



---

**Razvoj metoda za hronopotenciometrijsko određivanje  
odabranih pesticida u vodi**

**Doktorska disertacija**

**Kandidat:**

**dipl. inž. Ana Đurović**

**Mentor:**

**dr Snežana Kravić, vanr. prof.**

**Novi Sad, 2018.**



**УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ  
ТЕХНОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ**

**KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Ana Đurović
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Dr Snežana Kravić, vanredni profesor
Naslov rada: NR	Razvoj metoda za hronopotenciometrijsko određivanje odabranih pesticida u vodi
Jezik publikacije: JP	Srpski, latinica
Jezik izvoda: JI	Srpski / Engleski
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	AP Vojvodina
Godina: GO	2018.
Izdavač: IZ	Autorski reprint

Mesto i adresa: MA	21000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1
Fizički opis rada: FO	6 poglavlja / 162 strane / 56 slika / 32 tabele / 223 literaturna navoda
Naučna oblast: NO	Tehnološko inženjerstvo
Naučna disciplina: ND	Biotehnologija, Primenjena hemija
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	Pesticidi, imidakloprid, metamitron, metribuzin, hronopotenciometrija, elektroda od staklastog ugljenika, tankoslojna živina elektroda, voda, komercijalne formulacije pesticida
UDK	
Čuva se: ČU	U biblioteci Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, 21000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1
Važna napomena: VN	-
Izvod: IZ	
<p>U okviru ove doktorske disertacije, razvijene su elektroanalitičke metode za određivanje odabranih pesticida primenom hronopotenciometrije. Ispitana je mogućnost primene elektrode od staklastog ugljenika i tankoslojne živine elektrode kao radnih elektroda za određivanje insekticida imidakloprida i herbicida metamitrona i metribuzina. U cilju optimizacije uslova hronopotenciometrijske tehnike, za svaki ispitivani sistem (pesticid/radna elektroda) ispitan je uticaj najznačajnijih eksperimentalnih parametara na analitički signal pesticida, uključujući mehanizam generisanja analitičkog signala na radnoj elektrodi (oksidacija/redukcija), optimalnu metodu za uklanjanje rastvorenog kiseonika iz analiziranog rastvora, kao i vrstu, pH i koncentraciju pomoćnog elektrolita. Nakon toga definisan je optimalni opseg potencijala i struje redukcije. Pored toga, u okviru validacije metode za svaki ispitivani sistem, ispitan je i definisan opseg linearnosti, određena granica detekcije i granica kvantifikacije, ispitana preciznost, tačnost, robusnost i selektivnost metode. Dobijeni analitički signal za ispitivane pesticide bio je posledica ireverzibilne redukcije analita na radnoj elektrodi, a za svaki analit dobijen je jedan redukcionni pik. U slučaju određivanja metribuzina eksperimenti su pokazali da se analitički signal ne može detektovati na elektrodi od staklastog ugljenika uz korišćenje dostupne instrumentacije. Ispitivanja u model-rastvorima za svaki ispitivani sistem pokazala su dobre karakteristike u pogledu preciznosti, tačnosti, selektivnosti i robusnosti metode. Najveća osetljivost za sva tri pesticida postignuta je uz primenu tankoslojne živine elektrode, a vrednosti granice detekcije iznosile su 0,17 mg/l za imidakloprid, 0,07 mg/l za metamitron i 0,04 mg/l za metribuzin. Nakon optimizacije i validacije, razvijene hronopotenciometrijske metode primenjene su na komercijalne formulacije pesticida i uzorke vode. U cilju dodatne potvrde hronopotenciometrijskih rezultata na uzorcima vode izvedena su komparativna merenja uz primenu hromatografske LC-MS/MS analize.</p>	

Datum prihvatanja teme od strane Senata: DP	21. april 2016. godine
Datum odbrane: DO	
Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO	<p>predsednik: dr Marina Šćiban, redovni profesor, Tehnološki fakultet Novi Sad, Univerzitet u Novom Sadu</p> <p>mentor: dr Snežana Kravić, vanredni profesor, Tehnološki fakultet Novi Sad, Univerzitet u Novom Sadu</p> <p>član: dr Zorica Stojanović, docent, Tehnološki fakultet Novi Sad, Univerzitet u Novom Sadu</p> <p>član: dr Nada Grahovac, naučni saradnik, Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad</p>



**UNIVERSITY OF NOVI SAD  
FACULTY OF TECHNOLOGY**

**KEY WORD DOCUMENTATION**

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	
Author: AU	Ana Đurović
Mentor: MN	Dr. Snežana Kravić, Associate Professor
Title: TI	Development of methods for chronopotentiometric determination of selected pesticides in water
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	Serbian / English
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	AP Vojvodina
Publication year: PY	2018
Publisher: PU	Author reprint
Publication place: PP	21000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1

Physical description: PD	6 chapters / 162 pages / 56 figures / 32 tables / 223 references
Scientific field SF	Technological engineering
Scientific discipline SD	Biotechnology, Applied Chemistry
Subject, Key words SKW	Pesticides, imidacloprid, met amitron, metribuzin, chronopotentiometric determination, glassy carbon electrode, thin film mercury electrode, water, commercial formulations of pesticides
UC	
Holding data: HD	Library of the Faculty of Technology of Novi Sad, 21000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1
Note: N	-
Abstract: AB	<p>Within this doctoral dissertation, electroanalytical methods for the determination of selected pesticides using chronopotentiometry are developed. The possibility of using glassy carbon electrode and thin film mercury electrode as a working electrode for determination of insecticide imidacloprid and herbicides met amitron and metribuzin is investigated. In order to optimize the conditions of the chronopotentiometric technique for each tested system (pesticide/working electrode), the influence of the most important experimental parameters on the analytical signal of the pesticides is investigated, including the generating mechanism of the analytical signal on the working electrode (oxidation/reduction), the optimal method for removal of dissolved oxygen from the analyzed solution, as well as type, pH, and concentration of the supporting electrolyte. Afterwards, the optimal range of potential and reduction current is defined. Additionally, within the validation of the method for each tested system, the linearity range is determined and defined, limit of detection and quantification are determined, and precision, accuracy, robustness and selectivity of the method are tested. The obtained analytical signal for the investigated pesticides is the result of irreversible reduction of the analyte on the working electrode, and for each analyte one reduction peak is obtained. In the case of metribuzin determination, the experiments have shown that by using the available instrumentation the analytical signal can not be detected on the glassy carbon electrode. Investigation in model solutions for each tested system shows good characteristics in terms of precision, accuracy, selectivity and robustness of the method. The highest sensitivity for all three pesticides was achieved by using thin film mercury electrode, and values of detection limit were 0.17 mg/l for imidacloprid, 0.07 mg/l for met amitron and 0.04 mg/l for metribuzin. After optimization and validation, the developed chronopotentiometric methods are applied to commercial pesticide formulations and water samples. In order to further confirm the chronopotentiometric results on the water samples, comparative measurements are performed using chromatographic LC-MS/MS analysis.</p>



Accepted on Senate on: AS	April 21 <sup>st</sup> 2017
Defended: DE	
Thesis Defend Board: DB	<p>president: dr Marina Šćiban, Full professor, Faculty of Technology Novi Sad, University of Novi Sad</p> <p>mentor: dr Snežana Kravić, Associate professor, Faculty of Technology Novi Sad, University of Novi Sad</p> <p>member: dr Zorica Stojanović, Assistant professor, Faculty of Technology Novi Sad, University of Novi Sad</p> <p>member: dr Nada Grahovac, research associate, Institute of Field and Vegetable Crops</p>



## **Zahvalnica**

*Ova doktorska disertacija urađena je u laboratoriji za Instrumentalne metode analize Tehnološkog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu pod mentorstvom vanr. prof. dr Snežane Kravić. Pojedini delovi eksperimentalnog rada urađeni su u laboratoriji Gradskog zavoda za javno zdravlje, Beograd.*

*Temu za doktorsku disertaciju predložile su vanr. prof. dr Snežana Kravić i doc. dr Zorica Stojanović. Ovim putem im izražavam svoju veliku zahvalnost na prenesenom znanju i istraživačkom iskustvu u oblasti analitičke hemije i hronopotencimetrije, kao i na svestranoj pomoći, sugestijama i primedbama tokom izrade ove disertacije.*

*Veliku zahvalnost dugujem i prof. dr Marini Šćiban na sugestijama tokom pisanja ove doktorske disertacije.*

*Zahvaljujem se dr Nadi Grahovac na pomoći tokom izvođenja eksperimentalnog dela ove disertacije, kao i na pruženim savetima tokom pisanja.*

*Najiskrenije se zahvaljujem doc. dr Vojislavi Bursić i dr Gorici Vuković na izvođenju hromatografskih analiza.*

*Duboko poštovanje i veliku zahvalnost iskazujem prof. dr Zvonimiru Suturoviću na pruženoj podršci i savetima tokom izvođenja eksperimenata.*

*Biljani Zvizdalo se zahvaljujem na grafičkoj podršci.*

*Hvala kolegama i prijateljima na interesovanju tokom studija i izrade rada.*

*Najзад, najveću zahvalnost dugujem svojoj porodici na neizmernoj ljubavi, podršci i razumevanju.*

*Disertacija je rađena uz finansijsku podršku Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije u okviru projekta „Unapređenje i razvoj higijenskih i tehnoloških postupaka u proizvodnji namirnica životinjskog porekla u cilju dobijanja kvalitetnih i bezbednih proizvoda konkurentnih na svetskom tržištu“, potprojekat 1: „Razvoj i unapređenje tehnologije funkcionalnih proizvoda od mleka“.*



# SADRŽAJ

<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2 TEORIJSKI DEO.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Pesticidi i njihova klasifikacija.....</b>	<b>3</b>
<b>2.2 Toksičnost pesticida .....</b>	<b>4</b>
<b>2.3 Procesi i karakteristike koji utiču na sudbinu pesticida u životnoj sredini.....</b>	<b>6</b>
2.3.1 Rastvorljivost pesticida u vodi .....	7
2.3.2 Oktanol/voda podeoni koeficijent $K_{ow}$ .....	8
2.3.3 Tendencija pesticida da se adsorbuje za zemljište .....	8
2.3.4 Vreme poluživota .....	9
2.3.5 Isparavanje .....	9
2.3.6 Uticaj karakteristika zemljišta na sudbinu pesticida .....	10
2.3.7 Procesi degradacije pesticida.....	11
2.3.7.1 Hemijska degradacija .....	12
2.3.7.2 Fotodegradacija .....	12
2.3.7.3 Mikrobiološka degradacija .....	13
2.3.8 Usvajanje pesticida.....	14
2.3.9 Ispiranje pesticida.....	14
2.3.10 Spiranje pesticida .....	15
<b>2.4 Pesticidi i voda .....</b>	<b>16</b>
<b>2.5 Insekticidi .....</b>	<b>18</b>
2.5.1 Neonikotinoidi.....	19
2.5.1.1. Imidakloprid .....	22
<b>2.6 Herbicidi.....</b>	<b>28</b>
2.6.1 Triazini .....	30

2.6.1.1	Metamitron .....	31
2.6.1.2	Metribuzin .....	34
<b>2.7</b>	<b>Priprema uzoraka za analizu .....</b>	<b>38</b>
<b>2.8</b>	<b>Analitika pesticida.....</b>	<b>39</b>
2.8.1	Hromatografske metode .....	39
2.8.1.1	Gasna hromatografija (GC).....	40
2.8.1.2	Tečna hromatografija .....	40
2.8.2	Optičke metode .....	40
2.8.3	Imunohemijske metode .....	41
2.8.4	Elektroanalitičke metode.....	41
<b>2.9</b>	<b>Hronopotencimetrija.....</b>	<b>42</b>
<b>2.10</b>	<b>Radne elektrode.....</b>	<b>47</b>
2.10.1	Živine elektrode.....	47
2.10.2	Čvrste radne elektrode.....	48
2.10.2.1	Elektrode na bazi ugljenika .....	49
<b>3</b>	<b>EKSPERIMENTALNI DEO.....</b>	<b>51</b>
<b>3.1</b>	<b>Instrumentacija .....</b>	<b>51</b>
<b>3.2</b>	<b>Pribor i posude .....</b>	<b>53</b>
<b>3.3</b>	<b>Hemikalije i rastvori .....</b>	<b>54</b>
<b>3.4</b>	<b>Priprema i formiranje radnih elektroda .....</b>	<b>55</b>
<b>3.5</b>	<b>Uzorci.....</b>	<b>57</b>
3.5.1	Priprema uzoraka.....	58
<b>3.6</b>	<b>Optimizacija i validacija hronopotencimetrijske metode.....</b>	<b>59</b>
<b>3.7</b>	<b>Izvođenje hromatografske (LC-MS/MS) analize .....</b>	<b>61</b>
<b>4</b>	<b>REZULTATI I DISKUSIJA .....</b>	<b>64</b>
<b>4.1</b>	<b>Određivanje optimalnih uslova za hronopotencimetrijsko određivanje imidakloprida .....</b>	<b>64</b>

4.1.1 Elektroda od staklastog ugljenika .....	65
4.1.1.1 Ispitivanje optimalne metode za uklanjanje rastvorenog kiseonika iz rastvora .....	65
4.1.1.2 Uticaj vrste, pH i koncentracije pomoćnog elektrolita na analitički signal imidakloprida .....	69
4.1.1.3 Uticaj početnog potencijala na analitički signal imidakloprida .....	72
4.1.1.4 Uticaj struje na analitički signal imidakloprida.....	73
4.1.1.5 Linearnost.....	75
4.1.1.6 Granica detekcije i granica kvantifikacije .....	75
4.1.1.7 Preciznost .....	75
4.1.1.8 Tačnost metode .....	76
4.1.1.9 Interferencije .....	76
4.1.1.10 Robusnost .....	78
4.1.1.11 Primena razvijene hronopotenciometrijske metode za određivanje sadržaja imidakloprida u komercijalnim formulacijama .....	78
4.1.2 Tankoslojna živina elektroda .....	80
4.1.2.1 Ispitivanje optimalne metode za uklanjanje rastvorenog kiseonika iz rastvora .....	80
4.1.2.2 Uticaj vrste, pH i koncentracije pomoćnog elektrolita na analitički signal imidakloprida .....	81
4.1.2.3 Uticaj početnog potencijala na analitički signal imidakloprida .....	84
4.1.2.4 Uticaj struje na analitički signal imidakloprida.....	85
4.1.2.5 Linearnost.....	87
4.1.2.6 Granica detekcije i granica kvantifikacije .....	87
4.1.2.7 Preciznost .....	88
4.1.2.8 Tačnost metode .....	88
4.1.2.9 Interferencije .....	89
4.1.2.10 Robusnost .....	90

4.1.2.11	Primena razvijene hronopotenciometrijske metode za određivanje sadržaja imidakloprida u komercijalnim formulacijama .....	90
4.1.2.12	Primena razvijene hronopotenciometrijske metode za određivanje sadržaja imidakloprida u uzorcima vode .....	92
<b>4.2</b>	<b>Određivanje optimalnih uslova za hronopotenciometrijsko određivanje metamitrona.....</b>	<b>93</b>
4.2.1	Elektroda od staklastog ugljenika .....	94
4.2.1.1	Ispitivanje optimalne metode za uklanjanje rastvorenog kiseonika iz rastvora .....	95
4.2.1.2	Uticaj vrste, pH i koncentracije pomoćnog elektrolita na analitički signal metamitrona.....	95
4.2.1.3	Uticaj početnog potencijala na analitički signal metamitrona .....	98
4.2.1.4	Uticaj struje redukcije na analitički signal metamitrona .....	99
4.2.1.5	Linearnost.....	102
4.2.1.6	Granica detekcije i granica kvantifikacije .....	102
4.2.1.7	Preciznost .....	102
4.2.1.8	Tačnost metode .....	103
4.2.1.9	Interferencije .....	104
4.2.1.10	Robusnost .....	104
4.2.1.11	Primena razvijene hronopotenciometrijske metode za određivanje sadržaja metamitrona u komercijalnim formulacijama .....	105
4.2.1.12	Primena razvijene hronopotenciometrijske metode za određivanje sadržaja metamitrona u uzorcima vode .....	106
4.2.2.	Tankoslojna živina elektroda .....	108
4.2.2.1	Ispitivanje optimalne metode za uklanjanje rastvorenog kiseonika iz rastvora .....	108
4.2.2.2	Uticaj vrste, pH i koncentracije pomoćnog elektrolita na analitički signal metamitrona.....	109
4.2.2.3	Uticaj početnog potencijala na analitički signal metamitrona .....	112



4.2.2.4 Uticaj struje redukcije na analitički signal metomitrona .....	113
4.2.2.5 Linearnost .....	116
4.2.2.6 Granica detekcije i granica kvantifikacije .....	116
4.2.2.7 Preciznost .....	116
4.2.2.8 Tačnost .....	117
4.2.2.9 Interferencije .....	118
4.2.2.10 Robusnost .....	118
4.2.2.11 Primena razvijene hronopotenciometrijske metode za određivanje sadržaja metomitrona u komercijalnim formulacijama .....	119
4.2.2.12 Primena razvijene hronopotenciometrijske metode za određivanje sadržaja metomitrona u uzorcima vode .....	120
<b>4.3 Određivanje optimalnih uslova za hronopotenciometrijsko određivanje metribuzina .....</b>	<b>122</b>
4.3.1 Elektroda od staklastog ugljenika .....	123
4.3.2 Tankoslojna živina elektroda .....	124
4.3.2.1 Ispitivanje optimalne metode za uklanjanje rastvorenog kiseonika iz rastvora .....	124
4.3.2.2 Uticaj vrste, pH i koncentracije pomoćnog elektrolita na analitički signal metribuzina.....	125
4.3.2.3 Uticaj početnog potencijala na analitički signal metribuzina.....	128
4.3.2.4 Uticaj struje redukcije na analitički signal metribuzina .....	129
4.3.2.5 Linearnost.....	131
4.3.2.6 Granica detekcije i granica kvantifikacije .....	131
4.3.2.7 Preciznost .....	131
4.3.2.8 Tačnost metode .....	132
4.3.2.9 Interferencije .....	132
4.3.2.10 Robusnost .....	133

4.3.2.11	Primena razvijene hronopotenciometrijske metode za određivanje sadržaja metribuzina u komercijalnim formulacijama .....	134
4.3.2.12	Primena razvijene hronopotenciometrijske metode za određivanje sadržaja metribuzina u uzorcima vode .....	135
<b>5</b>	<b>ZAKLJUČCI .....</b>	<b>137</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>140</b>

## **1 UVOD**

Savremena poljoprivredna proizvodnja ne može se zamisliti bez upotrebe pesticida, jer gotovo da nema biljne kulture koja bi opstala bez zaštite. Pored dominantne primene u poljoprivredi u cilju povećanja prinosa, pesticidi se koriste u šumarstvu, a u znatno manjoj meri u veterini i komunalnoj higijeni. Za razliku od većine zagađujućih materija koje pretežno dospevaju u životnu sredinu u cilju oslobađanja od otpadnih materija, pesticidi se unose sa namerom da pomognu čoveku, povećanjem prinosa i suzbijanjem štetnih organizama.

Nepravilnom upotrebom pesticida, uključujući vrstu i količinu aktivne materije, kao i nepoštovanjem vremena karence, najveći deo ovih materija dospeva u životnu sredinu, prvenstveno u zemljište. Pesticidi koji su rastvorljivi u vodi spiranjem ili ispiranjem mogu lako dospeti do površinskih i podzemnih voda, i tako predstavljaju veliki rizik po zdravlje ljudi, naročito ako se takva voda koristi za piće. Štetni zdravstveni efekti koje pesticidi mogu izazvati zavise od stepena izloženosti, i mogu biti akutni kao što su mučnina, glavobolja, iritacije kože i očiju, i hronični, kao što su razni tumori, neurološki poremećaji, poremećaji u razvoju i reproduktivnom sistemu, dijabetes, kardiovaskularne bolesti. Zbog toga, praćenje pesticida u uzorcima vode iz životne sredine predstavlja jedan od najvažnijih zadataka sa kojima se susreće moderna analitička hemija.

U literaturi se, kao najčešće primenjivane tehnike za određivanje sadržaja pesticida u vodi, navode hromatografske metode. I pored brojnih prednosti koje omogućavaju ove metode, postoji potreba za razvojem alternativnih, jednostavnih i brzih načina detekcije ovih jedinjenja, koji bi se mogli primeniti direktno, bez prethodne kompleksne pripreme uzorka. Elektroanalitičke metode su se prethodnih nekoliko decenije pokazale kao pogodna alternativa za određivanje različitih grupa ovih jedinjenja.

Cilj ove doktorske disertacije je ispitivanje mogućnosti primene hronopotencimetrije u analizi odabranih pesticida u uzorcima vode iz životne sredine, kao i njihovim komercijalnim formulacijama koje se koriste u poljoprivredi, a dostupne su na domaćem tržištu. U tom smislu,

ispitana je mogućnost primene elektrode od staklastog ugljenika i tankoslojne živine elektrode, koje su korišćene za određivanje insekticida imidakloprida, kao i herbicida metomitrona i metribuzina. Za svaki ispitivani pesticid i korišćenu radnu elektrodu, optimizacija metode podrazumevala je ispitivanje elektrohemijskog ponašanja pesticida (oksidacija/redukcija), optimizaciju uslova hronopotenciometrijskog određivanja, validaciju razvijene metode, kao i primenu na uzorke vode i različite komercijalne formulacije pesticida. Optimizacija uslova obuhvatila je ispitivanje najpogodnije metode za uklanjanje rastvorenog kiseonika iz rastvora, uticaja vrste pomoćnog elektrolita, njegove pH vrednosti i koncentracije na analitički signal, ispitivanje i definisanje optimalnog opsega potencijala i struje. U okviru validacije ispitani su i definisani opsezi linearnosti, određene su vrednosti granice detekcije i granice kvantifikacije, ispitana je preciznost, tačnost, robusnost i selektivnost metode.

Rad se sastoji iz sledećih celina: *Uvod*, *Teorijski deo*, *Eksperimentalni deo*, *Rezultati i diskusija* i *Zaključci*. *Teorijski deo* obuhvata kratak pregled literature o karakteristikama pesticida, njihovoj klasifikaciji, vidovima razgradnje, štetnim uticajima na životnu sredinu, kao i analitici ovih jedinjenja. Posebno su istaknuti pesticidi koji su predmet proučavanja ove doktorske disertacije. U *Eksperimentalnom delu* opisani su korišćeni rastvori, hemikalije, instrumentacija, posuđe, ispitivani uzorci, kao i priprema uzoraka. Deo *Rezultati i diskusija* sastoji se iz nekoliko potpoglavlja koji su koncipirani prema određivanom analitu i radnoj elektrodi koja je korišćena u eksperimentima. U svakom potpoglavlju postupno su opisani postupci optimizacije i validacije metode, a na kraju, razvijene metode primenjene su na komercijalne formulacije pesticida i uzorke vode. Pored rezultata dobijenih hronopotenciometrijom, prikazani su i rezultati analize uzoraka vode dobijenih komparativnom hromatografskom metodom.

## 2 TEORIJSKI DEO

### 2.1 Pesticidi i njihova klasifikacija

Pesticidi predstavljaju sredstva namenjena za sprečavanje, suzbijanje, ili kontrolu bilo koje vrste štetočina, uključujući vektore humanih i animalnih bolesti, nepoželjne biljne i životinjske vrste koje izazivaju štetu, ili na bilo koji drugi način utiču na proizvodnju, obradu, skladištenje, ili transport životnih namirnica i poljoprivrednih kultura (Stephenson i sar., 2006). U Republici Srbiji, za pesticide koristi se termin sredstva za zaštitu bilja, čija su registracija, kontrola, promet, uvoz i primena u poljoprivrednoj proizvodnji i šumarstvu, regulisana *Zakonom o sredstvima za zaštitu bilja* (Službeni glasnik RS, 41/2009).

Još od davnina čovek je spoznao da određena hemijska sredstva mogu biti efikasna u zaštiti useva. Prvobitno, neorganske materije kao što su sumpor, arsen, živa i olovo, korišćene su kao pesticidi. Početkom XX veka Paul Müller otkrio je insekticidna svojstva DDT-a (dihlor-difenil-trihloretan), nakon čega je usledila masovna upotreba ovog pesticida širom sveta, naročito u kontroli bolesti kao što su malarija i kuga, koje su do tada dovele do smrti velikog broja ljudi. Otkriće DDT-a predstavlja početak industrijske proizvodnje pesticida.

Prema trenutnim podacima, na tržištu Evropske Unije registrovano je 1355 aktivnih materija (EU Pesticides database, 2017), dok se prema podacima Ministarstva poljoprivrede i zaštite životne sredine u Republici Srbiji na listi odobrenih supstanci nalazi ukupno 327 aktivnih supstanci, sadržanih u 1106 registrovanih sredstava za zaštitu bilja (Službeni Glasnik 49/2017).

Pesticidi se mogu klasifikovati na različite načine (prema vrsti organizma koji se suzbija, hemijskoj strukturi, načinu primene, načinu prodiranja u organizam, toksičnosti, fizičkom stanju), a najčešće se koristi klasifikacija prema vrsti organizma koji se suzbija, pa tako razlikujemo:

- insekticide;
- fungicide;
- baktericide;
- herbicide i
- regulatore rasta biljaka (Greene i Pohanish, 2005).

U praksi, pesticidi se retko koriste u čistom stanju. Većina savremenih pesticida podrazumeva odgovarajuću pripremu koja može obuhvatati različite postupke (mlevenje, rastvaranje, razblaživanje, ili razređenje inertnim materijama), čime se omogućuje ekonomičnija primena ovih materija, pravilna raspodela na tretiranoj površini i povećana efikasnost u zaštiti. Ovaj proces prevođenja pesticida, tj. aktivne materije, u proizvod koji može da se koristi u praktičnim uslovima, naziva se formulisanje, pri čemu formulacija može biti smeša jedne ili više vrsta aktivnih materija (Šovljanski i Lazić, 2007).

Prema podacima Ujedinjenih Nacija, procenjeno je da će do 2030. godine ljudska populacija dostići broj od 8,5 milijardi (United Nations, 2015). Uz takav rapidan rast broja stanovnika, potreba za hranom širom sveta će se povećati, što uslovljava i povećanu upotrebu pesticida. Nakon upotrebe, pesticidi dospevaju u životnu sredinu, zemljište i vodu i preko lanca ishrane ulaze u ljudski organizam. Dugotrajna izloženost pesticidima kod ljudi može narušiti funkcionisanje nervnog, endokrinog, imunog, reproduktivnog, renalnog, kardiovaskularnog i respiratornog sistema (Mostafalou i Abdollahi, 2013). U cilju smanjenja štetnih uticaja pesticida na životnu sredinu, kao i na zdravlje ljudi, uvedene su regulative po pitanju registracije i načina upotrebe pesticida, a došlo je i do znatne revizije regulativa po pitanju maksimalno dozvoljenih količina (MDK) ostataka pesticida u namirnicama (EU Pesticides database, 2017). U cilju usklađivanja zakona sa Evropskom Unijom, i Republika Srbija donosi Pravilnik kojim se vrednosti MDK za namirnice usklađuju sa vrednostima u Evropskoj Uniji (Službeni glasnik RS, 29/2014).

## 2.2 Toksičnost pesticida

Kada se govori o toksičnosti pesticida, onda se pod tim terminom označava sposobnost pesticida da izazove štetan efekat. Štetni efekti do kojih dovode pesticidi mogu varirati od blagih simptoma kao što je glavobolja, do ozbiljnih kao što su konvulzije, koma ili smrt. Iako

se pesticidi primenjuju u cilju povećanja poljoprivredne proizvodnje, fiziološka i biohemijska sličnost organizama koji nisu predmet delovanja pesticida čini ih osetljivim na toksično delovanje pesticida. Pre stavljanja u promet, pesticidi prolaze veoma detaljna ispitivanja koja se, pored fizičko-hemijskih karakteristika, odnose i na potencijalne toksične efekte na čoveka i životnu sredinu.

U zavisnosti od načina izloženosti, pesticidi mogu na različite načine da dospeju u organizam: oralno, dermalno, ili inhalacijom. U najvećem broju slučajeva do izlaganja čoveka dolazi preko disajnih organa prilikom primene pesticida, udisanjem štetnih materija u vidu pare, gasova, aerosola. U manjem broju slučajeva dolazi do dermalne ekspozicije, usled nekorišćenja zaštitne odeće i opreme, dok su oralna trovanja najređa, a uglavnom su posledica nesrećnog slučaja. Ispitivanje toksičnih efekata pesticida na ljude veoma je složen proces. Kao test-životinje koriste se zamorci: miševi, pacovi, zečevi i psi. Na osnovu rezultata toksikoloških testova na test-životinjama, procenjuje se toksičnosti pesticida na ljude. U zavisnosti od vremenskog intervala izlaganja i koncentracije štetne supstance, razlikujemo akutnu i hroničnu toksičnost. Akutna toksičnost nastaje nakon kratkotrajnog izlaganja štetnoj supstanci u velikoj dozi, a javlja se u relativno kratkom vremenskom intervalu, dok se hronična toksičnost javlja usled dugotrajnog izlaganja supstanci u manjoj koncentraciji, a javlja se nakon dužeg vremenskog perioda.

Standardni termin na osnovu kojeg se definiše akutna toksičnost neke supstance je  $LD_{50}$  (*lethal dose*) i označava onu dozu, odnosno količinu supstance koja dovodi do smrti 50% od ispitivane populacije, a izražava se u mg supstance po kg telesne težine. Pored  $LD_{50}$ , za definisanje toksičnosti koristi se i  $LC_{50}$  (*lethal concentration*), odnosno srednja smrtna koncentracija (mg/l), što predstavlja onu koncentraciju supstance koja dovodi do smrti 50% od ispitivane populacije. Za svaku iskazanu vrednost  $LD_{50}$  mora se naglasiti način primene, kao i vrsta životinja koja je korišćena u eksperimentima. Prema preporukama Svetske zdravstvene organizacije, u zavisnosti od  $LD_{50}$  oralne i dermalne vrednosti, predložena je klasifikacija pesticida u 5 grupa (Tabela 1).

Standardne vrednosti za izražavanje hronične toksičnosti nisu definisane. Štetni efekti koji nastaju usled hronične toksičnosti uključuju karcinogenost (sposobnost supstance da izazove maligni tumor), teratogenost (strukturne i funkcionalne anomalije koje izaziva supstanca tokom fetalnog razvoja), mutagenost (promene u genetskoj strukturi) i smanjenje reproduktivnosti.

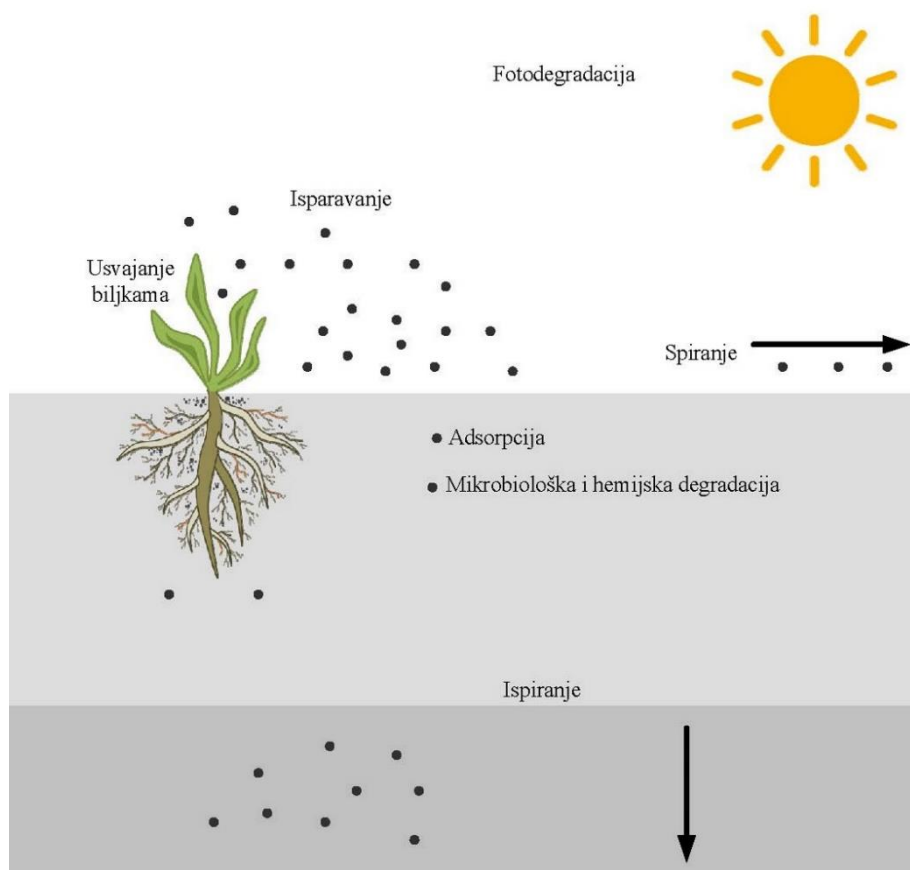
**Tabela 1.** Klasifikacija pesticida u zavisnosti od LD<sub>50</sub> vrednosti prema preporukama Svetske zdravstvene organizacije (WHO, 2009)

Grupa		LD <sub>50</sub> za pacove (mg/kg telesne težine)	
		Oralno	Dermalno
Ia	Ekstremno opasni	< 5	< 50
Ib	Veoma opasni	5 - 50	50 - 200
II	Umereno opasni	50 - 2000	200 - 2000
III	Malo opasni	> 2000	
U	Malo verovatno da predstavljaju akutnu opasnost	5000 ili veće	

### 2.3 Procesi i karakteristike koji utiču na sudbinu pesticida u životnoj sredini

Dok je efikasnost i toksičnost skoro svih pesticida dobro poznata, njihova sudbina i ponašanje u životnoj sredini nakon primene i dalje nije dovoljno ispitana. Prema istraživanju koje je sproveo David Pimentel pre više od 20 godina, manje od 0,1% primenjenog pesticida je zaista efikasno, dok ostatak odlazi u životnu sredinu (Pimentel, 1995). Razvojem poljoprivrede u praksi se primenjuju mnogo bolje aplikacione tehnologije, a savremene formulacije omogućavaju primenu mnogo manjih količina pesticida nego ranije (Collier i sar., 2016). Bez obzira na način primene, najveći deo pesticida nakon primene i dalje dospeva u životnu sredinu. Razlike u hemijskoj strukturi aktivnih materija mogu da ukazuju kako će se određena materija ponašati u životnoj sredini. Neki pesticidi su rastvorljivi u vodi, što znači da iz zemljišta procesima ispiranja ili spiranja mogu lako dospeti do podzemnih i površinskih voda. Ukoliko su pesticidi lako isparljivi, mogu lako preći u gasovito stanje. Takođe, pesticidi mogu i da se razgrade u životnoj sredini biološkim putem (uz pomoć mikroorganizama iz zemljišta), ili hemijskim putem, pri čemu može doći do potpune detoksikacije, ili u nekim slučajevima novonastali degradacioni produkti mogu biti još opasniji oblici od primarnih komponenata. Procesi kretanja i transformacije pesticida prikazani su na Slici 1.





**Slika 1.** Proces koji određuju sudbinu pesticida u zemljištu

Fizičko-hemijske karakteristike pesticida primarni su faktori u definisanju ponašanja pesticida u životnoj sredini, kao i za njihovo određivanje. U nastavku ovog dela disertacije nabrojani su najznačajniji faktori koji utiču na sudbinu pesticida u zemljištu.

### 2.3.1 Rastvorljivost pesticida u vodi

Rastvorljivost pesticida u vodi je fundamentalna hemijska karakteristika pesticida, a definiše se kao koncentracija hemikalije rastvorene u vodi u mg/l, pri čemu je voda u kontaktu, i u hemijskoj ravnoteži sa čistom hemikalijom (Barceló i Hennion, 1997). Ova karakteristika je u funkciji temperature, pH vrednosti vodenog rastvora kao i od prisustva drugih organskih materija. Rastvorljivost pesticida u vodi ukazuje na sklonost pesticida da spiranjem sa zemljišta, ili ispiranjem dospeju do izvora vode. Iako ova karakteristika sama po sebi nije dovoljna za

predviđanje ponašanja pesticida u životnoj sredini, pesticidi čija je rastvorljivost manja od 1 mg/l uglavnom ostaju na površini zemljišta (Gavrilescu, 2005).

### 2.3.2 Oktanol/voda podeoni koeficijent $K_{ow}$

$K_{ow}$  koeficijent ukazuje na obrnut odnos između rastvorljivosti organskog jedinjenja u vodi i oktanolu, a definiše se na sledeći način:

$$K_{ow} = \frac{\text{koncentracija organske hemikalije u oktanolu (mg/l)}}{\text{koncentracija organske hemikalije u vodi (mg/l)}} \quad (1)$$

Ovaj koeficijent često se iskazuje i kao logaritamska vrednost ( $\log K_{ow}$ ), a karakteristika je lipofilnosti molekula, i ukazuje na tendenciju hemikalije da se akumulira u biološkim membranama i živim organizmima. Generalno važi pravilo da kod supstanci sa vrednošću  $\log K_{ow}$  većom od 3, dolazi do akumulacije. Polarnost molekula takođe je povezana sa vrednošću  $K_{ow}$ . Tako nepolarni analiti imaju vrednost  $\log K_{ow}$  iznad 4 ili 5, dok polarni imaju  $\log K_{ow}$  nižu od 1 ili 1,5 (Barceló i Hennion, 1997).

### 2.3.3 Tendencija pesticida da se adsorbuje za zemljište

Adsorpcija pesticida za zemljište veoma je važna fizičko-hemijska karakteristika koja ukazuje na sudbinu pesticida u životnoj sredini, a odvija se kao rezultat interakcije između hemikalije i čestica zemlje. Adsorpciona svojstva zemljišta mogu značajno da utiču na mobilnost hemikalija duž zemljišnog profila kao i na njihovu postojanost, bioaktivnost, ispiranje, isparavanje i bioraspoloživost. Tendencija pesticida da se adsorbuje za zemljište izražava se adsorpcionim koeficijentom ( $K_{oc}$ ), što predstavlja odnos koncentracije pesticida u adsorbovanom obliku (vezanog za čestice zemlje) i u rastvoru (rastvorenog u vodi). Velike  $K_{oc}$  vrednosti ukazuju na tendenciju hemikalije, odnosno pesticida da se adsorbuje za čestice zemljišta. U zavisnosti od vrednosti  $K_{oc}$  pesticidi se smatraju veoma mobilnim ( $K_{oc} < 50$ ), umereno mobilnim ( $K_{oc}$ : 150 - 500) i neznatno mobilnim ( $K_{oc} < 2000$ ) (Barceló i Hennion, 1997).

### 2.3.4 Vreme poluživota

Vreme poluživota ( $DT_{50}$ , ili  $t_{1/2}$ ), određuje postojanost pesticida u zemljištu, a definiše se kao vreme potrebno da koncentracija pesticida opadne na polovinu od početne vrednosti (Stephenson i sar., 2006). Što je vreme poluživota pesticida duže, povećava se i mogućnost njegovog kretanja u zemljištu. Tako se pesticidi koji imaju vreme poluživota kraće od 30 dana smatraju nepostojanim, a oni sa vremenom poluživota dužim od 30, odnosno od 100 dana umereno postojanim i postojanim (Gavrilescu, 2005). Kod postojanih pesticida koji u životnoj sredini opstaju duže vreme, povećava se i mogućnost spiranja i kontakta sa površinskim vodama. U literaturi se mogu naći brojni podaci o vremenu poluživota pesticida, dobijeni u laboratorijskim ili realnim uslovima merenja, pri čemu treba naglasiti da veći značaj treba davati merenjima izvedenim u realnim uslovima, s obzirom da ona uključuju složene procese biotičke i abiotičke razgradnje, isparavanje, spiranje, ispiranje, adsorciju od strane biljaka, itd.

### 2.3.5 Isparavanje

Isparavanje predstavlja proces prevođenja čvrstih i tečnih pesticida u gasovitu fazu, a njegovo odvijanje određeno je strujanjem vazduha. Tendencija pesticida ka isparavanju, odnosno prelasku u gasovitu fazu izražava se Henrijevom konstantom:

$$H = \frac{\text{napon pare}}{\text{rastvorljivost}} \quad (2)$$

Što je veća vrednost ove konstante za datu aktivnu materiju, veća je i njena tendencija ka isparavanju. Za većinu pesticida, gubici isparavanjem zanemarljivi su u poređenju sa ispiranjem. Brzina isparavanja pesticida zavisi od nekoliko faktora:

- temperature – više temperature intenziviraju proces isparavanja;
- vlažnosti – kod niske vlažnosti veća je mogućnost isparavanja;
- kretanja vazduha – ubrzava procese isparavanja;
- načina primene pesticida;
- karakteristika zemljišta (tekstura, sadržaj organske materije, vlaga, i dr.).

### 2.3.6 Uticaj karakteristika zemljišta na sudbinu pesticida

Pesticidi dospevaju u zemljište direktnim ili indirektnim putem. Direktno dospevanje pesticida javlja se kao posledica kontrolisane primene, pri suzbijanju štetočina, a sprovodi se različitim formulacijama. Indirektan put podrazumeva dospevanje pesticida zalivanjem, ili navodnjavanjem vodom kontaminiranom pesticidima. Sudbina pesticida u zemljištu pod uticajem je kompleksnih dinamičkih, fizičkih, hemijskih i bioloških procesa, uključujući sorpciju-desorpciju, isparavanje, hemijsku, foto- i biološku degradaciju, usvajanje od strane biljaka, spiranje i ispiranje (Estévez i sar., 2008). Procena kontaminacije životne sredine pesticidima moguća je samo sagledavanjem i razumevanjem ovih kompleksnih procesa koji se odvijaju u zemljištu.

Zemljište predstavlja složeni polidisperzni trofazni sistem koji čine čvrsta, tečna i gasovita faza. Čvrsta faza (mineralna i organska materija) čini do 50% zapremine zemljišta, dok drugu polovinu čine zemljišni rastvor i vazduh. Što se tiče samog sadržaja čvrste faze, mineralne materije čine 90 - 95% celokupne zemljišne mase, dok na organske materije otpada svega 1 - 5%. Mineralne materije zemljišta čine pesak, mulj i glina i ove materije su, izuzev gline, inertne u pogledu hemijskih reakcija sa pesticidima. Organska materija zemljišta predstavlja složenu smešu huminskih i nehuminskih supstanci nastalih procesima raspadanja biljaka, životinja i mikroorganizama. Nehuminske supstance čine ugljeni hidrati, proteini, organske i amino-kiseline, masti, smole, lignin i pigmenti. Većinu ovih supstanci lako usvajaju mikroorganizmi, te one imaju kratak životni vek u zemljištu. Sa druge strane, huminske materije (huminska kiselina, fulvinska kiselina i humin) su stabilne, i čine veći deo organske materije zemljišta (do 90%). Čvrste čestice zemljišta formiraju se uglavnom od minerala i organske materije zemljišta, dok je prostor između njih ispunjen šupljinama koje su značajne za kretanje vode, rastvorenih materija i vazduha.

Transportni procesi pesticida u zemljištu zavise od strukture zemljišta kao i od njegove teksture (sadržaj peska, mulja i gline). Zemljišta koja imaju veću specifičnu površinu (fina tekstura) i manju propustljivost će imati na raspolaganju veću površinu sorpcije za vezivanje pesticida i upravo zbog toga kod takvih zemljišta za očekivati je duže vreme kontakta pesticida i zemljišta. Na procese adsorpcije pesticida najveći uticaj ima sadržaj organske materije i gline u zemljištu, fizičko-hemijske karakteristike pesticida, kao i pH vrednost zemljišnog rastvora i vlažnost zemljišta. Adsorpcijom molekula pesticida za zemljišne čestice smanjuje se mobilnost

pesticida, mikrobiološka degradacija, kao i usvajanje pesticida. Shodno tome, kod zemljišta sa visokim sadržajem organske materije i gline dolazi do usporenog kretanja vode kroz slojeve zemljišta, izraženi su procesi adsorpcije, a generalno takva zemljišta sadrže i raznovrsne populacije mikroorganizama koji mogu da metabolišu pesticide. Sa druge strane, kod peskovitih zemljišta procesi adsorpcije i mikrobiološke razgradnje su zanemarljivi, a velika propustljivost omogućuje da pesticidi lako dospeju do podzemnih voda.

Pored strukture zemljišta, postoji još nekoliko parametara koji utiču na ponašanje pesticida u zemljištu, a to su propustljivost, pH vrednost zemljišnog rastvora, nagib i dubina zemljišta.

Propustljivost (permeabilnost) zemljišta predstavlja brzinu kretanja vode kroz slojeve zemljišta, a zavisi od strukture zemljišta. Usporenim kretanjem vode vreme kontakta pesticida i čestica zemljišta se produžava, pa su samim tim i procesi njihove razgradnje izvesniji.

Dubina zemljišta utiče na količinu i vreme kontakta pesticida i čestica zemljišta; povećanjem debljine zemljišta vreme kontakta se produžava.

pH zemljišta utiče na rastvorljivost pesticida, kao i na brzinu bioloških procesa koji dovode do njihove razgradnje. Uopšteno, u kiselim zemljištima povećava se rastvorljivost pesticida, a smanjuje se adsorpcija za čestice zemlje i efikasnost bioloških procesa u zemljištu.

Nagib zemljišta utiče na količinu vode koja će dospeti u zemljište. Količina vode, a samim tim i kontaminanata koji dospevaju u zemljište je veća kod ravnih u odnosu na strme terene.

### **2.3.7 Procesii degradacije pesticida**

Degradacija predstavlja osnovni proces razgradnje pesticida u životnoj sredini koji se odvija pod uticajem biotičkih i abiotičkih faktora, a uključuje različite interakcije između mikroorganizama, sastojaka zemljišta i pesticida (Estévez i sar., 2008; Guo i sar., 2000). Većina pesticida se procesima razgradnje prevodi u manje toksična jedinjenja, iako postoji mogućnost da i novonastali produkti razgradnje budu izuzetno štetni (Aksu, 2005). Pojam degradacije pesticida treba razlikovati od iščezavanja, odnosno disipacije pesticida (eng. *dissipation*). Pojam disipacija često se koristi u slučajevima kada nije moguće utvrditi koji procesi dovode

do smanjenja koncentracije pesticida, što može biti posledica degradacije, isparavanja, ispiranja, spiranja i usvajanja pesticida (Đurović, 2011).

### **2.3.7.1 Hemijska degradacija**

Hemijska (abiotička) degradacija ima važnu ulogu u razgradnji mnogih pesticida u zemljištu, a može se odvijati različitim hemijskim reakcijama kao što su hidroliza, oksidoredukcija i jonizacija (Gavrilescu, 2005; Khan, 1980). Većina ovih reakcija odvija se u vodenoj sredini tako da voda istovremeno predstavlja i medijum i reaktant. Najčešće reakcije hemijske razgradnje podrazumevaju hidrolizu i oksidaciju. Reakcije razgradnje mogu biti katalizovane na različite načine: uz prisustvo čestica gline, oksida metala, metalnih jona i organske materije.

Hidroliza predstavlja reakciju razgradnje veza u molekulu usled reakcije sa vodom, pri čemu dolazi do zamene određene hemijske grupe sa hidroksilnom grupom. Brzina odvijanja hidrolize u velikoj meri zavisi od pH vrednosti sistema. Usled promene strukture novonastale komponente, u reakciji hidrolize dolazi i do promena njenih karakteristika, pri čemu ovom reakcijom najčešće nastaju produkti koji su manje toksični od polazne supstance. Hidroliza predstavlja ključnu reakciju u razgradnji organofosfornih pesticida i s-triazina.

Brzina odvijanja redoks reakcija zavisi od pH sredine, kao i od vrednosti redoks potencijala ispitivanog pesticida. Jonizovani oblici pesticida se značajno razlikuju po fizičko-hemijskim karakteristikama od neutralnih molekula u pogledu adsorpcije, rastvorljivosti i reaktivnosti. Vrednost pH u većini vodenih sistema nalazi se u rasponu od 4 do 9, uz ekstremne vrednosti pH do 2 i pH 11 (Gavrilescu, 2005).

### **2.3.7.2 Fotodegradacija**

Fotodegradacija (fotoliza) je proces razgradnje pesticida pod uticajem sunčeve svetlosti, koji može da se odvija na površini lista tretirane biljke, zemljišta ili u vazduhu. Procesi razgradnje pesticida fotodegradacijom mogu se odvijati direktnim ili indirektnim putem. Direktna fotodegradacija podrazumeva direktnu apsorpciju fotona od strane pesticida, dok kod indirektno fotolize molekul pesticida apsorbuje energiju preko intermedijera, odnosno takozvanog fotosenzitera. U kojoj meri će doći do fotolize zavisi od dužine trajanja izlaganja pesticida, intenziteta i talasne dužine zračenja, karakteristika samog pesticida, prisustva vode,

vrednosti pH i prisustva fotosenzitera. Iako je razgradnja pesticida fotolizom dosta proučavana, većina eksperimenata izvedena je pod laboratorijskim uslovima koji se bitno razlikuju od onih koji stvarno vladaju u životnoj sredini, pa tako i uticaj mnogih faktora koji mogu da utiču na brzinu fotolize i dalje nije u potpunosti objašnjen.

### **2.3.7.3 Mikrobiološka degradacija**

Mikrobiološka degradacija (biodegradacija) pesticida rezultat je mikrobiološkog metabolizma pesticida, i često predstavlja jedan od glavnih načina razgradnje pesticida u zemljištu. Ovaj proces odvija se tako što mikroorganizmi iz zemljišta koriste pesticide kao izvore ugljenika i energije i prevode ih u neorganske molekule. U poslednjih nekoliko decenija mikrobiološka razgradnja, za razliku od konvencionalnih fizičko-hemijskih metoda, pokazala se kao veoma uspešna metoda razgradnje pesticida, koja je jeftina i ekološka (Javaid i sar., 2016). Stoga se dosta napora ulaže u izolaciju i identifikaciju mikrobioloških vrsta koje imaju sposobnost razgradnje pesticida i njihovih ostataka u zemljištu (Ortiz-Hernández i sar., 2013). Populacije mikroorganizama koji se nalaze u zemljištu izuzetno su raznovrsne, a uključuju bakterije, aktinomicete, gljive, protozoe, alge, te su samim tim i procesi mikrobiološke razgradnje pesticida izuzetno složeni. Istraživači procenjuju da jedan gram zemljišta može sadržati između 5000 i 7000 različitih bakterijskih vrsta, dok, po brojnosti individua, populacije bakterija prelaze 100 hiljada miliona, a gljiva 10 hiljada miliona (Gavrilescu, 2005).

Zemljišni mikroorganizmi mogu da deluju na pesticid na nekoliko načina pri čemu najčešći mehanizam uključuje razgradnju detoksikacijom, dok u nekim slučajevima može doći do aktivacije, odnosno toksikacije inicijalno netoksičnog molekula pesticida. Metabolizam pesticida može uključivati nekoliko faza. U prvoj fazi osobine polazne komponente menjaju se reakcijama oksidacije, redukcije ili hidrolize i nastaju jedinjenja koja se karakterišu većom rastvorljivošću u vodi, i uglavnom manjom toksičnošću u odnosu na polazno jedinjenje. Druga faza podrazumeva konjugaciju pesticida, ili njihovih metabolita, na šećere ili aminokiseline, dok treća faza podrazumeva konverziju metabolita iz druge faze do sekundarnih netoksičnih metabolita (Ortiz-Hernández i sar., 2013). U ovim procesima razgradnje prvenstveno učestvuju bakterije i gljive, lučenjem ekstracelularnih i intracelularnih enzima (hidrolaza, peroksidaza, oksigenaza, i dr.). Brzina i efikasnost mikrobiološke razgradnje pod uticajem je kompleksnih faktora koji vladaju u životnoj sredini: vlage, temperature, pH zemljišta, procesa adsorpcije i osobina samog pesticida. Generalno, adsorbovane komponente su manje dostupne

mikroorganizmima, pa su tako razgradnja i transport ovih komponenata ograničeni (Gavrilescu, 2005). S obzirom da voda predstavlja rastvarač za difuziju i kretanje pesticida, a esencijalna je i za odvijanje mikrobioloških procesa, povećanjem vlage u zemljištu povećava se i intenzitet degradacije pesticida (Chowdhury i sar., 2008). Stepenn degradacije pesticida raste i porastom temperature, pošto povećanjem temperature dolazi i do porasta populacija mikroorganizama u zemljištu (Chowdhury i sar., 2008; del Pilar Castillo i Torstensson, 2007; Gavrilescu, 2005; Khan, 1980). Prema tome, biodegradacija može da se odvija odmah nakon primene pesticida, dok je u nekim slučajevima mikroorganizmima potrebno izvesno vreme da razviju mehanizam razgradnje određenog pesticida, a postoji mogućnost i da određeni molekuli uopšte ne podležu mikrobiološkoj razgradnji.

### 2.3.8 Usvajanje pesticida

Kao što je već ranije napomenuto, pesticidi se nakon primene adsorbuju za čestice zemljišta i organsku materiju, ili dolazi do njihove razgradnje biotičkim ili abiotičkim putem. Onaj deo pesticida koji ne podleže adsorpciji, odnosno razgradnji, a nalazi se u zemljišnom rastvoru usvaja biljka korenom. Mehanizam usvajanja pesticida izuzetno je kompleksan, a zavisi od fizičkih i hemijskih karakteristika pesticida i zemljišta, vrste biljke, kao i od uslova koji vladaju u životnoj sredini (temperatura, pH). Stepenn usvajanja pesticida iz zemljišta proporcionalan je oktanol/voda podeonom koeficijentu ( $K_{ow}$ ) (McKone i Maddalena, 2007). Sadržaj organske materije u zemljištu takođe ima važnu ulogu na usvajanje pesticida, obzirom da procesi adsorpcije u zemljištu ograničavaju dostupnost ovih hemikalija za biljke. Pored usvajanja pesticida korenom iz zemljišta, biljke usvajaju pesticide i iz vazduha, najvećim delom lišćem, a u manjoj meri putem stabla i izdanaka. Usvajanjem pesticida u biljkama može doći do njihove akumulacije, pa na taj način ulaze u lanac ishrane.

### 2.3.9 Ispiranje pesticida

Ispiranje pesticida predstavlja vertikalno premeštanje supstance kroz zemljišne slojeve. Sa stanovišta zaštite životne sredine, ovo je izuzetno važan proces, jer predstavlja potencijalnu opasnost zagađenja podzemnih voda. Mogućnost kontaminacije podzemnih voda pesticidima ne zavisi samo od kretanja pesticida kroz zemljište, već i od brzine razgradnje. Ukoliko je brzina



razgradnje dovoljno velika u poređenju sa brzinom ispiranja, može doći do kompletne razgradnje pesticida pre nego što dospe u podzemne vode. Intenzitet ispiranja zavisi od niza faktora kao što su sklonosti datog jedinjenja da se adsorbuje za čestice zemljišta, rastvorljivosti u vodi, teksture zemljišta, sadržaja organske materije u zemljištu, učestalosti i količine padavina, itd. Generalno važi pravilo da se pesticidi koji imaju veću rastvorljivost u vodi bolje kreću kroz zemljišni profil. Takođe, u ispiranju pesticida adsorcija ima veoma važnu ulogu, između adsorpcije i ispiranja pesticida važi obrnuta proporcionalnost. Ukoliko su poznate fizičko-hemijske karakteristike pesticida ( $K_{OC}$ ,  $DT_{50}$ ) može se proceniti i njihov potencijal ispiranja (Tabela 2).

**Tabela 2.** Procena pokretljivosti i postojanosti pesticida u zemljištu (Roberts, 1996)

Klasa pokretljivosti jedinjenja	Kritična vrednost $K_{OC}$ (ml/g)	Klasa postojanosti jedinjenja	Vreme poluraspada ( $DT_{50}$ ) (dani)
nepokretno	> 4000	nepostojano	< 5
slabo pokretno	4000 - 500	slabo postojano	5 - 21
umereno pokretno	499 - 75	umereno postojano	22 - 60
pokretno	74 - 15	veoma postojano	> 60
veoma pokretno	< 15		

Model koji povezuje pokretljivost i postojanost pesticida je tzv. GUS model (*Groundwater Ubiquity Score*), a definiše se na sledeći način:

$$GUS = \log(DT_{50})(4 - \log K_{OC}) \quad (3)$$

gde GUS predstavlja bezdimenzioni indeks,  $DT_{50}$  vreme poluraspada pesticida u zemljištu i  $K_{OC}$  koeficijent sorpcije. Kada je  $GUS > 2,8$  smatra se da je pesticid sklon ispiranju, pesticidi sa vrednošću  $GUS < 1,8$  nisu skloni ispiranju, dok su prelazni pesticidi sa  $1,8 < GUS < 2,8$  (Gustafson, 1989).

### 2.3.10 Spiranje pesticida

Spiranje pesticida predstavlja horizontalno premeštanje supstance po površni zemljišta, a javlja se u slučaju kada je akumulacija vode na površini zemljišta pod uticajem padavina, vetra, erozije, nagiba tla, itd. više izražena u odnosu na njenu infiltraciju u zemljište. Transport

pesticida spiranjem zavisi od oblika u kojima se oni nalaze u vodi. Molekul pesticida može biti u rastvorljivom obliku, ili vezan za čvrste čestice zemljišta ili koloide. Transport pesticida koji su rastvoreni biće regulisan samim tokom vode, dok transport vezanih pesticida može biti različit, u zavisnosti od vrste supstrata za koji su vezani. Transport pesticida koji su vezani za rastvorenu organsku materiju ili koloide sličan je kao kod onih koji su u rastvorenom obliku, dok kod pesticida koji su vezani za čestice peska ili gline u površinskim vodama dolazi do taloženja.

## 2.4 Pesticidi i voda

Voda predstavlja jednu od najrasprostranjenijih materija u prirodi i osnovni je preduslov za život na Zemlji. U vodu svakodnevno dospevaju velike količine zagađujućih materija, ali zahvaljujući svojim fizičko-hemijskim karakteristikama, stalnom kruženju u prirodi, kao i prisutvu mikroorganizama, voda poseduje ogromnu moć samoprečišćavanja.

