symposium on Analytical and Environmental Problems*, SZAB, Szeged (2004) 183-187.
- [154] C. Xu, K. Wu, S. Hu, D. Cui, *Anal. Bioanal. Chem.*, 373 (2002) 284.
- [155] V. Guzsvány, J. Csanádi, S. Lazić, L. Bjelica, F. Gaál, *1st European Chemistry Congress*, 27-31 August 2006, Budapest, Hungary (poslato)
- [156] V. Guzsvány, F. Gaál, M. Franko, P. Trebše, S. Lazić, *1st European Chemistry Congress*, 27-31 August 2006, Budapest, Hungary (poslato)
- [157] V. Guzsvány, S. Lazić, F. Gaál, *6th European Pesticide Residue Workshop (EPRW) 2006*, May 21-25, Corfu Island, Greece, 2006
- [158] S. Luterotti, M. Franko, M. Šikovec, D. Bicanic, *Anal. Chim. Acta*, 460 (2002) 193.
- [159] M. Franko, *Talanta*, 54 (2001) 1.
- [160] L. Pogačnik, M. Franko, *Biosens. Bioelectron.*, 18 (2003) 1.
- [161] M. Franko, C. D. Tran, *Rev. Sci. Instrum.*, 67 (1996) 1.
- [162] V. Guzsvány, A. Madžgalj, P. Trebše, F. Gaál, M. Franko, *6th European Meeting on Environmental Chemistry –EMEC6*, December 6-10, Belgrade, (2005) p.110.

- [163] V. Guzsvány, A. Madžgalj, P. Trebše, F. Gaál, M. Franko, *Environ. Chem. Lett.*,
(poslato)



KRATKA BIOGRAFIJA

Valeria Gužvanj rođena je 7. marta 1975. godine u Somboru. Godine 1994. upisuje se na Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Novom Sadu, Odsek za hemiju. Ispite na redovnim studijama je položila sa prosečnom ocenom 9,88. Diplomski rad je odbranila 29. septembra 1998. godine sa ocenom 10 (deset). Višestruko je nagrađivana Univerzitetom nagradom, Nagradom Prirodno-matematičkog fakulteta, a 1999. godine Izuzetnom nagradom Srpskog hemijskog društva za postignuti uspeh tokom studiranja. Oktobra godine 1998. upisala se na magistarske studije na Odseku za hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu, iz oblasti analitičke hemije. Godine 1999. postala je stipendista Ministarstva za nauku i tehnologiju. Magistarsku tezu pod naslovom "Karakterizacija uzoraka borom i fosforom dopovanog staklastog ugljenika i njihova primenljivost kao potenciometrijskih senzora" odbranila na Prirodno-matematičkom fakultetu u Novom Sadu, 2003. 1998-2001 g. je stipendista Ministarstva za nauku tehnologiju i razvoj. Od 1999.g uključena u nastavu na Departmanu za hemiju PMF, Novi Sad, istraživač pripravnik 2001. g, asistent pripravnik 2001-2004. g, asistent 2004. g. Vežbe drži iz sledećih predmeta: Osnovi instrumentalne analize, Instrumentalna analiza, Bioanalitička hemija, Praktikum iz instrumentalne analize, NMR spektrometrija (neke vežbe). Školske godine 2001/2002 je držala vežbe i iz Fizičke hemije sa instrumentalnim metodama na Medicinskom fakultetu u Novom Sadu, odsek Farmacija. Oblasti interesovanja su elektrohemijski senzori, optički (hemijski) senzori, analitika pesticida i lekova, a u poslednje vreme NMR spektrometrija.

Uključena je u više saradnje sa naučnim ustanovama i to: Fakultet tehničkih i ekonomskih nauka, Budimpešta, Mađarska, Elektroanalitička akademska istraživačka grupa, akademik *Klára Tóth*, Politehnika Nova Gorica, Nova Gorica, Slovenija, Laboratorij za raziskave v okolju, istraživačka grupa prof. dr. *Mladen Franko* i doc. dr. *Polonca Trebše*, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad, SCG, Institut za zaštitu bilja "dr Pavle Vukasović" istraživačka grupa prof. dr. *Sanja Lazić*.

Autor je ili koautor osam naučnih radova objavljenih pretežno u inostranim časopisima, kao i oko 20 naučnih saopštenja. Saradnik je na četiri projekta. Godine 2004. i 2005. dobitnik je stipendije "Domus Hungarica Scientiarum et Artium Junior" (Mađarske Akademije Nauka i Umetnosti), 2005. god. stipendije "Richter Gedeon Centenarijum" (Richter Gedeon, Budapimpešta) i 2005. god. junior stipendije fondacije "HTMT" (Mađarske Akademije Nauka i Umetnosti).

Član je Srpskog hemijskog društva – Hemijskog društva Vojvodine, sekretar je Analitičke sekcije Hemijskog društva Vojvodine i član je javnog inostranog tela Mađarske akademije nauka.

Novi Sad, 05.05.2006.

