

# Mikrovalno potpomognuta ekstrakcija benzoilcikloheksanonskih i benzoilpirazolnog herbicida iz poljoprivrednog tla

---

Milaković, Milena

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:510058>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-03**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





MILENA MILAKOVIĆ

**MIKROVALNO POTPOMOĞNUTA  
EKSTRAKCIJA  
BENZOILCIKLOHEKSANONSKIH I  
BENZOILPIRAZOLNOG HERBICIDA IZ  
POLJOPRIVREDNOG TLA**

**Diplomski rad**

predložen Kemijskom odsjeku  
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu  
radi stjecanja akademskog stupnja  
magistre edukacije biologije i kemije

Zagreb

2016.

Ovaj diplomski rad izrađen je u  
Jedinici za biokemiju i organsku analitičku kemiju  
Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada  
pod vodstvom dr. sc. Sanje Stipičević, zn. sur.  
(nastavnik: izv. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić,  
Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet)

Metodički dio izrađen je u  
Zavodu za opću i anorgansku kemiju Kemijskog odsjeka  
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta  
Sveučilišta u Zagrebu  
pod vodstvom doc. dr. sc. Nenada Judaša.

Posebna zahvala mentorici dr. sc. Sanji Stipičević na ukazanom povjerenju i razumijevanju te na stručnoj i predanoj pomoći prilikom izrade ovog rada. Najljepše zahvaljujem na strpljenju, brizi, danim savjetima te na riječima ohrabrenja u trenucima u kojima je to bilo i više nego potrebno.

Također, zahvaljujem svim djelatnicima Jedinice za biokemiju i organsku analitičku kemiju na pruženoj pomoći i ugodnoj suradnji prilikom izrade ovog rada.

Srdačno zahvaljujem mentoru doc. dr. sc. Nenadu Judašu na stručnoj i predanoj pomoći prilikom izrade metodičkog dijela diplomskog rada. Hvala Vam što ste mi omogućili da upoznam novi svijet kemije i što ste mi u svakoj situaciji pomagali da napredujem i postanem bolja...

Izv. prof. dr. sc. Ivi Juranović Cindrić od srca zahvaljujem na pomoći i zanimanju koje je iskazala za ovaj rad te na susretljivosti i savjetima koji su mi pomogli prilikom dovršavanja ovog rada.

Najveća zahvala mojoj obitelji na pruženoj podršci i iskazanom razumijevanju tijekom mojih studentskih dana. Posebna zahvala mojim roditeljima koji su mi omogućili da budem tu gdje jesam, koji su mi uvijek pružali ljubav, podršku i potrebnu utjehu. Hvala Vam što ste bili moja motivacija, što ste vjerovali u mene te uvijek bili uz mene...

Od srca zahvaljujem svojim prijateljima koji su bili dio mojih studentskih dana i sa mnom proživjeli sve uspone i padove. Manje lijepe dane su uljepšali, a one lijepe učinili još ljepšima.

*„Kad poželiš odustati, sjeti se razloga zbog kojeg si izdržao tako dugo...“*

nepoznat autor

**Ovaj rad omogućen je sredstvima iz projekta Hrvatske zaklade za znanost "Organska zagađivala u okolišu - markeri i biomarkeri toksičnosti (OPENTOX) (br. 8366).**

## Sadržaj

<b>SAŽETAK .....</b>	<b>VI</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>VII</b>
<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2. LITERATURNI PREGLED .....</b>	<b>5</b>
2.1. Herbicidi za suvremenu zaštitu bilja .....	6
2.1.1. Benzoilcikloheksanonski herbicidi (triketoni) .....	6
2.1.2. Benzoilpirazolni herbicidi (pirazoloni) .....	8
2.1.3. Mehanizam herbicidnog djelovanja .....	9
2.2. Svojstva tembotriona, topramezona, mezotriona i njegovih razgradnih produkata.....	12
2.3. Sudbina herbicida u okolišu .....	14
2.3.1. Zadržavanje herbicida u tlu .....	15
2.3.2. Razgradnja herbicida u okolišu .....	17
2.3.3. Pokretljivost herbicida u tlu .....	19
2.4. Toksikološka svojstva mezotriona, tembotriona i topramezona .....	20
2.5. Analiza herbicida u tlu .....	22
2.5.1. Metode ekstrakcije herbicida iz tla.....	22
2.5.2. Metode završne analize u ekstraktu tla.....	24
2.6. Validacija analitičke metode .....	26
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>29</b>
3.1. Kemikalije .....	30
3.2. Instrumenti i pribor .....	31
3.2.1. Radni uvjeti tekućinske kromatografije .....	32
3.3. Priprava otopina .....	32
3.3.1. Izvorne otopine.....	32
3.3.2. Kalibracijske otopine pripravljene u vodi .....	33
3.3.3. Otopina za pripremu uzoraka tla s dodatkom analita .....	33
3.4. Uzorci tla.....	34
3.4.1. Priprava uzoraka tla.....	35
3.4.2. Mikrovalno potpomognuta ekstrakcija spojeva iz tla.....	36
3.4.3. Kalibracijske otopine pripravljene u ekstraktu tla.....	36

<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>38</b>
4.1. Tekućinskokromatografska analiza topamezona, tembotriona, mezotriona i njegovih razgradnih produkata u ekstraktu tla .....	39
4.2. Optimiranje uvjeta mikrovalno potpomognute ekstrakcije topamezona, tembotriona, mezotriona i njegovih razgradnih produkata iz tla .....	43
4.2.1. Izbor otapala i optimiranje volumena otapala .....	44
4.2.2. Optimiranje temperature ekstrakcije i vremena zagrijavanja .....	48
4.3. Otapanje suhog ekstrakta tla prije završne analize.....	51
4.4. Utjecaj masenog udjela spojeva u tlu na djelotvornost mikrovalno potpomognute ekstrakcije .....	52
4.5. Utjecaj svojstava tla na djelotvornost mikrovalno potpomognute ekstrakcije.....	54
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>58</b>
<b>6. METODIČKI DIO.....</b>	<b>61</b>
6.1. Metode razdvajanja smjesa .....	62
6.2. Ekstrakcija i zakon razdjeljenja .....	63
6.2.1. Utjecaj svojstava otapala na ekstrakciju.....	65
6.2.2. Utjecaj svojstava tvari na ekstrakciju .....	66
6.3. Izvođenje postupka ekstrakcije .....	68
6.4. Ekstrakcija u svakodnevnom životu.....	70
6.5. Pojam ekstrakcije u osnovnoškolskim i srednjoškolskim nastavnim programima iz kemije .....	71
6.6. Objašnjenje nastavnog sata .....	74
6.7. Temeljni podatci o nastavnom satu .....	76
<b>7. LITERATURA.....</b>	<b>78</b>
<b>PRILOZI.....</b>	<b>VIII</b>
<b>ŽIVOTOPIS</b>	

## SAŽETAK

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Kemijski odsjek

Diplomski rad

**MIKROVALNO POTPOMOGNUTA EKSTRAKCIJA  
BENZOILCIKLOHEKSANONSKIH I BENZOILPIRAZOLNOG HERBICIDA  
IZ POLJOPRIVREDNOG TLA**

MILENA MILAKOVIĆ

Zavod za analitičku kemiju  
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu  
Horvatovac 102 A, 10 000 Zagreb

Istraženi su uvjeti mikrovalno potpomognute ekstrakcije benzoilpirazolnog herbicida topramezona i benzoilcikloheksanonskih herbicida tembotriona i mezotriona, kao i dva razgradna produkta mezotriona (2-amino-(4-metilsulfonyl)benzojeva kiselina, AMBA i 4-metilsulfonyl-2-nitrobenzojeva kiselina, MNBA) iz poljoprivrednog tla (udio organskog ugljika 0,9 %; pH = 7,3). Masene koncentracije spojeva u ekstraktu tla određene su tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti uz UV detektor s nizom dioda i kalibraciju vanjskim standardima pripremljenim u deioniziranoj vodi. Topramezon, tembotrion, mezotrion i MNBA djelotvorno su ekstrahirani iz suhog tla smjesom otapala  $\psi$  (metanol, 0,1 mol L<sup>-1</sup> klorovodična kiselina) = 9 : 1 pri 60 °C tijekom 5 min uz magnetno miješanje suspenzije tla i otapala u omjeru 1 : 6. Analitički povrat spojeva dodanih u tlo u masenim udjelima od 97 do 204 ng g<sup>-1</sup> bio je u rasponu od 80 % za mezotrion i MNBA do 94 % za topramezon, uz relativno standardno odstupanje do 11 %. Granica detekcije svih spojeva bila je 5 ng g<sup>-1</sup>. Predložena metoda nije prikladna za ekstrakciju AMBA iz tla. Analitički povrat svih spojeva iz kiselog tla (pH = 5,4) bio je manji od 50 %, vjerojatno kao rezultat jače sorpcije ili hidrolize neutralnih molekula herbicida u tlu. Zbog smanjene selektivnosti i preciznosti, povrat određivanja herbicida u tlu s 2,9 % udjela organskog ugljika iznosio je približno 60 %. Djelotvornost ekstrakcije herbicida iz vlažnog tla bila je u rasponu od 60 do 67 %, dok je povrat MNBA bio 95 %. Predloženi postupak ekstrakcije optimiran je za kvantitativnu analizu topramezona, tembotriona, mezotriona i MNBA u neutralnom, slabo humusnom i suhom tlu, dok bi se njihova analiza u neutralnom, humusnom i vlažnom tlu trebala provesti uz kalibraciju unutarnjim standardom ili vanjskim standardima pripremljenim u ekstraktu matrice.

U metodičkom dijelu diplomskog rada dan je pregled nastavnih sadržaja koji se bave metodama razdvajanja smjesa u osnovnoškolskom i srednjoškolskom (gimnazijskom) nastavnom programu. Uz to je dan prijedlog srednjoškolskog nastavnog sata koji se temelji na nastavnoj strategiji učenja otkrivanjem na temu ekstrakcije i kemijske ravnoteže, a uz njega je dan i kratki metodički komentar.

(85 + XIV stranica, 14 slika, 24 tablice, 68 literaturnih navoda, izvornik na hrvatskom jeziku)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102 A, Zagreb.

**Ključne riječi:** ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima / mezotrion / tekućinska kromatografija / tembotrion / tlo / topramezon

**Mentori:** dr. sc. Sanja Stipičević, zn. sur., IMI  
doc. dr. sc. Nenad Judaš, PMF

**Ocjenjivači:** izv. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić, PMF  
doc. dr. sc. Nenad Judaš, PMF  
doc. dr. sc. Jasna Lajtner, PMF  
izv. prof. dr. sc. Željka Soldin, PMF

**Zamjena:** izv. prof. dr. sc. Perica Mustafić, PMF

**Rad prihvaćen:** 8. srpnja 2016.



## ABSTRACT

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Chemistry

Diploma Thesis

**MICROWAVE-ASSISTED EXTRACTION OF BENZOYL CYCLOHEXANONE  
AND BENZOYL PYRAZOLE HERBICIDES FROM AGRICULTURAL SOIL**

MILENA MILAKOVIĆ

Laboratory of Analytical Chemistry  
Faculty of Science, University of Zagreb  
Horvatovac 102 A, 10 000 Zagreb

The factors that affect the microwave-assisted extraction of the benzoylpyrazole herbicide topramezone and the benzoylcyclohexanone herbicides tembotrione and mesotrione, as well as two mesotrione degradation products (2-amino-4-methylsulfonyl-benzoic acid, AMBA and 4-methylsulfonyl-2-nitrobenzoic acid, MNBA) from agricultural soil (organic carbon content 0.9 %; pH = 7.3) were investigated. The mass concentrations of compounds in soil extracts were determined by high-performance liquid chromatography coupled with an UV diode array detector and calibration with external standards prepared in deionised water. Topramezone, tembotrione, mesotrione and MNBA were efficiently extracted from dry soil with solvent mixture  $\psi$  (methanol, 0.1 mol L<sup>-1</sup> hydrochloric acid) = 9 : 1 at 60 °C for 5 min with magnetic stirring of suspension at 1 : 6 of soil-to-solvent ratio. The analytical recovery from soil fortified with analytes at mass fractions ranging from 97 to 204 ng g<sup>-1</sup> was between 80 % for mesotrione and MNBA and 94 % for topramezone, with a relative standard deviation under 11 %. The limit of detection for all of the analytes was 5 ng g<sup>-1</sup>. The proposed method is not suitable for the extraction of AMBA from soil. The analytical recovery of all of the compounds from acidic soil (pH = 5.4) was under 50 %, probably as a result of a higher sorption or a higher hydrolysis of neutral herbicide molecules in soil. Reduced selectivity and precision of herbicide determination in soil with 2.9 % of organic carbon content resulted in nearly 60 % of their analytical recoveries. The extraction efficiency of herbicides from wet soil ranged from 60 to 67 %, while MNBA recovery was 95 %. The proposed extraction procedure was optimised for quantitative analysis of topramezone, tembotrione, mesotrione and MNBA in neutral, low humic and dry soil, whereas their analysis in neutral, humic and wet soil should be performed using either internal standard or matrix-matched external standard calibration.

The analysis of the elementary and high school chemistry syllabuses with respect to the separation methods of mixtures is given in the methodical part of the diploma thesis. Also, an high school chemistry lesson that deals with extraction and chemical balance and is based on guided inquiry learning strategy was designed and commented in details.

(85 + XIV pages, 14 figures, 24 tables, 68 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemistry Library, Horvatovac 102 A, Zagreb.

**Keywords:** liquid chromatography / mesotrione / microwave-assisted extraction / soil / tembotrione / topramezone

**Supervisors:** Dr. sc. Sanja Stipičević, Res. Assoc., IMI  
Dr. sc. Nenad Judaš, Asst. Prof., PMF

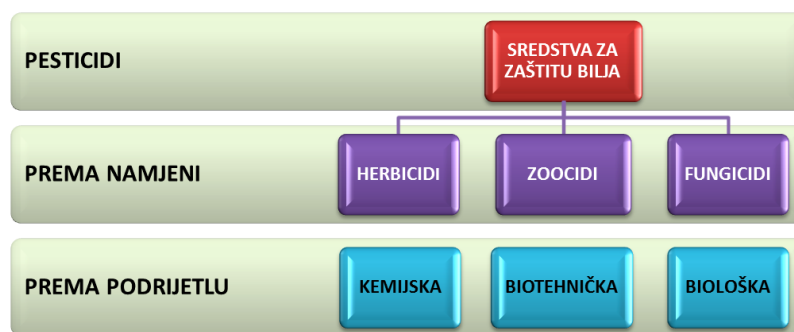
**Reviewers:** Dr. sc. Iva Juranović Cindrić, Assoc. Prof., PMF  
Dr. sc. Nenad Judaš, Asst. Prof., PMF  
Dr. sc. Jasna Lajtner, Asst. Prof., PMF  
Dr. sc. Željka Soldin, Assoc. Prof., PMF

**Replacement:** Dr. sc. Perica Mustafić, Assoc. Prof., PMF

**Thesis accepted:** 8<sup>th</sup> July 2016

# ***1. Uvod***

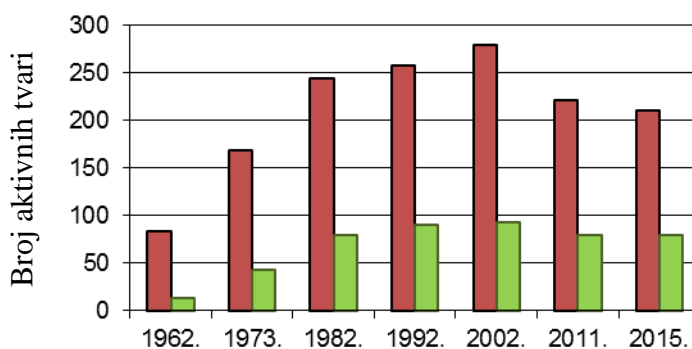
Suvremena poljoprivreda zauzima veliku teritorijalnu površinu i proizvodi velike količine hrane te je još uvijek nezamisliva bez primjene pesticida. Ova velika skupina tvari objedinjuje različita sredstva za suzbijanje štetnih organizama (štetnika, uzročnika bolesti i korova), među kojima najvažniju ulogu u poljoprivredi imaju sredstva za zaštitu bilja. Bez provođenja mjera zaštite kulture prinos u proizvodnji može biti prepolovljen, dok se uz organiziranu i pravilnu zaštitu gubi do četvrtine uroda.<sup>1</sup> Sredstva za zaštitu bilja su pripravci koji, uz razne pomoćne tvari, sadrže određeni udio aktivne tvari (kemijskog spoja ili mikroorganizma) ili više njih s različitim mehanizmom djelovanja na ciljne organizme i različitom sudbinom njihovih ostataka u okolišu (Slika 1). Većina (približno 98 %) sredstava za zaštitu bilja su kemijskog podrijetla.



**Slika 1.** Podjela sredstava za zaštitu bilja prema namjeni i podrijetlu, odnosno načinu djelovanja<sup>2</sup>

Do danas je u svijetu sintetizirano na tisuće molekula koje pokazuju opće ili selektivno biocidno djelovanje. Njihova registracija za primjenu u zaštiti bilja usklađuje se s rezultatima znanstvenih istraživanja i toksikoloških ocjena.<sup>3</sup> Desetljećima duga uporaba kemijskih sredstava za zaštitu bilja uzrokovala je i brojne, neočekivane probleme širom svijeta. Iako ostatke kemikalija za zaštitu bilja očekujemo najviše u hrani biljnog podrijetla, zapaženo je da se neke aktivne tvari i njihovi razgradni produkti u okolišu zadržavaju još dugo nakon primjene te da vrlo lako dospijevaju u hranidbeni lanac ekosustava, narušavajući njegovu prirodnu ravnotežu. Porast broja malignih i kroničnih oboljenja ljudi nerijetko se dovodi u vezu s profesionalnom izloženošću kemijskim agensima, a sve češće i s dugoročnom izloženošću niskim razinama

onečišćenja u hrani i vodi za piće. Dodatno, intenzivna primjena iste aktivne tvari za zaštitu istih vrsta kultura, posebice uz izostanak plodosmjene, izaziva razvoj otpornosti ciljnih korovnih vrsta, kao rezultat prirodne prilagodbe biljke uvjetima u okolišu. Stoga se u posljednjih desetak godina u svijetu nastoji provoditi sustav integrirane zaštite bilja, koji koristi sve raspoložive mjere sprječavanja gospodarske štete od nametnika, uz najmanje moguće onečišćenje proizvoda i okoliša.<sup>4</sup> Uz odgovarajuće agrotehničke mjere, ove mjere se odnose na racionalnu procjenu izbora kemikalije, kao i na vrijeme, način i količinu njezine primjene. Ujedno, kemijska industrija pesticida istražuje i sintetizira nove molekule, čije će ponašanje u okolišu biti prihvatljivo i koje će učinkovito djelovati na ciljne skupine organizama, otporne na djelovanje molekula iz prethodne primjene. Kao posljedica nakupljanja ostataka kemikalija u okolišu i njihovog negativnog utjecaja na zdravlje ljudi, u posljednjih petnaestak godina mnoge aktivne tvari registrirane za zaštitu bilja su povučene iz primjene (Slika 2). Međutim, primjena herbicida u zaštiti ratarskih kultura i dalje je aktualna, budući da ratarske kulture zauzimaju veliku površinu obradive zemlje pa samim time i udjel potrošnje herbicida zauzima gotovo polovicu ukupne potrošnje sredstava za zaštitu bilja.<sup>5</sup>



**Slika 2.** Pregled kretanja broja aktivnih tvari iz skupine sredstava za zaštitu bilja i podskupine herbicida registriranih za primjenu u Republici Hrvatskoj unatrag pola stoljeća<sup>6-8</sup>

U Hrvatskoj je trenutno registrirano 210 aktivnih tvari za zaštitu bilja, odnosno 462 pripravka, među kojima je 43,5 % herbicidnih pripravaka s glavnom primjenom u poljoprivredi, a gotovo polovica njih koristi se u zaštiti kukuruza.<sup>9</sup> Herbicidnu skupinu kemijskih spojeva čini velik broj molekula različite strukture, koja utječe na njihova fizičko-kemijska svojstva. Osim toga, herbicidi se razlikuju prema mehanizmu

djelovanja na ciljne organizme i vremenu primjene.<sup>2,10</sup> Najnovija klasifikacija svrstava sve strukturno definirane aktivne tvari u 119 kemijskih skupina, unutar kojih je poznato 15 načina herbicidnog djelovanja na osjetljive organizme.<sup>11</sup> Za zaštitu kukuruza, donedavno su se najviše primjenjivali relativno postojani zemljišni herbicidi iz skupina kloracetamida (acetoklor, s-metolaklor) i triazina (atrazin, simazin, terbutilazin). Kao posljedica učestale primjene navedenih skupina herbicida direktno na zemlju prije nicanja kulture i korova, njihovi ostatci često su detektirani u vodama okoliša.<sup>12-14</sup> Danas je većina ovih spojeva zamijenjena visoko selektivnim folijarnim herbicidima (primjena nakon nicanja kulture i korova), koji zbog drugačijeg mehanizma djelovanja postižu učinkovitost zaštite usjeva pri reduciranim dozama primjene. Među ove herbicide ubrajaju se spojevi iz kemijskih skupina benzoilcikloheksanona (triketona) i benzoilpirazola (pirazolona).<sup>15,16</sup> Zbog niskih doza primjene ovi spojevi nisu toliko značajni s gledišta utrošenih količina, već se potencijalni rizik njihove primjene nazire iz udjela u ukupno tretiranoj površini obradive zemlje, koji je rezultat njihove primjene za zaštitu gospodarski najznačajnije ratarske kulture - kukuruza.<sup>5</sup> O ponašanju nedavno uvedenih herbicida u okoliš, kao i analitičkim metodama njihove analize u tlu, još uvijek nema dovoljno podataka.

Svrha ovog rada bila je razraditi i validirati analitičku metodu za određivanje dva benzoilcikloheksanonska herbicida (tembotriona i mezotriona te njegova dva produkta razgradnje) i jednog benzoilpirazolnog herbicida (topramezona) u tlu, koja uključuje mikrovalno potpomognutu ekstrakciju spojeva iz poljoprivrednog tla, primjenjivu za praćenje ostataka navedenih spojeva u polju kukuruza. Tijekom istraživanja optimirani su uvjeti mikrovalno potpomognute ekstrakcije spojeva iz suhog tla (izbor i volumen otapala, temperatura ekstrakcije i vrijeme zagrijavanja) i uvjeti završne analize ekstrakta tekućinskom kromatografijom uz UV detektor s nizom dioda. Uz optimirane uvjete analize istražena je ovisnost djelotvornosti ekstrakcije potpomognute mikrovalovima o pH vrijednosti tla te udjelu organskog ugljika, prisutnosti vlage i masenom udjelu spojeva u tlu.

## ***2. Literaturni pregled***

## 2.1. Herbicidi za suvremenu zaštitu kukuruza

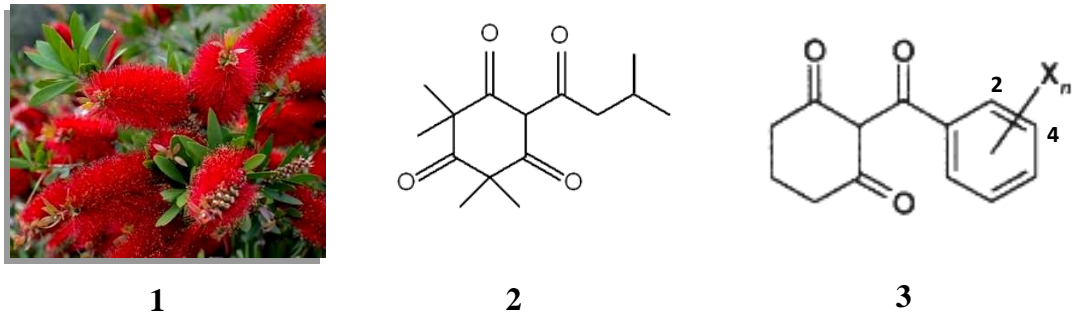
Glavni cilj istraživanja novih molekula herbicida je otkriti ili sintetizirati produkte koji će kontrolirati rast što većeg spektra korovnih vrsta, uz primjenu što manjih doza prije ili poslije nicanja kulture i korova. Dodatno, takvi herbicidi trebaju biti selektivni prema kultiviranom usjevu i neškodljivi za okoliš i krajnjeg korisnika. Mehanizam herbicidnog djelovanja ovisi o kemijskoj strukturi molekule, a posebno o njezinim supstituentima, stoga se cijela strategija proizvodnje novih herbicida zasniva na ciljanim kemijskim preinakama glavne kemijske skupine. Dugogodišnja istraživanja poljoprivredno-kemijske industrije pokazala su da molekule na benzoilcikloheksanonskoj i benzoilpirazolnoj osnovi dobro ispunjavaju sve navedene zahtjeve.<sup>15</sup> Iako strukturno različite, molekule ovih dviju skupina pokazuju isti mehanizam djelovanja na osjetljive biljne organizme (korove), s malim razlikama u širini spektra djelovanja. Njihova komercijalna primjena diljem svijeta započela je početkom 21. stoljeća, pred kraj primjene širokoprimjenjivanog zemljišnog triazinskog herbicida atrazina.

### 2.1.1. Benzoilcikloheksanonski herbicidi (triketoni)

Povijest otkrića benzoilcikloheksanonskih herbicida seže u 1977. godinu, kada je znanstvenik Reed Gray uočio da ispod biljke *Callistemon citrinus*\* raste manje korova nego u okolnom području.<sup>15</sup> Nakon ovog zapažanja, Gray je metodom tankoslojne kromatografije iz ekstrakta ove biljke izdvojio fitotoksičnu tvar acil sinkarpičnu kiselinu, tj. leptospermon (2,2,4,4-tetrametil-6-(3-metilbutanoil)cikloheksan-1,3,5-trion) (Slika 3). Daljnja istraživanja pokazala su da je za učinkovito suzbijanje korovnih vrsta potrebna komercijalno neprihvatljiva doza leptospermona (9 000 grama po hektaru) te je tako započeo program sinteze analognih spojeva. Desetak godina kasnije, patentiran je prvi učinkovit herbicid iz skupine benzoilcikloheksanona (Slika 3). U kemijskoj strukturi benzoilcikloheksanonskih herbicida dominiraju tri keto skupine po kojoj je cijela skupina dobila trivijalno ime  $\beta$ -triketoni.

---

\* *Callistemon citrinus* je biljna vrsta iz porodice *Myrtaceae* podrijetlom iz Australije, rasprostranjena diljem svijeta u zemljama umjerene klime. Zbog cvijeta u obliku četke za bocu, u Hrvatskoj je poznata pod imenom *Četkovac* i najčešće se uzgaja kao ukrasna biljka.



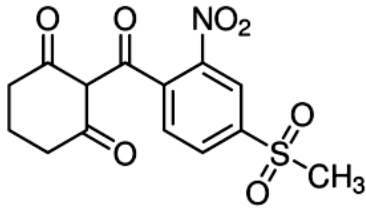
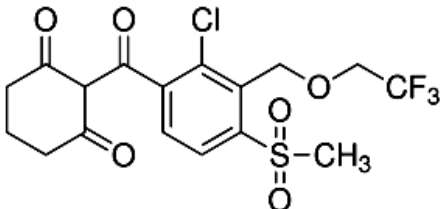
**Slika 3.** Struktura prirodnog fitotoksina leptospermona (2), izoliranog iz biljke *Callistemon citrinus* (1), i benzoilcikloheksanonska struktura analogno izvedenih herbicida, X<sub>n</sub> = benzoilni supstituenti (3)

Herbicidna aktivnost najviše ovisi o supstituentu na položaju C-2 benzoilne skupine (nitro- ili kloridna skupina), dok kisela svojstva molekule proizlaze iz supstituenta na položaju C-4 (metansulfonilna skupina).<sup>17</sup> Supstituenti na cikloheksanonskoj jezgri pridonijeli bi povećanju herbicidnih svojstava, ali bi se time smanjila selektivnost prema kukuruzu i povećala postojanost u okolišu.

Triketonski spojevi su herbicidi namijenjeni suzbijanju većine jednogodišnjih širokolisnih i manjeg broja uskolisnih korova u različitim usjevima, a najčešće u kukuruzu.<sup>8</sup> Mogu se primjenjivati kao zemljišni herbicidi prije nicanja usjeva i korova te kao folijarni herbicidi u ranoj fazi nicanja usjeva i korova (2 – 6 listova). Doze primjene u zaštiti kukuruza (*Zea mays* L.) su deset puta niže od doza konvencionalnih herbicida, primjerice triazina, i kreću se u rasponu 100 – 250 g ha<sup>-1</sup> pri zemljišnoj primjeni i 70 – 150 g ha<sup>-1</sup> pri folijarnoj primjeni.<sup>17,18</sup> Iako je soja (*Glycine max* L. Merr.) izuzetno osjetljiva već na dozu od 4 g ha<sup>-1</sup>, rizik od prijenosa herbicida u plodosmjeni je mali, zbog njegove brze razgradnje u tlu. Najčešće primjenjivani herbicidi iz ove kemijske skupine su sulkotrion (registriran 1991.), mezotrion (registriran 2001.) i tembotrion (registriran 2007.). U Hrvatskoj se trenutno koristi 20 pripravaka na osnovi mezotriona i tembotriona, a zbog proširenja spektra djelovanja često se koriste i njihove kombinacije s drugim herbicidima, najčešće s triazinima, sulfonilurejama i kloracetamidima.<sup>19-21</sup> Kemijski nazivi i strukture mezotriona i tembotriona prikazane su u Tablici 1.