Uprkos velikoj rasprostranjenosti, sve je manje čiste vode koja se bez prethodne obrade može koristiti za piće. Intenzivnim razvojem poljoprivrede, industrije i porastom broja stanovnika, dolazi do povećanog zagađenja izvora pitke vode, te se smatra da bi uskoro moglo doći i do iscrpljenja ovog neophodnog resursa. Zagađenje vode predstavlja svaka promena u kvalitetu vode (fizička, hemijska ili biološka), koja ima negativan uticaj na organizme koji tu vodu konzumiraju ili žive u njoj, a nastaje usled prisustva opasnih i štetnih materija. Glavne izvore zagađenja čine gradske i industrijske otpadne vode, koje se često bez prethodnog prečišćavanja ispuštaju u prirodne vodotokove, dok je na drugom mestu spiranje sa poljoprivrednih površina. Neke zagađujuće materije u vodi mogu biti štetne ukoliko su prisutne u većim koncentracijama, dok su toksične materije štetne bez obzira na to koliki je njihov sadržaj u vodi.

Pesticidi dospevaju u vodene sredine iz različitih izvora koji mogu da se grupišu na tačkaste i difuzione. Tačkasti izvori predstavljaju fabrike koje proizvode pesticide ili njihove formulacije, a mogu biti konstantnog zagađenja (otpadne vode), ili zadesnog (havarijsko). Difuzione izvore karakteriše veća površina, a odnose se na eroziju sa poljoprivrednih površina i otpad. Erozija može biti vodena (usled jakih padavina) i eolska, odnošenjem vetrom sitnih čestica zemljišta u kojima se nalazi pesticid. Pesticidi u vodotokove mogu dospeti direktno ili

indirektno. Direktni put podrazumeva suzbijanje neželjene vegetacije, algi, komaraca, ribe, itd. u vodi i oko vode. Indirektno pesticidi dospevaju u vodu iz atmosfere padavinama, ulivanjem otpadnih voda, erozijom, bacanjem neutrošenih preparata, i dr. (Šovljanski i Lazić, 2007).

Nakon dospeća pesticida u prirodne vodotokove, slično kao u zemljištu, njihova sudbina dalje zavisi od fizičko-hemijskih karakteristika vode, kao i samog pesticida. Smatra se da su fotodegradacija i hidroliza dva glavna abiotička procesa razgradnje pesticida u vodenim sredinama (Barceló i Hennion, 1997). Usled prisustva pesticida u vodi može doći do različitih promena boje, ukusa, mirisa, pH, biološke potrošnje kiseonika, pojave zamućenosti, kao i do promena vodenog živog sveta (brojnost, rast, reprodukcija).

Direktivom Evropske Unije (Directive 98/83/EC) koja se odnosi na kvalitet vode namenjene za javno snabdevanje, ostaci pesticida ograničeni su (ponaosob) na 0,1 µg/l, dok ova vrednost u slučaju aldrina, dieldrina, heptahlor i heptahlor epoksida iznosi 0,030 µg/l, a za ukupni sadržaj pesticida 0,5 µg/l. Kako bi se postojeći vodeni resursi održali i povećali, uvedena je Direktiva Evropske Unije o vodama (Directive 2000/60/EC), kojom se sprečava dalje pogoršanje, zaštićuje i poboljšava status vodenih ekosistema, promovise održivo korišćenje vode, smanjuje emisija zagađujućih supstanci. Na teritoriji Sjedinjenih Američkih Država kriterijumi za pijaću vodu regulisani su od strane US EPA (*US Environmental Protection Agency* - Agencija za zaštitu životne sredine SAD-a).

U Republici Srbiji sadržaji pesticida u površinskim i podzemnim vodama regulisani su *Uredbom o graničnim vrednostima zagađujućih materija u površinskim i podzemnim vodama i sedimentu i rokovima za njihovo dostizanje* (Službeni glasnik RS 50/2012) i *Uredbom o graničnim vrednostima prioritetnih i prioritetnih hazardnih supstanci koje zagađuju površinske vode i rokovima za njihovo dostizanje* (Službeni glasnik 24/2014). Maksimalno dozvoljene koncentracije za pojedine prioritetne i prioritetne hazardne supstance prema standardima kvaliteta životne sredine definisane su za pojedine pesticide kao što su alahlor, atrazin, hlorfenvinfos, hlorporifos, diuron, endosulfan, simazin, trifluralin i terbutrin u površinskim vodama i kreću se u opsegu od 0,01 mg/l do 4 mg/l (Službeni glasnik 24/2014). Prema standardima kvaliteta za podzemne vode, prosečna godišnja koncentracija pojedinačnih pesticida, uključujući njihove metabolite, produkte degradacije i reakcija ograničena je na 0,1 µg/l, dok ista vrednost za sumu svih individualnih pesticida iznosi 0,5 µg/l (Službeni glasnik RS 50/2012). Kvalitet vode koja se koristi za piće definisan je *Pravilnikom o higijenskoj ispravnosti vode za piće* (Službeni list SRJ 42/98 i 44/99). Prema navedenom Pravilniku

definisana je vrednost ukupne koncentracije pesticida od 0,5 mg/l, a regulisane su i koncentracije pojedinih pesticida (kao što su alahlor, aldrin, dieldrin, atrazin, DDT, ...). Poređenjem dozvoljenih vrednosti koncentracija pojedinih pesticida u vodi za piće treba naglasiti da su prema našem Pravilniku ove vrednosti hiljadu puta više u odnosu na Direktivu Evropske Unije (Directive 98/83/EC).

## 2.5 Insekticidi

Insekticidi su sredstva hemijskog ili biološkog porekla koja se koriste za suzbijanje ili sprečavanje delovanja insekata. Insekticidi predstavljaju veliku grupu jedinjenja i mogu se klasifikovati na nekoliko načina (Zgomba, 2014):

1. Prema fazi razvoja insekata u kojoj insekticidi deluju:
  - Ovicidi - za suzbijanje insekata u stadijumu jajeta;
  - Larvicidi - za suzbijanje insekata u stadijumu larve;
  - Adulticidi - za suzbijanje insekata u stadijumu odraslog.
2. Prema načinu delovanja:
  - Kontaktni - deluju na mestu dodira odnosno, kontakta s insektom ili biljkom;
  - Digestivni ili utrobni - deluju nakon unošenja u organizam ishranom i dospevanja u probavne organe gde manifestuju svoje delovanje;
  - Inhalacioni - deluju svojom gasovitom fazom nakon udisanja;
  - Regulatori rasta i razvoja insekata - utiču na metabolizam insekata, inhibicijom, ubrzavanjem, usporavanjem ili modifikovanjem pojedinih fizioloških procesa;
  - Repelentni - odbijaju insekte.
3. Prema hemijskom sastavu:
  - Organohlorni;
  - Organofosfati;
  - Karbamati;
  - Piretrini i piretroidi;
  - Neonikotinoidi;
  - IGR (regulatori rasta insekata).

Iako se najviše primenjuju u poljoprivredi, u zaštiti bilja i životinja, insekticidi se primenjuju i u domaćinstvima, kao i u očuvanju javnog zdravlja ljudi (kontrola termita, bubašvaba, komaraca, itd.).

### 2.5.1 Neonikotinoidi

Neonikotinoidi predstavljaju relativno novu grupu sintetskih insekticida. Naziv neonikotinoidi izveden je usled strukturnih sličnosti sa nikotinoidima, grupom jedinjenja koji se dugo koriste kao insekticidi. Prema mehanizmu delovanja, neonikotinoidi, uz veliku selektivnost i efikasnost, deluju na centralni nervni sistem insekata kao agonisti postsinaptičkih nikotinskih acetilholin receptora (Jeschke i Nauen, 2010). Zahvaljujući specifičnom mehanizmu delovanja, kod neonikotinoida mnogo je manja verovatnoća da kod štetnih insekata dođe do pojave unakrsne rezistentnosti, tako da je ova grupa insekticida ubrzo nakon svog pojavljivanja zamenila piretroide, organofosfate, karbamate, kao i druge grupe insekticida, pa se slobodno može reći da se otkriće neonikotinoida smatra prekretnicom u industriji insekticida (Jeschke i Nauen, 2010).

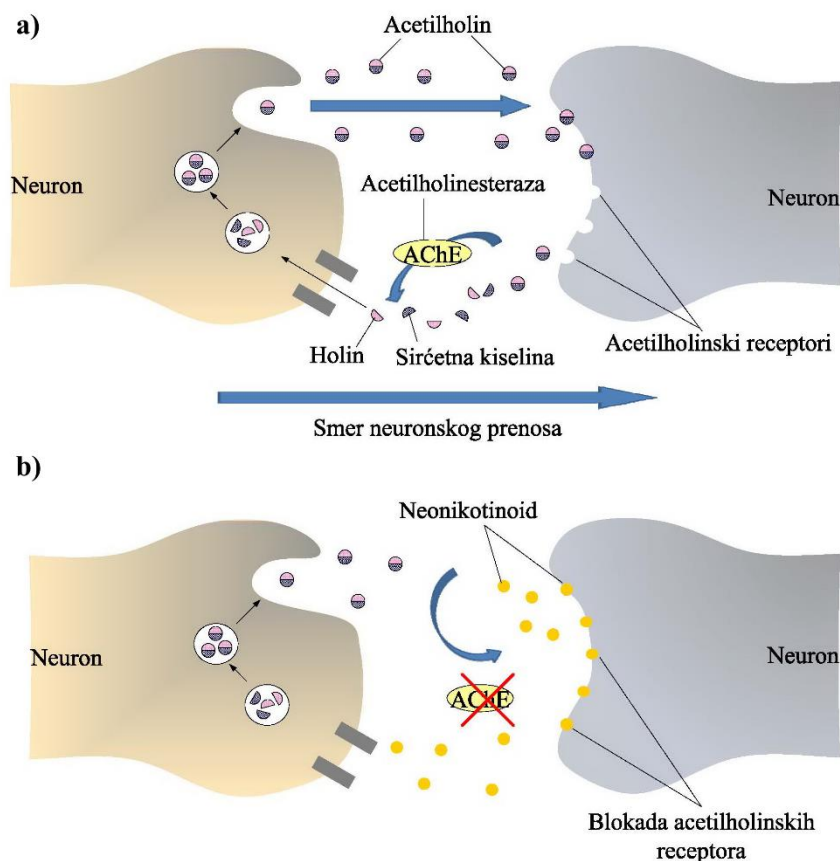
Neonikotinoidi imaju širok spektar delovanja, poseduju kontaktnu, digestivnu i sistematičnu aktivnost. Pogodni su za suzbijanje lisnih vaši, žičnjaka, kukuruzne pipe, kukuruzne i krompirove zlatice, repinog buvača i za kontrolu širenja (vektora) virusa. Koriste se u zaštiti velikog broja useva: žita, kukuruza, šećerne repe, kao i različitih vrsta voća i povrća (Janjić i Elezović, 2014; Saracco i sar., 2008). Usled male toksičnosti prema sisarima, koriste se i za suzbijanje štetočina u domaćinstvu, kao i u veterini (mrava, muva, termita i buva). Pored specifičnog delovanja, jedan od razloga široke upotrebe neonikotinoida predstavlja i mogućnost primene raznovrsnih aplikacionih tehnika: folijarno, tretiranjem semena ili zemljišta, što nije slučaj kod drugih grupa insekticida (Jeschke i sar., 2011). Tretiranje semena predstavlja izuzetno pogodnu tehniku kojom se oko semena stvara zaštitni omotač insekticida koji štiti seme dok je ono u zemlji. Putem korena neonikotinoidi dospevaju dalje u celu biljku štiteći je od ugriza, sisanja i žvakanja insekata. Ova tehnika u značajnoj meri smanjuje primenjenu količinu pesticida, a ne zavisi od vremenskih uslova koji vladaju tokom primene (Jeschke i sar., 2011).

Postsinaptički nikotinski acetilholin receptori su membranski proteini koji se nalaze na sinaptičkoj membrani, a iniciraju se vezivanjem neuro transmitera acetilholina, propuštajući

jone  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$ , što dovodi do stvaranja električnog impulsa. Acetilholin je estar koji nastaje kao produkt reakcije hidrolize pod dejstvom acetilholinesteraze. Nikotinski acetilholin receptori dobili su naziv po nikotinu, alkaloidu iz duvana, koji ih može aktivirati. Mehanizam delovanja neonikotinoidea zasniiva se na tome da oni, za razliku od acetilholina koji napušta receptor, ostaju trajno vezani, pa dolazi do prekida u prenosu signala, što dovodi do paralize i smrti kod insekata (Slika 2) (Goulson, 2013; Matsuda, i sar., 2009). Selektivno dejstvo neonikotinoidea ogleda se u različitim mestima vezivanja neonikotinoidea za nikotinske acetilholin receptore u nervnom sistemu kod kičmenjaka, za razliku od onih kod insekata (Simon-Delso i sar., 2015). Takođe, kod beskičmenjaka postoji mnogo veći broj nikotinskih receptora, koji pokazuju veliki afinitet prema neonikotinoidea, što i objašnjava mnogo veću toksičnost neonikotinoidea prema takvim organizmima (Tomizawa i Casida, 2005; Tomizawa i Casida, 2003). Iako su nikotini i neonikotinoidei strukturno slični, sa istim mehanizmom delovanja, njihova razlika ogleda se u jonizaciji pri fiziološkoj pH i ciljanom mestu delovanja. Naime, neonikotinoidei nisu jonizovani, i selektivni su prema nikotinskim acetilholin receptorima insekata, dok su nikotini jonizovani i selektivni prema nikotinskim acetilholin receptorima sisara (Tomizawa i Casida, 2003).

Otkriće neonikotinoidea vezuje se za sedamdesete godine prošlog veka, kada je otkrivena grupa nitrometilenskih heterocikličnih komponenata (2-(dibromo-nitrometil)-3- metil piridin), koje imaju mogućnost delovanja na nikotinske acetilholin receptore, pokazujući nizak stepen insekticidne aktivnosti prema određenim grupama insekata (Jeschke i Nauen, 2010). Optimizacijom hemijske strukture sintetisan je nitiazin (tetrahidro-2-(nitrometilen)-2H-1,3-tiazin), koji je pokazao veću efikasnost prema insektima od parationa, kombinovanu sa dobrim sistematskim ponašenjem kod biljaka i malom toksičnošću prema sisarima. Međutim, usled fotohemijske nestabilnosti, nitiazin se nije našao u komercijalnoj upotrebi. Daljom optimizacijom hemijske strukture sintetisan je imidakloprid kada započinje uspešna era neonikotinoidea. Poređenja radi, insekticidno delovanje novosintetizovanog jedinjenja imidakloprida je 10000 puta veće od nikotina (Jeschke i Nauen, 2010). Nakon proboja imidakloprida na svetsko tržište, mnoge druge kompanije razvile su sopstvene neonikotinoide. Pored imidakloprida prvu generaciju neonikotinoidea čine nitenpiram, acetamiprid i tiakloprid. Predstavnicima druge generacije su tiametoksam i klotianidin, dok dinotefuran čini treću generaciju neonikotinoidea. Iako je prvi predstavnik neonikotinoidea sintetisan u *Bayer* kompaniji, poslednjih godina Kina predstavlja lidera u proizvodnji neonikotinoidea, potrošnji, izvozu, kao i u istraživanju i razvoju novih neonikotinoidea. Predstavnicima najnovijih jedinjenja

iz ove grupe koji su razvijeni u Kini čine *imidaclothiz*, *guadipyr*, *huanyanglin*, *paichongding* i *cycloxaprid* (Shao i sar., 2013).



**Slika 2.** Mehanizam delovanja neonikotinoida: **a)** normalna transmisija, **b)** blokiranje acetilholinskih receptora neonikotinoida

Na osnovu hemijske strukture razlikujemo sledeće grupe neonikotinoida: nitroguanidine (imidaklopid, tiametoksam, klotianidin i dinotefuran), nitrometilene (nitiazin i nitenpiram) i N-cijanoimine (acetamiprid i tiaklopid) (Jeschke i Nauen, 2008). Nitenpiram, klotianidin, dinotefuran i acetamiprid su jedinjenja otvorenog lanca, dok ciklični neonikotinoidi mogu biti u obliku petočlanog (imidaklopid i tiaklopid) ili šestočlanog prstena (nitiazin, tiametoksam) (Jeschke i Nauen, 2008).

Zahvaljujući specifičnom mehanizmu delovanja, insekticidnoj aktivnosti širokog spektra pri malim dozama primene, u današnje vreme neonikotinoidi se koriste u više od 120

zemalja širom sveta pod različitim komercijalnim nazivima (Jeschke i sar., 2011; Jeschke i Nauen, 2010). Na tržištu Evropske Unije na listi aktivnih materija dozvoljenih za upotrebu nalaze se acetamiprid, imidaklopid, klotijanidin, tiaklopid i tiametoksam (EU Pesticides database, 2017), što je i u skladu sa listom odobrenih supstanci u Republici Srbiji (Službeni glasnik 49/2017).

Nakon primene, sudbina neonikotinoida u životnoj sredini zavisi od mnogih faktora kao što su količina i način primene, pH, temperatura, prisustvo ili odsustvo biljnog pokrivača, tip zemljišta, sadržaj organske materije, kao i korišćenje đubriva (Morrissey i sar., 2015). U literaturi se mogu naći različiti podaci o vremenu poluživota neonikotinoida u zemljištu, dobijeni na osnovu eksperimenata izvedenih pod različitim uslovima. U slučaju primene neonikotinoida tretiranjem semena, najduže vreme poluživota dobijeno je za klotijanidin (6931 dan), zatim sledi imidaklopid (1250 dana), dok je najkraće vreme poluživota za nitenpiram (svega 8 dana) (Goulson, 2013). Odsustvo biljnog pokrivača, primena formulisanih preparata, kao i upotreba đubriva bogatog organskom materijom produžavaju poluživot imidakloprida u zemljištu (Flores-Cespedes i sar., 2002; Rouchaud i sar., 1994). Neonikotinoidi nemaju visoku vrednost napona pare, što ukazuje na to da će nakon primene prskanjem ovi pesticidi biti kratko prisutni u gasovitoj fazi (Bonmatin i sar., 2015).

Generalno, najveći rizik po životnu sredinu primenom neonikotinoida predstavlja mogućnost kontaminacije površinskih i podzemnih voda, naročito ukoliko se takva voda koristi za piće. Osim fipronila, neonikotinoide karakteriše velika rastvorljivost u vodi, koja za nitenpiram dostiže i do 590 g/l (PPDB, 2017). Osim toga, niske vrednosti log  $K_{OW}$ , kao i niske vrednosti adsorpcionog koeficijenta (log  $K_{OC}$ ), ukazuju na mogućnost dospevanja u vodenu sredinu spiranjem i ispiranjem, te se samim tim njihov životni vek produžava (PPDB, 2017).

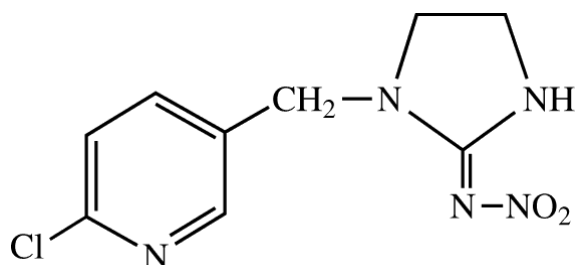
### **2.5.1.1. Imidaklopid**

Imidaklopid je prvi sintetski proizveden neonikotinoid (Slika 3). Otkriven je 1985. godine u *Bayer* kompaniji (Leverkuzen, Nemačka), kao insekticid jedinstvene hemijske strukture i veoma visoke insekticidne aktivnosti (Jeschke i Nauen, 2010).

Imidaklopid se primenjuje za suzbijanje lisne vaši, žičnjaka, kukuruzne zlatice, sive kukuruzne pipe, repinog buvača, krompirove zlatice, zelene breskvine vaši, u usevima žita, suncokreta, kukuruza, šećerne repe, krompira, paradajza, paprike, krastavca, lubenice i dinje,



jabučastih i koštičavih vrsta voćaka (Janjić i Elezović, 2014). Na tržištu Republike Srbije komercijalne formulacije imidakloprida dostupne su u vidu koncentrovanog rastvora (*Confidor 200, Gatgo 20, Kohinor 200, Macho 200, Mido 20, Salvador 200, Warrant 200*), uljne disperzije (*Confidor 200, Gatgo 20*), koncentrovane suspenzije (*Nuprid 200, Nuprid max, Kondor 350, Gaucho 600, Macho 600, Nuprid 600, Seedoprid 600, Pozitron*), vododisperznih granula (*Confidor 70, Lobo, Warrant 70*) i praška rastvorljivog u vodi (*Imidor 70*). Postoje i formulacije gde je imidaklopid dostupan u kombinaciji sa hlorpirifosom (*Primidex, Primidex forte*), gamacihalotrinom (*Warrant power*), lambdacihalotrinom (*Dospeh*), klotianidinom, tebukonazolom i protiokonazolom (*Yunta quattro*) (Službeni glasnik 49/2017).



**Slika 3.** Strukturna formula imidakloprida

Fizičko-hemijske karakteristike imidakloprida predstavljene su u Tabeli 3. Imidaklopid je kristalna supstanca bezbojne ili krem boje, u zavisnosti od čistoće. Odlikuje ga velika rastvorljivost u vodi i slaba isparljivost (Fossen, 2006; Roberts i Hutson, 1999).

Najbrži način razgradnje imidakloprida je fotodegradacijom (DT<sub>50</sub> 4,7 dana), a pored toga, i mikrobiološka degradacija u zemljištu ima važnu ulogu u njegovoj razgradnji (Sabourmoghaddam i sar., 2015; Roberts, 1999). Imidaklopid nema izraženu tendenciju vezivanja za zemljište i nakon primene može dugo opstati u zemljištu (Bonmatin i sar., 2005). Vreme poluživota varira široko u granicama od 100 do 1250 dana nakon primene (Baskaran i sar., 1999). U zavisnosti od uslova pod kojima su merenja izvedena (klimatski uslovi, prisustvo i vrsta biljnog pokrivača, načina primene imidakloprida), i drugi autori dobili su rezultate za vreme poluživota u približnim okvirima (Goulson, 2013; Fernández-Bayo, i sar., 2009; Bonmatin i sar., 2005), dok su znatno kraća vremena poluživota ovog insekticida zabeležena u Indiji (od 28 do 46 dana) (Sarkar, 2001). Dug poluživot u zemljištu omogućava kontinualnu dostupnost ovog insekticida za usvajanje od strane biljaka. Primarni produkti razgradnje

imidakloprida u zemljištu jesu: imidakloprid urea, 6-hidroksinikotinska kiselina, 6-hloronikotinska kiselina, a kao krajnji produkt razgradnje nastaje ugljen-dioksid (Rouchaud i sar., 1996) (Slika 4).

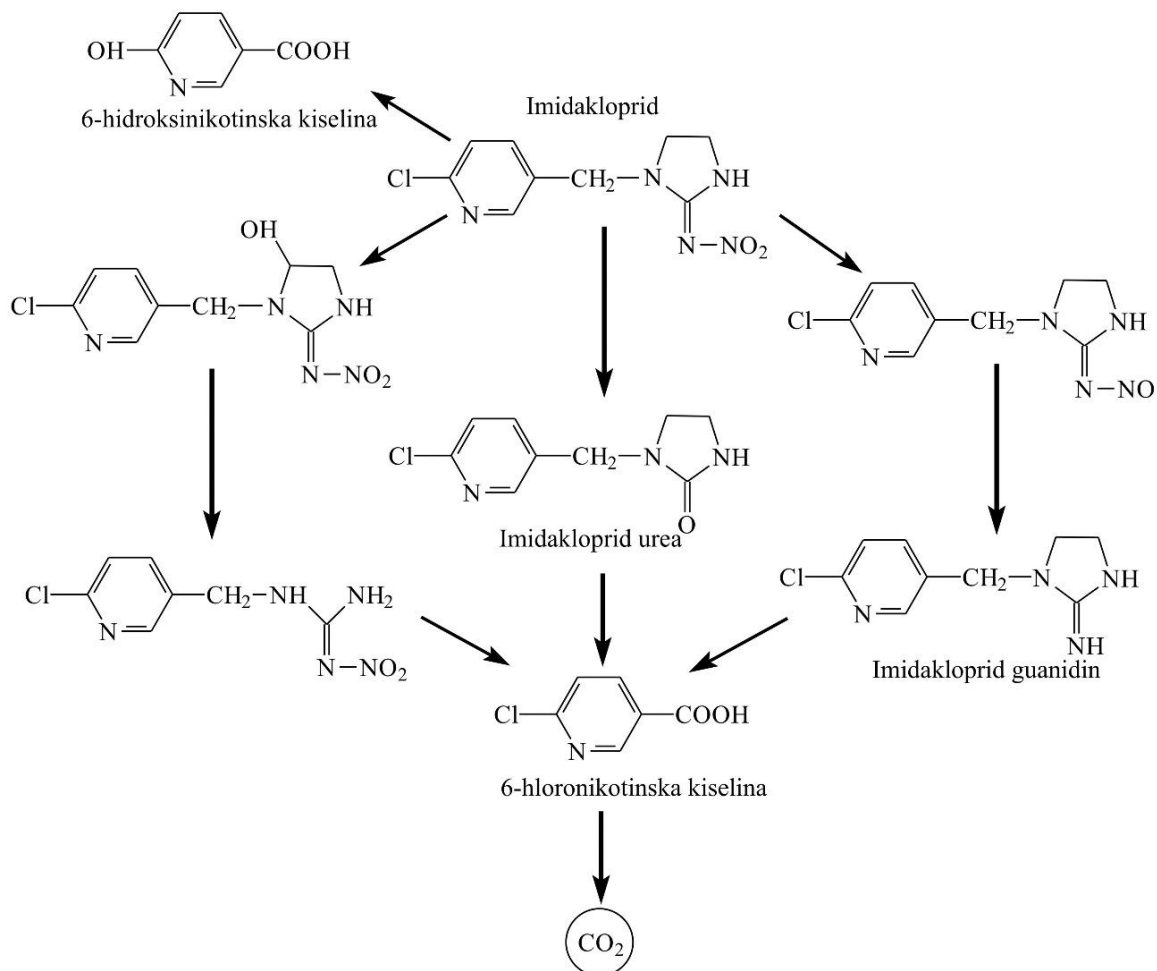
**Tabela 3.** Fizičko-hemijske karakteristike imidakloprida (PPDB, 2017)

Hemijski naziv (IUPAC)	<b>1-(6-hloro-3-piridilmetil)-2-nitroimino-imidazolidin</b>	
Molekulska formula	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> ClN <sub>5</sub> O <sub>2</sub>	
Molekulska masa (g/mol)	255,7	
Rastvorljivost u vodi (mg/l) na 20°C	610	
Rastvorljivost u organskim rastvaračima (mg/l) na 20°C	Dihlormetan	67000
	Toluen	690
	n-Heksan	100
	2-Propanol	2300
Napon pare (Pa) na 20°C	(2 – 4) x 10 <sup>-7</sup>	
log K <sub>oc</sub>	2,39	
log K <sub>ow</sub>	0,57	
GUS indeks	3,74	

Brzina razgradnje imidakloprida u vodenoj sredini u najvećoj meri zavisi od pH vrednosti i temperature, a njihovim povećanjem povećava se i brzina hidrolize (Bonmatin i sar., 2015; Thuyet i sar., 2013). Imidakloprid je hidrolitički stabilan u opsegu pH od 5 do 7. Vreme hidrolize pri pH 7 iznosi 182 dana, dok pri pH 10 iznosi 44,7 dana (Bonmatin i sar., 2015). Kada je inkorporiran u zemljište, vreme hidrolize može iznositi i do 229 dana (Fossen, 2006). Razlaganje imidakloprida u površinskim vodama odvija se uglavnom fotolizom, uz stvaranje: imidakloprid-uree, 6-hloronikotinaldehida i 6-hlor-N-metilnikotinamida, kao primarnih degradacionih produkata (Moza i sar., 1998; Rouchaud i sar., 1996) (Slika 5).

Dobra rastvorljivost u vodi, niska tendencija vezivanja za čestice zemlje, kao i GUS indeks, ukazuju da imidakloprid ima potencijal ka ispiranju, te samim tim može dospeti u površinske i podzemne vode (Bonmatin i sar., 2015; Morrissey i sar., 2015). Ovde treba naglasiti da komercijalne formulacije pesticida koje se koriste u poljoprivredi sadrže i određene pomoćne supstance (npr. surfaktanti) koje, između ostalog, imaju za cilj da povećaju

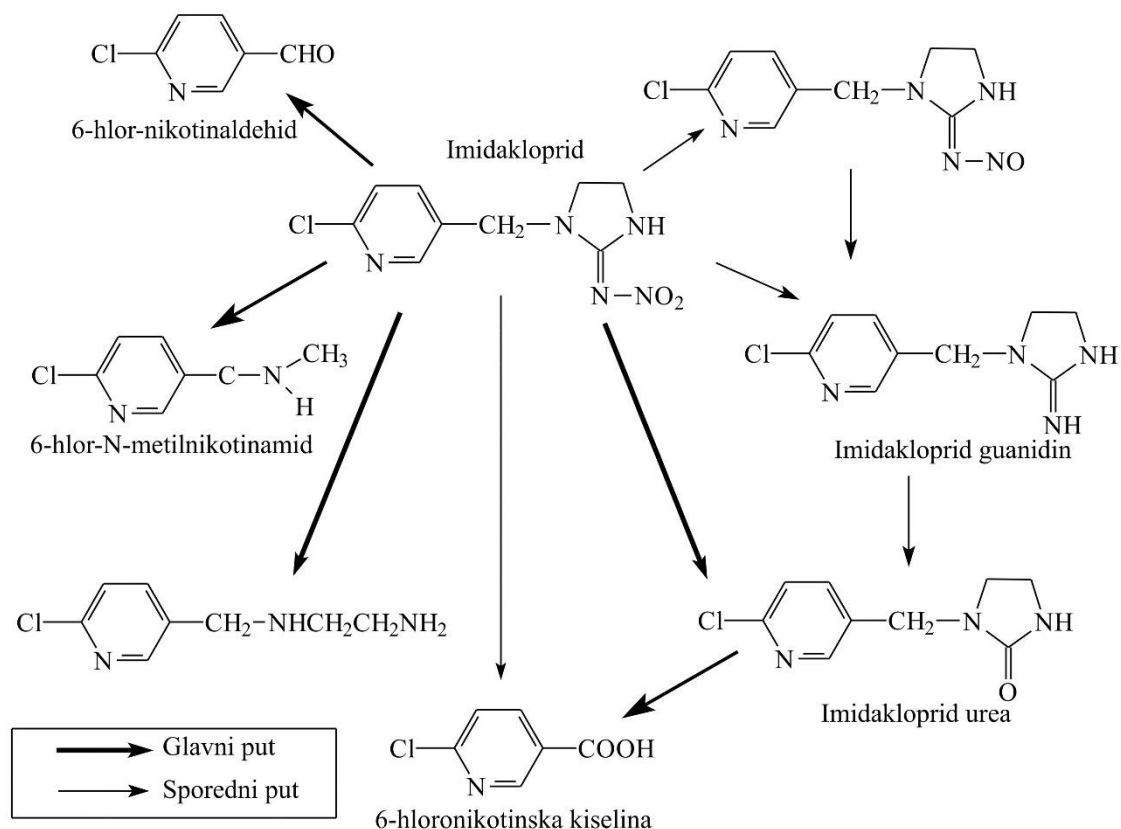
rastvorljivost aktivne supstance, ili da održavaju aktivnu materiju u rastvorenoj fazi duže vreme. Na ovaj način komercijalne formulacije pesticida imaju veći potencijal za ispiranje nego sama aktivna materija, što je dokazano i u slučaju imidakloprida (Gupta i sar., 2002).



**Slika 4.** Degradacija imidakloprida u zemljištu

Pored tendencije ka ispiranju, smatra se da je i spiranje, naročito nakon obilnijih padavina jedan od načina dospevanja imidakloprida u vodene sredine (Lamers i sar., 2011; Armbrust i Peeler, 2002). Uopšteno posmatrano, sve karakteristike koje imaju uticaja na poluživot imidakloprida u zemljištu utiču i na ispiranje imidakloprida u podzemne vode. U odsustvu svetlosti, imidakloprid može ispiranjem dospeti u zemljište do dubine od 105 cm (Felsot et al., 1998), i do koncentracija od 1 do 250  $\mu\text{g/l}$  (Larsbo i sar., 2013; Felsot i sar., 1998). Shodno tome, u nekoliko studija imidakloprid je detektovan u uzorcima podzemne vode u

koncentracijama od 0,22 do 3,34  $\mu\text{g/l}$  (Huseth i Groves, 2014; Lamers i sar., 2011). Iz podzemnih voda, neonikotinoidi mogu ulivanjem dospeti do površinskih voda.



**Slika 5.** Degradacija imidakloprida u vodi

Najveća koncentracija imidakloprida u uzorcima površinske vode izmjerena je u Holandiji, u blizini poljoprivrednih površina, gde je njegova koncentracija iznosila 320  $\mu\text{g/l}$  (Van Dijk i sar., 2013). U Kanadi, imidakloprid je određivan u različitim uzorcima površinske i podzemne vode, a najveća koncentracija ovog neonikotinoida od 11,9  $\mu\text{g/l}$  izmjerena je u površinskim vodama nakon obilnih padavina u blizini poljoprivrednih useva gde se uzgaja krompir (Denning i sar. 2004 u CCME, 2007). U Australiji, određivani su različiti neonikotinoidi u uzorcima rečne vode, a koncentracija imidakloprida dostizala je vrednost od 4,6  $\mu\text{g/l}$  (Sánchez-Bayo i Hyne, 2014). U Kaliforniji, 89% uzoraka površinske vode uzorkovanih sa poljoprivrednih površina sadržalo je imidakloprid u koncentraciji do 3,29  $\mu\text{g/l}$  (Starner i Goh, 2012). U principu, kontaminacija imidaklopridom najčešća je kod uzoraka površinske vode koji se nalaze u blizini poljoprivrednih useva, a u retkim slučajevima do

kontaminacije može doći i u urbanim zonama (Sánchez-Bayo i Hyne, 2014). Uopšteno, nakon dospevanja u površinske vode, maksimalna koncentracija neonikotinoidea ispoljava se u toku prva 24 h nakon primene, zatim sledi faza intenzivne razgradnje u sledećih nekoliko dana, praćena nešto sporijom drugom fazom (Armbrust i Peeler, 2002). Brza inicijalna disipacija imidakloprida u vodi može se objasniti razblaživanjem, fotolizom, mikrobiološkom degradacijom, usvajanjem od strane biljke i u mnogo manjoj meri adsorpcijom (Morrissey i sar., 2015). Iako je vreme poluživota imidakloprida u vodi relativno kratko (nekoliko dana), koncentracije od 0,1 do 0,2 µg/l detektovane su u uzorcima vode godinu dana nakon primene ovog insekticida (La i sar., 2015; Kanrar i sar., 2006), što potvrđuje da je pod određenim uslovima i uz korišćenje komercijalnih formulacija pesticida imidakloprid postojan u vodenoj sredini (Guzsvány i sar., 2006; Sarkar i sar., 2001).

Uzimajući u obzir široki opseg upotrebe imidakloprida, njegovo dugo vreme poluživota u zemljištu, mogućnost ispiranja, kao i sistematsko delovanje unutar biljaka, nema sumnje da će i veliki broj drugih organizama koji naseljavaju obradive površine, kao što su ptice, vodeni organizmi i insekti, biti izložen ovom insekticidu. Imidakloprid je veoma toksičan za pčele,  $LD_{50} = 8$  ng/pčeli (Fossen, 2006), pri čemu doze variraju u zavisnosti od načina izlaganja i podvrste pčele (Suchail i sar., 2000). Smatra se da je imidakloprid toksičniji oralno u malim dozama tokom dužeg vremenskog perioda,  $LD_{50} = 0,01 - 1,0$  ng/pčeli (Suchail i sar., 2001). Izloženost pčela najčešće nastaje usled blizine košnica i obradivih useva tretiranih imidaklopridom, usled čega može doći do oštećenja legla i gubitaka pčela, kao i do kontaminacije pčelinjih proizvoda (Rennich i sar., 2014; Sanchez-Bayo i Goka, 2014; Dively i Kamel, 2012; Pareja i sar., 2011). Stoughton i saradnici (2008) navode da hronično izlaganje vodenih beskičmenjaka imidaklopridu dovodi do smanjenja rasta i broja jedinki, a predstavlja veliki rizik i za druge vrste vodenih insekata (Roessink i sar., 2013). Za razliku od imidakloprida, koji se kao čista supstanca najčešće koristi u toksikološkim ispitivanjima, intenzivnija toksičnost kod algi, dafnija i riba uočena je korišćenjem formulisanog tečnog preparata *Confidor 200* (Tišler i sar., 2009).

Iako imidakloprid ima nisku toksičnost kod kičmenjaka, životinje koje se hrane semenom tretiranim imidaklopridom često mogu biti izložene letalnim dozama ovog insekticida. Procena je da 1% posejanog semena nije pravilno pohranjeno pod zemlju, već ostaje dostupno životinjama na površini, a često može doći i do slučajnog prosipanja tokom setve (Lopez-Antia i sar., 2015). Pod takvim okolnostima kod životinja često može doći do ingestije tretiranog semena u većoj količini u kraćem vremenskom intervalu. Letalna doza za

domaće vrste ptica može nastati ingestijom manje od pet semenki tretiranih imidaklopridom (Goulson, 2013; Mineau i Palmer, 2013). Lopez-Antia i sar. (2013) hranili su prepelice vrste *Alectoris rufa* semenom tretiranim imidaklopridom, a nakon deset dana smrtnost među populacijom iznosila je 58%. Pored ovog, postoji i mnogo drugih istraživanja o smrtnosti ptica usled ingestije semena tretiranog imidaklopridom (Mineau i Palmer, 2013; Bro et al., 2010; Berny, i sar., 1999; De Snoo i sar., 1999). Imidakloprid je umereno toksičan za sisare, oralna doza LD<sub>50</sub> za pacove iznosi 424 mg/kg (PPDB, 2017). Prema kriterijumima Evropske Unije imidakloprid je svrstan kao štetna supstanca, koji je opasan za životnu sredinu i veoma toksičan za vodene organizme (Directive 98/8/EC).

Metabolizam imidakloprida ispitan je i kod različitih vrsta životinja. Kod pacova, imidakloprid se brzo apsorbuje iz gastrointestinalnog trakta, a 96% od ukupne količine izlučuje se nakon 48 h, od toga 75% fecesom, a 21% urinom (Roberts i Hutson, 1999). Glavni metaboliti nađeni u urinu su 6-hloronikotinska kiselina, kao i produkt nastao konjugacijom 6-hloronikotinske kiseline sa glicinom (Tomizawa i Casida, 2005).

## 2.6 Herbicidi

Herbicidna svojstva neorganskih jedinjenja (fero-sulfat, bakar-sulfat, natrijum-nitrat, amonijum-sulfat, i dr.) zapažena su krajem XIX veka. Otkriće selektivnih herbicida vezuje se za razvoj prirodnih nauka i predstavlja jedno od najvećih pronalazaka u poljoprivredi. Od tada je sintetisan veliki broj organskih jedinjenja koja su našla široku primenu u poljoprivredi.

Herbicidi su jedinjenja koja se koriste za uništavanje korovskih biljaka. Naziv ove grupe pesticida potiče od latinske reči *herba* što znači trava i *cedere* ubiti. Primena herbicida veoma je složen zadatak, jer pored delovanja na korov, herbicidi deluju i na gajene biljke, te se nepravilnom upotrebom gajenim biljkama može naneti veća šteta od one koje bi naneo korov svojim prisustvom. Za pravilnu primenu herbicida neophodno je poznavati njegove osnovne karakteristike, delovanje na gajenu i korovsku biljku.

Herbicidi se mogu klasifikovati prema različitim kriterijumima. Prema hemijskom sastavu razlikujemo organska i neorganska jedinjenja. Prema karakteru delovanja herbicidi se mogu podeliti na totalne i selektivne. Totalni herbicidi uništavaju sve biljke, a najčešće se

koriste za uništavanje vegetacije pored železničkih pruga, puteva, kanala, na aerodromima, itd. Osnovna karakteristika selektivnih herbicida je da uništavaju samo korovske biljke, dok za gajene biljke nisu toksični. Prema načinu delovanja razlikujemo kontaktne i translokacione herbicide. Herbicidi kontaktnog delovanja deluju pri neposrednom kontaktu sa biljkom, pri čemu ne prodiru u unutrašnjost biljke, već uništavaju samo delove biljke koji su došli u kontakt sa herbicidom. Translokacioni ili sistemski herbicidi, usvajaju se preko biljnih organa (lista ili korena), prenose se putem sprovodnog sistema (floem, ksilem ili ćelijski protoplast), a zatim dospevaju do mesta delovanja i dovode do uginuća biljke.

U zavisnosti od vremena primene, razlikujemo herbicide koji se primenjuju pre setve (*presowing*), pre nicanja (*preemergence*) i nakon nicanja (*postemergence*). Primena herbicida pre nicanja predstavlja najčešći način suzbijanja korova, pri čemu se herbicid primenjuje u vremenskom periodu od setve do pred nicanje.

Prema mehanizmu delovanja herbicidi se mogu klasifikovati na sledeće grupe:

- inhibicija biosinteze aminokiselina;
- inhibicija biosinteze masnih kiselina;
- inhibicija fotosinteze;
- inhibicija biosinteze pigmenata;
- inhibicija deobe ćelija;
- inhibicija aktivnosti auksina.

Kako su fiziološki procesi u biljci veoma složeni i međusobno povezani, isti herbicidi mogu se prema mehanizmu delovanja svrstati u različite grupe, tako da se njihov efekat ispoljava na dva ili više mesta unutar biljke.

Kao i kod insekticida, kontinuiranom upotrebom određene vrste herbicida na istom zemljištu i kod pojedine vrste korova može se razviti otpornost na herbicide. U zavisnosti od vrste herbicida i korova, rezistentnost može da se razvije u periodu od 5 do 20 godina. Usled toga je kombinacija različitih vrsta preparata, rotacija useva, uz stručni nadzor od izuzetne važnosti u prevenciji rezistentnosti.

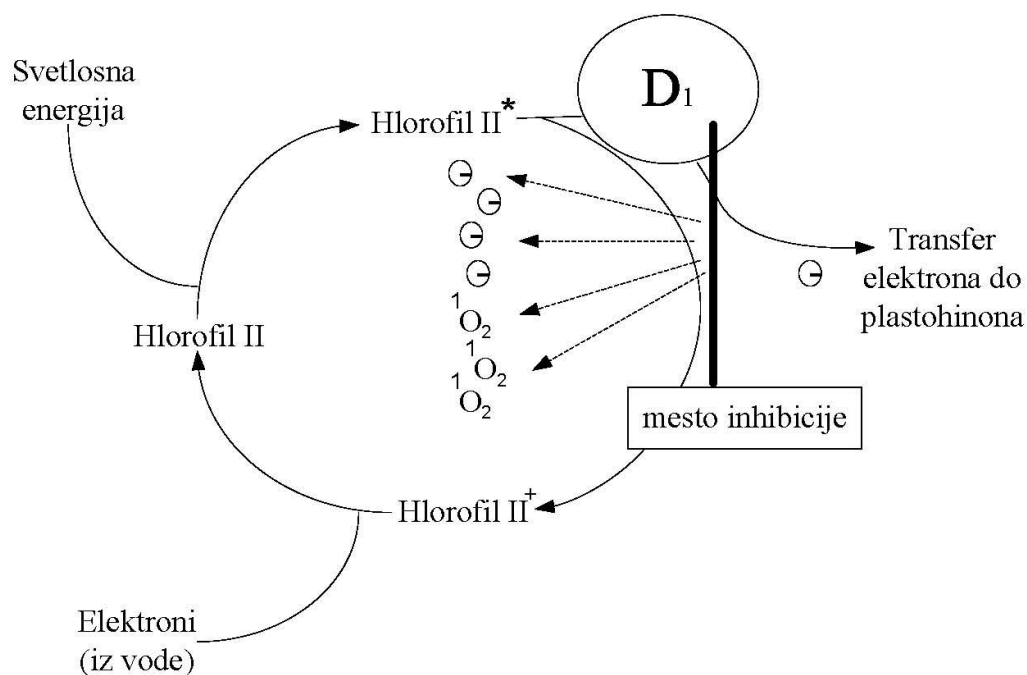
### 2.6.1 Triazini

Triazini predstavljaju grupu herbicida otkrivenu 1952. godine u Švajcarskoj. Simetrin i atrazin su među prvim predstavnicima ove grupe jedinjenja. U današnje vreme triazini su registrovani u više od 100 zemalja širom sveta, a ključni su u proizvodnji više od 50 useva (LeBaron i sar., 2008). Triazini se mogu podeliti na četiri grupe jedinjenja:

- hlorotriazini (atrazin, simazin, propazin, terbutilazin i cijanazin);
- metiltiotriazini (ametrin, prometrin i terbutrin);
- metoksitriazini (prometon i sekbumeton);
- asimetrični triazini, ili 1,2,4-triazinoni (metribuzin i metamitron).

Asimetrične triazine čine metamitron i metribuzin, a najznačajnija strukturna razlika između ova dva herbicida predstavlja prisustvo S-metil grupe kod metribuzina, za razliku od metil grupe metamitrona. Koriste se za suzbijanje trava i širokolisnih korova, a mogu se primenjivati pre ili nakon setve. Prema mehanizmu delovanja, oba predstavnika ove grupe jedinjenja inhibiraju proces fotosinteze II. Ovaj mehanizam zasniva se na prekidu transfera elektrona do molekula plastohinona, a odvija se vezivanjem inhibitora za specifičan protein D<sub>1</sub>, koji reguliše transfer elektrona. Naime, u procesu fotosinteze hlorofil apsorbuje svetlost (fotone), pa elektroni na spoljnoj orbitali usled primljene energije prelaze u ekscitovano stanje. Ekscitovani elektroni napuštaju hlorofil, pri čemu nastaje pozitivno naelektrisan jon hlorofila. Prema tome, hlorofil može da se nalazi u tri stanja: osnovno stanje u kojem može da primi svetlosnu energiju, ekscitovani molekul koji predstavlja veoma jak redukujući agens i pozitivno naelektrisan jon koji predstavlja veoma jak oksidans. Oksido-redukujuća snaga molekula hlorofila koristi se za stvaranje ATP, NADPH i kiseonika. Blokiranje prelaza elektrona od ekscitovanog molekula hlorofila do plastohinona od strane herbicida dovodi do stvaranja veoma reaktivnog singletnog kiseonika, koji dalje pokreće lančane reakcije degradacije masnih kiselina, lipida i proteina, a kao krajnji rezultat delovanja dolazi do potpune nekroze (Stenersen, 2004) (Slika 6).

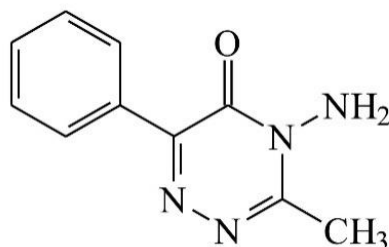




**Slika 6.** Blokiranje prelaza elektrona od ekscitovanog molekula hlorofila

### 2.6.1.1 Metamitron

Metamitron (Slika 7) je otkriven u nemačkoj kompaniji *Bayer* 1970-tih godina pod nazivom *Goltix*, gde je trenutno i jedan od najprodavanijih herbicida (BVL, 2015; Heri i sar., 2008).



**Slika 7.** Strukturna formula metamitrona

Koristi se u zaštiti useva cvekle, stočne repe, blitve, kao i kod određenih sorti jagoda (Roberts, 1998). U Republici Srbiji, primena metamitrona ograničena je na useve šećerne repe (Janjić i Elezović, 2014), a odnedavno, ovaj herbicid se može primenjivati i za proređivanje plodova jabuke (Stern, 2015; Stevanović i sar., 2015; Stern, 2014). Na tržištu naše zemlje dostupan je u vidu vodorastvorljivih granula (*Brevis*), kvašljivog praška (*Goltisav 70*), koncentrovane suspenzije (*Goltix 70*, *Goltix gold*, *Hemomitron*, *Korida*, *Metak 700*, *Metafol 700*, *Metix*, *Target*, *Viking 700*) i vododisperzibilnih granula (*Goltix 70*, *Metabeet 70*, *Betamet 90*) (Službeni glasnik 49/2017).

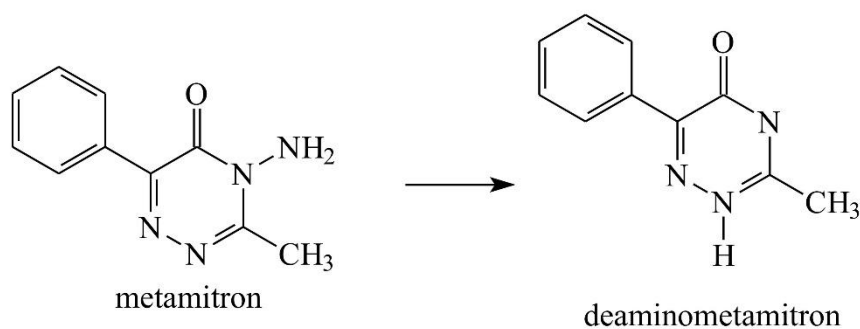
Metamitron je žuta kristalna supstanca. Karakteriše ga velika rastvorljivost u vodi od 1,77 g/l, kao i relativno niska vrednost napona pare (Tabela 4), što ukazuje na veoma blagu tendenciju ka isparavanju (Cessna, 2008). Po karakteristikama je selektivni, sistemični herbicid, biljka ga usvaja preko korena, gde inhibira proces fotosinteze.

**Tabela 4.** Fizičko hemijske karakteristike metamitrona

Hemijski naziv (IUPAC)	<b>4-amino-4,5-dihidro-3-metil-6-fenil-1,2,4-triazin-5-on</b>	
Molekulska formula	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O	
Molekulska masa (g/mol)	202,21	
Rastvorljivost u vodi (mg/l) na 20°C	1770	
Rastvorljivost u organskim rastvaračima (mg/l) na 20°C	Aceton	37000
	Ksilen	2000
	Etil-acetat	20000
	Dihlorometan	33000
Napon pare (mPa) na 25°C	7,44 x 10 <sup>-4</sup>	
log K <sub>ow</sub>	0,83	
GUS index	2,64	

Metamitron se u zemljištu, vodi i kod biljaka u najvećoj meri razgrađuje fotohemijskom i mikrobiološkom deaminacijom (Cox i sar., 1996a; Engelhardt i Wallnöfer, 1978). Fotodegradacija metamitrona u vodenom rastvoru je brz proces; nakon 4 h više od 90% metamitrona se razgrađuje, pri čemu je glavni fotoprodukt ove reakcije dezaminometamitron (Slika 8) (Roberts, 1998; Olmedo i sar., 1994; Rosen i Siewierski, 1971). Degradacija

metamitrona u zemljištu odvija se nakon 4 - 6 nedelja (Roberts, 1998), a nakon učestale primene degradacija se može odvijati i znatno brže, odnosno nekoliko dana nakon primene (Mamy i sar., 2005; Vischetti i sar., 1999). Dok temperatura, tekstura i sadržaj vlage u zemljištu imaju značajan uticaj na degradaciju metamitrona u zemljištu, uticaj pH i sadržaja organske materije je mnogo manji (Janaki i sar., 2013; Führ i Mittelstaedt, 1979). Takođe u studiji koju su sproveli Muszyński i Brodowska (2014), dokazano je da pojedini katjoni iz đubriva ( $K^+$ ,  $NH_4^+$ , i  $Ca^{2+}$ ) imaju uticaja na adsorpciju metamitrona u zemljištu. Naime, dok  $K^+$  i  $NH_4^+$  povećavaju adsorpciju, prisustvo  $Ca^{2+}$  jona smanjuje adsorpciju metamitrona u zemljištu. Što se tiče puta razgradnje u zemljištu, pojedine vrste bakterija koriste ga kao izvor ugljenika, za sintezu proteinskih ćelijskih komponenata i ugrađuju ga u organsku materiju zemljišta kao netoksične biogene ostatke, pri čemu dolazi do njegove kompletne detoksikacije (Wang i sar., 2017).



**Slika 8.** Degradacija metamitrona u zemljištu, biljakama (šćernojoj repi) i vodi fotolizom

Metamitron je stabilan u kiseljoj sredini; spor proces hidrolize odvija se u intervalu pH od 4 do 7. Izračunata vremena poluživota pri datim pH vrednostima iznose redom 353,2 i 479,6 dana (EFSA, 2008). Hidrolitička degradacija pri pH 9 znatno je brža, a vrednosti poluživota kreću se od 8,5 do 9,5 dana (EFSA, 2008; Roberts, 1998). Ipak, u poređenju sa fotolizom i biodegradacijom, smatra se da hidroliza ima neznatnu ulogu u disipaciji metamitrona, ali može biti značajna u vodenim sredinama sa većom pH vrednošću.

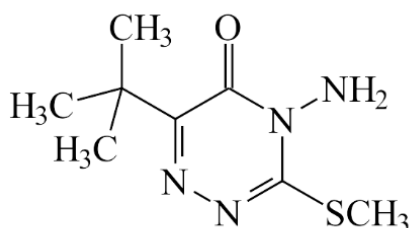
Metamitron se slabo adsorbuje za mineralnu i organsku materiju, što ga čini veoma mobilnim u zemljištu (Mamy i Barriuso, 2007; Autio i sar., 2004; Cox i sar., 1996b), a uz to velika rastvorljivost u vodi ukazuje na mogućnost da ispiranjem dospe do površinskih i podzemnih izvora vode (Schipper i sar., 2008; Carafa i sar., 2007; Autio i sar., 2004). U

studijama koje su sprovedene na uzorcima površinskih i podzemnih voda, sadržaj metamitrona iznosio je do 4,4 µg/l (Moschet i sar., 2015; Rosenbom i sar., 2015; Kreuger i sar., 2010; Jiménez i sar., 1997; Spliid i Køppen, 1996).

U organizmu se metamitron brzo apsorbuje, a više od 90% izlučuje se tokom 48 sati preko urina i fecesa. Metabolizam metamitrona uključuje deaminaciju, praćenu reakcijama hidrosilacije, oksidacije i konjugacije. Glavni metaboliti metamitrona nađeni u urinu i fecesu pacova su metamitron-triazinium, sirćetna kiselina, metamitron-4-hidroksi-deamino, metamitron-3-hidroksi-deamino i deamino-metamitron (EFSA, 2008). Karakteriše ga umerena oralna toksičnost (LD<sub>50</sub> iznosi 1183 mg/kg) i veoma mala toksičnost ako se unese dermalnim putem (LD<sub>50</sub> > 5000 mg/kg) (EFSA, 2008).

### 2.6.1.2 Metribuzin

Metribuzin (Slika 9) je sintetisan 1970. godine u *Bayer* kompaniji, a na tržištu je plasiran pod imenom *Sencor* (Heri et al., 2008).



**Slika 9.** Strukturna formula metribuzina

Prvobitno je korišćen u zaštiti krompira, zatim soje, a u današnje vreme koristi se i u usevima šećerne repe, lucerke, paradajza, asparagusa, kukuruza i žitarica, kao i u zaštiti travnatih površina koje se koriste za sportske namene (Roberts, 1998).

Na tržištu Republike Srbije, metribuzin je dostupan u obliku vododisperznih granula (*Bevekor*, *Buzzin 70*, *Dancor 70*, *Lord 700*, *Metriphar 700*, *Mistral*, *Sencor 70*, *Tribute 70*, *Velton*), koncentrovane suspenzije (*Sencor plus*), kvašljivog praška (*Tor 70*, *Velton WG*)

(Službeni glasnik 49/2017), a koristi se u usevima krompira, soje, paradajza i lucerke (Janjić i Elezović, 2014).

Metribuzin je selektivni, translokacioni herbicid. Nakon aplikacije usvaja se korenom i listom i transportuje u nadzemne delove biljke. Nije postojan u atmosferi; izračunato vreme degradacije je manje od 24 h (EFSA, 2006). U obliku je belih kristala, blago sumpornog mirisa, a karakteriše ga dobra rastvorljivost u vodi (Tabela 5).

