

Određivanje herbicida u prirodnim vodama vezanim sustavom tekućinska kromatografija - tandemna spektrometrija masa (LC-MS/MS)

Jusup, Ena

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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:217:800539>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-26**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Ena Jusup

**Određivanje herbicida u prirodnim vodama vezanim sustavom
tekućinska kromatografija – tandemna spektrometrija masa
(LC–MS/MS)**

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
radi stjecanja akademskog zvanja
magistre kemije

Zagreb, 2020.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za analitičku kemiju Instituta Ruđer Bošković
pod mentorstvom dr. sc. Ivana Sente, viši zn. sur.

Nastavnik imenovan od strane Kemijskog odsjeka je prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić.

Zahvale

Zahvaljujem dr. sc. Ivanu Senti na predloženoj temi za ovaj diplomski rad i na prenesenom znanju tijekom provođenja istraživačkog dijela rada, kao i na strpljivom ispravljanju i savjetima.

Zahvaljujem se i dr. sc. Ivi Juranović Cindrić na pruženoj pomoći i savjetima.

Najviše se zahvaljujem svojoj majci na strpljenju, razumijevanju, ljubavi i vjeri u mene.

Zahvaljujem se i ostatku obitelji na podršci te prijateljima, bez kojih studiranje ne bi bilo lako.

Sadržaj

SAŽETAK.....	VI
ABSTRACT	VII
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	4
2.1. 1,3,5-Triazinski herbicidi	4
2.2. Fenil-urea herbicidi.....	10
2.3. Kloracetanilidni herbicidi	14
2.4. Ekstrakcija na čvrstoj fazi.....	17
2.5. Tekućinska kromatografija.....	18
2.6. Spektrometrija masa.....	20
2.6.1. Elektoraspršenje (ESI).....	20
2.6.2. Kvadrupolni spektrometar masa	22
2.6.3. Vezani sustav tekućinska kromatografija – tandemna spektrometrija masa s kvadrupolnim analizatorom masa.....	23
2.7. Validacija analitičkih metoda	24
2.7.1. Specifičnost i selektivnost.....	24
2.7.2. Linearnost.....	25
2.7.3. Preciznost.....	25
2.7.4. Istinitost.....	26
2.7.5. Granica detekcije i granica kvantitativnog određivanja.....	27
2.7.6. Robusnost	27
2.8. Analiza triazinskih, fenil-urea i kloracetanilidnih herbicida u prirodnim vodama.....	28
2.9. Rasprostranjenost triazinskih, fenil-urea i kloracetanilidnih herbicida u prirodnim vodama	31
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	36
3.1. Materijali	36
3.1.1. Kemikalije	36
3.1.2. Instrumenti i pribor	37
3.1.3. Priprava otopina.....	38
3.1.4. Uzorkovanje	39
3.2. Metode.....	42
3.2.1. Ekstrakcija na čvrstoj fazi.....	42
3.2.2. Instrumentna analiza (LC-MS/MS).....	42

3.2.3. Kalibracija	45
3.2.4. Validacija metode	45
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	48
4.1. Razvoj metode određivanja herbicida u prirodnim vodama	48
4.2. Validacija metode.....	53
4.2.1. Validacija metode za riječnu vodu.....	54
4.2.2. Validacija metode za vodu za piće (izvorsku vodu)	56
4.2.3. Validacija metode za morsku vodu	58
4.3. Određivanje herbicida u prirodnim vodama	60
4.3.1. Određivanje herbicida u riječnoj vodi	60
4.3.2. Određivanje herbicida u vodi za piće	64
4.3.3. Određivanje herbicida u morskoj vodi.....	69
§ 5. ZAKLJUČAK	72
§ 6. POPIS KRATICA I SIMBOLA	74
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	76
§ 8. ŽIVOTOPIS	82



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

ODREĐIVANJE HERBICIDA U PRIRODNIM VODAMA VEZANIM SUSTAVOM TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA – TANDEMNA SPEKTROMETRIJA MASA (LC-MS/MS)

Ena Jusup

Razvijena je visokospecifična multirezidualna metoda za određivanje tragova 15 triazinskih, fenil-urea i kloracetanilidnih herbicida te triju razgradnih produkata triazina u prirodnim vodama. Uzorci su obogaćeni primjenom ekstrakcije na čvrstoj fazi te analizirani vezanim sustavom tekućinske kromatografije i tandemne spektrometrije masa. Metoda je sustavno validirana za nekoliko tipova prirodnih voda, uključujući riječnu vodu, morsku vodu i vodu za piće te je pokazala visoku lineranost, istinitost i preciznost, uz niske granice određivanja ($<0,2 \text{ ng L}^{-1}$ - 2 ng L^{-1}). Primjena metode pokazala je široku rasprostranjenost pojedinih herbicida u našim vodama, pri čemu su koncentracijske razine jako varirale ovisno o lokaciji i sezoni. U porječju Save prevladavaju metolaklor (do 139 ng L^{-1}) i terbutilazin (do 91 ng L^{-1}), dok je u uzorcima vodovodne vode sa zagrebačkog područja i dalje dominantan zabranjeni herbicid atrazin te njegovi razgradni produkti, s ukupnom koncentracijom od 83 ng L^{-1} .

(82 stranica, 16 slika, 20 tablica, 63 literaturnih navoda, jezik izvornika: Hrvatski jezik)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi: fenil-urea herbicidi, kloracetanilini herbicidi, morska voda, riječna voda, triazinski herbicidi, validacija metode, voda za piće

Mentor: dr. sc. Ivan Senta, viši zn. sur.

Nastavnik (imenovan od strane Kemijskog odsjeka): prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić

Ocjenitelji:

1. Prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić
 2. Prof. dr. sc. Željka Soldin
 3. Izv. prof. dr. sc. Vesna Petrović Peroković
- Zamjena: Izv. prof. sc. Sanda Rončević

Datum diplomskog ispita: 17. veljače 2020.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

DETERMINATION OF HERBICIDES IN NATURAL WATER BY LIQUID CHROMATOGRAPHY – TANDEM MASS SPECTROMETRY (LC-MS/MS)

Ena Jusup

A highly specific multiresidual method for trace determination of 15 triazine, phenylurea and chloroacetanilide herbicides, along with three degradation products of triazines, in natural water was developed. Samples were enriched by solid-phase extraction and analyzed by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. The method was systematically validated for several types of natural waters, including river water, drinking water and seawater, demonstrating high linearity, trueness and precision, as well as low quantification limits ($<0.2 \text{ ng L}^{-1}$ - 2 ng L^{-1}). It revealed widespread occurrence of selected herbicides in Croatian waters, with concentrations varying according to the season and location. In the Sava River basin, the most prominent compounds are metolachlor (139 ng L^{-1}) and terbuthylazine (91 ng L^{-1}), while banned herbicide atrazin and its degradation products are still dominant in tap water samples from the Zagreb area, with total mass concentrations up to 83 ng L^{-1} .

(82 pages, 16 figures, 20 tables, 63 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb

Keywords: chloroacetanilide herbicides, drinking water, phenylurea herbicides, river water, seawater, triazine herbicides, method validation

Mentor: Dr. Ivan Senta, Senior Research Associate
Supervisor (appointed by the Department of Chemistry): Dr. Iva Juranović Cindrić, Professor

Reviewers:

1. Dr. Iva Juranović Cindrić, Professor
 2. Dr. Željka Soldin, Professor
 3. Dr. Vesna Petrović Peroković, Associate Professor
- Substitute: Dr. Sanda Rončević, Associate Professor

Date of exam: 17th February 2020.

§ 1. UVOD

U površinske vode svakodnevno se unose velike količine raznih onečišćujućih tvari (zagađivala) antropogenog podrijetla koje mogu u znatnoj mjeri promijeniti njihov prirodni sastav te ugroziti njihovu kakvoću s mogućim štetnim posljedicama za živi svijet i ljudsko zdravlje. Najvažniji izvor unošenja štetnih tvari su opterećene komunalne i industrijske otpadne vode koje u pravilu sadrže vrlo složene smjese zagađivala. Konvencionalni uređaji za obradu otpadnih voda najčešće nisu dovoljno učinkoviti za uklanjanje širokog spektra potencijalnih zagađivala okoliša, te značajne količine teško razgradljivih zagađivala dopijevaju u prirodne vode. Polarni spojevi, zbog svoje dobre topljivosti u vodi, predstavljaju poseban problem za slatkovodne sustave, a time i za opskrbu čistom vodom za piće, jer ih je teško ukloniti tijekom obrade.¹ Dodatan izazov predstavlja i činjenica da se u ekonomski slabije razvijenim zemljama, uključujući i Hrvatsku, velik dio otpadnih voda ispušta u prirodne vodotoke bez ikakve prethodne obrade.

Među brojnim skupinama organskih zagađivala, istaknuto mjesto zauzimaju pesticidi, u koje pripadaju i herbicidi.² Na herbicide otpada polovica svih kemijskih proizvoda koji se primjenjuju u poljoprivredi. Često se nanose izravno na tlo, a njihova postojanost i ponašanje u tlu ovise o fizikalnim i kemijskim svojstvima herbicida, kao i o tipu tla, klimatskim uvjetima i obilježjima okoliša. Raspodjela herbicida i potencijalni rizici koje oni mogu predstavljati za okoliš određeni su njihovom topljivošću u vodi, lipofilnošću, tlakom para, kao i brzinom i načinom razgradnje. Nakon što se određena površina tretira herbicidom, oni ispiranjem tla lako dopijevaju u podzemne i površinske vode. Herbicidi mogu i isparavati s površine tla u atmosferu, iz koje se kišama mogu vratiti natrag u tlo te opet završiti u vodama. Interakcija herbicida s organskim tvarima u vodi i tlu može znatno utjecati na pokretljivost i postojanost herbicida u tlu. Vežanje herbicida na organske tvari u vodi povećava njihovu pokretljivost kroz tlo, a time se lako ispiru te završavaju u vodama.