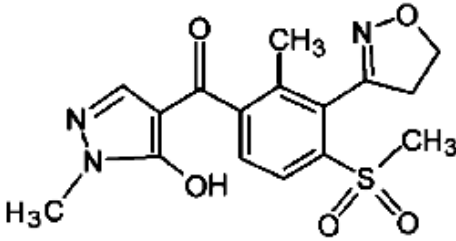
**Tablica 1.** Kemijske strukture, kemijske formule i IUPAC nazivi mezotriona i tembotriona

	Mezotrion	Tembotrion
IUPAC naziv	2-(4-metil-2-nitrobenzoil)cikloheksan-1,3-dion	2-{kloro-4-metil-3-[2,2,2-trifluoroetoksi]metil]benzoil} cikloheksan-1,3-dion
Kemijska formula	$C_{14}H_{13}NO_7S$	$C_{17}H_{16}ClF_3O_6S$
Kemijska struktura		

### 2.1.2. Benzoilpirazolni herbicidi (pirazoloni)

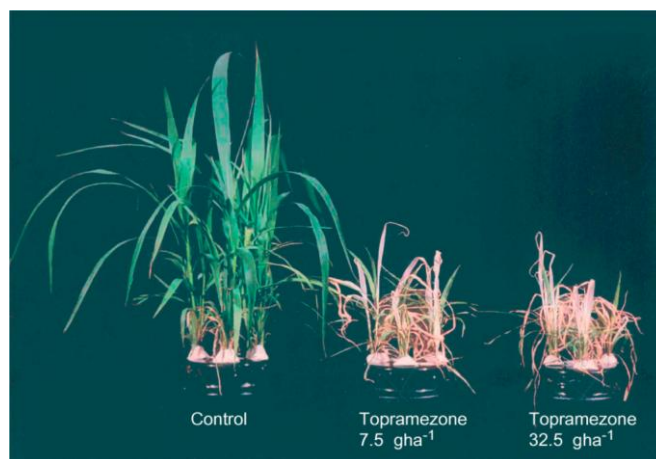
Topramezon je prvi komercijalni herbicid koji pripada kemijskoj skupini benzoilpirazola (pirazolona), spojeva s istim mehanizmom herbicidnog djelovanja poput triketona (Tablica 2).<sup>22,23</sup> Od 2006. godine registriran je za folijarnu primjenu u zaštiti svih sorti i namjena kukuruza (merkantilni, sjemenski, silažni, šećerac, kokičar i dr.). Zahvaljujući pirazolnom prstenu, topramezon ima širi spektar kontrole jednogodišnjih uskolisnih i širokolisnih korova, jače herbicidno djelovanje na osjetljive biljke i niže doze primjene ( $50 - 75 \text{ g ha}^{-1}$ ) od triketona. Iako učinkovitost herbicida ovisi o korovnoj vrsti, brzini translokacije u biljci i njenom metabolizmu, istraživanje o učinkovitosti topamezona primijenjenog pri preporučenoj dozi i višestruko reduciranim dozama pokazuje visoku učinkovitost topamezona i pri dozi za dvije trećine nižoj od preporučene.<sup>24</sup> Selektivnost prema kukuruзу proizlazi iz barem deset puta manje osjetljivosti metabolizma kukuruza (sporije apsorpcije i brže razgradnje topamezona u kulturi) u usporedbi s korovom.<sup>16</sup> Formulacije s topamezonom trenutno se primjenjuju u desetak europskih država, SAD-u i Australiji, dok u Hrvatskoj još nisu registrirane za primjenu.<sup>25</sup>

**Tablica 2.** Kemijska struktura, kemijska formula i IUPAC naziv topramezona

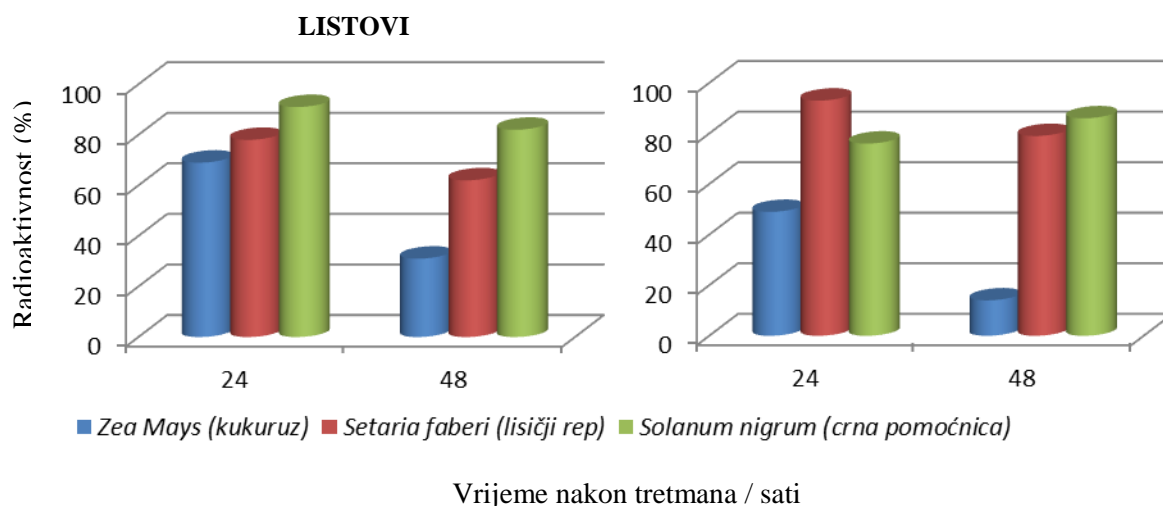
Topramezon	
IUPAC naziv	4-[3-(4,5-dihidro-1,2-oksazol-3-il)-2-metil-4-mesilbenzoil]-5-hidroksi-1-metil-1 <i>H</i> -pirazol
Kemijska formula	C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> S
Kemijska struktura	 <p>The chemical structure of Topramezon is a complex molecule. It features a central benzene ring substituted at the 4-position with a 3-(4,5-dihydro-1,2-oxazol-3-yl)-2-methyl-4-mesylbenzoyl group and at the 5-position with a 4-methyl-5-hydroxy-1-methyl-1H-pyrazol-3-yl group. The mesyl group is represented as a sulfur atom double-bonded to two oxygen atoms and single-bonded to a methyl group. The pyrazole ring has a methyl group on the nitrogen and a hydroxyl group at the 4-position. The oxazole ring is a five-membered heterocycle with one nitrogen and one oxygen atom.</p>

### 2.1.3. Mehanizam herbicidnog djelovanja

Triketonski i pirazolonski herbicidi se prema mehanizmu djelovanja svrstavaju u skupinu inhibitora biosinteze karotenoida.<sup>2</sup> Folijarna apsorpcija aktivne tvari ovisi o biljnoj vrsti te se u osjetljivih biljaka odvija vrlo brzo (55 – 90 % od primijenjene doze tijekom 24 sata).<sup>17,20</sup> Herbicidni učinak očituje se u inhibiciji enzima 4-hidroksifenil piruvat-dioksigenaze (4-HPPD) koji katalizira reakciju konverzije tirozina u plastokinon i  $\alpha$ -tokoferol. Nakupljanje tirozina i manjak plastokinona u biljnim stanicama ometa biosintezu karotenoida, pigmenta čija je najvažnija uloga zaštita klorofila od fotooksidacije. Pod utjecajem fotona dolazi do razaranja klorofila, biljne stanice blijede, biljka zaostaje u rastu i ugiba unutar 14 dana od primjene herbicida (Slika 4). Selektivni učinak zasniva se na različitom stupnju usvajanja, intenzitetu translokacije, metabolizmu i biokemijskom djelovanju herbicida između kulture i korova.<sup>10</sup> Slika 5 prikazuje primjer selektivnog djelovanja topramezona na kukuruz te uskolisni (*Setaria faberi*) i širokolisni korov (*Solanum nigrum*).

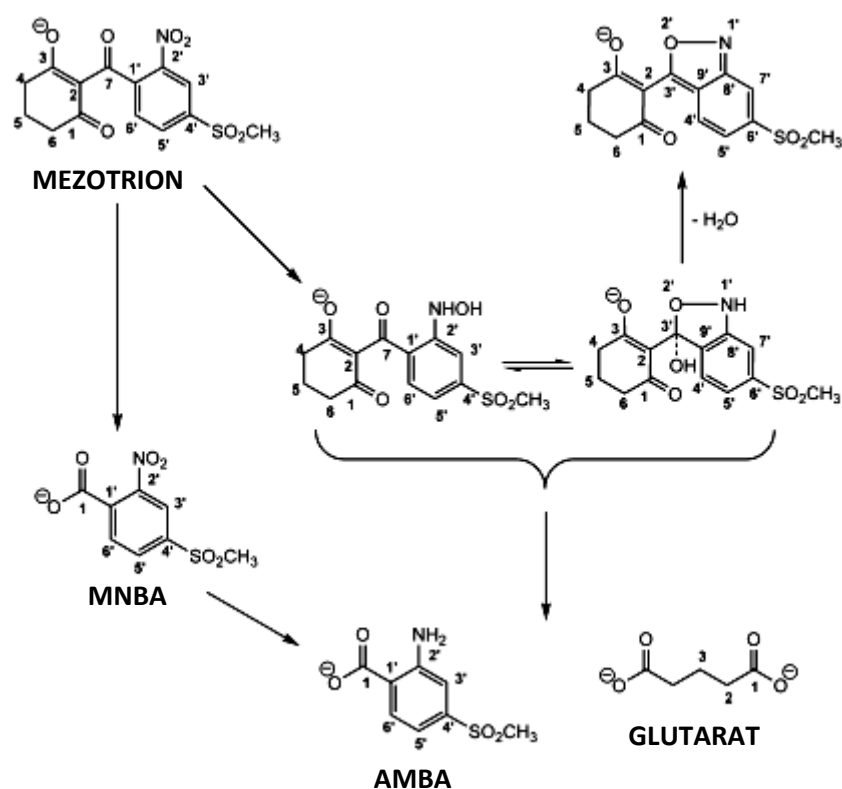


**Slika 4.** Oštećeni listovi uskolisnog korova *Setaria faberi* 11 dana nakon folijarne primjene topramezona (hidroponski uzgoj pod kontroliranim uvjetima)<sup>16</sup>



**Slika 5.** Metabolizam [<sup>14</sup>C]topramezona u listovima i izdancima kukuruza i korova nakon folijarne primjene herbicida pri dozi 75 g ha<sup>-1</sup> <sup>16</sup>

Nakon tretmana s vodenom otopinom herbicida, korovne biljke putem lista, korijena i izdanaka brzo usvajaju i translociraju aktivnu tvar kroz cijelu biljku. Tolerantne biljke (kukuruz) su barem 10 puta manje osjetljive na djelovanje herbicida i uspijevaju ga razgraditi brže od korova. Glavni produkti biorazgradnje mezotriona su derivati benzojeve kiseline, koji nastaju oksidativnim cijepanjem cikloheksandionskog prstena (MNBA) i redukcijom nitro supstituenta benzoilnog prstena preko MNBA ili hidroksilamino derivata u amino supstituent (AMBA) (Slika 6, Tablica 3).<sup>26</sup>

Slika 6. Biorazgradnja mezotriona<sup>26</sup>

**Tablica 3.** Kemijske strukture, kemijske formule i IUPAC nazivi produkata razgradnje mezotriona

	<b>AMBA</b>	<b>MNBA</b>
IUPAC naziv	2-amino-4-metilsulfonil benzojeva kiselina	4-metilsulfonil-2-nitrobenzojeva kiselina
Kemijska formula	$C_8H_9NO_4S$	$C_8H_7NO_6S$
Kemijska struktura		

Tembotrion se u biljkama metabolizira u hidroksilirane produkte i derivate benzojeve kiseline.<sup>27</sup> Produkti metabolizma topramezona nastaju demetilacijom pirazolnog prstena (glavni produkt) i odcjepljenjem pirazolnog prstena od benzoilne strukture (sporedni produkt).<sup>16</sup> Razgradni produkti herbicida obično su herbicidno neaktivni i mogu biti toksičniji od svojih matičnih molekula budući da lako reagiraju s biomolekulama, uključujući DNA.<sup>27,28</sup>

Farmaceutska primjena triketona u liječenju tirozinemije tipa I, Parkinsonove bolesti i drugih neurodegenerativnih bolesti zasniva se na istom mehanizmu djelovanja kao u biljaka (blokada enzima HPPD i prevencija akumuliranja toksina).<sup>15</sup>

## 2.2. Svojstva tembotriona, topramezona, mezotriona i njegovih razgradnih produkata

Različita fizičko-kemijska svojstva spojeva proizlaze iz njihove različite kemijske strukture. Fizičko-kemijska svojstva, u prvom redu topljivost u vodi, hidrofobnost (izražena koeficijentom razdjeljenja u sustavu *n*-oktanol/voda), konstanta ionizacije i tlak para, utječu na ponašanje spojeva u okolišu, njihov metabolizam u biljci, kao i na djelotvornost analitičke metode ekstrakcije i analize spojeva u uzorcima iz okoliša. Važnija fizičko-kemijska svojstva istraživanih herbicida i razgradnih produkata mezotriona prikazana su u Tablici 4.

Analitički čisti herbicidi i razgradni produkti komercijalno su dostupni kao svijetložute krutine.<sup>29,30</sup> Izvorni herbicidi su hidrofilni spojevi ( $\log P < 0,11$ ) zbog čega su pri sobnoj temperaturi i neutralnom pH umjereno (mezotrion) do jako (tembotrion i topramezon) topljivi u vodi. Dobra topljivost u vodi omogućuje lakše usvajanje i translokaciju spojeva u biljkama.<sup>19,20</sup> Iako podatak za topljivost razgradnih produkata mezotriona u vodi nije pronađen u literaturi, nešto viši koeficijenti razdjeljenja metabolita u sustavu *n*-oktanol/voda u odnosu na izvorni spoj upućuju na hidrofobniji karakter AMBA i MNBA te stoga i na slabiju topljivost u vodi od mezotriona. Hlapljivost istraživanih spojeva pri 25 °C pada u nizu mezotrion > tembotrion > topamezon.

**Tablica 4.** Fizičko-kemijska svojstva tembotriona, topramezona, mezotriona i njegovih razgradnih produkata AMBA i MNBA

Spoj	Relativna molekulska masa	$S(\text{H}_2\text{O})^a / \text{mg L}^{-1}$	$\log P^b$	$\text{p}K_a^c$	$p^d / \text{mPa}$
AMBA	215,23	–	0,31	4,24	–
MNBA	245,21	–	0,78	1,51	–
Mezotrion	339,32	160	0,11	3,12	$5,70 \times 10^{-3}$
Tembotrion	440,82	71 000	-1,09	3,18	$1,10 \times 10^{-5}$
Topramezon	363,39	100 000	-1,52	4,06	$1,10 \times 10^{-9}$

<sup>a</sup> topljivost u vodi pri 20 °C<sup>31</sup>

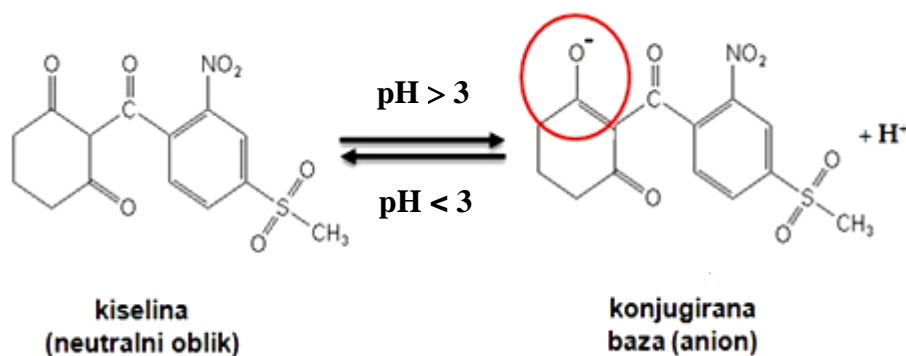
<sup>b</sup> koeficijent razdjeljenja u sustavu *n*-oktanol/voda pri 20 °C i pH 7<sup>27,31</sup>

<sup>c</sup> konstanta ionizacije konjugirane kiseline<sup>27,31</sup>

<sup>d</sup> tlak para pri 25 °C<sup>31</sup>

– podatak nije pronađen u literaturi

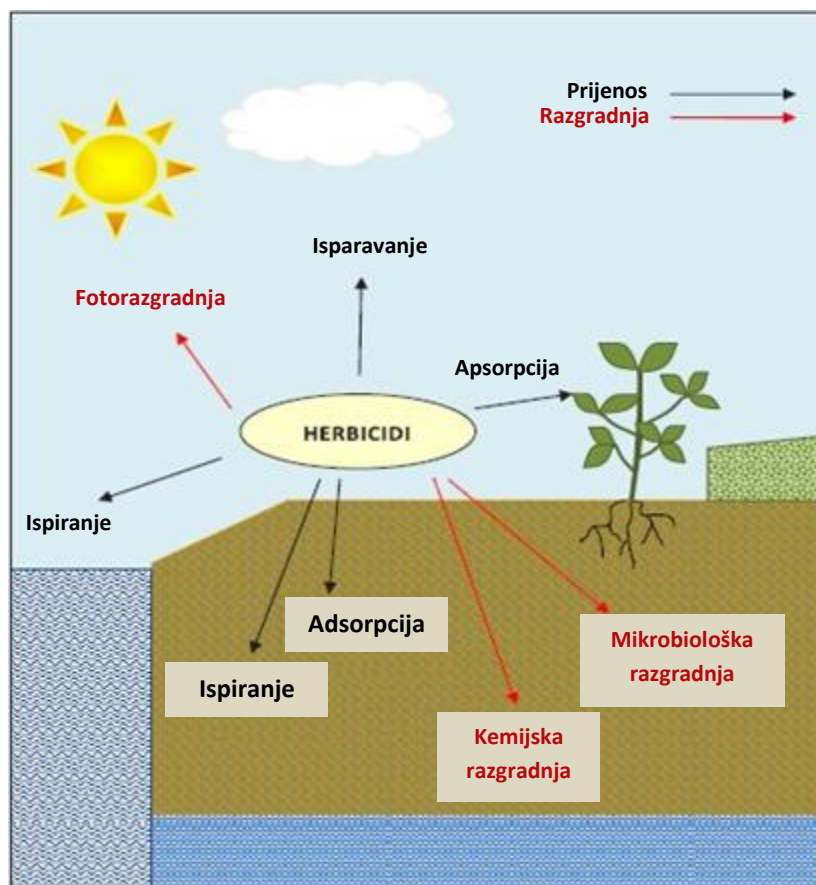
Prisutnost spoja u molekulskom ili ioniziranom obliku ovisi o pH-vrijednosti medija pri kojem se spoj nalazi i bitno utječe na ponašanje spoja u okolišu, kao i na analitičku metodu određivanja spoja. Konstanta disocijacije spoja izražava onu pH-vrijednost pri kojoj polovica količine spoja postoji u neutralnom odnosno ioniziranom obliku. Spojevi istraživani u ovom radu ponašaju se kao slabe kiseline s  $\text{p}K_a$  vrijednostima u rasponu od 1,51 do 4,24. Triketonski herbicidi mezotrion i tembotrion ( $\text{p}K_a \approx 3$ ) su jače kiseline od pirazolnog herbicida topramezona ( $\text{p}K_a \approx 4$ ), što je ujedno razlog njegove bolje topljivosti u vodi. U prirodnim uvjetima okoliša (neutralna vrijednost pH), kao i pri lužnatoj vrijednosti pH, istraživani spojevi prisutni su pretežito u anionskom obliku, dok se zakiseljavanjem sredine ( $\text{pH} < 4$ ) stupanj ionizacije smanjuje uz prevladavanje neutralnog oblika spojeva. Prema Brønsted-Lowryjevoj teoriji, povećanjem pH vrijednosti dolazi do deprotoniranja molekulskog oblika spoja otpuštanjem protona s atoma ugljika u ciklodienskoj strukturi, pri čemu se elektronski par s keto skupine prenosi na atom ugljika u prstenu uz nastajanje C=C veze. Na taj način u neutralnim uvjetima nastaje konjugirana baza (anion) slabe kiseline (Slika 7). Anionski oblik spoja otporniji je prema hidrolitičkoj i fotolitičkoj razgradnji. Razgradni produkt AMBA pokazuje kiselija svojstva, a time vjerojatno i veću topljivost u vodi od razgradnog produkta MNBA, što je rezultat amino skupine vezane na položaju C-2 benzenskog prstena u strukturi AMBA.



**Slika 7.** Disocijacija i protoniranje mezotriona u ovisnosti o pH-vrijednosti medija

### 2.3. Sudbina herbicida u okolišu

Nakon primjene molekule herbicida podliježu utjecaju različitih procesa, kao što su apsorpcija putem dijelova biljke, adsorpcija na organske i mineralne koloide tla, prijenos ispiranjem i isparavanjem te razgradnja (Slika 8).<sup>32</sup> Koji od ovih procesa će u okolišu prevladavati ovisi o fizičko-kemijskim svojstvima herbicida (Tablica 4) i uvjetima u okolišu (sastav tla, učestalost i količina oborina, poljoprivredna praksa, topografija terena, povijest primjene herbicida na određenom području i sl.). Apsorpcija herbicida od strane biljke odvija se putem korijena i lista, a za aktivaciju ovog procesa potrebne su oborine.<sup>10</sup> Gubitak herbicida apsorpcijom biljke uvelike ovisi o načinu i vremenu primjene herbicida. Herbicidi mogu djelovati na biljke selektivno i neselektivno (totalno), pri čemu se selektivnost zasniva na različitom stupnju apsorpcije, translokacije i brzine metabolizma u biljci. Totalni herbicidi uništavaju sve biljke na površini koja se tretira, dok selektivni herbicidi uništavaju samo određene (osjetljive) korovne vrste. Prema aktivnosti herbicidi mogu biti sustavni i kontaktni. Kontaktni herbicidi uništavaju tkiva biljke s kojom dođu u kontakt i zbog toga imaju najbrže djelovanje, dok sustavni herbicidi djeluju putem korijena ili listova tretirane biljke te imaju nešto sporije, ali zato učinkovitije djelovanje. Kod sustavnih selektivnih herbicida aktivna tvar se premješta kroz stanice biljke do mjesta djelovanja, dok kod kontaktnih selektivnih herbicida nema translokacije aktivne tvari, zbog čega dolazi do oštećenja onih dijelova biljke s kojima je djelatna tvar došla u dodir.<sup>25</sup>



Slika 8. Procesi prijenosa i razgradnje herbicida u okolišu<sup>10</sup>

Na sudbinu herbicida u okolišu može se utjecati i načinom obrade polja (oranje, gnojidba, navodnjavanje, plodosmjena), načinom i vremenom tretiranja polja, formulacijom i dozom herbicida. Gubitak triketonskih i pirazolonskih herbicida isparavanjem može se zanemariti zbog niskog tlaka para pri sobnoj temperaturi. Pokretljivost ili prijenos herbicida, od mjesta primjene preko površine tla do površinskih voda i kroz faze tla do slojeva pitke podzemne vode, najviše ovisi o intenzitetu adsorpcije na sastojke tla i brzini razgradnje u tlu i vodi.

### 2.3.1. Zadržavanje herbicida u tlu

Zadržavanje ili adsorpcija je proces vezanja organske tvari iz plinovite ili tekuće faze za površinu čvrste faze. U pravilu, adsorpcija molekula herbicida na čestice tla smanjuje pokretljivost u okolišu i dostupnost molekula herbicida za apsorpciju putem dijelova biljke i za djelovanje mikroorganizama (proces biorazgradnje). Adsorpcija herbicida na čestice tla pozitivno korelira s koeficijentima razdjeljenja herbicida u sustavu *n*-oktanol/voda (hidrofobnošću spoja), a negativno s njihovom



topljivošću u vodi.<sup>32</sup> Molekule herbicida koje su dobro topljive u vodi pokazuju slab potencijal zadržavanja u tlu, odnosno veći potencijal prijenosa kroz strukturu tla. Prema podacima iz Tablice 4, vidljivo je da su istraživani herbicidi hidrofilni spojevi od kojih se, bez obzira na sastav tla, očekuje veća pokretljivost nego intenzitet adsorpcije u tlu.

Na adsorpciju organskih spojeva u tlu utječe sadržaj i sastav organske i mineralne tvari te pH suspenzije tla. Neutralne molekule dulje će se zadržavati u tlu s većim udiom organske tvari s kojom se vežu slabim van der Waalsovima silama. Ukoliko je tlo siromašno organskom tvari, do izražaja će doći i adsorpcija na neutralnu silikatnu površinu minerala, posebice gline. Za razliku od anionskih vrsta, pozitivno nabijeni spojevi jače će se vezati na negativno nabijenu mineralnu podlogu tla uz formiranje ionskih veza.<sup>32</sup> Istraživani herbicidi djeluju kao slabe kiseline, koji su u prirodnim (neutralnim) uvjetima okoliša prisutni u obliku aniona te se ne očekuje njihova značajna adsorpcija u tlu. U kiselim tlima, slabe kiseline su protonirane, tj. prisutne u molekulskom obliku pa im se i intenzitet adsorpcije povećava. Osim o kvalitativnom i kvantitativnom sastavu tla, adsorpcija spojeva ovisi i o temperaturi, ionskoj jakosti vodene faze, koncentraciji spojeva u vodenoj fazi, omjeru mase sorbensa i volumenu sorpcijske otopine te vremenu njihovog kontakta (uspostavljanja ravnoteže).

Intenzitet adsorpcije spoja u nekom čvrstom sorbensu, kao i sorpcijski kapacitet sorbensa, određuju se empirijski u modelnim sorpcijskim pokusima. Za prikaz sorpcijskih rezultata i računanje sorpcijskih parametara najčešće se koristi matematički model Freundlichove izoterme. Vrijednosti Freundlichove konstante,  $K_f$  i konstante normirane prema udjelu organskog ugljika u tlu,  $K_{foc}$ , upućuju na intenzitet adsorpcije spoja pod određenim uvjetima, odnosno intenzitet adsorpcije spoja neovisno o sadržaju organskog ugljika u tlu. Literaturne vrijednosti navedenih konstanti za istraživane herbicide kreću se u rasponu od 0,98 do 1,78 i upućuju na njihovu slabu adsorpciju u tlu (Tablica 5).

**Tablica 5.** Matematički parametri za procjenu ponašanja istraživanih spojeva u okolišu<sup>31</sup>

Spoj	GUS <sup>a</sup>	Razgradnja u tlu		Adsorpcija u tlu	
		DT <sub>50</sub> <sup>b</sup> (lab) / dan	DT <sub>50</sub> <sup>c</sup> (polje) / dan	K <sub>f</sub> <sup>d</sup>	K <sub>foc</sub> <sup>e</sup>
AMBA	1,1	3,2	–	–	–
MNBA	2,8	7,5	–	–	–
Mezotrion	3,4	17	5	0,98	53
Tembotrion	2,5	14,5	2,7	1,59	66
Topramezon	4,8	218	26,1	1,78	93

<sup>a</sup> engl. *Groundwater Ubiquity Score* (GUS), indeks za procjenu potencijala ispiranja spoja i onečišćenja podzemnih voda (< 2,0 nizak; 2,0 – 3,0 umjeren; > 3,0 visok)

<sup>b</sup> vrijeme poluživota spoja izračunano iz podataka određenih u laboratorijskim uvjetima

<sup>c</sup> vrijeme poluživota spoja izračunano iz podataka određenih u poljskim uvjetima

<sup>d</sup> K<sub>f</sub> - Freundlichova sorpcijska konstanta

<sup>e</sup> K<sub>foc</sub> - Freundlichova sorpcijska konstanta normirana prema udjelu organskog ugljika u tlu

– podatak nije pronađen u literaturi

### 2.3.2. Razgradnja herbicida u okolišu

Razgradnja molekula herbicida u okolišu može se odvijati kemijskim, fotokemijskim i mikrobiološkim putem. Na stupanj i brzinu razgradnje u tlu utječu biotički čimbenici (sadržaj i sastav organske tvari, vrsta i brojnost mikrokulture tla) i abiotički uvjeti (koncentracija i formulacija spoja, sadržaj i sastav mineralne tvari i plinova u tlu, temperatura, padaline, prisutnost molekula vode).<sup>10</sup> Postojanost spoja u tlu ili vodi izražava se vremenom poluživota (DT<sub>50</sub>), odnosno vremenom koje je potrebno da koncentracija herbicida u tlu ili vodi padne na polovicu od početne vrijednosti.