**Tabela 5.** Fizičko-hemijske karakteristike metribuzina (PPDB, 2017; Roberts, 1998)

Hemijski naziv (IUPAC)	4-amino-6-tert-butil-4,5-dihidro-3-metiltio-1,2,4-triazin-5-on	
Molekulska formula	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> OS	
Molekulska masa (g/mol)	214,29	
Rastvorljivost u vodi (mg/l) na 20°C	1165	
Rastvorljivost u organskim rastvaračima (mg/l) na 20°C	n-heptan	820
	Ksilen	60000
	Etil acetat	250000
	Aceton	449400
Napon pare (mPa) na 25°C	0,121	
K <sub>oc</sub>	0,6 - 31,7	
log K <sub>ow</sub>	1,575	
GUS index	2,57	

Uzimajući u obzir strukturnu sličnost sa metamitronom, deaminacija predstavlja glavnu reakciju razgradnje metribuzina u životnoj sredini, kao i kod biljaka, a glavni metaboliti koji nastaju ovim putem su diketo-metribuzin i deamino-diketo-metribuzin (Simoneaux i Gould, 2008; EFSA, 2006; Roberts, 1998). Reakcija deaminacije važna je i za fitotoksičnost metribuzina i brže se odvija kod tolerantnih biljaka, usled čega manja količina metribuzina dospeva do lišća tolerantne biljne vrste (Roberts, 1998). Mikrobiološka degradacija metribuzina predstavlja primarni proces njegove degradacije, a predmet je izučavanja mnogih studija, te su detaljno i ispitani brojni faktori koji na nju imaju uticaja. Poluživot metribuzina smanjuje se povećanjem pH zemljišta, a povećava se povećanjem dubine uzorkovanja (Ladlie i sar., 1976), kao i smanjenjem temperature (Hyzak i Zimdahl, 1974). Takođe, prisustvo useva smanjuje

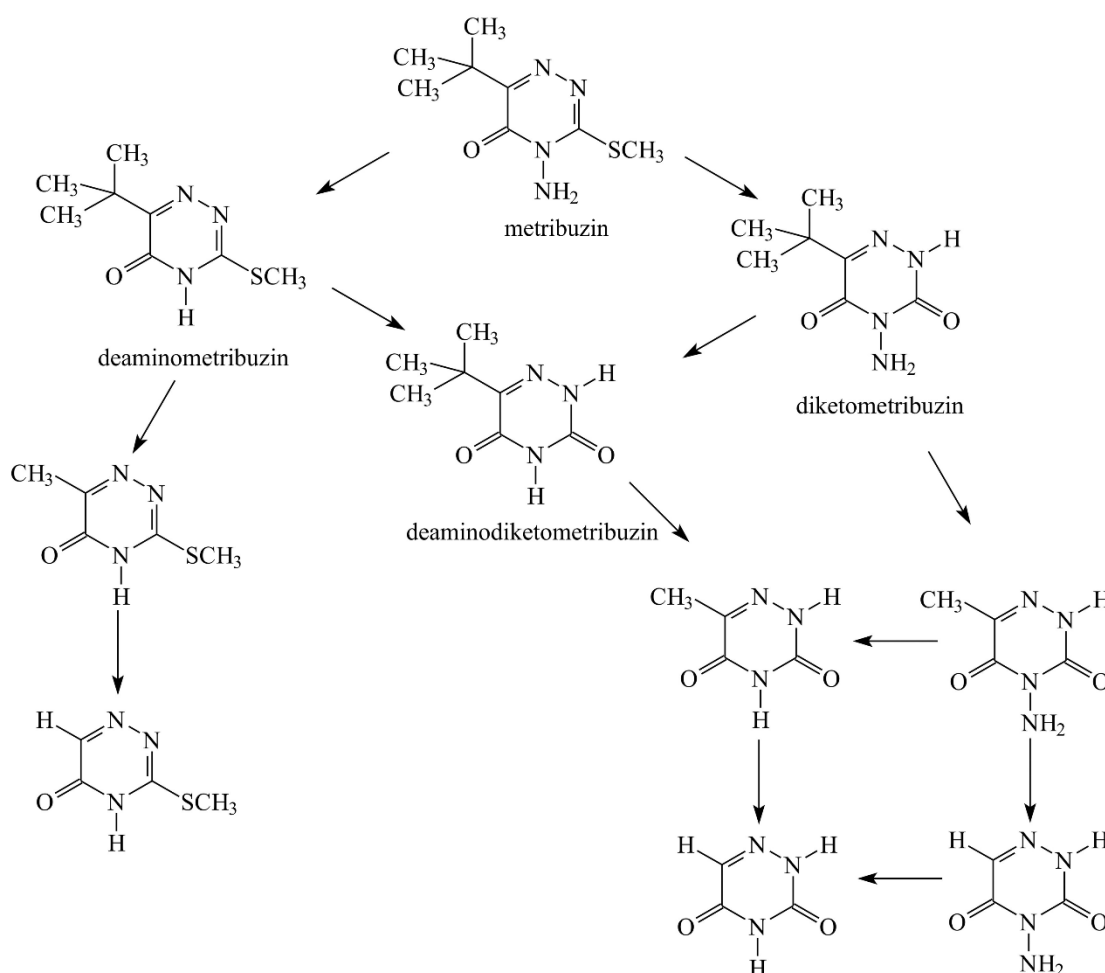
brzinu disipacije metribuzina, što može biti i posledica većeg sadržaja vlage u zemljištu (Gallaher i Mueller, 1996). Istraživanjem uticaja sadržaja organske materije u zemljištu na brzinu degradacije, utvrđeno je da se povećanjem sadržaja organske materije povećava i brzina mikrobiološke razgradnje, jer se na taj način povećava i rast mikroorganizama (Khoury i sar., 2006). Procenjeno je da vreme poluživota metribuzina u zemljištu iznosi od 16 do 377 dana (Roberts, 1998; Savage, 1977; Ladlie i sar., 1976; Hyzak i Zimdahl, 1974). Krajnji produkt mikrobiološke degradacije je ugljen-dioksid (EPA, 2003). Veoma slaba adsorpcija metribuzina uočena u dva različita tipa zemljišta (peskovitom i glinenom), ukazuje na veliku mobilnost ovog herbicida u zemljištu nakon primene, a klasifikovan je i kao potencijalni kontaminant podzemnih voda (PPDB, 2017; EFSA, 2006; Khoury i sar., 2006; Khoury i sar., 2003).

Pod uslovima koji vladaju u prirodnoj sredini (blago bazna ili kisela sredina, temperatura od oko 20°C) metribuzin je hidrolitički stabilan. U veoma kiseloj sredini i temperaturi od 37°C, metribuzin se veoma brzo razgrađuje, vreme poluživota iznosi 6,7 h, dok je u neutralnoj sredini najstabilniji, na 70°C vreme poluživota iznosi 47 dana (Roberts, 1998). Proces fotolize metribuzina u vodi odvija se veoma brzo, vreme poluživota iznosi manje od jednog dana. Glavni produkt fotodegradacije je deaminovani oblik metribuzina, a zatim daljim reakcijama dolazi do stvaranja diketometribuzina (DK-metribuzin) i deaminodiketometribuzina (DADK-metribuzin) (Cessna, 2008) (Slika 10).

Sadržaj ovog herbicida u uzorcima površinske i podzemne vode bio je predmet izučavanja mnogih studija, a česti su slučajevi i kada je njegov sadržaj prelazio zakonsku normu od 0,1 µg/l (Rosenbom i sar., 2015; Tagert i sar., 2014; Dores i sar., 2008; Haarstad i Ludvigsen, 2007; Rebich i sar., 2004; Cerejeira i sar., 2003; Kolpin i sar., 2000; Lawrence i sar., 1993; Hallberg, 1989). Najveći sadržaji određeni su u uzorcima podzemnih voda i to 33 µg/l (Haarstad i Ludvigsen, 2007), a posebno treba izdvojiti uzorke podzemne vode u Viskonsinu, gde je maksimalna koncentracija metribuzina iznosila 940 µg/l (Hallberg, 1989). U uzorcima površinskih voda najveći sadržaj ovog herbicida izmeren je u rečnim vodama od 2,1 µg/l (Tagert i sar., 2014). Usled fotolize sadržaji metribuzina su znatno niži u površinskim vodama u odnosu na podzemne.

Metribuzin se brzo i skoro u potpunosti apsorbuje u organizmu 36 h nakon oralnog unošenja, a više od 95% izlučuje se 72 h nakon unošenja (EFSA, 2008). Oralnim unosom metribuzin je umereno toksičan (LD<sub>50</sub> 322 mg/kg), a karakteriše ga niska dermalna (LD<sub>50</sub> > 5000 mg/kg) i inhalaciona toksičnost (LD<sub>50</sub> > 2,0 mg/l) (EFSA, 2008). Ne dovodi do

iritacije kože i očiju, a klasifikuje se kao štetan ukoliko dođe do gutanja (EFSA, 20008). Iako je malo podataka o štetnim efektima kod ljudi usled izlaganja ovom herbicidu, postoji veliki broj studija o toksičnosti metribuzina sprovedenih na životinjama. Dokazano je da hronično izlaganje metribuzina kod pacova dovodi do znatnog smanjenja telesne mase i do neželjenih promena određenih biohemijskih parametara u organizmu, kao što su povećanje triglicerida, uree, kreatinina i oksidativnog stresa (Chiali i sar., 2013; Medjdoub i sar., 2011). Takođe, zabrinjavajući su podaci studija o uticaju metribuzina na različite vrste riba. Hronično izlaganje ovih životinjskih vrsta komercijalnom preparatu metribuzina *Sencor* dovodi do smanjenja koncentracije glukoze u krvi, poremećaja aktivnosti određenih enzima, histoloških promena na jetri i oksidativnog stresa (Maksymiv i sar., 2015; Husak i sar., 2014).



Slika 10. Degradacija metribuzina fotolizom

Prema EPA kriterijumima, metribuzin je svrstan u D grupu hemikalija koje se ne mogu klasifikovati u pogledu ljudske karcinogenosti, usled nedostatka podataka o kancerogenosti kod ljudi (EPA, 2003). Po novijim studijama postoji povezanost između određenih maligniteta (Delancey i sar., 2009), kao i hromozomskih aberacija (Carbonell i sar., 1993), kod ljudi koji su bili izloženi metribuzinu.

## 2.7 Priprema uzoraka za analizu

Usled razblaženosti, ili kompleksnosti matriksa, mnogi uzorci iz životne sredine se ne mogu analizirati bez prethodne pripreme. Priprema uzoraka najčešće se sastoji iz tri faze: ekstrakcije analita iz vodenog rastvora, njegovog koncentrovanja, a zatim uklanjanja komponenata iz matriksa koje mogu uticati na određivanje analita. Ovde treba istaći da ne postoji jedinstvena strategija za pripremu uzoraka, već ona prvenstveno zavisi od prirode analita (isparljivosti i polarnosti), prirode matriksa i neophodne koncentracije. Uprkos napretku u tehnikama razdvajanja i kvantifikacije, priprema uzoraka i dalje predstavlja najslabiji i najdugotrajniji korak u celoj analitičkoj proceduri, kao i primarni uzrok grešaka. Metode koje se najčešće koriste za ekstrakciju i koncentrovanje pesticida jesu ekstrakcija tečno-tečno (LLE *liquid-liquid extraction*) i ekstrakcija na čvrstoj fazi (SPE *solid-phase extraction*).

Kod ekstrakcije tečno-tečno, organska jedinjenja razdvajaju se na osnovu različite rastvorljivosti između vodenog rastvora i nemešljivog organskog rastvarača. Princip ekstrakcije na čvrstoj fazi zasniva se na adsorciji pesticida od strane adsorbensa koji se u obliku čvrste supstance nalazi u ekstrakcionoj koloni, odnosno kertridžu, kroz koju se propušta uzorak. Vrsta adsorbensa određena je vrstom analita i analiziranog uzorka, a u zavisnosti od količine analiziranog uzorka, treba izabrati i kolone odgovarajućeg kapaciteta. Ova vrsta ekstrakcija sastoji se iz nekoliko koraka:

- kondicioniranje;
- nanošenja uzorka;
- ispiranje i
- eluiranje.



Kondicioniranje predstavlja proces aktiviranja adsorbensa propuštanjem određene zapremine rastvarača. Nanošenjem uzorka dolazi do vezivanja analita za adsorbens, dok se ispiranjem odstranjuju interferirajuće komponente koje su eventualno zaostale. Za eluiranje se koriste organski rastvarači prilikom čega se vrši desorbovanje analita.

Prednosti LLE su jednostavnost postupka i jeftina oprema, dok je ona otežana u slučaju analita rastvorljivih u vodi i umereno polarnih jedinjenja. Sa druge strane ovaj vid ekstrakcije podrazumeva upotrebu velike zapremine organskih rastvarača. U slučaju SPE tehnike, vreme trajanja analize se skraćuje, manji je utrošak organskih rastvarača, a postoji i mogućnost automatizacije kao i povezivanja sa hromatografskim sistemom. Pored toga, postoji veliki izbor adsorbenasa uz mogućnost adsorbovanja velikog broja polarnih analita.

## 2.8 Analitika pesticida

Prisustvo ostataka pesticida u životnoj sredini: zemljištu, vodi i namirnicama predstavlja ozbiljan problem za čovečanstvo. Stoga su neophodne brze, jednostavne i precizne analitičke metode pogodne za kvantifikaciju ovih jedinjenja u kompleksnim uzorcima. Kako u literaturi postoji veliki broj radova na ovu temu, u narednim poglavljima dat je pregled objavljenih radova iz oblasti analitike odabranih pesticida u vodi i komercijalnim formulacijama pesticida, koji su predmet izučavanja ove doktorske disertacije.

### 2.8.1 Hromatografske metode

Prema raspoloživoj literaturi, hromatografija predstavlja najčešće primenjivanu tehniku za određivanje sadržaja pesticida u različitim uzorcima. Osnovnu prednost hromatografije predstavlja mogućnost određivanja velikog broja različitih analita u uzorku, uz veliku selektivnost i osetljivost određivanja. Međutim, ove metode podrazumevaju komplikovanu pripremu uzoraka, skupu instrumentaciju, kao i veliko iskustvo analitičara, uz dugo vreme trajanja analize.

### **2.8.1.1 Gasna hromatografija (GC)**

U literaturi postoji veliki broj objavljenih radova o primeni GC za određivanje sadržaja pesticida. Međutim, veliki je broj jedinjenja koja se usled niske isparljivosti ili termolabilnosti ne mogu direktno određivati ovom tehnikom, već se prethodno moraju prevesti u isparljivi oblik. Upravo je to slučaj kod imidakloprida, koji se usled niske isparljivosti nakon ekstrakcije prvo prevodi u isparljiviji produkt, pa se zatim izvodi analiza. Nakon razdvajanja u GC za određivanje odabranih pesticida primenjeni su različiti principi detekcije: masena spektrometrija (MS) (Sanchez-Ortega i sar., 2009; Daraghmeh i sar., 2007; Haarstad i Ludvigsen, 2007; Kolpin i sar., 2000; Vilchez i sar., 1996), azot-fosforni detektor (NPD) (Lamers i sar., 2011; Beltran i sar., 1997; Jiménez i sar., 1997), elektron-apsorbujući detektor (ECD) (Dores i sar., 2008; Vassilakis i sar., 1998).

### **2.8.1.2 Tečna hromatografija**

Za razliku od gasne hromatografije, tečna hromatografija (LC) ili visokopritisna tečna hromatografija (HPLC) mnogo se češće koristi za određivanje teže isparljivih pesticida i njihovih metabolita. Ovi oblici hromatografije korišćeni su u kombinaciji sa ultravioletnim detektorom (UV) (Baig i sar., 2012; Baskaran i sar., 1997; Vitali i sar., 1994; Geerdink, 1991), detektorom sa serijom dioda (DAD) (Tuzimski i sar., 2008; Guzsvány i sar., 2007; Ying i Kookana, 2004; Martínez Galera i sar., 1998) i masenim spektrometrom (MS) (Robles-Molina i sar., 2014; Herrero-Hernández i sar., 2013; Starner i Goh, 2012; Fenoll i sar., 2011; Dujaković i sar., 2010; Seccia i sar., 2005; Tanabe i Kawata, 2004; Hernández i sar., 2001; Spliid i Köppen, 1996).

## **2.8.2 Optičke metode**

Optičke metode mogu biti prisutne u detekciji pesticida u kombinaciji sa hromatografskim tehnikama (DAD, UV), a mogu se primenjivati i samostalno. Kao najčešće primenjivane optičke metode u analizi odabranih pesticida možemo nabrojati fluorimetrijske (Fuentes i sar., 2015; López Flores i sar., 2007; Vilchez i sar., 2001; Vilchez i sar., 1998), infracrvenu spektrometriju (Khanmohammadi i sar., 2008; Moros i sar., 2006a; Moros i sar., 2006b; Quintás i sar., 2004) i spektrofotometriju (Ara i sar., 2016; Shah i sar., 2009).

### 2.8.3 Imunohemijske metode

Imunohemijske metode, odnosno ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), zasnivaju se na interakciji antigen-antitelo, a karakteriše ih velika selektivnost i osetljivost, uz relativno jednostavnu pripremu uzoraka, pa je moguće određivanje veoma niskih koncentracija (do ng/kg). Iako su ove metode prvenstveno bile korišćene u medicinske svrhe, u poslednje vreme beleži se trend porasta korišćenja ovih metoda i u detekciji pesticida. Odabrani pesticidi određivani su primenom ELISA metoda u različitim uzorcima; između ostalog, posebno treba istaći primenu na uzorke vode (Wang i sar., 2012; Lee i sar., 2001; Watts i sar., 1997).

### 2.8.4. Elektroanalitičke metode

Tokom poslednjih decenija naučni rad je sve više usmeren ka razvoju i implementaciji elektroanalitičkih metoda koje se mogu primenjivati za rutinsko određivanje sadržaja pesticida u kompleksnim uzorcima iz životne sredine. Pored velike osetljivosti i selektivnosti određivanja, ove metode podrazumevaju jednostavnu pripremu uzoraka uz kratko vreme izvođenja analize i mogućnost izvođenja merenja na terenu. Prisustvo elektroaktivnih grupa u molekulu pesticida pored analitičkih studija pruža i mogućnost izučavanja oksido-redukcionih mehanizama, kao i mehanizama njihove razgradnje.

Diferencijalna pulsna polarografija uz korišćenje kapljuće živine elektrode bila je među prvim elektrohemijskim metodama primenjenim za određivanje metamitrona u zemljištu (Valentin i sar., 1989) i imidakloprida u komercijalnim formulacijama (Navalón i sar., 1999). U novije vreme češće se koriste voltametrijske tehnike: ciklična voltometrija (Chen i sar., 2013; Lei i sar., 2013; Kumaravel i Chandrasekaran, 2011; Gómez-Caballero i sar., 2007; Guzsvány i sar., 2005), diferencijalna pulsna voltometrija (Janíková i sar., 2016; Šelešovská i sar., 2015; Chen i sar., 2013; Lei i sar., 2013; Kumaravel i Chandrasekaran, 2011; Majidi i sar., 2011; Papp i sar., 2009; Guzsvány i sar., 2008; Skopalová i sar., 2001; Arranz, i sar., 1997a; Arranz i sar., 1997b) i voltometrija sa pravougaonim talasom (Guzsvány i sar., 2013; Lima i sar., 2009; Sánchez Arribas i sar., 2006; Arranz i sar., 1997a; Arranz, i sar., 1997b). Iako se voltametrijske tehnike mogu primeniti samostalno, u cilju povećanja osetljivosti može se koristiti i kombinacija ovih tehnika sa striping analizom (Guiberteau i sar., 2001; Skopalová i sar., 2001; Arranz i sar., 1997a; Arranz i sar., 1997b). Najveća osetljivost u određivanju odabranih

pesticida postignuta je primenom kapljuće živine elektrode kao radne elektrode (Janíková i sar., 2016; Šelešovská i sar., 2015; Guiberteau i sar., 2001; Skopalová i sar., 2001). Brojni nedostaci koji su povezani sa upotrebom ove elektrode, doveli su do toga da se kapljuća živina elektroda zameni manje toksičnim elektrodama kao što su elektrode od staklastog ugljenika (Lima i sar., 2009; Guzsvány i sar., 2005) i njihove različite modifikacije (Chen i sar., 2013; Lei i sar., 2013; Kumaravel i Chandrasekaran, 2011). Pored toga, primenjuju se i elektrode od ugljениčne paste (Lima i sar., 2009; Papp i sar., 2009; Arranz i sar., 1997a; Arranz i sar., 1997b), borom dopovana dijamantska elektroda (Šelešovská i sar., 2015), tankoslojna bizmutova elektroda (Moreno i sar., 2009; Sánchez Arribas i sar., 2006; Guzsvány i sar., 2008) i srebro-amalgam elektroda (Janíková i sar., 2016; Šelešovská i sar., 2015; Guzsvány i sar., 2013). Primena modifikovanih elektroda dovela je do povećanja osetljivosti i selektivnosti određivanja, ali ove elektrode zahtevaju dugotrajnu i mukotrpnu pripremu, pa se na taj način postojeća jednostavna metoda znatno komplikuje i produžava.

## 2.9 Hronopotencimetrija

Hronopotencimetrija je elektroanalitička tehnika u kojoj dolazi do elektrolize rastvora elektroaktivnih vrsta, u prisustvu viška pomoćnog elektrolita, uz primenu konstantne struje i merenja potencijala radne elektrode u odnosu na nepolarizujuću referentnu elektrodu u funkciji vremena. Kako bi se kretanje elektroaktivnih vrsta odvijalo isključivo difuzijom, tokom izvođenja analize ne dolazi do mešanja ispitivanog rastvora, migraciono kretanje jona umanjuje se prisustvom pomoćnog elektrolita u višku, dok je sa druge strane konvekcija ograničena relativno kratkim vremenom elektrolize (Jain i Gaur, 1977). Nastala kriva potencijal–vreme naziva se hronopotenciogram (Thomas i Henze, 2001) (Slika 11).

Propuštanjem struje kroz ispitivani rastvor između radne i pomoćne elektrode dolaziće do nagle promene potencijala sve dok se ne dostigne potencijal pri kojem započinje elektroliza elektroaktivne komponente rastvora (analita). Ukoliko je analit prisutan u rastvoru u oksidovanom obliku, elektrodna reakcija može se predstaviti sledećom jednačinom:



Kako je elektrodna reakcija brža od difuzije jona do radne elektrode, koncentracija oksidovanog oblika supstance na površini elektrode će se smanjivati u odnosu na koncentraciju u okolnom rastvoru. Smanjenje koncentracije u okolini radne elektrode dovodi do pomeranja potencijala radne elektrode ka negativnijim vrednostima, kako bi i dalje tekla konstantna struja. Sve dok je koncentracija oksidovanog oblika supstance na površini elektrode različita od nule, promena potencijala elektrode može se definisati Nernstovim izrazom:

$$E = E^\theta + \frac{RT}{nF} \log \frac{c_{ox}(0,t)}{c_{red}(0,t)} \quad (5)$$

Gde su:

$E$  – potencijal elektrode u stanju ravnoteže (V),

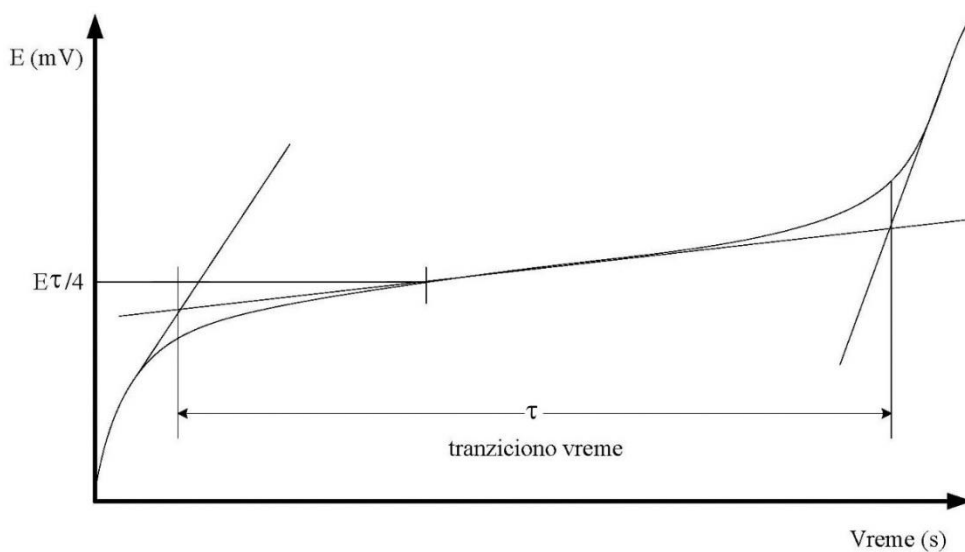
$E^\theta$  – standardni redoks potencijal (V),

$R$  – univerzalna gasna konstanta (J/mol K),

$n$  - broj razmenjenih elektrona u reakciji,

$F$  – Faradejeva konstanta (C/mol),

$c_{ox}$  i  $c_{red}(0, t)$  – koncentracije oksidovanog i redukovanog oblika supstance u vremenu  $t$  (mol/dm<sup>3</sup>).



Slika 11. Hronopotenciogram

Ukoliko je koncentracija oksidovanog oblika supstance na površini elektrode različita od nule, promena potencijala će se sporo odvijati. U momentu kada je koncentracija oksidovanog oblika supstance na površini elektrode jednaka nuli, dolazi do naglog skoka potencijala, dok se ne dostigne vrednost pri kojoj se odvija elektroliza sledeće elektroaktivne komponente u rastvoru (drugog analita ili jona pomoćnog elektrolita). Vreme potrebno da koncentracija oksidovanog oblika supstance na površini elektrode dođe do nule naziva se tranziciono vreme ( $\tau$ ). Na hronopotenciogramu, tranziciono vreme odgovara vremenu između naglih porasta potencijala (Slika 11), a meri se u cilju kvantitativnog određivanja analita. U cilju tačnog merenja tranzicionog vremena zavisnost koncentracije oksidovanog oblika supstance na površini elektrode od vremena mora biti poznata. Za galvanostatske uslove ova zavisnost data je izrazom (Sand, 1901 u Chowdhury i sar., 2017):

$$C_{ox}(0, t) = C_{ox}^0 - \frac{2}{\pi} \left( \frac{i}{nFD_{ox}A} \right) \delta_{ox}(t) \quad (6)$$

gde su:

$C_{ox}(0, t)$  – koncentracija oksidovane supstance na površini elektrode u vremenu  $t$ ,

$C_{ox}^0$  – početna koncentracija oksidovane supstance,

$n$  – broj razmenjenih elektrona,

$D_{ox}$  – koeficijent difuzije oksidovanog oblika supstance ( $\text{cm}^2/\text{s}$ ),

$A$  – površina elektrode ( $\text{cm}^2$ ),

$\delta_{ox}(t)$  – debljina difuzionog sloja u funkciji vremena  $t$ , a data je izrazom:  $\delta_{ox}(t) = \sqrt{\pi D_{ox} t}$ .

Rešavanjem jednačine (6), uz uslov da je  $C_{ox}(0, \tau) = 0$  za difuzioni proces, dobija se izraz koji povezuje primenjenu struju  $i$  i tranziciono vreme, odnosno Sandova jednačina, koja ujedno predstavlja i osnovnu jednačinu hronopotencijometrije (Thomas i Henze, 2001):

$$\tau^{1/2} = \frac{nFA(\pi D_{ox})^{1/2}}{2i} C_{ox}^0 \quad (7)$$

Gde su:

$A$  – površina elektrode ( $\text{cm}^2$ ),

$i$  – struja elektrolize (A),

$D_{ox}$  – koeficijent difuzije analita

Iz izraza za tranziciono vreme (7) vidi se da je vrednost kvadratnog korena tranzicionog vremena proporcionalna sa koncentracijom analita, te je usled nelinearne zavisnosti praktična primena hronopotencimetrije u velikoj meri otežana. Tranziciono vreme zavisi od primenjene struje, a povećanje vrednosti struje dovodi do smanjenja vrednosti  $\tau$  (Bott, 2000). U hronopotencimetriji, parametar  $i\tau^{1/2}$  je konstantan za redoks procese koji ne uključuju adsorpciju ili povezane hemijske reakcije (Bott, 2000). Uz primenu Nernstovog izraza može se izvesti funkcionalna zavisnost između potencijala radne elektrode (E) i vremena elektrolize (t):

$$E = E_{\tau/4} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{\tau^{1/2} - t^{1/2}}{t^{1/2}} \quad (8)$$

Gde je:

$$E_{\tau/4} = E_0 + \frac{RT}{nF} \ln \left( \frac{D_{red}}{D_{ox}} \right)^{1/2} \quad (9)$$

$E_0$  – standardni normalni redoks potencijal ispitivanog sistema,

$E_{\tau/4}$  – predstavlja potencijal radne elektrode kada je  $t = \tau/4$  i predstavlja kvalitativnu karakteristiku ispitivanog sistema. Za reverzne procese, ova vrednost potencijala identična je sa polarografskim polutalasnim potencijalom.

Za ireverzibilni proces važi sledeća jednačina:

$$E = E_0 + \frac{RT}{\alpha nF} \ln \left[ \frac{nFAc_{ox}^0 k}{i} \right] + \frac{RT}{\alpha nF} \ln \left[ \sqrt{\frac{\tau}{t}} - 1 \right] \quad (10)$$

Gde su:

$\alpha$  – koeficijent prenosa naelektrisanja,

$i$  – struja elektrolize (A),

$k$  – konstanta brzine reakcije za ireversni sistem (cm/s),

$c_{ox}^0$  – koncentracija analita.

Kada su u ispitivanom rastvoru prisutna dva analita, tada je tranziciono vreme drugog analita produženo prisustvom prvog analita. Kada dolazi do redukcije drugog analita, prvi analit se i dalje redukuje, tako da je za redukciju drugog analita dostupan samo deo primenjene struje.

Tranziciono vreme drugog analita povezano je sa njegovom koncentracijom sledećom relacijom:

$$(\tau_1 + \tau_2)^{1/2} - \tau_1^{1/2} = \frac{n^2 F A (\pi D_2)^{1/2}}{2i} C_{ox2} \quad (11)$$

Gde su:

$\tau_1$  i  $\tau_2$  – tranziciona vremena prvog i drugog analita.

Ukoliko je  $C_{ox1} = C_{ox2}$ ,  $D_1 = D_2$ , i  $n_1 = n_2$ , na osnovu jednačina (7) i (11) sledi da je  $\tau_2 = 3\tau_1$ , čime se dokazuje činjenica da se tranziciono vreme drugog analita produžava u odnosu na ono kada bi bio samostalno prisutan u rastvoru. Ovaj fenomen može se koristiti u cilju povećanja osetljivosti hronopotenciometrijske analize.

Hronopotenciometrijska tehnika ne zahteva komplikovanu instrumentaciju. Upotrebom operacionih pojačivača i mikroprocesora znatno je olakšano merenje tranzicionog vremena, automatizovana obrada i skladištenje podataka, a dobijeni su i stabilni izvori konstantne struje. Troelektrodni sistem koji čine radna, referentna i pomoćna elektroda takođe su sastvani deo instrumentacije, pri čemu se potencijal radne elektrode meri u odnosu na referentnu, a struja protiče između radne i pomoćne elektrode. Kao referentne elektrode najčešće se koriste kalomelova i srebro-srebro hloridna elektroda, kao pomoćna platinska elektroda, dok su kao radne elektrode najčešće korišćene živine elektrode, različite modifikacije ugljenika ili elektrode od plemenitih materijala (platine i zlata).

Iako su teorijske osnove hronopotenciometrije postavljene još početkom dvadesetog veka, Ruis prvi put koristi hronopotenciometriju kao analitičku metodu četrdesetih godina, a Gierst i Juliard su pokazali da ona može biti korisna i za proučavanje kinetike elektrodnih reakcija (Thomas i Henze, 2001; Gierst i Juliard, 1953). Poslednjih godina, najviše je publikovanih radova o primeni hronopotenciometrije za određivanje teških metala (Jedryczko i sar., 2017; Cypriano i sar., 2008), antimona (Tanguy i sar., 2010), arsena (Jedryczko i sar., 2016), kalcijuma (Gemene i Bakker, 2009), sulfida (Aumond i sar., 2012) kao i organskih elektroaktivnih supstanci: histamina (Stojanović i Švarc-Gajić, 2011) i vitamina (Brezo i sar., 2015; Stojanović i sar., 2013).



## 2.10 Radne elektrode

Izbor radne elektrode ima najviše uticaja na performanse elektroanalitičke tehnike. Materijal od kojeg je napravljena radna elektroda, njena geometrija i sama površina definišu tok elektrodne reakcije, osetljivost i reproduktivnost merenja (Thomas i Henze, 2001). Izbor radne elektrode prvenstveno zavisi od analita koji se određuje, a pri izboru radne elektrode poželjno je uzeti u obzir i sledeće činjenice: lako rukovanje, reproduktivnost merenja, dugotrajnu stabilnost, širok opseg potencijala za katodne i anodne reakcije, kao i malu rezidualnu struju (Garrido i sar., 2004; Thomas i Henze, 2001).

### 2.10.1 Živine elektrode

Živine elektrode su dugo bile veoma popularne u elektroanalitici. Živa omogućava veoma širok raspon potencijala od -2,5 V, dok je anodni smer ograničen potencijalom rastvaranja žive +0,4 V, te su živine elektrode pogodne za određivanje mnogih supstanci koje podležu redukciji (Vyskočil i Barek, 2009). Primenom polarografije 20-tih godina prošlog veka uvedene su elektrode živine kapi, koje su pokazale izuzetno veliku osetljivost i selektivnost merenja. Osnovni nedostaci ovog tipa elektroda su mehanička nestabilnost kapi, relativno mali odnos površine kapi u odnosu na zapreminu i pozadinska difuzija, a sama konstrukcija elektrode podrazumeva upotrebu rezervoara žive i elektronike za precizno stvaranje i odlaganje kapi, uz redovno održavanje kapilare (Vyskočil i Barek, 2009). Mnogi od ovih nedostataka kapljuće živine elektrode prevaziđeni su upotrebom tankoslojne živine elektrode. Pored toga, primena ovih elektroda podrazumeva minorne količine žive, a postoji i mogućnost primene analize na mestu uzorkovanja, kao i hemijske modifikacije njihove površine (Vyskočil i Barek, 2009). Ove elektrode najčešće se formiraju katodnom depozicijom iz nitratnog rastvora žive, gde je koncentracija  $\text{Hg}^{2+}$  u rasponu 20 - 50 mg/l, pri potenciostatskim ili galvanostatskim uslovima (Suturović, 2003; Thomas i Henze, 2001). Češće se koristi potenciostatsko deponovanje, a primenjuju se potencijali u rasponu od -0,2 do -0,9 V (u odnosu na zasićenu kalomelovu elektrodu) (Wang, 2006; Suturović, 2003; Thomas i Henze, 2001). Tanak sloj žive može se deponovati iz posebnog rastvora, tzv. *ex-situ*, ili iz analiziranog rastvora *in-situ*, uz istovremeno deponovanje žive i analiziranih analita, a najčešće se koristi u striping tehnikama, pri određivanju metala (Wang, 2006). *In-situ* postupak formiranja je jednostavniji pošto ne zahteva

izmenu rastvora, ispiranje i brisanje elektroda, ali se usled stalnog prisustva živinih jona u rastvoru debljina filma žive povećava tokom svake naredne elektrolize (Suturović, 2003). Takođe, primenom *in-situ* postupka, potencijal deponovanja tankog filma žive odgovara potencijalu izvođenja elektrolize ispitivanog rastvora (Suturović, 2003). Kao inertni nosač tankoslojne živine elektrode najčešće se koristi staklasti ugljenik, ili iridijum, a debljina formiranih slojeva je u granicama 10 - 100  $\mu\text{m}$  (Wang, 2006; Thomas i Henze, 2001). Tankoslojna živina elektroda osetljiva je na izdvajanje vodonika, što zahteva pažnju pri izboru pH rastvora i potencijala elektrolize, a usled formiranja kalomela, treba izbegavati duži kontakt elektrode sa rastvorom koji sadrži živine i hloridne jone, ukoliko nije saopšten određen negativni potencijal (Suturović, 2003).

U poslednje vreme objavljen je veliki broj radova o primeni ovih elektroda u detekciji organskih komponenata (pesticida, lekova i njihovih metabolita, itd.) koje sadrže nitro, nitrozo, azo, ili heterociklične grupe, te su se ove elektrode pokazale kao kompetentni senzori po pitanju cene, brzine, osetljivosti i jednostavnosti, a strahovi povezani sa toksičnošću žive pri elektrohemijskim merenjima u velikoj meri su neosnovani (Barek, 2013).

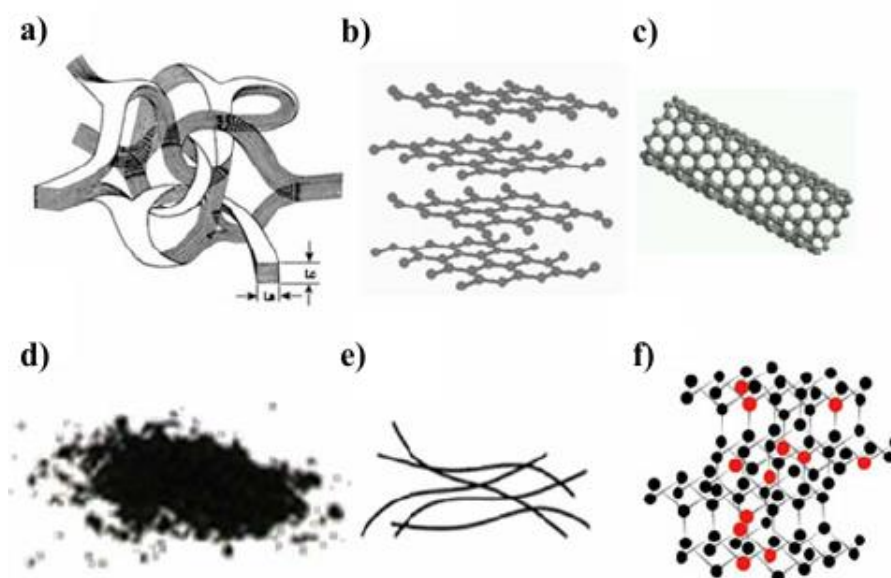
### 2.10.2 Čvrste radne elektrode

Opseg potencijala u anodnoj oblasti ograničio je upotrebu živinih elektroda u određivanju različitih jedinjenja koja podležu oksidaciji. Shodno tome, čvrste elektrode sa proširenim rasponom potencijala u anodnoj oblasti privukle su značajnu pažnju analitičara. Najčešće korišćeni materijali za izradu ovih elektroda su različite modifikacije ugljenika, platina, zlato, dok je upotreba srebra, nikla i bakra ograničena (Wang, 2006).

Kod čvrstih elektroda važan faktor koji utiče na odziv same elektrode jeste njena aktivna površina čiji se kvalitet može narušiti tokom izvođenja elektroanalitičkih merenja usled formiranja oksida, adsorpcije vodonika i organskih jedinjenja (Wang, 2006; Thomas i Henze, 2001). U cilju dobijanja reproduktivnih rezultata, upotreba ovih elektroda podrazumeva odgovarajuću pripremu i poliranje. Izbor odgovarajuće pripreme elektrode zavisi od materijala od kojeg je elektroda napravljena. Mehaničko poliranje i elektrohemijski tretman, uz cikličnu promenu potencijala, najčešće se koriste kod metalnih elektroda, dok se kod elektroda od različitih modifikacija ugljenika koriste hemijska, elektrohemijska ili termalna priprema (Wang, 2006).

### 2.10.2.1 Elektrode na bazi ugljenika

Zahvaljujući mnogostrukim prednostima uključujući hemijsku inertnost, širok opseg primenljivih potencijala, nisku cenu, hemijsku inertnost i izraženu elektrokatalitičku aktivnost za različite redoks reakcije, ugljenični materijali se već dugi niz godina primenjuju u analitičkoj i industrijskoj elektrohemiji. Za izradu radnih elektroda primenjuju se različite modifikacije ugljenika: grafit, staklasti ugljenik, ugljenična pasta, vlaknasti ugljenik, nanocevi i dijamant (Cavalheiro i sar., 2012) (Slika 12). Raznovrsnost ugljenika kao elektrodnog materijala u velikoj meri proizilazi iz njegovog strukturnog polimorfizma, hemijske stabilnosti i jakih ugljenik-ugljenik veza prisutnih unutar, kao i između ugljeničnih materijala i površinskog modifikatora. Od elektroda na bazi ugljenika u elektrohemiji se najčešće primenjuju one od staklastog ugljenika, ugljenične paste kao i borom dopovane dijamantske elektrode.



**Slika 12.** Strukture: **a)** staklastog ugljenika, **b)** grafita, **c)** ugljenične nanocevi, **d)** grafitnog praha, **e)** karbonskih vlakana, **f)** borom-dopovanog dijamanta

**Staklasti ugljenik** (*glassy* ili *vitreous carbon*, GC) dobija se procesom karbonizacije organskih polimera (fenolne smole, PVC, celuloza, i dr.), pri čemu brzina zagrevanja u temperaturnoj oblasti 300 - 1200°C mora biti veoma spora, kako bi se omogućila eliminacija kiseonika, azota i vodonika. Sam naziv potiče od glatkoće i sjaja njegove površine koja podseća na staklo. Usled velike gustine i malih dimenzija pora staklasti ugljenik ne zahteva

impregnaciju, a mehaničke i električne karakteristike, hemijska inertnost, širok raspon primenjenih potencijala i relativno reproduktivne performanse doprinose izuzetnoj popularnosti ovih elektroda u elektroanalitici. U neutralnim vodenim rastvorima, ove elektrode mogu se primeniti u širokom intervalu potencijala od -1,2 V do +1,3 V (u odnosu na zasićenu kalomelovu elektrodu) (Thomas i Henze, 2001). U cilju poboljšanja reproduktivnosti, priprema ovih elektroda najčešće obuhvata poliranje aktivne površine vodenom suspenzijom aluminijum-oksida na posebnim podlogama, uz sukcesivno smanjenje veličine čestica (do 0,05  $\mu\text{m}$ ) do sjajnog izgleda kao ogledalo. Za uklanjanje viška sredstva za poliranje često se primenjuje mehaničko čišćenje uz primenu ultrazvuka, a zatim, pre upotrebe elektrodu treba isprati bidestilovanom vodom. Za poboljšanje performansi mogu biti primenjeni dodatni tretmani kao što su elektrohemijski, hemijski, toplotni ili laserski. Treba istaći i da saopštavanjem suviše pozitivnih potencijala ( $> 2 \text{ V}$ , u odnosu na zasićenu kalomelovu elektrodu) dolazi do ireverzibilnih promena u strukturi staklastog ugljenika, te on postaje neupotrebljiv za elektrohemijsku primenu.

## 3 EKSPERIMENTALNI DEO

### 3.1 Instrumentacija

Sva elektroanalitička merenja u ovom radu izvedena su u laboratoriji za *Instrumentalne metode analize Tehnološkog fakulteta Novi Sad*, primenom sistema za elektrohemijsku analizu konstruisanog na Tehnološkom fakultetu Novi Sad u saradnji sa *Elektrouiverzalom*, iz Leskovca (Slika 13).

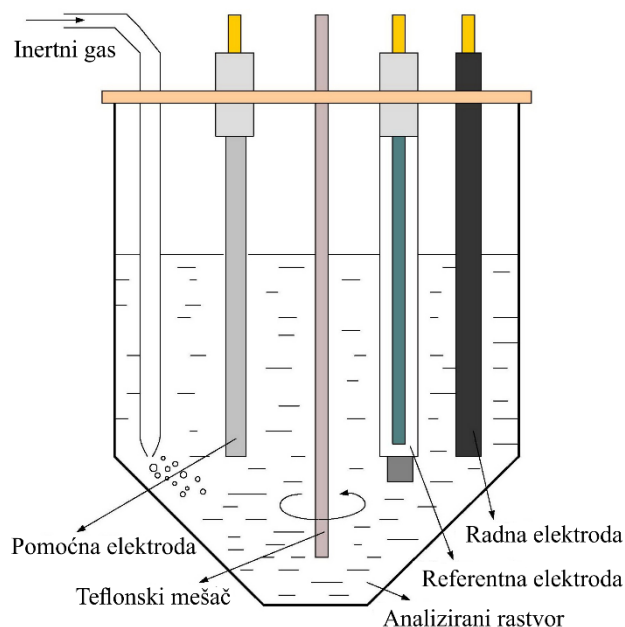


**Slika 13.** Sistem za elektrohemijsku analizu

Osnovni deo ovog sistema predstavlja elektrohemijski uređaj M1. Uređaj omogućava izvođenje potenciometrijske i hronopotenciometrijske striping analize, hronopotenciometrije, kao i elektrolize pri konstantnom potencijalu i struji. Vrednosti potencijala koje se mogu saopštiti kreću se u opsegu od -2 V do +2 V, a vrednosti konstantne struje od -50  $\mu\text{A}$  do +50  $\mu\text{A}$ . Tačnost zadavanja potencijala i struje definisana je greškom od  $\Delta E \leq \pm 2 \text{ mV}$ , odnosno  $\Delta I \leq \pm 0,2 \mu\text{A}$ . Uređaj takođe ima mogućnost automatskog određivanja kvalitativnih i

kvantitativnih karakteristika analita, uz računanje sadržaja ispitivanih analita. Kvalitativna karakteristika analita je srednja vrednost potencijala platoa potenciograma ili hronopotenciograma. Rezolucija pri merenju potencijala iznosi  $\Delta E \leq \pm 2$  mV. Kvantitativna karakteristika analita dobija se merenjem vremena između dve prevojne tačke signala odziva, uz tačnost definisanu greškom  $\Delta t = 50$  ms. Analizator takođe daje mogućnost automatske kalibracije vrednosti struja i potencijala, memorisanja rezultata poslednje analize, a upozorava i na eventualne neregularnosti tokom izvođenja analize, kao i u slučaju pogrešnog saopštavanja parametara analize. Nakon svake urađene analize, analitičar dobija informacije o ispravnosti analize, kao i prisustvu i vrsti eventualnih smetnji.

Elektrohemijsku ćeliju čini mehanička mešalica sa teflonskim mešačem, procesna čaša, troelektrodni sistem i elektromagnetni ventil (Slika 14). Elektromagnetni ventil omogućava uvođenje inertnog gasa u cilju deaeracije ispitivanog rastvora. Mehanička mešalica sa teflonskim mešačem omogućava reproduktivno mešanje ispitivanog rastvora, a moguće je podešavanje brzine mešanja u opsegu od 1000 - 6000 obrtaja/minuti. Rad mehaničke mešalice i elektromagnetnog ventila kontrolisan je elektrohemijskim uređajem. Elektrodni sistem čine radna, referentna i pomoćna elektroda.



**Slika 14.** Elektrohemijska ćelija

Kao radne elektrode korišćene su planarna disk elektroda od staklastog ugljenika i tankoslojna živina elektroda. Elektroda od staklastog ugljenika napravljena je utiskivanjem cilindra od staklastog ugljenika (*Sigradur G*,  $d = 3$  mm) pri povišenim temperaturama u teflonsku cev spoljašnjeg prečnika  $d = 8$  mm. Ova elektroda korišćena je i kao nosač tankog sloja žive. Kao referentna elektroda korišćena je Ag/AgCl (3,5 mol/l, KCl) elektroda, a svi potencijali u ovom radu prikazani su u odnosu na ovu referentnu elektrodu. Kao pomoćna elektroda korišćena je platinska žica ( $\varnothing = 0,7$  mm,  $l = 7$  mm) ugrađena u stakleni nosač.

Hromatografska LC-MS/MS analiza izvedena je na tečnom hromatografu (Agilent 1200 Series, Agilent Technologies Inc., USA) uz primenu trostrukog kvadrupolnog masenog spektrometra (Agilent 6410, Agilent Technologies Inc., USA) u laboratoriji *Gradskog zavoda za javno zdravlje*, Beograd.

Pored osnovne instrumentacije za izvođenje analiza, u radu je korišćeno i ultrazvučno kupatilo (Iskra, Šentjernej, Slovenija), pH metar MA 5705 (Iskra, Kranj, Slovenija) sa kombinovanim staklenom elektrodom, bidestilator (MonoDest 3000, Brand, Nemačka), sušnica (Sutjeska, Beograd, Srbija) tehnička i analitička vaga (Mettler Toledo, Kolambus, SAD).

### 3.2 Pribor i posuđe

U radu je korišćeno uobičajeno stakleno laboratorijsko posuđe (normalni sudovi, pipete, čaše, levkovi, itd.), propipeta Macro (Brand, Wertheim, Nemačka) i mikropipete različitih proizvođača i opsega zapremina: 100 - 1000  $\mu$ l Transferpette (Brand, Wertheim, Nemačka), 20 - 200  $\mu$ l, 2 - 20  $\mu$ l Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt, Nemačka).

Za elektrohemijska merenja korišćene su procesne posude u vidu staklene čaše sa konusnim dnom zapremine od 50 ml (Slika 15). Laboratorijsko posuđe prano je deterdžentom, isprano česmenskom vodom, rastvorom razblažene azotne kiseline (1:1, v/v) destilovanom i bidestilovanom vodom.



**Slika 15.** Procesna posuda za elektrohemijska merenja

### 3.3 Hemikalije i rastvori

Tokom izvođenja eksperimenata korišćeni su standardi pesticida (Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Nemačka) imidaklopid (čistoće > 99,1%), metamitron (čistoće > 98,2%) i metribuzin (čistoće > 99,5%). U nastavku, dat je spisak ostalih rastvora i hemikalija:

- Ortofosforna kiselina (Lach-Ner, Brno, Češka);
- Borna kiselina (Lach-Ner, Brno, Češka);
- Sirćetna kiselina (Lach-Ner, Brno, Češka);
- Hlorovodonična kiselina, suprapure (Merck, Darmstadt, Nemačka);
- Sumporna kiselina (Merck, Darmstadt, Nemačka);
- Azotna kiselina (Kemika, Zagreb, Hrvatska);
- Natrijum-hidroksid (Lach-Ner, Brno, Češka);
- Natrijum-hlorid (Centrohem, Stara Pazova, Srbija);
- Natrijum-hidrogenkarbonat (Centrohem, Stara Pazova, Srbija);
- Natrijum-sulfit (Centrohem, Stara Pazova, Srbija);
- Kalijum-nitrat (Kemika, Zagreb, Hrvatska);
- Kalcijum-sulfat dihidrat (Kemika, Zagreb, Hrvatska);
- Magnezijum-sulfat (Kemika, Zagreb, Hrvatska);
- Gvožđe(II)-sulfat heptahidrat (Centrohem, Stara Pazova, Srbija);
- Živa (Merck, Darmstadt, Nemačka);
- Aceton (Merck, Darmstadt, Nemačka);
- Etanol 96% (Zorka, Šabac, Srbija);
- Metanol za HPLC (Merck, Darmstadt, Nemačka);



- Acetonitril za HPLC (Kemika, Zagreb, Hrvatska);
- Aluminiјum-oksид 0,05  $\mu\text{m}$  (Merck, Darmstadt, Nemačka);
- Azot ekstra čistoće (Messer, Tehnogas, Beograd, Srbija).

Osnovni standardni rastvor imidakloprida koncentracije 0,4 g/l pripremljen je rastvaranjem čvrste supstance u bidestilovanoj vodi. Čuvanjem u frižideru, u mraku, pripremljeni rastvor bio je stabilan u periodu od tri nedelje. Standardni rastvor metamitrona 2,5 g/l pripreman je rastvaranjem čvrste supstance u acetonitrilu i čuvan je u zamrzivaču. Dnevni standardni rastvor metamitrona (0,5 g/l) pripreman je razblaživanjem osnovnog rastvora bidestilovanom vodom. Standardni rastvor metribuzina (0,3 g/l) pripreman je rastvaranjem osnovnog standarda u etanolu i čuvan je u zamrzivaču. Za niže opsege koncentracija koje su korišćene u merenjima, rastvori pesticida dodatno su razblaživani u odgovarajućem pomoćnom elektrolitu.

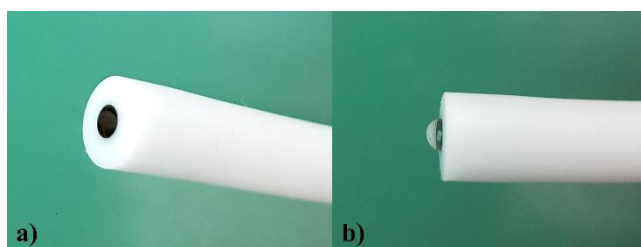
Rastvor  $\text{Hg}^{2+}$  jona (2 g/l) koji je korišćen za pripremu tankoslojne živine elektrode pripremljen je rastvaranjem elementarne žive u 3 ml azotne kiseline uz zagrevanje i razblaživanje bidestilovanom vodom.

Britton-Robinson pufer pripremljen je od 0,04 mol/l ekvimolarne smeše sirćetne, ortofosforne i borne kiseline, a odgovarajuća pH vrednost pufera podešena je prethodno kalibrisanim pH metrom, uz dodatak 0,2 mol/l rastvora natriјum-hidroksida. Pufferi su pripremani u rasponu pH vrednosti od 2 do 12.

### 3.4 Priprema i formiranje radnih elektroda

Na početku radnog dana, kvalitet aktivne površine staklastog ugljenika testiran je u 0,005 mol/l rastvoru sumporne kiseline, variranjem potencijala u 10 ciklusa od -0,7 V do +0,7 V, pri konstantnoj struji od 7  $\mu\text{A}$ . Test završen u roku od nekoliko sekundi (do 5 s) ukazuje na dobar kvalitet staklastog ugljenika, odnosno da elektroda ne zahteva dodatni tretman. Kada rezultati testa nisu bili zadovoljavajući, ili kada je uočen pad reproduktivnosti ili oštine analitičkog signala tokom merenja, izvedeno je poliranje aktivne površine staklastog ugljenika. Poliranje je izvedeno vodenom suspenzijom aluminiјum-oksida na posebnoj podlozi. Na početku ovog procesa koristi se gusta suspenzija, uz postepeno razređivanje suspenzije

bidestilovanom vodom. Na kraju, elektroda je ispirana mlazom bidestilovane vode, a radi uklanjanja eventualno zaostalih čestica aluminijum-oksida, primenjen je tretman u ultrazvučnom kupatilu u trajanju od 10 minuta u rastvoru etanola i vode (1:1, v/v). Nakon toga, elektroda je ispirana bidestilovanom vodom, a kvalitet staklastog ugljenika proveravan je testom, koji je istovremeno služio i kao elektrohemijska aktivacija. U slučaju dobrog testa, elektrodu je između analiza dovoljno prebrisati filter-hartijom nakvašenom acetonom, a zatim bidestilovanom vodom. Elektroda od staklastog ugljenika koja se koristila kao inertni nosač za tankoslojnu živinu elektrodu nije zahtevala često poliranje, a ono je izvođeno kada su se javljale teškoće pri formiranju tankog sloja žive. Izgled elektrode od staklastog ugljenika i tankoslojne živine elektrode prikazan je na Slici 16.



**Slika 16.** Izgled aktivne površine radnih elektroda: **a)** elektroda od staklastog ugljenika, **b)** tankoslojna živina elektroda

Tankoslojna živina elektroda formirana je iz 0,02 mol/l rastvora hlorovodonične kiseline koji sadrži 0,10 g/l  $\text{Hg}^{2+}$  jona, pri potenciostatskim uslovima, uz primenu potencijala od -0,4 V, u trajanju od 240 s. Tokom deponovanja žive rastvor je intenzivno mešan, a nakon deponovanja kvalitet formirane elektrode procenjen je vizuelno, pomoću kapi bidestilovane vode zaostale nakon ispiranja elektrodnog sistema. Ovako formirana živina elektroda pri optimalnim uslovima izvođenja analize može da se koristi za približno 40 analiza, nakon čega se sloj žive mehanički uklanja filter-hartijom koja je prvo nakvašena acetonom, a zatim bidestilovanom vodom. Između analiza, elektroda je ispirana bidestilovanom vodom. Prva analiza na sveže formiranoj elektrodi nije uzimana u obzir. Kada je izvođena deaeracija ispitivanog rastvora azotom, tankoslojna živina elektroda držana je u posebnoj čaši sa bidestilovanom vodom, jer bi u suprotnom dolazilo do oštećenja aktivne površine mehurima inertnog gasa koji se uvodi u ispitivani rastvor.

### 3.5 Uzorci

Kao reprezentativni uzorci vode u kojima je određivan sadržaj pesticida korišćeni su uzorci površinskih voda i vode za piće sa različitih lokaliteta na teritoriji Vojvodine:

- Reka Dunav kod Petrovaradinske Tvrđave;
- Reka Dunav Štrand;
- Reka Dunav Ribarac;
- Reka Dunav Kamenjar;
- Reka Dunav Mačkov sprud;
- Reka Tisa;
- Česmenska voda Begeč;
- Izvorska voda Begeč;
- Izvorska voda SPENS;
- Zobnatičko jezero.

Uzorkovanje je izvedeno u skladu sa smernicama za uzimanje uzoraka voda SRPS ISO 5667-6:2017 (Službeni glasnik 02/2017) i SRPS ISO 5667-5:2008 (Službeni glasnik 89/2008). Uzorci vode uzorkovani su u polietilenskim bocama i čuvani su u zamrzivaču do momenta analiziranja.

Sadržaj pesticida određen je i u komercijalnim formulacijama pesticida, i to:

- Sadržaj imidakloprida:
  - *Confidor 200* (Bayer, CropScience, Monheim, Nemačka);
  - *Confidor 70* (Bayer, CropScience, Monheim, Nemačka);
  - *Prestige 290* (Bayer, CropScience, Monheim, Nemačka);
  - *Gat Go 20* (GAT Microencapsulation AG, Ebenfurth, Austrija);
  - *Imidor 70* (Stockton Chemical, Florida, SAD);
  - *Kohinor 200* (Celsius Property, Amsterdam, Holandija).
- Sadržaj metamitrona:
  - *Metak 700* (Galenika Fitofarmacija A.D., Belgrade, Srbija);
  - *Brevis* (Adama Agan Ltd., Ashdod, Izrael);
  - *Korida* (Chemical Agrosava, Belgrade, Srbija);
  - *Metix* (Agromarket, Kragujevac, Srbija).

- Sadržaj metribuzina:
  - *Welton* (Galenika Fitofarmacija, Beograd, Srbija);
  - *Sencor Plus* (Bayer, CropScience, Monheim, Nemačka);
  - *Lord 700* (Willowood, Hong Kong, Kina).

Uzorci su nabavljeni u poljoprivrednim apotekama na teritoriji Novog Sada, i čuvani su u originalnim pakovanjima do momenta analiziranja.

### 3.5.1 Priprema uzoraka

U cilju izvođenja hronopotenciometrijske analize, uzorci vode sa povećanim sadržajem suspendovanih materija filtrirani su kroz filter-hartiju Whatman 1 (Whatman International, Maidstone, Velika Britanija), a zatim je od uzoraka vode pripremljen Britton-Robinson pufer odgovarajuće pH vrednosti.