Triazinski, fenil-urea i kloracetanilidni herbicidi imaju široku primjenu, pri čemu se koriste kao totalni ili selektivni herbicidi, što znači da uništavaju ili cijelu biljku ili samo njezin određeni dio. Obično se primjenjuju za kontrolu rasta trave i korova u raznim kulturama, uključujući kukuruz te razno voće i povrće. Komercijalno dostupni pripravci često sadrže smjesu dviju ili više aktivnih tvari pa se tako kloracetanilidi obično primjenjuju u smjesi s

triazinskim herbicidima.³ Triazinski i fenil-urea herbicidi relativno su netoksični za sisavce, iako su neka istraživanja pokazala da ipak postoji rizik za pojedine vrste. Pokazalo se tako da triazinski herbicid atrazin ima nepovoljan učinak na razvoj, reprodukciju i imunološki sustav štakora.⁴ Također, zabilježena je veća učestalost raznih tipova tumora kod štakora izloženih atrazinu ili simazinu.⁵ Fenil-urea herbicidi utječu na embrionalni razvoj nekih vrsta riba i vodenih organizama, dok su kloracetanilidni herbicidi, kao monuron i linuron, potencijalno kancerogeni za ljude.⁶ Zbog opaženog raširenog onečišćenja podzemnih i površinskih voda, upotreba određenih herbicida postupno je bila ograničena tijekom posljednjih nekoliko desetljeća i naposljetku zabranjena u mnogim europskim zemljama. U Europskoj uniji upotreba atrazina zabranjena je u Italiji i Njemačkoj 1991., a 2004. u ostalim zemljama. Acetoklor, kloracetanilidni herbicid, zabranjen je 2012. Ovi herbicidi su uglavnom zamijenjeni terbutilazinom te smjesom terbutilazina i metolaklora. Nakon ulaska Hrvatske u Europsku uniju, njezino zakonodavstvo koje se odnosi na zaštitu voda od onečišćenja pesticidima strogo slijedi propise EU.²

SVRHA RADA:

Svrha ovog rada bila je razvoj, validacija i primjena visokospecifične metode određivanja tragova nekoliko skupina herbicida, uključujući triazinske, fenil-urea i kloracetanilidne herbicide, u prirodnim vodama.

Za obradu uzoraka koristila se ekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *Solid-phase extraction* - SPE), a analiza je provedena primjenom vezanog sustava tekućinske kromatografije i tandemne spektrometrije masa (LC-MS/MS). Za detekciju i kvantitativno određivanje ciljanih spojeva koristilo se tzv. praćenje višestrukih tranzicijskih reakcija (engl. *multiple reaction monitoring* - MRM) na analizatoru masa s tri kvadrupola (QqQ), što je omogućilo pouzdano i osjetljivo određivanje odabranih herbicida u niskom području koncentracija koje se mogu očekivati u prirodnim vodama.

Validacija metode obuhvatila je sve bitne parametre, poput linearnosti, selektivnosti, istinitosti, preciznosti, utjecaja matrice, granice detekcije i granice kvantitativnog određivanja. Primjenjivost metode prikazana je na odabranim uzorcima rijeke Save, vodama za piće iz Zagreba i okolice te uzorcima morske vode iz Jadranskog mora.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. 1, 3, 5 – TRIAZINSKI HERBICIDI

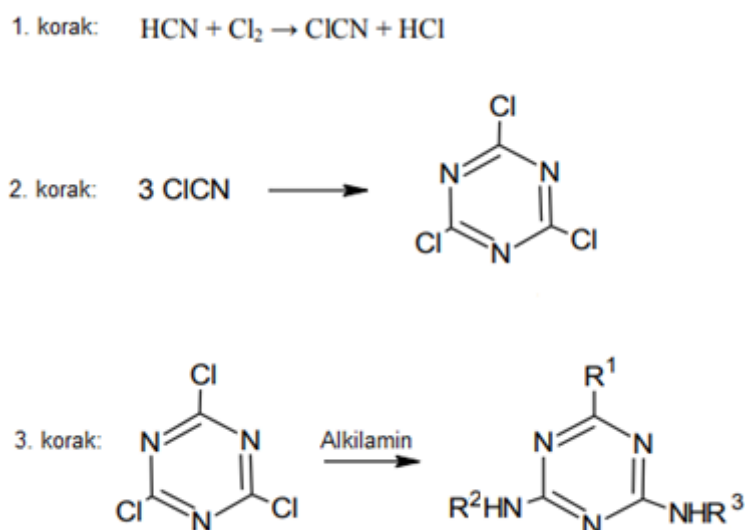
Triazinski herbicidi u upotrebi su od početka šezdesetih godina dvadesetog stoljeća, a prvi put su sintetizirani 1952. u farmaceutskoj tvrtki „Ciba-Geigy“ u Švicarskoj. Koriste se kao vodeći herbicidi za suzbijanje biljnih korova u poljoprivredi, najčešće za zaštitu kukuruza i šećerne trske. Učestala primjena i velike doze dovele su do pojave rezistencije nekih korova te do akumuliranja u tlu i vodama pa se danas postupno zabranjuje njihova upotreba.⁷

Triazini se sastoje od heterocikličkog prstena s tri atoma dušika te postoje u tri izomerna oblika: vicinalnom, asimetričnom i simetričnom (Slika 1).



Slika 1. Strukture triazinskih herbicida

Sinteza 1,3,5-triazinskih herbicida sastoji se od tri koraka, pri čemu u prvom koraku nastaje klorcijan iz cijanovodika i klora (Slika 2). U drugom koraku dolazi do ciklizacije klorcijana, uz dodatak kiseline, te nastaje heterociklički spoj cijanurklorid (2,4,6-triklor-1,3,5-triazin). Nakon toga cijanurklorid se supstituira različitim aminima, natrij-metanoatom ili natrij-tiometanoatom, pri čemu nastaje 1,3,5-triazin.⁴



Slika 2. Shematski prikaz sinteze 1,3,5-triazinskih herbicida⁸

1,3,5-triazini ili *s*-triazini dijele se u tri skupine: klortriazini, metiltiotriazini i metoksitriazini. Klortriazinima pripadaju atrazin, simazin, propazin i terbutilazin, metiltiotriazinima pripadaju prometrin i terbutrin, dok se u metoksitriazine ubrajaju atraton i prometon. Strukture nekih 1,3,5-triazina prikazane su u Tablici 1.⁸

Tablica 1. Strukture nekih triazinskih herbicida i njihovih razgradnih produkata te imena prema IUPAC-u

SPOJ	R ¹	R ²	R ³	IME SPOJA PREMA IUPAC-u
Atrazin	Cl	CH ₂ CH ₃	CH(CH ₃) ₂	<i>N</i> ² -etil-6-klor- <i>N</i> ⁴ -izopropil-1,3,5-triazin-2,4-diamin
Simazin	Cl	CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₃	<i>N</i> ² , <i>N</i> ⁴ -dietil-6-klor-1,3,5-triazin-2,4-diamin
Propazin	Cl	CH(CH ₃) ₂	CH(CH ₃) ₂	<i>N</i> ² , <i>N</i> ⁴ -diizopropil-6-klor-1,3,5-triazin-2,4-diamin
Terbutilazin	Cl	C(CH ₃) ₃	CH ₂ CH ₃	<i>N</i> ² - <i>tert</i> -butil- <i>N</i> ⁴ -etil-6-klor-1,3,5-triazin-2,4-diamin
Prometrin	SCH ₃	CH(CH ₃) ₂	CH(CH ₃) ₂	<i>N</i> ² , <i>N</i> ⁴ -diizopropil-6-metiltio-1,3,5-triazin-2,4-diamin
Terbutrin	SCH ₃	C(CH ₃) ₃	CH ₂ CH ₃	<i>N</i> ² - <i>tert</i> -butil- <i>N</i> ⁴ -dietil-6-metiltio-1,3,5-triazin-2,4-diamin
Irgarol (Cibutrin)	SCH ₃	C(CH ₃) ₃	CH(CH ₃) ₂	<i>N</i> ² - <i>tert</i> -butil- <i>N</i> ⁴ -diizopropil-6-metiltio-1,3,5-triazin-2,4-diamin
Deetiltatrazin*	Cl	CH(CH ₃) ₂	H	<i>N</i> ² -diizopropil-6-klor-1,3,5-triazin-2,4-diamin
Deilterbutilazin**	Cl	C(CH ₃) ₃	H	<i>N</i> - <i>tert</i> -butil-6-klor-1,3,5-triazin-2,4-diamin
Deizopropilatrazin*	Cl	CH ₂ CH ₃	H	<i>N</i> ² -etil-6-klor-1,3,5-triazin-2,4-diamin
Sebutilazin	Cl	CH(CH ₃)(CH ₂ CH ₃)	CH ₂ CH ₃	<i>N</i> ² - <i>sec</i> -butil- <i>N</i> ⁴ -etil-6-klor-1,3,5-triazin-2,4-diamin

* razgradni produkt atrazina

** razgradni produkt terbutilazina

Triazinski herbicidi su bijele ili bezbojne krutine, bez mirisa i relativno netoksični za ljude. Srednja letalna doza za štakore, unesena oralnim putem, u rasponu je od 1845 mg kg⁻¹ (terbutilazin) do 7000 mg kg⁻¹ (propazin).⁹

Tablica 2. Fizikalno-kemijska svojstva nekih 1,3,5-triazinskih herbicida i njihovih razgradnih produkata

SPOJ	$S(\text{H}_2\text{O})^a / \text{mg L}^{-1}$	p^b / Pa	$t_t^c / ^\circ\text{C}$	$\log K_{ow}^d$	$\log K_{oc}^e$	pK_a^f	$t_{1/2}^g / \text{d}$	$\text{LD}_{50}^h / \text{mg kg}^{-1}$
Atrazin	33,0	$3,5 \times 10^{-5}$	170	2,48	2,0	1,70	75-100	3080
Simazin	5,0	$6,1 \times 10^{-9}$	225	2,18	2,1	2,0	45 do 100	>5000
Propazin	8,6	$3,9 \times 10^{-6}$	213	2,94	2,2	1,62	135	>7000
Terbutilazin	8,5	$1,5 \times 10^{-4}$	178	3,04	2,2 do 2,4	2,0	76,7	1845
Prometrin	33,0	$1,3 \times 10^{-4}$	119	3,41	2,1 do 2,7	4,1	41	3150- 3750
Terbutrin	25,0	$2,3 \times 10^{-4}$	104	3,74	2,8	4,3	47	2450- 2980
Irgarol (Cibutrin)	7,0	$8,8 \times 10^{-5}$	128-133	3,95	2,8	4,12	40	>2250
Deiltatrazin	3,2	$1,2 \times 10^{-2}$	135-137	1,51	1,9	---	62	---
Deizopropilatrazin	670	$2,8 \times 10^{-2}$	---	1,15	1,8 do 2,1	---	32-172	---
Deilterbuilazin	---	---	142-144	1,98	1,6	---	57	---