Mikrobiološka razgradnja je najznačajniji put razgradnje organskog spoja u tlu, a odvija se djelovanjem enzimskog sustava mikroorganizama iz tla na molekulu herbicida, koja se postupno razgrađuje do ugljičnog dioksida i vode. Molekule herbicida koje su se procesom adsorpcije vezale za čestice tla teže su dostupne djelovanju mikroorganizama te se biorazgradnja takvih molekula odgađa (u slučaju reverzibilne adsorpcije) ili će biti zanemariva (u slučaju ireverzibilne adsorpcije). Proučavanjem puteva biorazgradnje mezotriona u tlu uočena su dva primarna razgradna produkta, derivata benzojeve kiseline (AMBA i MNBA).<sup>26,27</sup> Tembotrion se u aerobnim uvjetima

vrlo brzo razgrađuje u tlu, a glavni produkti su M6 (2-kloro-4-(metilsulfonyl)-3-3-[(2,2,2-trifluoroetoksi)metil]-benzojeva kiselina), M1 (2-kloro-4-(metilsulfonyl)-3-3-[(2,2,2-trifluoroetoksi)metil] fenol), oba s vremenom poluživota 18 do 26 dana, i TEMB MET (2-{2-kloro-4-metil-3-[(2,2,2-trifluoroetoksi)metil]benzoil}-4,6-dihidroksicikloheksan-1,3-dion).<sup>27</sup> Put biorazgradnje topamezona u tlu nije još dovoljno istražen. Istraživanje metabolizma topamezona enzimskim sustavom biljke (korova i kukuruza) pokazuje da razgradnja započinje demetilacijom pirazolnog prstena te se nastavlja cijepanjem prstenastih struktura izvornog spoja.<sup>16</sup>

Kemijska razgradnja je proces razlaganja molekule herbicida mehanizmima u koje nisu uključeni živi organizmi (hidroliza, oksidacija, redukcija). Na stupanj kemijske razgradnje utječe mnoštvo čimbenika, kao što su intenzitet adsorpcije herbicida, pH, temperatura, sadržaj vlage i sastav tla.<sup>32-35</sup> Hidroliza istraživanih herbicida značajna je jedino u vrlo kiselim uvjetima (pH < 4), dok je pri većim pH vrijednostima njihova hidroliza zanemariva.<sup>31</sup>

Fotokemijska razgradnja molekula herbicida odvija se pod utjecajem fotona i ovisna je o intenzitetu i valnim duljinama spektra Sunčevih zraka, kao i o svim vremenskim i okolišnim uvjetima prilikom tretiranja tla. Triketonski i pirazolni herbicidi uglavnom su stabilni prema fotorazgradnji (vrijeme poluživota im je dulje od 60 dana).<sup>31,36</sup> U pokusima fotolize tembotriona opažen je utjecaj pH vrijednosti medija na način razgradnje i vrstu nastalih razgradnih produkata. U alkalnim uvjetima fotolize, kloridna skupina zamjenjuje se hidroksilnom, dok u kiselim uvjetima dolazi do ciklizacije strukture tembotriona uz nastajanje ksantendionskih derivata.<sup>37</sup>

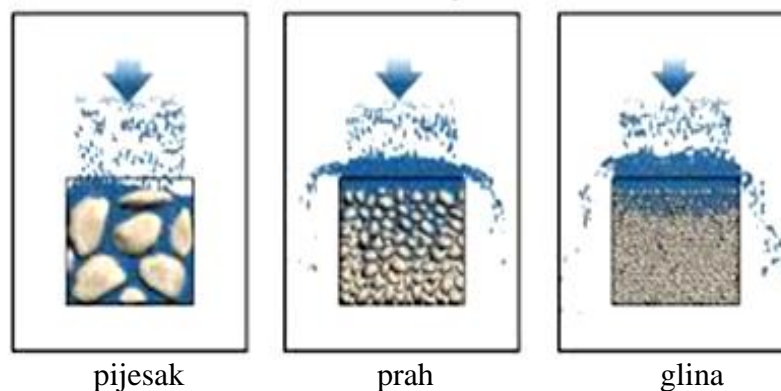
Vrijeme poluživota triketonskih herbicida u tlu je 3 do 5 dana u poljskim uvjetima ili otprilike dva tjedna u laboratorijskim uvjetima (Tablica 5). Postojanost razgradnih produkata mezotriona AMBA i MNBA kraća je od njihovog izvornog spoja. Vrijeme poluživota pirazolnog herbicida topamezona u tlu značajno je dulje od triketonskih herbicida i iznosi preko 200 dana u laboratorijskim uvjetima ili 3 do 4 tjedna u poljskim uvjetima. Zbog istovremenog uključivanja nekoliko različitih mehanizama, razgradnja spojeva u tlu brža je u poljskim uvjetima nego u laboratorijskim.

### 2.3.3. Pokretljivost herbicida u tlu

Nakon tretiranja polja herbicidnim pripravkom, vrlo mali udio aktivne tvari apsorbiraju biljke, dok se većina molekula herbicida prenosi kroz razne dijelove okoliša. Najznačajniji načini prijenosa molekula herbicida s mjesta primjene uključuju isparavanje u atmosferu te vertikalno i lateralno ispiranje putem cirkulacije vode po površini tla i kroz profil tla.<sup>32</sup>

Ključni čimbenici koji utječu na isparavanje spoja s površine tla ili lista biljke su fizičko-kemijska svojstva herbicida (tlak para, topljivost, adsorpcijski koeficijent, reaktivnost), svojstva tla (udjel vode i organske tvari u tlu, temperatura i gustoća tla, pH vrijednost), meteorološke prilike (temperatura zraka, brzina vjetra, vlažnost) i poljoprivredna praksa tretiranja polja (doza herbicida, vrsta pripravka, način prskanja).<sup>38</sup>

Lateralno ispiranje uključuje površinsko prenošenje slobodnih molekula vodom i molekula vezanih na čestice tla erozijom. Ovaj proces se događa kada je akumulacija vode na površini tla, zbog jakih padalina, vjetra, erozije i nagiba tla, izraženija od infiltracije vode u tlo. Na Slici 9 prikazan je utjecaj strukture tla na brzinu kretanja vode, primjerice brzo kretanje vode u zrnastim (mrvičastim) tlima, a ograničeno kretanje vode i zraka kroz glinovita tla. Vertikalno ispiranje spojeva kroz profil tla smatra se glavnim uzrokom onečišćenja podzemnih voda za piće. Općenito, potencijal ispiranja nekog organskog spoja prvenstveno ovisi o adsorpcijskim svojstvima tla i spoja, topljivosti spoja u vodi i brzini biorazgradnje u tlu.



**Slika 9.** Utjecaj teksture tla na smjer ispiranja spoja u tlu

Za procjenu potencijala ispiranja spoja koriste se razni indeksi, koji se računaju putem matematičkih modela.<sup>39</sup> GUS indeks predstavlja model koji je često u uporabi, a u izračun uzima vrijeme poluživota i koeficijent adsorpcije spoja u tlu.<sup>31</sup> U Tablici 5 navedeni su GUS indeksi istraživanih spojeva i numerički intervali za procjenu ispiranja. Prema tim indeksima istraživani spojevi procjenjuju se kao spojevi koji se umjereno do lako ispiru u vodene sustave i predstavljaju rizik za onečišćenje pitkih voda. Topramezon pokazuje veći potencijal ispiranja od triketonskih spojeva, dok se tembotrion zbog nešto brže razgradnje, smatra manje rizičnim od mezotriona. Razgradni produkti mezotriona još se brže razgrađuju od mezotriona te stoga ne upućuju na rizik od ispiranja.

#### **2.4. Toksikološka svojstva mezotriona, tembotriona i topamezona**

Toksičnost je sposobnost izazivanja štetnog djelovanja neke aktivne tvari na živi organizam. Izloženost organizma toksičnom djelovanju tvari može biti kratkotrajna (akutna, uz veću dozu tvari) i dugotrajna (kronična, uz niske doze tvari). Osim toga, simptomi izloženosti organizma djelovanju toksičnih tvari ovise o vrsti aktivne tvari, načinu unosa te vrsti, dobi, spolu i imunitetu živog organizma. Unos aktivne tvari u organizam odvija se putem usta (oralno), udisaja (inhalacijski) ili kože (dermalno). Nakon unosa u organizam molekule herbicida enzimski se razgrađuju i većim dijelom (> 80 %) izlučuju unutar 24 sata urinom. Toksičnost se izražava vrijednostima LD<sub>50</sub> (mg kg<sup>-1</sup> tjelesne težine). Srednja letalna doza LD<sub>50</sub> predstavlja onu količinu toksične tvari pri kojoj 50 % testiranih organizama ugiba. Što je vrijednost LD<sub>50</sub> veća, aktivna tvar je manje otrovna. Toksikološka svojstva istraživanih herbicida određena su u *in vivo* laboratorijskim pokusima s modelnim životinjama (Tablica 6). Inhalacijske LD<sub>50</sub> vrijednosti podjednake su za sva tri herbicida i značajno su niže od letalnih doza određenih za oralni i dermalni put unosa. Udisanje istraživanih herbicida pokazuje toksičniji učinak na organizam od oralnog i dermalnog unosa. Kod oralnog unosa najmanje toksičan je mezotrion. Triketonski herbicidi manje su toksični od topamezona u slučaju dermalnog izlaganja. Najčešći simptomi akutnog otrovanja su iritacija sluznica i kože.

**Tablica 6.** Osnovna toksikološka svojstva istraživanih herbicida<sup>29-31</sup>

Spoj	LD <sub>50</sub> oralno / mg kg <sup>-1</sup>	LD <sub>50</sub> dermalno / mg kg <sup>-1</sup>	LD <sub>50</sub> inhalacijski / mg kg <sup>-1</sup>
<b>Mezotrion</b>	> 5000	> 2000	> 5,0
<b>Tembotrion</b>	> 2500	> 2000	> 4,6
<b>Topramezon</b>	> 2000	> 4000	> 5,1

LD<sub>50</sub> = srednja letalna doza spoja

Ekotoksikološka svojstva pokazuju pojavu štetnih učinaka herbicida u bilo kojem živom organizmu u okolišu. Uz ekotoksikološke karakteristike javlja se problem bioakumulacije, tj. nakupljanja i skladištenja određene tvari iz okoliša u živim organizmima. Bioakumulacija je povezana uz pojavu biomagnifikacije, zbog čega dolazi do povećanja koncentracije bioakumulirane tvari iz okoliša u hranidbenom lancu. Tada postoji izravna opasnost za sve sudionike hranidbenog lanca. Zbog svojih hidrofilnih osobina i anionskog oblika pri fiziološkim uvjetima, istraživani herbicidi pokazuju nizak potencijal bioakumuliranja.<sup>31</sup> Ekotoksikološke karakteristike istraživanih herbicida prikazane su u Tablici 7.

**Tablica 7.** Ekotoksikološke karakteristike istraživanih herbicida<sup>31</sup>

Spoj	LD <sub>50</sub> oralno / mg kg <sup>-1</sup> (ptice)	LC <sub>50</sub> / mg L <sup>-1</sup> (ribe)	LD <sub>50</sub> oralno / µg/pčeli (pčele)	LD <sub>50</sub> oralno / mg kg <sup>-1</sup> (sisavci)
<b>AMBA</b>	–	> 150	–	> 5000
<b>MNBA</b>	–	120	–	> 5000
<b>Mezotrion</b>	> 2000	> 120	11	> 5000
<b>Tembotrion</b>	> 2250	> 100	> 93	> 2500
<b>Topramezon</b>	> 2000	> 100	> 72	> 2000

LD<sub>50</sub> = srednja letalna doza spoja; LC<sub>50</sub> = srednja letalna koncentracija spoja;  
– podatak nije pronađen u literaturi

Iako su pčele najosjetljivije na utjecaj novih vrsta herbicida, vrijednosti srednjih letalnih doza za sve spojeve upućuju na njihovu slabu toksičnost za sisavce, ptice, kukce i vodene organizme. Nema znakova genotoksičnog, karcinogenog i neurotoksičnog potencijala, kao niti utjecaja na reproduktivne organe sisavaca.

Uz uvjet da se primjenjuju u preporučenim dozama, istraživani herbicidi ne pokazuju značajan rizik za zdravlje ljudi, životinja i drugih organizama.

## 2.5. Analiza herbicida u tlu

Kvantitativna i kvalitativna analiza tragova herbicida i njihovih razgradnih produkata u heterogenim matricama uključuje niz analitičkih postupaka koji započinju uzorkovanjem reprezentativnog uzorka. Slijede postupci ekstrakcije analita iz matrice, pročišćavanja ekstrakta i koncentriranja analita kako bi se omogućila što veća selektivnost i osjetljivost završne instrumentalne analize ekstrakta. Svi navedeni postupci trebaju biti optimirani uz što manji broj koraka i koekstrahiranih interferencija.<sup>10</sup> Posebno je važno razvijati i validirati analitičke metode pomoću kojih je moguće istovremeno pouzdano odrediti što veći broj strukturno različitih spojeva.<sup>40–42</sup>

### 2.5.1. Metode ekstrakcije herbicida iz tla

Ekstrakcija je postupak izdvajanja analita iz matrice, koji nerijetko istovremeno uključuje i koncentriranje analita. Izdvajanje se zasniva na principu različite topljivosti spoja u različitim otapalima koja se međusobno ne miješaju.<sup>43</sup> Djelotvorna ekstrakcija analita iz uzorka tla osnovni je uvjet za djelotvornost cijele analitičke metode određivanja herbicida u tlu.

Tradicionalna metoda ekstrakcije po Soxhletu vremenski je vrlo zahtjevna (traje od nekoliko sati do 24 sata) i uključuje relativno veliki volumen organskog otapala (100 – 500 mL).<sup>44,45</sup> Osim toga, ova metoda ne omogućuje istovremenu ekstrakciju većeg broja uzoraka pod istim kontroliranim uvjetima što utječe na ponovljivost postupka. Danas se za ekstrakciju herbicida sve više koriste metode poput ekstrakcije potpomognute mikrovalovima (engl. *Microwave Assisted Extraction*, MAE), ekstrakcije na čvrstoj fazi (engl. *Solid Phase Extraction*, SPE), mikroekstrakcije na čvrstoj fazi (engl. *Solid-Phase Microextraction*, SPME) i metode QuEChERS (engl. *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*).<sup>40</sup>

Ekstrakcija analita iz tla često se provodi mehaničkim izmućkavanjem tla i organskog otapala.<sup>27,46</sup> Međutim, ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija omogućuje bolji kontakt analita i otapala, skraćuje vrijeme ekstrakcije i smanjuje volumen otapala potrebnog za ekstrakciju.<sup>40</sup> Ekstrakcija na čvrstoj fazi najčešće je korištena metoda ekstrakcije analita iz vodenih uzoraka, a služi i za akumuliranje analita i pročišćavanje

ekstrakta nakon postupka ekstrakcije mehaničkim izmućkavanjem.<sup>40,46–48</sup> To je metoda u kojoj se koriste mali stupci punjeni sorbensom, a masa i polarnost sorbensa se može mijenjati. Prednost ekstrakcije na čvrstoj fazi je uporaba malog volumena otapala (nekoliko mililitara) za eluiranje stupca i mogućnost automatizacije. Mikroekstrakcija na čvrstoj fazi je metoda ekstrakcije u kojoj se mikro-sorbens u obliku vlakna uranja direktno u tekući uzorak (ekstrakt tla) ili se izlaže parama analita iznad čvrstog uzorka. Ova metoda ekstrakcije pogodna je za analizu lakohlapljivih spojeva bez uporabe otapala.<sup>40</sup> Metoda QuEChERS je relativno nova metoda ekstrakcije, a sam naziv metode dolazi od njezinih prednosti: brza, jednostavna, jeftina, učinkovita, robusna i pouzdana. Zbog visoke učinkovitosti za ekstrakciju velikog broja analita, ova multirezidualna metoda danas se sve više koristi za analizu vrlo malih količina pesticida u čvrstim uzorcima različitog podrijetla.<sup>10,40</sup>

Ekstrakcija analita potpomognuta djelovanjem mikrovalova praktična je i djelotvorna metoda za izolaciju analita organskim otapalom iz čvrstih uzoraka.<sup>40,42–45,49</sup> Prednost ove metode ekstrakcije nad tradicionalnim metodama je mogućnost istovremene ekstrakcije većeg broja uzoraka pod kontroliranim uvjetima temperature ili tlaka te snage mikrovalova, primjena manjeg volumena otapala i kraćeg trajanja ekstrakcije. Nedostatak ove metode je manjak selektivnosti ekstrakcije zbog koekstrakcije interferirajućih spojeva, posebice iz tla s većim udjelom humusa. Stoga je nakon ekstrakcije često nužno uključiti i postupak čišćenja ekstrakta, primjerice na čvrstoj fazi, odnosno na stupcu punjenom različitim vrstama sorbensa. Djelotvornost ekstrakcije potpomognute mikrovalovima postiže se optimiranjem volumena i vrste otapala za ekstrakciju, temperature, trajanja ekstrakcije i snage mikrovalova.

Kod izbora otapala u ekstrakciji potpomognutoj mikrovalovima u obzir treba uzeti fizičko-kemijska svojstva analita (topljivost analita u određenom otapalu, hidrofobnost). Primjena polarnijih otapala sa svojstvom visoke dielektrične konstante pogodnija su za mikrovalnu ekstrakciju, jer se zbog velike apsorpcije mikrovalova lako zagriju i difundiraju u matricu uzorka. Najčešća otapala koja se koriste u mikrovalnoj ekstrakciji uključuju vodu, metanol, acetonitril, diklormetan, aceton i smjese ovih otapala u različitim omjerima. Napolarna otapala poput heksana i etil-acetata slabo se zagrijavaju djelovanjem mikrovalova, ali se mogu dodati u smjesu s polarnim otapalom zbog lakšeg otapanja hidrofobnog analita. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima



pogodna je za izolaciju termostabilnih spojeva jer općenito vrijedi pravilo da povišenje temperature rezultira većim ekstrakcijskim učinkom. Pri optimiranju temperature ekstrakcije smjese analita treba paziti na termičku razgradnju analita pri povišenoj temperaturi.

### 2.5.2. Metode završne analize spojeva u ekstraktu tla

Metode završne analize ekstrakta tla uključuju tehnike odjeljivanja spojeva u smjesi te njihovu identifikaciju i određivanje koncentracija. Danas se u tu svrhu najčešće primjenjuju kromatografske tehnike: plinska kromatografija (engl. *Gas Chromatography*, GC) i tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC).

Plinska kromatografija je instrumentalna metoda analize u kojoj je pokretna faza plin, najčešće inertni helij i dušik.<sup>42,50</sup> Pogodna je za analizu termostabilnih i lakohlapljivih spojeva, a odjeljivanje se zasniva na principu različitog zadržavanja spojeva na nepokretnoj fazi (tanki film sorbensa unutar kapilarne duge kolone) zbog različite hidrofobnosti spojeva u smjesi. Osim toga, zbog razlike u hlapljivosti spojeva bolja djelotvornost odjeljivanja postiže se gradijentnom promjenom temperature kromatografske kolone i optimiranjem brzine protoka pokretne faze. Visoka snaga razlučivanja u plinskoj kromatografiji postignuta je primjenom kapilarnih kolona dugih od 30 do 60 metara. Na osjetljivost i selektivnost analize može se utjecati izborom detektora.<sup>34</sup> Za analizu herbicida najčešće se primjenjuje spektrometar masa (engl. *Mass Spectrometer*, MS), kao univerzalni i specifični detektor.<sup>42,50</sup> Spektrometrija masa je tehnika kojom se molekule analita ioniziraju, a nastali ioni se razdvajaju i detektiraju na temelju omjera njihove mase i naboja. Analizom specifičnih fragmenata dobivaju se podaci o strukturi i masi molekule analita. Dodatna selektivnost i osjetljivost analize postiže se vezanjem dva spektrometra masa u tandemu (GC/MS-MS).<sup>36</sup> Analit se nedvojbeno identificira usporedbom fragmentograma analita, koji predstavlja svojevrsni "otisak prsta" molekule analita, i specifičnih fragmentograma milijuna molekula iz baze podataka. Plinska kromatografija nije pogodna za analizu polarnih, slabo hlapljivih i termolabilnih spojeva. Slabo hlapljivi spojevi mogu se postupkom deriviranja prevesti u hlapljive derivate, što produžuje i nerijetko snižava djelotvornost cijelog analitičkog postupka određivanja analita. Analiza navedenih spojeva obično se provodi uz pomoć tekućinske kromatografije.

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti je instrumentalna metoda završne analize u kojoj se kao pokretna faza koriste otapala različite polarnosti, a odjeljivanje spojeva prema polarnosti iz smjese može se provesti u koloni (kolonska) ili na ravnoj plohi (tankoslojna). Na djelotvornost odjeljivanja u tekućinskoj kromatografiji utječu veličina, oblik i vrsta čestica nepokretne faze (tanki film sorbensa u koloni ili na plohi), izbor i program miješanja pokretnih faza, brzina protoka pokretne faze, polarnost analita, volumen uzorka i temperatura.<sup>34</sup> HPLC obrnutih faza je najčešće korištena metoda analize u kojoj je nepokretna faza nepolarna, a pokretna faza je polarna. Najčešće korištene pokretne faze su voda, voda zakiseljena dodatkom slabe organske ili anorganske kiseline, 0,01 mol L<sup>-1</sup> fosfatni pufer, metanol, acetonitril i tetrahidrofuran. Veća djelotvornost odjeljivanja postiže se gradijentnom promjenom omjera dvaju otapala različite polarnosti. Najčešće korištene nepokretne faze su oktil-silil (C<sub>8</sub>), oktadecil-silil (C<sub>18</sub>) i cijanopropil-silil (CNPr).

Osjetljivost i selektivnost tekućinskokromatografske analize herbicida u ekstraktu tla postiže se primjenom različitih detektora, najčešće UV-Vis, detektora s nizom dioda (engl. *UV-Diode-Array-Detector*, UV-DAD), fluorescentnog detektora i spektrometra masa (MS).<sup>29,30,34,36</sup> Uvjet za detekciju spojeva UV i fluorescentnim detektorima je postojanje kromofornih i fluorofornih skupina u kemijskoj strukturi analita. Zbog povećanja selektivnosti odjeljivanja analita u smjesi i njihove nedvojbene identifikacije sve češće se koristi znatno skuplja tehnika LC/MS.<sup>34,47</sup> Najčešće korištene pokretne faze u metodi LC/MS su smjese otapala acetonitril/amonijev acetat, acetonitril/0,01 % mravlje kiseline u vodi, metanol/voda, 0,01 % fosforne kiseline u vodi/acetonitril i 0,6 % mravlje kiseline u vodi/0,6 % mravlje kiseline u metanolu. Analizom triazinskih i triketonskih herbicida tehnikom LC/MS postignute su granice detekcije u rasponu od 0,3 do 3 ng g<sup>-1</sup>.<sup>46,47</sup> Osjetljivost analize primjenom UV-DAD u pravilu je manja od MS detekcije, zbog nemogućnosti odjeljivanja koekstrahiranih interferencija od analita koje apsorbiraju zračenje u istom dijelu UV-spektra. Ovaj problem donekle se može izbjeći dodatnim pročišćavanjem ekstrakata tla, primjerice propuštanjem ekstrakta kroz stupac silikagela.<sup>51</sup>

U posljednje vrijeme, zbog brojnih prednosti u odnosu na MS, za nedvojbeno kvalitativnu i preciznu kvantitativnu analizu u tekućinskoj kromatografiji koristi se i detektor na bazi nuklearne magnetske rezonancije (engl. *Nuclear magnetic resonance*, NMR). NMR je brza i precizna tehnika koja daje podatke o molekulskoj strukturi na

osnovu magnetskih svojstava specifičnih atoma u molekuli analita te se stoga koristi i za određivanje kemijske strukture nepoznatih molekula.<sup>52</sup> Za razliku od tehnike MS, NMR je nedestruktivna tehnika i manje je osjetljiva na utjecaj matrice, što značajno smanjuje postupak pripreme uzorka prije same analize. Glavni nedostatak tehnike NMR je manja osjetljivost u usporedbi sa ostalim tekućinskokromatografskim detektorima.<sup>26,36</sup>

## 2.6. Validacija analitičke metode

Nakon optimiranja uvjeta ekstrakcije i završne analize analitičku metodu potrebno je validirati. Validacija analitičke metode je postupak kojim dokazujemo da odabrana metoda služi namijenjenoj svrsi, čime se osigurava pouzdanost, točnost i preciznost dobivenih analitičkih rezultata. Osim toga, validacijom se može utvrditi uzrok mogućih pogrešaka koji nastaju prilikom izvođenja metode što povećava pouzdanost metode.<sup>53</sup> Osnovni parametri validacije su specifičnost, selektivnost, linearnost, radno područje, preciznost (ponovljivost, međupreciznost, obnovljivost), točnost (istinitost), granica određivanja, granica detekcije i postojanost. Pri provedbi validacije nije potrebno za svaku analitičku metodu odrediti sve parametre, već njihov odabir ovisi o namjeni metode. Neizostavni dio validacije je postavljanje kriterija prihvatljivosti za svaki parametar, a to je moguće samo razumijevanjem značenja pojedinih parametara i načina na koji se izvode u laboratoriju, poznavanjem značajki metoda i regulatornih zahtjeva.<sup>54,55</sup>

*Specifičnost i selektivnost* su svojstva metode zbog kojeg je analit moguće precizno odijeliti od primjesa iz matrice uzoraka i kvantitativno odrediti. Specifična metoda je ona kojom se može odrediti samo jedan analit, dok je selektivna metoda ona kojom se može odrediti više spojeva istovremeno, pod uvjetom da ti spojevi ne interferiraju. U praksi se ova svojstva dokazuju usporedbom odziva detektora za referentni materijal (standard), matricu bez analita (slijepi uzorak) i matrice s analitom.<sup>53,54</sup>

*Linearnost* je svojstvo metode da unutar određenog koncentracijskog raspona daje linearni odziv detektora.<sup>54</sup> Test linearnosti obično se provodi analizom analita na pet koncentracijskih razina. Metodom linearne regresije i jednadžbe pravca izračuna se koeficijent korelacije ( $k$ ) za kojeg se postavlja kriterij  $k \geq 0,99$ .<sup>54,55</sup>

*Radno područje* metode je raspon koncentracija unutar linearnog područja koje se mogu kvantificirati uz odgovarajuću točnost (istinitost) i preciznost. Ovaj parametar

validacije ne određuje se eksperimentalno, već se zaključci izvode iz ispitivanja linearnosti. Radno područje metode često je određeno svrhom metode.<sup>54</sup>

*Preciznost* metode definira se kao stupanj slaganja rezultata dobivenih ponavljanim mjerenjem istovjetnog uzorka.<sup>53</sup> Razlikujemo tri vrste preciznosti:

- preciznost pod uvjetima ponovljivosti ili ponovljivost (isti laboratorij, analitičar, aparatura, kratko razdoblje analize)
- međupreciznost (isti laboratorij, dulje razdoblje analize uz očekivane promjene nekih uvjeta)
- preciznost pod uvjetima obnovljivosti ili obnovljivost (promjenjivi uvjeti koji uključuju različite laboratorije, različite analitičare)

Određivanjem preciznosti uočavaju se slučajne pogreške metode, a numerički pokazatelj je relativno standardno odstupanje (RSO) te koeficijent varijacije ili varijanca. Ovi eksperimenti se provode na homogenom autentičnom uzorku, uz statistički broj ponavljanja. Kriteriji prihvatljivosti ovise o vrsti analize, matrici uzorka i koncentraciji analita koji se određuje.<sup>54</sup>

*Točnost* ili *istinitost* metode je stupanj podudaranja između stvarne (referentne, standardne) vrijednosti i srednje vrijednosti dobivene primjenom analitičkog postupka.<sup>53,54</sup> Eksperimenti se ponavljaju najmanje tri puta na tri koncentracijske razine raspoređene unutar radnog područja metode. Raspon koncentracija analita treba odgovarati stvarnom uzorku. Istinitost metode se može procijeniti usporedbom rezultata dobivenih ispitnom metodom s rezultatima dobivenim referentnom metodom, analizom uzorka poznate koncentracije ili cijepljenjem matrice uzorka poznatom koncentracijom referentnog materijala.<sup>54</sup> Rezultat kojim se procjenjuje točnost metode izražava se kao postotak povrata.<sup>53,54</sup>

*Granica detekcije* je najmanja količina analita u uzorku koja se može detektirati, dok *granica kvantifikacije* označava najmanju količinu analita u uzorku koja se može kvantitativno odrediti uz odgovarajuću preciznost i točnost.<sup>54</sup> Obje granice određuju se razrjeđivanjem otopine analita najniže koncentracije u standardu ili ekstraktu tla, a metode određivanja mogu biti:

- vizualne (vrijedi samo za granicu detekcije pri instrumentalnoj i neinstrumentalnoj metodi analize; procjenjuje se najmanji signal koji se može prepoznati)

- iz omjera signal/šum (vrijedi samo za analitičke postupke koji imaju baznu liniju; za granicu detekcije prihvatljiv je omjer 3 : 1, a za granicu određivanja 10 : 1)
- statistički (računa se iz standardnog odstupanja signala i nagiba)

*Robusnost* metode označava otpornost analitičkog postupka na male, namjerne promjene parametara metode. Ispitivanje robusnosti uključuje promjene radnih uvjeta metode unutar stvarnih granica te se prati kvantitativna promjena rezultata.<sup>53</sup> Kod metode HPLC promjena radnih uvjeta uključuje promjenu pH vrijednosti, sastava i brzine protoka pokretne faze, uporaba različitih kromatografskih kolona i rad pri različitim temperaturama. Ukoliko promjena nekog radnog uvjeta bitno ne utječe na rezultat, onda je ta promjena u području robusnosti metode. Radne uvjete koji utječu na rezultat treba kontrolirati i jasno ih naznačiti u propisu metode. Osim toga, ispitivanja robusnosti metode uključuju i parametre kao što su stabilnost mjernih otopina, duljina trajanja ekstrakcije, provjera preciznosti i linearnosti uz rad nekog drugog analitičara i uz korištenje drugih materijala i aparature u laboratoriju.<sup>53</sup>

Korištenjem validiranih analitičkih metoda smanjuje se mogućnost slučajne i sustavne pogreške, a dobiveni analitički rezultati smatraju se točni i pouzdani.