Za izvođenje hromatografske analize (LC-MS/MS), uzorci vode (250 ml) filtrirani su kroz membranske špic-filtre sa prečnikom pora od 0,45  $\mu\text{m}$  (Chromafil<sup>®</sup>Xtra PET- 45/25, Macherey-Nagel, Düren, Nemačka). Ekstrakcija i koncentrovanje uzoraka izvedena je postupkom ekstrakcije na čvrstoj fazi primenom Supelco kolone (Supel<sup>™</sup> - Select HLB cartridges, Sigma-Aldrich, Misuri, SAD, 200 mg, 6 ml). Kolone su prethodno kondicionirane sa 5 ml metanola i 5 ml bidestilovane vode. Uzorci vode propuštani su kroz kolone pri brzini od 3-5 ml/min primenom vodene vakuum-pumpe. Nakon prolaska uzoraka, kolone su isprane sa 10 ml bidestilovane vode, a analit je eluiran sa 5 ml metanola. Nakon eluiranja, uzorci su upareni do suva u struji azota, a ostatak je rastvoren u 0,25 ml inicijalne mobilne faze i količina od 10  $\mu\text{l}$  injektovana je u LC-MS/MS sistem. Sadržaj pesticida u uzorcima vode određen je metodom kalibracione krive.

Za izvođenje hronopotenciometrijske analize, komercijalne formulacije su razblažene do opsega koncentracija koje su bile pogodne za izvođenje analize. U zavisnosti od ispitivanog pesticida, kao i korišćene radne elektrode, ove koncentracije bile su u opsegu 3 - 15 mg/l, te su ova razblaženja ostvarena serijski. Prvobitno razblaženje izvedeno je uz primenu organskog rastvarača (metanola ili acetonitrila), u kojem je velika rastvorljivost pesticida, dok je drugo razblaženje izvedeno u normalnom sudu koji je zatim dopunjen pomoćnim elektrolitom. Za preciznu pripremu razblaženja kod formulacija koje su bile u obliku koncentrovanih suspenzija,

gde nije bilo moguće pipetirati tačnu zapreminu, prethodno je određena tačna gustina formulacija pomoću piknometra, pa je zatim odmerena tačna masa na analitičkoj vagi. Gustina formulacije određena piknometrom računata je pomoću sledeće formule:

$$\rho = \rho_{vode} \times \frac{m_3 - m_1}{m_2 - m_1} \quad (12)$$

Gde su:

$m_1$  – masa praznog piknometra;

$m_2$  – masa piknometra sa bidestilovanom vodom;

$m_3$  – masa piknometra sa formulacijom pesticida;

$\rho_{vode}$  – gustina vode (1 g/ml).

### 3.6 Optimizacija i validacija hronopotenciometrijske metode

Za svaki ispitivani pesticid i korišćenu radnu elektrodu optimizacija uslova i validacija hronopotenciometrijske metode podrazumevala je sledeće faze:

- Ispitivanje reakcionog mehanizma (oksidacija/redukcija) ispitivanog analita na radnoj elektrodi;
- Ispitivanje optimalne metode za uklanjanje rastvorenog kiseonika iz ispitivanog rastvora;
- Ispitivanje uticaja vrste, pH vrednosti i koncentracije pomoćnog elektrolita na analitički signal;
- Ispitivanje i definisanje optimalnog opsega potencijala i struje;
- Ispitivanje i definisanje opsega linearnosti;
- Određivanje granice detekcije (LOD - *limit of detection*) i granice kvantifikacije (LOQ – *limit of quantification*);
- Ispitivanje preciznosti;
- Provera tačnosti;
- Ispitivanje uticaja interferencija različitih supstanci;
- Ispitivanje robusnosti;

- Primena razvijene metode za određivanje sadržaja pesticida u uzorcima vode i/ili komercijalnim formulacijama pesticida.

Za izvođenje hronopotenciometrijske analize u procesnu čašu pipetirano je 20 ml analiziranog rastvora. Nakon uklanjanja rastvorenog kiseonika, mešalica se zaustavlja, a posle pauze od 10 s, koja je neophodna da se u okolini radne elektrode ostvari difuzioni prenos mase, snimani su hronopotenciogrami u primenjenom rasponu potencijala, uz primenu konstantne struje. Na početku merenja snimani su hronopotenciogrami slepe probe, a zatim je u ispitivani rastvor dodat analit, uz dodatnu deaeraciju od 15 s i mešanje. Sva ispitivanja izvedena su u 5 ponavljanja primenom elektrode od staklastog ugljenika, odnosno u 3 ponavljanja u slučaju tankoslojne živine elektrode. Na osnovu dobijenih rezultata izračunato je srednje tranziciono vreme, standardna devijacija (SD) i relativna standardna devijacija (RSD). Optimizacija je izvođena na osnovu uticaja ispitivanog parametra na srednju vrednost analitičkog signala, vrednosti SD i RSD, a u slučaju ispitivanja pH i vrste pomoćnog elektrolita, i na osnovu izgleda samog hronopotenciograma. S obzirom na eksponencijalnu zavisnost analitičkog signala od koncentracije, linearnost je ispitana za tri različita opsega koncentracija sa minimalno pet tačaka. Vrednosti LOD i LOQ određene su računskim putem na sledeći način (ICH, 1996):

$$LOD = \frac{3,3 \times S_b}{a} \quad (13)$$

$$LOQ = \frac{10 \times S_b}{a} \quad (14)$$

Gde su:

$S_b$  – standardna devijacija odsečka;

$a$  – nagib kalibracione krive definisane za najniži koncentracioni opseg.

Preciznost razvijene metode procenjena je na osnovu ponovljivosti (preciznost u toku jednog dana) i reproduktivnosti (preciznost u toku više dana). Ponovljivost je izražena vrednošću RSD za pet analiza identično pripremljenih standardnih rastvora pesticida u pomoćnom elektrolitu u toku istog dana. Reprodutivnost je određena računanjem RSD vrednosti dobijenih analiziranjem identično pripremljenih standardnih rastvora pesticida u pomoćnom elektrolitu za pet različitih dana. Eksperimenti su obuhvatali dve koncentracije svakog ispitivanog pesticida. Vrednosti RSD < 5% ukazuju na dobru preciznost razvijene metode.

Tačnost razvijene metode procenjena je kvantifikacijom sadržaja ispitivanog pesticida pomoću hronopotenciometrijske analize u model-sistemu, u uzorcima vode i komercijalnim formulacijama pesticida, odnosno računanjem prinosa (eng. *recovery*), računatih kao odnos dobijenih koncentracija hronopotenciometrijskom analizom i stvarno dodatih koncentracija pesticida. Za dodatnu procenu tačnosti metode, analiza uzoraka vode izvedena je i komparativnom LC-MS/MS tehnikom. Rezultati dobijeni hronopotenciometrijskom analizom statistički su poređeni sa rezultatima komparativne hromatografske tehnike korišćenjem Studentovog t-testa uparenih vrednosti. U slučaju analiziranja sadržaja pesticida u komercijalnim formulacijama, rezultati hronopotenciometrijske metode statistički su poređeni sa deklarisanim vrednostima sadržaja pesticida primenom Studentovog t-testa uparenih vrednosti.

Realni uzorci vode su kompleksnog hemijskog sastava usled prisustva neorganskih jona koji mogu znatno uticati na analitički signal ispitivanog pesticida. Selektivnost razvijene hronopotenciometrijske metode ispitana je u prisustvu različitih koncentracija neorganskih jona koji su najčešće prisutni u realnim uzorcima vode. Eksperimenti su obuhvatali sledeće jone:  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $Cl^-$ ,  $HCO_3^-$ ,  $NO_3^-$  i  $Fe^{2+}$ , koji su dodavani u rastvor u odnosima koncentracija pesticid:interferent: 1:0,1; 1:1; 1:5; 1:10 i 1: 50. Razvijena metoda se može okarakterisati kao selektivna ukoliko interferirajuća supstanca ne dovodi do promene analitičkog signala veće od  $\pm 5\%$ .

Robusnost metode procenjena je ispitivanjem uticaja malih promena eksperimentalnih parametara metode na analitički signal analita, a upoređene su vrednosti analitičkog signala pre i nakon promene ispitivanog parametra (ICH, 1996). Ispitivane su promene pH pomoćnog elektrolita ( $\pm 0,2$ ), početnog potencijala ( $\pm 0,05$  V) i vrednosti struje ( $\pm 0,1$   $\mu A$ ). Ispitivanje robusnosti metode izvedeno je za dve koncentracije pesticida.

### 3.7 Izvođenje hromatografske (LC-MS/MS) analize

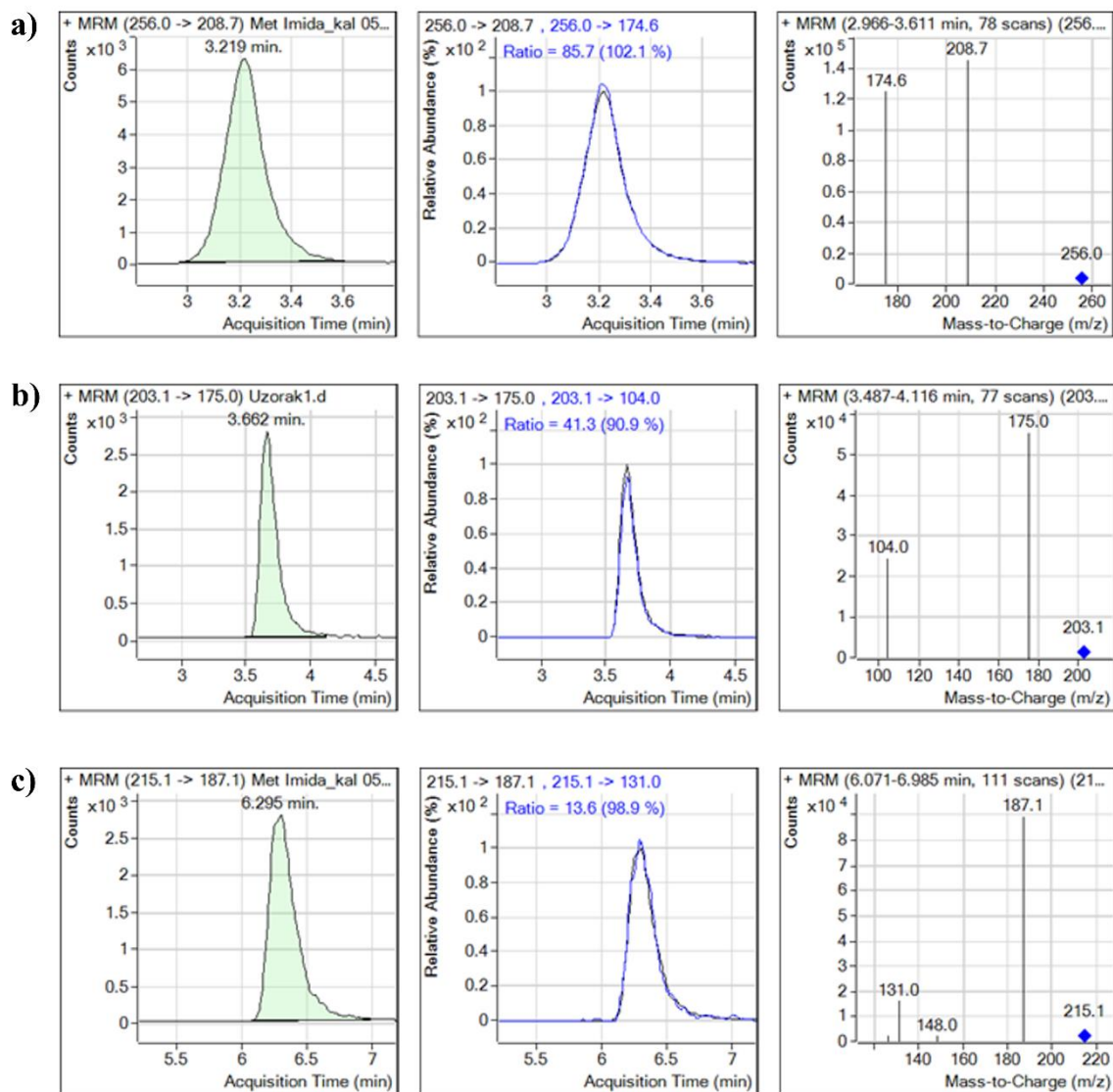
LC-MS/MS analiza uzoraka vode izvedena je nakon pripreme uzoraka uz opisani postupak ekstrakcije na čvrstoj fazi (poglavlje 3.5.1), na tečnom hromatografu uz primenu trostrukog kvadrupolnog masenog spektrometra. Razdvajanje pesticida postignuto je korišćenjem XBridge C18 kolone (150 x 3 mm, 3,5  $\mu m$ ) (Waters, Milford, USA). Korišćena je

mobilna faza koja se sastojala od rastvarača A (0,1%, v/v mravlje kiseline u metanolu) i B (0,1%, v/v mravlje kiseline u vodi), pri protoku od 0,5 ml/min i gradijentnim uslovima elucije. Gradijentni program započinje sa 70% mobilne faze B održanim konstantnim tokom 2 minuta, praćenim linearnim gradijentom od 50% B nakon 15 minuta, konstantnim režimom u trajanju od 4 minuta, uz konačno smanjenje do 30% B nakon 20 minuta i održavanje konstantnog režima tokom 6 minuta. Temperatura kolone održavana je na 40°C. Maseni spektrometar funkcionisao je u MRM režimu rada (eng. *multiple reactions monitoring*) masene analize pozitivnih jona dobijenih elektrosprej-jonizacijom. Operativni parametri masenog spektrometra bili su sledeći: temperatura gasa za sušenje 350°C, a temperatura isparivača 250°C. Azot je korišćen kao gas za raspršivanje sa pritiskom na raspršivaču od 50 psi, protokom gasa od 5 l/min, naponom kapilare od 3500 V i naponom punjenja od 2000 V. Za kvantifikaciju, za svaki pesticid, izabrane su dve tranzicije (Tabela 6). Kontrola parametara, analiza i obrada podataka izvedena je primenom MassHunter Workstation softvera (Agilent Technologies, USA). Snimljeni hromatogrami jona i maseni spektri za ispitivane pesticide u spajkovanim (eng. *spiked*) uzorcima vode prikazani su na Slici 17.

**Tabela 6.** MRM prelazi (m/z) sa retencionim vremenima ispitivanih pesticida

Pesticid	Prekursor jon	Produkt jon	Rt (min)
Imidaklopid	256	208,7	3,30
	256	174,6	
Metamitron	203,1	175,0	3,70
	203,1	104,0	
Metribuzin	215,1	187,1	6,30
	215,1	131,0	



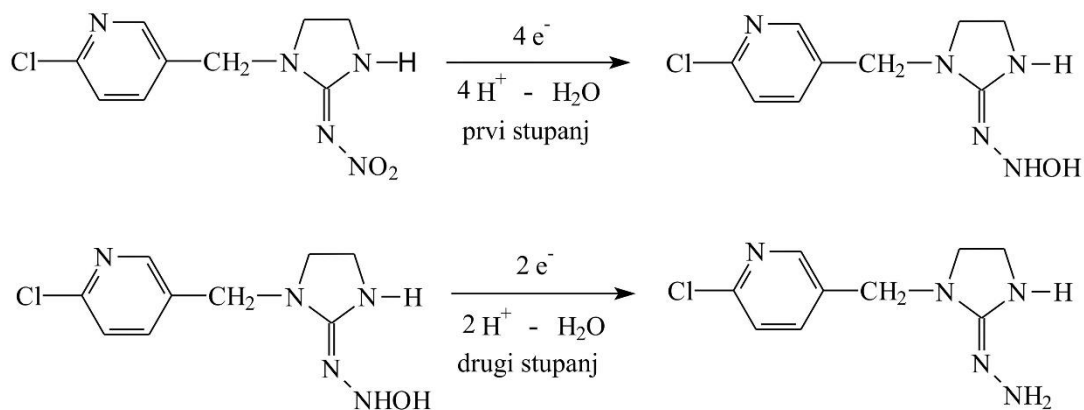


**Slika 17.** MRM hromatogrami jona i odgovarajući maseni spektri: **a)** imidakloprida, **b)** metamitrona i **c)** metribuzina u spajkovanim uzorcima vode

## 4 REZULTATI I DISKUSIJA

### 4.1 Određivanje optimalnih uslova za hronopotenciometrijsko određivanje imidakloprida

Pregledom literature ustanovljeno je da se elektroanalitičke metode određivanja imidakloprida zasnivaju na njegovoj redukciji. Na osnovu polarografskih ispitivanja imidaklopid se redukuje u dva stupnja. U prvom stupnju dolazi do redukcije nitro grupe u molekulu, pri čemu se razmenjuju četiri elektrona i nastaje hidroksilamin derivat, a zatim se u drugom stupnju razmenjuju dva elektrona, a novonastali produkt se transformiše do odgovarajućeg amina (Slika 18) (Navalón i sar., 1999). Polutaladni potencijal prvog stupnja javlja se na -1,035 V, a drugog na -1,530 V (Navalón i sar., 1999).



**Slika 18.** Redukcioni mehanizam imidakloprida na živinoj elektrodi

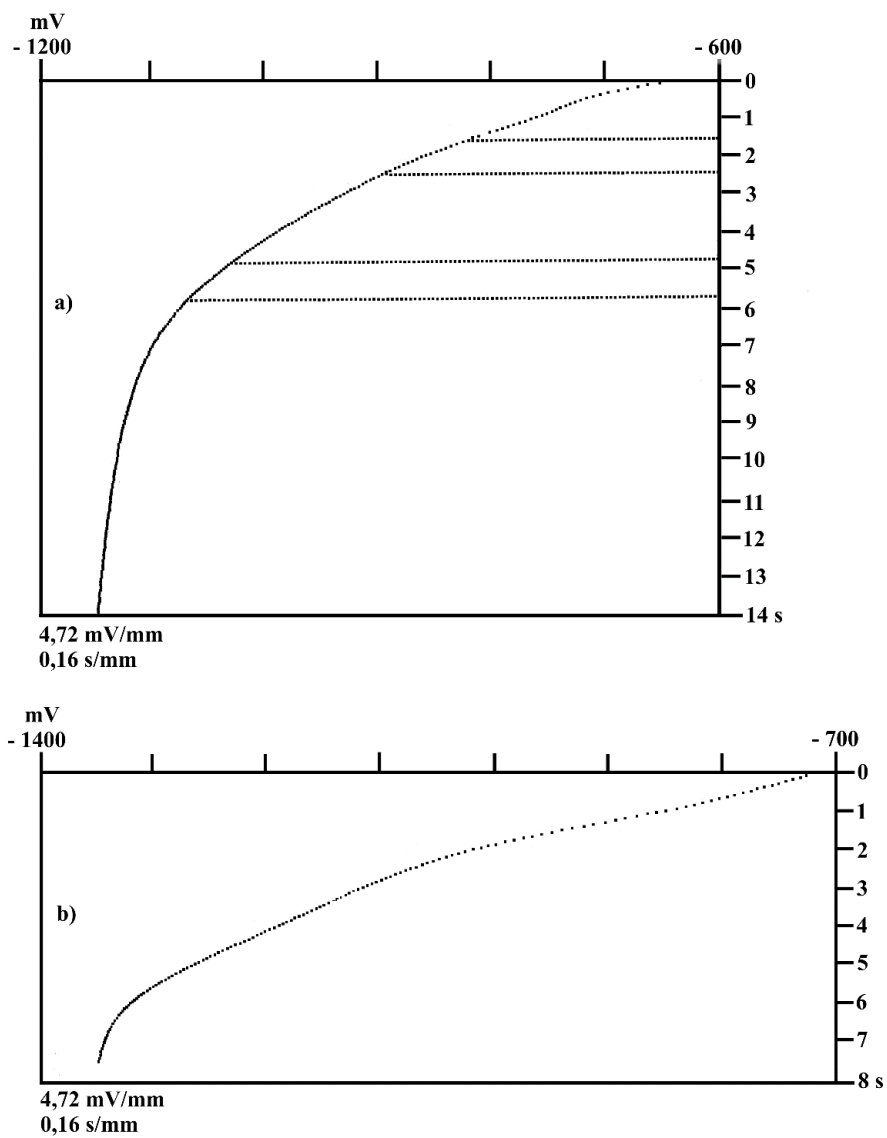
#### 4.1.1 Elektroda od staklastog ugljenika

Preliminarni eksperimenti u cilju hronopotenciometrijskog određivanja imidakloprida izvedeni su snimanjem hronopotenciograma u negativnom rasponu potencijala u Britton-Robinson puferu pH 8. Prisustvo rastvorenog kiseonika u ispitivanom rastvoru dovelo je do smetnji u izvođenju analize usled redukcije kiseonika na radnoj elektrodi, a u svrhu njegovog uklanjanja korišćen je azot. Deaeracija je izvođena uz mešanje rastvora u trajanju od 10 minuta. Nakon uklanjanja rastvorenog kiseonika u slepoj probi nisu detektovani signali. Potom je u ispitivani rastvor dodavan standardni rastvor imidakloprida, a jedan redukcionni signal uočen je pri potencijalu od -1,2 V, što je za elektrodu od staklastog ugljenika potvrđeno i od drugih autora (Chen i sar., 2013; Lei i sar., 2013; Guzsány i sar., 2005).

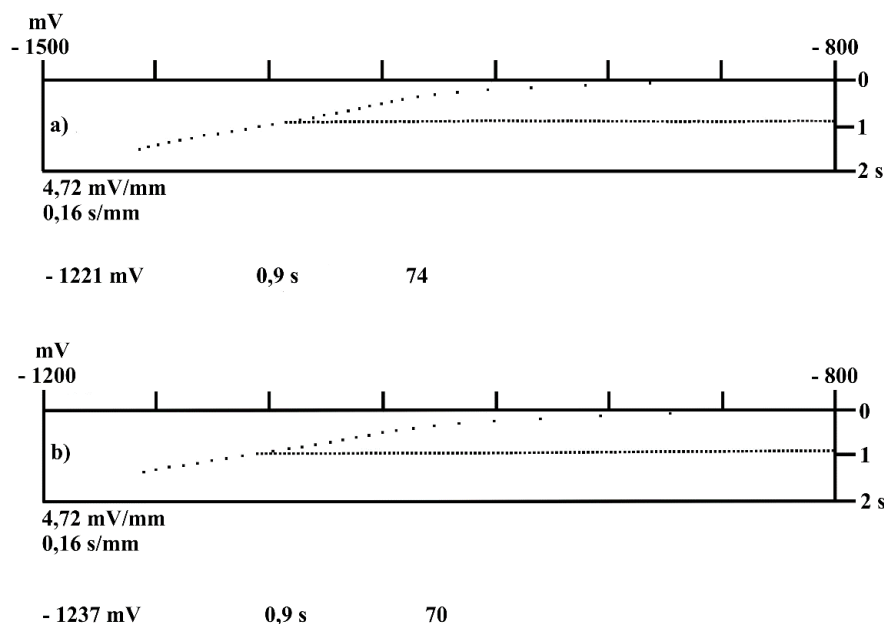
##### 4.1.1.1 Ispitivanje optimalne metode za uklanjanje rastvorenog kiseonika iz rastvora

U cilju skraćanja postupka deaeracije, pored fizičke metode uklanjanja kiseonika primenom azota, ispitana je i mogućnost primene različitih hemijskih sredstava za uklanjanje kiseonika iz rastvora. U tu svrhu primenjeni su: natrijum-sulfit, askorbinska kiselina, oksalna kiselina, kalijum-bromid i natrijum-bromid. Eksperimenti su izvedeni dodavanjem navedenih supstanci u Britton-Robinson pufer pH 8, nakon čega je rastvor mešan u trajanju od 30-60 s, a zatim izvedena analiza. U ispitivani rastvor zatim je dodavan imidaklopid u različitim koncentracijama, a dobijeni hronopotenciogrami međusobno su upoređeni.

Dodatkom askorbinske kiseline, oksalne kiseline, kalijum-bromida i natrijum-bromida nije bilo moguće eliminisati smetnje izazvane kiseonikom iz rastvora, a signal imidakloprida se nije mogao registrovati čak ni pri višim koncentracijama (40 mg/l i 60 mg/l). Kao najbolje hemijsko sredstvo pokazao se natrijum-sulfit, pri čemu je kiseonik uklonjen iz rastvora nakon 30 s mešanja rastvora, a nakon dužeg stajanja na vazduhu, ili višestrukog dodatka standardnog rastvora imidakloprida, dovoljno je rastvor mešati u trajanju od 15 s kako bi se nesmetano izvela analiza. Takođe, ovom metodom postignuta je ista osetljivost kao i u slučaju provođenja azota, pa su u daljem radu ove dve metode međusobno poređene. Poređenja radi, hronopotenciogrami snimljeni nakon dodatka askorbinske kiseline, kalijum-bromida, 8,85 g/l natrijum-sulfita i provođenjem azota u trajanju od 10 minuta prikazani su na slikama 19 i 20.



**Slika 19.** Hronopotenciogrami dobijeni u Britton-Robinson puferu pH 8;  $c_{im} = 15 \text{ mg/l}$  nakon dodatka: **a)** askorbinske kiseline, **b)** kalijum-bromida



**Slika 20.** Hronopotenciogrami dobijeni u Britton-Robinson puferu pH 8;  $c_{im} = 15$  mg/l nakon:  
**a)** dodatka 8,85 g/l natrijum-sulfita, **b)** 10 minuta provođenja struje azota

Kod fizičke metode ispitana su različita vremena, a kod hemijske različite koncentracije natrijum-sulfita, kao i kombinacija ove dve metode. U Tabeli 7 prikazan je uticaj primenjene metode deaeracije na analitički signal imidakloprida koncentracije 15 mg/l.

U pojedinim slučajevima izvođenja analize uz primenu fizičke metode uklanjanja kiseonika dolazilo je do smetnji usled blokiranja aktivne površine elektrode mehurima azota, a analitički signal imidakloprida mogao se registrovati nakon brisanja aktivne površine radne elektrode filter-hartijom nakvašenom bidestilovanom vodom, ali su tada dobijeni razvučeni signali. Takođe, usled višestrukog dodavanja analita, hermetički zatvorena aparatura mora se otvoriti, pri čemu kiseonik ponovo ulazi u rastvor i pravi smetnje, pa je neophodna dodatna deaeracija.

U cilju određivanja optimalne koncentracije natrijum-sulfita, u ispitivani rastvor dodavane su različite zapremine zasićenog rastvora natrijum-sulfita (230 g/l). Ispitivane koncentracije natrijum-sulfita bile su u rasponu od 0,6 g/l do 230 g/l (Tabela 7). Pri koncentraciji natrijum-sulfita od 0,6 g/l nije dobijen signal analita, dok je najviši signal dobijen kada je zasićeni rastvor natrijum-sulfita korišćen kao pomoćni elektrolit, ali uz najlošiju reproduktivnost (RSD = 19,63%). U svim daljim eksperimentima usvojena je koncentracija

natrijum-sulfita od 8,85 g/l, s obzirom da je pri ovoj koncentraciji dobijena visoka vrednost signala uz najbolju reproduktivnost (RSD = 1,50%). Rastvoreni kiseonik je uklonjen iz rastvora uz 30 s mešanja, odnosno 15 s za svaki naredni dodatak standardnog rastvora.

**Tabela 7.** Analitički signal imidakloprida ( $c_{im} = 15 \text{ mg/l}$ ) u zavisnosti od primenjene metode uklanjanja kiseonika iz rastvora na elektrodi od staklastog ugljenika

	Metoda uklanjanja kiseonika	Vreme redukcije (s)	RSD (%)
Fizička	Vreme provođenja azota (min)		
	5	$0,58 \pm 0,03^a$	2,59
	10	$0,88 \pm 0,05$	2,84
	15	$0,87 \pm 0,05$	2,87
Hemijska	Koncentracija natrijum-sulfita (g/l)		
	0,6	/	/
	1,14	$0,78 \pm 0,09$	5,73
	1,71	$0,78 \pm 0,17$	10,73
	2,27	$0,72 \pm 0,09$	6,21
	2,84	$0,74 \pm 0,11$	7,40
	3,40	$0,72 \pm 0,09$	6,21
	3,96	$0,72 \pm 0,09$	6,21
	4,51	$0,70 \pm 0,06$	3,99
	6,70	$0,88 \pm 0,17$	9,51
	8,85	$0,90 \pm 0,03$	1,50
	10,95	$0,94 \pm 0,23$	12,13
230,0	$0,98 \pm 0,38$	19,63	
N <sub>2</sub> i Na <sub>2</sub> S <sub>03</sub>	Kombinacija		
	4,51 g/l natrijum-sulfita i 5 minuta azot	$0,66 \pm 0,05$	3,79

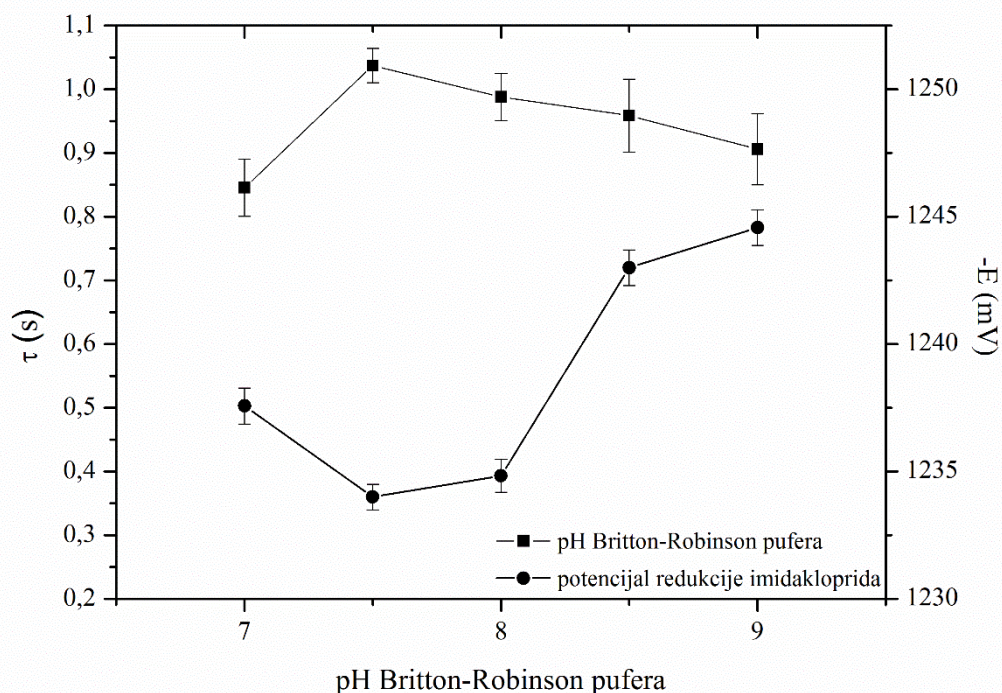
<sup>a</sup>Srednja vrednost  $\pm 2SD$ , n = 5.

#### **4.1.1.2 Uticaj vrste, pH i koncentracije pomoćnog elektrolita na analitički signal imidakloprida**

Izbor pomoćnog elektrolita predstavlja osnovni korak pri razvoju elektroanalitičke metode, s obzirom da njegov sastav i pH mogu znatno uticati na elektrohemijske reakcije koje se odvijaju na površini elektrode. Zavisnost hronopotenciomterijskih signala imidakloprida od vrste pomoćnog elektrolita ispitana je korišćenjem rastvora Britton-Robinson pufera; 0,1 mol/l citratnog pufera pH 8; 0,1 mol/l fosfatnog pufera pH 6 i 4,5 g/l natrijum-sulfita. Koncentracija imidakloprida u pomoćnom elektrolitu iznosila je 20 mg/l, a primenjena je struja redukcije od -13,6  $\mu$ A. Snimanjem hronopotenciograma od -0,91 V do -1,42 V u svim ispitivanim rastvorima dobijen je jedan redukcionni pik pri potencijalima od -1,18 do -1,28 V. Snimanjem hronopotenciograma u pozitivnom smeru potencijala nije dobijen signal analita, što je ukazivalo na ireverzibilnost elektrodne reakcije. Od ispitivanih pomoćnih elektrolita najveća osetljivost, uz dobru oštrinu redukcionog pika i dobru reproduktivnost ostvarena je u Britton-Robinson puferu, pa je on usvojen kao pomoćni elektrolit u svim daljim eksperimentima.

U cilju optimizacije pH vrednosti Britton-Robinson pufera pripremljeni su puferi u rasponu pH od 2 do 12. Ispitivanja su izvedena u opsegu potencijala -0,91 V do -1,42 V, uz primenjenu struju redukcije od -12,1  $\mu$ A. Signal imidakloprida (15 mg/l) javljao se u uskim pH granicama od 7 do 9, a rezultati su prikazani na Slici 21. Svaka tačka na dijagramu predstavlja srednju vrednost dobijenu za pet uzastopnih merenja, dok je reproduktivnost prikazana kao 2SD odstupanje od srednje vrednosti.

Kao što se može videti, do pH 7,5 došlo je do blagog porasta signala, koji je zatim opadao do pH 9. Kako se maksimalna vrednost signala imidakloprida dobijala pri pH 7,5 (1,04 s), uz najbolju reproduktivnost (RSD = 2,60%), ova vrednost je usvojena kao optimalna. Na istoj slici prikazani su i potencijali pri kojima se javljao imidakloprid pri različitim pH vrednostima Britton-Robinson pufera. Variranjem pH, potencijal redukcije kretao se u rasponu od -1234 mV do -1245 mV (Slika 21).



**Slika 21.** Uticaj pH Britton-Robinson pufera na analitički signal i potencijal redukcije imidakloprida na elektrodi od staklastog ugljenika ( $C_{im} = 15 \text{ mg/l}$ ,  $i_{red} = -12,1 \text{ } \mu\text{A}$ )

U sledećoj fazi eksperimenata ispitan je uticaj koncentracije Britton-Robinson pufera na analitički signal imidakloprida. U tu svrhu ispitani su puferi različitih koncentracija 0,01; 0,02; 0,03 i 0,04 mol/l. Eksperimenti su izvedeni u model-rastvoru sadržaja 15 mg/l imidakloprida, pri rasponu potencijala od -0,91V do -1,42 V, uz primenjenu vrednost redukcione struje od -12,5  $\mu\text{A}$ . Dobijene srednje vrednosti signala za pet uzastopnih analiza, kao i odstupanje od srednje vrednosti izraženo kao vrednost 2SD prikazani su na Slici 22.

Povećanjem koncentracije Britton-Robinson pufera dolazilo je do blagog porasta signala imidakloprida od 0,74 s do 0,80 s (Slika 22). Pored toga, najbolja reproduktivnost merenja ( $RSD = 1,69\%$ ) ostvarena je u slučaju 0,04 mol/l koncentracije, tako da je ova koncentracija usvojena kao optimalna. Hronopotenciogram dobijen u Britton-Robinson puferu pH 7,5 pre i nakon dodatka standardnog rastvora imidakloprida prikazan je na Slici 23.

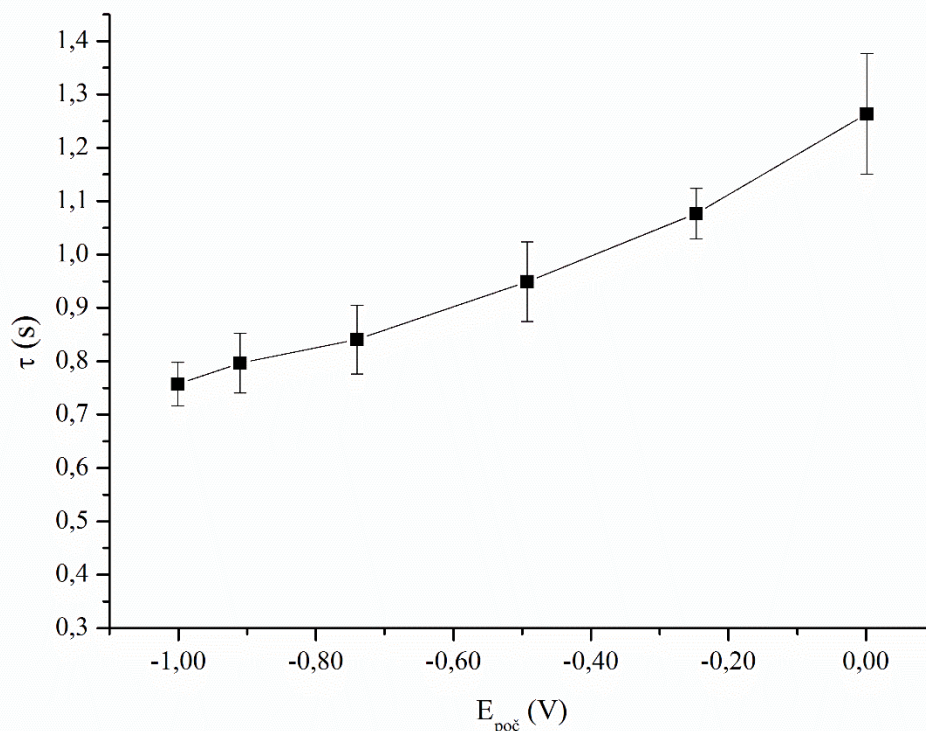




#### 4.1.1.3 Uticaj početnog potencijala na analitički signal imidakloprida

Uticaj početnog potencijala na analitički signal imidakloprida ispitan je u intervalu od 0 V do -1,0 V, primenjena struja iznosila je -12,1  $\mu\text{A}$ , završni potencijal -1,42 V, a sadržaj imidakloprida u ispitivanom rastvoru iznosio je 15 mg/l. Za svaku ispitivanu tačku izvedeno je pet analiza, a srednja vrednost, kao i reproduktivnost merenja izražena kao 2SD od srednje vrednosti prikazane su na Slici 24.

Najviša vrednost analitičkog signala dobijena je primenom početnog potencijala od 0 V, ali je dobijen razvučen hronopotenciogram, uz izrazito lošu reproduktivnost merenja (RSD = 4,48%). Primenom negativnijih vrednosti potencijala elektrolize visina analitičkog signala opadala je do 0,66 s. Kao optimalna vrednost početnog potencijala usvojena je -0,25 V, pri kojoj je dobijena visoka vrednost analitičkog signala (1,08 s) uz najbolju reproduktivnost (RSD = 2,19%).

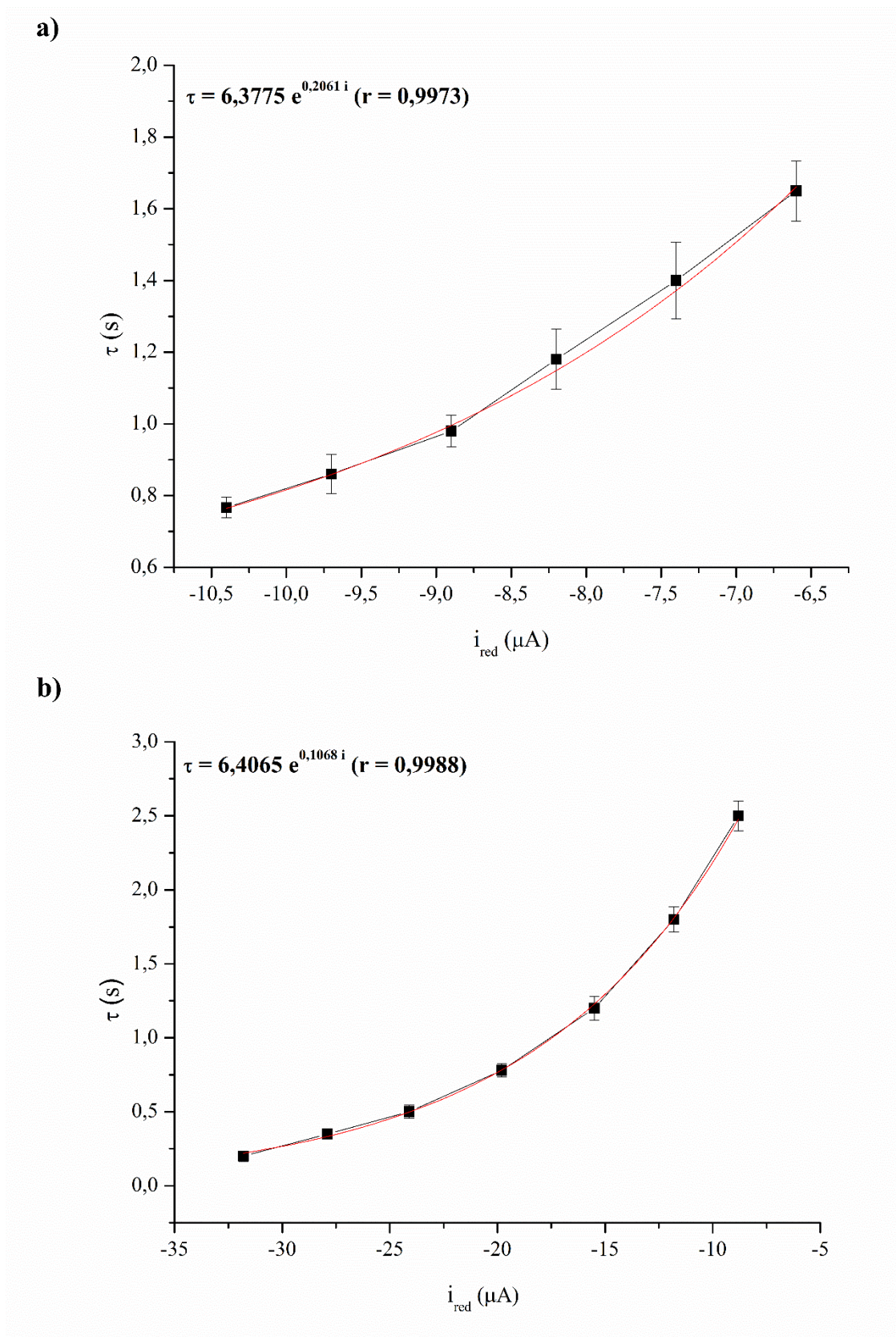


**Slika 24.** Uticaj početnog potencijala na analitički signal imidakloprida na elektrodi od staklastog ugljenika ( $C_{\text{im}} = 15 \text{ mg/l}$ ,  $i_{\text{red}} = -12,1 \mu\text{A}$ )

#### 4.1.1.4 Uticaj struje na analitički signal imidakloprida

U hronopotencijometriji struja predstavlja jedan od najvažnijih parametara analize, pošto ona ima najviše uticaja na visinu i oštrinu analitičkog signala. Uticaj struje na analitički signal ispitan je u rastvorima imidakloprida sadržaja 10 mg/l i 30 mg/l. Za nižu koncentraciju (10 mg/l) struja je varirana u opsegu od -6,6  $\mu$ A do -10,4  $\mu$ A, dok je za koncentraciju od 30 mg/l primenjena struja od -8,8  $\mu$ A do -31,8  $\mu$ A. U oba slučaja dobijena je eksponencijalna zavisnost, a dobijene funkcije prikazane su na Slici 25. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost dobijenu za pet uzastopnih ponavljanja; prikazani intervali odnose se na reproduktivnost, a izraženi su kao vrednost 2SD.

Sa Slike 25 može se videti da su za niže apsolutne vrednosti struje dobijene veće vrednosti analitičkog signala, ali uz lošiju reproduktivnost, i obrnuto. Na osnovu kriterijuma o pravolinijskoj zavisnosti  $I \times \tau_{\text{red}}^{1/2} = f(I)$ , odgovarajući intervali struje koje treba primeniti iznose: -6,6  $\mu$ A do -9,7  $\mu$ A za koncentraciju od 10 mg/l i od -14  $\mu$ A do -26  $\mu$ A za koncentraciju od 30 mg/l. U opštem slučaju, za određivanje nižih koncentracija analita treba primeniti i niže apsolutne vrednosti struja, i obrnuto. I pored širokog opsega struje pri kojoj je dobijen signal imidakloprida, potencijal redukcije imidakloprida neznatno je varirao od -1205 mV do -1276 mV (RSD = 1,59%).



**Slika 25.** Uticaj struje na analitički signal imidakloprida na elektrodi od staklastog ugljenika

**a)**  $C_{\text{im}} = 10 \text{ mg/l}$ , **b)**  $C_{\text{im}} = 30 \text{ mg/l}$

#### 4.1.1.5 Linearnost

Linearnost je ispitana u rasponu koncentracija od 7 do 70 mg/l u tri koncentraciona opsega. Za svaki koncentracioni opseg primenjena je različita redukciona struja, a eksperimenti su izvedeni u pet ponavljanja. Kalibracione krive, vrednosti SD nagiba ( $S_a$ ) i odsečka ( $S_b$ ) dobijene metodom najmanjeg kvadrata, uz primenjene vrednosti redukcionne struje prikazane su u Tabeli 8. Pod optimalnim uslovima dobijena je veoma dobra linearnost za sva tri koncentraciona opsega, uz koeficijente korelacije od 0,9976 do 0,9986.

**Tabela 8.** Linearni opsezi koncentracija za hronopotenciometrijsko određivanje imidakloprida primenom elektrode od staklastog ugljenika

Koncentracioni opseg (mg/l)	Redukciona struja ( $\mu\text{A}$ )	Nagib	Odsečak	$S_a^a$	$S_b^b$	r
7 - 15	-6,6	0,046	0,329	0,0031	0,0129	0,9976
10 - 40	-14,0	0,032	0,038	0,0007	0,0012	0,9987
40 - 70	-18,4	0,051	-0,730	0,0002	0,0220	0,9986

$S_a^a$  standardna devijacija nagiba ( $s \times l/\text{mg}$ ),  $n = 5$ .

$S_b^b$  standardna devijacija odsečka ( $s$ ),  $n = 5$ .

#### 4.1.1.6 Granica detekcije i granica kvantifikacije

Vrednosti LOD i LOQ određene su računskim putem (izraz 14 i 15) na osnovu vrednosti standardne devijacije odsečka i vrednosti nagiba definisanih za kalibracionu krivu za najniži opseg koncentracija (7 - 15 mg/l). Dobijene vrednosti za LOD i LOQ iznosile su redom 0,92 mg/l i 2,80 mg/l.

#### 4.1.1.7 Preciznost

Preciznost je procenjena na osnovu ponovljivosti i reproduktivnosti za dve koncentracije imidakloprida. Analizirani su rastvori sa sadržajem imidakloprida od 10 i 30 mg/l, dok su primenjene redukcionne struje iznosile -8,9 i -16,7  $\mu\text{A}$ .

Dobijene vrednosti RSD analizom rastvora imidakloprida u toku istog dana iznosile su 1,43% (10 mg/l) i 1,20% (30 mg/l). Analizom rastvora imidakloprida u toku pet različitih dana



dobijene vrednosti RSD iznosile su 3,44% (10 mg/l) i 2,64% (30 mg/l). Srednja vrednost potencijala redukcije na elektrodi od staklastog ugljenika iznosila je -1237 mV. Vrednosti RSD potencijala redukcije imidakloprida za niži i viši sadržaj analita iznosile su 0,65% i 0,15%, po redosledu navođenja.

#### 4.1.1.8 Tačnost metode

Ispitivanje tačnosti metode uz primenu elektrode od staklastog ugljenika izvedeno je analizom model-rastvora imidakloprida koji su sadržali različite koncentracije imidakloprida (10, 15 i 20 mg/l). Kvantifikacija je izvedena metodom kalibracione krive, određivanja su izvedena u tri ponavljanja, a određeni sadržaji uz vrednosti SD i prinosa prikazane su u Tabeli 9.

**Tabela 9.** Rezultati određivanja imidakloprida u rastvorima poznatih koncentracija razvijenom hronopotenciometrijskom metodom uz primenu elektrode od staklastog ugljenika

Koncentracija rastvora (mg/l)	Određena količina (mg/l) <sup>a</sup>	Prinos (%)
10	10,23 ± 0,67	102,26
15	15,27 ± 0,54	101,80
20	20,38 ± 0,49	101,90

<sup>a</sup>Srednja vrednost ± 2SD, n = 3.

Vrednosti prinosa za analizirane rastvore kretale su se u opsegu 101,80% do 102,26%, što potvrđuje da su rezultati za određivane koncentracije približni vrednostima dodatih koncentracija. Vrednosti RSD kretale su se u opsegu 1,21% do 3,26% ukazujući na relativno dobru reproduktivnost razvijene hronopotenciometrijske metode na elektrodi od staklastog ugljenika.

#### 4.1.1.9 Interferencije

Ispitivanje interferencija pojedinih neorganskih jona na analitički signal imidakloprida primenom elektrode od staklastog ugljenika izvedeno je pri koncentraciji imidakloprida od 10 i 20 mg/l. Eksperimenti su izvedeni u model sistemu, a primenjena struja za nižu koncentraciju

pesticida iznosila je  $-8,9 \mu\text{A}$ , dok je za višu koncentraciju iznosila  $-13,4 \mu\text{A}$ . Dobijeni rezultati prikazani su u Tabeli 10.

Kao što se iz prikazanih rezultata može videti, najveće varijacije analitičkog signala imidakloprida u rasponu od  $-4,76\%$  do  $4,96\%$  uočene su u prisustvu  $\text{Ca}^{2+}$  jona u analiziranom rastvoru (Tabela 10). Sa druge strane, prisustvo  $\text{Fe}^{2+}$  jona u ispitivanom rastvoru u koncentraciji od  $1 \text{ mg/l}$  dovodilo je do blagog smanjenja signala imidakloprida, dok je pri većim koncentracijama dolazilo do blokiranja radne elektrode pri potencijalu od  $-1,3 \text{ V}$ . Ova pojava može se objasniti redukcijom  $\text{Fe}^{2+}$  jona (Bard i sar., 1985), čime se u određenoj meri smanjuje selektivnost metode. Kako je koncentracija  $\text{Fe}^{2+}$  jona u rečnoj vodi niža od pomenute vrednosti ( $0,7 \text{ mg/l}$ ) (WHO, 2008), uticaj ovog jona može se zanemariti. Međutim, treba obratiti pažnju ukoliko se razvijena metoda koristi za određivanje ovog insekticida u uzorcima podzemnih voda, jer se u takvim uzorcima očekuju povećani sadržaji jona gvožđa. U tom slučaju neophodno je prethodno ukloniti jone gvožđa iz analiziranih rastvora adekvatnom pripremom uzorka.

**Tabela 10.** Uticaj neorganskih jona na hronopotenciometrijsko određivanje imidakloprida primenom elektrode od staklastog ugljenika

Varijacija analitičkog signala imidakloprida za ispitane odnose koncentracija imidaklopid:interferent (%)					
Interferent	1:0,1	1:1	1:5	1:10	1:50
$\text{K}^+$	0,75	-0,75	-0,38	-3,08	-3,20
$\text{Na}^+$	-1,54	-3,59	0,14	-3,50	3,38
$\text{Ca}^{2+}$	-1,80	-3,59	-4,76	-0,99	4,96
$\text{Mg}^{2+}$	2,00	2,40	-3,11	-3,88	4,00
$\text{SO}_4^{2-}$	-0,60	-1,80	-4,39	-1,30	-2,60
$\text{Cl}^-$	2,43	4,27	-4,54	-4,91	-4,27
$\text{HCO}_3^-$	3,75	2,60	-3,61	-1,25	-2,60
$\text{NO}_3^-$	-3,08	3,91	-4,57	-4,23	3,72
$\text{Fe}^{2+}$	-0,14	/	/	/	/

#### **4.1.1.10 Robusnost**

Robusnost hronopotenciometrijske metode na elektrodi od staklastog ugljenika ispitana je u rastvorima imidakloprida koncentracija 10 mg/l i 30 mg/l u pomoćnom elektrolitu, primenom struje od  $-8,9 \mu\text{A}$ , odnosno  $-16,7 \mu\text{A}$  za višu koncentraciju.

Kod rastvora niže koncentracije, variranje pH Britton-Robinson pufera u granicama  $7,5 \pm 0,2$  nije dovelo do promene analitičkog signala imidakloprida, dok su promene analitičkog signala kod variranja početnog potencijala ( $-0,25 \pm 0,05 \text{ V}$ ), i struje ( $-8,9 \pm 0,1 \mu\text{A}$ ) bile u granicama 0,63% do 1,23%.

Za višu koncentraciju imidakloprida od 30 mg/l variranje struje ( $-16,7 \pm 0,1 \mu\text{A}$ ) nije imalo uticaja na visinu signala, dok su promene usled variranja početnog potencijala i pH iznosile  $-1,52\%$  i  $-2,02\%$  po redosledu navođenja. Konstantnost tranzicionih vremena pri variranju osnovnih parametara analize ukazuje da je razvijena metoda robusna.

#### **4.1.1.11 Primena razvijene hronopotenciometrijske metode za određivanje sadržaja imidakloprida u komercijalnim formulacijama**

Kako bi se ispitala mogućnost primene razvijene hronopotenciometrijske metode za određivanje sadržaja imidakloprida, analizirani su sadržaji komercijalnih preparata koji sadrže imidakloprid kao aktivnu materiju. Analiza komercijalnih formulacija izvedena je bez pripreme uzoraka, samo uz neophodno razblaženje, primenom optimalnih uslova hronopotenciometrijske metode. Tokom analize formulacija u tečnom stanju, usled dodatka različitih nepesticidnih komponenata koje poboljšavaju karakteristike formulacije, dolazilo je do prljanja aktivne površine staklastog ugljenika, uz izraženu nereproduktivnost analitičkih signala. U cilju povećanja reproduktivnosti, između analiza izvedeno je elektrohemijsko čišćenje površine staklastog ugljenika. Ova procedura sastojala se od 10 ciklusa promene potencijala u analiziranom rastvoru pri rasponu potencijala u kojem se inače izvodi analiza (od  $-0,25$  do  $-1,42 \text{ V}$ ), primenom struje od  $-12,1 \mu\text{A}$ . Na ovaj način omogućeno je da svaka analiza bude izvedena na sveže aktiviranoj površini (Wang i Lin, 1988). Svaka formulacija analizirana je u tri ponavljanja, a kvantitativno određivanje sadržaja imidakloprida izvedeno je metodom kalibracione krive. Sadržaji imidakloprida deklarirani od strane proizvođača, dobijene vrednosti sadržaja primenom hronopotenciometrijske metode uz vrednosti 2SD i prinosa prikazane su u Tabeli 11.

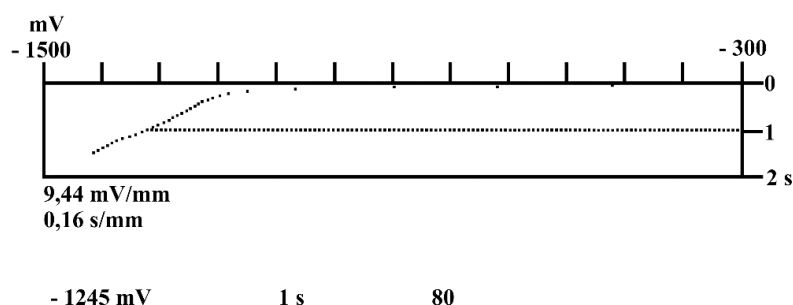


**Tabela 11.** Rezultati dobijeni analizom komercijalnih formulacija imidakloprida primenom razvijene hronopotenciometrijske metode na elektrodi od staklastog ugljenika

Komercijalna formulacija	Deklarisano	Određeno <sup>a</sup>
<b>Sadržaj imidakloprida (g/l)</b>		
<i>Prestige 290</i>	140	134,27 ± 6,78 (95,91)
<i>Confidor 200</i>	200	197,02 ± 5,48 (98,51)
<i>Kohinor 200</i>	200	203,33 ± 5,49 (101,67)
<i>Gat Go 20</i>	200	196,46 ± 2,85 (98,23)
<b>Sadržaj imidakloprida (g/kg)</b>		
<i>Confidor 70</i>	700	685,72 ± 16,26 (97,96)
<i>Imidor 70</i>	700	712,19 ± 15,67 (101,74)

<sup>a</sup>Srednja vrednost ± 2SD (prinos, %), n = 3.

Dobro slaganje dobijeno je između određenih sadržaja imidakloprida primenom razvijene metode sa sadržajima deklariranih od strane proizvođača (prinos u granicama 95,91 - 101,74%), čime je potvrđena tačnost razvijene metode. Pored toga, statističkim poređenjem primenom Studentovog t-testa uparenih vrednosti potvrđeno je da se rezultati dobijeni hronopotenciometrijski ne razlikuju značajno od deklariranih vrednosti uz verovatnoću od 95% (izračunate t-vrednosti bile su manje od teorijskih vrednosti). Analizom komercijalnih formulacija signal imidakloprida dobijen je u rasponu potencijala od -1216 do -1304 mV, a hronopotenciogram dobijen analizom formulacije *Gat Go* prikazan je na Slici 26.



**Slika 26.** Hronopotenciogram dobijen analizom formulacije imidakloprida *Gat Go 20* na elektrodi od staklastog ugljenika ( $c_{im} = 15 \text{ mg/l}$ ,  $i_{red} = -12,1 \text{ } \mu\text{A}$ )

### 4.1.2 Tankoslojna živina elektroda

Preliminarni eksperimenti pri hronopotenciometrijskom određivanju imidakloprida primenom tankoslojne živine elektrode izvedeni su u Britton-Robinson puferu pH 8, uz dodatak zasićenog rastvora natrijum-sulfita. U slepoj probi nisu detektovani signali, a kao i u slučaju elektrode od staklastog ugljenika, dodatkom imidakloprida primećen je jedan redukcioni pik pri potencijalu od oko -1 V, koji odgovara redukcionom piku gde se razmenjuju četiri elektrona, odnosno nastaje hidroksilamin. Već u toku preliminarnih eksperimenata uočena je veća osetljivost tankoslojne živine elektrode u odnosu na elektrodu od staklastog ugljenika.

#### 4.1.2.1 Ispitivanje optimalne metode za uklanjanje rastvorenog kiseonika iz rastvora

U cilju ispitivanja optimalne metode za uklanjanje kiseonika iz rastvora uz primenu tankoslojne živine elektrode, upoređene su fizička metoda uz provođenje struje azota u trajanju od deset minuta i hemijska metoda uz korišćenje natrijum-sulfita. Vrednost početnog potencijala iznosila je -0,34 V, završnog -1,35 V, struje redukcije -5  $\mu$ A, dok je koncentracija imidakloprida iznosila 2 mg/l.