^a topljivost u vodi pri 20 °C⁹

^b tlak para pri 25 °C⁹

^c temperatura taljenja⁹

^d koeficijent razdjeljenja u sustavu *n*-oktanol/voda⁹

^e koeficijent razdjeljenja u sustavu organski ugljik/voda⁹

^f konstanta ionizacije konjugirane kiseline triazina⁹

^g vrijeme poluživota u tlu⁹

^h srednja letalna doza za štakore⁹

--- podatak nije pronađen

Fizikalna i kemijska svojstva triazinskih herbicida, koja su prikazana u Tablici 2, ovise o supstituentima R^1 , R^2 i R^3 . Najveći utjecaj ima supstituent R^1 (-Cl, -OCH₃, -SCH₃ ili -OH skupina), koji utječe na topljivost herbicida te na njegovu bazičnost. U Tablici 2 prikazane su vrijednosti za topljivost u vodi pri 20 °C i konstante ionizacije konjugirane kiseline triazina. Topljivost herbicida koji na položaju R^1 imaju -SCH₃ općenito je nešto veća od onih koji na tom položaju imaju atom klora. Utjecaj na bazičnost imaju i supstituenti R^2 i R^3 , odnosno alkilne skupine koje su vezane na prsten preko atoma dušika. Što je broj atoma ugljika u alkilnoj skupini veći, to će herbicid biti bazičniji i time slabije topljiv u vodi.⁴ Takvi se spojevi duže zadržavaju u tlu te se sporije ispiru vodama. S druge strane, spojevi koji imaju veću topljivost (>30 mg L⁻¹) te koeficijent razdjeljenja u sustavu organski ugljik/voda, K_{oc} , manji od 300, slabije se zadržavaju u tlu i lako dospijevaju u vode, a time imaju i velik potencijal zagađenja podzemnih voda. Razlog tomu je što prijenos herbicida iz tla u vodu ovisi o topljivosti u vodi, koeficijentu razdjeljenja između organskog ugljika i vode (K_{oc}), koeficijentu razdjeljenja u sustavu *n*-oktanol/voda (K_{ow}) te hlapljivosti.⁵

Mehanizam djelovanja triazina na korov je takav da oni uništavaju biljku inhibirajući fotosintezu. Klorofil je glavni pigment na koji triazinski herbicid ima toksičan učinak, a stupanj toksičnosti izravno je proporcionalan intenzitetu svjetlosti. Toksičnost je najjača na valnoj duljini od 428 nm do 658 nm.¹⁰ Herbicid djeluje tako da blokira struju elektrona iz vode u klorofil, uzrokujući oksidaciju klorofila, što dovodi do postupnog uništavanja slojevite strukture kloroplasta. Osim toga, herbicid može inhibirati sustav transporta elektrona tijekom fotosinteze, uzrokujući nakupljanje nitrata na vrhovima listova, čime se biljka dodatno oštećuje. Na taj način herbicidi uzrokuju klorozu: biljka se ošteti na vrhovima listova i osuši, rubovi postanu žuti, a time se polako uništava i cijela biljka.¹¹ Inhibiranjem transporta elektrona sprječava se proizvodnja adenozin-trifosfata (ATP-a), a on je glavni izvor energije za biljku. Mnoge biljke, kao što su kukuruz i šećerna trska, imaju metabolizam kojim se mogu zaštititi od triazinskih herbicida, zbog čega se oni upotrebljavaju za njihovu zaštitu. Mehanizam je takav da mogu razgraditi triazine u neaktivne 6-hidroksi-derivate ili mogu formirati konjugate s aminokiselinskim ostacima, npr. SH-skupinama u glutationu ili cisteinu.⁵ Po načinu djelovanja herbicidi se mogu podijeliti u dvije skupine: totalni ili selektivni herbicidi. Totalni unište cijelu biljku, a selektivni samo dijelove. Triazinski herbicidi se uglavnom upotrebljavaju kao selektivni, dok u mnogo većim koncentracijama djeluju kao totalni, ali ako se koriste za

uništenje biljke koja je u ranoj fazi razvoja. Što je biljka, odnosno korov, veća, to ju je teže uništiti.¹⁰

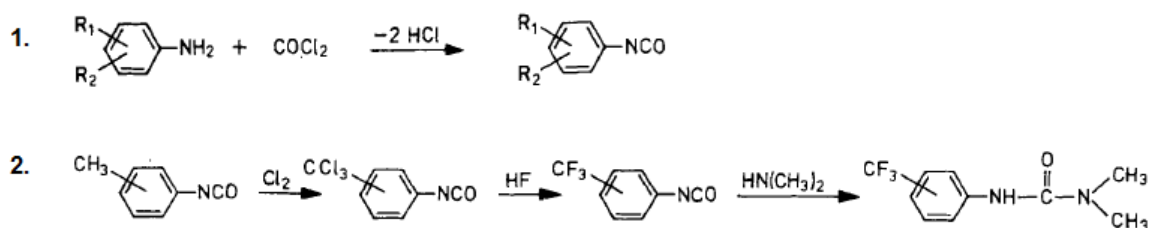
Postoje tri glavne skupine reakcija kojima se triazini mogu razgraditi: dealkiranje, hidroksiliranje i oksidacija. Najznačajniji proces razgradnje u vodi je fotokemijska razgradnja koja se temelji na hidroksiliranju. Prilikom razgradnje dolazi do djelomičnog ili potpunog gubitka bočnih lanaca, odnosno supstitucije bočnog lanca koji sadrži heteroatom u hidroksilnu skupinu. Kemijske karakteristike bočnih lanaca određuju brzinu razgradnje. Bočni lanac s C-S vezom puno se lakše razgrađuje od onog s C-Cl vezom, dok se lanac koji sadrži -OH skupinu najteže razgrađuje.¹²

Prvi proizvedeni triazinski herbicid bio je atrazin, a ujedno i najkorišteniji zbog svoje prihvatljive cijene i mogućnosti aplikacije pri lošim vremenskim uvjetima, ali i dugotrajnog rezidualnog djelovanja na korove. Atrazin se u biljku apsorbira najvećim dijelom kroz korijen, a zatim se polako provodi i do listova gdje inhibira proces fotosinteze. Zbog svoje pokretljivosti u tlu, jedan je od najznačajnijih onečišćivača površinskih i podzemnih voda, mora i tla, te je izrazito štetan za okoliš. Razlog zbog kojeg se ne sorbira jako na čestice tla je taj što je koeficijent razdjeljenja atrazina, K_{oc} , 100 mL g^{-1} , pa se lako ispire vodama. Kao zamjena za atrazin koristi se terbutilazin, koji je slabije topljiv u vodi i ima viši koeficijent razdjeljenja pa manje zagađuje podzemne vode. Mehanizam djelovanja isti je kao i kod atrazina. U tlu se zadržava 41 dan, za razliku od atrazina koji se može zadržati od 75 do 100 dana, a u većim koncentracijama i do cijele godine.⁴

2.2. FENIL-UREA HERBICIDI

Fenil-urea herbicidi pripadaju drugoj skupini herbicida koji se, također, upotrebljavaju od šezdesetih godina dvadesetog stoljeća, a prvi put su proizvedeni 1954. Pripadaju derivatima uree, a osim njih postoje još dva derivata: sulfonil-urea i benzoil-urea. Svi derivati uree su niskotoksični herbicidi. Međutim, za toplokrvne životinje veće akutne doze mogu biti smrtonosne. Koriste se u poljoprivredi za kontrolu korova, ali i za nepoljoprivredne svrhe; uz željezničke pruge, ceste, u industrijskim područjima.¹³

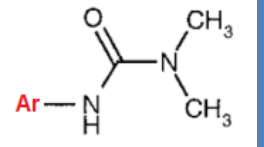
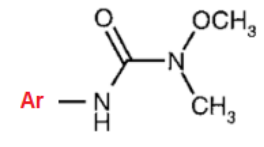
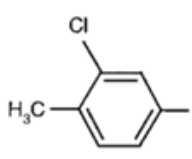
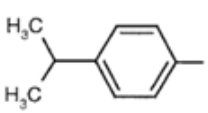
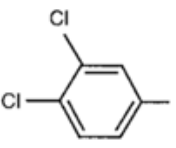
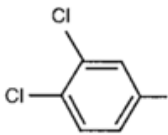
Fenil-urea herbicidi proizvode se adicijom primarnih ili sekundarnih alkilamina na arilizocijanate pa je njihova opća strukturna formula Ar-NH-CON(CH₃)R, u kojoj je Ar supstituirana benzenska jezgra, a R je -CH₃ ili -OCH₃ skupina. Na Slici 3 prikazana je sinteza fenil-urea herbicida. U prvom stupnju nastaje aril-izocijanat koji se pripravlja reakcijom arilamina s fosgenom. U drugom stupnju dolazi do kloriranja izocijanata, a zatim fluoriranja, pri čemu se krajnji produkt dobije u reakciji s dimetilaminom.⁵



Slika 3. Shematski prikaz sinteze fenil-urea herbicida⁵

Postoje disupstituirani, trisupstituirani i tetrasupstituirani derivati uree. Disupstituirani i tetrasupstituirani derivati su netoksični za biljku, a trisupstituirani pokazuju herbicidnu aktivnost i zbog toga imaju najširu primjenu.⁵ Među najvažnije trisupstituirane uree ubrajaju se *N'*-aril-*N,N*-dimetil-derivati i *N'*-aril-*N*-metoksi-*N*-metil-derivati, koji su prikazani u Tablici 3.