### ***3. Eksperimentalni dio***

### 3.1. Kemikalije

#### Herbicidi:

- **mezotrion**; 2-(4-metil-2-nitrobenzoil)cikloheksan-1,3-dion; 99,9 %-tni, Pestanal, Sigma-Aldrich, Seelze, Njemačka
- **tembotrion**; 2-{2-klor-4-metil-3-[(2,2,2-trifluoroetoksi)metil]benzoil} cikloheksan-1,3-dion; 99,3 %-tni, Pestanal, Sigma-Aldrich, Seelze, Njemačka
- **topramezon**; [3-(4,5-dihidro-1,2-oksazol-3-il)-4-metil-*o*-tolil](5-hidroksi-1-metilpirazol-4-il)metanon; 98,3 %-tni, Pestanal, Sigma-Aldrich, Seelze, Njemačka

#### Produkti razgradnje mezotriona:

- **AMBA\***, 2-amino-(4-metilsulfonil)benzojeva kiselina; Aldrich<sup>CPR</sup>, Sigma-Aldrich, Seelze, Njemačka
- **MNBA**, (4-metilsulfonil-2-nitrobenzojeva kiselina); 98,0 %-tni, Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Njemačka

#### Otapala i ostali reagensi:

- **aceton**, za analizu tragova organskih spojeva, SupraSolv, E. Merck, Darmstadt, Njemačka
- **acetonitril**, čistoće za HPLC, J. T. Baker, Deventer, Nizozemska
- **metanol**, čistoće za HPLC, LiChrosolv, E. Merck, Darmstadt, Njemačka
- **36,5 %-tna klorovodična kiselina p.a.**, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- **85 %-tna fosforna kiselina p.a.**, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- **ultra čista voda**, čistoće za HPLC, pripravljena primjenom sustava Milli-Q za pročišćavanje vode, Millipore, Bedford, MA, SAD
- **natrijev karbonat p.a.**, bezvodni, Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan
- **D-(+)-glukoza p.a.**, bezvodna, Kemika, Zagreb, Hrvatska

---

\* proizvod iz kolekcije kemikalija u ranoj fazi istraživanja; proizvođač ne osigurava podatak o čistoti kemikalije

### 3.2. Instrumenti i pribor

- **tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti** s pumpom ProStar 230 SDM, UV detektorom s nizom fotodioda ProStar 330 i automatskim uzorkivačem AutoSampler 410; sve Varian Walnut Creek, CA, SAD
- **kromatografska kolona** XBridge<sup>TM</sup> C<sub>18</sub>, 250 mm × 4,6 mm (unutarnji promjer), veličina čestica 5 μm (Waters, Milford, MA, SAD) s **predkolumnom** Gemini C<sub>18</sub>, 4 mm × 3 mm (unutarnji promjer), veličina čestica 5 μm (Phenomenex, Torrance, CA, SAD)
- **uređaj za mikrovalno potpomognutu ekstrakciju** MarsX, 1200 W, kontrola temperature (CEM, Matthews, NC, SAD)
- **teflonske kivete za mikrovalno potpomognutu ekstrakciju** GreenChem Plus (CEM, Matthews, NC, SAD)
- **tehnička vaga** PN 1210 (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Švicarska)
- **analitička vaga** AB104 (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Švicarska)
- **uparivač** za uparavanje otapala u struji dušika, N-evap (The Meyer, Washington, SAD)
- **mlinac za zemlju** Culatti (Kleinfeld, Gehrden, Njemačka)
- **digitalni pH metar** SevenMulti<sup>TM</sup> s **kombiniranom elektrodom** InLab 413 (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Švicarska)
- **centrifuga** Centric 332A (Tehtnica, Železniki, Slovenija)
- **uređaj za protresanje i miješanje** Bio Vortex V1 (BIOSAN, Riga, Latvija)
- **pipete** ep T.I.P.S. (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- **PP štrcaljke** BD DISCARDIT 300928 BX10, 2 mL (King Scientific, West Yorkshire, V. Britanija)
- **PTFE-filtri**, veličina pora 0,2 μm, Acrodisc CR13 (Waters, Milford, MA, SAD)
- **analizator ugljika** TOC-V<sub>CPH</sub> s **modulom za čvrste uzorke** SSM-5000A (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan);



### 3.2.1. Radni uvjeti tekućinske kromatografije

- pokretna faza: (A) acetonitril i (B) 0,1 %-tna fosforna kiselina (pH 2,2)
- protok pokretne faze: 1 mL min<sup>-1</sup>
- volumen injektiranog uzorka: 100 µL
- valne duljine detekcije spojeva: 205 nm i 220 nm
- način eluiranja: linearni gradijent (Tablica 8)

**Tablica 8.** Sastav pokretne faze i trajanje tekućinskokromatografske analize

Vrijeme / min	Sastav pokretne faze $\varphi$ / %	
	A	B
0 – 3	10	90
3 – 20	80	20
20 – 25	80	20
25 – 30	10	90

### 3.3. Priprava otopina

#### 3.3.1. Izvorne otopine

Izvorne otopine pripravljene su otapanjem čvrstih spojeva analitičke čistoće u acetonitrilu (mezotrion, tembotrion, AMBA i MNBA) i metanolu (topramezon). Masene koncentracije spojeva u izvornim otopinama prikazane su u Tablici 9.

**Tablica 9.** Masene koncentracije spojeva u izvornim otopinama

Spoj	Masena koncentracija / mg mL <sup>-1</sup>	Otapalo
AMBA	0,6380	acetonitril
MNBA	0,9888	acetonitril
Mezotrion	0,9830	acetonitril
Tembotrion	0,8093	acetonitril
Topramezon	0,4846	metanol

### 3.3.2. Kalibracijske otopine pripravljene u vodi

Standardna otopina smjese spojeva (Standard 0) pripravljena je razrjeđivanjem određenog volumena izvornih otopina vodom na 10 mL. Daljnjim razrjeđivanjem otopine Standard 0 vodom pripravljen je niz vodenih otopina smjese spojeva (Standardi 1 – 4) za vanjsku kalibraciju u tekućinskokromatografskoj analizi. Masene koncentracije spojeva u kalibracijskim otopinama pripravljenim u vodi prikazane su u Tablici 10.

**Tablica 10.** Masene koncentracije spojeva u kalibracijskim otopinama pripravljenim u vodi

Spoj	Masena koncentracija / $\mu\text{g mL}^{-1}$				
	Standard 0	Standard 1	Standard 2	Standard 3	Standard 4
<b>AMBA</b>	5,104	0,051	0,204	0,612	1,021
<b>MNBA</b>	4,944	0,050	0,198	0,593	0,989
<b>Mezotrion</b>	4,915	0,049	0,197	0,590	0,983
<b>Tembotrion</b>	4,856	0,049	0,194	0,583	0,971
<b>Topramezon</b>	4,846	0,048	0,194	0,581	0,969

### 3.3.3. Otopina za pripravu uzoraka tla s dodatkom analita

Otopina smjese spojeva (otopina SPIKE) za pripravu uzoraka tla poznatih masenih udjela spojeva pripravljena je razrjeđivanjem određenog volumena izvornih otopina acetonom na 10 mL. Masene koncentracije spojeva u otopini SPIKE prikazane su u Tablici 11.

**Tablica 11.** Masene koncentracije spojeva u otopini SPIKE

Spoj	Masena koncentracija / $\mu\text{g mL}^{-1}$
<b>AMBA</b>	5,104
<b>MNBA</b>	4,944
<b>Mezotrion</b>	4,915
<b>Tembotrion</b>	4,856
<b>Topramezon</b>	4,846

### 3.4. Uzorci tla

Površinska tla (do 30 cm dubine) skupljena su na tri lokacije:

- Šašinovec (20 km sjeveroistočno od Zagreba) – poljoprivredno tlo
- Cmrok (sjeverni dio Zagreba) – šumsko tlo
- Rudani (7 km jugoistočno od Žminja, južna Istra) – šumsko tlo

Uzorci tla osušeni su na zraku, usitnjeni u mlincu, prosijani kroz sito veličine otvora 1 mm te pohranjeni na 4 °C do uporabe. Odabranim tlima određena su svojstva pH-vrijednost i udio organskog ugljika.

Vrijednost pH izmjerena je u suspenziji tla i vode u omjeru 1 : 2,5 nakon 24 sata uspostavljanja ravnoteže pri sobnoj temperaturi. Vrijednosti pH odabranih tla prikazane su u Tablici 12.

**Tablica 12.** Svojstva površinskih tla različitog podrijetla

Tlo	Svojstvo tla	
	pH (H <sub>2</sub> O)	Udio organskog ugljika / %
<b>Cmrok</b>	7,4	2,9
<b>Rudani</b>	5,4	1,7
<b>Šašinovec</b>	7,3	0,9

Udio organskog ugljika u tlu određen je iz razlike udjela ukupnog ugljika (TC) i anorganskog ugljika (IC), čiji su udjeli određeni metodom katalitički potpomognute oksidacije izgaranjem tla pri 900 °C (za analizu TC) i 200 °C (za analizu IC). Prije analize TC približno 100 mg tla rahlo je prekriveno keramičkom vunom u keramičkoj ladici. Udio TC u tlu određen je prema baždarnom pravcu D-(+)-glukoze u koncentracijskom rasponu od 5 do 20 mg C ( $r = 0,999$ ). Neposredno prije analize IC, približno 100 mg tla je zakiseljeno dodatkom 0,3 mL razrijeđene fosforne kiseline [ $\psi$  (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O) = 1 : 2]. Udio IC u tlu određen je prema baždarnom pravcu natrijeva karbonata u koncentracijskom rasponu od 4 do 17 mg C ( $r = 0,999$ ). Udio organskog ugljika u odabranim tlima je prikazan u Tablici 12.

### 3.4.1. Priprava uzoraka tla

Za određivanje djelotvornosti mikrovalno potpomognute ekstrakcije spojeva iz suhog tla, uzorci tla poznatih masenih udjela spojeva pripremljeni su dodatkom 100  $\mu\text{L}$  (niža razina) ili 200  $\mu\text{L}$  (viša razina) otopine SPIKE na 5 g suhog tla prethodno suspendiranog s 3 mL acetona. Pripremljeni uzorci tla ručno su promiješani i ostavljeni 24 h na zraku pri sobnoj temperaturi kako bi prije ekstrakcije aceton ishlapio.

Za određivanje djelotvornosti mikrovalno potpomognute ekstrakcije spojeva iz vlažnog tla (udio vode 20 %), uzorci tla poznatih masenih udjela spojeva pripremljeni su dodatkom 80  $\mu\text{L}$  (niža razina) ili 180  $\mu\text{L}$  (viša razina) otopine SPIKE na 4 g suhog tla prethodno suspendiranog s 3 mL acetona. Pripremljeni uzorci tla ručno su promiješani i ostavljeni 24 h na zraku pri sobnoj temperaturi kako bi aceton ishlapio. Neposredno prije ekstrakcije uzorcima je dodan 1 mL vode.

Slijepi uzorci tla pripremljeni su jednako kao i uzorci suhog/vlažnog tla, ali bez dodatka otopine SPIKE. Maseni udjeli spojeva u pripremljenim uzorcima tla prikazani su u Tablici 13.

**Tablica 13.** Maseni udjeli spojeva u uzorcima tla pripremljenim dodatkom otopine SPIKE

Spoj	Maseni udio / $\text{ng g}^{-1}$	
	Viša razina	Niža razina
<b>AMBA</b>	204	102
<b>MNBA</b>	198	99
<b>Mezotrion</b>	197	98
<b>Tembotrion</b>	194	97
<b>Topramezon</b>	194	97

### 3.4.2. Mikrovalno potpomognuta ekstrakcija spojeva iz tla

Uvjeti mikrovalno potpomognute ekstrakcije spojeva iz tla optimirani su analizom niza uzoraka suhog tla Šašinovec s dodatkom spojeva pri višoj razini masenih udjela ( $194 - 204 \text{ ng g}^{-1}$ ). Istražen je utjecaj sljedećih parametara na djelotvornost ekstrakcije:

- izbor otapala: metanol;  $\psi$  (metanol, aceton) = 1 : 1;  $\psi$  (acetonitril, 0,1 mol L<sup>-1</sup> HCl) = 9 : 1;  $\psi$  (acetonitril, 0,5 mol L<sup>-1</sup> HCl) = 9 : 1;  $\psi$  (metanol, 0,1 mol L<sup>-1</sup> HCl) = 9 : 1;  $\psi$  (metanol, 0,5 mol L<sup>-1</sup> HCl) = 9 : 1
- volumen otapala: 20 mL i 30 mL
- vrijeme zagrijavanja: 5 min i 10 min
- temperatura ekstrakcije: 60 °C, 80 °C i 100 °C

Ekstrakcija je provedena pri snazi magnetrona od 1200 W uz automatsko podešavanje intenziteta mikrovalova i umjereno magnetsko miješanje suspenzija tla i otapala. Uzorci su zagrijavani 5 minuta do postizanja željene temperature. Nakon hlađenja reakcijske smjese do sobne temperature, suspenzije su centrifugirane 10 minuta na 425 g. Ekstrakti tla su kapalicom pažljivo odvojeni od taloga i ukoncentrirani uparavanjem u vodenoj kupelji (~35 °C) pod strujom dušika do suhog ostatka. Suhi ostatak otopljen je u 1 mL otapala. Utjecaj izbora otapala na djelotvornost otapanja suhog ostatka istražen je s vodom i 0,1 %-tnom fosfornom kiselinom u vodi (pH = 2,2) te smjesama otapala  $\psi$  (metanol, voda) = 1 : 1 i  $\psi$  (acetonitril, voda) = 1 : 9. Otopljeni sadržaj snažno je promiješan nekoliko minuta na vorteksu i profiltriran neposredno prije tekućinskokromatografske analize. Masene koncentracije spojeva u ekstraktima tla određivane su tekućinskokromatografskom analizom metodom vanjskih standarda (Standardi 1 – 4).

### 3.4.3. Kalibracijske otopine pripravljene u ekstraktu tla

Utjecaj matrice na osjetljivost i selektivnost odziva detektora istražen je usporedbom nagiba baždarnih pravaca dobivenih analizom kalibracijskih otopina u vodi i u ekstraktu tla Šašinovec.

Za pripremu kalibracijskih otopina u ekstraktu tla, nekoliko odvaga od 5 g suhog tla Šašinovec ekstrahirano je 5 minuta s 30 mL metanola uz pomoć mikrovalova i magnetskog miješanja pri 60 °C. Iz spojenih ekstrakata tla otpipetirana su tri alikvota od 20 mL te je svakom alikvotu dodan određeni

volumen otopine SPIKE u nizu: 10  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{L}$  i 200  $\mu\text{L}$  za dobivanje otopina Standardi T1 – T3. Nakon toga, ekstrakti su upareni do suhog ostatka u vodenoj kupelji ( $\sim 35\text{ }^\circ\text{C}$ ) pod strujom dušika. Suhi ostatak je otopljen u 1 mL vode, sadržaj je promiješan nekoliko minuta na vorteksu te profiltriran neposredno prije analize. Masene koncentracije spojeva u kalibracijskim otopinama u ekstraktu tla prikazane su u Tablici 14.

**Tablica 14.** Masene koncentracije spojeva u kalibracijskim otopinama pripravljenim u ekstraktu tla

Spoj	Standard T1	Standard T2	Standard T3
	Masena koncentracija / $\mu\text{g mL}^{-1}$		
<b>AMBA</b>	0,051	0,510	1,001
<b>MNBA</b>	0,050	0,494	0,989
<b>Mezotrion</b>	0,049	0,491	0,983
<b>Tembotrion</b>	0,049	0,486	0,971
<b>Topramezon</b>	0,048	0,485	0,969

## ***4. Rezultati i rasprava***

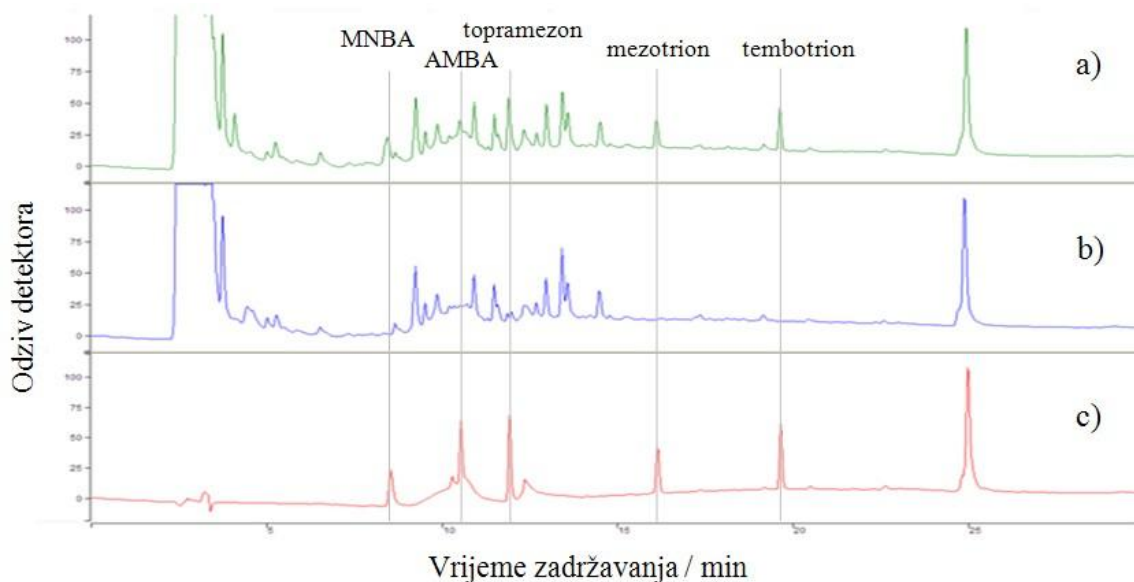
#### 4.1. Tekućinskokromatografska analiza topamezona, tembotriona, mezotriona i njegovih razgradnih produkata u ekstraktu tla

Zbog fizičko-kemijskih svojstava istraživanih spojeva (slabe kiseline s niskim tlakom para i dobrom topljivosti u vodi pri sobnoj temperaturi), za određivanje masenih koncentracija tembotriona, topamezona i mezotriona, kao i razgradnih produkata mezotriona AMBA i MNBA, u ekstraktu tla koristi se tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) uz UV detektor s nizom dioda (DAD)<sup>46</sup> ili uz spektrometar masa (MS) kao detektor.<sup>47</sup> U ovom radu optimirani su uvjeti za selektivnu i osjetljivu analizu spojeva ekstrahiranih iz tla metodom HPLC-UV-DAD. Kvalitativna analiza temeljila se na međusobnoj usporedbi vremena zadržavanja spojeva u kromatografskoj koloni i njihovih UV-spektara dobivenih analizom spojeva u kalibracijskoj otopini i u uzorku (ekstraktu tla).

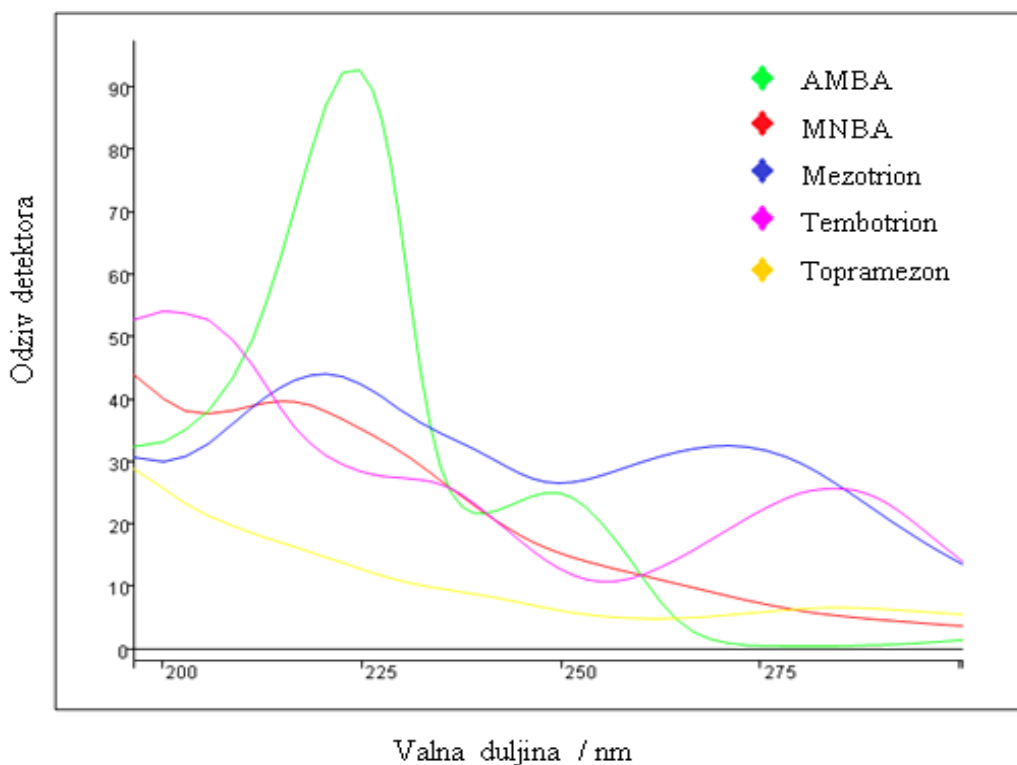
Selektivnost metode istražena je usporedbom kromatograma dobivenih analizom kalibracijskih otopina smjese spojeva u vodi i ekstrakta suhog tla Šašinovec s dodatkom i bez dodatka (slijepi uzorak) smjese spojeva (Slika 10). Gradijentnim eluiranjem spojeva acetonitrilom i zakiseljenom vodom (Tablica 8) iz nepolarne kromatografske kolone C<sub>18</sub> postignuto je djelotvorno razdvajanje analiziranih spojeva bez dodatnog postupka čišćenja ekstrakta tla.

Osjetljivost analize postignuta je detekcijom spojeva pri valnim duljinama maksimalne apsorpcije UV zračenja. Valne duljine detekcije odabrane su prema UV-spektrima snimljenim tijekom tekućinskokromatografske analize spojeva otopljenih pojedinačno u vodi (Slika 11). Za osjetljivu detekciju MNBA, tembotriona i topamezona u ekstraktima tla odabrana je valna duljina 205 nm, dok je za detekciju AMBA i mezotriona odabrana valna duljina 220 nm.



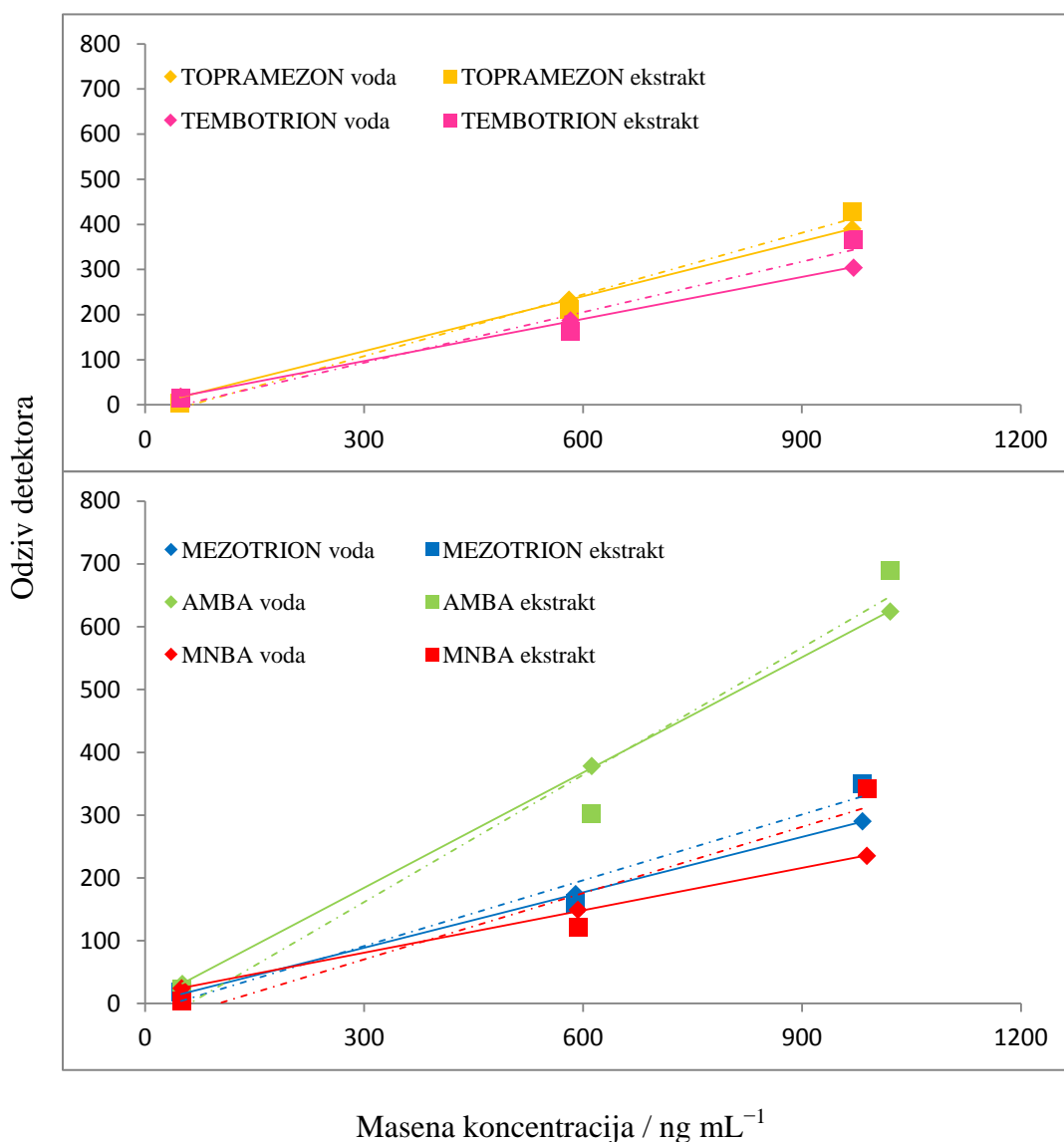


**Slika 10.** HPLC-UV-DAD kromatogrami dobiveni analizom a) ekstrakta suhog tla Šašinovec s dodatkom spojeva masenog udjela približno  $200 \text{ ng g}^{-1}$ , b) ekstrakta suhog tla Šašinovec bez dodatka spojeva (slijepi uzorak) i c) kalibracijske otopine u vodi masene koncentracije spojeva približno  $200 \text{ ng mL}^{-1}$



**Slika 11.** UV-spektri spojeva u vodi: AMBA ( $\lambda_{\text{max}} = 224 \text{ nm}$  i  $\lambda_{\text{max}} = 249 \text{ nm}$ ), MNBA ( $\lambda_{\text{max}} = 215 \text{ nm}$ ), mezotrion ( $\lambda_{\text{max}} = 220 \text{ nm}$  i  $\lambda_{\text{max}} = 267 \text{ nm}$ ), tembotrion ( $\lambda_{\text{max}} = 284 \text{ nm}$ ) i topramezon ( $\lambda_{\text{max}} = 284 \text{ nm}$ )

Svojstva matrice, prvenstveno udio organskog ugljika u tlu, mogu povećati ili smanjiti odziv UV-DAD detektora u odnosu na odziv detektora pri analizi spojeva u čistom otapalu (vodi).<sup>56</sup> Za istraživanje utjecaja matrice na odziv detektora konstruirani su kalibracijski pravci dobiveni regresijskom analizom kromatografskih podataka za kalibracijske otopine pripravljene u vodi (Tablica 10, Standardi 1, 3 i 4) i u ekstraktu tla Šašinovec (Tablica 14, Standardi T1 – T3). Kalibracijski pravci grafički su prikazani na Slici 12, a njihovi nagibi i koeficijenti korelacije ( $r$ ) navedeni su u Tablici 15.