Valeria Gužvanj

UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO -MATEMATIČKI FAKULTET

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj:

RBR

Identifikacioni broj:

IBR

Tip dokumentacije: Monografska dokumentacija

TD

Tip zapisa: Tekstualni štampani materijal

TZ

Vrsta rada: Doktorska disertacija

VR

Autor: mgr Valeria Gužvanj

AU

Mentor: dr Gaál Ferenc, redovni profesor

MN

Naslov rad: Prilog karakterizaciji i određivanju nekih neonikotinoida

NR

Jezik publikacije: Srpski (latinica)

JP

Jezik izvoda:

JI

Zamlja publikovanja: Srbija i Crna Gora

ZP

Uže geografsko područje: Vojvodina

UGP

Godina: 2006

GO

Izdavač: Autorski reprint

IZ

Mesto i adresa: Departman za Hemiju,

Prirodno-matematički fakultet

Trg Dositeja Obradovića 3, Novi Sad

MA

Fizički opis rada: broj poglavlja 8, broj strana 158, broj literaturnih citata 163, broj tabela 17, broj slika 71, broj shema 14

FO

Naučna oblast: Hemija

NO

Naučna disciplina: Analitička hemija

ND

Ključne reči: neonicotinoide, HPLC/DAD, HPLC/TLS, NMR, voltometrija, spektrofotometrija

PO

UDK

Čuva se: U biblioteci Departmana za hemiju, PMF, Novi Sad,

Trg Dositeja Obradovića 3

ČU

Važna napomena:

VN

Izvod: U okviru ove doktorske disertacije pažnja je sa jedne strane posvećena razradi NMR spektrometrijskih i veoma osetljivih hromatografskih (HPLC/DAD i HPLC/TLS) metoda, a sa druge strane razradi jednostavnijih spektrofotometrijskih i voltametrijskih metoda za određivanje odabranih neonicotinoide. Kao posebno vredan doprinos, razrađena je metoda pripreme ekološki pogodne bizmut-film elektrode na staklastom ugljeniku i na planarnoj ugljeničnoj elektrodi. Efikasnost elektrode je upoređena sa elektrodom modifikovanom filmom od žive. Za ispitivanje površine radnih elektroda primenjena je i (SEM/EDS) metoda. Razrađene metode su testirane za određivanje neonicotinoide iz komercijalnih formulacija, kao i iz uzoraka krompira, kukuruza, paprike, meda i površinske vode.

IZ

Datum prihvatanja teme od strane NN veća:

DP

Datum odbrane:

DO

Članovi komisije:

KO

Predsednik: dr Luka Bjelica, redovni profesor, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad

Mentor: dr Gaál Ferenc, redovni profesor, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad

Član: dr Biljana Abramović, redovni profesor, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad Član: dr Sanja Lazić, vanredni profesor, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad

Član: dr Janoš Čanadi, redovni profesor, Prirodno-matematički fakulteta, Novi Sad

UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF SCIENCE

KEYWORDS DOCUMENTATION

Accession number:

AN

O

Identification number:

INO

Document type: Monograph type

DT

Type of record: Printed text

TR

Contents code: doctor theses

CC

Author: Valeria Gužvanj

AU

Mentor: dr Gaál Ferenc, Full Professor

MN

Title: Contribution to the Characterisation and Determination of some Neonicotinoids

XI

Language of text: Serbian (latin alphabet)

LT

Language of abstract: S/E

LA

Country of publication: Serbia and Montenegro

CP

Locality of publication: Vojvodina

LP

Publication year: 2006

PY

Publisher: Author's reprint

PU

Publ. place: Novi Sad, Department for Chemistry, Faculty of Science, Trg Dositeja Obradovića 3

PP

Physical description: chapters 8, pages 158, literature 163, tables 17, pictures 71, shema 14

PD

Scientific field: Chemistry

SF

Scientific discipline: Analytical Chemistry

SD

Keywords: Pesticide, neonicotinoids, NMR, HPLC/DAD, HPLC/TLS, voltammetry, spectrophotometry

UC

Holding data: In the library of Department for Chemistry, Faculty of Sciences, Novi Sad, Trg

Dositeja Obredovića 3

HD

Note:

Abstract: The Ph. D. thesis is concerned with the development of NMR spectrometric and very sensitive chromatographic (HPLC/DAD and HPLC/TLS) methods, on the one hand, and simpler spectrophotometric and voltammetric methods on the other, for the determination of selected neonicotinoids. As an especially valuable contribution, a procedure has been developed for the preparation of an environment-friendly bismuth film electrode on glassy carbon and planar carbon electrode. The achieved efficiency of such electrode was compared with that of mercury film electrode. Surface morphology of the working electrodes was studied by the SEM/EDS method. The developed methods have been tested for the determination of the neonicotinoids from their commercial formulations, as well as from samples of potato, maize, pepper, honey, and surface water.

AB

Accepted by the Scientific Board on:

AC

Defended:

DE

Thesis defend board:

DB

President: dr Luka Bjelica, Full Professor, Faculty of Science, University of Novi Sad

Mentor: dr Gaál Ferenc, Full Professor, Faculty of Science, University of Novi Sad

Member: dr Biljana Abramović, Full Professor, Faculty of Science, University of Novi Sad

Member: dr Sanja Lazić, Professor, Faculty of Agriculture, University of Novi Sad

Member: dr Janoš Čanadi, Full Professor, Faculty of Science, University of Novi Sad