Tablica 3. Strukture nekih fenil-urea herbicida i imena spojeva prema IUPAC-u

SPOJ			IME SPOJA PREMA IUPAC-U
Klortoluron	Ar= 		3-(3-klor-4-metilfenil)-1,1-dimetilurea
Izoproturon	Ar= 		3-(4-izopropilfenil)-1,1-dimetilurea
Diuron	Ar= 		3-(3,4-diklorfenil)-1,1-dimetilurea
Linuron		Ar= 	3-(3,4-diklorfenil)-1-metil-1-metoksiurea

Fenil-urea herbicidi su bezbojne do blijedožute stabilne kristalne tvari, dobro topljive u vodi, ali i u organskim otapalima kao što su aceton, benzen, metanol i diklormetan. Zbog svoje visoke kemijske stabilnosti, zadržavaju se na površinama tla i ispiranjem odlaze u podzemne vode. Na zadržavanje u tlu utječe udio organske tvari, odnosno organskog ugljika u tlu, a to možemo vidjeti iz koeficijenta razdjeljenja u sustavu organski ugljik-voda, K_{oc} , čije se vrijednosti nalaze u Tablici 4. Najveći afinitet vezanja za organski ugljik u tlu ima diuron, zatim linuron i klortoluron, a najmanji izoproturon. Iz tog razloga, izoproturon najlakše dospje u podzemne i površinske vode, jer što spoj ima veću topljivost u vodi i manji K_{oc} , slabije se zadržava u tlu i lakše dospjeva u vode.¹³

Tablica 4. Fizikalno-kemijska svojstva nekih fenil-urea herbicida

SPOJ	$S(\text{H}_2\text{O})^a$ / mg L^{-1}	p^b / Pa	t_t^c / °C	log K_{ow}^d	log K_{oc}^e	pK_a^f	$t_{1/2}^g$ / d	LD_{50}^h / mg kg^{-1}
Klortoluron	74	$1,7 \times 10^{-5}$	156,6- 158	2,50	2,6	---	30 do 40	>10 000
Izoproturon	70,2	$5,5 \times 10^{-6}$	148,1	2,50	2,4	---	6 do 28	1826
Diuron	42	$1,1 \times 10^{-3}$	158-159	2,80	3,2-4,1	13,18	90	3400
Linuron	81	$5,1 \times 10^{-5}$	93-95	3,00	2,6-2,7	11,94	38 do 67	4000

^a topljivost u vodi pri 25 °C⁹

^b tlak para pri 25 °C⁹

^c temperatura taljenja⁹

^d koeficijent razdjeljenja u sustavu *n*-oktanol/voda⁹

^e koeficijent razdjeljenja u sustavu organski ugljik/voda⁹

^f konstanta ionizacije konjugirane kiseline triazina⁹

^g vrijeme poluživota u tlu⁹

^h srednja letalna doza za štakore⁹

--- podatak nije pronađen

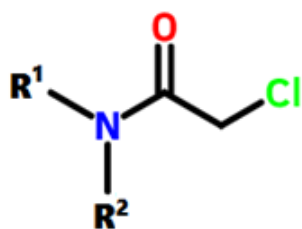
Mehanizam djelovanja sličan je kao kod triazinskih herbicida, što znači da inhibiraju fotosintezu sprječavanjem transporta elektrona. Nakon što se primijene na tlo te apsorbiraju u biljku, putem korijena dolaze do listova. Također mogu djelovati ili kao totalni ili kao selektivni herbicidi, ovisno o koncentraciji u kojoj se koriste. Kao i kod triazinskih herbicida, postoje biljke, poput pamuka, koje su razvile metabolizam otporan na ove herbicide. Relativno su netoksični za sisavce, a njihove letalne doze za štakore, unesene oralnim putem, nalaze se u Tablici 4 i u rasponu su od 1826 mg kg^{-1} za izoproturon do >10 000 mg kg^{-1} za klortoluron. *N'*-aril-*N*-metil-*N*-metoksi-derivati su selektivniji i imaju veću herbicidnu aktivnost od *N'*-aril-*N,N*-dimetil-derivata.¹⁰

Kada urea herbicidi dođu u okoliš, postupno se razgrađuju u zemlji. Period razgradnje ovisi o stabilnosti molekule, ali i o svojstvima tla. Kada aktivna tvar dođe na površinu tla ili u vodu, kemijski se razgrađuje pod utjecajem UV zračenja ili djelovanjem kiselih ili bazičnih komponenti iz tla. Urea herbicidi apsorbirani u biljkama metabolički se razgrađuju.⁵ Na proces razgradnje utječu skupine na položaju *N* i *N'*. Ako su arilni supstituent i metilna skupina u *N* položaju veoma blizu, to je nepovoljno pa se spoj dalje razgrađuje, a gubitak tih skupina poželjan je put razgradnje. Zbog toga se *N'*-aril-*N,N*-dimetil-derivati razgrađuju brže od *N'*-aril-*N*-metil-*N*-metoksi-derivata.⁵

1951. sintetiziran je prvi *N'*-aril-*N,N*-dimetil-derivat fenil-urea herbicida, odnosno monuron. Nakon njega sintetiziran je diuron. Ova dva herbicida strukturno su veoma slična. Glavna razlika među njima je ta što diuron ima jedan klorov atom više. Veoma su stabilni te se jako adsorbiraju za tlo, a od cijele skupine upravo se diuron najviše zadržava u tlu. Ako se upotrebljava u većim koncentracijama, u tlu se može zadržati i do dvije godine.⁵

2.3. KLORACETANILIDNI HERBICIDI

Uz triazinske i fenil-urea herbicide, jedni od najzastupljenijih herbicida su karboksiamidni herbicidi koji se dijele na anilide i kloracetanilide. Opća strukturna formula kloracetanilidnih herbicida nalazi se na Slici 4. U kloracetanilide spadaju acetoklor, alaklor i metolaklor, čije se strukture nalaze u Tablici 5. Po kemijskom sastavu kloracetanilidi su derivati klora, octene kiseline i anilina. Koriste se za suzbijanje korova u nasadima kukuruza, soje, suncokreta i pamuka.⁵



Slika 4. Strukturna formula kloracetanilidnih herbicida

Tablica 5. Struktura nekih kloracetanilida i imena spojeva prema IUPAC-u

SPOJ	R ¹	R ²	IME PREMA IUPAC-u
Acetoklor			2-klor- <i>N</i> -(2-etil-6-metilfenil)- <i>N</i> -etoksimetil-acetamid
Alaklor			2-klor- <i>N</i> -(2,6-dietilfenil)- <i>N</i> -metoksimetil-acetamid
Metolaklor			2-klor- <i>N</i> -(2-etil-6-metilfenil)- <i>N</i> -(1-metoksipropan-2-il)-acetamid

Alaklor je pri sobnoj temperaturi bezbojna krutina, dok su acetoklor i metolaklor tekućine. Njihova topljivost u vodi veća je od 30 mg L^{-1} , a koeficijent razdjeljenja u sustavu organski ugljik-voda (K_{oc}) manji od 300 pa se zbog toga slabije zadržavaju u tlu i lako ispiru u vode. Premda se u tlu ne zadržavaju dugo, veoma su štetni i imaju toksična i genotoksična svojstva. Letalna doza za štakore je od 1200 mg kg^{-1} (alaklor) do 1929 mg kg^{-1} (acetoklor).¹⁴ Fizikalno-kemijska svojstva nalaze se u Tablici 6.

Tablica 6. Fizikalno-kemijska svojstva nekih kloracetanilidnih herbicida

SPOJ	$S(\text{H}_2\text{O})^a / \text{mg L}^{-1}$	p^b / Pa	$t_t^c / ^\circ\text{C}$	$\log K_{ow}^d$	$\log K_{oc}^e$	$t_{1/2}^f / \text{d}$	$\text{LD}_{50}^g / \text{mg kg}^{-1}$
Acetoklor	233	$2,2 \times 10^{-2}$	10,6	4,14	2,1	9	1929
Alaklor	240	$2,9 \times 10^{-3}$	40-41	3,09	2,3	90	1200
Metolaklor	530	$1,7 \times 10^{-3}$	-62,1	3,40	>4,5	5 do 25	1080

^a topljivost u vodi pri $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ⁹

^b tlak para pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ⁹

^c temperatura taljenja⁹

^d koeficijent razdjeljenja u sustavu *n*-oktanol/voda⁹

^e koeficijent razdjeljenja u sustavu organski ugljik/voda⁹

^f vrijeme poluživota u tlu⁹

^g srednja letalna doza za štakore⁹

Kloracetanilidi djeluju tako da inhibiraju fotosintezu. Mehanizam djelovanja im je sličan kao kod prethodne dvije skupine herbicida. Nakon što se tlo tretira herbicidom, on se apsorbira u biljku preko korijena, odakle dolazi do listova gdje započinje njegovo djelovanje. Za učinkovito suzbijanje potrebno je da biljka bude u ranom stadiju razvoja.¹⁴

Kloracetanilidni herbicidi relativno su otporni na fotokemijsku razgradnju. U usporedbi s roditeljskom molekulom herbicida, produkti fotokemijske razgradnje su manje tvrdokorni za naknadnu biorazgradnju. Organska tvar u površinskoj vodi inhibira fotokemijsku razgradnju, zbog vezanja molekule acetanilida na otopljenu organsku tvar, što je čini nedostupnom za fotokemijsku razgradnju. U mnogim organizmima, glavni faktor u transformaciji acetanilidnih herbicida je detoksikacija koja uključuje konjugaciju, posredovanu glutathion-S-transferazom (GST), između tripeptidnog glutathiona i kloroacetamidnog dijela acetanilidnih herbicida. Opći mehanizam ove reakcije je nukleofilni napad glutathiona na 2-klor-elektrofilnu skupinu acetanilidnog herbicida. Na taj način GST ublažava toksičnost herbicida, npr. alaklora u

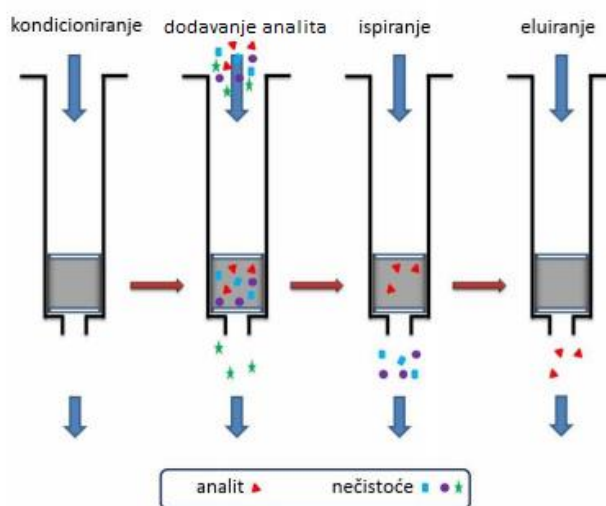
sojevima kukuruza, pri čemu najotporniji sojevi kukuruza imaju najvišu GST specifičnost za alaklor. GST aktivnost u biljkama varira po specifičnosti prema acetanilidu. Konjugati glutation-acetanilidi se zatim razgrađuju karboksipeptidazama, gama-glutamil transpeptidazama i cistein beta-liazama. Konjugacija posredovana GST-om predstavlja glavni mehanizam razgradnje kloracetanilida jer se događa u biljkama, gljivama i životinjama, kao i u čovjeku.¹⁴

Prvi proizvedeni herbicid ove skupine je alaklor, sintetiziran 1969. Razna istraživanja pokazala su da neki kloracetanilidni herbicidi imaju citotoksični i genotoksični učinak pa je 2012. Europska unija zabranila upotrebu acetoklora, kao i triazinskog herbicida atrazina, te su ovi herbicidi zamijenjeni terbutilazinom ili smjesom terbutilazina i metolaklora.²