**Slika 12.** Kalibracijski pravci za određivanje topamezona, tembotriona, mezotriona i njegova dva razgradna produkta AMBA i MNBA izračunani regresijskom analizom kromatografskih podataka za kalibracijske otopine pripravljene u vodi (puna crta) i u ekstraktu suhog tla Šašinovec (isprekidana crta)

**Tablica 15.** Utjecaj matrice na nagib i koeficijent korelacije ( $r$ ) kalibracijskih pravaca izračunanih regresijskom analizom kromatografskih podataka za kalibracijske otopine pripravljene u vodi i u ekstraktu suhog tla Šašincev

Spoj	Masena koncentracija / $\text{ng mL}^{-1}$	Matrica: ekstrakt tla	Matrica: ekstrakt tla
		Nagib pravca ( $r$ )	Nagib pravca ( $r$ )
AMBA	51 – 1021	0,612 (0,999)	0,675 (0,983)
MNBA	50 – 989	0,225 (0,999)	0,351 (0,966)
Mezotrion	49 – 983	0,294 (1,000)	0,349 (0,985)
Tembotrion	49 – 971	0,311 (0,999)	0,373 (0,983)
Topramezon	48 – 969	0,405 (1,000)	0,455 (0,995)

Rezultati regresijske analize upućuju na uže linearno područje metode s vanjskim standardima pripremljenim u ekstraktu tla nego u vodi. Visoki koeficijenti korelacije ( $> 0,999$ ) linearne regresije podataka dobivenih analizom kalibracijskih otopina u vodi upućuju na linearnost metode u rasponu koncentracija 50–1000  $\text{ng mL}^{-1}$ . Koeficijenti korelacije u rasponu 0,966 – 0,995 dobiveni analizom kalibracijskih otopina u ekstraktu tla ukazuju na nelinearni odziv detektora u istraživanom koncentracijskom području. Testiranjem razlike između analitičkih povrata spoja izračunanih prema kalibracijskim pravcima konstruiranih analizom otopina u vodi i ekstraktu tla nije dobivena statistički značajna razlika na nivou značajnosti  $p < 0,05$ . Sukladno tome, kalibracijske otopine pripravljene u vodi prikladne su za određivanje masenih udjela tembotriona, topamezona, mezotriona i njegovih razgradnih produkata u tlu koje ne sadrži više od 1 % organskog ugljika.

Preciznost metode pod uvjetima ponovljivosti (jednodnevna analiza) i obnovljivosti (dvodnevna analiza) provjerena je analizom kalibracijskih otopina pripremljenih u vodi pri koncentracijskim razinama 50  $\text{ng mL}^{-1}$  (Standard 1, Tablica 10) i 1000  $\text{ng mL}^{-1}$  (Standard 4, Tablica 10). Ponovljivost i obnovljivost analitičkih rezultata, izražena relativnim standardnim odstupanjem (RSO), prikazana je u Tablici 16.

**Tablica 16.** Preciznost (ponovljivost i obnovljivost) tekućinskokromatografske analize spojeva u kalibracijskim otopinama pripremljenim u vodi pri dvije koncentracijske razine

Spoj	Ponovljivost, RSO (%) Broj mjerenja = 6		Obnovljivost, RSO (%) Broj mjerenja = 10	
	Razina 50 ng mL <sup>-1</sup>	Razina 1000 ng mL <sup>-1</sup>	Razina 50 ng mL <sup>-1</sup>	Razina 1000 ng mL <sup>-1</sup>
AMBA	4	1	3	1
MNBA	10	2	10	2
Mezotrion	5	1	10	1
Tembotrion	4	1	5	2
Topramezon	10	< 1	13	1

Rezultati pokazuju da uvjeti tekućinskokromatografske analize omogućuju dobru ponovljivost ( $RSO \leq 10\%$ ) i obnovljivost ( $RSO \leq 13\%$ ) mjerenja svih spojeva. Pri višoj masenoj koncentraciji spojeva u uzorku postignuta je veća ponovljivost i obnovljivost analize ( $RSO \leq 2\%$ ), dok je pogreška mjerenja pri nižoj koncentracijskoj razini bila u rasponu 4 – 10 % za ponovljivost i 3 – 13 % za obnovljivost analize. Najveće pogreške mjerenja mogu se očekivati pri analizi topramezona i MNBA. Osjetljivost HPLC-UV-DAD analize topramezona i MNBA je ograničena njihovom slabom apsorpcijom UV zračenja (UV-spektri bez intenzivnih apsorpcijskih maksimuma).

#### **4.2. Optimiranje uvjeta mikrovalno potpomognute ekstrakcije topramezona, tembotriona, mezotriona i njegovih razgradnih produkata iz tla**

Za ekstrakciju analita iz tla odabrana je metoda ekstrakcije mikrovalovima, kao relativno brza, djelotvorna i precizna analitička metoda akumuliranja spojeva iz čvrste faze. Razrada uvjeta za djelotvornu ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima uključila je odabir otapala i njegovog volumena te optimiranje temperature ekstrakcije i vremena zagrijavanja ekstrakcijske smjese. Svojstva matrice koja mogu bitno utjecati na djelotvornost mikrovalno potpomognute ekstrakcije spojeva iz tla također su istražena.

#### 4.2.1. Izbor otapala i optimiranje volumena otapala

Priroda otapala je najvažniji čimbenik koji utječe na djelotvornost svake vrste ekstrakcije. Izbor otapala za ekstrakciju slijedi pravilo "sličnosti", što znači da će se analit lakše akumulirati u kemijski sličnom otapalu. Između dva otapala sličnih kemijskih svojstava odabire se ono koje će selektivnije ekstrahirati analit, uz što manje interferirajućih tvari iz matrice. Najvažnije svojstvo otapala za ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima je polarnost izražena dielektričnom konstantom. U pravilu, otapalo s većom dielektričnom konstantom (polarnije otapalo) apsorbira veću količinu mikrovalova, jače se zagrijava i djelotvornije ekstrahira spojeve iz čvrste matrice.<sup>40,43,58</sup> Najčešće korištena organska otapala za mikrovalno potpomognutu ekstrakciju herbicida iz tla su aceton, metanol i acetonitril, s dielektričnim konstantama u rasponu od 21 do 37.<sup>58</sup> Napolarna otapala (heksan, benzen, toluen, kloroform, dietil-eter, etil-acetat), s dielektričnim konstantama u rasponu od 2 do 6, slabo apsorbiraju mikrovalove ili ih propuštaju te se stoga ne zagrijavaju. Smjesa polarnog i napolarnog otapala koristi se za mikrovalno potpomognutu ekstrakciju termolabilnih ili hlapljivih spojeva, jer omogućuje održavanje temperature smjese otapala ispod kritične.<sup>40,42,43,58</sup> Voda, kao najpolarnije otapalo (dielektrična konstanta 80), apsorbira najviše energije mikrovalova, što pospješuje ekstrakciju polarnih spojeva iz tla. Najčešći problem koji se javlja pri ekstrakciji vodom je niska selektivnost ekstrakcije, zbog koje se uz analit ekstrahiraju i brojne druge tvari iz tla. U kromatografskoj analizi interferencije su jače izražene pri ekstrakciji spojeva iz humusnog tla te je u takvom slučaju analitičku metodu potrebno dopuniti postupkom čišćenja ekstrakta.

Đurović i suradnici<sup>50</sup> su istraživali utjecaj prirode otapala na djelotvornost čvrsto-tekućinske ekstrakcije različitih vrsta pesticida iz tla. Najvišu djelotvornost ekstrakcije postigli su smjesom otapala  $\psi$  (metanol, aceton) = 1 : 1. Barchanska i suradnici<sup>46</sup> su istraživali utjecaj prirode otapala na djelotvornost ekstrakcije mezotriona, atrazina i njihovih razgradnih produkata iz tla. Pritom su za ekstrakciju mehaničkim izmućkavanjem koristili metanol, aceton i etil-acetat te smjese otapala:  $\psi$  (metanol, voda) = 7 : 3 i  $\psi$  (acetonitril, 0,1 mol L<sup>-1</sup> klorovodična kiselina) = 9 : 1. Najdjelotvornija ekstrakcija istraživanih spojeva postignuta je smjesom otapala  $\psi$  (acetonitril, 0,1 mol L<sup>-1</sup> klorovodična kiselina) = 9 : 1 (povrat ekstrakcije mezotriona iz tla bio je 98 %). Ujedno, ovom smjesom otapala ekstrahiralo se najmanje interferencija iz matrice. Metanol, kao polarno protično otapalo, prikladan je za

mikrovalno potpomognutu ekstrakciju umjereno polarnih i slabo bazičnih spojeva, primjerice triazinskih herbicida, iz neutralnog i slabo humusnog poljoprivrednog tla.<sup>59</sup>

U okviru ovog rada istražena je djelotvornost istovremene mikrovalno potpomognute ekstrakcije relativno polarnih herbicida topamezona, tembotriona, mezotriona i njegova dva produkta razgradnje AMBA i MNBA iz poljoprivrednog tla različitim polarnim otapalima: metanolom i smjesama otapala  $\psi$  (metanol, aceton) = 1 : 1,  $\psi$  (metanol, 0,1 mol L<sup>-1</sup> HCl) = 9 : 1,  $\psi$  (metanol, 0,5 mol L<sup>-1</sup> HCl) = 9 : 1,  $\psi$  (acetonitril, 0,1 mol L<sup>-1</sup> HCl) = 9 : 1 i  $\psi$  (acetonitril, 0,5 mol L<sup>-1</sup> HCl) = 9 : 1. Rezultati ovog istraživanja prikazani su u Tablici 17.

Analitički povrat topamezona, tembotriona i mezotriona nakon ekstrakcije metanolom iz tla bio je manji od 60 % (RSO < 18 %) i u skladu s razlikama u topljivosti spojeva u vodi. Ekstrakcija razgradnih produkata AMBA i MNBA metanolom iz tla pokazala je slabe rezultate (povrat oba spoja bio je manji od 44 % uz RSO ≤ 23 %). Ekstrakcija smjesom metanola i acetona u jednakim udjelima pokazala se još manje djelotvornom od ekstrakcije metanolom, pri čemu je povrat ekstrakcije svih spojeva bio manji od trećine njihovog masenog udjela u tlu.

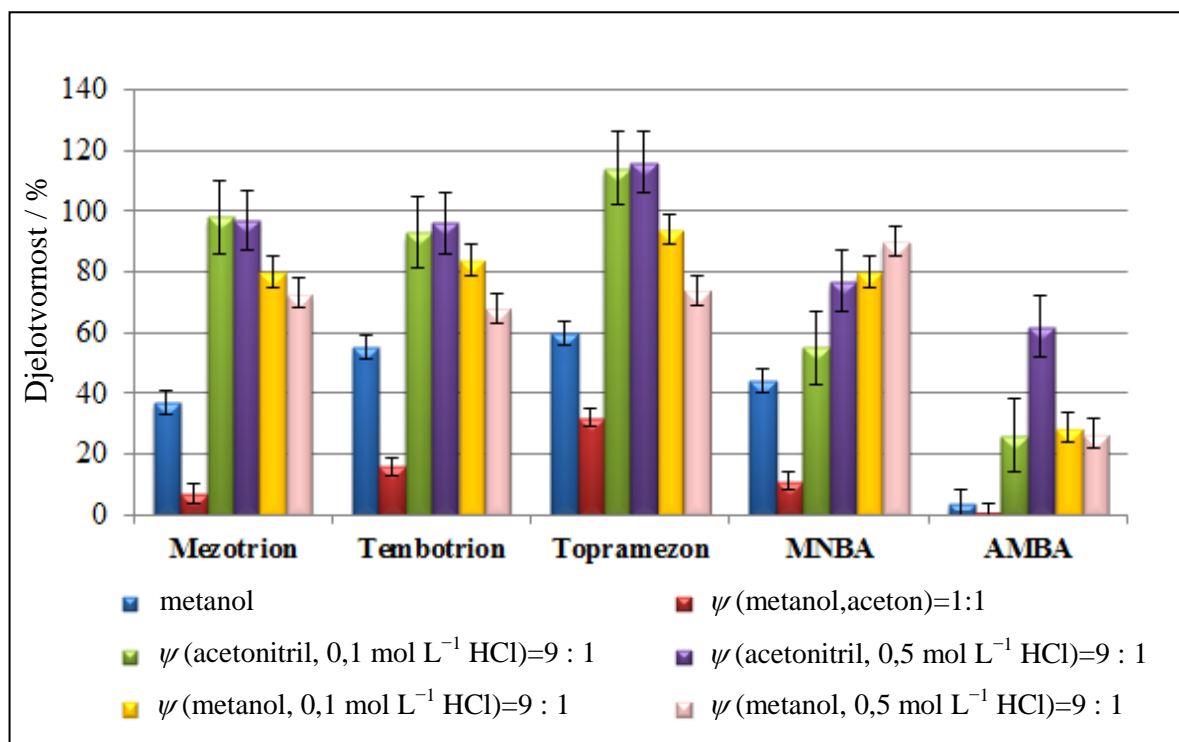
Zakiseljavanjem metanola dodatkom 10 % 0,1 mol L<sup>-1</sup> klorovodične kiseline povećana je djelotvornost mikrovalno potpomognute ekstrakcije svih istraživanih spojeva. Izvorni herbicidi i MNBA ekstrahirali su se kvantitativno (> 80 %, RSO < 11 %). Smjesom otapala koja uključuje koncentriraniju klorovodičnu kiselinu (0,5 mol L<sup>-1</sup>) postignut je viši analitički povrat MNBA, ali niži mezotriona. Negativan učinak ovakve smjese otapala na analitički povrat spojeva zapažen je i pri ekstrakciji tembotriona i topamezona. Razlog tomu može biti razgradnja izvornih herbicida u kiselijim uvjetima ekstrakcije.

**Tablica 17.** Djelotvornost i ponovljivost (RSO) mikrovalno potpomognute ekstrakcije spojeva iz suhog poljoprivrednog tla Šašinovec u ovisnosti o prirodi otapala. Maseni udjeli spojeva u tlu: 194 – 204 ng g<sup>-1</sup>; uvjeti ekstrakcije: zagrijavanje 5 min pri 60 °C uz magnetno miješanje

Otapalo	Analitički povrat (RSO) / % Broj uzoraka = 3-5				
	AMBA	MNBA	Mezotrion	Tembotrion	Topramezon
MeOH	4 (23)	44 (18)	37 (8)	55 (7)	60 (9)
$\psi$ (MeOH, aceton) = 1 : 1	<GK	11 (16)	7 (7)	16 (15)	32 (33)
$\psi$ (MeOH, 0,1 M HCl) = 9 : 1	29 (3)	80 (6)	80 (7)	84 (6)	94 (11)
$\psi$ (MeOH, 0,5 M HCl) = 9 : 1	27 (15)	90 (7)	73 (7)	68 (7)	74 (6)
$\psi$ (ACN, 0,1 M HCl) = 9 : 1	26 (18)	55 (24)	98 (13)	93 (16)	114 (11)
$\psi$ (ACN, 0,5 M HCl) = 9 : 1	62 (2)	77 (9)	97 (9)	96 (10)	116 (19)

MeOH = metanol; ACN = acetonitril; HCl = klorovodična kiselina; M = mol L<sup>-1</sup>; GK = granica kvantifikacije

Smjesa metanola i klorovodične kiseline nije prikladno otapalo za mikrovalno potpomognutu ekstrakciju AMBA iz tla (povrat manji od 30 %). Dvostruko veći povrat ekstrakcije AMBA (približno 60 %) postignut je smjesom otapala u kojoj je metanol zamijenjen polarnim aprotičnim otapalom acetonitrilom i zakiseljen s 10 % 0,5 mol L<sup>-1</sup> klorovodične kiseline. Uz navedenu smjesu otapala postignuti su najveći povrati svih spojeva, u rasponu od 62 % za AMBA do 116 % za topramezon, iako je djelotvornost ekstrakcije AMBA i nadalje preniska. Međutim, zbog slabije selektivnosti ekstrakcije sa zakiseljenim acetonitrilom, koja utječe na odziv UV detektora te rezultira sniženom preciznošću analize i analitičkim povratom ekstrakcije preko 100 % (Slika 13), smjesa otapala koja uključuje 10 % 0,1 mol L<sup>-1</sup> klorovodične kiseline u metanolu izabrana je kao najprikladnije otapalo za mikrovalno potpomognutu ekstrakciju istraživanih topramezona, tembotriona, mezotriona i MNBA iz suhog poljoprivrednog tla.



**Slika 13.** Grafički prikaz ovisnosti djelotvornosti mikrovalno potpomognute ekstrakcije spojeva iz tla o prirodi otapala

Tradicionalne metode ekstrakcije u pravilu koriste velike volumene organskih otapala kako bi se povisila djelotvornost ekstrakcije. Na djelotvornost mikrovalno potpomognute ekstrakcije može se utjecati i volumenom otapala za ekstrakciju, koji treba prilagoditi masi tla. Premali volumen otapala će nedovoljno suspendirati uzorak, dok će se za preveliki volumen otapala utrošiti nepotrebna snaga mikrovalova te više vremena za zagrijavanje i hlađenje ekstrakcijske smjese. Osim toga, preveliki volumen otapala može rezultirati neujednačenom raspodjelom mikrovalova unutar matrice, što također snižava djelotvornost ekstrakcije analita.<sup>58</sup>

Patsias i suradnici<sup>60</sup> su istraživali utjecaj volumena otapala na djelotvornost mikrovalno potpomognute ekstrakcije herbicida iz tla i zaključili da se povećanjem volumena otapala do 50 mL djelotvornost ekstrakcije povisuje. Daljnje povećavanje volumena otapala nije imalo utjecaja na djelotvornost ekstrakcije ili ju je snizilo. Optimalni omjer suspenzije tla i otapala bio je 1 : 5. Lopez-Avila i suradnici<sup>61</sup> su uz pomoć mikrovalova ekstrahirali organska onečišćivala iz suspenzije tla i otapala u omjeru 1 : 6, čime su postigli analitički povrat analita veći od 65 % uz RSO < 15 %.

Slijedeći literaturne navode, u ovom radu istražen je volumen otapala za djelotvornu mikrovalno potpomognutu ekstrakciju topramezona, tembotriona,



mezotriona i njegovih razgradnih produkata iz suhog tla. Rezultati analitičkih povrata nakon ekstrakcije spojeva smjesom otapala  $\psi$  (metanol, 0,1 mol L<sup>-1</sup> klorovodična kiselina) = 9 : 1 u različitim omjerima tla i otapala u suspenziji prikazani su u Tablici 18.

**Tablica 18.** Djelotvornost i ponovljivost (RSO) mikrovalno potpomognute ekstrakcije spojeva iz suhog poljoprivrednog tla Šašincev u ovisnosti o volumenu otapala za ekstrakciju. Maseni udjeli spojeva u tlu: 194 – 204 ng g<sup>-1</sup>; uvjeti ekstrakcije: zagrijavanje 5 min pri 60 °C uz magnetno miješanje

Spoj	Analitički povrat (RSO) / % Broj uzoraka = 3-5	
	Masa tla : volumen otapala 1 : 4	Masa tla : volumen otapala 1 : 6
AMBA	11 (27)	29 (3)
MNBA	39 (9)	80 (6)
Mezotrion	75 (8)	80 (7)
Tembotrion	83 (4)	84 (6)
Topramezon	68 (4)	94 (11)

Analitički povrat spojeva nakon ekstrakcije iz suspenzije tla i otapala u omjeru 1 : 4 bio je u rasponu od 11 % (AMBA) do 83 % (tembotrion) uz RSO < 10 %, osim za AMBA, čiji su rezultati analize bili raspršeni zbog njegove vrlo slabe ekstrakcije. Veći volumen otapala za ekstrakciju (suspenzija tla i otapala u omjeru 1 : 6) povisio je djelotvornost ekstrakcije oba razgradna produkta mezotriona, čime je postignuta kvantitativna ekstrakcija MNBA, dok je povrat AMBA i dalje ostao prenizak. Nakon ekstrakcije s većim volumenom otapala povrat herbicida bio je kvantitativan (veći od 80 %, RSO ≤ 11 %).

#### 4.2.2. Optimiranje temperature ekstrakcije i vremena zagrijavanja

Ekstrakcija spojeva iz tla u pravilu je djelotvornija pri povišenim temperaturama, budući da viša temperatura smanjuje viskoznost i površinsku napetost otapala koje onda lakše prodire u matricu i otapa analit. Nakon optimalne temperature djelotvornost ekstrakcije obično se snižava.<sup>58</sup> Budući da se reakcijska smjesa nalazi u zatvorenom sustavu, ekstrakcija mikrovalovima može se provoditi i pri temperaturi višoj od vrelišta

otapala što pogoduje desorpciji čvrsto vezanog analita na sastojak matrice tla. Temperaturu ekstrakcije treba optimirati obzirom na termičku stabilnost analita. Temperatura ekstrakcijske smjese prati se temperaturnim senzorom u kontrolnoj kiveti, a kontrolira snagom magnetrona, odnosno podešavanjem intenziteta mikrovalova obzirom na broj uzoraka, tj. ukupan volumen otapala u mikrovalnoj pećnici.<sup>43,58</sup>

Za djelotvornu mikrovalno potpomognutu ekstrakciju herbicida iz tla Patsias i suradnici<sup>60</sup> navode optimalnu temperaturu 80 °C. Pylypiw i suradnici<sup>49</sup> su zaključili da je za istovremenu mikrovalno potpomognutu ekstrakciju herbicida klorotalonila, azinfos-metila, daktala, metoksiklora, permetrina, diazinona i klorpirifosa iz različitih vrsta povrća povoljna temperatura ekstrakcije u rasponu 80 – 100 °C. Shen i suradnici<sup>57</sup> su objavili da se herbicidi simazin, atrazin, propazin i prometrin najdjelotvornije ekstrahiraju iz tla pri temperaturi 105 °C. U ovom radu istražena je ovisnost djelotvornosti mikrovalno potpomognute ekstrakcije topamezona, tembotriona, mezotriona i njegovih razgradnih produkata smjesom otapala  $\psi$  (metanol, 0,1 mol L<sup>-1</sup> klorovodična kiselina) = 9 : 1 iz tla o temperaturi u rasponu od 60 do 100 °C. Rezultati ovog istraživanja prikazani su u Tablici 19.

Pri 60 °C kvantitativno su ekstrahirani topamezon, tembotrion, mezotrion i MNBA (povrat  $\geq 80$  %, RSO  $\leq 11$  %). Povišenjem temperature za 20 °C snizila se djelotvornost ekstrakcije topamezona i povicila djelotvornost ekstrakcije MNBA, oba spoja za približno 20 %. Iako se činilo da se daljnjim povišenjem temperature ekstrahira manja količina mezotriona i MNBA, zapaženo sniženje djelotvornosti ekstrakcije nije bilo statistički značajno. Optimiranje temperature ekstrakcije nije povicilo djelotvornost ekstrakcije AMBA iz tla, čiji je najveći povrat bio manji od 30 % (RSO  $\leq 15$  %).

**Tablica 19.** Djelotvornost i ponovljivost (RSO) mikrovalno potpomognute ekstrakcije spojeva iz suhog poljoprivrednog tla Šašinovec u ovisnosti o temperaturi. Maseni udjeli spojeva u tlu: 194 – 204 ng g<sup>-1</sup>; vrijeme zagrijavanja: 5 min uz magnetno miješanje

Spoj	Analitički povrat (RSO) / % Broj uzoraka = 4 – 5		
	60 °C	80 °C	100 °C
<b>AMBA</b>	29 (3)	17 (15)	23 (8)
<b>MNBA</b>	80 (6)	100 (7)	98 (6)
<b>Mezotrion</b>	80 (7)	83 (11)	70 (3)
<b>Tembotrion</b>	84 (6)	86 (10)	81 (3)
<b>Topramezon</b>	94 (11)	76 (8)	90 (3)

Može se zaključiti da su za djelotvornu ekstrakciju istraživanih herbicida i MNBA prikladne temperature u rasponu 60 – 100 °C. Ovisno o vrsti matrice, povišenjem temperature lakše se koekstrahiraju i dodatne tvari iz matrice koje smanjuju selektivnost metode ekstrakcije. Stoga je za istraživanje u ovom radu odabrana optimalna temperatura ekstrakcije 60 °C.

Vremenski period zagrijavanja ekstrakcijske smjese mikrovalovima također može utjecati na djelotvornost ekstrakcije. Općenito, što je period kontakta matrice i otapala dulji, difuzija analita u otapalo će biti uspješnija. Ukoliko se ekstrakcija provodi u blizini temperature kritične za početak razgradnje analita, tada je poželjno da period zagrijavanja traje što kraće.<sup>58</sup> U Tablici 20 uspoređena je djelotvornost mikrovalno potpomognute ekstrakcije topamezona, tembotriona, mezotriona i njegovih razgradnih produkata AMBA i MNBA smjesom otapala  $\psi$  (metanol, 0,1 mol L<sup>-1</sup> klorovodična kiselina) = 9 : 1 iz suhog poljoprivrednog tla, određena s vremenom zagrijavanja reakcijske smjese 5 minuta i 10 minuta.

Pet minuta zagrijavanja ekstrakcijske smjese bilo je dovoljno za kvantitativni povrat topamezona, tembotriona, mezotriona i MNBA iz tla uz ponovljivost RSO < 11 %. Deset minuta zagrijavanja ekstrakcijske smjese snizilo je djelotvornost ekstrakcije topamezona, a povišilo djelotvornost ekstrakcije MNBA. Vrijeme zagrijavanja nije značajno utjecalo na djelotvornost ekstrakcije AMBA.

**Tablica 20.** Djelotvornost i ponovljivost (RSO) mikrovalno potpomognute ekstrakcije spojeva iz suhog poljoprivrednog tla Šašinovec u ovisnosti o vremenu zagrijavanja. Maseni udjeli spojeva u tlu: 194 – 204 ng g<sup>-1</sup>; temperatura ekstrakcije: 60 °C uz magnetno miješanje

Spoj	Analitički povrat (RSO) / % Broj uzoraka = 4 – 5	
	Zagrijavanje 5 min	Zagrijavanje 10 min
AMBA	29 (3)	20 (29)
MNBA	80 (6)	94 (7)
Mezotrion	80 (7)	76 (6)
Tembotrion	84 (6)	76 (6)
Topramezon	94 (11)	64 (8)

Za djelotvornu istovremenu ekstrakciju istraživanih herbicida i MNBA iz tla prikladno vrijeme zagrijavanja je 5 minuta.

### 4.3. Otapanje suhog ostatka ekstrakta tla prije završne analize

Zbog povećanja osjetljivosti završne tekućinskrokromatografske analize, analizirane spojeve u ekstraktu tla treba ukoncentrirati uparavanjem otapala za ekstrakciju do suhog ostatka. Otapalo koje će djelotvorno otopiti analit, a ujedno biti prikladno za završnu kromatografsku analizu, također treba optimirati. Djelotvornost otapanja suhog ostatka ekstrakta tla provjerena je u četiri različita otapala: vodi, kiseloj pokretnoj fazi B za HPLC-UV-DAD analizu te dvije smjese otapala odabrane prema literaturnim navodima koje uključuju dva najčešće primjenjivana organska otapala (metanol ili acetonitril) i vodu. Rezultati analitičkih povrata prikazani su u Tablici 21.

**Tablica 21.** Djelotvornost otapanja suhog ostatka ekstrakta tla u ovisnosti o prirodi otapala za resuspenziju

Spoj	Analitički povrat / %			
	Voda	0,1 %-tna H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (pokretna faza B)	$\psi$ (MeOH, voda) = 1 : 1	$\psi$ (ACN, voda) = 1 : 9
AMBA	92	73	105	102
MNBA	105	80	80	112
Mezotrion	105	82	113	111
Tembotrion	102	70	109	104
Topramezon	94	65	102	98

H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> = fosforna kiselina; MeOH = metanol; ACN = acetonitril

Najniži povrat svih spojeva od 65 do 82 % dobiven je nakon otapanja suhog ostatka u kiseloj pokretnoj fazi B (pH = 2,2). Analit koji djeluje kao slaba kiselina u vrlo kiselim uvjetima prelazi iz anionskog u neutralni oblik u kojem se lakše adsorbira na čestice hidrofobne nepokretne faze u HPLC-koloni i apsorbira UV-zrake. Hidrolitička razgradnja neutralnih molekula analita brža je u vrlo kiselim uvjetima, što vjerojatno snizuje analitički povrat spojeva nakon otapanja u pokretnoj fazi B. Otapanje suhog ostatka u preostala tri otapala bilo je podjednako djelotvorno (povrat  $\geq 80$  %). Zbog jednostavnosti postupka odabrana je voda kao najprikladnije otapalo za otapanje suhog ostatka ekstrakta prije tekućinskokromatografske analize.

#### 4.4. Utjecaj masenog udjela spojeva u tlu na djelotvornost mikrovalno potpomognute ekstrakcije

Analitička metoda koja uključuje ekstrakciju spojeva iz tla uz pomoć mikrovalova i tekućinskokromatografsku analizu razrađena je pri udjelu spojeva u tlu od približno 200 ng g<sup>-1</sup>. Budući da su u realnim uvjetima ostatci herbicida u tlu prisutni u tragovima (maseni udjeli na razini desetak ng g<sup>-1</sup>, koji u ekstraktu tla nakon postupka akumuliranja i koncentriranja iznose približno 100 ng g<sup>-1</sup>), djelotvornost analitičkog postupka provjerena je i pri razini masenih udjela spojeva u tlu u rasponu 97 – 102 ng g<sup>-1</sup>. Usporedba rezultata ovog istraživanja prikazana je u Tablici 22.