Primenom fizičke metode uklanjanja kiseonika provođenjem azota signal imidakloprida ( $c = 2$  mg/l) nije detektovan, a mehuri azota doveli su do oštećenja tankog sloja žive. U cilju ispitivanja uticaja koncentracije hemijskog agensa na analitički signal, kao i u slučaju elektrode od staklastog ugljenika, različite zapremine zasićenog rastvora natrijum-sulfita dodavane su u ispitivani rastvor, sniman je hronopotenciogram slepe probe, a zatim je dodavan standardni rastvor imidakloprida. Dobijene vrednosti prikazane su u Tabeli 12.

**Tabela 12.** Analitički signal imidakloprida ( $c_{im} = 2$  mg/l) uz primenu različitih koncentracija natrijum-sulfita na tankoslojnoj živinoj elektrodi

Koncentracija natrijum-sulfita (g/l)	Vreme redukcije (s)	RSD (%)
4,51	0,83 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	3,43
8,85	0,94 $\pm$ 0,03	1,51
10,95	0,84 $\pm$ 0,03	1,68
20,91	0,92 $\pm$ 0,03	1,55
115,00	0,97 $\pm$ 0,03	1,46

<sup>a</sup>Srednja vrednost  $\pm$  2SD, n = 3.

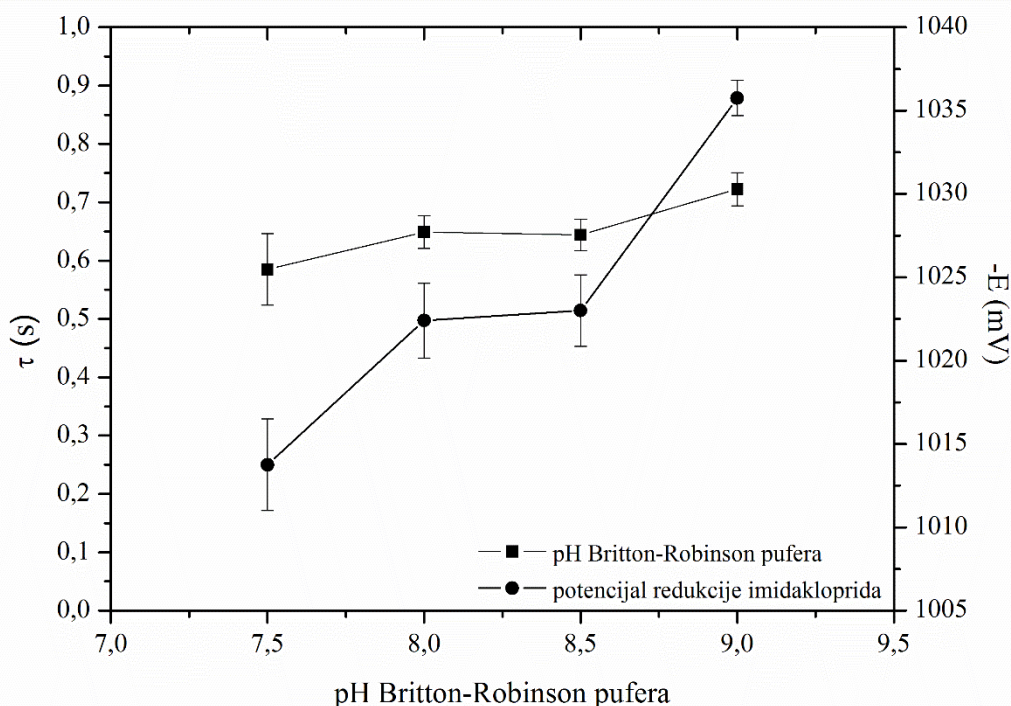
Iako je najviša vrednost analitičkog signala dobijena pri koncentraciji rastvora natrijum-sulfita od 115 g/l (0,97 s), na hronopotenciogramu slepe probe dolazilo je do razvlačenja bazne linije. Najoštriji signal imidakloprida uz najbolju reproduktivnost dobijen je pri koncentraciji natrijum-sulfita od 8,85 g/l, pa je ta vrednost koncentracije usvojena kao optimalna.

#### ***4.1.2.2 Uticaj vrste, pH i koncentracije pomoćnog elektrolita na analitički signal imidakloprida***

Nakon optimizacije metode za uklanjanje kiseonika iz rastvora na taknoslojnoj živinoj elektrodi, ispitano je elektrohemijsko ponašanje imidakloprida u različitim puferima. Eksperimenti su izvedeni u rastvorima sadržaja imidakloprida od 2 mg/l i 4 mg/l, uz početni potencijal od -0,34 V, završni potencijal -1,35 V i primenom redukcione struje od -5  $\mu$ A. Analitički signal imidakloprida dobijen je u Britton-Robinson puferu pH 8; 0,01 mol/l fosfatnom puferu pH 6; 0,1 mol/l citratnom puferu pH 6; 4,5 g/l rastvoru natrijum-sulfita; 0,01 mol/l rastvoru hlorovodonične kiseline i 0,1 mol/l rastvoru NaCl. Najbolje karakteristike u pogledu visine signala, reproduktivnosti merenja i oštine dobijenog signala pokazao je Britton-Robinson pufer. U svim daljim eksperimentima Britton-Robinson pufer je korišćen kao pomoćni elektrolit.

U cilju ispitivanja optimalne pH vrednosti pomoćnog elektrolita, pripremljena je serija Britton-Robinson pufera u rasponu pH od 2 do 12, a koncentracija imidakloprida iznosila je 2 mg/l. Ispitivanja su izvedena u opsegu potencijala od -0,34 V do -1,35 V, uz primenjenu struju redukcije od -5,4  $\mu$ A. Analitički signal imidakloprida dobijen je u rasponu pH od 7,5 do 9 (Slika 27).

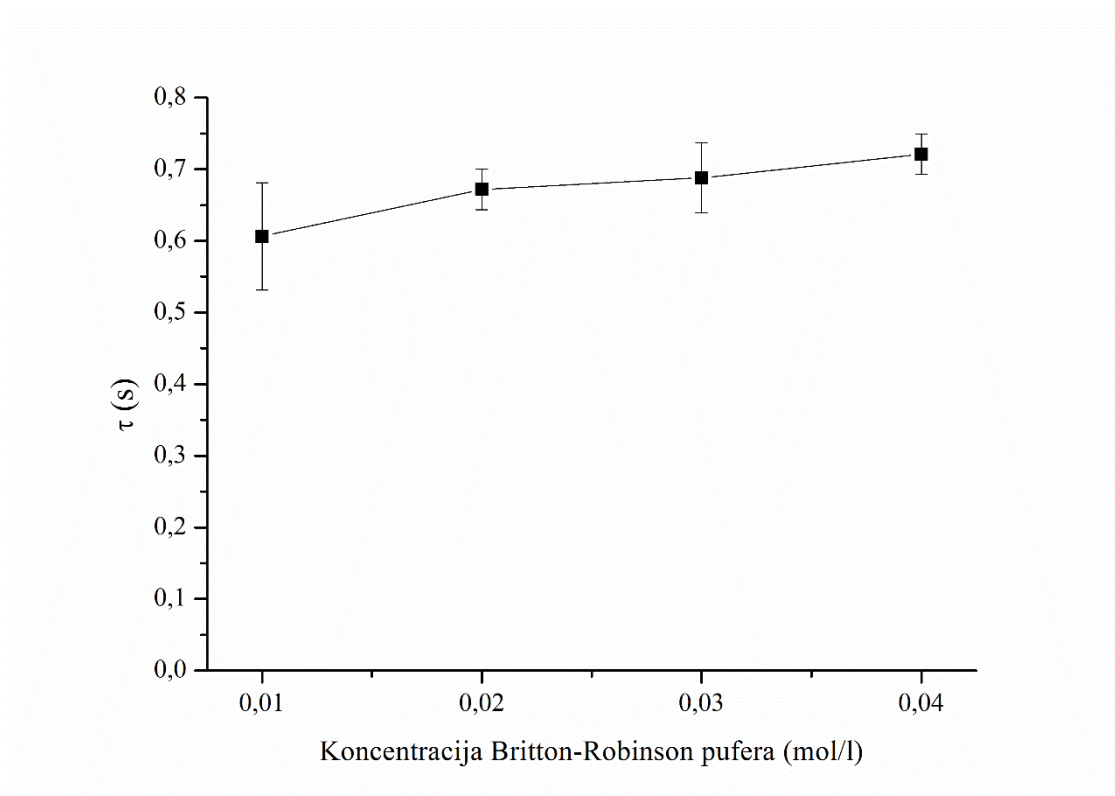
Povećanjem pH vrednosti Britton-Robinson pufera dolazilo je do porasta analitičkog signala imidakloprida, koji je na pH 9 iznosio 0,72 s. Pri istoj pH vrednosti postignuta je i najveća reproduktivnost određivanja (RSD = 3,04%), pa je ova vrednost usvojena kao optimalna. Što se tiče vrednosti potencijala pri kojoj je detektovan imidaklopid, porastom pH vrednosti potencijal redukcije se takođe pomerao ka negativnijim vrednostima, i to od -1014 mV pri pH 7,5 do -1036 mV pri pH 9. U rasponu pH vrednosti Britton-Robinson pufera od 2 do 7, usled blokiranja radne elektrode nije bilo moguće dostići završnu vrednost potencijala, pri pH 10 odgovarajuća osetljivost određivanja nije postignuta, dok se pri većim pH vrednostima signal imidakloprida nije mogao detektovati čak ni pri većim koncentracijama.



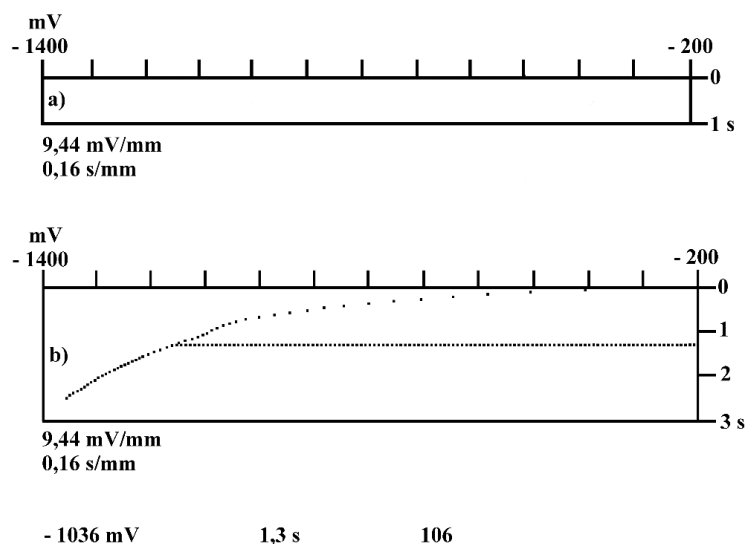
**Slika 27.** Uticaj pH Britton-Robinson pufera na analitički signal i potencijal redukcije imidakloprida na tankoslojnoj živinoj elektrodi ( $C_{im} = 2 \text{ mg/l}$ ,  $i_{red} = -5,4 \text{ }\mu\text{A}$ )

Uticaj koncentracije Britton-Robinson pufera na analitički signal imidakloprida ispitan je u opsegu koncentracija od  $0,01 \text{ mol/l}$  do  $0,04 \text{ mol/l}$ . Eksperimenti su izvedeni u rastvoru imidakloprida sadržaja  $2 \text{ mg/l}$ , u opsegu potencijala od  $-0,34 \text{ V}$  do  $-1,35 \text{ V}$ , uz primenjenu struju redukcije od  $-5,4 \text{ }\mu\text{A}$ . Dobijeni rezultati prikazani su na Slici 28. Svaka tačka na dijagramu odnosi se na srednju vrednost za tri uzastopne analize, a vertikalne linije predstavljaju reproduktivnost merenja izraženu kao 2SD.

Kao što se može videti na Slici 28, povećanjem koncentracije Britton-Robinson pufera uočen je blagi porast signala imidakloprida. Uzimajući u obzir visinu i reproduktivnost vremena redukcije imidakloprida, koncentracija Britton-Robinson pufera od  $0,04 \text{ mol/l}$  usvojena je kao optimalna u svim daljim eksperimentima na tankoslojnoj živinoj elektrodi. Hronopotenciogrami u Britton-Robinson puferu pH 9 pre i nakon dodatka imidakloprida prikazani su na Slici 29.



**Slika 28.** Uticaj koncentracije Britton-Robinson pufera na analitički signal imidakloprida na tankoslojnoj živinoj elektrodi ( $C_{im} = 2 \text{ mg/l}$ ,  $i_{red} = -5,4 \text{ } \mu\text{A}$ )

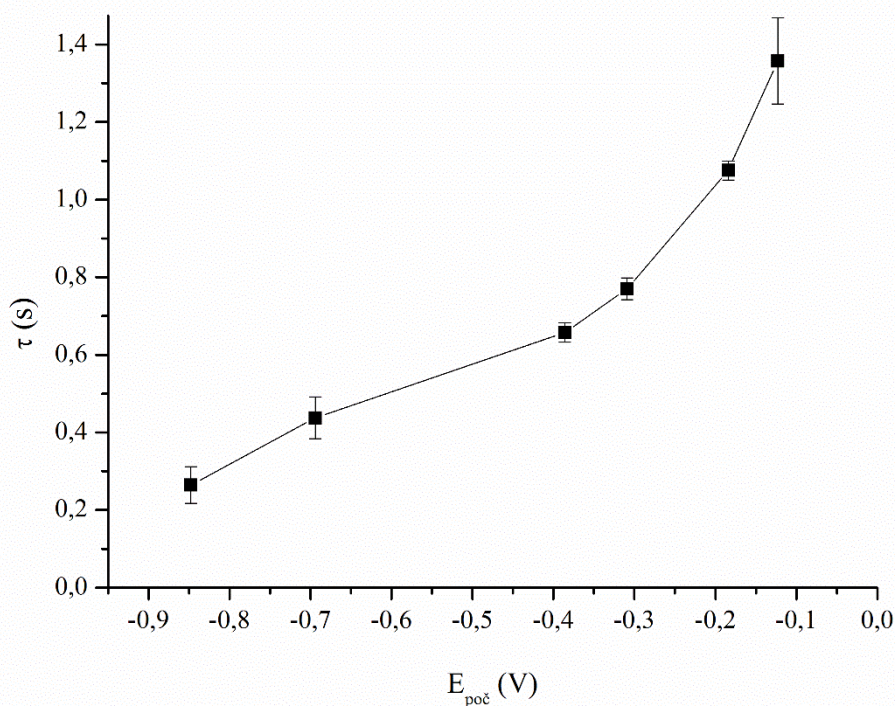


**Slika 29.** Hronopotenciogram dobijen u Britton-Robinson puferu pH 9 na tankoslojnoj živinoj elektrodi ( $i_{red} = -4,6 \text{ } \mu\text{A}$ ): **a)** pre i **b)** nakon dodatka standardnog rastvora imidakloprida ( $C_{im} = 2 \text{ mg/l}$ )

#### 4.1.2.3 Uticaj početnog potencijala na analitički signal imidakloprida

Ispitivanje uticaja početnog potencijala na analitički signal imidakloprida izvedeno je u rastvoru imidakloprida koncentracije 2 mg/l u Britton-Robinson puferu pH 9, primenom završnog potencijala -1,35 V, a struja redukcije iznosila je -5  $\mu$ A. Ispitan je interval potencijala od -0,12 V do -0,85 V, a dobijeni rezultati prikazani su na Slici 30. Svaka tačka na dijagramu predstavlja srednju vrednost za 3 uzastopne analize, a reproduktivnost je prikazana kao 2SD odstupanje od srednje vrednosti.

Vrednosti početnog potencijala pozitivnije od -0,09 V dovodile su do trajnog oštećenja tankog filma žive, dok se pri negativnijim potencijalima analit nije mogao detektovati. Kao što se može videti (Slika 30), analitički signal imidakloprida se povećavao saopštavanjem pozitivnijih vrednosti potencijala elektrolize od 0,26 s do 1,36 s. S obzirom da je najbolja reproduktivnost analitičkog signala imidakloprida ostvarena pri vrednosti početnog potencijala od -0,18 V (RSD = 1,14%), ova vrednost je usvojena kao optimalna i primenjena je u svim daljim eksperimentima primenom tankoslojne živine elektrode.



**Slika 30.** Uticaj početnog potencijala na analitički signal imidakloprida na tankoslojnoj živinoj elektrodi ( $C_{\text{im}} = 2$  mg/l,  $i_{\text{red}} = -5$   $\mu$ A)

#### 4.1.2.4 Uticaj struje na analitički signal imidakloprida

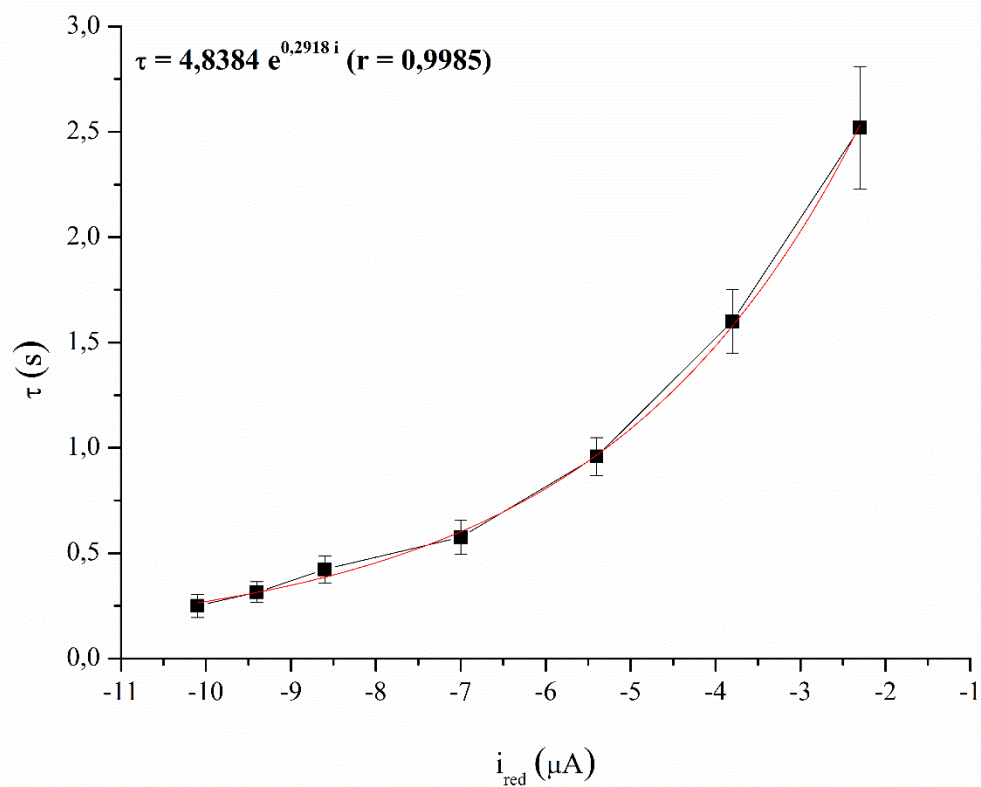
Uticaj struje na analitički signal imidakloprida ispitan je u rastvorima koncentracije 1 i 5 mg/l imidakloprida. U eksperimentima je primenjen usvojeni potencijal elektrolize -0,18 V i završni potencijal -1,35 V. U slučaju niže koncentracije (1 mg/l) struja je varirana od -2,3  $\mu\text{A}$  do -10,1  $\mu\text{A}$ , dok su za višu koncentraciju (5 mg/l) obuhvaćene struje od -3,2  $\mu\text{A}$  do -27,6  $\mu\text{A}$ . Dobijene zavisnosti analitičkog signala imidakloprida od primenjene struje prikazane su na Slici 31. Tačke na dijagramu predstavljaju srednju vrednost za 3 uzastopna merenja dok je reproduktivnost izražena kao 2SD odstupanja od srednje vrednosti.

U oba slučaja dobijena je eksponencijalna zavisnost, odnosno vreme redukcije imidakloprida opadalo je primenom negativnijih vrednosti struja. Negativnije vrednosti struje dovodile su do oštrijih signala i do povećanja reproduktivnosti.

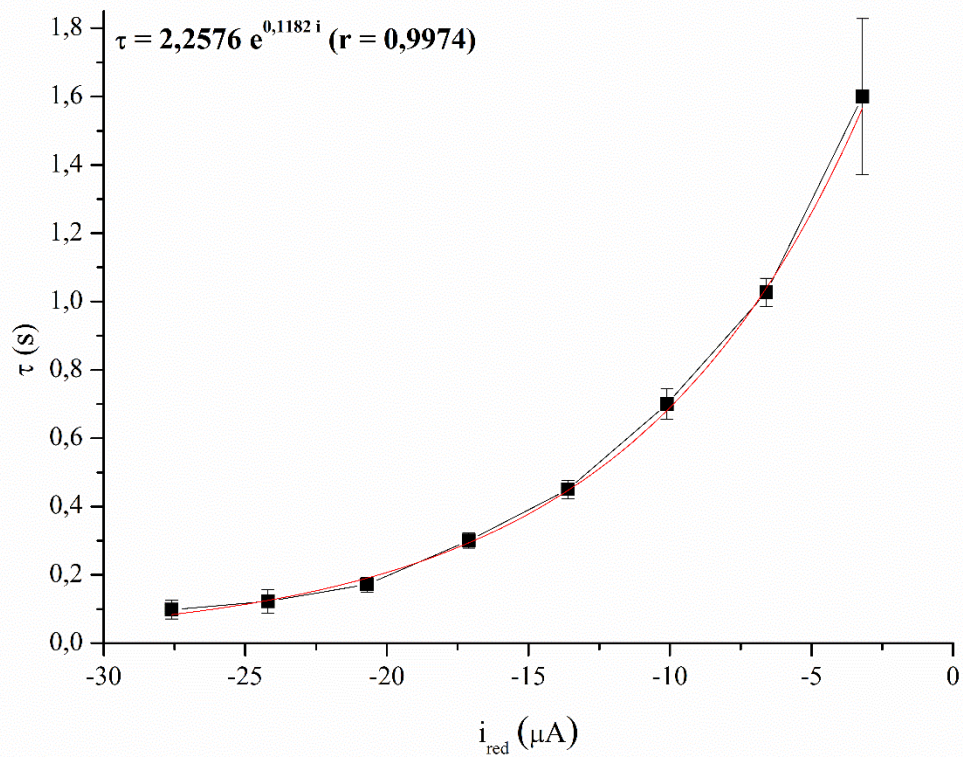
Primenom istog kriterijuma o pravolinijskoj zavisnosti kao i u slučaju elektrode od staklastog ugljenika, određeni su odgovarajući intervali struje koje treba primeniti u slučaju ispitivanih koncentracija, a oni iznose od -3,8  $\mu\text{A}$  do -8,6  $\mu\text{A}$  za koncentraciju od 1 mg/l, dok interval za koncentraciju od 5 mg/l iznosi -10,1  $\mu\text{A}$  do -27,6  $\mu\text{A}$ . Primenom širokog raspona struja redukcije potencijal redukcije imidakloprida varirao je u granicama od -974 mV do -1122 mV, odnosno u nešto širim granicama u odnosu na elektrodu od staklastog ugljenika, uz vrednost RSD = 4,20%.



a)



b)

**Slika 31.** Uticaj struje na analitički signal imidakloprida na tankoslojnoj živinoj elektrodi:a)  $C_{\text{im}} = 1 \text{ mg/l}$ , b)  $C_{\text{im}} = 5 \text{ mg/l}$



#### 4.1.2.5 Linearnost

Karakter zavisnosti analitičkog signala imidakloprida od koncentracije primenom tankoslojne živine elektrode ispitan je u opsegu koncentracija od 0,8 do 30 mg/l. U ispitivanoj oblasti koncentracija dobijena su tri linearna opsega i to u sledećim rasponima: od 0,8 do 2 mg/l, od 2 do 10 mg/l i od 10 do 30 mg/l. Za ispitivane koncentracione opsege primenjene su sledeće vrednosti struje redukcije: -4,2  $\mu\text{A}$ , -6,2  $\mu\text{A}$  i -16,8  $\mu\text{A}$ . Dobijene vrednosti nagiba, odsečka, kao i njihove vrednosti SD za sva tri koncentraciona opsega prikazane su u Tabeli 13. Za sva tri ispitivana opsega koncentracija ostvarena je dobra linearnost, koeficijent korelacije se kretao u granicama 0,9975 do 0,9989.

**Tabela 13.** Linearni opsezi koncentracija za hronopotenciometrijsko određivanje imidakloprida primenom tankoslojne živine elektrode

Koncentracioni opseg (mg/l)	Redukciona struja ( $\mu\text{A}$ )	Nagib	Odsečak	Sa <sup>a</sup>	Sb <sup>b</sup>	r
0,8 - 2,0	-3,8	0,257	0,898	0,0187	0,0131	0,9989
2,0 - 10,0	-6,2	0,132	0,390	0,0020	0,0195	0,9975
10,0 - 30,0	-16,8	0,086	-0,280	0,0022	0,0123	0,9980

Sa<sup>a</sup> standardna devijacija nagiba ( $s \times l/\text{mg}$ ),  $n = 5$ .

Sb<sup>b</sup> standardna devijacija odsečka ( $s$ ),  $n = 5$ .

#### 4.1.2.6 Granica detekcije i granica kvantifikacije

Nakon optimizacije uslova hronopotenciometrijskog određivanja imidakloprida na tankoslojnoj živinoj elektrodi, vrednosti LOD i LOQ izračunate su korišćenjem izraza 14 i 15, na osnovu vrednosti SD odsečka i nagiba definisanih za kalibracionu krivu sa najnižim opsegom koncentracija. Izračunata vrednost za LOD iznosila je 0,17 mg/l imidakloprida, dok je vrednost za LOQ iznosila 0,51 mg/l imidakloprida. U odnosu na elektrodu od staklastog ugljenika, tankoslojna živina elektroda pokazala je pet puta veću osetljivost pri hronopotenciometrijskom određivanju imidakloprida.

#### 4.1.2.7 Preciznost

Pri hronopotenciometrijskom određivanju imidakloprida primenom tankoslojne živine elektrode, ponovljivost i reproduktivnost određene su analizom rastvora sa sadržajem imidakloprida od 1 i 5 mg/l u Britton-Robinson puferu pH 9, pri prethodno definisanim optimalnim uslovima. Primenjene struje redukcije iznosile su -5  $\mu$ A za niži sadržaj i -6,2  $\mu$ A za viši sadržaj insekticida.

U slučaju određivanja ponovljivosti, dobijene vrednosti RSD iznosile su 1,10% (1 mg/l) i 1,27% (5 mg/l). Vrednosti RSD u slučaju određivanja reproduktivnosti iznosile su 2,17% (1 mg/l) i 2,28% (5 mg/l). U odnosu na elektrodu od staklastog ugljenika dobijene su niže vrednosti RSD, ukazujući na veću preciznost u slučaju primene tankoslojne živine elektrode. Imidaklopid se redukovao na tankoslojnoj živinoj elektrodi pri srednjoj vrednosti potencijala od -1003 mV. Vrednosti RSD potencijala redukcije imidakloprida na tankoslojnoj živinoj elektrodi iznosile su za sadržaj imidakloprida od 1 mg/l 0,42% i 0,32% za sadržaj imidakloprida od 5 mg/l.

#### 4.1.2.8 Tačnost metode

Tačnost razvijene hronopotenciometrijske metode uz primenu tankoslojne živine elektrode kao radne elektrode procenjena je analizom model-rastvora sa različitim sadržajem imidakloprida. Određeni sadržaji imidakloprida uz vrednosti 2SD i prinosa prikazane su u Tabeli 14. Dobijene vrednosti prinosa (99,07 - 104,55%), kao i vrednosti 2SD (1,19 - 2,54%) ukazuju na tačnost i reproduktivnost određivanja imidakloprida primenom razvijene hronopotenciometrijske metode uz korišćenje tankoslojne živine elektrode kao radne elektrode.

**Tabela 14.** Rezultati određivanja imidakloprida u rastvorima poznatih koncentracija razvijenom hronopotenciometrijskom metodom primenom tankoslojne živine elektrode

Koncentracija rastvora (mg/l)	Određena količina (mg/l) <sup>a</sup>	Prinos (%)
1,5	1,57 $\pm$ 0,08	104,55
3,5	3,58 $\pm$ 0,09	102,26
5,0	4,95 $\pm$ 0,19	99,07

<sup>a</sup>Srednja vrednost  $\pm$  2SD, n = 3.

#### 4.1.2.9 Interferencije

U slučaju određivanja imidakloprida primenom tankoslojne živine elektrode selektivnost razvijene metode ispitana je u prisustvu različitih neorganskih jona. Analizirani su rastvori sadržaja imidakloprida od 1 mg/l i 10 mg/l u pomoćnom elektrolitu. Primenjene struje redukcije iznosile su  $-4,2 \mu\text{A}$  (1 mg/l) i  $-8,2 \mu\text{A}$  (10 mg/l), a dobijeni rezultati, prikazani kao varijacija analitičkog signala imidakloprida za svaki ispitivani odnos imidaklopid:interferent, dati su u Tabeli 15.

**Tabela 15.** Uticaj neorganskih jona na hronopotenciometrijsko određivanje imidakloprida primenom tankoslojne živine elektrode

Varijacija analitičkog signala imidakloprida za ispitane odnose koncentracija imidaklopid:interferent (%)					
Interferent	1:0,1	1:1	1:5	1:10	1:50
$\text{K}^+$	1,03	0	-0,85	-0,87	-0,87
$\text{Na}^+$	-0,84	0	-0,82	0	1,05
$\text{Ca}^{2+}$	0	0,44	0	1,33	2,22
$\text{Mg}^{2+}$	0	-0,65	0,64	-0,65	1,53
$\text{SO}_4^{2-}$	1,25	1,52	1,28	1,88	1,52
$\text{Cl}^-$	-1,45	-2,97	0,87	0	-0,99
$\text{HCO}_3^-$	-0,83	0,47	0	0	-1,41
$\text{NO}_3^-$	-0,87	0,90	-1,32	0,90	-0,90
$\text{Fe}^{2+}$	-3,39	/	/	/	/

Prisustvo neorganskih jona u ispitivanom rastvoru dovodilo je do varijacije analitičkog signala imidakloprida u granicama od  $-2,97\%$  ( $\text{Cl}^-$  jon) do  $2,22\%$  ( $\text{Ca}^{2+}$  jon) (Tabela 15). Kada je ispitivan uticaj prisustva  $\text{Fe}^{2+}$  jona u ispitivanom rastvoru, eksperimenti su izvedeni samo u slučaju odnosa koncentracija imidaklopid:interferent 1:0,1, odnosno pri koncentraciji  $\text{Fe}^{2+}$  od 1 mg/l kada je dolazilo do smanjenja signala za 3,39%, a pored redukcionog pika imidakloprida javljao se i redukcionni pik  $\text{Fe}^{2+}$  jona pri potencijalu od  $-0,49 \text{ V}$  (Bard i sar., 1985). Povećanjem koncentracije  $\text{Fe}^{2+}$  jona u ispitivanom rastvoru dolazilo je do blokiranja radne elektrode pri potencijalu od  $-1,12 \text{ V}$ , odnosno bilo je nemoguće izvesti analizu do kraja. Uzimajući u obzir uobičajen sadržaj  $\text{Fe}^{2+}$  jona u uzorcima rečne vode (0,7 mg/l) (WHO, 2008), primenom

razvijene hronopotenciometrijske metode pri određivanju sadržaja imidakloprida u uzorcima rečne vode ne očekuje se uticaj na analitički signal analita. U slučaju analiziranja podzemnih voda u kojima je očekivan sadržaj  $\text{Fe}^{2+}$  jona znatno viši, neophodna je prethodna priprema uzoraka u cilju uklanjanja ovih jona iz analiziranog rastvora.

#### **4.1.2.10 Robusnost**

U cilju ispitivanja robusnosti razvijene hronopotenciometrijske metode na tankoslojnoj živinoj elektrodi, analizirani su rastvori imidakloprida koncentracije 2 mg/l i 5 mg/l u Britton-Robinson puferu pH 9, pri prethodno definisanim optimalnim uslovima.

U rastvoru koncentracije 2 mg/l variranje pH Britton-Robinson pufera u granicama  $9 \pm 0,2$  dovodilo je do blagog povećanja analitičkog signala imidakloprida (do 0,96%), dok je, u slučaju variranja vrednosti početnog potencijala ( $-0,18 \pm 0,05$  V), dolazilo do blagog smanjenja analitičkog signala (do 1,27%). Promena struje u granicama ( $-5,4 \pm 0,1$   $\mu\text{A}$ ) nije dovela do promene signala analita. Kod rastvora imidakloprida koncentracije 5 mg/l, pH i početni potencijal varirani su na isti način kao i kod rastvora niže koncentracije, dok je struja varirana u granicama ( $-6,2 \pm 0,1$   $\mu\text{A}$ ). Promena početnog potencijala dovela je do blagog smanjenja analitičkog signala (-1,27%), promena pH do blagog povećanja (+0,68%), dok variranjem struje nije dolazilo do promene analitičkog signala. Kao i u slučaju elektrode od staklastog ugljenika, i kod tankoslojne živine elektrode pri variranju osnovnih parametara analize nije dolazilo do većih varijacija analitičkog signala, te se razvijena metoda može okarakterisati kao robusna.

#### **4.1.2.11 Primena razvijene hronopotenciometrijske metode za određivanje sadržaja imidakloprida u komercijalnim formulacijama**

Razvijena metoda za hronopotenciometrijsko određivanje sadržaja imidakloprida na tankoslojnoj živinoj elektrodi primenjena je direktno na komercijalne formulacije ovog insekticida, bez prethodne pripreme uz odgovarajuća razblaženja. Sadržaj imidakloprida određen je metodom kalibracione krive, primenom redukcione struje  $-4,6$   $\mu\text{A}$ , a za svaku formulaciju određivanje je izvedeno u tri ponavljanja (Tabela 16).

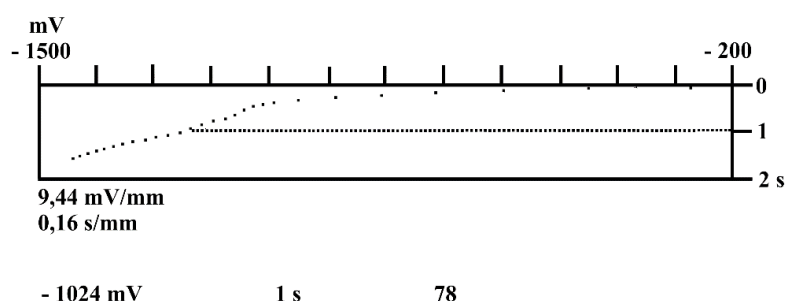
Tokom izvođenja analiza na tankoslojnoj živinoj elektrodi nije uočen uticaj nepesticidnih komponenata na analitički signal imidakloprida, koje su u slučaju primene

elektrode od staklastog ugljenika dovodile do prljanja aktivne površine elektrode. Na osnovu dobijenih rezultata potvrđeno je dobro slaganje deklariranih sadržaja sa sadržajima dobijenim hronopotenciometrijski (prinosi u intervalu od 99,71% do 102,98%), što ukazuje na tačnost razvijene metode. Reproductivnost razvijene metode još jednom je potvrđena dobijenim RSD vrednostima (0,82 - 2,07%). Statističkim poređenjem rezultata dobijenih hronopotenciometrijski sa deklariranim vrednostima primenom Studentovog t-testa uparenih vrednosti, izračunate t-vrednosti bile su manje od teorijskih vrednosti. Na osnovu toga, može se zaključiti da se srednje vrednosti sadržaja dobijenih hronopotenciometrijski ne razlikuju značajno od deklariranih vrednosti uz 95% verovatnoću. Signal redukcije imidakloprida se analizom komercijalnih formulacija kretao u opsegu potencijala od -991 do -1144 mV. Na Slici 32 prikazan je hronopotenciogram dobijen analizom formulacije *Imidor 70*.

**Tabela 16.** Rezultati dobijeni analizom komercijalnih formulacija imidakloprida primenom razvijene hronopotenciometrijske metode na tankoslojnoj živinoj elektrodi

Komercijalna formulacija	Deklarisano	Određeno <sup>a</sup>
<b>Sadržaj imidakloprida (g/l)</b>		
<i>Prestige 290 FS</i>	140	144,17 ± 4,61 (102,98)
<i>Confidor 200 SL</i>	200	199,71 ± 6,35 (99,86)
<i>Kohinor 200 SL</i>	200	202,02 ± 3,31 (101,01)
<i>Gat Go 20 OD</i>	200	204,22 ± 8,09 (102,11)
<b>Sadržaj imidakloprida (g/kg)</b>		
<i>Confidor 70 WG</i>	700	697,98 ± 14,45 (99,71)
<i>Imidor 70 WS</i>	700	708,42 ± 18,28 (101,20)

<sup>a</sup>Srednja vrednost ± 2SD (prinos, %), n = 3.



**Slika 32.** Hronopotenciogram dobijen analizom formulacije imidakloprida *Imidor 70* na tankoslojnoj živinoj elektrodi ( $c_{im} = 3 \text{ mg/l}$ ,  $i_{red} = -4,6 \text{ } \mu\text{A}$ )

#### 4.1.2.12 Primena razvijene hronopotenciometrijske metode za određivanje sadržaja imidakloprida u uzorcima vode

Nakon optimizacije hronopotenciometrijske metode za određivanje sadržaja imidakloprida na tankoslojnoj živinoj elektrodi, metoda je pored primene na komercijalne formulacije primenjena i za određivanje sadržaja ispitivanog insekticida u uzorcima rečne vode. Analizirani su uzorci dunavske vode, sa pet različitih lokaliteta na teritoriji Novog Sada (Petrovaradinska Tvrđava, Štrand, Ribarac, Kamenjar, Mačkov sprud). Od uzoraka vode pripremljen je Britton-Robinson pufer pH 9, a analizirana je zapremina od 20 ml. Hronopotenciometrijskom analizom u uzorcima vode nije detektovano prisustvo imidakloprida, odnosno njegov sadržaj bio je ispod vrednosti LOD razvijene metode. U cilju provere tačnosti razvijene metode uzorci vode su spajkovani sa koncentracijom imidakloprida od 1 mg/l i analizirani hronopotenciometrijskom i hromatografskom metodom (LC-MS/MS). Hronopotenciometrijsko određivanje sadržaja insekticida izvedeno je metodom kalibracione krive, a merenje je u svakom uzorku izvedeno u tri ponavljanja. Kalibraciona kriva definisana je u model sistemu. Dobijeni sadržaji primenom obe metode, uz vrednosti 2SD i prinosa, prikazani su u Tabeli 17.

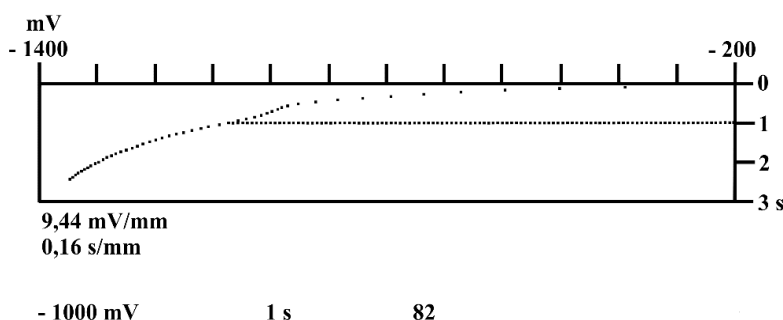
**Tabela 17.** Rezultati dobijeni analizom uzoraka rečne dunavske vode hronopotenciometrijskom metodom na tankoslojnoj živinoj elektrodi i referentnom hromatografskom metodom

Uzorak	Sadržaj imidakloprida (mg/l)	Dodato imidakloprida (mg/l)	Određen sadržaj imidakloprida (mg/l)	
			Hronopotenciometrija	LC-MS/MS
Petrovaradinska Tvrđava	< LOD <sup>a</sup>	1	0,979 ± 0,03 (97,94) <sup>b</sup>	1,032
Štrand	< LOD	1	0,980 ± 0,05 (97,95)	0,960
Ribarac	< LOD	1	0,936 ± 0,01 (93,64)	0,989
Kamenjar	< LOD	1	0,963 ± 0,04 (96,26)	0,938
Mačkov sprud	< LOD	1	0,952 ± 0,01 (95,19)	1,016

<sup>a</sup>LOD = 0,17 mg/l

<sup>b</sup>Srednja vrednost ± 2SD (prinos, %), n = 3

Tačnost razvijene hronopotenciometrijske metode još jednom je potvrđena dobijenim prinosima (93,64 - 97,95%), a maksimalna vrednost RSD od 2,56% ukazuje na dobru reproduktivnost metode. Rezultati sadržaja, dobijeni hronopotenciometrijski, statistički su upoređeni sa rezultatima hromatografske (LC-MS/MS) metode primenom Studentovog t-testa uparenih vrednosti. Kako su dobijene t-vrednosti bile manje od teorijskih, može se zaključiti da uz verovatnoću od 95% ne postoji statistički značajna razlika između sadržaja imidakloprida određenih primenom pomenutih metoda. Hronopotenciogram snimljen u spajkovanom uzorku vode prikazan je na Slici 33. Tokom izvođenja analiza hronopotenciometrijski nije uočen uticaj eventualnih interferirajućih supstanci na analitički signal imidakloprida. Potencijal redukcije imidakloprida se u spajkovanim uzorcima vode kretao u opsegu od -980 do -1012 mV.

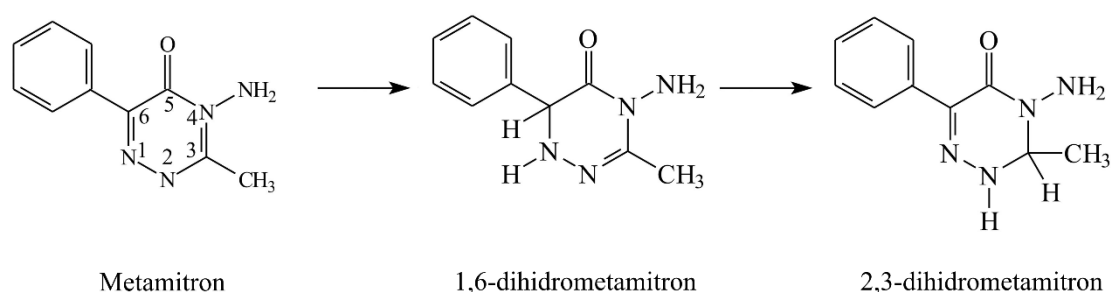


**Slika 33.** Hronopotenciogram dobijen u spajkovanom uzorku vode lokalitet Mačkov sprud, na tankoslojnoj živinoj elektrodi ( $c_{im} = 1 \text{ mg/l}$ ,  $i_{red} = -5 \text{ } \mu\text{A}$ )

## 4.2 Određivanje optimalnih uslova za hronopotenciometrijsko određivanje metamitrona

Valentin i sar. (1989) su prvi opisali metodu za elektrohemijsko određivanje matamitrona. Primenom diferencijalne pulsne polarografije u Britton-Robinson puferu pH 2 na kapljućoj živinoj elektrodi dobijena su dva redukciona signala ovog herbicida pri potencijalima od -0,49 V i -0,95 V (Valentin i sar., 1989). Redukcija je okarakterisana kao ireverzibilna i kontrolisana difuzijom. Mehanizam redukcije metamitrona na živinoj elektrodi predložili su

Ludvík i sar. (1998a). Prema ovim autorima redukcija metomitrona odvija se u dva koraka u kojima se razmenjuju po dva elektrona. Prvi korak redukcije odvija se pri potencijalu od -0,5 V pri čemu nastaje 1,6-dihidrometamitron, dok se drugi korak odvija pri potencijalu od -1,0 V kada dolazi do stvaranja 2,3-dihidrometamitrona (Ludvík i sar., 1998a) (Slika 34). Većina radova iz oblasti elektrohemijskog određivanja ovog herbicida zasniva se na redukciji (Šelešovská i sar., 2015; Gómez-Caballero i sar., 2007; Sánchez Arribas i sar., 2006; López de Armentia i sar., 1999; Ludvík i sar., 1998a; Arranz et al., 1997a; Valentin i sar., 1989;), dok je elektrohemijska oksidacija metomitrona ispitana primenom modifikovane elektrode od ugljenične paste (Arranz i sar., 1997b) i borom dopovane elektrode (Šelešovská i sar., 2015).



**Slika 34.** Redukcija metomitrona na kapljućoj živinoj elektrodi

#### 4.2.1 Elektroda od staklastog ugljenika

Preliminarni eksperimenti pri hronopotenciometrijskom određivanju metomitrona na elektrodi od staklastog ugljenika izvedeni su u Britton-Robinson puferu pH 4. Kao i u slučaju određivanja imidakloprida primenom hronopotenciometrije, rastvoreni kiseonik koji se redukuje na radnoj elektrodi dovodio je do smetnji. U cilju uklanjanja kiseonika primenjena je fizička metoda provođenjem struje azota kroz ispitivani rastvor u trajanju od 10 minuta. Snimanjem hronopotenciograma u katodnom smeru dobijen je redukcionni pik metomitrona pri potencijalu od -900 mV, koji odgovara nastajanju 2,3-dihidrometamitrona.



#### **4.2.1.1 Ispitivanje optimalne metode za uklanjanje rastvorenog kiseonika iz rastvora**

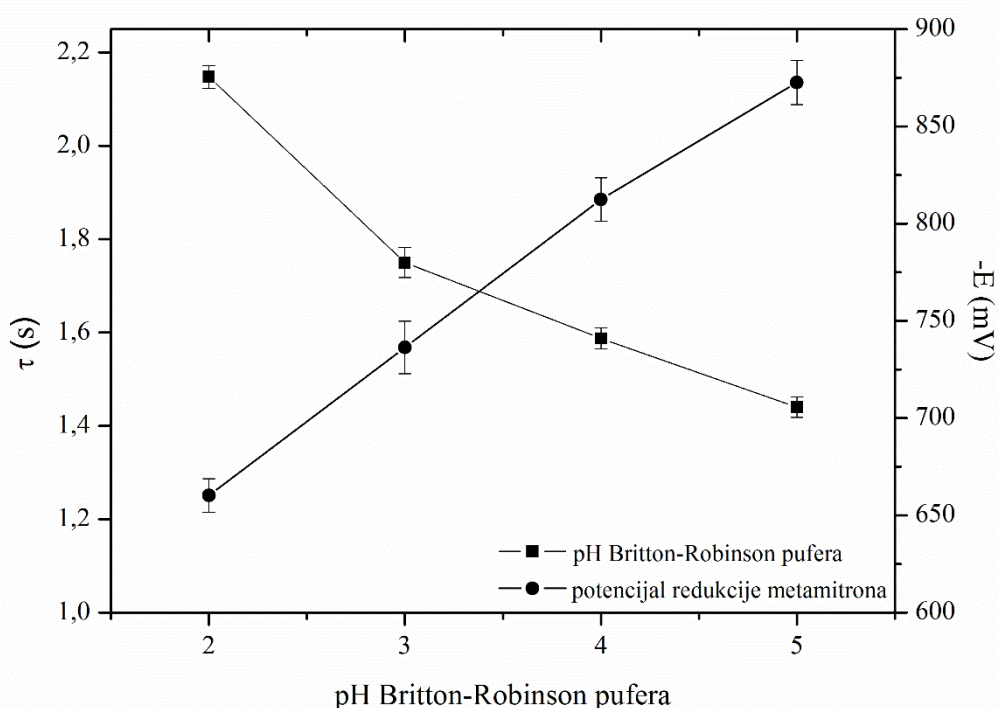
U cilju efikasnijeg uklanjanja rastvorenog kiseonika iz analiziranog rastvora, kao i skraćanja samog postupka, ispitana je mogućnost hemijske deaeracije primenom natrijum-sulfita, sa ciljem da se uklone efekti rastvorenog kiseonika pri određivanju metamitrona. Pripremljen je zasićeni rastvor natrijum-sulfita koncentracije 230 g/l, pa su u ispitivani rastvor dodavane različite zapremine ovog rastvora. U slučaju određivanja metamitrona primenom natrijum-sulfita, efikasno je eliminisan efekat rastvorenog kiseonika, ali se analit nije mogao detektovati čak ni pri višim koncentracijama (do 40 mg/l). Kao potencijalna sredstva za hemijsku deaeraciju ispitani su: askorbinska kiselina, oksalna kiselina, kalijum-bromid, natrijum-bromid, međutim, njihovim dodavanjem efekat rastvorenog kiseonika se nije mogao ukloniti, odnosno nije bilo moguće dostići završnu vrednost potencijala analize.

Kako se u cilju dobijanja analitičkog signala metamitrona nije mogla primeniti hemijska deaeracija, u narednim eksperimentima primenjena je fizička metoda uz korišćenje azota. U sledećoj fazi eksperimenti su izvođeni uz smanjenje vremena deaeracije u prisustvu 10 mg/l metamitrona u pomoćnom elektrolitu. Kao optimalno vreme deaeracije usvojeno je 5 minuta. Pri kraćim vremenima deaeracija je bila nepotpuna, a produžavanje vremena nije dovodilo do promene u visini signala.

#### **4.2.1.2 Uticaj vrste, pH i koncentracije pomoćnog elektrolita na analitički signal metamitrona**

Uticaj vrste pomoćnog elektrolita na analitički signal metamitrona ispitan je u Britton-Robinson puferu pH 4; 0,1 mol/l citratnom puferu pH 4; 0,1 mol/l acetatnom puferu pH 4; 5 mmol/l rastvoru HCl i 9 mmol/l rastvoru H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Hronopotenciogrami su snimani skeniranjem potencijala u oblasti od -0,25 V do -1,10 V, uz primenu struje od -2,3 μA, a koncentracija metamitrona iznosila je od 2 do 10 mg/l. U svim ispitivanim pomoćnim elektrolitima dobijen je jedan redukcioni pik metamitrona u rasponu potencijala od -690 mV do -890 mV, dok skeniranjem potencijala u anodnom smeru nisu dobijeni analitički signali ukazujući na ireverzibilnost reakcije ispitivanog herbicida. Među ispitivanim pomoćnim elektrolitima najbolji rezultati ostvareni su u Britton-Robinson puferu u pogledu visine i oštine analitičkog signala, tako da je ovaj pufer usvojen kao pomoćni elektrolit u svim daljnim eksperimentima.

Nakon usvajanja optimalnog elektrolita, sledeći korak u optimizaciji odnosio se na izbor njegove optimalne pH vrednosti. U tom smislu Britton-Robinson pufer je pripremljen u rasponu pH vrednosti od 2 do 12, a koncentracija metamitrona iznosila je od 2 do 10 mg/l. Ispitivanja su izvedena u rasponu potencijala od -0,25 V do -1,10 V uz primenu struje redukcije od -2,3  $\mu$ A. Na Slici 35 dat je prikaz dobijenih rezultata za koncentraciju od 10 mg/l. Tačke na dijagramu predstavljaju srednje vrednosti visine analitičkog signala, odnosno potencijala dobijene za pet ponavljanja, a reproduktivnost merenja izražena je kao 2SD odstupanja od srednje vrednosti.



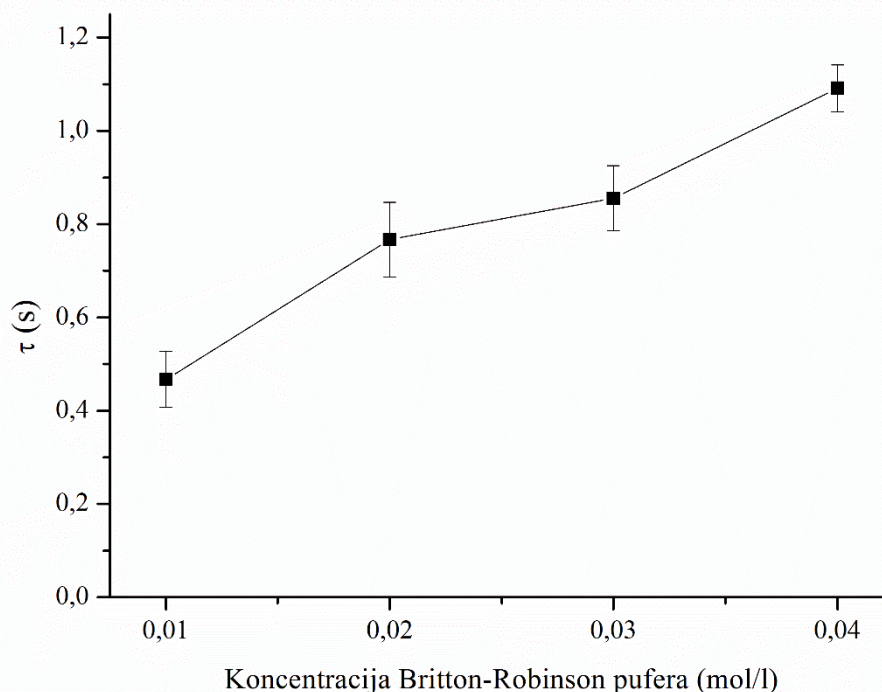
**Slika 35.** Uticaj pH Britton-Robinson pufera na analitički signal i potencijal redukcije metamitrona na elektrodi od staklastog ugljenika ( $C_{\text{mtm}} = 10$  mg/l,  $i_{\text{red}} = -2,3$   $\mu$ A)

Signal metamitrona mogao se detektovati u opsegu pH od 2 do 5, uz značajno smanjenje visine analitičkog signala sa porastom pH vrednosti. Pored smanjenja visine analitičkog signala ispitivanog herbicida, porastom vrednosti pH dolazilo je i do smanjenja osetljivosti, tako da se u Britton-Robinson puferu pH 5 signal metamitrona pri koncentraciji od 2 mg/l nije mogao detektovati. U oblasti pH Britton-Robinson pufera od 6 do 12 nije se javljao redukcionni signal analita, čak ni pri većim ispitivanim koncentracijama. Kao optimalna vrednost pH Britton-

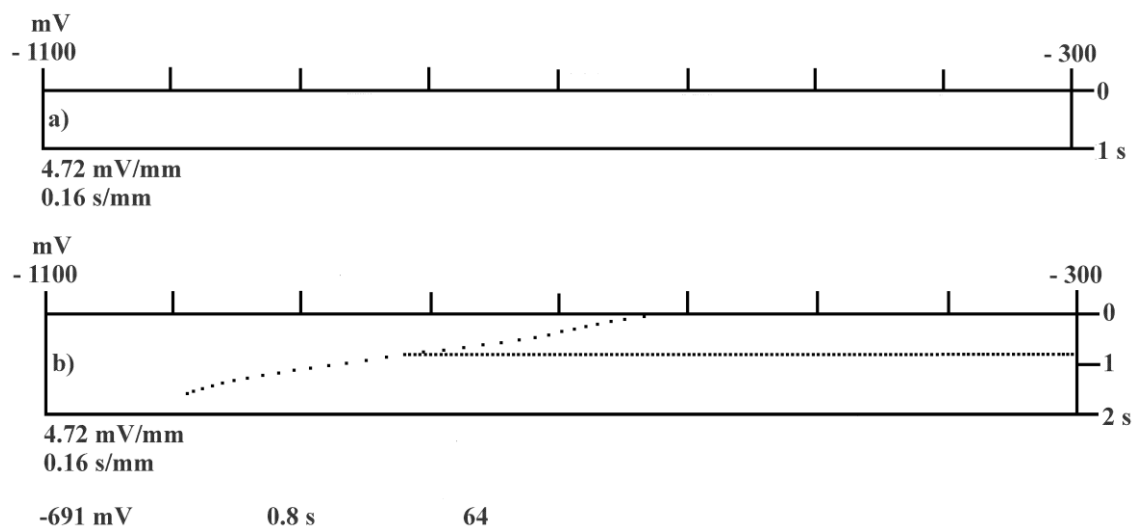
Robinson pufera usvojena je pH 2, s obzirom da je dobijena maksimalna vrednost signala, uz najbolju reproduktivnost merenja (RSD = 1,14%). Porastom pH vrednosti Britton-Robinson pufera redukcija metamitrona odvijala se pri negativnijim vrednostima potencijala, a vrednosti su varirale u opsegu potencijala od -660 mV do -870 mV (Slika 35).

Uticaj koncentracije Britton-Robinson pufera na analitički signal metamitrona ispitan je za sledeće koncentracije: 0,01; 0,02; 0,03 i 0,04 mol/l. Potencijal elektrolize iznosio je -0,25 V, krajnji potencijal -1,10 V, pri čemu je primenjena redukciona struja od -3,1  $\mu$ A, dok je koncentracija metamitrona iznosila 10 mg/l. Dobijeni rezultati iskazani kao srednja vrednost za 5 uzastopnih merenja prikazani su na Slici 36. Odstupanja od srednje vrednosti predstavljena su vertikalnim linijama na dijagramu kao vrednosti 2SD.

Povećanjem koncentracije Britton-Robinson pufera analitički signal metamitrona se povećavao. Najviša vrednost signala dobijena je u 0,04 mol/l Britton-Robinson puferu, uz najbolju reproduktivnost (RSD = 2,16%), pa je ova koncentracija usvojena kao optimalna. Izgled hronopotenciograma u Britton-Robinson puferu pH 2, pre i nakon dodatka standardnog rastvora metamitrona, prikazan je na Slici 37.