2.4. EKSTRAKCIJA NA ČVRSTOJ FAZI

Ekstrakcija na čvrstoj fazi analitički je postupak koji se temelji na obogaćivanju analita koji su otopljeni ili suspendirani u nekoj tekućini. Svrha ove metode je povećanje koncentracije ciljanih spojeva, tako da se koriste kolonice (ponekad i diskovi) punjene odgovarajućim sorbentsom koji omogućava selektivno zadržavanje analita. Osim obogaćivanja, na ovaj način se uzorci i pročišćavaju, budući da se uklanja i dio tvari koje predstavljaju potencijalnu smetnju za analizu ciljanih spojeva. Prije primjene, potrebno je odabrati prikladan sorbens, kao i otapalo za desorpciju ciljanih spojeva, ali i eventualno dodatno pročišćavanje.¹⁵

Postupak se sastoji od nekoliko koraka (Slika 5). Najprije se kondicionira sorbens propuštanjem organskog otapala kroz kolonu, čime se postiže bolja povezanost sorbensa i uzorka. Sljedeći korak je propuštanje uzorka kroz kolonu uz konstantan protok, najčešće uz upotrebu vakuuma, pri čemu dolazi do vezanja analita na površinu sorbensa. Nakon toga sorbens se ispire odgovarajućim otapalom kako bi se uklonile interferencije, a analit od interesa ostaje vezan za čvrstu fazu. Završni korak u ovom postupku je eluiranje analita odgovarajućim otapalom. Ekstrakt se zatim obično ukoncentrira na manji volumen kako bi se postigla veća osjetljivost. Nakon toga ekstrakt je spreman za analizu prethodno razvijenom instrumentnom metodom.¹⁶



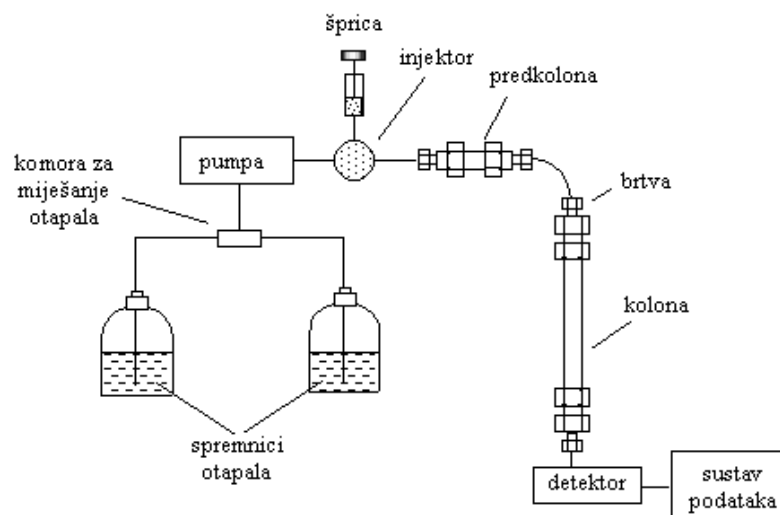
Slika 5. Postupak ekstrakcije na čvrstoj fazi¹⁶

2.5. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA

Kromatografija je jedna od najprimjenjivijih analitičkih tehnika, čiji je razvoj započeo šezdesetih godina prošlog stoljeća. To je analitička metoda razdvajanja sastojaka iz složenih smjesa koja se temelji na raspodjeli između nepokretne (stacionarne) i pokretne (mobilne) faze, a služi za kvalitativno i kvantitativno određivanje sadržaja smjese. Kromatografske metode imaju veoma široku primjenu jer omogućuju analizu velikog broja tvari, od jednostavnih atoma i iona do složenih spojeva kao što su proteini.¹⁷

U tekućinskoj kromatografiji pokretna faza je tekućina koja se ne smije se miješati s nepokretnom fazom te su u njoj analizirani uzorak mora dobro otapati. Nepokretna faza je smještena ili u koloni (kolonska kromatografija) ili se nanosi na čvrstu podlogu, najčešće načinjenu od stakla ili aluminijske plošne kromatografija). Na taj način odvajaju se komponente prema afinitetu vezanja za nepokretnu fazu, i to ovisno o tome koristi li se kromatografija normalnih faza, gdje je nepokretna faza polarna, a pokretna nepolarna, ili kromatografija obrnutih faza, gdje je pokretna faza polarna, a nepokretna nepolarna. Kod kromatografije normalnih faza, nepolarne komponente će se prve ispirati s kolone jer će se polarne komponente jače vezati za kolonu. Kod kromatografije obrnutih faza bit će obratno, prvo će s kolone izlaziti polarnije komponente, a zatim one manje polarne.

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) je tehnika kod koje se koriste čestice punila manjih dimenzija (najčešće <10 μm). Korištenjem takvih kolona, koje omogućuju primjenu visokog tlaka, poboljšala se djelotvornost razdvajanja sastojaka te brzina pokretne faze, a time se skratilo i vrijeme analize. Ova metoda prikladna je za odjeljivanje spojeva male i velike molekulske mase, teško hlapljivih te termički nestabilnih spojeva.¹⁸

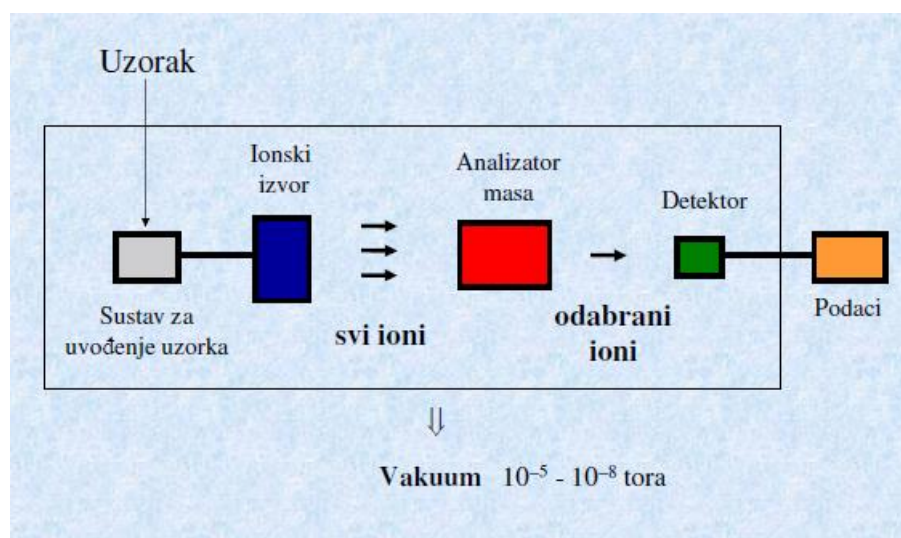


Slika 6. Shematski prikaz tekućinskog kromatografa¹⁹

Tekućinski kromatograf, čiji se shematski prikaz nalazi na Slici 6, sastoji se od sustava za dovod pokretne faze, sustava za injektiranje, kolone i detektora. Sustav za dovod pokretne faze sastoji se od spremnika otapala i pumpe koja omogućuje potiskivanje pokretne faze u kromatografsku kolonu uz kontrolirani protok. U kromatografskoj analizi važan je pravilan odabir pokretne faze, što, između ostalog, znači da tekućine moraju biti visoke čistoće. Pumpa kontrolira protok pokretne faze u kromatografsku kolonu uz uobičajeni tlak do 400 bar, a protok može biti u rasponu od 0,1 do 10 mL min⁻¹.¹⁷ Nakon pumpe nalazi se sustav za injektiranje koji služi za unošenje uzorka. Uzorak se unosi špricom ili injektorom s petljom kojim se uzorak dovodi u kolonu bez prekida protoka pokretne faze. Uzorak, zatim, dolazi do kolone u kojoj se najčešće nalazi punilo bazirano na silikagelu. Osim glavne kolone, sustav obično sadrži i predkolonu, čija je uloga zaštita glavne kolone i postizanje boljeg razdvajanja sastojaka. Nakon eluiranja, uzorak se prikuplja i analizira odgovarajućim detektorom. Oni služe za detektiranje sastojaka na temelju njihovih svojstava kao što su indeks loma, vodljivost, fluorescencija, elektrokemijska reakcija, apsorpcija UV svjetla itd., pa se prema tome odabire detektor koji je prikladan za određenu analizu.

2.6. SPEKTROMETRIJA MASA

Spektrometrija masa jedna je od najvažnijih analitičkih tehnika, a temelji se na razdvajanju iona prema omjeru masa i naboja (m/z). U spektrometriji masa molekule se prevode u molekulske ione koji se mogu dalje fragmentirati na druge ione-fragmente. Spektar masa je grafički prikaz ovisnosti relativnog intenziteta iona o njihovom omjeru m/z .



Slika 7. Shematski prikaz spektrometra masa¹⁷

Uređaj, spektrometar masa (Slika 7), sastoji se od sustava za uvođenje uzorka, ionskog izvora u kojem nastaju ioni koji dolaze do analizatora masa, gdje se analizirani ioni razdvajaju na temelju omjera m/z te samo određeni ioni dolaze do detektora i sustava za obradu podataka. Cijeli uređaj nalazi se pod vakuumom pri tlaku od $1,3 \cdot 10^{-3}$ do $1,3 \cdot 10^{-6}$ Pa.¹⁷

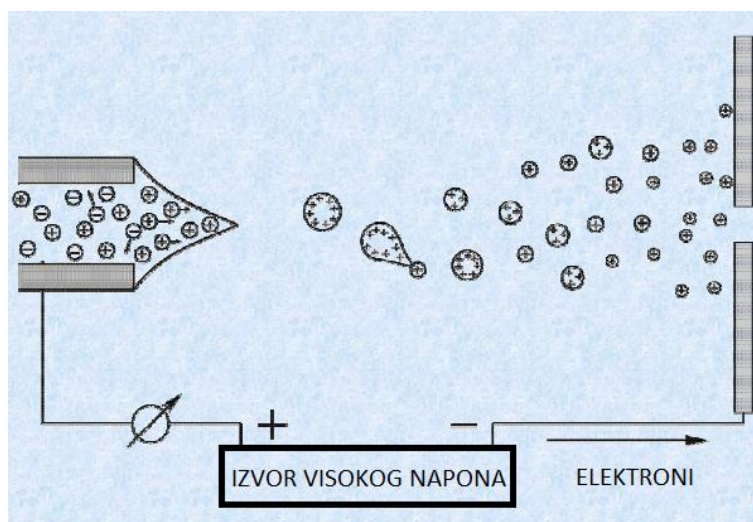
2.6.1. Elektoraspršenje (ESI)

Elektoraspršenje (ESI) je jedan od najčešće korištenih načina ionizacije u vezanim sustavima LC-MS. Mehanizam elektoraspršenja sastoji se od tri koraka: nastajanje nabijenih kapljica na vrhu kapilare, smanjenje nabijenih kapljica i nastajanje iona u plinskoj fazi. Prvi korak započinje tako da se otopina koja sadrži analit uvodi u metalnu kapilaru na koju se, pri atmosferskom tlaku, primjenjuje jako električno polje (2-3 kV), pod čijim utjecajem dolazi do odvajanja pozitivnog i negativnog naboja u otopini. Kada je kapilara spojena na pozitivan kraj izvora napona, pozitivno nabijeni ioni putuju prema katodi i akumuliraju se na površini

tekućine. Pri kritičnoj jakosti polja nastaje tzv. Taylorov stožac u kojem se kontinuirano proizvode kapljice bogate pozitivno nabijenim ionima, koje pod utjecajem gradijenta potencijala i tlaka putuju prema analizatoru spektrometra masa. Mijenjanjem polariteta moguće je proizvesti negativno nabijene kapljice.