**Tablica 22.** Djelotvornost mikrovalno potpomognute ekstrakcije spojeva iz suhog poljoprivrednog tla Šašinovec u ovisnosti o masenom udjelu spojeva u tlu

Spoj	Analitički povrat (RSO) / % Broj uzoraka = 4-5	
	Maseni udio 194 – 204 ng g <sup>-1</sup>	Maseni udio 97 – 102 ng g <sup>-1</sup>
<b>AMBA</b>	29 (3)	12 (17)
<b>MNBA</b>	80 (6)	81 (19)
<b>Mezotrion</b>	80 (7)	66 (22)
<b>Tembotrion</b>	84 (6)	69 (11)
<b>Topramezon</b>	94 (11)	89 (11)

Pri manjim masenim udjelima rezultati analize pokazuju kvantitativnu ekstrakciju topramezona i MNBA iz tla. Iako se čini da je djelotvornost ekstrakcije tembotriona i mezotriona pri udjelima približno 100 ng g<sup>-1</sup> nešto niža od djelotvornosti ekstrakcije pri udjelima približno 200 ng g<sup>-1</sup>, ta razlika nije bila statistički značajna ukoliko se ubroji ponovljivost određivanja. Zbog otežanog integriranja površina kromatografskih pikova, analiza ekstrakata s vrlo niskim masenim koncentracijama spojeva nije visoko precizna. Djelotvornost ekstrakcije AMBA je gotovo izvan dosega metode analize predložene u ovom radu. Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da je metoda ekstrakcije topramezona, tembotriona, mezotriona i MNBA iz suhog tla uz pomoć mikrovalova primjenjiva za njihovu analizu u rasponu masenih udjela 97 – 204 ng g<sup>-1</sup>.

Granica detekcije i granica kvantifikacije spojeva u tlu određene su analizom razrijeđenih ekstrakata suhog tla Šašinovec iz omjera visine pika analita i šuma osnovne linije 3 : 1 za granicu detekcije i 10 : 1 za granicu kvantifikacije.<sup>54</sup> Granica detekcije istraživanih spojeva u suhom tlu bila je 5 ng g<sup>-1</sup>, a granica kvantifikacije 15 ng g<sup>-1</sup>.

#### 4.5. Utjecaj svojstava tla na djelotvornost mikrovalno potpomognute ekstrakcije

Osim uvjeta mikrovalno potpomognute ekstrakcije, na djelotvornost ekstrakcije utječu i svojstva matrice, u ovom radu svojstva tla. Najvažnija svojstva tla su udio vlage i organskog ugljika te pH-vrijednost vodene suspenzije tla. Metoda ekstrakcije mikrovalovima razrađena je na suhom poljoprivrednom tlu, tipičnom za uzgoj kukuruza u kontinentalnoj sredini. Takvo tlo je neutralno (pH 6,5 – 7,3) i sadrži nizak udio organskog ugljika (približno 1 %). S obzirom da se benzoilcikloheksanonski i benzoilpirazolni herbicidi u vodenoj otopini ponašaju poput slabih kiselina, njihov intenzitet adsorpcije u tlu ovisi o pH-vrijednosti tla te je veći u kiselom tlu. Budući da se organska tvar pridružena tlu smatra glavnim sastojkom tla koji hidrofobnim i vodikovim vezama zadržava analit i tako otežava djelotvornost njegove ekstrakcije iz tla, intenzitet adsorpcije spojeva koji djeluju kao slabe kiseline bit će veći u kiselim uvjetima u kojima je takav analit prisutan kao neutralna molekula.<sup>32</sup> Stoga se iz kiselih humusnih tla očekuje niža djelotvornost ekstrakcije topamezona, tembotriona, mezotriona i njegovih razgradnih produkata nego iz neutralnih tla, s vrlo niskim udjelom humusa.

U okviru ovog rada djelotvornost predložene metode, optimirane za mikrovalno potpomognutu ekstrakciju spojeva iz suhog neutralnog i slabo humusnog tla, istražena je i pri analizi spojeva u suhom humusnom tlu (šumsko tlo Cmrok) te u suhom kiselom tlu (šumsko tlo Rudani). Rezultati ovog istraživanja uspoređeni su s analitičkim povratom spojeva određenim pri njihovoj ekstrakciji iz tla Šašinovec (Tablica 23).

Djelotvornost mikrovalno potpomognute ekstrakcije istraživanih spojeva iz kiselog tla Rudani (pH 5,4) bila je niža (analitički povrat  $\leq 50$  %) od ekstrakcije iz neutralnog tla Šašinovec. U neutralnom tlu anioni slabih kiselina mogu formirati stabilne ionske komplekse s kationima mineralne faze tla, otporne na hidrolitičku razgradnju. U kiselom tlu, negativni naboj slabih kiselina neutralizira se viškom protona iz matrice te se takve molekule lakše vežu vodikovim i hidrofobnim vezama na čestice organske tvari iz tla i teže se ekstrahiraju. Ujedno, neutralna molekula je manje otporna prema hidrolizi te se zbog razgradnje analita opaža niža djelotvornost ekstrakcije.<sup>27</sup> Dodatno, preciznost analize spojeva iz tla Rudani bila je umanjena zbog utjecaja matrice, odnosno većeg broja ekstrahiranih tvari koje ometaju selektivnu analizu analita.

**Tablica 23.** Djelotvornost mikrovalno potpomognute ekstrakcije spojeva iz suhih tla različitog sastava (udjela organskog ugljika i pH). Maseni udjeli spojeva: 194 – 204 ng g<sup>-1</sup>

Spoj	Analitički povrat (RSO) / % Broj uzoraka = 4 – 5		
	Cmrok pH = 7,4 OC = 2,9 %	Rudani pH = 5,4 OC = 1,7 %	Šašinovec pH = 7,3 OC = 0,9 %
<b>AMBA</b>	20 (32)	19 (23)	29 (3)
<b>MNBA</b>	95 (7)	32 (4)*	80 (6)
<b>Mezotrion</b>	58 (13)	12 (30)*	80 (7)
<b>Tembotrion</b>	59 (15)	18 (29)*	84 (6)
<b>Topramezon</b>	63 (11)	50 (12)*	94 (11)

\* interferencije; OC = organski ugljik u tlu

Može se zaključiti da kiselost tla snižava djelotvornost mikrovalno potpomognute ekstrakcije slabih kiselina.

Neutralna tla Cmrok i Šašinovec razlikuju se prema udjelu organskog ugljika. U takvim tlama istraživani spojevi prisutni su većinom kao anioni koji radije formiraju ionske parove nego što se vežu na organsku tvar iz tla. Korelacija između udjela organskog ugljika u tlu i stabilnosti triketona i njihovih razgradnih produkata u literaturi nije uočena.<sup>27</sup> Budući da je u tlu Cmrok mineralna faza tla zasjenjena humusom, očekuje se da će djelotvornost ekstrakcije spojeva iz tla Cmrok biti podjednaka ili viša nego što je to bila iz tla Šašinovec. Međutim, djelotvorno se ekstrahirao jedino MNBA, dok je djelotvornost ekstrakcije triketonskih i pirazolnog herbicida iz tla Cmrok bila za približno 20 % niža od ekstrakcije iz tla Šašinovec. Ovakvo zapažanje može biti posljedica koekstrakcije interferirajućih tvari podrijetlom iz organske faze tla, u većoj mjeri iz humusnog šumskog tla nego iz poljoprivrednog tla. Na to upućuju manje precizna mjerenja postignuta pri analizi spojeva u tlu Cmrok (RSO = 11 – 15 %) nego u tlu Šašinovec (RSO = 6 – 11 %). Za ponašanje herbicida u tlu, uz udio važan je i sastav organske tvari, koji proizlazi iz podrijetla (načina postanka) i starosti humusa u tlu. Sastav šumskog i poljoprivrednog humusa se razlikuje te se ne očekuje sličan utjecaj tih dviju matrica na djelotvornost ekstrakcije spojeva. Ekstrakt tla djelomično se može



pročistiti izmućkavanjem s diklormetanom ili propuštanjem zakiseljenog ekstrakta kroz stupac hidrofobnog sorbensa.<sup>27</sup>

Ovisno o kapacitetu tla za zadržavanje vode, realni uzorak tla u pravilu sadrži određeni udio vode, koji prosječno iznosi između 15 i 25 %.<sup>58</sup> Pri razradi metode ekstrakcije mikrovalovima potrebno je istražiti i utjecaj vlage iz tla na djelotvornost ekstrakcije analita. Prirodno prisutna voda u tlu mijenja (povećava) polarnost otapala za ekstrakciju te obično povećava djelotvornost mikrovalno potpomognute ekstrakcije spojeva iz matrice. Vlaga u kiselom tlu može pospješiti hidrolizu analita i tako negativno utjecati na analitički povrat spojeva. Rezultati utjecaja vlage u tlu na djelotvornost mikrovalno potpomognute ekstrakcije spojeva iz poljoprivrednog tla Šašinovec prikazani su u Tablici 24.

**Tablica 24.** Djelotvornost mikrovalno potpomognute ekstrakcije spojeva iz suhog i vlažnog poljoprivrednog tla Šašinovec. Maseni udjeli spojeva u tlu: 194 – 204 ng g<sup>-1</sup>

Spoj	Analitički povrat (RSO) / % Broj uzoraka = 4 – 5	
	Suho tlo	Vlažno tlo (udio vode 20 %)
<b>AMBA</b>	29 (3)	21 (15)
<b>MNBA</b>	80 (6)	95 (14)
<b>Mezotrion</b>	80 (7)	62 (8)
<b>Tembotrion</b>	84 (6)	60 (17)
<b>Topramezon</b>	94 (11)	67 (13)

Vlaga u tlu je snizila djelotvornost ekstrakcije mikrovalovima triketonskih i pirazolnog herbicida, a povećala povrat MNBA. Analitički povrat topramezona, tembotriona i mezotriona iz vlažnog poljoprivrednog tla bio je u rasponu 60 – 67 %, dok je povrat MNBA bio 95 %. Ovakav ishod ekstrakcije u suprotnosti je s očekivanjem kako će dodatak polarnog otapala ekstrakcijskoj smjesi pospješiti ekstrakciju hidrofilnijih spojeva (topramezona, tembotriona i mezotriona). Metanol zakiseljen s 10 % 0,1 mol L<sup>-1</sup> klorovodične kiseline ekstrahira analit iz tla u neutralnoj formi čestica. Moguće je da dodatak od 20 % vlage u tlu utječe na pH-vrijednost smjese otapala i smanji udio neutralnih čestica analita, što se onda negativno odražava na

djelotvornost ekstrakcije. Kvantitativna analiza benzoilcikloheksanonskih i benzoilpirazolnog herbicida u vlažnom tlu trebala bi se provoditi uz kalibraciju unutarnjim standardom ili vanjskim standardima pripremljenim u ekstraktu matrice.

## ***5. Zaključci***

1. Analitička metoda koja uključuje mikrovalno potpomognutu ekstrakciju spojeva smjesom otapala  $\psi$  (metanol, 0,1 mol L<sup>-1</sup> klorovodična kiselina) = 9 : 1, otapanje suhog ostatka ekstrakta tla u deioniziranoj vodi i završnu tekućinskokromatografsku (HPLC) analizu ekstrakta uz UV-detektor s nizom dioda (UV-DAD) djelotvorna je i precizna za istovremeno određivanje benzoilpirazolnog herbicida topramezona i benzoilcikloheksanonskih herbicida tembotriona i mezotriona te njegovog razgradnog produkta MNBA u neutralnom i suhom tlu, s udjelom organskog ugljika < 1 %. Spojevi su djelotvorno ekstrahirani u suspenziji tla i otapala u omjeru 1 : 6 pri 60 °C tijekom 5 min uz magnetno miješanje. Analitički povrat spojeva dodanih u tlo pri masenim udjelima 97 – 204 ng g<sup>-1</sup> bio je u rasponu od 80 % za mezotrion i MNBA do 94 % za topramezon, uz relativno standardno odstupanje (RSO) manje od 11 % i granicu detekcije spojeva 5 ng g<sup>-1</sup>. Predložena metoda nije prikladna za određivanje razgradnog produkta AMBA iz tla (analitički povrat < 30 %).
2. Selektivnost, linearnost i osjetljivost HPLC-UV-DAD analize spojeva u smjesi postignuta je na koloni XBridge C<sub>18</sub> (250 mm × 4,6 mm) uz gradijentno eluiranje acetonitrilom i 0,1 %-tnom fosforom kiselinom (pH = 2,2) i detekciju pri 205 nm (MNBA, tembotrion i topramezon) i 220 nm (AMBA i mezotrion). Kalibracijske otopine pripravljene u vodi prikladne su za kvantitativnu analizu spojeva u slabo humusnom tlu. Linearni odziv detektora postignut je pri masenim koncentracijama spojeva u vodi u rasponu 48 – 1021 ng mL<sup>-1</sup>, uz koeficijente korelacije > 0,999. Preciznost analize bila je vrlo dobra i ovisila je o masenoj koncentraciji spojeva u otopini: RSO ≤ 2 % pri koncentraciji 1000 ng mL<sup>-1</sup> te RSO ≤ 10 % za ponovljivost i RSO ≤ 13 % za obnovljivost analize pri koncentraciji 50 ng mL<sup>-1</sup>.
3. Kiselost tla značajno utječe na djelotvornost ekstrakcije istraživanih spojeva koji pokazuju svojstvo slabih kiselina. Takvi spojevi se u kiselim uvjetima protoniraju te se kao neutralne molekule mogu vezati na organsku fazu tla i zbog toga teže ekstrahirati. Dodatno, spojevi u neutralnoj formi podložniji su hidrolitičkoj razgradnji. Opisana metoda ekstrakcije nije djelotvorna za analizu spojeva u kiselom tlu (analitički povrat svih spojeva iz tla pri pH-vrijednosti 5,4 bio je niži od 50 %).

4. Analitički povrat spojeva iz humusnog tla bio je 95 % za MNBA i približno 60 % za topramezon, tembotrion i mezotrion. Niža djelotvornost ekstrakcije herbicida iz šumskog tla, s udjelom organskog ugljika 2,9 %, nego iz poljoprivrednog tla, s udjelom organskog ugljika 0,9 %, može biti rezultat slabije selektivnosti i preciznosti određivanja analita zbog ko-ekstrakcije interferirajućih tvari podrijetlom iz humusa. Preciznost analize spojeva u poljoprivrednom tlu bila je veća (RSO = 6 – 11 %) od preciznosti njihove analize u šumskom tlu (RSO = 11 – 15 %). Za precizniju i selektivniju analizu spojeva u humusnom tlu, ekstrakte tla potrebno je dodatno pročistiti prije završne HPLC-UV-DAD analize.
  
5. Vlaga u tlu (udio vode 20 %) snižava djelotvornost mikrovalno potpomognute ekstrakcije topamezona, tembotriona i mezotriona. Analitički povrat navedenih herbicida iz vlažnog poljoprivrednog tla bio je u rasponu 60 – 67 %, dok je povrat MNBA bio 95 %. Za djelotvornu i preciznu kvantitativnu analizu spojeva u vlažnom tlu kalibraciju je potrebno provesti unutarnjim standardom ili vanjskim standardima pripremljenim u ekstraktu matrice.

## ***6. Metodički dio***

## 6.1. Metode razdvajanja smjesa

Voda. Zrak. Vodena otopina šećera. Krv. Vodena otopina soli. Benzin. Vegeta. Ptičja hrana. Gusti sok. More. Zlatni nakit. Cedevita. Ocat. Pijesak. Kuhinjska sol. Sve su to tvari koje čovjek svakodnevno koristi. Voda, gusti sok i cedevita gase žeđ, sol je sastavni dio svake kuhinje, dok more i pijesak izazivaju toplinu u grudima i osmijeh na licu. Rijetko tko zapita se o sastavu ovih tvari. Jesu li to čiste tvari ili se sastoje od više komponenti? Ako su smjese, kako ih razdvojiti?

Tvari dijelimo na čiste, one u kojima se kemijskim i fizikalnim metodama ne može dokazati prisutnost neke druge tvari, i na smjese. Primjerice, natrijev klorid je čista tvar, no vodena otopina natrijeva klorida je smjesa tvari. Smjese su sustavi koji se sastoje od dvije ili više tvari koje međusobno kemijski ne reagiraju.

Iako su i vodena otopina natrijeva klorida i Vegeta smjese tvari, među njima se mogu uočiti određene razlike. Promatranjem Vegete uočiti ćemo sastojke različite boje, oblika i veličine, ali promatranjem vodene otopine natrijevog klorida nećemo uočiti različite sastojke. Vegetu zbog toga smatramo heterogenom smjesom tvari, a vodenu otopinu natrijeva klorida homogenom smjesa tvari. U čemu je razlika? Homogene su one smjese kod kojih nije moguće golim okom, niti mikroskopom uočiti pojedine sastojke smjese, dok se kod heterogenih smjesa jasno uočavaju pojedini sastojci smjese. Važno je naglasiti da u smjesi svaka tvar zadržava svoja fizikalna i kemijska svojstva. Zbog toga je smjese prikladnim postupcima moguće razdvojiti.

Destilacija, kristalizacija, hlapljenje, isparavanje, ekstrakcija i kromatografija su postupci kojima na sastojke možemo razdvojiti homogene smjese, a za heterogene smjese možemo uporabiti i ove postupke: sedimentaciju, dekantaciju, filtraciju, frakcijsku destilaciju ili razdvajanje magnetom. Odabir postupka razdvajanja smjese na čiste tvari ovisi o svojstvima pojedinih komponenti smjese kao što su topljivost, magnetičnost, hlapljivost i veličina čestica. Razdvajanje smjese na sastojke često se temelji na raspodjeli sastojaka smjese između dvije faze koje se ne miješaju i koje je moguće fizički odvojiti.

## 6.2. Ekstrakcija i zakon razdjeljenja

Ekstrakcija je metoda izdvajanja čistih tvari iz smjese koja se temelji na različitoj topljivosti tvari u otapalima koja se međusobno ne miješaju. Drugim riječima, ekstrakcija je metoda za pročišćavanje i izolaciju tvari iz otopine, suspenzije, emulzije ili krute smjese pomoću otapala koje se sa smjesom ne miješa. Kada otapalo za ekstrakciju dođe u kontakt sa smjesom tvari, dolazi do prijenosa mase tvari koju se želi ekstrahirati u otapalo u kojem je ta tvar bolje topljiva. Stupanj do kojeg se tvar razdjeljuje između dvije faze koje se međusobno ne miješaju znatno se razlikuje od jedne do druge kemijske vrste što se već stoljećima primjenjuje za njihovo međusobno razdjeljivanje.<sup>62</sup> Postupak ekstrakcije treba biti brz, jeftin i jednostavan, a dobiveni rezultati kvantitativni. Tijekom ekstrakcije ne smije doći do gubitka ili razgradnje ekstrakta. Osim toga, dobiveni ekstrakt treba biti dovoljno koncentriran za daljnja mjerenja tako da nema potrebe za dodatnim ukoncentriranjem, koje bi produljilo postupak i zahtijevalo veći utrošak organskih otapala te bi, u konačnici, postupak bio skuplji.

Ekstrakcija tvari X, koja je otopljena u fazi A, postiže se dovođenjem te smjese u kontakt s drugom fazom, faza B, koja može biti tekućina, krutina ili superkritični fluid. Tvar X je topljiva u obje faze, ali kako se one ne miješaju dolazi do razdjeljenja tvari X između njih.<sup>63</sup> Nakon nekog vremena uspostavlja se kemijska ravnoteža koju možemo opisati ravnotežnom jednadžbom (izraz 1)

$$X_A = X_B \quad (1)$$

Raspodjelu tvari (koju razdjeljujemo) između dviju faza koje se ne miješaju, opisuje *Nernstov zakon razdjeljenja*, (Nernst, 1891. godine).<sup>64</sup> Tim zakonom definiran je koeficijent razdjeljenja (izraz 2)

$$K_D = [X]_B/[X]_A \quad (2)$$

Koeficijent razdjeljenja,  $K_D$ , je koncentracijska konstanta ravnoteže koja opisuje raspodjelu otopljene tvari između dva otapala koja se međusobno ne miješaju.<sup>62,65</sup> Uglate zagrade označavaju da je u pitanju ravnotežna koncentracija tvari X u pojedinoj fazi (množinsku ili masenu) pri stalnoj temperaturi. Dogovoreno je da se koncentracija



tvori X, u fazi u koju je se ekstrahira, piše u brojniku.<sup>63</sup> Da bi razdjeljenje otopljenе tvori između dviju faza bilo maksimalno, potrebno je optimirati uvjete ekstrakcije. Rezultat optimizacije ekstrakcijskih uvjeta su velike vrijednosti koeficijenta razdjeljenja i učinkovita ekstrakcija otopljenе tvori iz jedne u drugu fazu. Mala vrijednost koeficijenta razdjeljenja pokazatelj je slabe ekstrakcije otopljenе tvori, a u slučaju kada je koeficijent razdjeljenja jednak 1, koncentracija tvori X jednaka je u obje faze.<sup>63</sup>

Razdjeljivanje tvori s obzirom na ukupnu koncentraciju neće slijediti Nernstov zakon razdjeljenja ako je u jednoj ili u obje faze otopljena tvar prisutna u više oblika (molekule, polimeri, ioni...). Tada je potrebno koristiti više koeficijenata razdjeljenja, od kojih bi svaki opisivao razdjeljenje samo jednog oblika tvori. U tom slučaju koristi se slična veličina, omjer razdjeljenja,  $D$ , koji je definiran kao omjer ukupnih koncentracija tvori u dva otapala koja se međusobno ne miješaju. Za jednostavan sustav, opisan izrazom 1, omjer razdjeljenja jednak je koeficijentu razdjeljenja, dok se u složenijim sustavima ove dvije veličine znatno razlikuju.<sup>62</sup> Primjerice, otopljena tvar X u fazi B čini dimer (izraz 3)

$$2X_{(A)} \quad X_{2(B)} \quad (3)$$

gdje su u zagradama oznake faza A i faza B. To se može opisati omjerom razdjeljenja (izraz 4)

$$D = c_{X,B}/c_{X,Y} \quad (4)$$

gdje su  $c_{X,A}$  i  $c_{X,B}$  ukupne množinske koncentracije tvori X u fazi A, odnosno u fazi B. Na primjer, ako su u otopini prisutni oblici X,  $X^+$  i  $X_2^+$ , tada je ukupna množinska koncentracija tvori X u pojedinoj fazi definirana izrazom 5:

$$c_X = [X] + [X^+] + [X_2^+] \quad (5).$$

Koeficijent razdjeljenja ovisi o temperaturi, svojstvima tvori i svojstvima faza, odnosno otapala pa sukladno tome ima svojstva koncentracijske konstante, dok se omjer razdjeljenja mijenja ovisno o eksperimentalnim uvjetima zbog čega se ne može smatrati konstantom.<sup>65</sup>

Učinkovitost ekstrakcije jednaka je udjelu ekstrahirane tvari koja se izražava postotcima, a naziva se *stupanj* ili *iskorištenje* ekstrakcije.<sup>62</sup> Na učinkovitost ekstrakcije utječu brojni čimbenici kao što su temperatura, svojstva tvari i svojstva otapala za ekstrakciju. Stoga je prije same ekstrakcije potrebno procijeniti i optimirati sve navedene uvjete. Također, treba uzeti u obzir koeficijent i omjer razdjeljenja i svojstva uzorka te sukladno tome odabrati prikladnu metodu ekstrakcije tvari iz smjese.

### 6.2.1. Utjecaj svojstava otapala na ekstrakciju

Ključan korak prilikom izvođenja ekstrakcije, koji ovisi o vrsti i svojstvima tvari koje se žele ekstrahirati, je odabir otapala za ekstrakciju. Odabir otapala za ekstrakciju treba rezultirati što djelotvornijom i uspješnijom ekstrakcijom te što čistim ekstraktom bez potrebe za dodatnim korakom pročišćavanja ili koncentriranja. Najčešće korištena otapala za ekstrakciju su dietil eter, kloroform i etanol.

Otapalo za ekstrakciju treba zadovoljiti određene kriterije kao što su selektivnost otapala, visoki koeficijent razdjeljenja, nisko vrelište i mala viskoznost otapala. Također, tvar koja se želi ekstrahirati mora biti dobro topljiva u otapalu za ekstrakciju stoga je potrebno obratiti pozornost na polarnost otapala. S obzirom na to da vodikove veze između tvari koja se želi ekstrahirati i otapala za ekstrakciju utječu na selektivnost otapala i topljivost tvari, otapala za ekstrakciju se mogu podijeliti u nekoliko skupina. Prvu skupinu čine otapala koja tvore trodimenzijske mreže vodikovih veza (npr. molekula vode), druga skupina su otapala koja ne stvaraju trodimenzijske mreže vodikovih veza iako imaju *aktivne* vodikove atome i atome donora (npr. karboksilne kiseline), dok se u treću skupinu ubrajaju otapala koja imaju atome donora, ali nemaju *aktivne* vodikove atome (npr. karbonilni spojevi). Četvrta skupina su otapala koja imaju aktivne vodikove atome uz izostanak atoma donora (npr. molekula kloroforma), a peta skupina su otapala koja nemaju sposobnost stvaranja vodikovih veza (npr. molekula tetraklor ugljika). Iako se tvar u otapalu otapa, otapalo mora biti stabilno i ne smije s tom tvari kemijski reagirati kao ni s matricom uzorka. U slučaju ekstrakcije tvari iz tekuće smjese, odabrano otapalo ne smije kemijski reagirati i miješati se s vodom, koja je najčešće sekundarno otapalo. U konačnici, odabrano otapalo za ekstrakciju treba biti neškodljivo za kemičara i okoliš, dostupno u dovoljnim količinama, jeftino i pogodno za ponovnu upotrebu.<sup>64,65,66</sup>

Konačni produkt postupka ekstrakcije je ekstrakt, ekstrahirana tvar otopljena u otapalu za ekstrakciju. Premda je poželjno da se otapalo za ekstrakciju ne miješa s vodom, može se dogoditi da mala količina vode zaostane u ekstraktu. U tom je slučaju, prije uklanjanja otapala iz ekstrakta, potrebno ukloniti vodu iz ekstrakta. To se može postići dodatkom tvari za sušenje, npr. bezvodni natrijev sulfat ili bezvodni magnezijev sulfat, čija je uloga adsorpcija vode iz ekstrakta. U konačnici, da bi se dobila čista tvar, potrebno je iz ekstrakta ukloniti otapalo za ekstrakciju što se može postići postupcima destilacije, kristalizacije ili isparavanja otapala. Osim toga, otapalo se može ukloniti i postupcima kao što su taloženje i adsorpcija. Adsorpcija na odgovarajućoj stacionarnoj fazi prikladna je kada je potreban dodatni korak pročišćavanja, dok taloženje otopljene tvari zahtjeva dodatni korak filtriranja ili dekantiranja, što rezultira manje učinkovitom ekstrakcijom.<sup>64,65</sup>

### 6.2.2. Utjecaj svojstava tvari na ekstrakciju

Na postupak ekstrakcije, kao i na odabir otapala za ekstrakciju, utječu svojstva tvari koju se želi ekstrahirati. Otopljene tvari ostvaruju brojne međumolekulske interakcije kako s matricom uzorka, tako i s otapalom za ekstrakciju što utječe na kompletan postupak ekstrakcije, od odabira otapala za ekstrakciju, broja ponavljanja postupaka ekstrakcije pa do odabira postupka uklanjanja otapala iz ekstrakta. Kemijska svojstva tvari koja utječu na postupak ekstrakcije su *tlak para*, *topljivost*, *molarna masa* te *hidrofobnost* izražena koeficijentom razdjeljenja u sustavu *n*-oktanol/voda.

Isparavanje je proces razdjeljenja tvari između tekuće i plinovite faze što rezultira smanjenjem koncentracije tvari u tekućoj fazi. Ukoliko isparavanje tvari utječe na postupak ekstrakcije, potrebno je predvidjeti ponašanje tvari u određenim uvjetima i sukladno tome optimirati uvjete ekstrakcije kako bi se izbjegle moguće greške u rezultatima. Isparavanje neke tvari se može procijeniti pomoću *Henryjeve konstante*,  $H'$ , koeficijenta razdjeljenja tvari između tekuće i plinove faze (izraz 6)<sup>63</sup>

$$H' = K_D = [X]_G/[X]_L \quad (6)$$

Veća vrijednost Henryjeve konstante ukazuje na veći stupanj razdjeljenja tvari iz tekuće u plinovitu fazu. Eksperimentalno, Henryjeva konstanta može se odrediti mjerenjem koncentracije tvari u plinovitoj i u tekućoj fazi u stanju ravnoteže, dok se za neutralne

spojeve može odrediti iz omjera tlaka pare tvari,  $P_{vp}$ , koji se definira kao tlak plina koji je u ravnoteži s tekućinom ili krutinom pri određenoj temperaturi, i topljivosti,  $S$ , koja se definira kao maksimalna količina tvari koja se može otopiti u nekoj drugoj tvari pri određenoj temperaturi (uz uvjet da se ne potigne prezasićenje). Tlak pare tvari proporcionalan je temperaturi i obrnuto proporcionalan jakosti međumolekulskih interakcija.