**Slika 36.** Uticaj koncentracije Britton-Robinson pufera na analitički signal metamitrona na elektrodi od staklastog ugljenika ( $C_{im} = 10$  mg/l,  $i_{red} = -3,1$   $\mu$ A)

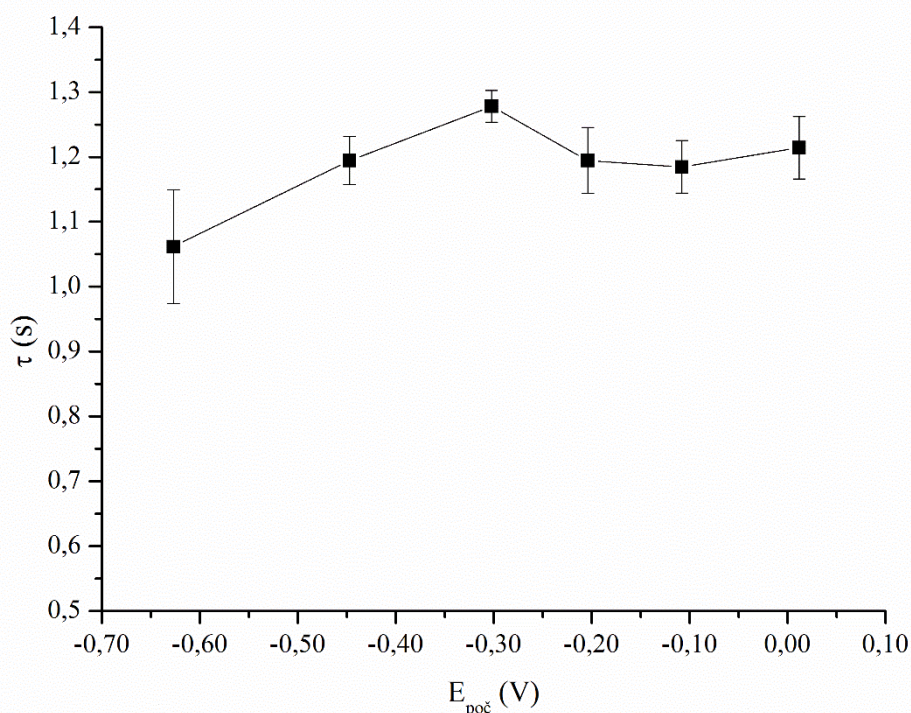


**Slika 37.** Hronopotenciogram dobijen u Britton-Robinson puferu pH 2 na elektrodi od staklastog ugljenika ( $i_{\text{red}} = -3,5 \mu\text{A}$ ): **a)** pre i **b)** nakon dodatka metamitrona ( $c_{\text{mtm}} = 10 \text{ mg/l}$ )

#### 4.2.1.3 Uticaj početnog potencijala na analitički signal metamitrona

Uticaj početnog potencijala ispitan je u rastvoru koncentracije metamitrona od 10 mg/l, a ispitani interval obuhvatao je potencijale od 0,01 V do -0,63 V, uz primenjenu struju redukcije od -3,1  $\mu\text{A}$ . U svim eksperimentima primenjena je vrednost završnog potencijala od -1,10 V. Na Slici 38 prikazani su dobijeni rezultati izraženi kao srednje vrednosti pet merenja, dok je vertikalnim linijama prikazana reproduktivnost izražena kao 2SD.

Promena početnog potencijala u intervalu od 0,01 V do -0,45 V nije značajno uticala na visinu analitičkog signala metamitrona i reproduktivnost merenja, dok je pri početnom potencijalu od -0,63 V došlo do značajnog pada visine analitičkog signala i reproduktivnosti (Slika 38). Kao optimalna vrednost početnog potencijala usvojena je -0,30 V, s obzirom da je pri toj vrednosti dobijena najviša vrednost analitičkog signala metamitrona, uz najbolju reproduktivnost i najveću osetljivost.



**Slika 38.** Uticaj početnog potencijala na analitički signal metamitrona na elektrodi od staklastog ugljenika ( $C_{\text{mtm}} = 10 \text{ mg/l}$ ,  $i_{\text{red}} = -3,1 \text{ } \mu\text{A}$ )

#### 4.2.1.4 Uticaj struje redukcije na analitički signal metamitrona

Uticaj struje redukcije na analitički signal metamitrona ispitan je u rastvorima metamitrona koncentracije  $2 \text{ mg/l}$  u pomoćnom elektrolitu u intervalu od  $-1,1 \text{ } \mu\text{A}$  do  $-3,1 \text{ } \mu\text{A}$ , dok je ispitan interval struje redukcije u rastvoru metamitrona sadržaja  $10 \text{ mg/l}$  iznosio od  $-1,9 \text{ } \mu\text{A}$  do  $-7,9 \text{ } \mu\text{A}$ . Primenjena vrednost početnog potencijala iznosila je  $-0,30 \text{ V}$ , dok je završni potencijal iznosio  $-1,10 \text{ V}$ . Dobijene zavisnosti analitičkog signala metamitrona od struje redukcije prikazane su na Slici 39. Svaka tačka na dijagramu predstavlja srednju vrednost za pet uzastopnih analiza, a reproduktivnost merenja iskazana je vrednošću 2SD.

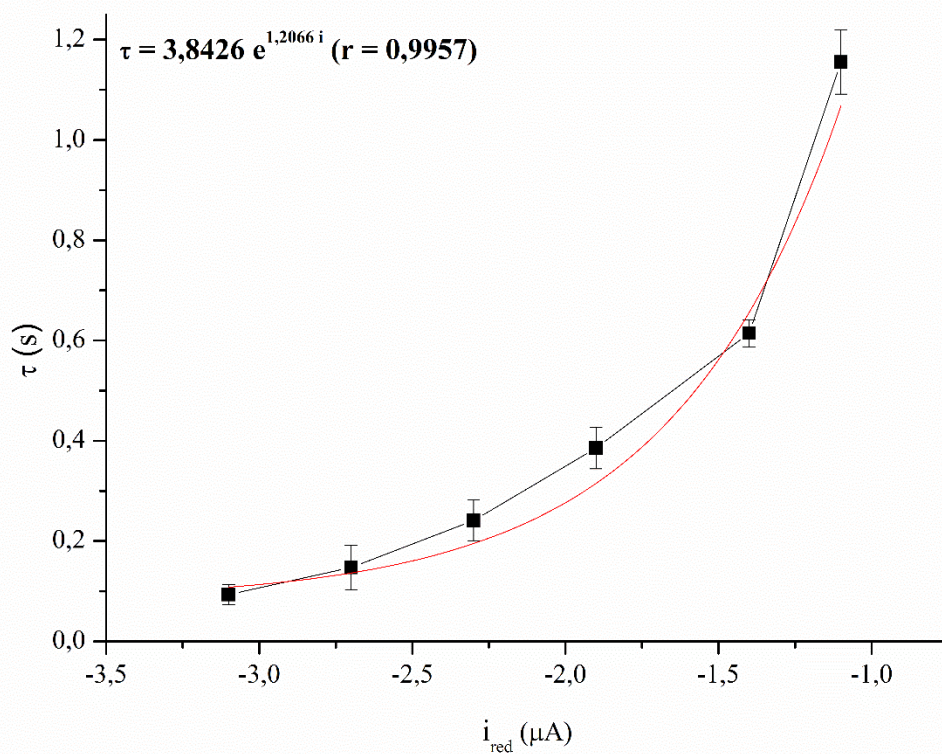
U oba slučaja porastom apsolutnih vrednosti struje redukcije, dolazilo je do opadanja vrednosti analitičkog signala metamitrona po eksponencijalnim funkcijama. Primenom kriterijuma o pravolinijskoj zavisnosti  $I \times \tau_{\text{red}}^{1/2} = f(I)$ , optimalni interval struje koji treba

primeniti za koncentraciju metamitrona od 2 mg/l iznosi od -1,9  $\mu\text{A}$  do -2,7  $\mu\text{A}$ , dok za višu ispitivanu koncentraciju (10 mg/l) iznosi od -4,7  $\mu\text{A}$  do -6,3  $\mu\text{A}$ .

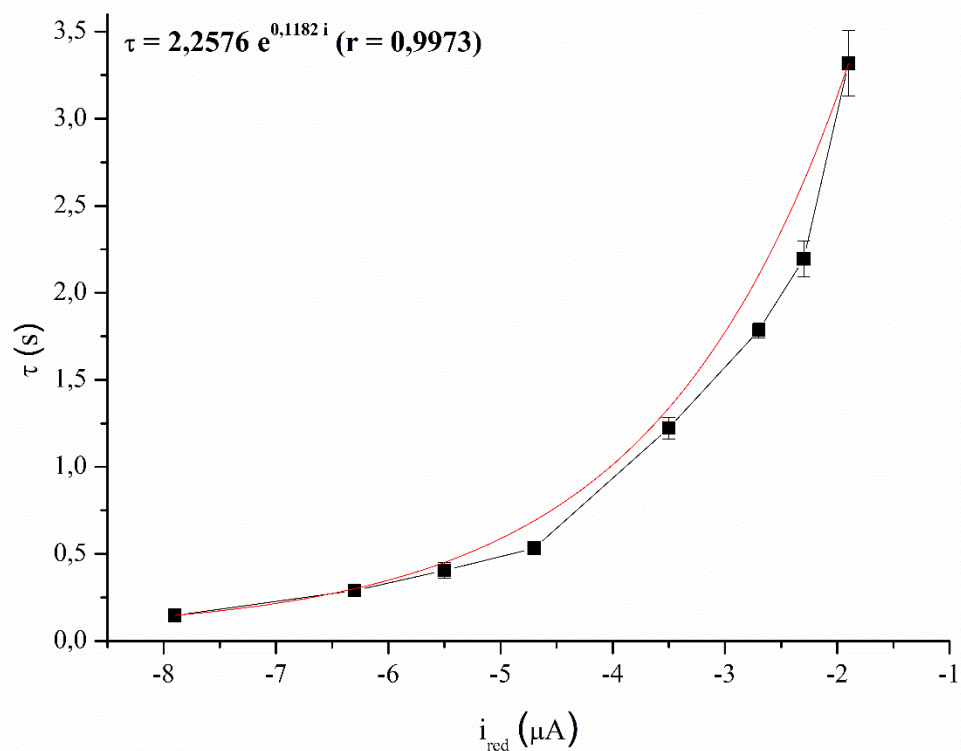
Sa Slike 39 može se videti da, za niži sadržaj metamitrona, porast struje nije mnogo uticao na reproduktivnost, dok je kod koncentracije od 10 mg/l bolja reproduktivnost postignuta primenom negativnijih struja redukcije. Promenom jačine struje u okviru izvođenja eksperimenata potencijal redukcije metamitrona na elektrodi od staklastog ugljenika varirao je u granicama od -644 do -727 mV, uz RSD od 3,28%.



a)



b)



**Slika 39.** Uticaj struje na analitički signal metamitrona na elektrodi od staklastog ugljenika:

**a)**  $C_{\text{mtm}} = 2 \text{ mg/l}$ , **b)**  $C_{\text{mtm}} = 10 \text{ mg/l}$

#### 4.2.1.5 Linearnost

Karakter zavisnosti analitičkog signala metamitrona od koncentracije ispitan je u opsegu od 1 do 30 mg/l. U okviru ispitanog opsega koncentracija uočena su tri linearna opsega koncentracija: 1 - 3 mg/l, 2 - 10 mg/l i 10 - 30 mg/l. Uz prethodno optimizovane vrednosti početnog potencijala -0,30 V, završnog potencijala -1,10 V, primenjene vrednosti struje redukcije iznosile su -1,4  $\mu$ A za prvi opseg, -2,3  $\mu$ A za drugi opseg i -5,5  $\mu$ A za treći linearni opseg. Za svaki opseg koncentracija eksperimenti su izvedeni u pet ponavljanja. Dobijene vrednosti nagiba, odsečka, kao i njihove SD za sva tri opsega koncentracije, prikazane su u Tabeli 18. Vrednosti koeficijenta korelacije ukazuju na dobru linearnost za sva tri ispitivana opsega koncentracija.

**Tabela 18.** Linearni opsezi koncentracija za hronopotenciometrijsko određivanje metamitrona primenom elektrode od staklastog ugljenika

Koncentracioni opseg (mg/l)	Redukciona struja ( $\mu$ A)	Nagib	Odsečak	Sa <sup>a</sup>	Sb <sup>b</sup>	r
1 - 3	-1,4	0,4724	-0,2903	0,0077	0,0133	0,9939
2 - 10	-2,3	0,2639	-0,4155	0,0041	0,0107	0,9952
10 - 30	-5,5	0,0639	-0,3086	0,0010	0,0100	0,9939

Sa<sup>a</sup> standardna devijacija nagiba ( $s \times l/\text{mg}$ ),  $n = 5$ .

Sb<sup>b</sup> standardna devijacija odsečka ( $s$ ),  $n = 5$ .

#### 4.2.1.6 Granica detekcije i granica kvantifikacije

Na osnovu vrednosti SD odsečka i nagiba, koje su dobijene za kalibracionu krivu za najniži koncentracioni opseg (1 - 3 mg/l), na osnovu izraza 14 i 15 izračunate vrednosti LOD i LOQ pri određivanju metamitrona primenom elektrode od staklastog ugljenika iznosile su redom 0,09 mg/l i 0,28 mg/l.

#### 4.2.1.7 Preciznost

Ponovljivost i reproduktivnost određene su za dve koncentracije metamitrona od 2 i 10 mg/l, pri prethodno definisanim optimalnim uslovima. Primenjena struja redukcije za



koncentraciju od 2 mg/l iznosila je  $-1,4 \mu\text{A}$ , dok je za koncentraciju od 10 mg/l iznosila  $-3,1 \mu\text{A}$ .

U slučaju ispitivanja ponovljivosti izračunate vrednosti RSD za ispitivane koncentracije metamitrona iznosile su: 2,57% (2 mg/l) i 2,13% (10 mg/l). Analizom rastvora u toku pet različitih dana, dobijene vrednosti RSD, odnosno reproduktivnosti, iznosile su 3,54% za koncentraciju od 2 mg/l i 2,90% za koncentraciju 10 mg/l. Primenom optimalnih eksperimentalnih uslova metamitron se na elektrodi od staklastog ugljenika redukovao pri srednjoj vrednosti potencijala od  $-690 \text{ mV}$ . RSD potencijala redukcije metamitrona za koncentraciju od 2 mg/l iznosila je 1,81%. Nešto veće varijacije u potencijalu redukcije metamitrona javile su se kod koncentracije od 10 mg/l, pri čemu je vrednost RSD iznosila 3,75%.

#### 4.2.1.8 Tačnost metode

Tačnost razvijene hronopotenciometrijske metode uz primenu elektrode od staklastog ugljenika ispitana je analiziranjem model-rastvora metamitrona poznatog sadržaja, pri prethodno definisanim optimalnim uslovima. Kvantifikacija je izvršena metodom kalibracione krive, a za svaku koncentraciju određivanja su izvedena u tri ponavljanja. Dobijene vrednosti sadržaja, kao i vrednosti 2SD i prinosa prikazane su u Tabeli 19.

Vrednosti prinosa kretale su se u opsegu 99,46 - 103,58%, čime je potvrđena tačnost metode. Veoma dobra reproduktivnost još jednom je potvrđena na osnovu dobijenih vrednosti RSD (1,66 - 4,93%).

**Tabela 19.** Rezultati određivanja metamitrona u rastvorima poznate koncentracije razvijenom hronopotenciometrijskom metodom primenom elektrode od staklastog ugljenika

Dodata količina (mg/l)	Određena količina (mg/l) <sup>a</sup>	Prinos (%)
3,1	$3,21 \pm 0,32$	103,58
7,4	$7,36 \pm 0,29$	99,46
9,5	$9,53 \pm 0,32$	100,28

<sup>a</sup>Srednja vrednost  $\pm$  2SD, n = 3.

#### 4.2.1.9 Interferencije

Uticaj prisustva različitih neorganskih jona na analitički signal metamidrona ispitan je na elektrodi od staklastog ugljenika, pri prethodno definisanim optimalnim uslovima. Analizirani su rastvori herbicida od 2 i 10 mg/l, primenjena struja redukcije iznosila je za nižu i višu koncentraciju  $-1,4 \mu\text{A}$  i  $-3,5 \mu\text{A}$ , a dobijeni rezultati prikazani su u Tabeli 20.

Varijacije analitičkog signala metamidrona na elektrodi od staklastog ugljenika kretale su se u granicama od  $-4,76\%$  u prisustvu  $\text{NO}_3^-$  jona do  $+4,95$  usled prisustva  $\text{Mg}^{2+}$  jona u analiziranom rastvoru. Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da ispitivani neorganski joni nisu doveli do značajne varijacije signala metamidrona, odnosno maksimalna vrednost varijacije bila je manja od  $5\%$ , čime je potvrđena selektivnost metode.

**Tabela 20.** Uticaj neorganskih jona na hronopotenciometrijsko određivanje metamidrona primenom elektrode od staklastog ugljenika

Varijacija analitičkog signala metamidrona za ispitane odnose koncentracija metamidron:interferent (%)					
Interferent	1:0,1	1:1	1:5	1:10	1:50
$\text{K}^+$	0	0	-3,41	-2	-4,55
$\text{Na}^+$	-1,00	-0,76	-1,51	-3,01	-2,73
$\text{Ca}^{2+}$	-0,49	-0,99	-1,49	-0,70	1,00
$\text{Mg}^{2+}$	1,74	2,97	-2,97	-3,45	4,95
$\text{SO}_4^{2-}$	1,35	1,94	0,97	1,41	-0,97
$\text{Cl}^-$	2,09	0,30	4,39	0,99	-3,41
$\text{HCO}_3^-$	1,06	2,13	-1,05	-1,74	-1,05
$\text{NO}_3^-$	0	0,53	-3,57	2,00	-4,76
$\text{Fe}^{2+}$	-1,18	-2,74	-3,86	0,83	-2,74

#### 4.2.1.10 Robusnost

U cilju ispitivanja robusnosti hronopotenciometrijske metode primenom elektrode od staklastog ugljenika ispitani su uticaji varijacije pH vrednosti Britton-Robinson pufera  $2 \pm 0,2$  i početnog potencijala ( $-0,30 \pm 0,05 \text{ V}$ ) na analitički signal metamidrona. Ispitane vrednosti

redukcionih struja razlikovale su se za analizirane koncentracije, za koncentraciju od 2 mg/l ispitano je variranje redukcione struje u granicama ( $-1,4 \pm 0,1 \mu\text{A}$ ), dok je za koncentraciju metamitrona od 10 mg/l struja varirana u granicama ( $-2,7 \pm 0,1 \mu\text{A}$ ).

U rastvoru koncentracije 2 mg/l promene pH i početnog potencijala dovodile su do blagog povećanja signala a maksimalna vrednost u slučaju pH iznosila je 1,08%, dok je u slučaju početnog potencijala iznosila 1,28%. Promenom struje dolazilo je do blagog smanjenja vrednosti analitičkog signala metamitrona (-1,18%). Blago povećanje analitičkog signala metamitrona uočeno je u rastvoru od 10 mg/l u slučaju variranja pH i struje (1,23%), dok je variranjem početnog potencijala dolazilo do njegovog smanjenja (-0,82%). Kako je maksimalna vrednost varijacije signala sa promenom najznačajnijih parametara analize bila manja od 2%, potvrđena je robusnost hronopotenciometrijske metode za određivanje metamitrona primenom elektrode od staklastog ugljenika.

#### ***4.2.1.11 Primena razvijene hronopotenciometrijske metode za određivanje sadržaja metamitrona u komercijalnim formulacijama***

U cilju ispitivanja mogućnosti primene razvijene hronopotenciometrijske metode, analizirane su komercijalne formulacije koje sadrže metamitron kao aktivnu materiju. Većina analiziranih komercijalnih formulacija bila je u obliku koncentrovane suspenzije (*Korida, Metak i Metix*) sa deklarisanim sadržajem aktivne supstance od 700 g/l. Formulacija *Brevis* bila je u obliku vodorastvorljivih granula, uz znatno niži deklarisan sadržaj metamitrona (150 g/kg). Formulacije su razblažene acetonitriplom, a zatim pomoćnim elektrolitom. Sadržaj metamitrona određen je metodom kalibracione krive, a za svaku formulaciju merenja su izvedena u tri ponavljanja. Dobijeni rezultati prikazani su u Tabeli 21.

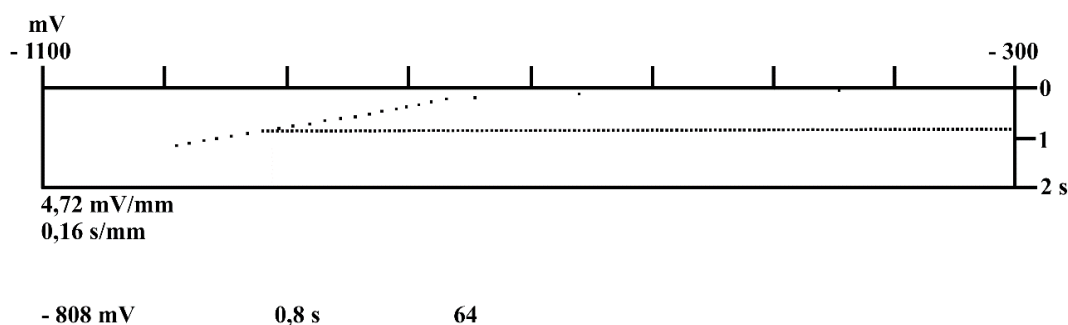
Razvijenom hronopotenciometrijskom metodom postignuto je dobro slaganje dobijenih sadržaja sa sadržajima metamitrona koji su deklarisani na ambalaži od strane proizvođača (prinosi u granicama 99,23 - 101,18%). Dobijene vrednosti RSD niže su od 2%, što potvrđuje reproduktivnost metode. Za poređenje rezultata dobijenih hronopotenciometrijski sa deklarisanim sadržajima, primenjen je Studentov t-test uparenih vrednosti. Kako su izračunate t-vrednosti bile niže od teorijskih, na ovaj način potvrđeno je da nema značajnog odstupanja sadržaja određenih hronopotenciometrijski od deklarisanih vrednosti uz verovatnoću od 95%. Signal metamitrona tokom izvođenja eksperimenata u komercijalnim formulacijama kretao se

u opsegu potencijala od -727 do -820 mV, a dobijeni hronopotenciogram analizom formulacije *Korida* prikazan je na Slici 40.

**Tabela 21.** Rezultati dobijeni analizom komercijalnih formulacija primenom razvijene hronopotenciometrijske metode na elektrodi od staklastog ugljenika

Komercijalna formulacija	Deklarisano	Određeno <sup>a</sup>
<b>Sadržaj metamitrona (g/l)</b>		
<i>Korida</i>	700	698,16 ± 9,69 (99,74)
<i>Metak</i>	700	701,28 ± 15,07 (100,18)
<i>Metix</i>	700	694,64 ± 18,33 (99,23)
<b>Sadržaj metamitrona (g/kg)</b>		
<i>Brevis</i>	150	151,78 ± 4,78 (101,18)

<sup>a</sup>Srednja vrednost ± 2SD (prinos, %), n = 3.



**Slika 40.** Hronopotenciogram dobijen analizom formulacije metamitrona *Korida* na elektrodi od staklastog ugljenika ( $c_{\text{mm}} = 7 \text{ mg/l}$ ,  $i_{\text{red}} = -2,7 \text{ } \mu\text{A}$ )

#### 4.2.1.12 Primena razvijene hronopotenciometrijske metode za određivanje sadržaja metamitrona u uzorcima vode

U cilju primene razvijene hronopotenciometrijske metode na uzorke vode od sakupljenih uzoraka je pripremljen pomoćni elektrolit (Britton-Robinson pufer pH 2), a za izvođenje analize korišćena je zapremina od 20 ml. Kako je sadržaj metamitrona u uzorcima vode bio niži od vrednosti LOD, uzorci vode su spajkovani sa 1 mg/l metamitrona i analizirani. Za proveru tačnosti, spajkovani uzorci vode analizirani su i hromatografskom (LC-MS/MS)

metodom. Sadržaj metamitrona određen je metodom kalibracione krive u tri ponavljanja, a dobijeni rezultati prikazani su u Tabeli 22.

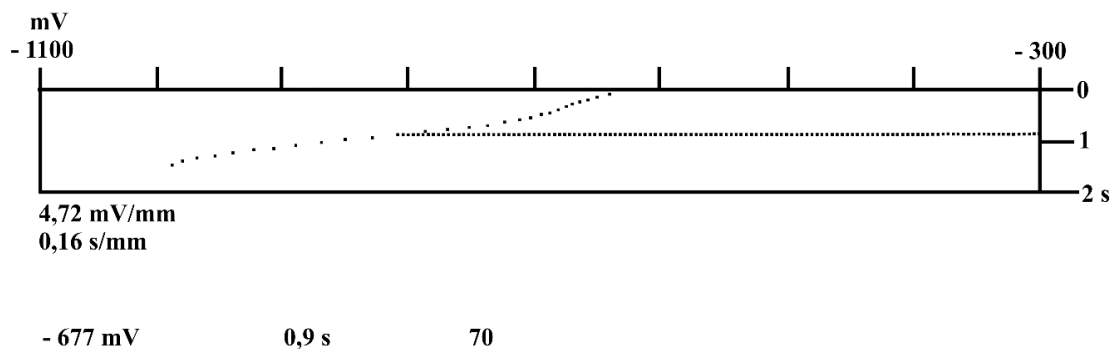
**Tabela 22.** Rezultati dobijeni analizom uzoraka vode hronopotenciometrijskom metodom na elektrodi od staklastog ugljenika i referentnom hromatografskom metodom

Uzorak	Sadržaj metamitrona (mg/l)	Dodato metamitrona (mg/l)	Određen sadržaj metamitrona (mg/l)	
			Hronopotenciometrija	LC-MS/MS
Begeč česmenska voda	< LOD <sup>a</sup>	1	1,007 ± 0,08 (100,74) <sup>b</sup>	0,985
Begeč izvor	< LOD	1	1,000 ± 0,02 (99,97)	0,961
SPENS izvor	< LOD	1	1,043 ± 0,07 (104,31)	1,058
Zobnatičko jezero	< LOD	1	1,062 ± 0,06 (106,20)	1,084
Reka Tisa	< LOD	1	0,938 ± 0,03 (93,81)	0,974

<sup>a</sup>LOD = 0,09 mg/l

<sup>b</sup>Srednja vrednost ± 2SD (prinos, %), n = 3.

Sadržaji određeni hronopotenciometrijski bili su približni dodatim vrednostima prinosi u granicama 93,81 - 106,2%. Vrednosti RSD za analizirane uzorke bile su u granicama 1,09 - 3,22%, dok je nešto viša vrednost RSD (4,08%) dobijena za uzorak Begeč česmenska voda, međutim i ova vrednost je bila u prihvatljivim granicama (niža od 5%), te je i na ovom mestu potvrđena reproduktivnost razvijene metode. Statističkim poređenjem sadržaja dobijenih hronopotenciometrijskom i hromatografskom metodom primenom Studentovog t-testa uz 95% verovatnoće nisu uočena značajna odstupanja. Redukcija metamitrona pri izvođenju hronopotenciometrijskih merenja odvijala se pri rasponu potencijala od -638 mV do -735 mV, a odsustvo interferirajućih supstanci potvrđeno je i izgledom hronopotenciograma spajkovanih uzoraka vode (Slika 41).



**Slika 41.** Hronopotenciogram snimljen u spajkovanom uzorku vode Zobnatičko jezero

( $c_{\text{mtm}} = 1 \text{ mg/l}$ ,  $i_{\text{red}} = -1,4 \text{ }\mu\text{A}$ )

#### 4.2.2. Tankoslojna živina elektroda

U slučaju određivanja metamitrona primenom tankoslojne živine elektrode kao radne elektrode, preliminarni eksperimenti izvedeni su u Britton-Robinson puferu pH 5 skeniranjem potencijala u katodnom smeru od  $-0,20 \text{ V}$  do  $-1,00 \text{ V}$ . Usled redukcije na radnoj elektrodi rastvoreni kiseonik dovodio je do smetnji, a u cilju njegovog uklanjanja u preliminarnim eksperimentima korišćena je fizička metoda provođenjem struje azota. Kao i u slučaju elektrode od staklastog ugljenika, i kod tankoslojne živine elektrode uočen je jedan redukcioni pik pri nešto pozitivnijoj vrednosti potencijala od  $\sim -670 \text{ mV}$ .

##### 4.2.2.1 Ispitivanje optimalne metode za uklanjanje rastvorenog kiseonika iz rastvora

U cilju ispitivanja optimalne metode za uklanjanje rastvorenog kiseonika iz rastvora ispitane su hemijska metoda uz dodatak natrijum-sulfita, askorbinske kiseline, oksalne kiseline, kalijum-bromida i natrijum-bromida, kao i fizička metoda provođenja struje azota u trajanju od 10 minuta. Primenom natrijum-sulfita kiseonik je efikasno redukovan, ali se metamitron nije mogao detektovati u ispitivanom rastvoru, dok se primena ostalih hemijskih sredstava nije pokazala efikasnom. U svim daljim eksperimentima primenjena je fizička metoda uklanjanja kiseonika provođenjem struje azota kroz ispitivani rastvor. U cilju definisanja optimalnog

vremena deaeracije ispitana su različita vremena, a koncentracija metemitrona iznosila je 10 mg/l.

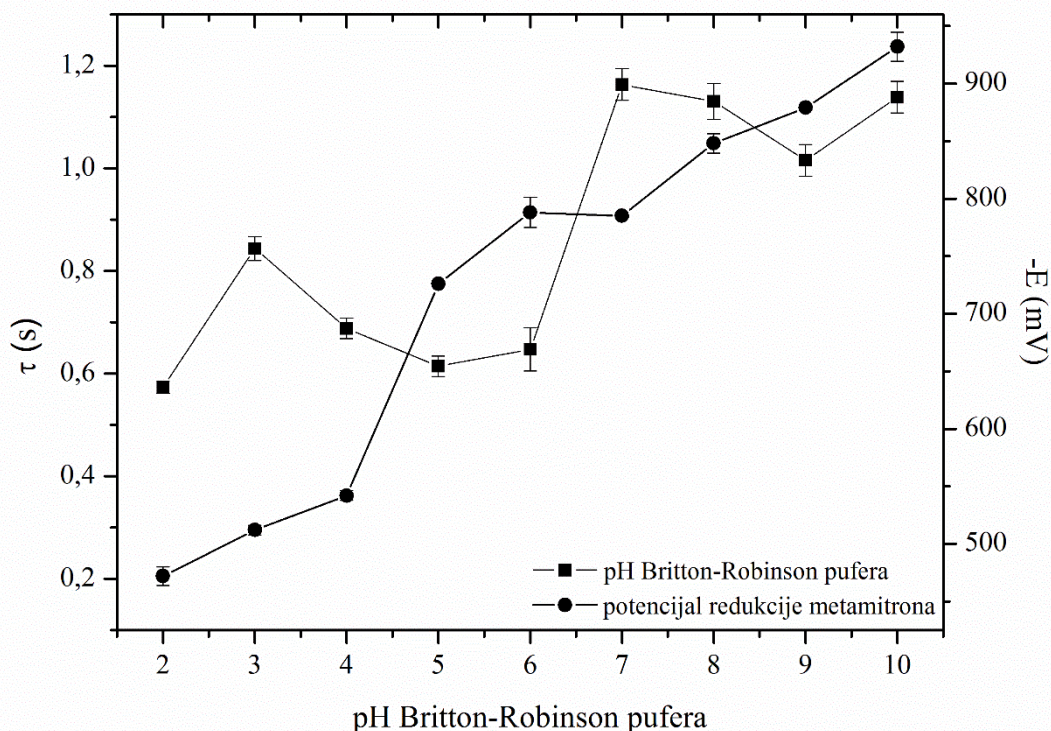
Dobijeni rezultati pokazali su da provođenje azota u intervalu od 5 do 10 minuta nije dovelo do promene analitičkog signala metemitrona, dok vreme kraće od 5 minuta nije bilo dovoljno efikasno, pošto se teško dostizala završna vrednost potencijala, a dobijeni su razvučeni signali metemitrona. Kao optimalno vreme provođenja azota u cilju uklanjanja rastvorenog kiseonika usvojeno je 5 minuta.

#### ***4.2.2.2 Uticaj vrste, pH i koncentracije pomoćnog elektrolita na analitički signal metemitrona***

Nakon uklanjanja rastvorenog kiseonika iz rastvora, u cilju određivanja metemitrona na tankoslojnoj živinoj elektrodi poređeni su različiti pomoćni elektroliti, a koncentracija analita iznosila je od 1 do 10 mg/l. Skeniranjem potencijala u katodnom smeru od -0,20 V do -1,00 V dobijen je jedan redukcionni pik metemitrona u oblasti potencijala od -551 do -795 mV u sledećim elektrolitima: 0,1 mol/l acetatnom puferu pH 4; 0,1 mol/l citratnom puferu pH 4; 0,01 mol/l fosfatnom puferu pH 6; Britton-Robinson puferu pH 5 i u 5 mmol/l rastvoru HCl. Britton-Robinson pufer je usvojen kao optimalni pomoćni elektrolit, s obzirom da je pokazao najbolje karakteristike u odnosu na ostale u pogledu oštine i visine analitičkog signala.

Optimalna vrednost pH Britton-Robinson pufera ispitana je u opsegu od pH od 2 do 12, pri početnom potencijalu od -0,20 V, završnom potencijalu od -1,00 V i prisustvu različitih koncentracija metemitrona od 1 - 10 mg/l. Zavisnost visine analitičkog signala metemitrona i potencijala redukcije od pH Britton-Robinson pufera pri koncentraciji metemitrona od 10 mg/l prikazana je na Slici 42. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost dobijenu na osnovu tri ponavljanja, a reproduktivnost merenja predstavljen je vertikalnim linijama kao vrednost 2SD.

Na slici se može videti da je, u opsegu pH od 2 do 6, signal metemitrona varirao u granicama od 0,57 - 0,84 s, a u oblasti pH od 7 do 10 dolazilo je do značajnog povećanja signala (1,01 - 1,16 s). Takođe, povećanjem pH Britton-Robinson pufera potencijal redukcije metemitrona se pomerao ka negativnijim vrednostima (Slika 42).



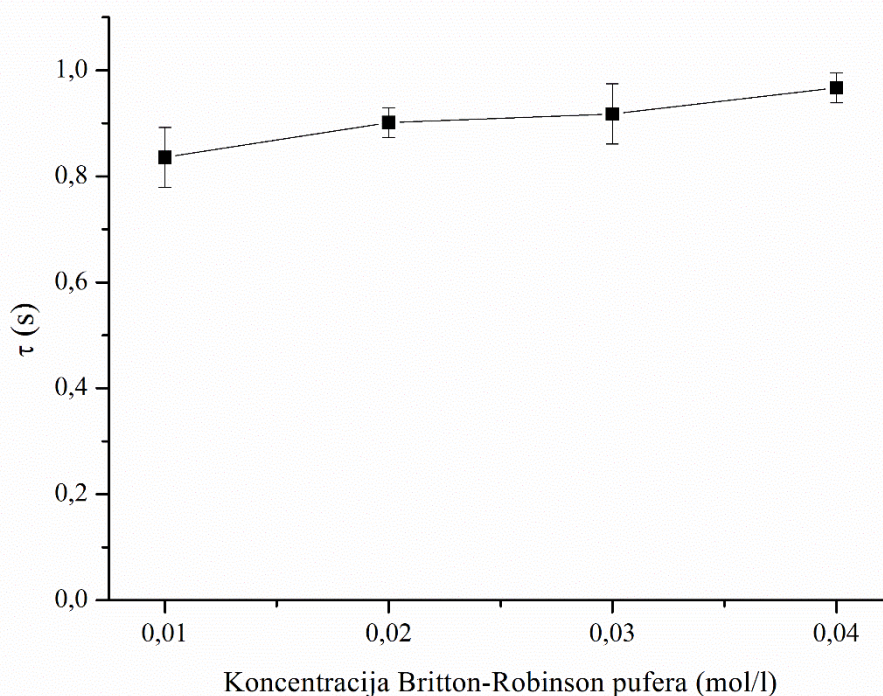
**Slika 42.** Uticaj pH Britton-Robinson pufera na analitički signal i potencijal redukcije metamitrona na tankoslojnoj živinoj elektrodi ( $C_{\text{mtm}} = 10 \text{ mg/l}$ ,  $i_{\text{red}} = -4,6 \text{ }\mu\text{A}$ )

Velika razlika u visini analitičkog signala metamitrona u navedenim oblastima pH može se objasniti na osnovu vrednosti potencijala redukcije metamitrona. Naime, pretpostavka je da u kiseloj sredini redukcionni signal metamitrona odgovara nastajanju 1,6-dihidrometamitrona, dok u neutralnoj i alkalnoj sredini nastaje 2,3-dihidrometamitron (Valentin i sar., 1989). Za razliku od tankoslojne živine elektrode, kod elektrode od staklastog ugljenika nije dolazilo do veće varijacije u visini signala, odnosno potencijala redukcije metamitrona, a signal se javljao pri vrednostima od  $-660 \text{ mV}$  do  $-872 \text{ mV}$ , što potvrđuje činjenicu da se pri izvođenju eksperimenata na pomenutoj radnoj elektrodi javljao samo signal usled redukcije do 2,3-dihidrometamitrona. Pufferi pH 2 i 10 nisu pokazali dobre karakteristike u pogledu osetljivosti, odnosno najniža koncentracija pri kojoj se signal metamitrona javljao bila je  $5 \text{ mg/l}$ , dok u pufferima pH 11 i 12 nisu dobijeni signali, čak ni pri višim koncentracijama (do  $20 \text{ mg/l}$ ). Kao optimalna vrednost pH Britton-Robinson pufera usvojena je pH 7, pošto je pri toj vrednost dobijen najviši signal, uz dobru reproduktivnost ( $\text{RSD} = 2,63\%$ ).

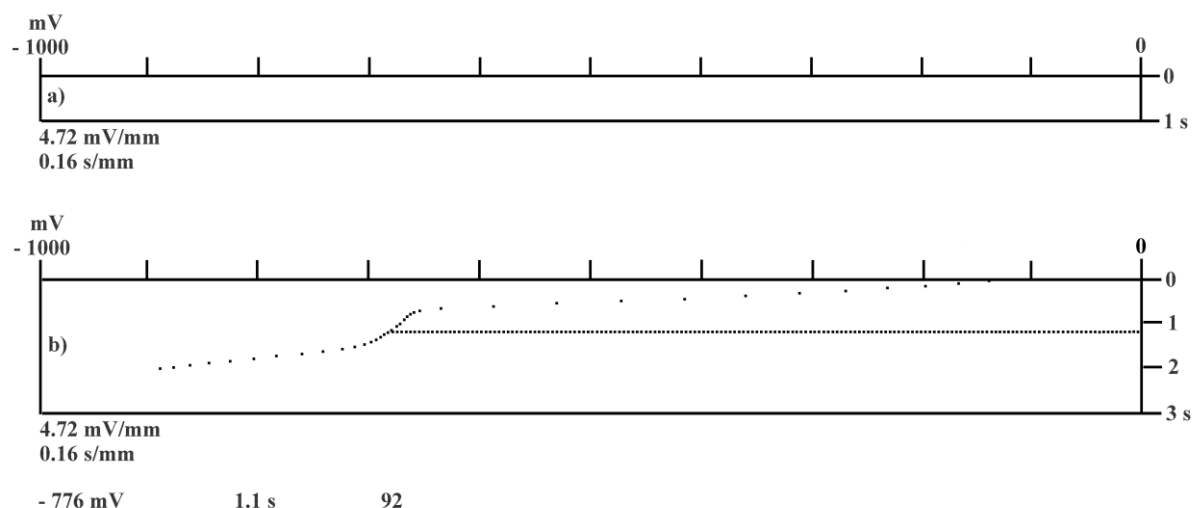


Pored uticaja pH vrednosti Britton-Robinson pufera na analitički signal metamitrona, ispitan je i uticaj koncentracije Britton-Robinson pufera. Pripremljeni su puferi koncentracija 0,01; 0,02; 0,03 i 0,04 mol/l u rastvoru metamitrona koncentracije 10 mg/l. Eksperimenti su izvedeni u rasponu potencijala od -0,20 V do -1,00 V, uz primenjenu struju redukcije od -5,1  $\mu$ A. Dobijeni rezultati prikazani su na Slici 43. Reproductivnost merenja prikazana je kao odstupanje od srednje vrednosti iskazano preko 2SD.

Na Slici 43 može se videti da promena koncentracije Britton-Robinson pufera nije značajno uticala na visinu signala metamitrona, dok su nešto lošije reproductivnosti uočene za koncentracije 0,01 i 0,03 mol/l. Kao optimalna koncentracija Britton-Robinson pufera usvojena je vrednost od 0,04 mol/l, s obzirom da je dobijen najviši signal uz najbolju reproductivnost (RSD = 1,47%). Hronopotenciogrami snimljeni u Britton-Robinson puferu pH 7 pre i nakon dodatka standardnog rastvora metamitrona, prikazani su na Slici 44.



**Slika 43.** Uticaj koncentracije Britton-Robinson pufera na analitički signal metamitrona na tankoslojnoj živinoj elektrodi ( $C_{\text{mtm}} = 10 \text{ mg/l}$ ,  $i_{\text{red}} = -5,1 \mu\text{A}$ )

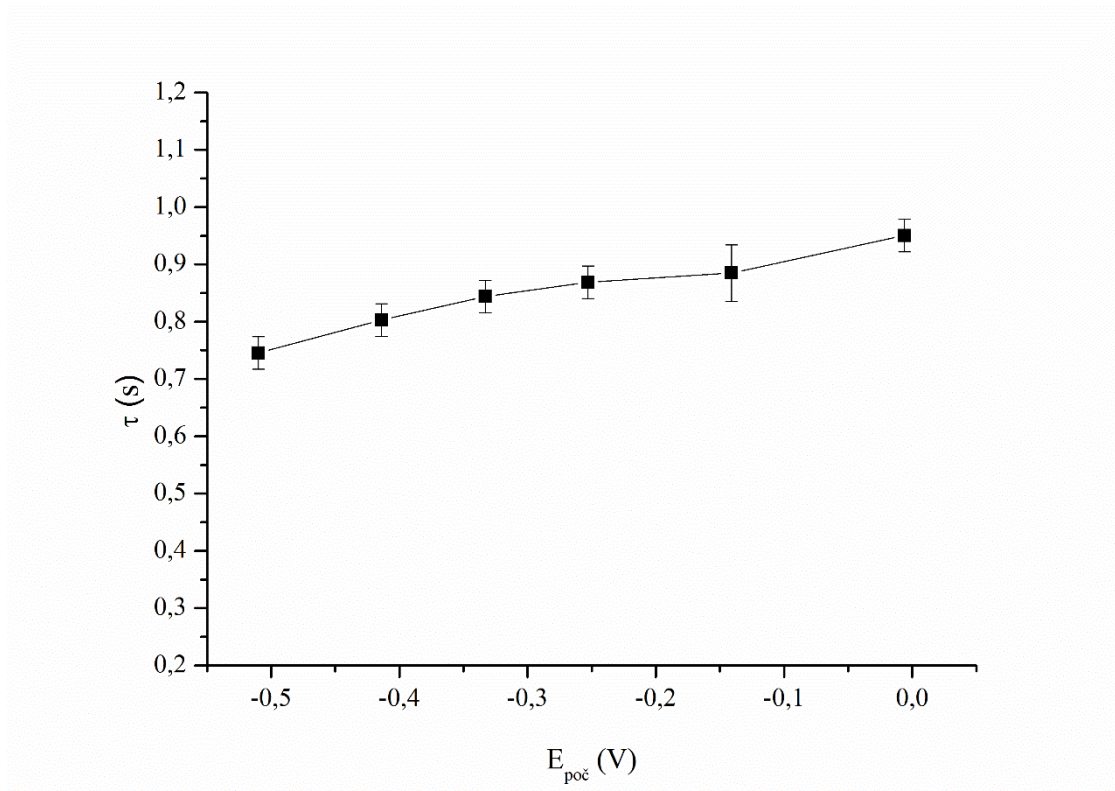


**Slika 44.** Hronopotenciogram dobijen u Britton-Robinson puferu pH 7 na tankoslojnoj živinoj elektrodi ( $c_{\text{mtm}} = 10 \text{ mg/l}$ ,  $i_{\text{red}} = -4,6 \mu\text{A}$ , V): **a)** pre i **b)** nakon dodatka metamitrona

#### 4.2.2.3 Uticaj početnog potencijala na analitički signal metamitrona

Uticaj početnog potencijala na analitički signal metamitrona ispitan je u pomoćnom elektrolitu sa sadržajem metamitrona od 10 mg/l, primenom završnog potencijala od -1,00 V, a struja redukcije iznosila je -4,6  $\mu\text{A}$ . Početni potencijal je menjan u intervalu od 0 V do -0,51 V, a dobijeni rezultati prikazani su na Slici 45. Na dijagramu tačke su prikazane kao srednje vrednosti analitičkog signala na osnovu tri merenja, dok je reproduktivnost izražena preko vrednosti 2SD.

U ispitivanom rasponu potencijala od 0 do -0,51 V analitički signal metamitrona opadao je od 0,95 s do 0,75 s, a najlošija reproduktivnost ostvarena je pri vrednosti od -0,14 V. Kako je najviši (0,95 s) i najreproduktivniji analitički signal (RSD = 1,49%) dobijen pri vrednosti početnog potencijala od 0 V, ovaj potencijal je usvojen kao optimalna vrednosti i primenjen je u svim daljim eksperimentima.



**Slika 45.** Uticaj početnog potencijala na analitički signal metamitrona na tankoslojnoj živinoj elektrodi ( $C_{\text{mtm}} = 10 \text{ mg/l}$ ,  $i_{\text{red}} = -4,6 \text{ }\mu\text{A}$ )

#### 4.2.2.4 Uticaj struje redukcije na analitički signal metamitrona

Uticaj struje redukcije na analitički signal metamitrona ispitan je u rastvorima koncentracije 2 i 10 mg/l. Ispitani interval struje za koncentraciju od 2 mg/l iznosio je od -1,4 do -7,1  $\mu\text{A}$ , dok je, u rastvoru koncentracije 10 mg/l, ispitani interval obuhvatio struje od -3,5 do -16  $\mu\text{A}$ .

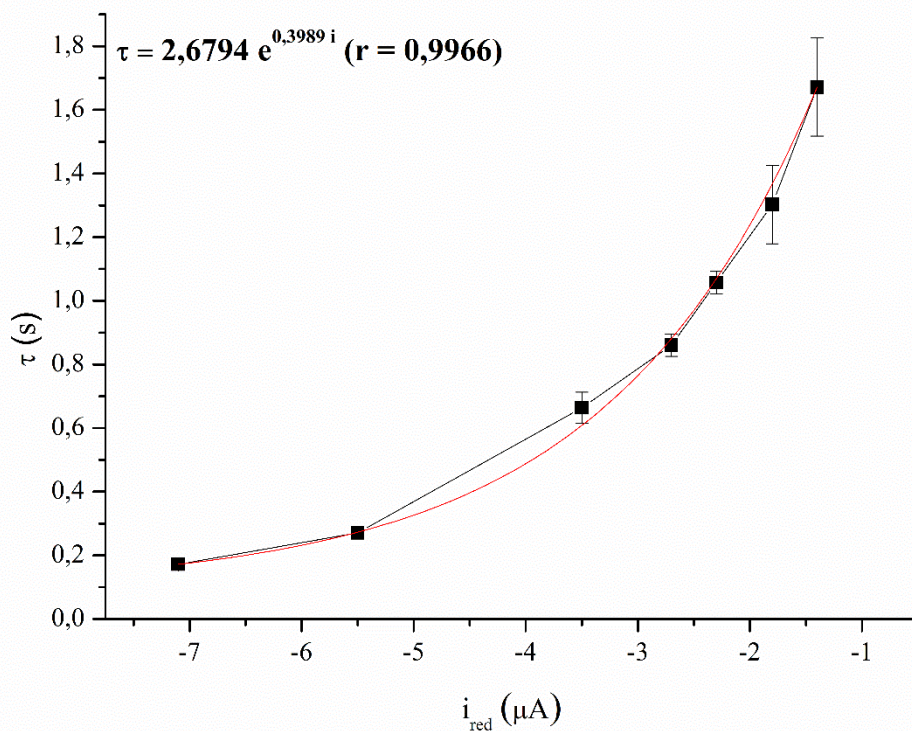
Za obe koncentracije dobijena je eksponencijalna zavisnost, odnosno sa negativnijim vrednostima struje redukcije dolazilo je do opadanja analitičkog signala metamitrona, a dobijene zavisnosti prikazane su na Slici 46. Tačke predstavljene na dijagramu odnose se na srednju vrednost visine analitičkog signala dobijenog za tri ponavljanja, dok je reproduktivnost predstavljena kao vrednost 2SD.

Kod analiziranih rastvora saopštavanjem negativnijih vrednosti struje dobijeni su reproduktivniji signali (Slika 46 a i b). Takođe, uočeno je da se, pri negativnijim vrednostima

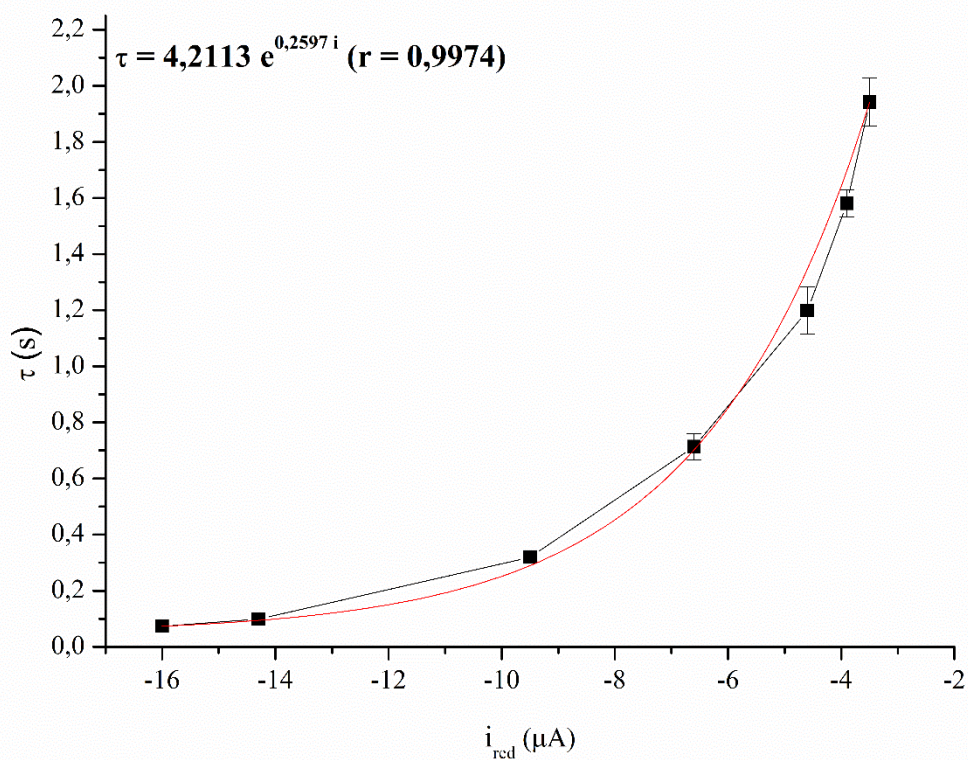
struje, potencijal redukcije pomera ka negativnijim vrednostima. Pri ispitivanim rasponima redukcione struje potencijal redukcije metamitrona varirao je u rasponu od -787 mV do -831 mV, uz vrednost RSD od 3,03%. Određeni optimalni interval struje prema kriterijumu o pravolinijskoj zavisnosti proizvoda struje i kvadratnog korena tranzicionog vremena u funkciji od struje za koncentraciju metamitrona od 2 mg/l iznosi -2,3 do -5,5  $\mu\text{A}$ , a za koncentraciju od 10 mg/l interval struje redukcije iznosi -3,9 do -9,5  $\mu\text{A}$ .



a)



b)



**Slika 46.** Uticaj struje na analitički signal metamitrona primenom tankoslojne živine elektrode: **a)**  $C_{\text{mtm}} = 2 \text{ mg/l}$ , **b)**  $C_{\text{mtm}} = 10 \text{ mg/l}$

#### 4.2.2.5 Linearnost

Zavisnost analitičkog signala metamitrona od koncentracije ispitana je za tri opsega: 0,8 - 2,4 mg/l, 2 - 10 mg/l i 10 - 30 mg/l. Eksperimenti su izvedeni pri prethodno definisanim optimalnim uslovima, a struje redukcije su za navedene opsege koncentracija iznosile redom: -3,1  $\mu$ A, -4,3  $\mu$ A i -8,3  $\mu$ A. Za svaki koncentracioni opseg merenja su izvedena u pet ponavljanja. Dobijene srednje vrednosti nagiba, odsečka, njihove SD i koeficijenti korelacije prikazane su u Tabeli 23. Za sva tri ispitivana koncentraciona opsega dobijene vrednosti koeficijenta korelacije kreću se u intervalu od 0,9929 do 0,9968, što potvrđuje dobru linearnost.

**Tabela 23.** Linearni opsezi koncentracija za hronopotenciometrijsko određivanje metamitrona primenom tankoslojne živine elektrode

Koncentracioni opseg (mg/l)	Redukciona struja ( $\mu$ A)	Nagib	Odsečak	Sa <sup>a</sup>	Sb <sup>b</sup>	r
0,8 - 2,4	-3,2	0,3178	0,2065	0,0094	0,0066	0,9954
2 - 10	-4,3	0,0687	0,2883	0,0026	0,0065	0,9968
10 - 30	-8,3	0,0477	-0,0781	0,0003	0,0034	0,9929

Sa<sup>a</sup> standardna devijacija nagiba (s x l/mg), n = 5.

Sb<sup>b</sup> standardna devijacija odsečka (s), n = 5.

#### 4.2.2.6 Granica detekcije i granica kvantifikacije

Vrednosti LOD i LOQ izračunate su po prethodno definisanim kriterijumima (izrazi 14 i 15) na osnovu vrednosti nagiba i SD odsečka definisanih za najniži koncentracioni opseg od 0,8 do 2,4 mg/l. Za tankoslojnu živinu elektrodu pri hronopotenciometrijskom određivanju metamitrona, izračunate vrednosti LOD i LOQ iznose redom 0,07 mg/l i 0,21 mg/l

#### 4.2.2.7 Preciznost

Preciznost hronopotenciometrijske metode za određivanje metamitrona primenom tankoslojne živine elektrode procenjena je na osnovu ponovljivosti i reproduktivnosti za dva sadržaja metamitrona od 2 i 10 mg/l. Analiza rastvora izvedena je pri prethodno definisanim

optimalnim uslovima, a primenjene struje redukcije iznosile su  $-2,3 \mu\text{A}$  i  $-5,1 \mu\text{A}$  za niži i viši sadržaj herbicida.

Analizom različitih rastvora u toku jednog dana dobijene vrednosti RSD iznosile su 1,15% za nižu i 0,88% za višu koncentraciju, dok su vrednosti RSD u toku pet različitih dana iznosile 2,08% (2 mg/l) i 1,75% (10 mg/l). Kao što se na osnovu dobijenih vrednosti RSD može zaključiti, razvijena hronopotenciometrijska metoda za određivanje metamitrona može se okarakterisati kao precizna, a postignuta je veća preciznost u poređenju sa elektrodom od staklastog ugljenika. Pri izvođenju ovih eksperimenata redukcija metamitrona odvijala se pri srednjem potencijalu od  $-830 \text{ mV}$ . Izračunate vrednosti RSD za potencijal redukcije metamitrona iznosile su 1,24% za sadržaj metamitrona od 2 mg/l i 0,41% za sadržaj metamitrona od 10 mg/l.

#### 4.2.2.8 Tačnost

U cilju ispitivanja tačnosti metode, analizirani su rastvori sa različitim sadržajem metamitrona. Sadržaj metamitrona određen je metodom kalibracione krive, a za svaku koncentraciju određivanje je izvedeno u tri ponavljanja. Dobijene srednje vrednosti, uz vrednosti 2SD i prinosa prikazane su u Tabeli 24.

Određene količine bile su bliske sa dodatim vrednostima za sve koncentracije, što potvrđuju i vrednosti prinosa koje su približne 100% (98,78 - 100,39%), dok veoma niske vrednosti RSD potvrđuju reproduktivnost razvijene metode.

**Tabela 24.** Rezultati određivanja metamitrona u rastvorima poznatih koncentracija razvijenom hronopotenciometrijskom metodom uz primenu tankoslojne živine elektrode

Koncentracija rastvora (mg/l)	Određena količina (mg/l) <sup>a</sup>	Prinos (%)
1,6	$1,59 \pm 0,08^a$	100,39
4,4	$4,35 \pm 0,14$	98,78
7,5	$7,51 \pm 0,14$	100,20

<sup>a</sup>Srednja vrednost  $\pm$  2SD, n = 3.

#### 4.2.2.9 Interferencije

Selektivnost metode ispitana je analizom rastvora metamidrona koncentracije 2 mg/l i 10 mg/l, u koje su dodati različiti neorganski joni uz variranje njihovih koncentracija. Primenjene vrednosti struje redukcije iznosile su -3,1  $\mu\text{A}$  (2 mg/l) i -5,1  $\mu\text{A}$  (10 mg/l). Dobijeni rezultati za ispitane odnose prikazani su u Tabeli 25.

Dodavanje neorganskih jona u ispitivani rastvor u koncentracijama pedeset puta većim od analita nije dovelo do značajne varijacije analitičkog signala metamidrona, a maksimalna vrednost uočena je u prisustvu  $\text{Cl}^-$  jona (4,5%). S obzirom da je maksimalna vrednost varijacije niža od 5%, može se zaključiti da je razvijena metoda selektivna.

**Tabela 25.** Uticaj neorganskih jona na hronopotenciometrijsko određivanje metamidrona primenom tankoslojne živine elektrode

Varijacija analitičkog signala metamidrona za ispitane odnose koncentracija metamidron:interferent (%)					
Interferent	1:0,1	1:1	1:5	1:10	1:50
$\text{K}^+$	0	0	0	0,81	2,08
$\text{Na}^+$	0	-1,54	-1,15	0,77	2,30
$\text{Ca}^{2+}$	1,15	1,15	-1,15	-0,86	-2,30
$\text{Mg}^{2+}$	0	0	1,25	-0,89	3,75
$\text{SO}_4^{2-}$	-0,87	-1,73	-1,84	-1,73	-1,18
$\text{Cl}^-$	1,80	1,15	1,15	4,50	2,30
$\text{HCO}_3^-$	-2,40	-1,66	-1,08	-2,40	3,22
$\text{NO}_3^-$	0,92	3,70	0	3,21	0
$\text{Fe}^{2+}$	-0,93	0	2,74	-0,93	2,74

#### 4.2.2.10 Robusnost

Robusnost razvijene hronopotenciometrijske metode ispitana je variranjem jednog od osnovnih instrumentalnih i eksperimentalnih parametara: početnog potencijala ( $0 \pm 0,05$  V), pH Britton-Robinson pufera  $7 \pm 0,2$  i redukcione struje ( $\pm 0,1$   $\mu\text{A}$ ), a koncentracija metamidrona je iznosila 2 mg/l i 10 mg/l.