Drugi korak je smanjenje nabijenih kapljica, u kojem otapalo grijanjem (i/ili kolizijom s inernim plinom) isparava te se smanjuje veličina kapljica, ali naboj ostaje konstantan. Kada se sila elektrostatskog odbijanja izjednači s površinskom napetošću postiže se Rayleighova granica stabilnosti, odnosno dolazi do Coulombova dijeljenja i nastajanja manjih kapljica potomaka.

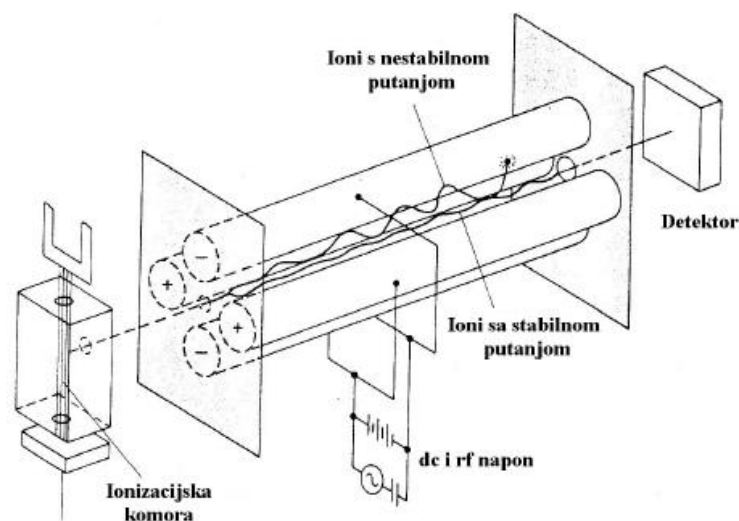
Treći korak je nastajanje iona u plinovitoj fazi koji se može podijeliti na nastanak velikih i malih iona. Nastajanje velikih iona može se objasniti „Modelom ostatka naboja“ (engl. *Residual excess charge model*) gdje se stvara iznimno mala kapljica, promjera približno 1 nm, koja sadrži samo jedan ion. Isparavanjem posljednje molekule otapala nastaje ion u plinovitoj fazi. Na taj način nastaju ioni mase veće od 3300 Da. Nastajanje malih iona može se objasniti „Modelom isparavanja iona“ (engl. *The ion evaporation model*), gdje iz kapljice promjera približno 8 nm dolazi do isparavanja iona prije nego kapljica dostigne Rayleighovu granicu i započne dijeljenje. Shematski prikaz elektroraspršenja nalazi se na Slici 8.¹⁷



Slika 8. Shematski prikaz elektroraspršenja¹⁷

2.6.2. Kvadrupolni spektrometar masa

Analizator masa sastavni je dio spektrometra masa, a njegova je uloga razdvajanje iona na temelju različitog omjera mase i naboja. Različiti analizatori zahtjevaju različite ionizacijske izvore i različite detektore iona. Jedan od najprimjenjivanijih analizatora je kvadrupol.



Slika 9. Shematski prikaz kvadrupolnog analizatora masa¹⁷

Kvadrupolni analizator masa (Slika 9) sastoji se od četiri cilindrične elektrode spojene u paru na koje se primjenjuje promjenljiv izmjeničan (RF) i istosmjernan (DC) potencijal s pomakom u fazi od 180°. Ioni nastali u ionizacijskom izvoru ubrzavaju se potencijalom od 5 V do 15 V i usmjeravaju u kvadrupol, a tijekom odjeljivanja iona simultano se povećava vrijednost primijenjenih potencijala tako da njihov omjer ostaje konstantan. Na taj način nastaje oscilirajuće električno polje koje propušta samo ione određenog omjera m/z , odnosno ione sa stabilnom putanjom.¹⁷ Kvadrupoli nisu najpogodniji za suvremena visokobrzinska razdvajanja, nisu dobri selektori jako velikih masa te imaju ograničenu brzinu pregleda. Kako bi se uklonili ti nedostaci, koristi se tandemni kvadrupol, odnosno spektrometar masa u kojem su povezana tri kvadrupola ($Q_1Q_2Q_3$). Kvadrupol Q_1 i Q_3 su klasični analizatori masa, a Q_2 je tzv. kolizijska ćelija. Trostrukim kvadrupolom moguće je snimati sve ione, ali i kombinaciju odabranih iona.²⁰

2.6.3. Vezani sustav tekućinska kromatografija - tandemna spektrometrija masa s kvadrupolnim analizatorom masa

Vezani sustav LC-MS/MS s trostrukim kvadrupolom omogućuje odjeljivanje komponenata smjese primjenom tekućinske kromatografije te njihovu detekciju na temelju omjera mase i naboja nabijenih čestica pomoću spektrometra masa. Spajanjem ta dva sustava u jedan omogućuje se analiza širokog spektra spojeva, što uključuje termički nestabilne analite i analite s visokom molekulskom masom koje je teško analizirati zasebnim metodama.²¹

Nakon što se analiti odvoje primjenom tekućinske kromatografije, potrebno je pokretnu fazu uvesti u spektrometar masa, i to pod visokim naponom, nakon čega analiti dolaze do ionizacijskog izvora. Nastali ioni zatim se uvode u analizator masa. Specifični ioni prekursori određenog m/z naboja usmjeravaju se kroz prvi kvadrupol, gdje se odvajaju ioni određenog omjera mase i naboja. U kolizijskoj ćeliji, odnosno drugom kvadrupolu, samo odabrani ioni se zatim fragmentiraju u ione produkte, sudaranjem s inernim plinom. Treći kvadrupol se koristi za određivanje ciljanih specifičnih iona produkata. Ovaj prijelaz iona iz prekursora u produkte vrlo je specifičan za određivanje strukture spoja od interesa i stoga osigurava visok stupanj selektivnosti.²²

2.7. VALIDACIJA ANALITIČKIH METODA

Prije primjene na realnim uzorcima, metodu je potrebno validirati. Validacija analitičkih metoda je skup postupaka kojima se potvrđuje da je neka analitička metoda, koja je razvijena za neku svrhu, prikladna za tu primjenu. Validacijom se dokazuje da bilo koji proces, oprema, materijal ili sustav djeluje očekivano pri određenim uvjetima i pri tome postiže zadovoljavajuću razinu određenih parametara. Validacija potvrđuje da se određenom analitičkom metodom mogu dobiti točni i pouzdani podaci te da je metoda ponovljiva i neovisna o analitičaru koji ju provodi i mjestu gdje se provodi. Također, validacijom je moguće odrediti uzroke mogućih problema tijekom izvođenja metode, čime se postiže visok stupanj pouzdanosti i primjenjivosti.²³

Proces validacije sastoji se od četiri faze. U prvoj fazi definira se cilj metode, analit koji će se određivati, očekivani raspon koncentracija, okolina, oprema na kojoj će se raditi i lokacija. U drugoj fazi definiraju se kriteriji validacije, odnosno kriteriji prihvatljivosti određivanih parametara i karakteristike njihovog djelovanja. Treća faza obuhvaća razvoj plana za kontrolu kvalitete za rutinske analize. Posljednja, četvrta, faza obuhvaća izradu validacijskog izvješća i dokumentacije.²⁴

Postoje osnovni parametri koji se određuju tijekom validacije analitičke metode, a to su specifičnost, selektivnost, istinitost, preciznost, granica detekcije, granica kvantitativnog određivanja, linearnost radnog područja te robusnost, odnosno postojanost metode. Preciznost se može određivati kao preciznost mjerenja, preciznost pripreme, međupreciznost i međulaboratorijska ponovljivost.²⁵

2.7.1. *Specifičnost i selektivnost*

Specifičnost metode pokazuje je li metoda sposobna za određivanje samo jednog određenog analita, a selektivnost metode je mogućnost određivanja analita u prisutnosti drugih sastojaka u uzorku. Dakle, selektivnost predstavlja mogućnost određivanja više komponenta istodobno, ali pod uvjetom da te komponente ne smetaju jedna drugoj prilikom određivanja. Na taj način selektivnost pokazuje je li metoda sposobna odvojiti analit od interesa od poznatih onečišćenja. I specifičnost i selektivnost metode ovise o matrici uzorka i interferencijama unutar određene metode. Cilj određivanja selektivnosti metode je osigurati da komponente matrice ne utječu

znatno na krajnji rezultat analize. Što je manji utjecaj matrice na uzorak, to će selektivnost metode biti bolja.²⁴

U praksi se specifičnost i selektivnost dokazuju usporedbom odziva metode na referentni materijal i analit u uzorku. Za specifičnost metode mjeri se odziv samo jednog analita, dok se kod selektivnosti može mjeriti odziv više analita istodobno. Kod kromatografskih metoda potrebno je da ne dolazi do preklapanja pikova pojedinih analita.²⁶