Dok se tlak para odnosi na isparavanje čiste tvari, Henryjeva konstanta se odnosi na isparavanje spoja iz tekuće faze u plinovitu. Topljivost tvari također se povećava povećanjem temperature, a može se odrediti eksperimentalno ili se može procijeniti na temelju strukture molekule.<sup>63</sup>

Na topljivost neke tvari u otapalu utječe i oblik, molekulski ili ionski, u kojem je tvar prisutna u smjesi.<sup>65</sup> Da bi se moglo predvidjeti isparavanje neke tvari u određenim uvjetima, potrebno je uzeti u obzir i tlak para i topljivost te tvari u istim uvjetima. Naime, slabo razdjeljenje tvari između tekuće i plinovite faze proizlazi iz niskog tlaka pare i dobre topljivosti, dok je povećano razdjeljenje tvari između ovih faza rezultat visokog tlaka pare i slabije topljivosti tvari. Vrijednosti Henryjeve konstante mogu pomoći pri odabiru najpovoljnije metode za ekstrakciju ovisno o isparavanju otopljene tvari iz otopine. Ukoliko je vrijednost Henryjeve konstante otopljene tvari manja od vrijednosti Henryjeve konstante otapala, otopljena tvar nije hlapljiva i koncentracija će joj se povećati isparavanjem otapala. U suprotnom, koncentracija otopljene tvari će se smanjiti, jer otopljena tvar brže isparava nego otapalo.<sup>63</sup>

Uzrok hidrofobnog efekta, koji proizlazi iz otapanja tvari u vodi, su vodikove veze između molekula vode. Molekule polarnih tvari bolje su topljive u vodi u odnosu na tvar čije su molekule nepolarne. Naime, molekule nepolarnih tvari nemaju sposobnost stvaranja vodikovih veza s molekulama vode koje ih okružuju. Time se narušava raspored molekula vode i smanjuje ukupna energija povezivanja jer se kidaju vodikove veze. Za sve to potrebna je energija. Zbog toga se hidrofobne molekule u vodi okupljaju kako bi njihovo djelovanje na međusobno povezivanje molekula vode bilo minimalno. To ima pozitivan energijski i entropijski učinak. Kažemo da je sustav stabilniji. Hidrofobnost tvari izražava koeficijentom razdjeljenja u sustavu *n*-oktanol/voda,  $K_{ow}$  (7)<sup>63</sup>

$$K_{ow} = K_D = [X]_o/[X]_w \quad (\text{izraz 7})$$

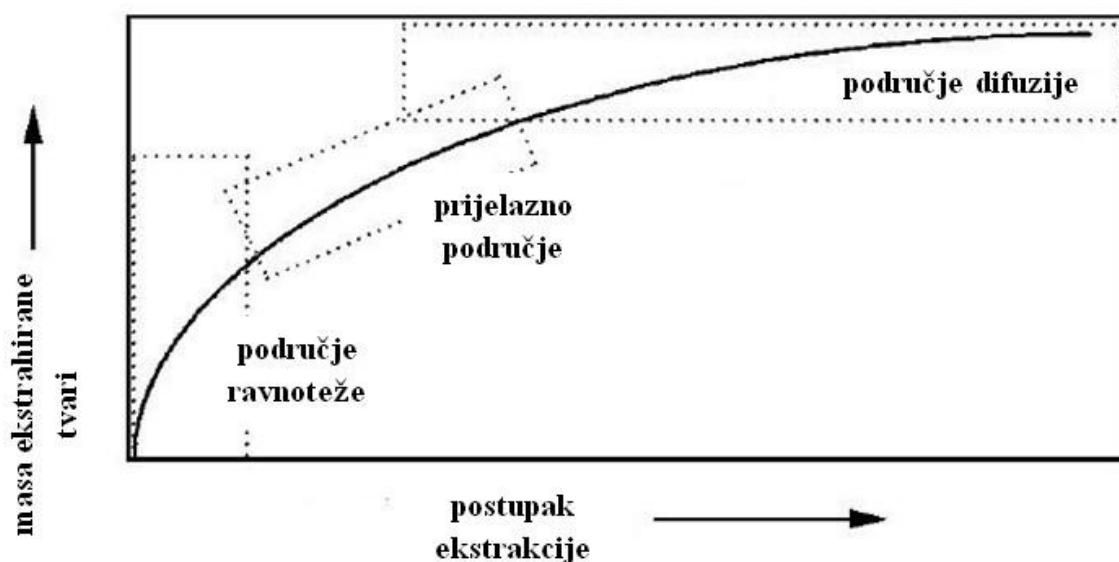
u kojem se *n*-oktanol uzima kao referentno hidrofobno otapalo. Veća vrijednost koeficijenta razdjeljenja u sustavu *n*-oktanol/voda ukazuje na veću sklonost otopljene tvari prelasku, odnosno ekstrakciji, iz vodene u hidrofobnu fazu. Osim toga, usporedbom vrijednosti koeficijenta razdjeljenja u sustavu *n*-oktanol/voda za različita otapala, može se zaključiti o hidrofobnom karakteru otapala. Naime, otapala s većom vrijednosti ovog koeficijenta hidrofobnija su od onih s manjom vrijednosti koeficijenta razdjeljenja u sustavu *n*-oktanol/voda.<sup>63</sup> Hidrofobni karakter neke tvari povezan je s njezinom topljivošću u vodi. Što tvar ima jače izražen hidrofobni karakter, to je manje topljiva u vodi, i obrnuto.

Za svaki postupak ekstrakcije, bez obzira na faze između kojih se tvar razdjeljuje, može se primijeniti Nernstov zakon razdjeljenja. Henryjeva konstanta kao i koeficijent razdjeljenja u sustavu *n*-oktanol/voda zapravo su koeficijenti razdjeljenja, definirani Nernstovim zakonom razdjeljenja, između različitih faza.

### 6.3. Izvođenje postupka ekstrakcije

Postupak ekstrakcije izvodi se u nekoliko koraka, a najčešće korištena aparatura je lijevak za odjeljivanje. Prvi korak je ostvarivanje kontakta između uzorka i otapala za ekstrakciju nakon čega slijedi stadij mirovanja, tijekom kojeg se tvar difuzijski raspoređuje po fazama. Ovaj spontan, nepovrativi proces kretanja čestica tvari iz područja veće koncentracije u područje manje koncentracije do uspostavljanja ravnoteže, zbiva se kada u smjesi postoji koncentracijski gradijent, odnosno kada je u različitim dijelovima volumena sustava različita koncentracija otopljene tvari. Ovaj korak nije problematičan kod tekućih uzoraka, u kojima difuzija ovisi o viskoznosti, temperaturi, obliku i veličini otopljene tvari. No, kod krutih uzoraka, da bi se tvar ekstrahirala, treba savladati interakcije između svih jedinki u sustavu i jedinki tvari koju se želi ekstrahirati. U tom slučaju, jedinice tvari moraju imati veći afinitet prema fazi otapala za ekstrakciju nego prema fazi uzroka u kojem se nalaze. U konačnici, dolazi do prijenosa molekula tvari u otapalo za ekstrakciju. Ona faza, koja sadrži ciljanu tvar, difundira natrag kroz uzorak, kako bi se u sljedećem koraku faze mogle odvojiti. Upravo u ovom koraku do izražaja dolazi važnost odabira otapala za ekstrakciju. Naime, s pravilnim odabirom otapala za ekstrakciju, posljednji korak ne bi trebao predstavljati problem.<sup>64</sup>

Grafički prikaz ovisnosti mase ekstrahirane tvari o različitim stadijima, odnosno koracima postupka ekstrakcije ima oblik asimptote i sastoji se od dva stadija (slika 13). Početno, više strmo nagnuto područje asimptote predstavlja stadij ravnoteže do čijeg uspostavljanja dolazi nakon što uzorak dođe u kontakt s otapalom za ekstrakciju. Potom slijedi proces otapanja tvari koju se želi ekstrahirati u otapalo za ekstrakciju.<sup>64</sup> Kako postupak ekstrakcije napreduje, povećava se masa ekstrahirane tvari te slijedi stadij difuzije u kojem otopljena tvar treba imati veći afinitet prema otapalu za ekstrakciju nego prema uzorku kako bi difundirala u otapalo. U stadiju difuzije dolazi do zasićenja, odnosno, to je stadij u kojem se masa ekstrahirane tvari više ne povećava, što ujedno označava kraj ekstrakcije. Temelj svakog razdvajanja upravo su dva navedena stadija prisutna u svim ekstrakcijskim metodama.



**Slika 14.** Grafički prikaz ovisnosti mase ekstrahirane tvari o različitim stadijima ekstrakcijskog postupka<sup>64</sup>

Termodinamički gledano, razdvajanje je proces suprotan miješanju reakcijske smjese, tj. spontanom procesu kojim se povećava entropija sustava. U skladu s time, da bi se postignulo razdvajanje smjese na sastojke, potrebno je prevladati termodinamička ograničenja što je najlakše postići vanjskim utjecanjem na reakcijsku smjesu. Povišenje temperature jedan je od takvih utjecaja koji rezultira povećanjem kinetike reakcije, topljivosti i bržom difuzijom otopljene tvari, te smanjenjem viskoznosti, a time se ujedno i nadjačavaju interakcije između molekula otopljene tvari i ostalih molekula u uzorku.<sup>64</sup>

Ekstrakcija tvari temelji se na različitoj topljivosti tvari u različitim fazama. Tvar koja se želi ekstrahirati je bolja topljiva u jednoj od faza, no nije u potpunosti netopljiva u drugoj fazi zbog čega određena količina te tvari zaostaje u fazi u kojoj je slabije topljiva. Iskorištenje ekstrakcije ovisi o omjeru raspodjele tvari te o omjeru volumena dviju faza (najčešće vodene i organske faze). Ukoliko je vrijednost omjera razdjeljenja tvari velika ( $D > 1000$ ), jednostruka ekstrakcija s cjelokupnim volumenom otapala za ekstrakciju bit će dovoljna te će ekstrakcija biti učinkovita, iskorištenje ekstrakcije bilo veliko ( $\approx 90\%$ ). Male vrijednosti omjera raspodjele mogu se nadoknaditi povećanjem omjera volumena dviju faza. Osim toga, iskorištenje ekstrakcije može biti veliko i prilikom višestruke ekstrakcije, odnosno uzastopnim ponavljanjem postupka ekstrakcije s manjim volumenima otapala za ekstrakciju.<sup>65</sup> S obzirom na to da određena količina tvari zaostaje u fazi u kojoj je slabije topljiva, svakim ponavljanjem postupka ekstrakcije određena količina tvari ekstrahira se u otapalo za ekstrakciju. Time se povećava učinkovitost ekstrakcijskog postupka. Zato je preporučljivo postupak ekstrakcije izvoditi više puta s manjim volumenima otapala za ekstrakciju. Ukoliko je tvar koju se želi ekstrahirati dobro topljiva u vodenoj fazi, može se provesti tzv. isaljavanje, tj. dodati u sustav anorgansku sol. Time će vodenom sloju porasti ionska jakost. Posljedica toga bit će smanjenje topljivosti tvari koju se želi ekstrahirati u vodenom sloju i prijelaz veće mase u organsku fazu. Time se povećava koeficijent razdjeljenja između, u ovom slučaju, vodene i organske faze, tj. smanjuje se topljivost tvari u vodenoj fazi čime se postiže učinkovitija ekstrakcija tvari u organsku fazu, odnosno u otapalo za ekstrakciju.<sup>65</sup>

#### 6.4. Ekstrakcija u svakodnevnom životu

Ekstrakcija je postupak koji se svakodnevno koristi, kako u kemijskim laboratorijima, tako i izvan njih. Koristi se u školama, kućanstvima, industrijama... Ovaj postupak rabe kemičari, ali i oni koji s kemijom i radom u laboratoriju nisu ni na koji način povezani. Naime, svako kuhanje kave ili čaja je zapravo postupak ekstrakcije.<sup>64</sup> U ovom slučaju, kipuća voda predstavlja otapalo za ekstrakciju pomoću kojeg se iz krute smjese kave ili čaja ekstrahiraju tvari ili spojevi, poput kafeina, koji su dobro topljivi u vodi. Ljudi koji boluju od dijabetesa ili njemu sličnih bolesti, tijekom pripremanja za jelo, neko vrijeme krumpir ostavljaju u vodi. Zašto? Rješenje se krije upravo u ekstrakciji. Stajanjem u vodi, iz krumpira se ekstrahira škrob, koji je relativno

dobro topljiv u vodi, a može dijabetičarima uzrokovati određene tegobe. Nadalje, i u ljudskom organizmu svakodnevno se zbiva ekstrakcija. Djelovanje tableta protiv bolova temelji se na ekstrakciji. Može se reći da je tableta smjesa tvari u krutom agregacijskom stanju koja uz aktivnu tvar sadrži i brojne pomoćne tvari. Kada tableta dospije u želudac dolazi do njezine razgradnje i ekstrahiranja aktivne tvari iz smjese, kako bi mogla postići svoje djelovanje. Primjer toga je ekstrakcija kodeina iz brojnih analgetika koji se uzimaju za umanjeње bolnih tegoba.

Bojanje uskršnjih pisanica ekstraktom ljusaka crvenog luka dobro je poznata i duga tradicija. No, malo tko zna da se to postiže upravo ekstrakcijom. Kuhanjem ljuski luka u vodi dolazi do ekstrakcije spojeva, koji ljuskama daju crvenu boju, zbog čega pisanice nakon takvog bojenja postaju crvene (crvenosmeđe).

Ekstrakcija je, osim u svakodnevnom životu čovjeka, vrlo zastupljen proces i u pojedinim industrijskim postrojenjima. U posljednje vrijeme, ekstrakcija je kao postupak doživjela veliki napredak u farmaceutskoj, naftnoj i nuklearnoj industriji, u kojima je vrlo značajno dobiti čisti produkt, odnosno čistu tvar što je moguće postići upravo postupkom ekstrakcije.<sup>64</sup>

## **6.5. Pojam ekstrakcije u osnovnoškolskim i gimnazijskim nastavnim programima iz kemije**

Iz navedenih primjera može se zaključiti o korištenju ekstrakcijskog postupka u svakodnevnom životu. Osim toga, može se zaključiti i da svakodnevno, svjesno ili nesvjesno, koristimo ovaj postupak. Uz stjecanje brojnih praktičnih i općih kemijskih znanja, i ovo su razlozi zbog kojih bi učenici u školi trebali učiti o ekstrakciji kao metodi razdvajanja smjesa. U osnovnoj školi, nastava kemije usmjerena je na kemijska znanja potrebna za svakodnevni život. Iskustveno učenje i učenje otkrivanjem glavni su načini učenja, a izvođenje pokusa središnja je nastavna aktivnost. Sve to pridonosi razvoju logičkog i kreativnog mišljenja te razvoju sposobnosti povezivanja znanja iz različitih znanstvenih područja. Nastava kemije u srednjoj školi također bi se trebala temeljiti na učenju otkrivanjem te izvođenju brojnih pokusa, opažanja i mjerenjima, čime bi se dalje poticao razvoj sposobnosti uočavanja promjena i njihovog raščlanjivanja te donošenja zaključaka.<sup>67</sup>

Prema nastavnom planu i programu za osnovnu školu, učenici se već u sedmom razredu susreću s pojmovima smjesa i postupci razdvajanja smjesa. Učenje otkrivanjem na



nastavnim satovima u kojima se obrađuje nastavna cjelina „Smjese i postupci razdvajanja smjesa“ treba biti ostvareno putem pokusa, kako demonstracijskih, tako i onih koje učenici mogu izvesti sami. Učenike treba poticati na promatranje, opažanje i opisivanje nastalih promjena, na zaključivanje i tumačenje promjena na temelju usvojenih teorija i modela. Tijekom obrade ove nastavne cjeline, treba izvesti pokuse na temelju kojih će učenici postići usvajanje i razumijevanje sljedećih pojmova: sedimentacija (taloženje), talog, dekantacija, filtracija, filtrat, destilacija, destilat, sublimacija, kristalizacija i kristali.<sup>67</sup> Za nastavne satove na kojima će se obrađivati navedeni pojmovi, učenici trebaju imati sljedeća predznanja:

- navesti vrste tvari,
- razlikovati elementarne tvari (metale i nemetale) i kemijske spojeve,
- navesti fizikalna svojstva tvari,
- razlikovati smjese tvari od kemijskih spojeva i elementarnih tvari,
- razlikovati homogenu i heterogenu smjesu,
- zaključiti o razdvajanju smjesa tvari na temelju fizikalnih svojstava tvari koje čine smjesu,
- koristiti laboratorijski pribor i posuđe.

Ono što učenici trebaju usvojiti na temelju nastavnih satova je predložiti i primijeniti postupke razdvajanja zadanih smjesa, uključujući i metodu ekstrakcije.

Prema nastavnom planu i programu za srednju školu, u prvom razredu se, u sklopu nastavne cjeline „Tvari i njihove promjene“ i nastavne teme „Podjela, izvori i agregatna stanja tvari“, učenici ponovno susreću s pojmovima smjese i postupci razdvajanja smjesa.<sup>67</sup>

S obzirom na to da su ovi nastavni sadržaji već obrađeni u sedmom razredu osnovne škole, za očekivati je da će učenici moći razlikovati smjese tvari od elementarnih tvari te da će moći predložiti i primijeniti postupke razdvajanja smjesa. Nastavni sat, na kojem će se obrađivati navedena nastavna tema, također treba uključivati brojne pokuse koje će učenici moći sami izvesti, na temelju kojih će učenici ponoviti pojmove usvojene u sedmom razredu osnovne škole, te usvojiti nove pojmove kao što su prekristalizacija i kromatografija.<sup>67</sup> Nakon toga, učenici će moći razlikovati čiste tvari i smjese tvari te će biti sposobni predložiti i primijeniti brojne postupke razdvajanja smjesa na čiste tvari na temelju fizikalnih svojstava tvari koje čine smjesu.

Usporedbom osnovnoškolskog i srednjoškolskog nastavnog plana i programa za kemiju, mogu se uočiti određene sličnosti. Iako se dobar dio nastavnih sadržaja, obrađenih u osnovnoj školi, ponovno obrađuje u srednjoj školi, važno je naglasiti da su ti nastavni sadržaji u srednjoj školi zahtjevniji i kompleksniji, što je u skladu s uzrastom učenika. Također, važno je naglasiti da se ni u jednom planu i programu ne predviđa obrađivanje ekstrakcije kao metode za razdvajanje smjesa. Iako je se ne navodi u planu i programu, postavlja se pitanje kako uključiti ekstrakciju u nastavu kemije.

S obzirom na to da postoji niz jednostavnih pokusa koji se temelje na zakonu razdjeljenja, ekstrakcija se može uključiti u nastavu kemije već u sedmom razredu osnovne škole. Jednostavnim, ali zanimljivim i efektnim pokusima učenike se može potaknuti na razmišljanje, zaključivanje i povezivanje nastavnih sadržaja. U prvom razredu srednje škole, učenje ekstrakcije treba podići na višu razinu koja će biti u skladu s mogućnostima, predznanjima i uzrastom učenika, što uključuje korištenje složenije aparature za pokuse (u sedmom razredu osnovne škole se pokusi ekstrakcije mogu izvesti korištenjem jednostavne aparature, dok se u prvom razredu srednje škole može koristiti i lijevak za odjeljivanje). Osim u prvom razredu srednje škole, ekstrakcija se može obrađivati i u drugom razredu srednje škole u sklopu nastavne cjeline „Ravnotežni sustavi“. Tada se može spomenuti i Nernstov zakon i koeficijent razdjeljenja, koji je ravnotežna konstanta, te se u nastavu mogu uključiti i brojni zadaci koji se odnose upravo na ekstrakciju i koeficijent razdjeljenja. Osim toga, učenici će biti sposobni pretpostaviti uvjete, kao što su izbor otapala i svojstva uzorka, uz koje će ekstrakcija biti učinkovita. Uz ekstrakciju se vežu i kemijski pojmovi kao što su polarnost, hidrofobnost, interakcije tvari s uzorkom i interakcije tvari s otapalom za ekstrakciju što uključuje različite oblike međumolekulskih interakcija (vodikove veze, van der Waalsove sile). Na taj će način učenici pomoću već usvojenih nastavnih sadržaja moći pretpostaviti učinkovitost pojedinog ekstrakcijskog procesa, što osigurava povezivanje nastavnih sadržaja i bolju usvojenost istih.

Osim što je ekstrakcija postupak koji od učenika zahtjeva razmišljanje, logičko zaključivanje i povezivanje nastavnih sadržaja, učenici također razvijaju sposobnost apstraktnog, kritičkog i kreativnog mišljenja. Također, učenici će stjecati navike potrebne za samostalan i timski rad i razvijati vještine sigurnog i urednog rukovanja kemijskim priborom i kemikalijama te usvojiti vještine rada prema uputama i davanje uputa za rad drugima.<sup>67</sup>

## 6.6. Objašnjenje nastavnog sata

Tijekom izrade ovog diplomskog rada osmišljen je nastavni sat koji se bavi konstantom kemijske ravnoteže, a temelji se na metodi aktivnog poučavanja koja učenike stavlja u središte nastavnog procesa. Cilj ovog nastavnog sata je da učenici, pomoću jednostavnog pokusa, zaključe o postizanju kemijske ravnoteže u sustavu i opišu je konstantom ravnoteže. Ovaj nastavni sat od učenika zahtjeva opažanje, razmišljanje, logičko zaključivanje i povezivanje nastavnih sadržaja kako bi, uz vodstvo nastavnika, došli do spoznaje i rješenja problema. Predloženi nastavni sat temelji se na pokusu, a nastavna sredstva i pomagala potrebna za njega su: pribor i kemikalije za pokuse, radni listić, projektor, računalo, PowerPoint-prezentacija, ploča i kreda. Oblik rada je grupni. Prvi dio nastavnog sata odnosi se na provedbu pokusa ekstrakcije joda iz vodene otopine joda, a u drugom dijelu nastavnog sata naglasak se stavlja na kemijsku ravnotežu u navedenom sustavu i definiranje konstante ravnoteže.

Struktura i tijek nastavnog sata vidljivi su iz radnog listića i ppt-prezentacije (vidi Prilog VIII – XIV) u kojem su u koracima opisani postupci koje učenici moraju pratiti kako bi, u konačnici, došlo do željenih zaključaka i spoznaja. U prvom dijelu nastavnog sata od učenika se očekuje primjena prethodno usvojenih znanja i vještina. Na početku sata, prije izvedbe pokusa, učenici trebaju provjeriti imaju li na stolu sve materijale i pribor koji su im potrebni za izvođenje pokusa. Na taj način nastavnik dobiva povratnu informaciju o tome jesu li učenici prije provedbe pokusa pročitali dane upute. Pokus koji učenici rade u grupi je ekstrakcija vodene otopine joda u lijevku za odjeljivanje. Prije izvedbe pokusa, učenici trebaju zapisati opažanja i odgovoriti na pitanje o vrsti tvari kojoj pripada jod i vodena otopina joda. To daje nastavniku povratnu informaciju o usvojenosti prethodno obrađenih nastavnih sadržaja. Tijekom izvođenja pokusa ekstrakcije, učenici trebaju u svakom koraku pomno pratiti i bilježiti opažanja. Nakon svakog koraka, učenici čitaju opažanja kako bi, u slučaju različitih opažanja, nastavnik potaknuo raspravu kojoj je cilj uskladiti opažanja. Ključno opažanje u ovom dijelu nastavnog sata je odjeljivanje slojeva u lijevku za odjeljivanje nakon provedbe ekstrakcije. Kako bi učenici mogli imenovati slojeve u skladu s njihovim položajem u lijevku za odjeljivanje, potrebno je povezivanje nastavnih sadržaja. U ovom dijelu sata učenici trebaju povezati gustoću otapala s njegovim položajem u lijevku za odjeljivanje. Osim toga, crtajući aparaturu i pravilno imenujući njezine dijelove i slojeve u lijevku, učenici će osim razvijanja motoričkih vještina povezivati funkciju i oblik dijelova

aparature. Kako bi se provjerila točnost rješenja ovog zadatka, nastavnik će zatražiti učenika(e) da skicira(ju) navedeni crtež na ploču, a potom će skica aparature s pravilnim oznakama i bojama slojeva biti prikazana na ppt-prezentaciji.

Nakon toga slijedi provedba još jednog koraka ekstrakcije, što je uvod u drugi dio sata u kojem se naglasak stavlja na kemijsku ravnotežu u danom sustavu. Na temelju opažanja nakon drugog koraka ekstrakcije, učenici trebaju zaključiti da je jod bolje topljiv u kloroformu nego u vodi. Nastavnik potiče raspravu kojoj je cilj zaključiti o razlozima bolje topljivosti joda u kloroformu – slabije međumolekulske interakcije između molekula kloroforma u usporedbi s onima između molekula vode. Upotrebom već obrađenih nastavnih sadržaja, učenici trebaju zaključiti o sastavu slojeva nakon druge ekstrakcije. Potiče se rasprava o ponovnom obojenju kloroformskog sloja kojoj je cilj zaključiti o prisutnosti molekula joda u vodenom sloju nakon prve ekstrakcije. U idućem koraku, učenici trebaju zaključiti o razlogu izmućkavanja sadržaja lijevka za odjeljivanje. Potiče se rasprava o razlozima izmućkavanja sadržaja lijevka kojoj je cilj prisjetiti se različite gustoće otapala i zaključiti o povećanju dodirne površine između dvije faze, što utječe na djelotvornost ekstrakcijskog postupka. Na temelju toga, učenici će dane odgovore potkrijepiti pripadajućom ravnotežnom jednačinom. Kako bi se provjerila točnost rješenja ovog zadatka, nastavnik će od učenika zatražiti da rješenje zadatka napišu na ploču. Točno rješenje zadatka bit će prikazano na ppt-prezentaciji uz simboličan prikaz dinamičke ravnoteže u sustavu (slika klackalice). Potiče se rasprava kojoj je cilj zaključiti da se stanje ravnoteže u sustavu označava ravnotežnom strelicom. Pitanje, u kojem učenici trebaju zaključiti o stalnoj ili promjenljivoj vrijednosti omjera koncentracija joda u vodenom i kloroformskom sloju, daje povratnu informaciju nastavniku o učeničkom razumijevanju kemijske ravnoteže.

Za kraj nastavnog sata, učenici će riješiti računski zadatak u kojem, na temelju danih podataka, trebaju izračunati množinsku koncentraciju joda u vodenom sloju. U ovom zadatku učenici trebaju izračunati omjer koncentracija joda u vodenom i kloroformskom sloju, kojeg će koristiti za računanje koncentracije joda u vodenom sloju nakon drugog izmućkavanja. Nastavnik će od učenika zatražiti da riješe postavljeni zadatak na ploči kako bi se provjerila točnost rješenja, što će nastavniku biti povratna informacija o razumijevanju odgovora na prethodno pitanje. Nastavnik će, pomoću ppt-prezentacije, definirati konstantu ravnoteže kao omjer koncentracija neke tvari u različitim fazama, odnosno otapalima. Nakon toga slijedi izračun množinske koncentracije joda u vodenom sloju u slučaju da se ekstrakcija provede u jednom koraku s 40 mL

kloroforma. I ovaj zadatak učenici će riješiti na ploči. Usporedbom računskih podataka iz posljednja dva zadatka, učenici će odgovoriti na posljednje pitanje prilikom čega se potiče rasprava kojoj je cilj zaključiti da je ekstrakcija djelotvornija kada se provede u više koraka s manjim volumenima otapala. Na kraju sata, učenici, zajedno s nastavnikom, sumiraju spoznaje do kojih su došli tijekom ovog nastavnog sata.

## 6.7. Temeljni podatci o nastavnom satu

Razred: 2. razred

Oblik rada: grupni rad

Nastavna cjelina: Ravnotežni sustavi

Nastavna tema: Konstanta ravnoteže

Ključna opažanja tijekom pokusa:

Miješanjem sadržaja lijevka za odjeljivanje, klorofomski sloj postaje ljubičast što je posljedica ekstrakcije joda iz vodenog u klorofomski sloj. Stajanjem lijevka na metalnom prstenu dolazi do odjeljivanja slojeva, nakon čega se uspostavlja stanje ravnoteže.

Glavni nastavni cilj:

Pomoću jednostavnog pokusa ekstrakcije vodene otopine joda, učenici će zaključiti da se kemijska ravnoteža opisuje konstantom, koja je omjer koncentracija neke tvari u dvije različite faze.

Procjene opasnosti i rizika:

Kloroform je lako hlapljivo otapalo, ne smije GA SE direktno udisati. Moguće su ozljede u slučaju razbijanja kemijskog pribora.

Prethodno potrebna znanja, vještine i sposobnosti:

- navesti vrste tvari,
- razlikovati elementarne tvari (metale i nemetale) i kemijske spojeve,
- razlikovati smjese tvari od elementarnih tvari i kemijskih spojeva,
- razlikovati homogene i heterogene smjese,
- navesti fizikalna svojstva tvari,

- usporediti topljivost topljivosti tvari u pojedinom otapalu na temelju opažanja,
- povezati gustoću otapala s položajem slojeva nakon postupka ekstrakcije,
- izračunati množinsku koncentraciju tvari,
- opisati kemijsku ravnotežu ravnotežnom jednadžbom,
- koristiti laboratorijski pribor i posuđe,
- crtati laboratorijski pribor i posuđe.