Kod koncentracije metamitrona od 2 mg/l struja redukcije varirana je u rasponu ( $-2,6 \pm 0,1 \mu\text{A}$ ), a variranjem primenjene struje nije dolazilo do promene analitičkog signala metamitrona. Promene u visini signala usled variranja pH iznosile su do -1,92%, dok su nešto niže vrednosti analitičkog signala dobijene u slučaju varijacije početnog potencijala (do 1,03%). U slučaju koncentracije metamitrona od 10 mg/l, struja redukcije varirana je u rasponu ( $-4,6 \pm 0,1 \mu\text{A}$ ), pri čemu promena početnog potencijala nije dovođila do promene signala, dok su maksimalne promene signala uzrokovane promenom pH i struje redukcije iznosile do 0,67%. U slučaju obe koncentracije uočene su veoma male promene analitičkog signala, čime je potvrđena robusnost razvijene metode.

#### 4.2.2.11 Primena razvijene hronopotenciometrijske metode za određivanje sadržaja metamitrona u komercijalnim formulacijama

U cilju primene tankoslojne živine elektrode za određivanje sadržaja metamitrona u komercijalnim formulacijama analizirane su iste formulacije kao i u slučaju elektrode od staklastog ugljenika. Hronopotenciometrijskoj analizi prethodilo je rastvaranje formulacija u acetonitrilu, a zatim u pomoćnom elektrolitu, odnosno u Britton-Robinson puferu pH 7. Sadržaj metamitrona određen je metodom kalibracione krive, a za svaku analiziranu formulaciju merenja su izvedena u tri ponavljanja. Dobijene srednje vrednosti, uz izračunate vrednosti 2SD, i prinosa prikazane su Tabeli 26.

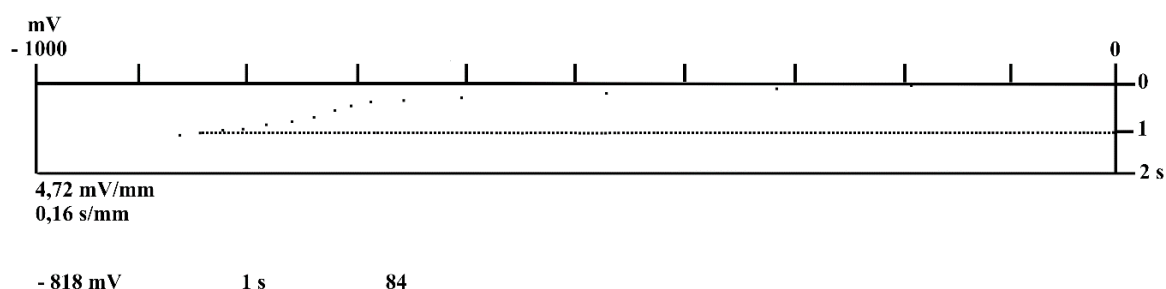
**Tabela 26.** Rezultati dobijeni analizom komercijalnih formulacija primenom razvijene hronopotenciometrijske metode na tankoslojnoj živinoj elektrodi

Komercijalna formulacija	Deklarisano	Određeno <sup>a</sup>
<b>Sadržaj metamitrona (g/l)</b>		
<i>Korida</i>	700	$695,49 \pm 15,42$ (99,36)
<i>Metak</i>	700	$697,04 \pm 12,59$ (99,58)
<i>Metix</i>	700	$696,02 \pm 12,57$ (99,43)
<b>Sadržaj metamitrona (g/kg)</b>		
<i>Brevis</i>	150	$152,74 \pm 2,73$ (101,82)

<sup>a</sup>Srednja vrednost  $\pm$  2SD (prinos, %), n = 3.

Sadržaji metamitrona dobijeni hronopotenciometrijski bili su u izuzetno dobroj korelaciji sa deklarisanim vrednostima od strane proizvođača, vrednosti prinosa bile su u rasponu 99,36 -101,82%. Određeni sadržaji hronopotenciometrijski su upoređeni sa deklarisanim vrednostima primenom Studentovog t-testa uparenih vrednosti. Kako su izračunate t-vrednosti bile manje od teorijskih, određeni sadržaji metamitrona nisu se statistički značajno razlikovali od deklarisanih vrednosti, uz verovatnoću od 95%. Pored toga, treba istaći veoma dobru reproduktivnost koja je postignuta tokom izvođenja hronopotenciometrijskih merenja, pošto su vrednosti RSD su bile manje od 1,2%, što je mnogo manje i u odnosu na iste vrednosti dobijene za elektrodu od staklastog ugljenika.

Originalni zapis analizatora dobijen analiziranjem komercijalnih formulacija isključuje prisustvo interferirajućih supstanci (Slika 47). Potencijal redukcije metamitrona tokom izvođenja analiza kretao se u opsegu od -775 do -890 mV.



**Slika 47.** Hronopotenciogram dobijen analizom formulacije metamitrona *Metix* na tankoslojnoj živinoj elektrodi ( $c_{\text{mtm}} = 7 \text{ mg/l}$ ,  $i_{\text{red}} = -3,4 \text{ }\mu\text{A}$ )

#### 4.2.2.12 Primena razvijene hronopotenciometrijske metode za određivanje sadržaja metamitrona u uzorcima vode

Nakon optimizacije hronopotenciometrijske metode za određivanje sadržaja metamitrona primenom tankoslojne živine elektrode i primene na komercijalne formulacije, razvijena metoda primenjena je i na uzorke vode. Analizirani su isti uzorci vode kao i u slučaju elektrode od staklastog ugljenika, samo što je u ovom slučaju od uzoraka pripremljen Britton-Robinson pufer pH 7. Određivanje sadržaja metamitrona izvedeno je metodom kalibracione krive, a svako merenje izvedeno je u tri ponavljanja. Iako je primenom tankoslojne živine

elektrode postignuta nešto niža vrednost LOD, u analiziranim uzorcima vode nije detektovan metamitron, pa su uzorci spajkovani sa sadržajem metamitrona od 1 mg/l. Vrednosti određenih sadržaja metamitrona za tri ponavljanja u spajkovanim uzorcima vode prikazani su u Tabeli 27.

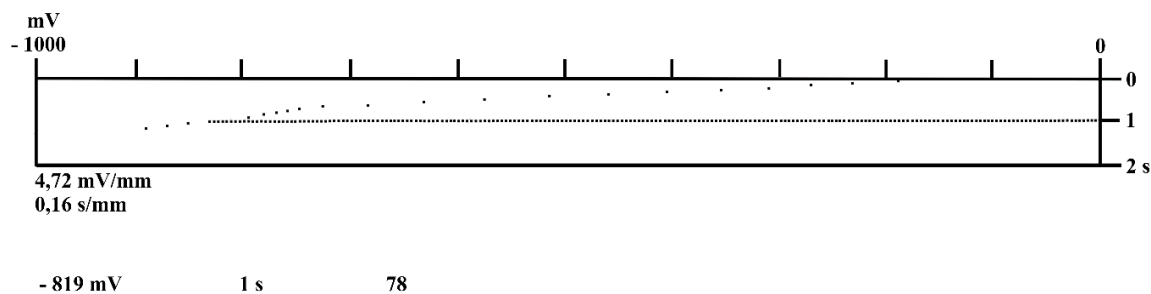
**Tabela 27.** Rezultati dobijeni analizom uzoraka vode hronopotenciometrijskom metodom na tankoslojnoj živinoj elektrodi i referentnom hromatografskom metodom

Uzorak	Sadržaj metamitrona (mg/l)	Dodato metamitrona (mg/l)	Određen sadržaj metamitrona (mg/l)	
			Hronopotenciometrija	LC-MS/MS
Begeč česmenska voda	< LOD <sup>a</sup>	1	0,982 ± 0,04 (98,17) <sup>b</sup>	0,985
Begeč izvor	< LOD	1	0,972 ± 0,03 (97,19)	0,961
SPENS izvor	< LOD	1	1,011 ± 0,08 (101,10)	1,058
Zobnatičko jezero	< LOD	1	1,091 ± 0,05 (109,08)	1,084
Reka Tisa	< LOD	1	0,954 ± 0,04 (95,38)	0,974

<sup>a</sup>LOD = 0,07 mg/l.

<sup>b</sup>Srednja vrednost ± 2SD (prinos, %), n = 3.

Dobijeni sadržaji metamitrona i prinosi (99,36 - 101,82%) ukazuju na tačnost razvijene hronopotenciometrijske metode. Pored toga, tačnost razvijene metode dodatno je proverena paralelnom analizom spajkovanih uzoraka vode hromatografskom LC-MS/MS metodom. Primenom Studentovog t-testa uparenih vrednosti, rezultati dobijeni razvijenom hronopotenciometrijskom metodom upoređeni su sa rezultatima LC-MS/MS metode. Na osnovu dobijenih parametara Studentovog t-testa (t-vrednosti i teorijske vrednosti), uz verovatnoću od 95%, može se zaključiti da kod dobijenih rezultata nema statistički značajne razlike. Tokom izvođenja analiza spajkovanih uzoraka vode na tankoslojnoj živinoj elektrodi nije uočeno prisustvo interferirajućih supstanci, a metamitron se redukovao u opsegu potencijala od -814 mV do -896 mV. Izgled hronopotenciograma dobijen u spajkovanom uzorku vode predstavljen je na Slici 48.

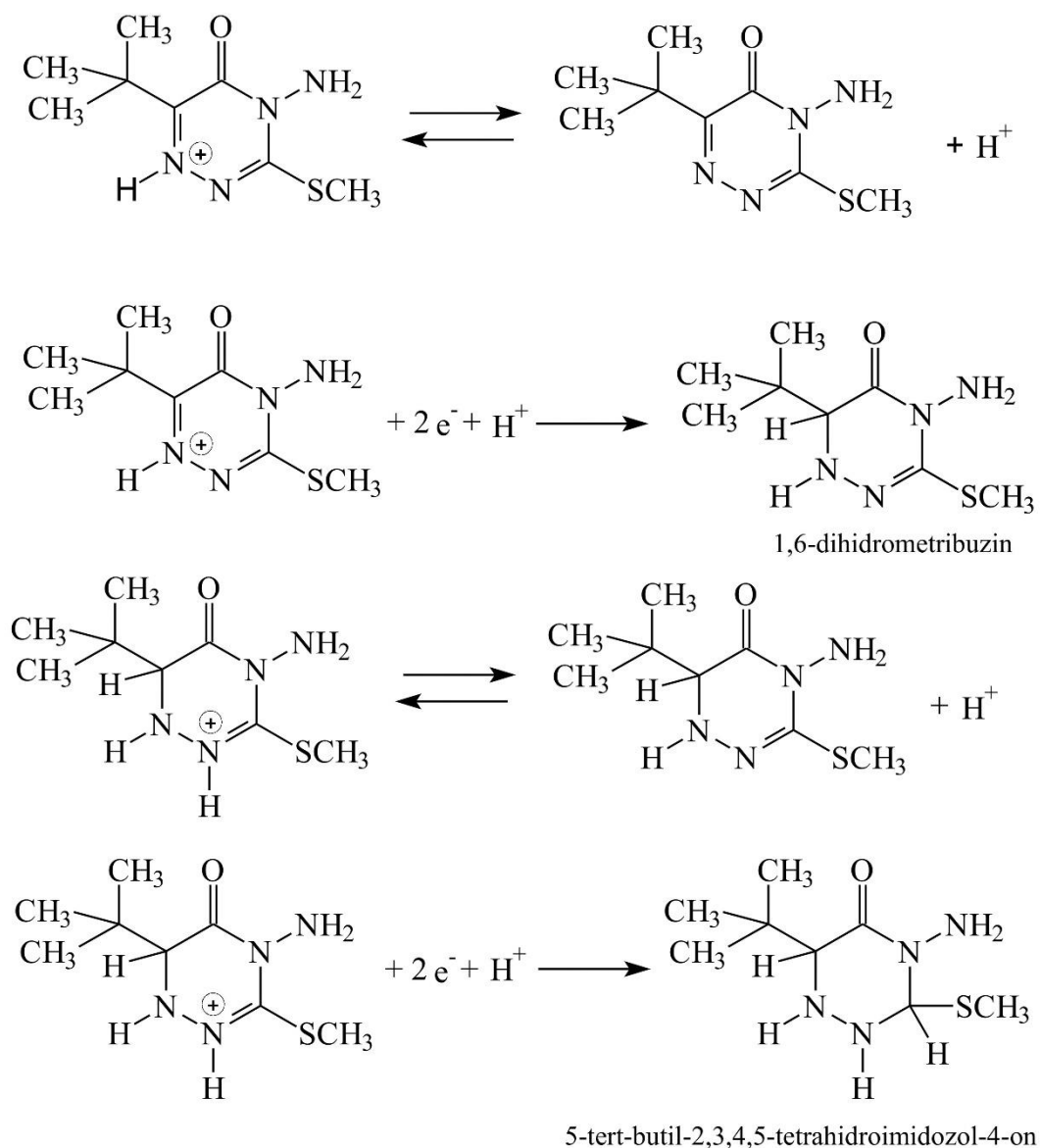


**Slika 48.** Hronopotenciogram dobijen u spajkovanom uzorku izvorske vode SPENS na tankoslojnoj živinoj elektrodi ( $c_{\text{mtm}} = 1 \text{ mg/l}$ ,  $i_{\text{red}} = -1,4 \text{ } \mu\text{A}$ )

### 4.3 Određivanje optimalnih uslova za hronopotenciometrijsko određivanje metribuzina

Mehanizam elektrohemijske redukcije metribuzina ispitali su Ludvík i sar. (1998b), uz korišćenje polarografije i voltometrijskih tehnika na kapljućoj živinoj elektrodi. Prema podacima iz navedene studije utvrđeno je da se redukcija metribuzina odvija u dva koraka. Prvi korak redukcije odvija se pri polutalanskom potencijalu od  $-0,8 \text{ V}$ , pri čemu dolazi do redukcije protonovane azometinske veze u položaju 1, 6 uz nastajanje 1, 6- dihidrometribuzina. Drugi korak podrazumeva redukciju iste grupe u položaju 2,3 nakon protonovanja, a odvija se pri polutalanskom potencijalu od  $-1,2 \text{ V}$ , pri čemu nastaje 5-tert-butil-2,3,4,5-tetrahidroimidazol-4-on (Skopalová i sar., 2001; Ludvík i sar., 1998b). Predloženi mehanizam redukcije prikazan je na Slici 49 (Ludvík i sar, 1998b).

Pored kapljuće živine elektrode (Janíková i sar., 2016; Skopalová i Navrátil, 2007; Skopalová i sar., 2001), u cilju određivanja metribuzina u model-sistemu i različitim uzorcima, u literaturi je opisana i primena drugih radnih elektroda kao što su elektroda od staklastog ugljenika i ugljenične paste (Lima i sar., 2009), kao i srebro-amalgam elektroda (Janíková i sar., 2016).



**Slika 49.** Mehanizam redukcije metribuzina na kapljućoj živinoj elektrodi

#### 4.3.1 Elektroda od staklastog ugljenika

U cilju određivanja metribuzina primenom elektrode od staklastog ugljenika kao radne elektrode snimani su hronopotenciogrami nakon uklanjanja rastvorenog kiseonika provođenjem struje azota kroz ispitivani rastvor u trajanju od 10 minuta. Potencijal je skeniran u negativnom i pozitivnom smeru u različitim pomoćnim elektrolitima: 0,1 mol/l acetatnom puferu pH 4; 0,1 mol/l citratnom puferu pH 4; 0,01 mol/l fosfatnom puferu pH 6; Britton-

Robinson puferu pH 5 i u 5 mmol/l rastvoru HCl. Iako postoje radovi gde se primenjuje elektroda od staklastog ugljenika za određivanje metribuzina (Lima i sar., 2009; Moreno i sar., 2009), u našem slučaju eksperimenti su pokazali da se signal metribuzina ne može detektovati uz korišćenje dostupne instrumentacije.

#### 4.3.2 Tankoslojna živina elektroda

Preliminarni eksperimenti u cilju određivanja metribuzina na tankoslojnoj živinoj elektrodi, izvedeni su snimanjem hronopotenciograma u Britton-Robinson puferu pH 5 u opsegu potencijala od -0,20 V do -1,10 V.

Usled redukcije rastvorenog kiseonika na radnoj elektrodi dolazilo je do smetnji tokom izvođenja analize, te se nije mogao dostići završni potencijal, čak ni povećanjem apsolutne vrednosti redukcionne struje. I u ovom slučaju uklanjanje rastvorenog kiseonika iz rastvora bio je neophodan korak pre izvođenja analize, te je tokom preliminarnih eksperimenata u tom smislu provoden azot u trajanju od 10 minuta. Nakon dodatka standardnog rastvora metribuzina u ispitivani elektrolit, dobijen je jedan redukcioni pik metribuzina pri potencijalu od ~ -890 mV.

##### 4.3.2.1 Ispitivanje optimalne metode za uklanjanje rastvorenog kiseonika iz rastvora

Kao i u slučaju određivanja drugih pesticida primenom hronopotencijometrije, određivanje optimalne metode deaeracije, pored fizičke metode, obuhvatalo je i mogućnost primene različitih hemijskih agenasa za uklanjanje rastvorenog kiseonika: askorbinske kiseline, oksalne kiseline, kalijum-bromida, natrijum-bromida i natrijum-sulfita.

Od primenjenih hemijskih sredstava, efekat rastvorenog kiseonika efikasno je eliminisan isključivo dodatkom zasićenog rastvora natrijum-sulfita, međutim redukcioni signal metribuzina nije se javljao u ispitivanom rastvoru, čak ni pri većim ispitivanim koncentracijama (20 mg/l), tako da je kao optimalna metoda uklanjanja rastvorenog kiseonika iz rastvora usvojena fizička metoda, uz primenu azota. U cilju ispitivanja optimalnog vremena deaeracije, eksperimenti su izvođeni uz primenu vremenskih intervala od 2 do 10 minuta, a koncentracija metribuzina iznosila je 10 mg/l. Kako promenom vremena deaeracije nije dolazilo do znatnog odstupanja u visini analitičkog signala, a najreproduktivniji signal metribuzina dobijen je u

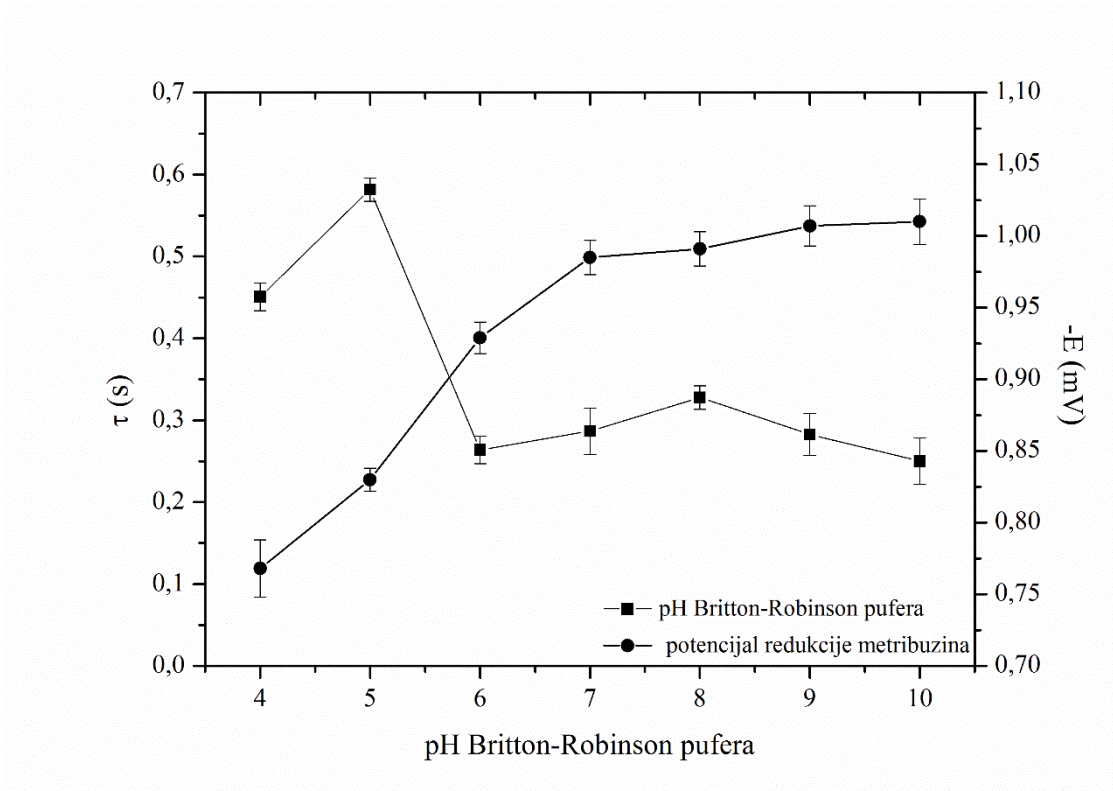
vremenskom intervalu deaeracije od 5 minuta, to vreme je usvojeno kao optimalno i primenjeno je u svim narednim eksperimentima.

#### **4.3.2.2 Uticaj vrste, pH i koncentracije pomoćnog elektrolita na analitički signal metribuzina**

Nakon koraka deaeracije, ispitana je mogućnost korišćenja različitih pomoćnih elektrolita za hronopotenciometrijsko određivanje metribuzina. Hronopotenciogrami su snimani u rasponu potencijala od -0,21 V do -1,10 V, koncentracije metribuzina iznosile su 2, 5 i 10 mg/l, a eksperimenti su izvođeni u 0,1 mol/l acetatnom puferu pH 4; 0,1 mol/l citratnom puferu pH 6; 0,1 mol/l fosfatnom puferu pH 6; Britton-Robinson puferu pH 5 i u 0,025 mol/l rastvoru sumporne kiseline. U svim ispitivanim elektrolitima metribuzin se redukovao uz pojavu redukcionog pika u rasponu potencijala od -580 mV do -1050 mV. Skeniranjem potencijala u anodnom smeru nisu se javljali signali, što je ukazivalo na ireverzibilnost elektrohemijske reakcije. Među ispitivanim elektrolitima Britton-Robinson pufer se izdvajao po visini analitičkog signala, njegovoj oštini i reproduktivnosti, pa je ovaj pufer usvojen kao optimalni.

U cilju ispitivanja uticaja pH na analitički signal metribuzina, pripremljen je Britton-Robinson pufer u rasponu pH od 2 do 12. Koncentracija metribuzina iznosila je 2 mg/l, primenjen je početni potencijal od -0,21 V, uz redukcionu struju od -6  $\mu$ A, dok je vrednost završnog potencijala iznosila -1,10 V. Izrazito kisela, odnosno bazna sredina nije bila pogodna za redukciju metribuzina, pa se analitički signal metribuzina javljao u oblasti pH od 4 do 10. U okviru ovog intervala maksimalna vrednost analitičkog signala dobijena je u rastvoru pH 5, nakon čega je dolazilo do pada signala. Dobijene vrednosti analitičkog signala u zavisnosti od pH Britton-Robinson pufera prikazane su na Slici 50. Tačke na dijagramu predstavljaju srednju vrednost signala dobijenu za tri uzastopne analize. Vertikalne linije odnose se na reproduktivnost merenja, a predstavljaju vrednost 2SD.

Porastom pH vrednosti pufera dolazilo je do pomeranja potencijala redukcije metribuzina ka negativnijim vrednostima (Slika 50). Na osnovu dobijenih rezultata kao optimalna vrednost Britton-Robinson pufera usvojena je pH 5, pri kojoj je dobijen najviši analitički signal uz dobru reproduktivnost (RSD = 2,44%).

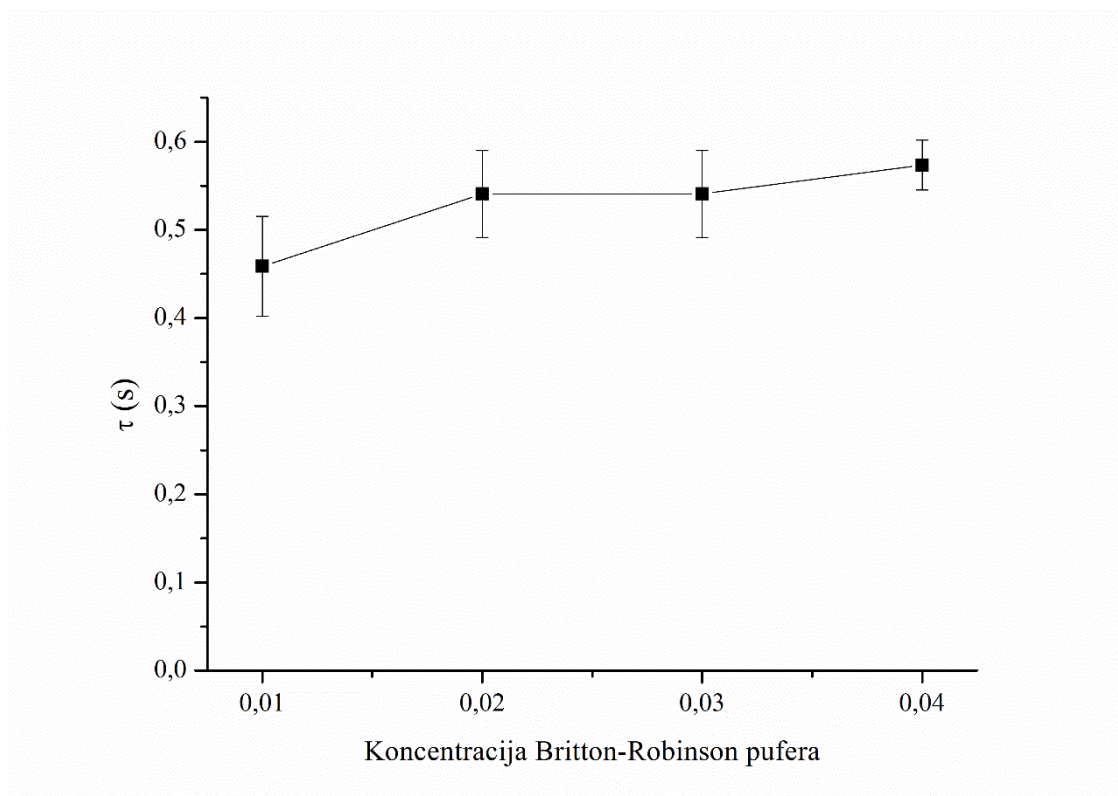


**Slika 50.** Uticaj pH Britton-Robinson pufera na analitički signal i potencijal redukcije metribuzina na tankoslojnoj živinoj elektrodi ( $C_{\text{mtr}} = 2 \text{ mg/l}$ ,  $i_{\text{red}} = -6 \text{ }\mu\text{A}$ )

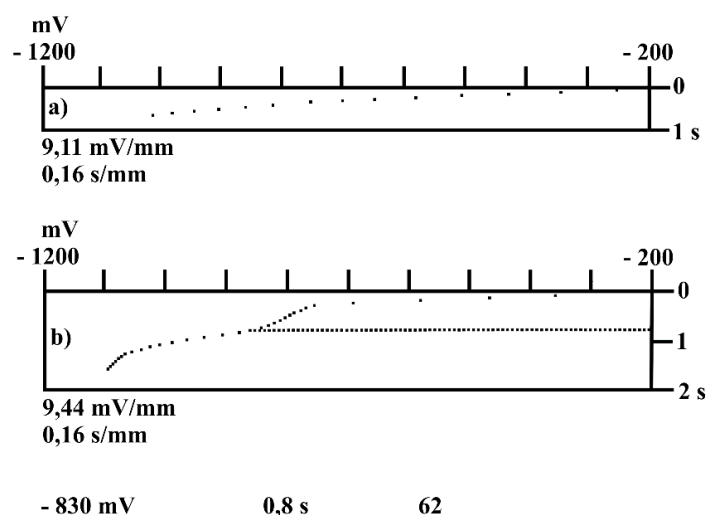
Uticaj koncentracije Britton-Robinson pufera (0,01 do 0,04 mol/l) na analitički signal metribuzina ispitan je u prisustvu metribuzina u koncentraciji od 2 mg/l, u rasponu potencijala od -0,21 V do -1,10 V, a primenjena vrednost redukcione struje iznosila je -6  $\mu\text{A}$ .

Dobijeni rezultati (Slika 51) su ukazali da promena koncentracije Britton-Robinson pufera nije značajno uticala na dobijene vrednosti redukcionog vremena. S obzirom da je najveća vrednost analitičkog signala metribuzina uz najbolju reproduktivnost merenja (RSD = 2,47%) dobijena pri koncentraciji Britton-Robinson pufera od 0,04 mol/l, u svim narednim eksperimentima primenjena je ova koncentracija pufera. Hronopotenciogrami dobijeni u Britton-Robinson puferu pH 5, pre i nakon dodatka standardnog rastvora metribuzina, prikazani su na Slici 52.





**Slika 51.** Uticaj koncentracije Britton-Robinson pufera na analitički signal metribuzina na tankoslojnoj živinoj elektrodi ( $C_{\text{mtr}} = 2 \text{ mg/l}$ ,  $i_{\text{red}} = -6 \text{ }\mu\text{A}$ )



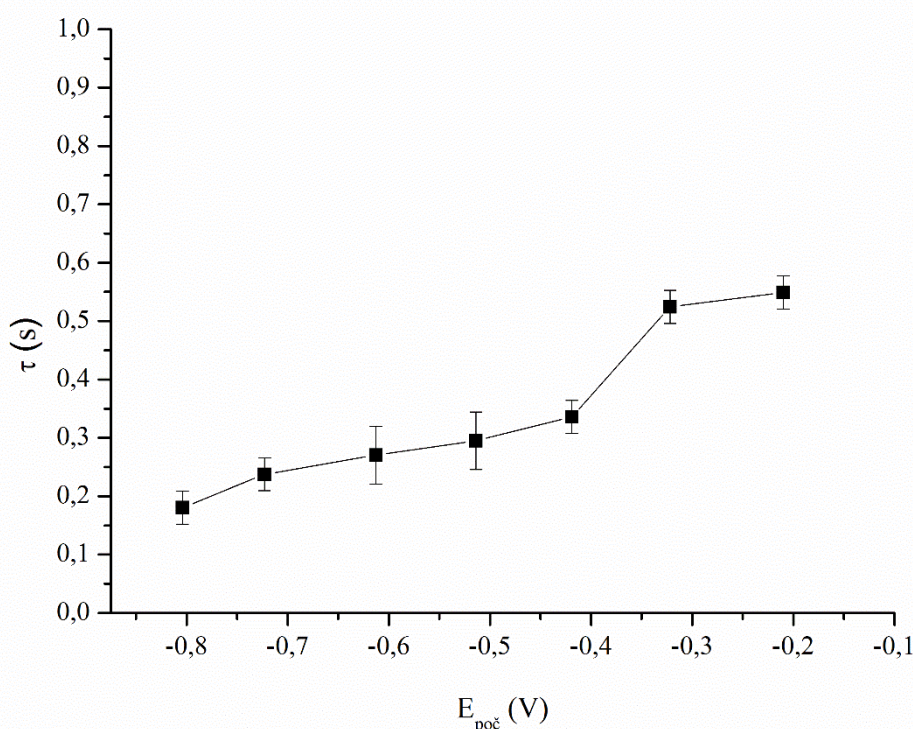
**Slika 52.** Hronopotenciogram dobijen u Britton-Robinson puferu pH 5 na tankoslojnoj živinoj elektrodi ( $i_{\text{red}} = -5,1 \text{ }\mu\text{A}$ ): **a)** pre i **b)** nakon dodatka standardnog rastvora metribuzina ( $C_{\text{mtr}} = 2 \text{ mg/l}$ )

#### 4.3.2.3 Uticaj početnog potencijala na analitički signal metribuzina

Uticaj početnog potencijala na analitički signal metribuzina ispitan je u rastvoru koncentracije 2 mg/l metribuzina, a ispitan je opseg potencijala od 0,16 V do -0,92 V. Primenjena redukciona struja iznosila je -6  $\mu$ A, a vrednost završnog potencijala -1,10 V.

Signal metribuzina dobijen je u oblasti početnog potencijala od -0,21 V do -0,80 V. Pozitivnije vrednosti dovodile su do trajnog oštećenja filma žive, dok se pri vrednostima negativnijim od -0,80 V analit nije mogao detektovati. Dobijene srednje vrednosti redukcionog vremena metribuzina, kao i reproduktivnost prikazane kao vrednosti 2SD date su na Slici 53.

Kao što se može videti na Slici 53, od vrednosti početnog potencijala od -0,80 V do -0,42 V prisutan je blagi porast analitičkog signala metribuzina, dok se nešto veći porast javlja u intervalu od -0,42 V do -0,21 V. Kako je maksimalna vrednost redukcionog vremena dobijena pri početnom potencijalu od -0,21 V, uz najbolju reproduktivnost (RSD = 2,59%), ova vrednost primenjena je u svim daljim eksperimentima.



**Slika 53.** Uticaj početnog potencijala na analitički signal metribuzina na tankoslojnoj živinoj elektrodi ( $C_{\text{mtr}} = 2$  mg/l,  $i_{\text{red}} = -6$   $\mu$ A)

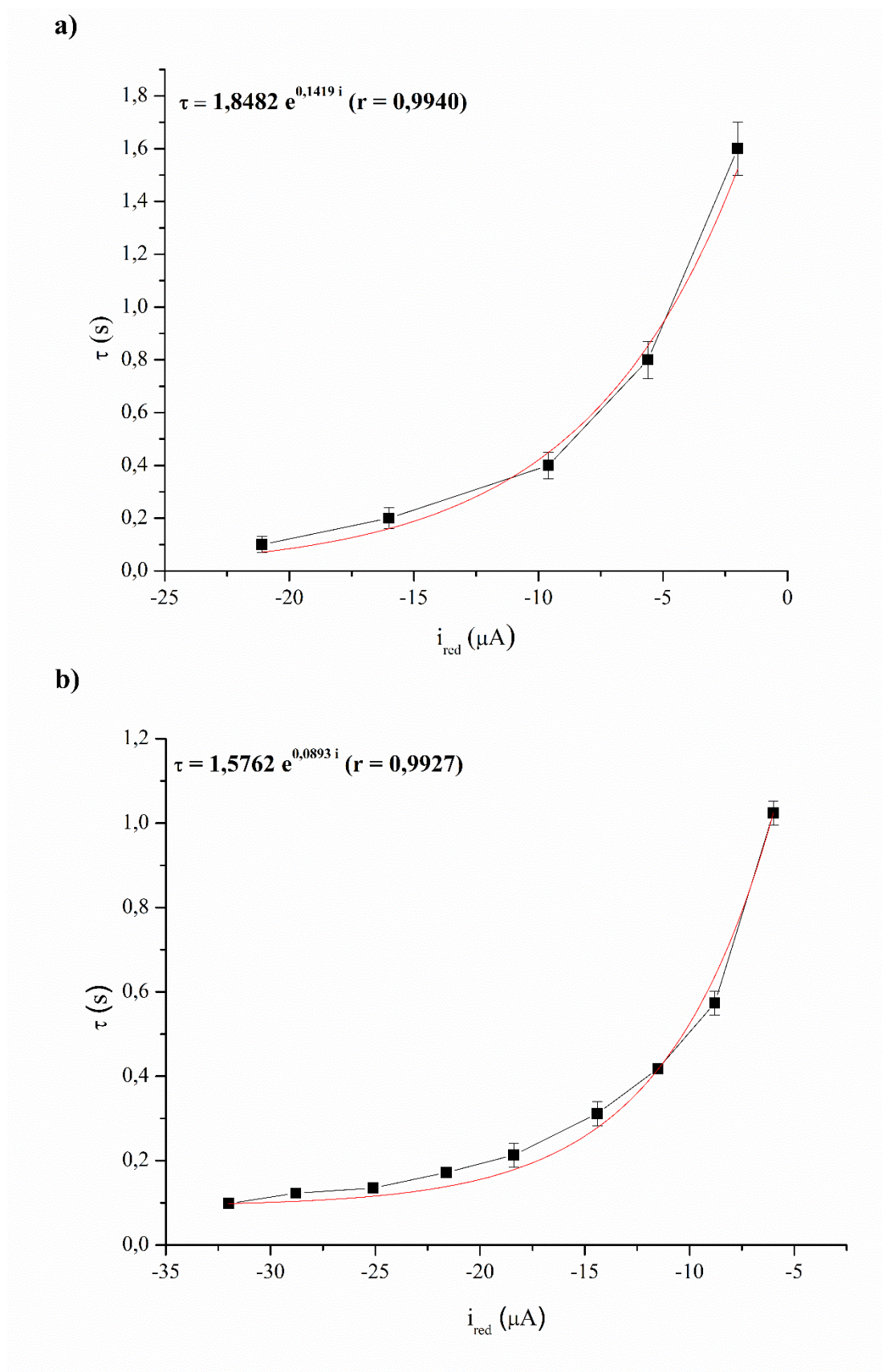
#### 4.3.2.4 Uticaj struje redukcije na analitički signal metribuzina

Uticaj struje redukcije na analitički signal metribuzina ispitan je u rastvorima metribuzina koncentracije 2 i 10 mg/l, pri početnom potencijalu od -0,21 V i završnom potencijalu od -1,10 V. Za sadržaj metribuzina od 2 mg/l ispitani interval redukcione struje iznosio je od -2 do -21,1  $\mu\text{A}$ , dok je za sadržaj od 10 mg/l ispitan interval od -3,6 do -32  $\mu\text{A}$ .

Za obe koncentracije herbicida dobijene su eksponencijalne zavisnosti signala od primenjene struje, odnosno sa porastom apsolutnih vrednosti struje, vrednosti redukcionog vremena metribuzina opadale su po eksponencijalnim funkcijama (Slika 54).

Primenom kriterijuma o pravolinijskoj zavisnosti proizvoda vrednosti redukcione struje i kvadratnog korena vremena redukcije u funkciji od redukcione struje, odgovarajući intervali struje redukcije koje treba primeniti iznose: od -9,6 do -21,1  $\mu\text{A}$  za sadržaj metribuzina od 2 mg/l i od -6,6 do -21,6  $\mu\text{A}$  za sadržaj metribuzina od 10 mg/l. Variranje vrednosti redukcione struje u tako širokim granicama nije dovelo do značajnih varijacija u vrednostima potencijala redukcije metribuzina. Metribuzin se redukovao pri potencijalu redukcije u granicama od -800 mV do -900 mV, uz vrednost RSD od 4,84%.





**Slika 54.** Uticaj struje na analitički signal metribuzina na tankoslojnoj živinoj elektrodi:

**a)**  $C_{\text{mtr}} = 2 \text{ mg/l}$ , **b)**  $C_{\text{mtr}} = 10 \text{ mg/l}$

#### 4.3.2.5 Linearnost

Pod prethodno definisanim optimalnim uslovima za određivanje metribuzina, definisani su koncentracioni opsezi pri kojima je dobijena linearna zavisnost između analitičkog signala metribuzina i koncentracije (Tabela 28).

Dobra linearnost postignuta je za tri opsega koncentracija, što je potvrđeno vrednostima koeficijenta korelacije koji se kretao u opsegu od 0,9950 do 0,9985. U Tabeli 28 prikazane su i vrednosti nagiba, odsečka, kao i vrednosti njihove SD dobijene za pet ponavljanja.

**Tabela 28.** Linearni opsezi koncentracija za hronopotenciometrijsko određivanje metribuzina primenom tankoslojne živine elektrode

Koncentracioni opseg (mg/l)	Redukciona struja ( $\mu$ A)	Nagib	Odsečak	Sa <sup>a</sup>	Sb <sup>b</sup>	r
1 - 5	-4,4	0,3679	-0,3123	0,0085	0,0047	0,9950
5 - 15	-8,3	0,0781	-0,0993	0,0010	0,0039	0,9985
15 - 30	-14,0	0,0613	-0,5896	0,0015	0,0239	0,9964

Sa<sup>a</sup> standardna devijacija nagiba ( $s \times l/mg$ ),  $n = 5$ .

Sb<sup>b</sup> standardna devijacija odsečka ( $s$ ),  $n = 5$ .

#### 4.3.2.6 Granica detekcije i granica kvantifikacije

Na osnovu vrednosti nagiba i SD odsečka definisanih za najniži opseg koncentracija od 1 do 5 mg/l datih u Tabeli 28, primenom izraza 14 i 15 izračunata vrednost LOD za metribuzin na tankoslojnoj živinoj elektrodi iznosila je 0,04 mg/l, dok je vrednost LOQ iznosila 0,13 mg/l.

#### 4.3.2.7 Preciznost

Pri hronopotenciometrijskom određivanju metribuzina primenom tankoslojne živine elektrode, preciznost je procenjena analizom rastvora sa sadržajem metribuzina od 2 i 5 mg/l. Primenjene struje redukcije iznosile su - 6  $\mu$ A za niži sadržaj metribuzina i - 8  $\mu$ A za viši sadržaj metribuzina.

Za sadržaj metribuzina od 2 mg/l dobijena vrednosti RSD analiziranjem rastvora u toku istog dana iznosila je 2,82%, dok je na osnovu analiza izvedenih u toku pet različitih dana

vrednost RSD iznosila 3,66%. Za sadržaj metribuzina od 5 mg/l dobijene su sledeće vrednosti RSD za analizu različitih rastvora u toku istog dana 1,56% i 2,13% u toku različitih dana. Tokom izvođenja ovih eksperimenata metribuzin se redukovao pri srednjoj vrednosti potencijala od -805 mV, a vrednosti RSD iznosile su -1,47% (2 mg/l) i 1,97% (5 mg/l).

#### 4.3.2.8 Tačnost metode

Tačnost hronopotenciometrijske metode ispitana je u model-sistemu, analizom rastvora sadržaja metribuzina 4,8 mg/l, 6,5 mg/l i 12,4 mg/l. Za izvođenje analiza primenjene su redukcionne struje koje su za navedene sadržaje iznosile redom: -6  $\mu$ A, -7,2  $\mu$ A i -9,9  $\mu$ A. Određivanje je izvedeno primenom metode kalibracione krive, a za svaki sadržaj metribuzina analize su izvedene u tri ponavljanja. Dobijeni sadržaji, vrednosti 2SD, kao i vrednosti prinosa prikazani su u Tabeli 29.

Dobijene srednje vrednosti koncentracija metodom kalibracione krive približne su stvarnim koncentracijama, što potvrđuju i prinosi (95,12 - 100,63%). Vrednosti RSD < 4,7% potvrđuju reproduktivnost razvijene hronopotenciometrijske metode.

**Tabela 29.** Rezultati određivanja sadržaja metribuzina u rastvorima poznatih koncentracija razvijenom hronopotenciometrijskom metodom uz primenu tankoslojne živine elektrode

Dodata količina (mg/l)	Određena količina (mg/l) <sup>a</sup>	Prinos (%)
4,8	4,83 ± 0,44	100,63
6,5	6,40 ± 0,40	98,51
12,4	11,79 ± 0,47	95,12

<sup>a</sup>Srednja vrednost ± 2SD, n = 3.

#### 4.3.2.9 Interferencije

Uticaj prisustva različitih neorganskih jona u ispitivanom rastvoru na analitički signal metribuzina ispitivan je u model-sistemu pri prethodno definisanim optimalnim uslovima. Analizirani su rastvori sa sadržajem metribuzina od 2 i 10 mg/l, a primenjene vrednosti redukcionne struje iznosile su -6  $\mu$ A (2 mg/l) i -7,6  $\mu$ A (10 mg/l). Varijacije analitičkog signala metribuzina za ispitivane odnose metribuzina i interferenta prikazane su u Tabeli 30.

Dobijeni rezultati pokazali su da maksimalne varijacije analitičkog signala metribuzina usled prisustva neorganskih jona u ispitivanom rastvoru iznose od -4,92% (u prisustvu  $\text{Fe}^{2+}$  jona) do 4,48% (u prisustvu  $\text{Na}^+$  jona). Kako maksimalne vrednosti varijacije analitičkog signala nisu prelazile vrednost od 5%, može se zaključiti da je razvijena metoda selektivna.

**Tabela 30.** Uticaj neorganskih jona na hronopotenciometrijsko određivanje metribuzina primenom tankoslojne živine elektrode

Varijacija analitičkog signala metribuzina za ispitane odnose koncentracija metribuzin:interferent (%)					
Interferent	1:0,1	1:1	1:5	1:10	1:50
$\text{K}^+$	1,54	-1,54	2,78	-1,54	-2,78
$\text{Na}^+$	1,49	4,48	0	2,99	-2,82
$\text{Ca}^{2+}$	-1,15	-1,15	0	1,15	1,96
$\text{Mg}^{2+}$	0	3,17	-1,64	-1,59	-3,28
$\text{SO}_4^{2-}$	2,13	4,26	2,08	3,19	2,08
$\text{Cl}^-$	3,23	1,61	-3,13	-1,61	-3,75
$\text{HCO}_3^-$	1,49	4,47	0	0	-1,50
$\text{NO}_3^-$	0	1,27	-3,13	1,27	-4,69
$\text{Fe}^{2+}$	-1,67	0	-1,64	-1,67	-4,92

#### 4.3.2.10 Robusnost

Robusnost razvijene metode ispitana je variranjem različitih parametara analize u rastvorima sadržaja metribuzina 2 i 10 mg/l. Vrednost pH Britton-Robinson pufera varirana je u rasponu  $5 \pm 2$ , početni potencijal ( $-0,21 \pm 0,05$  V), dok je struja redukcije varirana za  $\pm 0,1$   $\mu\text{A}$ . U zavisnosti od sadržaja metribuzina, razlikovala se i vrednost primenjene struje redukcije, pa je tako za niži ispitivani sadržaj struja varirana u opsegu ( $-5,2 \pm 0,1$   $\mu\text{A}$ ), dok je za viši sadržaj metribuzina variranje bilo u granicama ( $-6 \pm 0,1$   $\mu\text{A}$ ).

Promene pH i početnog potencijala dovodile su do blagog smanjenja analitičkog signala metribuzina, dok je promena struje dovodila do blagog povećanja signala. Kako su maksimalne promene signala bile +2,27%, na ovaj način potvrđeno je da je razvijena metoda robusna.

#### 4.3.2.11 Primena razvijene hronopotenciometrijske metode za određivanje sadržaja metribuzina u komercijalnim formulacijama

Nakon optimizacije i validacije metode za hronopotenciometrijsko određivanje metribuzina primenom tankoslojne živine elektrode, ispitana je i mogućnost primene na komercijalne formulacije metribuzina. Eksperimenti su obuhvatali formulacije *Welton* i *Lord* koje se nalaze u obliku vododisperzibilnih granula, kao i *Sencor Plus* u obliku koncentrovane suspenzije. U čvrstim analiziranim preparatima metribuzin se nalazi u koncentraciji od 700 g/kg, dok deklarirana koncentracija u tečnom preparatu *Sencor Plus* iznosi 600 g/l. Priprema pre izvođenja hronopotenciometrije obuhvatala je razređivanje u acetonitrilu, a zatim u pomoćnom elektrolitu. Gustina *Sencor Plus* preparata prethodno je određena piknometrom. Sadržaj metribuzina određen je metodom kalibracione krive u tri ponavljanja. Dobijene srednje vrednosti sadržaja, kao i vrednosti 2SD i prinosa prikazane su u Tabeli 31.

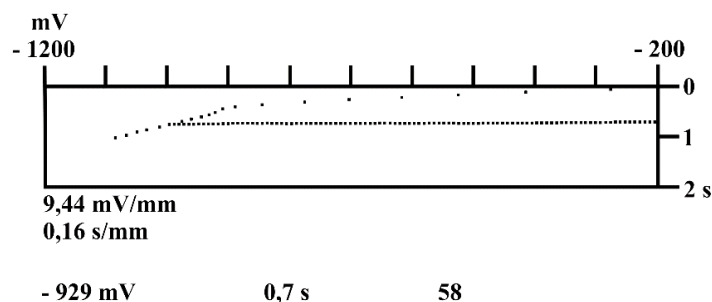
**Tabela 31.** Rezultati dobijeni analizom komercijalnih formulacija metribuzina primenom razvijene hronopotenciometrijske metode na tankoslojnoj živinoj elektrodi

Komercijalna formulacija	Deklarisano	Određeno <sup>a</sup>
<b>Sadržaj metribuzina (g/kg)</b>		
<i>Lord 700</i>	700	711,77 ± 13,82 (101,68)
<i>Welton</i>	700	709,34 ± 11,20 (101,33)
<b>Sadržaj metribuzina (g/l)</b>		
<i>Sencor Plus</i>	600	603,99 ± 2,68 (100,67)

<sup>a</sup>Srednja vrednost ± 2SD (prinos, %), n = 3.

Sadržaji metribuzina dobijeni hronopotenciometrijski u skladu su sa istaknutim sadržajima od strane proizvođača, prinosi 100,67 - 101,68%, dok su vrednosti RSD bile manje od 1%, što potvrđuje tačnost i reproduktivnost razvijene metode. Poređenjem dobijenih vrednosti sadržaja metribuzina sa deklariranim vrednostima primenom Studentovog t-testa uparenih vrednosti, ustanovljeno je da su izračunate t-vrednosti bile manje od teorijskih, na osnovu čega se može zaključiti da ne postoji statistički značajna razlika između vrednosti dobijenih hronopotenciometrijski i deklariranih vrednosti uz verovatnoću od 95%. Prilikom izvođenja eksperimenata u ovoj fazi potencijal redukcije metribuzina kretao se u granicama od -861 do -948 mV, a izgled hronopotenciograma formulacije prikazan je na Slici 55.





**Slika 55.** Hronopotenciogram dobijen analizom formulacije metribuzina *Sencor plus* na tankoslojnoj živinoj elektrodi ( $c_{\text{mtr}} = 7 \text{ mg/l}$ ,  $i_{\text{red}} = -6,4 \text{ } \mu\text{A}$ )

#### 4.3.2.12 Primena razvijene hronopotenciometrijske metode za određivanje sadržaja metribuzina u uzorcima vode

U cilju primene razvijene hronopotenciometrijske metode za određivanje metribuzina na uzorke vode, analizirano je pet uzoraka dunavske vode različitog lokaliteta. Od uzoraka je pripremljen Britton-Robinson pufer pH 5, a određivanje sadržaja metribuzina izvedeno je metodom kalibracione krive u tri ponavljanja za svaki uzorak. Kako je sadržaj metribuzina u ispitivanim uzorcima bio ispod vrednosti LOD, uzorci su spajkovani sa sadržajem metribuzina od 0,4 mg/l. U cilju dodatne provere tačnosti razvijene hronopotenciometrijske metode, *spajkovani* uzorci vode paralelno su analizirani hromatografskom LC-MS/MS metodom, a rezultati dobijeni primenom obe metode prikazani su u Tabeli 32.

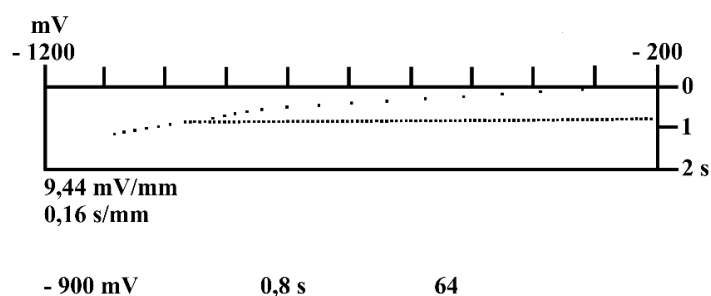
Na osnovu rezultata, prinosi dobijeni razvijenom hronopotenciometrijskom metodom bili su približni 100%, ukazujući na primenljivost razvijene metode na kompleksne matrikse kao što su uzorci rečne vode. Primenom Studentovog t-testa uparenih vrednosti, dokazano je da se rezultati hronopotenciometrijske i LC-MS/MS metode statistički ne razlikuju značajno uz verovatnoću od 95%, ukazujući na tačnost razvijene metode. Pored toga, dobijene vrednosti  $\text{RSD} < 4,1\%$  potvrđuju i veoma dobru reproduktivnost merenja. Hronopotenciometrijskom analizom uzoraka vode nije uočeno prisustvo drugih interferirajućih supstanci, a potencijal redukcije metribuzina kretao se u granicama od -889 do -998 mV. Hronopotenciogram snimljen u spajkovanom uzorku dunavske vode (lokalitet Štrand) prikazan je na Slici 56.

**Tabela 32.** Rezultati dobijeni analizom uzoraka rečne vode hronopotenciometrijskom metodom na tankoslojnoj živinoj elektrodi i referentnom hromatografskom metodom

Uzorak	Sadržaj metribuzina (mg/l)	Dodato metribuzina (mg/l)	Određen sadržaj metribuzina (mg/l)	
			Hronopotenciometrija	LC-MS/MS
Petrovaradinska Tvrđava	< LOD <sup>a</sup>	0,4	0,41 ± 0,01 (102,5) <sup>a</sup>	0,38
Štrand	< LOD	0,4	0,38 ± 0,01 (95,0)	0,42
Ribarac	< LOD	0,4	0,37 ± 0,02 (92,5)	0,42
Kamenjar	< LOD	0,4	0,38 ± 0,01 (95,0)	0,43
Mačkov Sprud	< LOD	0,4	0,37 ± 0,03 (92,5)	0,38

<sup>a</sup>LOD = 0,04 mg/l.

<sup>b</sup>Srednja vrednost ± 2SD (prinos, %), n = 3.



**Slika 56.** Hronopotenciogram dobijen u spajkovanom uzorku dunavske vode lokalitet Štrand na tankoslojnoj živinoj elektrodi ( $c_{\text{mtr}} = 0,4 \text{ mg/l}$ ,  $i_{\text{red}} = -2,4 \text{ } \mu\text{A}$ )

## 5 ZAKLJUČCI

U ovoj doktorskoj disertaciji razvijene su elektroanalitičke metode za određivanje odabranih pesticida primenom hronopotencijometrije. Za određivanje su kao radne elektrode primenjene elektroda od staklastog ugljenika i tankoslojna živina elektroda na kojima su ispitivani insekticid imidakloprid, kao i herbicidi metamitron i metribuzin. U cilju optimizacije metode, za svaki pesticid ispitan je uticaj najznačajnijih eksperimentalnih parametara na signal analita, uključujući mehanizam određivanja (oksidacija/redukcija), optimalnu metodu za uklanjanje rastvorenog kiseonika iz rastvora, vrstu, pH i koncentraciju pomoćnog elektrolita. Potom je definisan optimalni opseg potencijala i struje redukcije. Pored toga, za svaki ispitivani sistem validacija metode podrazumevala je ispitivanje i definisanje opsega linearnosti, određivanje granice detekcije i granice kvantifikacije, ispitivanje preciznosti, tačnosti, robusnosti i uticaja interferirajućih supstanci na analitički signal. Razvijene metode primenjene su za određivanje pesticida u komercijalnim formulacijama pesticida i uzorcima vode. U cilju dodatne provere tačnosti razvijenih metoda, izvedena je i komparativna analiza uzoraka vode LC-MS/MS tehnikom.

Za svaki ispitivani sistem dobijeni signali bili su rezultat ireverzibilne redukcije pesticida na radnoj elektrodi, a za svaki određivani analit dobijen je jedan redukcionni pik.

U slučaju određivanja imidakloprida za obe radne elektrode primenjene u merenjima, kao optimalna metoda za uklanjanje efekta rastvorenog kiseonika korišćena je hemijska metoda dodatka zasićenog rastvora natrijum-sulfita u ispitivani rastvor, dok je u slučaju određivanja herbicida metamitrona i metribuzina primenjena fizička metoda provođenjem struje azota u trajanju od pet minuta.

Primenom elektrode od staklastog ugljenika za određivanje imidakloprida najintenzivniji signal dobijen je u 0,04 mol/l Britton-Robinson puferu pH 7,5. Linearna zavisnost analitičkog signala od koncentracije uočena je za nekoliko koncentracionih opsega:

od 7 do 15 mg/l, zatim od 10 do 40 mg/l, kao i od 40 do 70 mg/l. Izračunate vrednosti granice detekcije i granice kvantifikacije iznosile su redom 0,92 i 2,80 mg/l.

U slučaju primene tankoslojne živine elektrode za određivanje imidakloprida, kao pomoćni elektrolit korišćen je 0,04 mol/l Britton-Robinson pufer pH 9. Zavisnost analitičkog signala od koncentracije imala je linearan karakter za sledeće koncentracione opsege: od 0,8 do 2 mg/l, od 2 do 10 mg/l i od 10 do 30 mg/l. Tankoslojna živina elektroda je u odnosu na elektrodu od staklastog ugljenika pokazala pet puta veću osetljivost, vrednost granice detekcije iznosila je 0,17 mg/l, dok je vrednost granice kvantifikacije iznosila 0,51 mg/l.

Određivanjem metamitrona primenom elektrode od staklastog ugljenika najintenzivniji signali dobijeni su u 0,04 mol/l Britton-Robinson puferu pH 2. Linearnost između analitičkog signala i koncentracije uočena je za sledeće opsege: od 1 do 3 mg/l, od 2 do 10 mg/l i od 10 do 30 mg/l. Granica detekcije iznosila je 0,09 mg/l, a granica kvantifikacije 0,28 mg/l.

Za sistem sa tankoslojnom živinom elektrodom pri određivanju metamitrona, najintenzivniji signal dobijen je u 0,04 mol/l Britton-Robinson puferu pH 7. Opsezi koncentracija gde je postignuta dobra linearna zavisnost analitičkog signala od koncentracija bili su slični kao kod elektrode od staklastog ugljenika: od 0,8 do 2,4 mg/l, od 2 do 10 mg/l i od 10 do 30 mg/l. Ostvarene vrednosti granice detekcije i granice kvantifikacije za dati sistem iznosile su: 0,07 mg/l i 0,21 mg/l. U poređenju sa elektrodom od staklastog ugljenika, tankoslojna živina elektroda pokazala je nešto veću osetljivost pri određivanju metamitrona.