2.7.2. *Linearnost*

Linearnost je obilježje metode koje daje potvrdu da su izmjereni rezultati, unutar radnog područja, izravno (ili putem dobro definiranih matematičkih transformacija) proporcionalni koncentraciji analita u uzorku. Područje linearnosti je raspon između gornje i donje koncentracijske granice analita u uzorku koje se mogu kvantitativno odrediti uz zadovoljavajuću točnost. Utvrđuje se izradom kalibracijskog pravca pomoću kojeg se može procijeniti može li metoda dati točne rezultate u točno određenom graničnom području. Otopine za određivanje linearnosti pripremaju se razrjeđivanjem iz jedne koncentrirane otopine te linearnost treba biti provjerena na najmanje pet točaka u prikladnom radnom području, u kojem pogreška mjernog instrumenta leži unutar određenih granica, a taj je interval omeđen donjom i gornjom granicom, obično od 80 % do 120 % koncentracije analita. Sužavanjem radnog područja na koncentracijski raspon uzoraka postižu se bolja istinitost i preciznost metode.²⁴

U praksi se linearnost određuje mjerenjem odziva detektora za poznate koncentracije referentnog materijala. Može se procijeniti grafički ili matematički. Ako se određuje grafički, linearnost treba biti provjerena na najmanje pet točaka u prikladnom radnom području. Matematički se računa preko jednadžbe pravca ($y=ax+b$) te se izračuna koeficijent korelacije (r), za koji je postavljen kriterij $r \geq 0,99$.²⁶

2.7.3. *Preciznost*

Preciznost analitičke metode pokazuje slaganje između niza ponovljenih mjerenja iz istog uzorka, kroz minimalno šest serija mjerenja napravljenih analizom istog homogenog uzorka. Izražava se kao standardno odstupanje (SD), relativno standardno odstupanje (RSD) ili kao interval pouzdanosti oko srednje vrijednosti.²⁶

Preciznost se može iskazati kao: ponovljivost, međupreciznost (unutar jednog laboratorija) i reproducibilnost (između 2 laboratorija).

a) Ponovljivost je podudaranje rezultata dobivenih uzastopnim mjerenjem istog uzorka istom metodom pod istim uvjetima (isti analitičar, instrument i laboratorij) u kratkom vremenskom periodu. Određuje se iz šest uzastopnih mjerenja koncentracije analita uz referentne standardne otopine. Odabere se jedna koncentracija koja odgovara sredini radnog raspona i izračuna se relativno standardno odstupanje.

b) Međupreciznost je odstupanje rezultata dobivenih mjerenjem istog uzorka istom metodom, ali pod različitim uvjetima u istom laboratoriju (različiti analitičar, instrument, kolona) kroz duže vremensko razdoblje. Pripremi se šest otopina istog uzorka na definirani način i otopine uzorka analizira drugi analitičar, na drugome uređaju, drugi dan. Ovim parametrom utvrđuje se hoće li metoda nakon razvoja davati iste rezultate tijekom upotrebe uz promjene navedenih uvjeta.

c) Reproducibilnost (preciznost priprave uzoraka) je parametar koji opisuje preciznost dobivenu u istom laboratoriju pod propisanim, unaprijed određenim uvjetima (npr. uzorak koji se analizira, metoda koja se koristi, analitičari, okoliš). Određuje se pripremom i analizom šest otopina istog uzorka te izračunavanjem relativnog standardnog odstupanja.²⁴

Tijekom validacije metode nije potrebno potvrđivati reproducibilnost. Validacija reproducibilnosti važna je ako se određena metoda koristi u različitim laboratorijima, zato što razni čimbenici mogu utjecati na reproducibilnost, npr. razlika u sobnoj temperaturi, vlaga u zraku ili različita oprema koja ima različite karakteristike.²³

Da bi metoda bila prihvatljiva s obzirom na parametar preciznosti, bitno je da relativno standardno odstupanje bude $\leq 20\%$.

2.7.4. Istinitost

Istinitost metode je podudaranje između stvarne, prihvaćene referentne vrijednosti i srednje vrijednosti dobivene na osnovi određenog broja mjerenja validiranom metodom. Provodi se najmanje tri puta za najmanje tri koncentracijske razine unutar radnog područja metode.²⁶

Istinitost je mjera pouzdanosti analitičke metode. Može se odrediti na nekoliko načina, od kojih je najznačajniji usporedba rezultata metode s rezultatima druge metode koja je potvrđena kao istinita. Može se odrediti i analizom uzorka poznate koncentracije i usporedbom dobivene mjerene vrijednosti s pravom, već poznatom vrijednosti.²³

Istinitost se određuje kao analitički povrat, koji se određuje nakon ekstrakcije analita iz matrice uzorka i injektiranja u analitički instrument, usporedbom odgovora analiziranog uzorka s odgovorom standardnog referentnog materijala otopljenog u čistom otapalu. Izražava se u postotcima kao analitički povrat ili kao razlika između srednje i prihvaćene prave vrijednosti, zajedno s intervalima pouzdanosti.²⁴

2.7.5. Granica detekcije i granica kvantitativnog određivanja

Granice detekcije predstavljaju najmanju količinu analita u uzorku koja se može detektirati, ali ne nužno i kvantitativno odrediti, dok je granica kvantitativnog određivanja najmanja količina analita u uzorku koja se može kvantitativno odrediti uz odgovarajuću točnost.²⁶

Granica detekcije određuje se na temelju omjera signala kromatografskog pika i šuma bazne linije (engl. *signal-to-noise*; S/N), čija je prihvaćena vrijednost 3:1. Za određivanje granice kvantitativnog određivanja koristi se omjer signala kromatografskog pika i šuma (S/N) 10:1. Određuju se na više načina, npr. analiziranjem uzoraka analita poznatih koncentracija, te određivanjem najmanjeg nivoa s održivom i prihvatljivom točnošću i preciznošću. U većini slučajeva granica kvantitativnog određivanja je dvostruko, odnosno trostruko veća od granice detekcije.²⁴

2.7.6. Robusnost

Robusnost metode određuje se kao mjera otpornosti analitičkog postupka na male, namjerne promjene radnih uvjeta metode. Na taj se način utvrđuje utječu li male promjene radnih uvjeta i provedbe same metode na rezultat analize. Kod kromatografskih metoda najčešće se istražuju utjecaji promjene sastava i vrijednosti pH pokretne faze, temperature kolone i protoka pokretne faze. Parametre koji bi mogli utjecati na rezultate metode potrebno je držati pod nadzorom i označiti ih kod opisa metode.²⁶

Nekad se robusnost određivala tako da se istraživao utjecaj izmjene jednog po jednog parametra na analit. Međutim, ovakav način rijetko opisuje promjene koje se mogu uvesti u svakodnevnoj primjeni metode. Iz tog razloga, da bismo dobili podatke o svojstvima metode prilikom izmjene više parametara istovremeno, koriste se razni računalni programi.²⁴

2.8. ANALIZA TRIAZINSKIH, FENIL-UREA I Kloracetanilidnih herbicida u prirodnim vodama

Triazinski spojevi, fenil-urea herbicidi i kloracetanilidi koriste se za zaštitu biljaka od korova ili za uništavanje korova u gradskim sredinama tako da se primjenjuju izravno na tlo. Ispiranjem iz tla, ovi spojevi dospijevaju u površinske i podzemne vode, a time i u vodu za piće. Mogu dospjeti u vode i zbog nedovoljno pročišćenih industrijskih otpadnih voda. Tako djeluju kao zagađivala okoliša pa su razvijene brojne metode za određivanje njihovih tragova u prirodnim vodama. Analitički postupci za određivanje herbicida u vodama najčešće se temelje na ekstrakciji iz vodenog medija te na kromatografskoj analizi ekstrakta.⁶ Ekstrakcija je potrebna zbog razmjerno niskih koncentracija herbicida u većini prirodnih voda. Obogaćivanje se najčešće provodi ekstrakcijom na čvrstoj fazi (SPE)²⁷ koja je u novije vrijeme gotovo u potpunosti zamijenila klasičnu ekstrakciju otapalom.

Najprikladnija metoda za razdvajanje srodnih herbicida u složenim smjesama je kromatografija. Plinska kromatografija (GC) i tekućinska kromatografija visoke/ultravisoke djelotvornosti (HPLC/UPLC) predstavljaju najbolje metode za analizu herbicida u uzorcima voda. Te metode su brze, osjetljive i veoma precizne te su potpuno zamijenile UV-VIS spektrofotometriju i tankoslojnu kromatografiju (TLC), koje su se intenzivno koristile ranih 70-ih godina prošlog stoljeća.⁸ Nekad je najznačajnija bila plinska kromatografija^{8,28,29,30} uz detekciju spojeva detektorom zahvata elektrona,³¹ masenim spektrometrom^{8,28,29,30} te detektorom dušika i fosfora.³¹ Plinska kromatografija je često bila prvi izbor za analizu triazina, zbog njihovog dobrog odziva s detektorom dušika i fosfora, koji nudi osjetljivost i selektivnost za organske spojeve koji sadrže dušikove ili fosforove atome u svojoj strukturi.⁸ Međutim, u novije vrijeme ipak se najčešće upotrebljava masenospektrometrijska detekcija koja osigurava dodatnu selektivnost, osjetljivost i pouzdanost u analitici tragova organskih zagađivala u okolišu. Tako su, primjerice, Cruzeiro i suradnici³² određivali 56 pesticida, među kojima i znatan broj herbicida, u riječnoj vodi, primjenom vezanog sustava GC-MS i GC-MS/MS, pri čemu su, osim otopljene frakcije, analizirali i partikulatnu frakciju, uz visoke analitičke povrate, dobru točnost i granice kvantitativnog određivanja u niskom ng L⁻¹ području. Auersperger i suradnici³³ određivali su herbicide, pretežno triazinske, kao i njihove razgradne produkte, u vodi za piće vezanim sustavom GC-MS, uz prethodno obogaćivanje uzoraka na čvrstoj fazi, pri čemu je granica detekcije za većinu spojeva bila 2 ng L⁻¹, dok su Bruzzoniti i suradnici³⁴

primjenom slične metode postigli granice detekcije od 10 ng L^{-1} za herbicide iz nekoliko skupina. Pritom su posebnu pažnju posvetili pripravi uzoraka, i to tako što su testirali više tipova sorbensa za ekstrakciju na čvrstoj fazi, optimalne uvjete desorpcije analita (vrsta i volumen otapala), kao i brzinu propuštanja uzoraka kroz kolone, te su postigli zadovoljavajuće analitičke povrate za većinu ciljanih spojeva.