Izlazni obrazovni ishodi:

- objasniti postupak ekstrakcije,
- opisati ekstrakcijski postupak konstantom ravnoteže,
- izračunati koeficijent razdjeljenja tvari između dva otapala.
- primijeniti postupak ekstrakcije za razdvajanje smjese tvari.

## ***7. Literatura***

1. E.-C. Oerke, *J. Agr. Sci.* **144** (2006) 31–43.
2. Sredstva za zaštitu bilja (fitofarmacija) - opći dio, u: Priručnik iz zaštite bilja, M. Maceljki, B. Cvjetković, J. Igrc Barčić, Z. Ostojić (urednici), Zavod za zaštitu bilja u poljoprivredi i šumarstvu Republike Hrvatske i Hrvatsko društvo biljne zaštite, Zagreb, 2002, str. 45–97.
3. D. Želježić, *Sigurnost* **53** (2011) 141–150.
4. Zakon o održivoj uporabi pesticida (NN 14/2014) i Pravilnik o integriranoj proizvodnji poljoprivrednih proizvoda (NN br. 137/2012 i 59/2014).
5. K. Barić, Analiza potrošnje sredstava za zaštitu bilja, u: Utjecaj poljoprivrede na onečišćenje površinskih i podzemnih voda u Republici Hrvatskoj, Izvještaj projekta, D. Romić (voditelj), Sveučilište u Zagrebu, Agronomski Fakultet, 2014, str. 75–112.
6. M. Maceljki, *Glasilo biljne zaštite* **6** (2003) 363–357.
7. Pregled sredstava za zaštitu bilja u Hrvatskoj za 2011. godinu, *Glasilo biljne zaštite* **1–2** (2011).
8. Pregled sredstava za zaštitu bilja u Hrvatskoj za 2015. godinu, *Glasilo biljne zaštite* **1–2** (2015).
9. Popis registriranih sredstava za zaštitu bilja, Ministarstvo poljoprivrede Republike Hrvatske: <https://fis.mps.hr/trazilicaszb/> (pristupljeno 21. veljače 2016.).
10. R. Baličević, M. Ravlić, Herbicidi u zaštiti bilja, Poljoprivredni fakultet Sveučilišta J. J. Strossmayera, Osijek, 2014, str. 28–54.
11. A. Forouzesh, E. Zand, S. Soufizadeh, S. Samadi Ferooshani, *Eur. Weed Res. Soc.* **55** (2015) 334–358.
12. P. Bottoni, P. Grenni, L. Lucentini, A. Barra Caracciolo, *Microchem. J.* **107** (2013) 136–142.
13. R. Loos, G. Locoro, S. Comero, S. Contini, D. Schwesig, F. Werres, P. Balsaa, O. Gans, S. Weiss, L. Blaha, M. Bolchi, B. M. Gawlik, *Water Res.* **44** (2010) 4115–4126.
14. V. Drevenkar, S. Fingler, G. Mendaš, S. Stipičević, Ž. Vasilić, *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* **84** (2004) 207–216.
15. R. Beaudegnies, A. J. F. Edmunds, T. E. M. Fraser, R. G. Hall, T. R. Hawkes, G. Mitchell, J. Schaetzer, S. Wendeborn, J. Wibley, *Bioorg. Med. Chem.* **17** (2009) 4134–4152.



16. K. Grossman, T. Ehrhardt, *Pest. Manag. Sci.* **63** (2007) 429–439.
17. G. Mitchell, D. W. Bartlett, T. E. M. Fraser, T. R. Hawkes, D. C. Holt, J. K. Townson, R. A. Wichert, *Pest. Manag. Sci.* **57** (2001) 120–128.
18. H. De Almeida Dan, A. L. De Lemos Barroso, R. S. De Oliveira Junior, L. G. De Moraes Dan, S. De Oliveira Procopio, J. Constantin, G. B. Pereira Braz, Potential use of tembotrione (HPPD-inhibitor herbicides) in grain sorghum, u: Weed Control, A. Price (urednik), InTech, 2012: <http://www.intechopen.com/books/weed-control/potential-use-of-tembotrione-hppd-inhibitor-herbicides-in-grain-sorghum> (pristupljeno 3. listopada 2015.).
19. Lj. Radivojević, J. Gajić Umiljendić, D. Marisavljević, A. Anđelković, D. Pavlović, *Zaštita bilja* **65** (2014) 155–162.
20. I. Elezović, M. Stević, K. Jovanović-Radovanov, *Pesticidi* **18** (2003) 245–256.
21. R. Idziak, Z. Woznica, *Chil. J. Agr. Res.* **74** (2014) 129–134.
22. A. Schönhammer, J. Freitag, H. Koch, *J. Plant Dis. Prot.* (2006) 1023–1031.
23. C. A. Damalas, T. K. Gitsopoulous, S. D. Koutroubas, I. Georgoulas, *Planta Daninha* **3** (2015) 509–519.
24. J. Zhang, L. Zheng, O. Jack, D. Yan, Z. Zhang, R. Gerhards, H. Ni, *Crop Prot.* **52** (2013) 26–32.
25. A. Rahman, C. A. Dowsett, M. R. Trolove, T. K. James, *N. Z. Plant Prot.* **67** (2014) 298–303.
26. S. Durand, M. Sancelme, P. Besse-Hoggan, B. Combourieu, *Chemosphere* **81** (2010) 372–380.
27. H. Barchanska, A. Kluza, K. Krajczweska, J. Maj, *J. Soils Sediments* **16** (2016) 125–133.
28. H. Barchanska, A. Kowalska, B. Poloczek, *Environ. Sci. Pollut. Res.* **21** (2014) 4751–4758.
29. European Food Safety Authority, *EFSA Journal* **11** (2013) 1–78.
30. European Food Safety Authority, *EFSA Journal* **12** (2014) 1–79.
31. Pesticide Properties DataBase, University of Hertfordshire, Hatfield, Engleska. Dostupno na: <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/> (pristupljeno 20. studenog 2015.).
32. R. Đurović, *Pestic. fitomed.* **26** (2011) 9–22.
33. C. Csutoras, A. Kiss, *Microchem. J.* **85** (2007) 21–24.
34. V. Andreu, Y. Picó, *Trends Anal. Chem.* **23** (2004) 772–789.

35. M. Arias-Estévez, E. López-Periago, E. Martínez-Carballo, J. Simal-Gándara, J.-C. Mejuto, L. García-Río, *Agr. Ecosyst. Environ.* **123** (2008) 247–260.
36. I. Batisson, M. Sancelme, C. Maller, P. Besse-Hoggan, Fate and environmental impact of the recently marketed herbicide mesotrione: coupling biological and chemical studies for a global overview, u: *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, A. Méndez-Vilas (urednik), Badajoz, Španjolska, 2010, str. 287–294.
37. C. Calvayrac, N. Bontemps, A. Nougua-Bissoué, S. Romdhane, C.-M. Coste, J.-F. Cooper, *Sci. Total Environ.* **452-453** (2013) 227–232.
38. V. Yusà, C. Coscollà, W. Mellouki, A. Pastor, M. de la Guardia, *J. Chromatogr.* **1216** (2009) 2972–2983.
39. M. Kogan, S. Rojas, P. Gómez, F. Suárez, J. F. Muñoz, C. Alister, *Water. Sci. Technol.* **56** (2007) 169–178.
40. R. Đurović, T. Đorđević, Modern extraction techniques for pesticide residues determination in plant and soil samples, u: *Pesticides in the Modern World – Trends in Pesticides Analysis*, Margarita Stoytcheva (urednik), 2011, str. 221–246. Dostupno na: <http://www.intechopen.com/books/pesticides-in-the-modern-world-trends-in-pesticides-analysis/modern-extraction-techniques-for-pesticide-residues-determination-in-plant-and-soil-samples> (pristupljeno 23. svibnja 2015.).
41. S. Babić, M. Kaštelan-Macan, M. Petrović, *Wat. Sci. Tech.* **37** (1998) 243–250.
42. M. H. El-Saeid, M. I. Al-Wabel, G. Abdel-Nasser, A. M. Al-Turki, A. G. Al-Ghamdi, *J. App. Sci.* **10** (2010) 1775–1780.
43. M. Blekić, A. Režek Jambrak, F. Chemat, *Croat. J. Food Sci. Technol.* **3** (2011) 32–47.
44. A. N. Kakade, C. S. Magdum, *J. Pharm. Phytother.* **2** (2014) 5–7.
45. B. K. Kramer, P. B. Ryan, Soxhlet and microwave assisted extraction in determining the bioaccessibility of pesticides from soil and model solids, *Proceedings of the 2000 Conference on Hazardous Waste Research*, Denver, Colorado, SAD, 2000, str. 196–210. Dostupno na: <https://www.engg.ksu.edu/HSRC/00Proceed/kramer.pdf> (pristupljeno 20. veljače 2016.).
46. H. Barchanska, M. Rusek, *Environ. Monit. Assess.* **184** (2012) 321–334.

47. L. Gomides Freitas, C. W. Götz, M. Ruff, H. P. Singer, S. R. Müller, *J. Chromatogr. A* **1028** (2004) 277–286.
48. N. J. K. Simpson, M. J. M. Wells, Introduction to solid-phase extraction, u: Solid-phase extraction – principles, techniques and applications, N. J. K. Simpson (urednik), SAD, 2000, str. 2–5.
49. H. M. Pylypiw Jr., T. L. Arsenault, C. M. Thetford, M. J. Incorvia Mattina, *J. Agric. Food Chem.* **45** (1997) 3522–3528.
50. R. Đurović, T. Đorđević, Lj. Radivojević, Lj. Šantrić, J. Gajić Umiljendić, *Pestic. Phytomed.* **27** (2012) 239–244.
51. C. Molins, E. A. Hogendoorn, H. A. G. Heusinkveld, A. C. van Beuzekom, P. van Zoonen, R. A. Baumann, *Chromatographia* **48** (1998) 450–456.
52. B. Rakvin, *Zbornik 16. ljetne škole mladih fizičara* (lipanj 2000) 1–8.
53. S. Betlehem – Bebek, *Glasiló Belupa* (2007). Dostupno na: <http://www.belupo.com/Default.aspx?sid=6941> (pristupljeno 20. veljače 2016.).
54. K. Lazarić, Validacija analitičkih metoda – osnovna načela, str. 61–64. Dostupno na: <http://www.akreditacija.hr/agencija/casopis/> (pristupljeno 18. veljače 2016.).
55. T. Madić, *Svijet po mjeri* **2** (2013).
56. S. Stipičević, S. Fingler, L. Zupančić-Kralj, V. Drevenkar, *J. Sep. Sci.* **26** (2003) 1237–1246.4
57. G. Shen, H. Kee Lee, *J. Chromatogr. A* **985** (2003) 167–174.
58. P. C. Veggi, J. Martinez, M. A. A. Meireles, Fundamentals of microwave extraction, u: Microwave-assisted extraction for bioactive compounds – theory and practice, F. Chemat, F. Cravotto (urednici), SAD, 2013, str. 15–52.
59. S. Stipičević, N. Galzina, N. Udiković-Kolić, T. Jurina, G. Mendaš, M. Dvorščak, I. Petrić, K. Barić, V. Drevenkar, *Geoderma* **259–260** (2015) 300–309.
60. J. Patsias, E. N. Papadakis, E. Papadopoulou-Mourkidou, *J. Chromatogr. A* **959** (2002) 153–161.
61. V. Lopez-Avila, R. Young, J. Benedicto, P. Ho, R. Kim, *Anal. Chem.* **67** (1995) 2096–2102.
62. D. A. Skoog, D. M. West, F. James Holler (prevoditelji N. Kujundžić, V. Živčić-Alegretti, A. Živković), *Osnove analitičke kemije*, Republika Hrvatska, 1999, str. 750–768.

63. M. J. M. Wells, Principles of extraction and the extraction of semivolatile organics from liquids, u: Sample preparation techniques in analytical chemistry, S. Mitra (urednik), SAD, 2003, str. 37–57.
64. D. E. Raynie, Extraction, u: Encyclopedia of analytical science, A. Townshend, C. F. Poole, P. J. Worsfold (urednici), SAD, 2005, str. 118–128.
65. Multi-Agency Radiological Laboratory Analytical Protocols, Separation Techniques, str. 25–36. Dostupno na: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-05/documents/402-b-04-001b-14-final.pdf> (pristupljeno 30. ožujka 2016.).
66. Y. Marcus, Principles of solubility and solutions, u: Solvent extraction principles and practice, J. Rydberg, M. Cox, C. Musikas, G. R. Choppin (urednici), New York, SAD, 2005, str. 25–80.
67. Nastavni plan i program za osnovnu školu. Dostupno na: <http://public.mzos.hr/fgs.axd?id=20542> (pristupljeno 5. travnja 2016.).
68. Nastavni plan i program za gimnazije i strukovne škole. Dostupno na: [http://dokumenti.ncvvo.hr/Nastavni\\_plan/gimnazije/obvezni/kemija.pdf](http://dokumenti.ncvvo.hr/Nastavni_plan/gimnazije/obvezni/kemija.pdf) (pristupljeno 6. travnja 2016.).

*Prilozi*

Prilog A.

Radni listić (s očekivanim odgovorima) uz nastavnu temu Konstanta ravnoteže

### POKUS 1 TKO BI GORI, SAD JE DOLI...

**Pribor:** lijevak za odjeljivanje, stativ, željezni prsten, Erlenmeyerova tikvica od 250 mL, menzura

**Kemikalije:** vodena otopina joda, kloroform

**KORAK 1** Pred tobom se nalaze kloroform i vodena otopina joda, pripremljena otapanjem zrnca joda u 50 mL destilirane vode. **Zabilježi opažanja.**

---

Kloroform je bistra bezbojna tekućina karakterističnog mirisa, a vodena otopina joda je bistra žutosmeđa tekućina.

**PITANJE 1** Kojoj vrsti tvari pripada jod, a kojoj pripada vodena otopina joda?

---

Jod je elementarna tvar, a vodena otopina joda je homogena smjesa tvari.

**KORAK 2** Menzурom odmjeri 10 mL vodene otopine joda te je prelij u lijevak za odjeljivanje koji stoji u željeznom prstenu na stativu. Drugom menzурom odmjeri 5 mL kloroforma te ga također prelij u lijevak za odjeljivanje. **Zabilježi opažanja.**

---

U početku dolazi do miješanja kloroforma i vodene otopine joda, no nakon nekoliko sekundi jasno se mogu primjetiti odvojeni slojevi kloroforma i vodene otopine joda.

**KORAK 3** Zatvori lijevak za odjeljivanje čepom i njegov sadržaj dobro promućkaj. Lijevak čvrsto drži objema rukama. **Pritom jednom rukom stalno čvrsto drži čep lijevka!** Nakon kraćeg mućkanja otvori pipac lijevka, ali tako da je lijevak čepom okrenut prema dolje. **Zabilježi opažanja.**

---

Prilikom miješanja sadržaja lijevka, dolazi do miješanja vodene otopine joda i kloroforma pri čemu se može primjetiti da kloroformski sloj postaje ljubičast.

**PITANJE 2** Zašto je potrebno otvarati pipac lijevka?

---

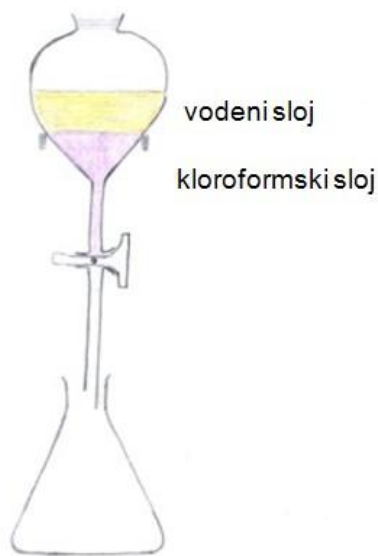
---

Pipac na lijevku je potrebno otvarati da bi se tlak u lijevku izjednačio s atmosferskim tlakom. Kada se tlakovi ne bi izjednačavali, tlak u lijevku za odjeljivanje bi postao prevelik i moglo bi doći do pucanja lijevka. Otvaranjem pipca lijevka čuje se kako zrak izlazi iz lijevka.

**KORAK 4** Nakon što je sadržaj lijevka promućkan, lijevak stavi u metalni prsten na stativu i skini čep s njega. **Zabilježi opažanja.**

Stajanjem lijevka na metalnom prstenu, mogu se primjetiti dva sloja – gornji i donji. Gornji sloj je žutosmeđ, a donji sloj je ljubičast.

**PITANJE 3** Skiciraj aparaturu korištenu u ovom pokusu. Na skici naznači nazive i boje slojeva u lijevku za odjeljivanje.



**PITANJE 4** Zašto je došlo do odvajanja slojeva u lijevku za odjeljivanje? Zašto je jedan sloj gore, a drugi dolje?

Do odvajanja slojeva u lijevku za odjeljivanje je došlo zato što su to otapala koja se međusobno ne miješaju i koja se razlikuju u gustoći. Donji sloj ima veću gustoću od gornjeg sloja, koji „pliva“ na njemu.

**KORAK 5** Donji sloj ispusti u Erlenmeyerovu tikvicu, a zatim u lijevak za odjeljivanje dodaj novih 5 mL kloroforma, lijevak začepi i promućkaj njegov sadržaj na način opisan u **KORAKU 3**. Nakon što su se slojevi odijelili, donji sloj ispusti u Erlenmeyerovu tikvicu.

**PITANJE 5** Što na temelju ovog pokusa zaključuješ o topljivosti joda u vodi i kloroformu? Objasni svoj odgovor.

Jod je topljiv i u vodi i u kloroformu. S obzirom na to da tijekom pokusa ekstrakcije jod prelazi iz vodenog sloja u kloroformski, može se zaključiti da je jod bolje topljiv u kloroformu nego u vodi.

**PITANJE 7** Što zaključuješ o sastavu slojeva nakon druge ekstrakcije?

S obzirom na to da i nakon ekstrakcije s drugim volumenom kloroforma, kloroform postaje ljubičast, može se zaključiti da se prilikom prve ekstrakcije nije sav jod ekstrahirao iz vodenog u kloroformski sloj.

**PITANJE 8** Što se postiže miješanjem, odnosno izmućkavanjem sadržaja lijevka za odjeljivanje?

Voda i kloroform su otapala različite gustoće koja se međusobno ne miješaju. Zbog toga dolazi do odjeljivanja slojeva. Izmućkavanjem sadržaja lijevka postiže se miješanje ovih dvaju slojeva, koji se, nakon prestanka mućkanja, ponovno odjeljuju.

**PITANJE 9** Odgovor na **PITANJE 8** potkrijepi pripadajućom ravnotežnom jednačbom.

$[I_2]_{\text{VODENI SLOJ}} \quad [I_2]_{\text{KLOROFORMSKI SLOJ}}$

**PITANJE 10** Hoće li omjer množinskih koncentracija joda u vodenom i kloroformskom sloju biti stalna ili promjenljiva vrijednost? Objasni svoj odgovor.

Bit će stalna vrijednost, ako je postignuto stanje ravnoteže.

**PITANJE 11** Nakon prvog izmućkavanja množinska koncentracija joda u vodenom sloju je bila  $2 \text{ mmol mL}^{-1}$ , a u klorofomu  $500 \text{ mmol mL}^{-1}$ . Kolika je bila množinska koncentracija joda u vodenom sloju nakon drugog izmućkavanja?

nakon prvog izmućkavanja

$$c(I_2, \text{vod.}) = 2 \text{ mmol mL}^{-1}$$

$$c(I_2, \text{klor.}) = 500 \text{ mmol mL}^{-1}$$

$$V(\text{vodeni sloj}) = 10 \text{ mL}$$

$$V(\text{kloroformski sloj}) = 5 \text{ mL}$$

$c(I_2, \text{vod.}) = ?$  nakon drugog izmućkavanja

$$c(I_2, \text{klor.})/c(I_2, \text{vod.}) = 500 \text{ mmol mL}^{-1}/2 \text{ mmol mL}^{-1} = 250 \text{ – nakon prvog izmućkavanja}$$

$$250 = 2 \text{ mmol mL}^{-1}/x$$

$$250x = 2 \text{ mmol mL}^{-1}$$

$$x = 2 \text{ mmol mL}^{-1}/250$$

$$x = 8 \times 10^{-3} \text{ mmol mL}^{-1} = c(I_2, \text{vod.}) \text{ nakon drugog izmućkavanja}$$

$$c(I_2, \text{vod.}) = n(I_2, \text{vod.})/V(\text{vodeni sloj}) \rightarrow n(I_2, \text{vod.}) = c(I_2, \text{vod.})/V(\text{vod. sloj})$$

$$n(I_2, \text{vod.}) = 8 \times 10^{-3} \text{ mmol mL}^{-1}/10 \text{ mL}$$

$$n(I_2, \text{vod.}) = 8 \times 10^{-5} \text{ mmol} = 8 \cdot 10^{-8} \text{ mmol}$$

$$n(I_2, \text{vod.}) = m(I_2, \text{vod.})/M(I_2) \rightarrow m(I_2, \text{vod.}) = n(I_2, \text{vod.}) \cdot M(I_2)$$

$$m(I_2, \text{vod.}) = 8 \cdot 10^{-8} \text{ mmol} \cdot 253,8 \text{ g mol}^{-1}$$

$$m(I_2, \text{vod.}) = 2,030 \cdot 10^{-5} \text{ g}$$

Rješenje:  $c(I_2, \text{vod.}) = 8 \cdot 10^{-3} \text{ mmol mL}^{-1}$



**PITANJE 12** Kolika bi bila množinska koncentracija joda u vodenom sloju u slučaju da je ekstrakcijski postupak proveden u jednom koraku, tj. da je odmah uporabljeno 10 mL kloroforma?

$$c(I_2, \text{klor.}) = 500 \text{ mmol mL}^{-1}$$

$$V(\text{vodeni sloj}) = 10 \text{ mL}$$

$$V(\text{kloroformski sloj}) = 10 \text{ mL}$$

---


$$c(I_2, \text{vod.}) = ?$$

$$250 = c(I_2, \text{klor.}) / c(I_2, \text{vod.})$$

$$250 = 500 \text{ mmol mL}^{-1} / c(I_2, \text{vod.})$$

$$250 \cdot c(I_2, \text{vod.}) = 500 \text{ mmol mL}^{-1}$$

$$c(I_2, \text{vod.}) = 500 \text{ mmol mL}^{-1} / 250$$

$$c(I_2, \text{vod.}) = 2 \text{ mmol mL}^{-1}$$

$$c(I_2, \text{vod.}) = n(I_2, \text{vod.}) / V(\text{vodeni sloj}) \rightarrow n(I_2, \text{vod.}) = c(I_2, \text{vod.}) \cdot V(\text{vod. sloj})$$

$$n(I_2, \text{vod.}) = 2 \text{ mmol mL}^{-1} / 10 \text{ mL}$$

$$n(I_2, \text{vod.}) = 0,2 \text{ mmol} = 2 \cdot 10^{-4} \text{ mol}$$

$$n(I_2, \text{vod.}) = m(I_2, \text{vod.}) / M(I_2) \rightarrow m(I_2, \text{vod.}) = n(I_2, \text{vod.}) \cdot M(I_2)$$

$$m(I_2, \text{vod.}) = 2 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot 253,8 \text{ g mol}^{-1}$$

$$m(I_2, \text{vod.}) = 0,050 \text{ g}$$

Rješenje: \_\_\_\_\_  
 $c(I_2, \text{vod.}) = 2 \text{ mmol mL}^{-1}$

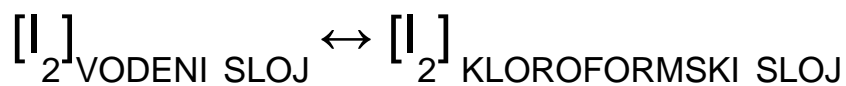
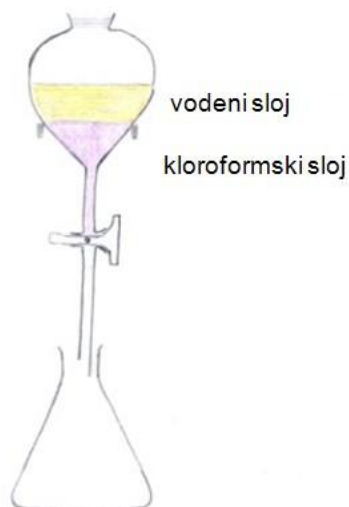
**PITANJE 13** Što zaključuješ na temelju rezultata računa iz prethodna dva pitanja? (P11 i P12)

---

Da je ekstrakciju bolje provoditi više puta s manjim porcijama otapala za ekstrakciju, nego odjednom s velikim volumenom.

## Prilog B.

Prezentacija uz nastavnu temu Konstanta ravnoteže

**P11**

nakon prvog izmućkavanja

$$c(I_2, \text{vod.}) = 2 \text{ mmol mL}^{-1}$$

$$c(I_2, \text{klor.}) = 500 \text{ mmol mL}^{-1}$$

$$V(\text{vodeni sloj}) = 10 \text{ mL}$$

$$V(\text{kloroformski sloj}) = 5 \text{ mL}$$

---

 $c(I_2, \text{vod.}) = ?$  nakon drugog izmućkavanja

 $c(I_2, \text{klor.})/c(I_2, \text{vod.}) = 500 \text{ mmol mL}^{-1}/2 \text{ mmol mL}^{-1} = 250$  – nakon prvog izmućkavanja

$$250 = 2 \text{ mmol mL}^{-1}/x$$

$$250 x = 2 \text{ mmol mL}^{-1}$$

$$x = 2 \text{ mmol mL}^{-1}/250$$

 $x = 8 \times 10^{-3} \text{ mmol mL}^{-1} = c(I_2, \text{vod.})$  nakon drugog izmućkavanja

$$c(I_2, \text{vod.}) = n(I_2, \text{vod.})/V(\text{vodeni sloj}) \rightarrow n(I_2, \text{vod.}) = c(I_2, \text{vod.})/V(\text{vod. sloj})$$

$$n(I_2, \text{ vod.}) = 8 \times 10^{-3} \text{ mmol mL}^{-1} / 10 \text{ mL}$$

$$n(I_2, \text{ vod.}) = 8 \times 10^{-5} \text{ mmol} = 8 \cdot 10^{-8} \text{ mmol}$$

$$n(I_2, \text{ vod.}) = m(I_2, \text{ vod.}) / M(I_2) \rightarrow m(I_2, \text{ vod.}) = n(I_2, \text{ vod.}) \cdot M(I_2)$$

$$m(I_2, \text{ vod.}) = 8 \cdot 10^{-8} \text{ mmol} \cdot 253,8 \text{ g mol}^{-1}$$

$$m(I_2, \text{ vod.}) = 2,030 \cdot 10^{-5} \text{ g}$$

**P12**

$$c(I_2, \text{ klor.}) = 500 \text{ mmol mL}^{-1}$$

$$V(\text{vodeni sloj}) = 10 \text{ mL}$$

$$V(\text{kloroformski sloj}) = 10 \text{ mL}$$

---


$$c(I_2, \text{ vod.}) = ?$$

$$250 = c(I_2, \text{ klor.}) / c(I_2, \text{ vod.})$$

$$250 = 500 \text{ mmol mL}^{-1} / c(I_2, \text{ vod.})$$

$$250 \cdot c(I_2, \text{ vod.}) = 500 \text{ mmol mL}^{-1}$$

$$c(I_2, \text{ vod.}) = 500 \text{ mmol mL}^{-1} / 250$$

$$c(I_2, \text{ vod.}) = 2 \text{ mmol mL}^{-1}$$

$$c(I_2, \text{ vod.}) = n(I_2, \text{ vod.}) / V(\text{vodeni sloj}) \rightarrow n(I_2, \text{ vod.}) = c(I_2, \text{ vod.}) / V(\text{vod. sloj})$$

$$n(I_2, \text{ vod.}) = 2 \text{ mmol mL}^{-1} / 10 \text{ mL}$$

$$n(I_2, \text{ vod.}) = 0,2 \text{ mmol} = 2 \cdot 10^{-4} \text{ mol}$$

$$n(I_2, \text{ vod.}) = m(I_2, \text{ vod.}) / M(I_2) \rightarrow m(I_2, \text{ vod.}) = n(I_2, \text{ vod.}) \cdot M(I_2)$$

$$m(I_2, \text{ vod.}) = 2 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot 253,8 \text{ g mol}^{-1}$$

$$m(I_2, \text{ vod.}) = 0,050 \text{ g}$$

$$K = K_D = \frac{[I_2]_{\text{Kloroformski sloj}}}{[I_2]_{\text{vodeni sloj}}}$$

Rođena sam 27. listopada 1991. godine u Bjelovaru. Nakon što sam završila III. osnovnu školu u Bjelovaru, upisala sam opći smjer Gimnazije Bjelovar. Integrirani preddiplomski i diplomski studij biologije i kemije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu sam upisala 2010. godine.

Tijekom srednjoškolskih dana aktivno sam se bavila glumom u Bjelovarskom kazalištu, Bjelovar te nastupala u predstavama „Lektira pred sudom“ i „Soba 101 s pogledom na mrtvačnicu“ i cabaretu „Tebi ljubavi“. Tijekom studentskih dana sudjelovala sam u manifestaciji „Noć biologije“ 2013. godine.