U slučaju određivanja metribuzina, signal ovog herbicida dobijen je samo primenom tankoslojne živine elektrode. Kao pomoćni elektrolit korišćen je 0,04 mol/l Britton-Robinson pufer pH 5. Pri optimalnim eksperimentalnim uslovima linearna zavisnost signala od koncentracije uočena je za sledeće opsege: od 1 do 5 mg/l, od 5 do 15 mg/l, kao i od 15 do 30 mg/l. Granica detekcije u slučaju određivanja metribuzina iznosila je 0,04 mg/l, a granica kvantifikacije 0,13 mg/l.

Selektivnost razvijenih metoda potvrđena je malim varijacijama signala analita (< 5%) usled prisustva različitih neorganskih jona u ispitivanom rastvoru. Izuzetak je predstavljao  $\text{Fe}^{2+}$  jon koji je izazivao smetnje pri određivanju imidakloprida. Bez obzira na vrstu radne elektrode koja je korišćena u merenjima, imidaklopid se mogao određivati samo u prisustvu  $\text{Fe}^{2+}$  jona u koncentraciji do 1 mg/l. Pri većim koncentracijama na elektrodi od staklastog ugljenika dolazilo je do blokiranja analizatora, dok se primenom tankoslojne živine elektrode pored redukcionog

pika imidakloprida javljao i redukcionu pik  $\text{Fe}^{2+}$  jona. Kako prosečan sadržaj  $\text{Fe}^{2+}$  jona u uzorcima rečne vode iznosi 0,7 mg/l, interferencija ovog jona može se zanemariti. U slučaju kada se razvijena metoda koristi za određivanje imidakloprida u uzorcima podzemne vode, gde je očekivan sadržaj  $\text{Fe}^{2+}$  znatno viši, neophodna je adekvatna priprema uzoraka kako bi se ovi joni uklonili iz ispitivanog rastvora.

Konstantnost visine analitičkog signala u slučaju variranja pH, početnog potencijala i struje redukcije za svaki ispitivani pesticid, odnosno radnu elektrodu potvrđuje robusnost razvijenih metoda.

Razvijene metode za određivanje pesticida primenjene su za analizu komercijalnih formulacija imidakloprida (*Prestige 290, Confidor 200, Kohinor 200, Gat Go 20, Confidor 70, Imidor 70*), metamitrona (*Korida, Metak 700, Metix, Brevis*) i metribuzina (*Lord 700, Welton, Sencor Plus*). Poređenjem dobijenih vrednosti hronopotenciometrijski sa deklariranim sadržajima, primenom Studentovog t-testa uparenih vrednosti, dobijena su dobra slaganja.

Pored komercijalnih formulacija pesticida, razvijene metode primenjene su i za analizu uzoraka rečne, jezerske i česemske vode. Sadržaj analiziranih pesticida u uzorcima vode bio je ispod granice detekcije razvijenih hronopotenciometrijskih metoda, pa su uzorci vode spajkovani sa određenim sadržajem pesticida i analizirani hronopotenciometrijski. U cilju dodatne provere tačnosti, spajkovani uzorci vode analizirani su i hromatografskom LC-MS/MS metodom. Na osnovu dobijenih rezultata postignuta je dobra korelacija između određene i dodate količine. Niske vrednosti relativne standardne devijacije ukazuju na visoku pouzdanost razvijenih metoda. Pored toga, rezultati razvijenih hronopotenciometrijskih metoda statistički su upoređeni sa rezultatima komparativne hromatografske LC-MS/MS metode. Parametri dobijeni primenom Studentovog t-testa uparenih vrednosti pokazali su da nema statistički značajne razlike između dobijenih sadržaja primenom dve poređene metode uz verovatnoću od 95%.

Kako razvijene hronopotenciometrijske metode u velikoj meri ispunjavaju stroge zahteve moderne analitičke hemije, one se mogu efikasno primeniti za određivanje sadržaja odabranih pesticida u uzorcima vode iz životne sredine, kao i u komercijalnim formulacijama pesticida bez prethodne pripreme, čime se postiže znatna ušteda u vremenu. Pored toga, treba istaći i znatno nižu cenu instrumentacije i njene eksploatacije u odnosu na konkurentne tehnike, dok male dimenzije instrumentacije pružaju mogućnost izvođenja analiza na terenu.

## 6 LITERATURA

Aksu, Z. (2005). Application of biosorption for the removal of organic pollutants: A review. *Process Biochemistry*, 40, 997-1026.

Ara, B., Shah, J., Jan, M.R., & Muhammad, M. (2016). Spectrophotometric determination of metribuzin herbicide with p-dimethylamino-benzaldehyde using factorial designs for optimization of experimental variables. *Journal of Saudi Chemical Society*, 20(1), S566-S572.

Armbrust, K.L., & Peeler, H.B. (2002). Effects of formulation on the run-off of imidacloprid from turf. *Pest Management Science*, 58(7), 702-706.

Arranz, A., de Betoño, S.F., Moreda, J.M., Cid, A., & Arranz, J.F. (1997a). Preconcentration and voltammetric determination of the herbicide metamitron with a silica-modified carbon paste electrode. *Microchimica Acta*, 127, 273-279.

Arranz, A., Villalba, M.F., de Betoño, S.F., Moreda, J.M., & Arranz, J.F. (1997b). Anodic voltammetric assay of the herbicide metamitron on a carbon paste electrode. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 357(6), 768-772.

Aumond, V., Waeles, M., Salaün, P., Gibbon-Walsh, K., van den Berg, C.M.G., Sarradin, P.-M., & Riso, R.D. (2012). Sulfide determination in hydrothermal seawater samples using a vibrating gold micro-wire electrode in conjunction with stripping chronopotentiometry. *Analytica Chimica Acta*, 753, 42-47.

Autio, S., Siimes, K., Laitinen, P., Rämö, S., Oinonen, S., & Eronen, L. (2004). Adsorption of sugar beet herbicides to Finnish soils. *Chemosphere*, 55(2), 215-226.

Baig, S.A., Akhter, N.A., Ashfaq, M., Asi, M.R., & Ashfaq, U. (2012). Imidacloprid residues in vegetables, soil and water in the southern Punjab, Pakistan. *Journal of Agricultural Technology*, 8(3), 903-916.

Barceló, D., & Hennion, M.-C. (1997). *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry, Trace determination of pesticides and their degradation products in water*. Amsterdam: Elsevier.

Bard, A.J., Parsons, R., & Jordan, J. (1985). *Standard Potentials in Aqueous Solution*. New York : Marcel Dekker.

Barek, J. (2013). Possibilities and limitations of mercury and mercury-based electrodes in practical electroanalysis of biologically active organic compounds. *Portugaliae Electrochimica Acta*, 31(6), 291-295.

Baskaran, S., Kookana, R.S., & Naidu, R. (1999). Degradation of bifenthrin, chlorpyrifos and imidacloprid in soil and bedding materials at termiticidal application rates. *Pest Management Science*, 55(12), 1222-1228.

Baskaran, S., Kookana, R.S., & Naidu, R. (1997). Determination of the insecticide imidacloprid in water and soil using high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 787, 271-275.

Beltran, J., López, F.J., Forcada, M., & Hernández, F. (1997). Microextraction procedures combined with large volume injection in capillary gas chromatography for the determination of pesticide residues in environmental aqueous samples. *Analytica Chimica Acta*, 356, 125-133.

Berny, P.J., Buronfosse, F., Videmann, B., & Buronfosse, T. (1999). Evaluation of the toxicity of imidacloprid in wild birds. A new high performance thin layer chromatography (HPTLC) method for the analysis of liver and crop samples in suspected poisoning cases. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 22(10), 1547-1559.

Bonmatin, J.-M., Giorio, C., Girolami, V., Goulson, D., Kreutzweiser, D.P., Krupke, C., Liess, M., Long, E., Marzaro, M., Mitchell, E.A.D., Noome, D.A., Simon-Delso, N., & Tapparo, A. (2015). Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(1), 35-67.

Bonmatin, J.M., Moineau, I., Charvet, R., Colin, M.E., Fleche, C., & Bengsch, E.R. (2005). Behaviour of Imidacloprid in Fields. Toxicity for Honey Bees. U Lichtfouse E., Schawrzbauer, J., & Robert, D. ured.), *Environmental Chemistry: Green Chemistry and Pollutants in Ecosystems* (str. 483-494). Berlin: Springer. Preuzeto 5.06.2017, sa <http://cues.cfans.umn.edu/old/pollinators/pdf-HBcolony/2005BonmartinChemistrychapter.pdf>.

- Bott, A.W. (2000). Controlled current techniques. *Current Separations*, 18(4), 125-127.
- Brezo, T., Stojanović, Z., Suturović, Z., Kravić, S., Kos, J., & Đurović, A. (2015). Simple, rapid and selective chronopotentiometric method for the determination of riboflavin in pharmaceutical preparations using a glassy carbon electrode. *Acta Chimica Slovenica*, 62, 923-931.
- Bro, E., Decors, A., Millot, F., Soyeux, D., Moinet, M., Berny, P., & Mastain, O. (2010). Intoxications des perdrix grises en nature Nouveau bilan de la surveillance « SAGIR ». *Faune Sauvage*, 289(4), 26-32.
- BVL (2015). Absatz an Pflanzenschutzmitteln in der Bundesrepublik Deutschland, Ergebnisse der Meldungen gemäß § 64 Pflanzenschutzgesetz für das Jahr 2015. Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit. Preuzeto 23.06.2016, sa [http://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/04\\_Pflanzenschutzmittel/meld\\_par\\_64\\_2015\\_EN.pdf?\\_\\_blob=publicationFile&v=2/](http://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/04_Pflanzenschutzmittel/meld_par_64_2015_EN.pdf?__blob=publicationFile&v=2/).
- Carafa R., Wollqast, J., Canuti, E., Ligthart, J., Dueri, S., Hanke, G., Eisenreich, S.J., Viaroli, P., & Zaldívar, J.M. (2007). Seasonal variations of selected herbicides and related metabolites in water, sediment, seaweed and clams in the Sacca di Goro coastal lagoon (Northern Adriatic). *Chemosphere*, 69(10), 1625-1637.
- Carbonell, E., Xamena, N., Creus, A., & Marcos, R. (1993). Cytogenetic biomonitoring in a Spanish group of agricultural workers exposed to pesticides. *Mutagenesis*, 8(6), 511-517.
- Cavalheiro, É.T.G., Brett, C.M.A., Oliveira-Brett, A.M., & Fatibello-Filho, O. (2012). Bioelectroanalysis of pharmaceutical compounds. *Bioanalytical Reviews*, 4(1), 31-53.
- CCME (2007). Canadian Water Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life, Imidacloprid. Canadian Council of Ministers of the Environment. Preuzeto 10.06.2017, sa <http://ceqg-rcqe.ccme.ca/download/en/187>.
- Cerejeira, M.J., Viana, P., Batista, S., Pereira, T., Silva, E., Valério, M.J., Silva, A., Ferreira, M., & Silva-Fernandes, A.M. (2003). Pesticides in Portuguese surface and ground waters. *Water Research*, 37(5), 1055-1063.
- Cessna, A.J. (2008). Nonbiological Degradation of Triazine Herbicides: Photolysis and Hydrolysis. U: LeBaron, H.M., & Burnside, O.C. (ured.), *The Triazine Herbicides 50 Years Revolutionizing Agriculture* (str. 329-355). Amsterdam: Elsevier.



Chen, M., Meng, Y., Zhang, W., Zhou, J., Xie, J., & Diao, G. (2013).  $\beta$ -Cyclodextrin polymer functionalized reduced-graphene oxide: Application for electrochemical determination imidacloprid. *Electrochimica Acta*, 108, 1-9.

Chiali, F.Z., Merzouk, H., Merzouk, S.A., Medjdoub, A., & Narce, M (2013). Chronic low level metribuzin exposure induces metabolic alterations in rats. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 106(1-2), 38-44.

Chowdhury, N.R., Kumar, R., & Kant, R. (2017). Theory for the chronopotentiometry on rough and finite fractal electrode: Generalized Sand equation. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 802, 64-77.

Chowdhury, A., Pradhan, S., Saha, M., & Sanyal, N. (2008). Impact of pesticides on soil microbiological parameters and possible bioremediation strategies. *Indian Journal of Microbiology*, 48(1), 114-127.

Collier, R., Jukes, A., Daniel, C., & Hommes, M. (2016). Ecological selectivity of pesticides and pesticide application methods. Working Group "Integrated Protection in Field Vegetables". Proceedings of the Meeting at Pflanzenschutzdienst Hamburg (Germany) 04 - 07 October. (str. 94-98). Preuzeto 17.3.2017, sa [https://ec.europa.eu/eip/agriculture/sites/agri-eip/files/fg6\\_ipm\\_brassica\\_minipaper5\\_2015\\_en.pdf](https://ec.europa.eu/eip/agriculture/sites/agri-eip/files/fg6_ipm_brassica_minipaper5_2015_en.pdf).

Cox, L., Hermosin, M.C., Comejo, J., & Mansour, M. (1996a). Photolysis of metamitron in water in the presence of soils and soil components. *Chemosphere*, 33(10), 2057-2064.

Cox, L., Hermosin, M.C., & Cornejo, J. (1996b). Sorption of metamitron on soils with low organic matter content. *Chemosphere*, 32(7), 1391-1400.

Cypriano, J.C., Matos, M.A.C., & Matos, R.C. (2008). Ultrasound-assisted treatment of palm oil samples for the determination of copper and lead by stripping chronopotentiometry. *Microchemical Journal*, 90, 26-30.

Daraghmeah, A., Shraim, A., Abulhaj, S., Sansour, R., & Ng, J.C. (2007). Imidacloprid residues in fruits, vegetables and water samples from Palestine. *Environmental Geochemistry and Health*, 29(1), 45-50.

De Snoo, G.R., Scheidegger, N.M.I., & de Jong, F.M.W. (1999). Vertebrate wildlife incidents with pesticides: a European survey. *Pest Management Science*, 55(1), 47-54.

Delancey, J.O.L., Alavanja, M.C., Coble, J., Blair, A., Hoppin, J.A., Austin, H.D., & Freeman, L.E. (2009). Occupational exposure to metribuzin and the incidence of cancer in the agricultural health study. *Annals of Epidemiology*, 19(6), 388-395.

Del Pilar Castillo, M., & Torstensson, L. (2007). Effect of biobed composition, moisture, and temperature on the degradation of pesticides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(14), 5725-5733.

Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy L 327. *Official Journal of the European Communities*, 43, 1-72. Preuzeto 12.03.2017, sa [http://eur-lex.europa.eu/resource.html?uri=cellar:5c835afb-2ec6-4577-bdf8-756d3d694eeb.0004.02/DOC\\_1&format=PDF](http://eur-lex.europa.eu/resource.html?uri=cellar:5c835afb-2ec6-4577-bdf8-756d3d694eeb.0004.02/DOC_1&format=PDF).

Directive 98/8/EC. Directive 98/8/EC concerning the placing of biocidal products on the market Inclusion of active substances in Annex I or IA to Directive 98/8/EC Assessment Report Imidacloprid Product-type 18 (Insecticides, Acaricides and Products to control other Arthropods), Annex I, Germany. Preuzeto 9.06.2017, sa <https://circabc.europa.eu/sd/a/22af201b-1d21-4c88-bde9-cab30211c965/Imidacloprid%20PT%2018%20assessment%20report-checked%20by%20DE.pdf>.

Directive 98/83/EC. Directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption – Drinking Water Directive. *Official Journal of the European Communities*. L 330, 41, 32-54. Preuzeto 10.03.2017, sa [https://www.mattilsynet.no/om\\_mattilsynet/utkast\\_til\\_dwd\\_annex\\_iii.11845/binary/Utkast%20til%20DWD\\_Annex%20III](https://www.mattilsynet.no/om_mattilsynet/utkast_til_dwd_annex_iii.11845/binary/Utkast%20til%20DWD_Annex%20III).

Dively, G.P., & Kamel, A. (2012). Insecticide residues in pollen and nectar of a cucurbit crop and their potential exposure to pollinators. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(18), 4449-4456.

Dores, E.F., Carbo, L., Ribeiro, M.L., & De-Lamonica-Freire, E.M. (2008). Pesticide levels in ground and surface waters of Primavera do Leste Region, Mato Grosso, Brazil. *Journal of Chromatographic Science*, 46(7), 585-590.

Dujaković, N., Grujić, S., Radišić, M., Vasiljević, T., & Laušević, M. (2010). Determination of pesticides in surface and ground waters by liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 678(2), 63-72.

Đurović, R. (2011). Procesi koji određuju sudbinu pesticida u zemljištu. *Pesticidi i fitomedicina*, 26(1), 9-22.

EFSA (2008). European Food Safety Authority Scientific Report, Conclusion on the review of metamidon, Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance metamidon, 185, 1-95. Preuzeto 20.06.2017, sa <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2008.185r>.

EFSA (2006). European Food Safety Authority Scientific Report, Conclusion on the review of metribuzin, Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance metribuzin, 88, 1-74. Preuzeto 4.07.2017, sa <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2006.88r>.

Engelhardt, G., & Wallnöfer, P.R. (1978). Microbial transformation of the triazinone herbicide metamidon to desaminometamidon. *Chemosphere*, 7(6), 463-466.

EPA (2003). United States Environmental Protection Agency, Health Effects Support Document for Metribuzin. Preuzeto 3.07.2017, sa [https://www.epa.gov/sites/production/files/2014-09/documents/support\\_cc1\\_metribuzin\\_healtheffects.pdf](https://www.epa.gov/sites/production/files/2014-09/documents/support_cc1_metribuzin_healtheffects.pdf).

Estévez, M.A., Periago, E.L., Carballo, E.M., Gándara, J.S., Mejuto, J.C., & Río, L.G. (2008). The mobility and degradation of pesticides in soil and the pollution of groundwater resources. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 123(4), 247-260.

EU Pesticides database, 2017. Preuzeto 15.03.2017, sa <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.selection&language=EN>.

Felsot, A.S., Cone, W., Yu, J., & Ruppert, J.R. (1998). Distribution of imidacloprid in soil following subsurface drip chemigation. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 60(3), 363-370.

- Fenoll, J., Hellín, P., Martínez, C.M., Flores, P., & Navarro, S. (2011). Determination of 48 pesticides and their main metabolites in water samples by employing sonication and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta*, 85(2), 975-982.
- Fernández-Bayo, J.D., Nogales, R., & Romero, E. (2009). Effect of vermicomposts from wastes of the wine and alcohol industries in the persistence and distribution of imidacloprid and diuron on agricultural soils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(12), 5435-5442.
- Flores-Cespedes, F., Gonzalez-Pradas, E., Fernandez-Perez, M., Villafranca-Sanchez, M., Socias-Viciano, M., & Urena-Amate, M.D. (2002). Effects of dissolved organic carbon on sorption and mobility of imidacloprid in soil. *Journal of Environmental Quality*, 31(3), 880-888.
- Fossen, M. (2006). Environmental fate of imidacloprid, Environmental Monitoring, Department of Pesticide Regulation 1001 I Street, Sacramento, CA 95812-4015. Preuzeto 5.06. 2017, sa <http://www.cdpr.ca.gov/docs/emon/pubs/fatememo/Imidclprdfate2.pdf>.
- Fuentes, E., Cid, C., & Báez, M.E. (2015). Determination of imidacloprid in water samples via photochemically induced fluorescence and second-order multivariate calibration. *Talanta*, 134, 8-15.
- Führ, Dr.F., & Mittelstaedt, W. (1979). Effect of varying soil temperatures on the degradation of methabenzthiazuron, isocarbamid and metamitron. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 142(5), 657-668.
- Gallaher, K., & Mueller, T.C. (1996). Effect of crop presence on persistence of atrazine, metribuzin, and clomazone in surface soil. *Weed Science*, 44(3), 698-703.
- Garrido, E.M., Delerue-Matos, C., Lima, J.L.F.C., & Brett, A.M.O. (2004). Electrochemical methods in pesticide control. *Analytical Letters*, 37(9), 1755-1791.
- Gavrilescu, M. (2005). Fate of pesticides in the environment and its bioremediation. *Engineering in Life Sciences*, 5(6), 497-526.
- Geerdink, R.B. (1991). Direct determination of metamitron in surface water by large sample volume injection. *Journal of Chromatography*, 543, 244-249.

- Gemene, K.L., & Bakker, E. (2009). Measurement of total calcium by flash chronopotentiometry at polymer membrane ion-selective electrodes. *Analytica Chimica Acta*, 648, 240–245.
- Gierst, L., & Juliard, A. (1953). Non-steady state electrolysis under forced current. *The Journal of Physical Chemistry*, 57(7), 701-706.
- Gómez-Caballero, A., Unceta, N., Goicolea, M.A., & Barrio, R.J. (2007). Voltammetric determination of metamitron with an electrogenerated molecularly imprinted polymer microsensor. *Electroanalysis*, 19(2-3), 356-363.
- Goulson, D. (2013). An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. *Journal of Applied Ecology*, 50(4), 977-987.
- Greene, S.A., & Pohanish, R.P. (2005). *Sittig's Handbook of Pesticides and Agricultural Chemicals*. William Andrew Publishing: Norwich, USA.
- Guiberteau, A., Galeano, T., Mora, N., Parrilla, P., & Salinas, F. (2001). Study and determination of the pesticide imidacloprid by square wave adsorptive stripping voltammetry. *Talanta*, 53(5), 943-949.
- Guo, L., Jury, W.A., Wagenet, R.J., & Flury, M. (2000). Dependence of pesticide degradation on sorption: nonequilibrium model and application to soil reactors. *Journal of Contaminant Hydrology*, 43(1), 45-62.
- Gupta, S., Gajbhiye, V.T., & Agnihotri K.N.P. (2002). Leaching behaviour of imidacloprid formulations in soil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 68, 502-508.
- Gustafson, D.I. (1989). Groundwater ubiquity score: A simple method for assessing pesticide leachability. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 8(4), 339-357.
- Guzsvány, V., Petrović, J., Krstić, J., Papp, Z., Putek, M., Bjelica, L., Bobrowski, A., & Abramović, B. (2013). Renewable silver-amalgam film electrode for voltammetric monitoring of solar photodegradation of imidacloprid in the presence of Fe/TiO<sub>2</sub> and TiO<sub>2</sub> catalysts. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 699, 33-39.
- Guzsvány, V., Kádár, M., Papp, Z., Bjelica, L., Gaál, F., & Tóth, K. (2008). Monitoring of photocatalytic degradation of selected neonicotinoid insecticides by cathodic voltammetry with a bismuth film electrode. *Electroanalysis*, 20(3), 291-300.

- Guzsvány, V., Madžgalj, A., Trebše, P., Gaál, F., & Franko, M. (2007). Determination of selected neonicotinoid insecticides by liquid chromatography with thermal lens spectrometric detection. *Environmental Chemistry Letters*, 5(4), 203-208.
- Guzsvány, V., Csanádi, J., & Gaál, F. (2006). NMR study of the influence of pH on the persistence of some neonicotinoids in water. *Acta Chimica Slovenica*, 53, 52-57.
- Guzsvány, V.J., Gaál, F.F., Bjelica, L.J., & Ökrész, S.N. (2005). Voltammetric determination of imidacloprid and thiametoxam. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 70(5), 735-743.
- Haarstad, K., & Ludvigsen, G.H. (2007). Ten years of pesticide monitoring in Norwegian ground water. *Ground Water Monitoring and Remediation*, 27(3), 75-89.
- Hallberg, G.R. (1989). Pesticide pollution of groundwater in the humid United States. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 26(3-4), 299-367.
- Heri, W., Pfister, F., Carroll, B., Parshley, T., & Nabors, J.B. (2008). Production, Development, and Registration of Triazine Herbicides. U: LeBaron, H.M., & Burnside, O.C. (Eds.), *The Triazine Herbicides 50 Years Revolutionizing Agriculture* (str. 31-45). Amsterdam: Elsevier.
- Hernández, F., Sancho, J.V., Pozo, O., Lara, A., & Pitarch, E. (2001). Rapid direct determination of pesticides and metabolites in environmental water samples at sub-microg/l level by on-line solid-phase extraction-liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 939(1-2), 1–11.
- Herrero-Hernández, E., Andrades, M.S., Álvarez-Martín, A., Pose-Juan, E., Rodríguez-Cruz, M.S., & Sánchez-Martín, M.J. (2013). Occurrence of pesticides and some of their degradation products in waters in a Spanish wine region. *Journal of Hydrology*, 486, 234-245.
- Husak, V.V., Mosiichuk, N.M., Maksymiv, I.V., Sluchyk, I.Y., Storey, J.M., Storey, K.B., & Lushchak, V.I. (2014). Histopathological and biochemical changes in goldfish kidney due to exposure to the herbicide Sencor may be related to induction of oxidative stress. *Aquatic Toxicology*, 155, 181-189.
- Huseth, A.S., & Groves, R.L. (2014). Environmental fate of soil applied neonicotinoid insecticides in an irrigated potato agroecosystem. *PLoS ONE*, 9(5), 1-11.
- Hyzak, D.L., & Zimdahl, R.L. (1974). Rate of degradation of metribuzin and two analogs in soil. *Weed Science*, 22(1), 75-79.

ICH (1996). International Conference on Harmonisation, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. Geneva, Switzerland. Preuzeto 5.04.2017, sa [https://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Efficacy/E6/E6\\_R1\\_Guideline.pdf](https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Efficacy/E6/E6_R1_Guideline.pdf).

Jain, R.K., & Gaur, H.C. (1977). Chronopotentiometry: A review of theoretical principles. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 79, 211-236.

Janaki, P., Rathika, S., Chinnusamy, C., & Prabhakaran, N.K. (2013). Field dissipation of metamitron in soil and sugar beet crop. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 90(1), 116–119.

Janíková L., Šelešovská R., Rogozinská M., Tomášková M., & Chýlková J. (2016). Sensitive voltammetric method for determination of herbicide metribuzin using silver solid amalgam electrode. *Monatshefte Für Chemie*, 147(1), 219-229.

Janjić, V., & Elezović, I. (2014). *Pesticidi u poljoprivredi u šumarstvu u Srbiji* (18. izd.). Beograd: Društvo za zaštitu bilja Srbije.

Javaid, M.K., Ashiq, M., & Tahir, M. (2016). Potential of biological agents in decontamination of agricultural soil. *Scientifica*, Article ID 1598325, 1-9.

Jedryczko, D., Pohl, P., & Welna, M. (2017). Determination of the total cadmium, copper, lead and zinc concentrations and their labile species fraction in apple beverages by flow-through anodic stripping chronopotentiometry. *Food Chemistry*, 225, 220–229.

Jedryczko, D., Pohl, P., & Welna, M. (2016). Inorganic arsenic speciation in natural mineral drinking waters by flow-through anodic stripping chronopotentiometry. *Talanta*, 150, 265–271.

Jeschke, P., Nauen, R., Schindler, M., & Elbert, A. (2011). Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(7), 2897-2908.

Jeschke, P., & Nauen, R. (2010). Neonicotinoid Insecticides. U: Gilbert, L.I., & Gill, S.S. (ured.), *Insect control Biological and Synthetic agents* (str. 61-114). Amsterdam: Elsevier.

Jeschke, P., & Nauen, R. (2008). Neonicotinoids-from zero to hero in insecticide chemistry. *Pest Management Science*, 64, 1084-1098.

- Jiménez, J.J., Bernal, J.L., del Nozal, M.J., & Rivera, J.M. (1997). Determination of pesticide residues in waters from small loughs by solid-phase extraction and combined use of gas chromatography with electron-capture and nitrogen-phosphorus detection and high-performance liquid chromatography with diode array detection. *Journal of Chromatography A*, 778(1-2), 289-300.
- Kanrar, B., Ghosh, T., Pramanik, S.K., Dutta, S., Bhattacharyya, A., & Dhuri, A.V. (2006). Degradation dynamics and persistence of imidacloprid in a rice ecosystem under West Bengal climatic conditions. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 77(5), 631-637.
- Khan, S.U. (1980). *Pesticides in the Soil Environment* (1. izd.). Amsterdam: Elsevier.
- Khanmohammadi, M., Armenta, S., Garrigues, S., & de la Guardia, M. (2008). Mid- and near-infrared determination of metribuzin in agrochemicals. *Vibrational Spectroscopy*, 46(2), 82-88.
- Khoury, R., Coste, C.M., & Kwar, N.S. (2006). Degradation of metribuzin in two soil types of Lebanon. *Journal of Environmental Science and Health Part B*, 41(6), 795-806.
- Khoury, R., Geahchan, A., Coste, C.M., Cooper, J.F., & Bobe, A. (2003). Retention and degradation of metribuzin in sandy loam and clay soils of Lebanon. *Weed Research*, 43(4), 252-259.
- Kolpin, D.W., Thurman, E.M., & Linhart, S.M. (2000). Finding minimal herbicide concentrations in ground water? Try looking for their degradates. *The Science of the Total Environment*, 248(2-3), 115-122.
- Kreuger, J., Graaf, S., & Adielsson, J.P.S. (2010). Pesticides in surface water in areas with open ground and greenhouse horticultural crops in Sweden 2008. *Ekohydrologi*, 117, Swedish University of Agricultural Sciences, Division of Water Quality Management. Preuzeto 30.05.2017, sa [https://pub.epsilon.slu.se/5413/1/kreuger\\_j\\_et\\_al\\_101014.pdf](https://pub.epsilon.slu.se/5413/1/kreuger_j_et_al_101014.pdf).
- Kumaravel, A., & Chandrasekaran, M. (2011). Electrochemical determination of imidacloprid using nanosilver nafion<sup>®</sup>/nanoTiO<sub>2</sub> nafion<sup>®</sup> composite modified glassy carbon electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 158(1), 319-326.
- La, N., Lamers, M., Bannwarth, M., Nguyen, V.V., & Streck, T. (2015). Imidacloprid concentrations in paddy rice fields in northern Vietnam: measurement and probabilistic modeling. *Paddy and Water Environment*, 13(2), 191-203.



- Ladlie, J.S., Meggitt, W.F., & Penner, D. (1976). Role of pH on metribuzin dissipation in field soils. *Weed Science*, 24(5), 508-511.
- Lamers, M., Anyusheva, M., La, N., Nguyen, V.V., & Streck, T. (2011). Pesticide pollution in surface- and groundwater by paddy rice cultivation: A case study from Northern Vietnam. *Clean – Soil, Air, Water*, 39(4), 356-361.
- Larsbo, M., Löfstrand, E., van Alphen de Veer, D., & Ulén, B. (2013). Pesticide leaching from two Swedish topsoils of contrasting texture amended with biochar. *Journal of Contaminant Hydrology*, 147(2013) 73–81.
- Lawrence, J.R., Eldan, M., & Sonzogni, W.C. (1993). Metribuzin and metabolites in Wisconsin (U.S.A.) well water. *Water Research*, 27(8), 1263-1268.
- LeBaron, H.M., McFarland, J.E., & Burnside, O.C. (2008). The Triazine Herbicides: A Milestone in the Development of Weed Control Technology. U: LeBaron, H.M., McFarland, J.E., & Burnside, O.C. (ured.), *The Triazine Herbicides, 50 years Revolutionizing Agriculture* (str. 1-13). Amsterdam: Elsevier.
- Lee, J.K., Ahn, K.C., Park, O.S., Kang, S.Y., & Hammock, B.D. (2001). Development of an ELISA for the detection of the residues of the insecticide imidacloprid in agricultural and environmental samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(5), 2159-2167.
- Lei, W., Wu, Q., Si, W., Gu, Z., Zhang, Y., Deng, J., & Hao, Q. (2013). Electrochemical determination of imidacloprid using poly(carbazole)/chemically reduced graphene oxide modified glassy carbon electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 183, 102-109.
- Lima A.C.A., da Silva E.G., Goulart M.O.F., Tonholo J., da Silva T.T., & de Abreu F.C. (2009). Electrochemical behavior of metribuzin on glassy carbon electrode in an aqueous medium including quantitative studies by anodic stripping voltammetry. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 20(9), 1698-1704.
- Lopez-Antia, A., Ortiz-Santaliestra, M.E., Mougeot, F., & Mateo, R. (2015). Imidacloprid-treated seed ingestion has lethal effect on adult partridges and reduces both breeding investment and offspring immunity. *Environmental Research*, 136, 97-107.
- Lopez-Antia, A., Ortiz-Santaliestra, M.E., Mougeot, F., & Mateo, R. (2013). Experimental exposure of red-legged partridges (*Alectoris rufa*) to seeds coated with imidacloprid, thiram and difenoconazole. *Ecotoxicology*, 22(1), 125-138.

- López de Armentia, C., Sampedro, C., Goicolea, M.A., Gómez de Balugera, Z., Rodríguez, E., & Barrio, R.J. (1999). Poly(3-methylthiophene)-coated carbon fiber microelectrode for the voltammetric measurement of herbicide metamitron. *Electroanalysis*, 11(16), 1222-1226.
- López Flores, J., Molina Díaz, A., & Fernández de Córdoba, M.L. (2007). Development of a photochemically induced fluorescence-based optosensor for the determination of imidacloprid in peppers and environmental waters. *Talanta*, 72(3), 991-997.
- Ludvík, J., Riedl, F., Liška, F., & Zuman, P. (1998a). Electrochemical reduction of metamitron. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 457(1-2), 177-190.
- Ludvík, J., Riedl, F., Liška, F., & Zuman, P. (1998b). Electrochemical reduction of metribuzin. *Electroanalysis*, 10(13), 869-876.
- Majidi, M.R., Asadpour-Zeynali, K., Bamorowat, M., & Nazarpur, M. (2011). Determination of imidacloprid in tomato grown in greenhouse based on copper(II) phthalocyanine modified carbon ceramic electrode by differential pulse voltammetry. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 58(2), 207-214.
- Maksymiv, I.V., Husak, V.V., Mosiichuk, N.M., Matviishyn, T.M., Sluchyk, I.Y., Storey, J.M., Storey, K.B., & Lushchak, V.I. (2015). Hepatotoxicity of herbicide sensor in goldfish may result from induction of mild oxidative stress. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 122, 67-75.
- Mamy, L., & Barriuso, E. (2007). Desorption and time-dependent sorption of herbicides in soils. *European Journal of Soil Science*, 58(1), 174 - 187.
- Mamy, L., Barriuso, E., & Gabrielle, B. (2005). Environmental fate of herbicides trifluralin, metazachlor, metamitron and sulcotrione compared with that of glyphosate, a substitute broad spectrum herbicide for different glyphosate-resistant crops. *Pest Management Science*, 61(9), 905-916.
- Martínez Galera, M., Garrido Frenich, A., Martínez Vidal, J.L., & Parrilla Vázquez, P. (1998). Resolution of imidacloprid pesticide and its metabolite 6-chloronicotinic acid using cross-sections of spectrochromatograms obtained by high-performance liquid chromatography with diode-array detection. *Journal of Chromatography A*, 799(1-2), 149-154.
- Matsuda, K., Kanaoka, S., Akamatsu, M., & Sattelle, D.B. (2009). Diverse actions and target-site selectivity of neonicotinoids: structural insights. *Molecular Pharmacology*, 76(1), 1-10.

- McKone, T.E., & Maddalena, R.L. (2007). Plant uptake of organic pollutants from soil: Bioconcentration estimates based on models and experiments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26(12), 2494-2504.
- Medjdoub, A., Merzouk, S.A., Merzouk, H., Chiali, F.Z., & Narce, M. (2011). Effects of mancozeb and metribuzin on in vitro proliferative responses and oxidative stress of human and rat spleen lymphocytes stimulated by mitogens. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 101(1), 27-33.
- Mineau, P., & Palmer, C. (2013). The impact of the nation's most widely used insecticides on birds. *American Bird Conservancy*, 1-96. Preuzeto 8.06.2017, sa [https://abcbirds.org/wp-content/uploads/2015/05/Neonic\\_FINAL.pdf](https://abcbirds.org/wp-content/uploads/2015/05/Neonic_FINAL.pdf).
- Moreno, M., Bermejo, E., Chicharro, M., Zapardiel, A., & Arribas, A.S. (2009). Cathodic electrochemical determination of herbicides in acid media using a bismuth film electrode. *Electroanalysis*, 21(3-5), 415-421.
- Moros, J., Armenta, S., Garrigues, S., & de la Guardia, M. (2006a). Quality control of metamidon in agrochemicals using fourier transform infrared spectroscopy in the middle and near range. *Analytica Chimica Acta*, 565(2), 255-260.
- Moros, J., Armenta, S., Garrigues, S., & de la Guardia, M. (2006b). Univariate near infrared methods for determination of pesticides in agrochemicals. *Analytica Chimica Acta*, 579(1), 17-24.
- Morrissey, C.A., Mineau, P., Devries, J.H., Sanchez-Bayo, F., Liess, M., Cavallaro, M.C., & Liber, K. (2015). Neonicotinoid contamination of global surface waters and associated risk to aquatic invertebrates: A review. *Environmental International*, 74, 291-303.
- Moschet, C., Vermeirssen, E.L.M, Singer, H., Stamm, C., & Hollender, J. (2015). Evaluation of in-situ calibration of chemcatcher passive samplers for 322 micropollutants in agricultural and urban affected rivers. *Water Research*, 71, 306-317.
- Mostafalou, S., & Abdollahi, M. (2013). Pesticides and human chronic diseases: Evidences, mechanisms, and perspectives. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 268, 157-177.
- Moza, P.N., Hustert, K., Feicht, E., & Kettrup, A. (1998). Photolysis of imidacloprid in aqueous solution. *Chemosphere*, 36(3), 497-502.

Muszyński, P., & Brodowska, S. (2014). Effects of potassium, ammonium, and calcium chlorides on the sorption of metamitron in soil. *Polish Journal of Environmental Studies*, 23(6), 2125-2135.

Navalón A., El-Khattabi, R., González-Casado, A., & Vilchez, J.L. (1999). Differential-pulse polarographic determination of the insecticide imidacloprid in commercial formulations. *Mikrochimica Acta*, 130(4), 261-265.

Olmedo, C., Deban, L., Barrado, E., Castrillejo, Y., & Herrero, L (1994). Identification of different products obtained by electrochemical and photochemical reduction of the herbicide metamitron. *Electrochimica Acta*, 39(14), 2237-2241.

Ortiz-Hernández, L., Sánchez-Salinas, E., Dantán-González, E., & Castrejón-Godínez, M.L. (2013). Pesticide Biodegradation: Mechanisms, Genetics and Strategies to Enhance the Process. U: Chamy, R., & Rosenkranz, F. (ured.), *Biodegradation – Life of Science* (str. 251-289). London: InTech.

Papp, Z., Švancara, I., Guzsavány, V., Vytřas, K., & Gaál, F. (2009). Voltammetric determination of imidacloprid insecticide in selected samples using a carbon paste electrode. *Microchimica Acta*, 166(1-2), 169-175.

Pareja, L., Colazzo, M., Pérez-Parada, A., Niell, S., Carrasco-Letelier, L., Besil, N., Cesio, M.V., & Heinzen, H. (2011). Detection of pesticides in active and depopulated beehives in Uruguay. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 8(10), 3844-3858.

Pimentel, D. (1995). Amounts of pesticides reaching target pests: Environmental impacts and ethics. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics*, 8(1), 17-29.

PPDB (2017). Pesticide Properties DataBase. Preuzeto 2. Juna 2017, sa <https://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/>.

Quintás, G., Armenta, S., Garrigues, S., & de la Guardia, M. (2004). Fourier transform infrared determination of imidacloprid in pesticide formulations. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 15(2), 307-312.

Rebich, R.A., Coupe, R.H., & Thurman, E.M. (2004). Herbicide concentrations in the Mississippi River Basin-the importance of chloroacetanilide herbicide degradates. *Science of the Total Environment*, 321(1-3), 189-199.

Rennich, K., Kunkel, G., Abban, S., Fahey, R., Eversole, H., Evans, J., Forsgren, E., Levi, V., Lopez, D., Madella, S., Pettis, J., Rose, R., & van Engelsdorp, D. (2014). 2013-2014 National honey bee pests and diseases survey report, USDA, 23 p. Preuzeto 8.06.2017, sa <https://beeinformed.org/wp-content/uploads/2015/07/2013-2014-NHBS-Report.pdf>.

Roberts, T., & Hutson, D. (1999). *Metabolic Pathways of Agrochemicals Part Two: Insecticides and Fungicides*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry.

Roberts, T.R. (1998). *Metabolic Pathways of Agrochemicals. Part 1: Herbicides and Plant Growth Regulators*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry.

Roberts, T.R. (1996). Assessing the environmental fate of agrochemicals. *Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 31(3), 325-335.

Robles-Molina, J., Gilbert-López, B., García-Reyes, J.F., & Molina-Díaz, A. (2014). Monitoring of selected priority and emerging contaminants in the Guadalquivir River and other related surface waters in the province of Jaén, South East Spain. *Science of the Total Environment*, 479-480, 247-257.

Roessink, I., Merga, L.B., Zweers, H.J., & Van der Brink, P.J. (2013). The neonicotinoid imidacloprid shows high chronic toxicity to Mayfly Nymphs. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32(5), 1096–1100.

Rosen, J.D., & Siewierski, M. (1971). Photolysis of 4-amino-3-methylthio-6-phenyl-1, 2,4-triazin-5-one (Aglypt). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 6(5), 406-408.

Rosenbom, A.E., Olsen, P., Plauborg, F., Grant, R., Juhler, R.K., Brüsch, W., & Kjær, J. (2015). Pesticide leaching through sandy and loamy fields-long-term lessons learnt from the danish pesticide leaching assessment programme. *Environmental Pollution*, 201, 75-90.

Rouchaud, J., Gustin, F., & Wauters, A. (1996). Imidacloprid insecticide soil metabolism in sugar beet field crops. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 56(1), 29-36.

Rouchaud, J., Gustin, F., & Wauters, A. (1994). Soil biodegradation and leaf transfer of insecticide imidacloprid applied in seed dressing in sugar beet crops. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 53(3), 344-350.

- Sabourmoghaddam, N., Zakaria, M.P., & Omar, D. (2015). Evidence for the microbial degradation of imidacloprid in soils of Cameron Highlands. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 14(2), 182-188.
- Sánchez Arribas, A., Bermejo, E., Chicharro, M., & Zapardiel, A. (2006). Voltammetric detection of the herbicide metamitron at a bismuth film electrode in nonde-aerated solution. *Electroanalysis*, 18(23), 2331-2336.
- Sanchez-Bayo, F., & Goka, K. (2014). Pesticide residues and bees – a risk assessment. *PLoS One*, 9(4), e94482.
- Sánchez-Bayo, F., & Hyne, R.V. (2014). Detection and analysis of neonicotinoids in river waters-Development of a passive sampler for three commonly used insecticides. *Chemosphere*, 99, 143-151.
- Sanchez-Ortega, A., Unceta, N., Gómez-Caballero, A., Sampedro, M.C., Akeso, U., Goicolea, M.A., & Barrio, R.J. (2009). Sensitive determination of triazines in underground waters using stir bar sorptive extraction directly coupled to automated thermal desorption and gas chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 641(1-2), 110-116.
- Saracco, P., Marzachi, C., & Bosco, D. (2008). Activity of some insecticides in preventing transmission of chrysanthemum yellows phytoplasma ('Candidatus Phytoplasma asteris') by the leafhopper *Macrostelus quadripunctulatus* Kirschbaum. *Crop Protection*, 27(1), 130-136.
- Sarkar, M.A., Roy, S., Kole, R.K., & Chowdhury, A. (2001). Persistence and metabolism of imidacloprid in different soils of West Bengal. *Pest Management Science*, 57(7), 598-602.
- Savage, K.E. (1977). Metribuzin Persistence in Soil. *Weed Science*, 25(1), 55-59.
- Schipper, P.N., Vissers, M.J., & van der Linden, A.M. (2008). Pesticides in groundwater and drinking water wells: overview of the situation in the Netherlands. *Water Science & Technology*, 57(8), 1277-1286.
- Seccia, S., Fidente, P., Barbini, D.A., & Morrica, P. (2005). Multiresidue determination of nicotinoid insecticide residues in drinking water by liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 553(1-2), 21-26.

Shah, J., Jan, M.R., Ara, B., & Mohammad, M. (2009). Extractive spectrophotometric method for determination of metribuzin herbicide and application of factorial design in optimisation of various factors. *Journal of Hazardous Materials*, 164(2-3), 918-922.

Shao, X., Liu, Z., Xu, X., Li, Z., & Qian, X. (2013). Overall status of neonicotinoid insecticides in China: Production, application and innovation. *Journal of Pest Science*, 38(1), 1-9.

Simon-Delso, N., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L.P., Bonmatin, J.M., Chagnon, M., Downs, C., Furlan, L., Gibbons, D.W., Giorio, C., Girolami, V., Goulson, D., Kreutzweiser, D.P., Krupke, C.H., Liess, M., Long, E., McField, M., Mineau, P., Mitchell, E.A.D., Morrissey, C.A., Noome, D.A., Pisa, L., Settele, J., Stark, J.D., Tapparo, A., Van Dyck, H., Van Praagh, J.V., Van der Suijs, J.P., Whitehorn, P.R., & Wiemers, M. (2015). Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(1), 5-34.

Simoneaux, B.J., & Gould, T.J. (2008). Plant Uptake and Metabolism of Triazine Herbicides. U: LeBaron, H.M., & Burnside, O.C. (ured.), *The Triazine Herbicides, 50 years Revolutionizing Agriculture* (str. 73-101). Amsterdam: Elsevier.

Skopalová, J., & Navrátil, T. (2007). Application of elimination voltammetry to the study of electrochemical reduction and determination of the herbicide metribuzin. *Chemia Analytyczna*, 52, 961-967.

Skopalová J., Lemr K., Kotouček M., Čáp L., & Barták, P. (2001). Electrochemical behavior and voltammetric determination of the herbicide metribuzin at mercury electrodes. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 370, 963-969.

Službeni glasnik RS, 02/2017. SRPS ISO 5667-6:2017, *Kvalitet vode – Uzimanje uzoraka – Deo 6: Smernice za uzimanje uzoraka iz reka i potoka*, Beograd: „Službeni glasnik“.

Službeni glasnik RS, 49/2017. *Sredstva za zaštitu bilja na osnovu izdatih rešenja o registraciji sredstava za zaštitu bilja*. Beograd: „Službeni glasnik“. Preuzeto 22.06.2017, sa <http://www.pravno-informacioni-sistem.rs/SlGlasnikPortal/viewdoc?uuid=b161db44-02a7-4383-a8a3-c0825e4d95e8>.

Službeni glasnik RS, 24/2014, *Uredba o graničnim vrednostima prioriternih i prioriternih hazardnih supstanci koje zagađuju površinske vode i rokovima za njihovo dostizanje*. Beograd: „Službeni glasnik“. Preuzeto 22.02.2018, sa <http://www.sepa.gov.rs/download/kvbg/uredba3.pdf>.

Službeni glasnik RS, 29/2014. *Pravilnik o maksimalno dozvoljenim količinama ostataka sredstava za zaštitu bilja u hrani i hrani za životinje i u hrani i hrani za životinje za koju se utvrđuju maksimalno dozvoljene količine ostataka sredstava za zaštitu bilja*. Beograd „Službeni glasnik“. Preuzeto 22.06.2017, sa <https://zivinarstvo.com/wp-content/uploads/2014/06/PRAVILNIK-O-MAKSIMALNIM-OSTATAKA.pdf>.

Službeni glasnik RS, 50/2012. *Uredba o graničnim vrednostima zagađujućih materija u površinskim i podzemnim vodama i sedimentu i rokovima za njihovo dostizanje*. Beograd: „Službeni glasnik“. Preuzeto 20.11.2017, sa <http://www.rdvode.gov.rs/doc/dokumenta/podzak/Uredba%20o%20granicnim%20vrednostima%20zagadjujucih%20materija%20u%20povrsinskim%20i%20podzemnim%20vodama%20i%20sedimentu%20i%20rokovima%20za%20njihovo%20dostizanje.pdf>

Službeni glasnik RS, 41/2009. *Zakon o sredstvima za zaštitu bilja*, Beograd: „Službeni glasnik“. Preuzeto 22.06.2017, sa <http://www.vojvodinasume.rs/wp-content/uploads/2012/04/Zakon-o-sredstvima-za-zastitu-bilja.pdf>

Službeni glasnik RS, 89/2008. SRPS ISO 5667-5: 2008, *Kvalitet vode – Uzimanje uzoraka – Deo 5: Smernice za uzimanje uzoraka vode za piće iz postrojenja za obradu vode i iz sistema za distribuciju*, Beograd: „Službeni glasnik“.

Službeni list SRJ, 42/98 i 44/99. *Pravilnik o higijenskoj ispravnosti vode za piće*. Beograd: „Službeni list SRJ“. Preuzeto 10.03.2017, sa <http://www.zjz.org.rs/wp-content/uploads/2013/04/pravilnik-o-higijenskoj-ispravnosti-vode-za-pice.pdf>

Spliid, N.H., & Køppen, B. (1996). Determination of polar pesticides in ground water using liquid chromatography-mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization. *Journal of Chromatography A*, 736(1), 105-114.

Starner, K., & Goh, K.S. (2012). Detections of the neonicotinoid insecticide imidacloprid in surface waters of three agricultural regions of California, USA, 2010–2011. *Bulletin of Environmental Contamination Toxicology*, 88(3), 316-321.



- Stenersen, J. (2004). *Chemical Pesticides: Mode of Action and Toxicology*. Boca Raton: CRC Press.
- Stephenson, G.R., Ferris, I.G., Holland, P.T., & Nordberg, M. (2006). Glossary of terms relating to pesticides. *Pure and Applied Chemistry*, 78(11), 2075-2154.
- Stern, R.A. (2015). The photosynthesis inhibitor metamitron is a highly effective thinner for 'Golden Delicious' apple in a warm climate. *Fruits*, 70(2), 1-8.
- Stern, R.A. (2014). The photosynthesis inhibitor metamitron is an effective fruitlet thinner for 'Gala' apple in the warm climate of Israel. *Scientia Horticulture*, 178, 163-167.
- Stevanović, M., Dolovac, N., Marisavljević, D., Anđelković, A., Radivojević, L, Aleksić, G., & Gavrilović, V. (2015). Efficacy of metamitron in apple thinning in Serbia. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*, 80(2), 261-266.
- Stojanović, Z., Švarc-Gajić, J., Vitas, J., Malbaša, R., & Lončar, E. (2013). Direct chronopotentiometric method for ascorbic acid determination in fermented milk products. *Journal of Food Composition and Analysis*, 32, 44–50.
- Stojanović, Z., & Švarc-Gajić, J. (2011). A simple and rapid method for histamine determination in fermented sausages by mediated chronopotentiometry. *Food Control*, 22, 2013-2019.
- Stoughton, S.J., Liber, K., Culp, J., & Cessna, A. (2008). Acute and chronic toxicity of imidacloprid to the aquatic invertebrates *Chironomus tentans* and *Hyaella azteca* under constant- and pulse-exposure conditions. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 54(4), 662–673.
- Suchail, S., Guez, D., & Belzunces, L.P. (2001). Discrepancy between acute and chronic toxicity induced by imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(11), 2482–2486.
- Suchail, S., Guez, D., & Belzunces, L.P. (2000). Characteristics of imidacloprid toxicity in two *Apis mellifera* subspecies. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19(7) 1901–1905.
- Suturović, Z. (2003). *Elektrohemijska striping analiza*. Monografija. Novi Sad: Tehnološki fakultet.

- Šelešovská, R., Janíková, L., & Chýlková, J. (2015). Green electrochemical sensors based on boron-doped diamond and silver amalgam for sensitive voltammetric determination of herbicide metamitron. *Monatshefte für Chemie*, 146(5), 795-805.
- Šovljanski, R., & Lazić, S. (2007). *Osnovi fitofarmacije*. Novi Sad: Poljoprivredni fakultet.
- Tagert, M.L.M., Massey, J.H., & Shaw, D.R. (2014). Water quality survey of Mississippi's Upper Pearl River. *Science of the Total Environment*, 481, 564–573.
- Tanabe, A., & Kawata, K. (2004). Determination of triazine pesticides and related compounds in environmental water by liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytical Sciences*, 20(1), 227-230.
- Tanguy, V., Waeles, M., Vandenhecke, J., & Riso, R.D. (2010). Determination of ultra-trace Sb(III) in seawater by stripping chronopotentiometry (SCP) with a mercury film electrode in the presence of copper. *Talanta*, 81, 614-620.
- Thomas, F.G., & Henze, G. (2001). *Introduction to Voltammetric Analysis Theory and Practice*. Collingwood: Csiro Publishing.
- Thuyet, D.Q., Watanabe, H., & Ok, J. (2013). Effect of pH on the degradation of imidacloprid and fipronil in paddy water. *Journal of Pesticide Science*, 38(4), 223-227.
- Tišler, T., Jemec, A., Mozetič, B., & Trebše, P. (2009). Hazard identification of imidacloprid to aquatic environment. *Chemosphere*, 76(7), 907-914.
- Tomizawa, M., & Casida, J.E. (2005). Neonicotinoid insecticide toxicology: Mechanisms of selective action. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45, 247-268.
- Tomizawa, M., & Casida, J.E. (2003). Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. *Annual Review of Entomology*, 48, 339-364.
- Tuzimski, T. (2008). Determination of pesticides in water samples from the Wieprz-Krzna Canal in the Łęczyńsko-Włodawskie lake district of Southeastern Poland by thin-layer chromatography with diode array scanning and high-performance column liquid chromatography with diode array detection. *Journal of AOAC International*, 91(5), 1203-1209.

United Nations, 2015. World Population Prospects, Department of Economic and Social Affairs, Population Division, The 2015 Revision, Key findings & advance tables. Preuzeto 17.03.2017, sa [https://esa.un.org/unpd/wpp/publications/files/key\\_findings\\_wpp\\_2015.pdf](https://esa.un.org/unpd/wpp/publications/files/key_findings_wpp_2015.pdf)

Valentin, J.F.A., Altuna, A.G., Diez-Caballero, R.J.B., & Garcia, A.A. (1989). Study of the conditions for the determination of metamidon by differential pulse polarography. *Fresenius Zeitschrift für analytische Chemie*, 333(3), 218-220.

Van Dijk, T.C., Van Staalduinen, M.A., & Van der Sluijs, J.P. (2013). Macro-invertebrate decline in surface water polluted with imidacloprid. *PloS One*, 8(5), 1-10.

Vassilakis, I., Tsipi, D., & Scoullou, M. (1998). Determination of a variety of chemical classes of pesticides in surface and ground waters by off-line solid-phase extraction, gas chromatography with electron-capture and nitrogen-phosphorus detection, and high-performance liquid chromatography with postcolumn derivatization and fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 823(1-2), 49-58.

Vilchez, J.L., Valencia, M.C., Navalón, A., Molinero-Morales, B., & Capitán-Vallvey, L.F. (2001). Flow injection analysis of the insecticide imidacloprid in water samples with photochemically induced fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta*, 439(2), 299-305.

Vilchez, J.L., El-Khattabi, R., Blanc, R., & Navalón, A. (1998). Photochemical-fluorimetric method for the determination of the insecticide imidacloprid in water samples. *Analytica Chimica Acta*, 371(2-3), 247-253.

Vilchez, J.L., El-Khattabi, R., Fernández, J., González-Casado, A., & Navalón, A. (1996). Determination of imidacloprid in water and soil samples by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 746, 289-294.

Vischetti, C., Marucchini, C., Casucci, C., Leita, L., & Porzi, G. (1999). Transformation of metamidon in a sandy clay loam soil. *Agronomie*, 19(6), 477-481.

Vitali, P., Venturini, E., Bonora, C., Calori, R., & Raffaelli, R. (1994). Determination of triazines and dinitroanilines in waters by high-performance liquid chromatography after solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A*, 660, 219-222.

Vyskočil, V., & Barek, J. (2009). Mercury electrodes-possibilities and limitations in environmental electroanalysis. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 39(3), 173-188.

- Wang, S., Miltner, A., & Nowak, K.M. (2017). Identification of degradation routes of metamitron in soil microcosms using  $^{13}\text{C}$ -isotope labeling. *Environmental Pollution*, 220, 927-935.
- Wang, R., Wang, Z., Yang, H., & Deng, A. (2012). Highly sensitive and specific detection of neonicotinoid insecticide imidacloprid in environmental and food samples by a polyclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(6), 1253-1260.
- Wang, J. (2006). *Analytical Electrochemistry* (3. izd.). New Jersey: A John Wiley & Sons.
- Wang, J., & Lin, M.S. (1988). In situ electrochemical renewal of glassy carbon electrodes. *Analytical Chemistry*, 60(5), 499-502.
- Watts, D.W., Novak, J.M., & Pfeiffer, R.L. (1997). Evaluation of an ELISA kit for the detection of metribuzin in stream water. *Environment Science and Technology*, 31(4), 1116-1119.
- WHO (2009). The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification. Preuzeto 30.03.2017, sa [http://www.who.int/ipcs/publications/pesticides\\_hazard\\_2009.pdf?ua=1](http://www.who.int/ipcs/publications/pesticides_hazard_2009.pdf?ua=1).
- WHO (2008). Iron in Drinking Water, Background Document for Development of WHO Guidelines for Drinking-Water Quality, vol. 2, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2nd edition, 1996. Preuzeto 13.06.2016, sa [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/chemicals/iron.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/iron.pdf).
- Ying, G.G., & Kookana, R.S. (2004). Simultaneous determination of imidacloprid, thiacloprid, and thiamethoxam in soil and water by high-performance liquid chromatography with diode-array detection. *Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes B*, 39(5-6), 737-746.
- Zgomba, M. (2014). *Insekticidi u zaštiti bilja*. Novi Sad: Poljoprivredni fakultet. Preuzeto 11.03.2017, sa <http://www.agroekologija.com/agri-conto-cleen/wp-content/uploads/2014/10/Insekticidi-u-zastiti-bilja.pdf>.