Za određivanje polarnijih i termički nestabilnih herbicida prikladnija je tekućinska kromatografija,^{8,29,31} koja ne zahtijeva prethodnu derivatizaciju teže hlapljivih spojeva. Iako se nekad uz HPLC često upotrebljavao UV-detektor^{29,31}, danas, kao i kod GC metoda, prevladava detekcija spektrometrom masa^{6,8,35,36}, pri čemu se uglavnom koristi ionizacija elektroraspršenjem^{37,36} kao veoma pouzdana i robusna tehnika ionizacije polarnih spojeva. Upotreba tandemске spektrometrije masa (MS/MS) poboljšava selektivnost metode uz drastično smanjenje šuma i bez gubitka sposobnosti identifikacije.

Asperger i suradnici³⁵ određivali su herbicide u površinskoj vodi i vodi za piće primjenom tekućinske kromatografije spregnute s tandemnom spektrometrijom masa (LC-MS/MS) uz brzu *on-line* ekstrakciju na čvrstoj fazi, uz upotrebu kromatografskih kolona s turbulentnim protokom (engl. *Turbulent-flow chromatography columns* - TFC). *On-line* SPE ima velike prednosti, kao što su minimalna količina otapala potrebna za ekstrakciju, brza priprava i mali volumen uzoraka. Testirano je pet tipova SPE kolona, od kojih su se dva polimerna tipa (Oasis HLB i Cyclone) te porozne grafitne kolone Hypercarb pokazale prikladne za učinkovitu ekstrakciju ciljanih spojeva, uz visoke analitičke povrate ($> 80 \%$) i niske granice detekcije ($\leq 2 \text{ ng L}^{-1}$) za većinu svih istraživanih herbicida.

Loos i suradnici¹ određivali su širok spektar organskih zagađivala u površinskim vodama i vodama za piće, među kojima su bili i triazinski i fenil-urea herbicidi. Priprava uzoraka vode provedena je ekstrakcijom na čvrstoj fazi, a analiza vezanim sustavom LC-MS/MS. Ekstrakcijom 1 l uzoraka vode i ukoncentriravanjem ekstrakta do $100 \mu\text{L}$, dobiveni su analitički povrati od približno 70% , uz granice detekcije od samo $0,05\text{-}0,5 \text{ ng L}^{-1}$.

Mazzela i suradnici³⁸ razvili su multirezidualnu metodu za određivanje 30 triazinskih, fenil-urea i kloracetanilidnih herbicida u površinskim vodama, također uz primjenu ekstrakcije na čvrstoj fazi i vezanog sustava LC-MS/MS, uz visoke analitičke povrate ($\geq 73 \%$), te granice kvantitativnog određivanja između 1 i 59 ng L^{-1} . Autori su posebnu pažnju posvetili istraživanju utjecaja matrice za koji se pokazalo da je najviše izražen u matricama s visokom vodljivošću (npr. more) te visokim sadržajem otopljene organske tvari (npr. bare). Autori su

naglasili važnost primjene odgovarajućih unutarnjih standarda koji u velikoj mjeri kompenziraju supresiju signala u matrici te tako bitno povećavaju pouzdanost rezultata.

U novije vrijeme sve više se koristi mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *Solid-Phase Microextraction*, SPME), kao vrlo djelotvorna tehnika za ekstrakciju spojeva iz vode bez primjene otapala. S druge strane, razvojem kromatografskih metoda, nastala je tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti (engl. *Ultra Performance Liquid Chromatography* - UPLC) koja kao stacionarnu fazu koristi čestice punila od 2 μm , čime se znatno smanjuje vrijeme analize. UPLC-MS/MS metoda može ponuditi veoma dobru osjetljivost, ali i visoku pouzdanost metode.³⁹ Chen i suradnici⁴⁰ koristili su SPME metodu za obogaćivanje 30 triazinskih herbicida iz vode za piće te njihovo određivanje vezanim sustavom tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti i spektrometra masa visoke rezolucije. Ekstrakcija se provodila tako da su uzorci vode zakiseljeni mravljom kiselinom, a ciljani spojevi su adsorbirani pomoću PCX (engl. *Polimer Cation Exchange*) kolone kod koje dolazi do izmjene kationa na polimeru. Metoda je postigla granice detekcije od 0,2 do 30,0 ng l^{-1} , s analitičkim povratom u rasponu od 70,5 do 112,1 %.

Unatoč činjenici da danas prevladavaju tekućinsko-kromatografske metode temeljene na maseno-spektrometrijskoj detekciji, herbicidi se mogu određivati i primjenom HPLC-UV metoda, koje su jednostavnije, ekonomičnije i dostupnije u odnosu na LC-MS metode. Tako su, primjerice, Beceiro-Gonzalez i suradnici⁴¹ razvili metodu za određivanje 9 triazinskih herbicida u pitkoj vodi, uz visoke analitičke povrate ($\geq 86\%$) i granice određivanja u niskom ng L^{-1} području.

Osim tekućinske kromatografije, koristi se i micelarna elektrokinetička kapilarna kromatografija (engl. *Micellar electrokinetic capillary chromatography*)^{42,43}. Turiel i suradnici⁴³ su primjenom te metode odredili herbicide za manje od šest minuta, nakon što su spojevi ekstrahirani na čvrstoj fazi.

Herbicide je moguće odrediti i drugim metodama koje nisu kromatografske. Tako su Song i suradnici⁴⁴ određivali herbicide u vodi za piće pomoću površinske Ramanove spektroskopije (engl. *Surface-enhanced Raman spectroscopy*, SERS) sa zlatnim nanočesticama. Starva i suradnici⁴⁵ određivali su herbicide uz pomoć biosenzora. Senzor se može regenerirati i ponovo upotrijebiti najmanje 20 puta bez značajnog utjecaja na analizu. Zbog svojih analitičkih svojstava i kratkog vremena analize omogućuju brzo određivanje analita na licu mjesta.

2.9. RASPROSTRANJENOST TRIAZINSKIH, FENIL-UREA I Kloracetanilidnih herbicida u prirodnim vodama

Herbicidi se masovno upotrebljavaju od početka šezdesetih godina dvadesetog stoljeća, što je dovelo do njihove sve veće rasprostranjenosti u vodama diljem svijeta, te se tako ubrajaju među najvažnija zagađivala prirodnih voda. Tijekom godina opaženo je rašireno onečišćenje podzemnih i površinskih voda, te je upotreba određenih herbicida postupno bila ograničena tijekom posljednjih nekoliko desetljeća i naposljetku zabranjena diljem svijeta. Tako je u mnogim zemljama zabranjen triazinski herbicid atrazin, a zamjenjuje se terbutilazinom zbog sličnih svojstava te kloracetanilidni herbicid acetoklor, koji se zamjenjuje metolaklorom. Premda su ova dva herbicida zabranjena, i dalje se u mnogim zemljama mogu pronaći njihovi tragovi u prirodnim vodama.

U Tablici 7 prikazane su koncentracije nekih herbicida u riječnim vodama, u nekoliko zemalja svijeta, u periodu od 1998. do 2016. Visoke koncentracije triazinskih herbicida i njihovih razgradnih produkata određene su u španjolskim rijekama, pri čemu je prednjačio terbutilazin, čije su koncentracije u rijeci Alavesa dosegnule $12,6 \mu\text{g L}^{-1}$ te njegov razgradni produkt deilterbutilazin, s koncentracijama koje su premašile $5 \mu\text{g L}^{-1}$ u rijeci Baja. U istim su uzorcima određeni i linuron te kloracetanilidni herbicidi acetoklor i metolaklor, ali su njihove koncentracije bile znatno niže. U Sjevernoj Americi, odnosno u SAD-u i Kanadi, određene su visoke koncentracije atrazina do približno $4 \mu\text{g L}^{-1}$.^{47,48} Atrazin je detektiran i u drugim zemljama, ali su njegove koncentracije bile osjetno niže, s iznimkom Kine, gdje je maksimalna izmjerena koncentracija atrazina, ali i terbutrina, dosegnula $1,7 \mu\text{g L}^{-1}$. Ovi herbicidi određivani su 2014. i u hrvatskim rijekama Savi i Krapini.² Pritom su maksimalno izmjerene koncentracije u rijeci Krapini uglavnom bile više nego u Savi. Najviše koncentracije u obje rijeke izmjerene su za metolaklor (174 ng L^{-1} , odnosno 120 ng L^{-1}), dok su maksimalne koncentracije terbutilazina i acetoklora također premašile 100 ng L^{-1} . S druge strane, koncentracije atrazina bile su za red veličine niže, što je u skladu s činjenicom da se taj triazinski herbicid u Hrvatskoj ne upotrebljava od 2009. To je dovelo do značajnog smanjenja njegove koncentracije u odnosu na studiju koja je provedena između 1992. i 2001.⁵⁰

Tablica 7. Masene koncentracije nekih herbicida i njihovih razgradnih produkata u riječnoj vodi

Lokacija (period uzorkovanja)	Masena koncentracija / ng L ⁻¹							Referenca
	ATR	SIM	TBA	PRM	TBR	DE-ATR	DE-TBA	
Španjolska, rijeka Alavesa (03./2011.)	92-214	- ^a	2386- 12597	-	-	75-130	289-1385	[46]
Španjolska, rijeka Alta (03./2011.)	53-110	-	1235- 7171	-	-	65-156	49-203	[46]
Španjolska, rijeka Baja (03./2011.)	76-333	-	917-9900	-	-	53-132	220-5192	[46]
Kanada (2009.)	37-3910	22-896	-	n.d. ^b	n.d.	-	-	[47]
SAD (06./1998.)	170-4070	<50	-	<50	<50	90-540	-	[48]
Kina (05./2016.)	21-1726	-	-	-	6-1688	-	-	[49]
Hrvatska, rijeka Sava (2014.)	5-8	-	4-57	-	-	+ ^c	+	[2]
Hrvatska, rijeka Krapina (2014.)	7-18	-	4-140	-	-	+	+	[2]

Lokacija (period uzorkovanja)	Masena koncentracija / ng L ⁻¹			Referenca
	LIN	ACE	MET	
Španjolska, rijeka Alavesa (03./2011.)	80-118	154-292	32-39	[46]
Španjolska, rijeka Alta (03./2011.)	77-165	143-314	39-68	[46]
Španjolska, rijeka Baja (03./2011.)	145-301	149-224	65-163	[46]
Kanada (2009.)	3-1050	-	-	[47]
SAD (06./1998.)	-	50-640	60-1200	[48]
Kina (05./2016.)	-	-	9-317	[49]
Hrvatska, rijeka Sava (2014.)	+	6-12	4-120	[2]
Hrvatska, rijeka Krapina (2014.)	+	5-122	6-174	[2]

ATR=Atrazin, SIM=Simazin, TBA=Terbutilazin, PRM-Prometrin, TBR=Terbutrin, DE-ATR=Deetilatrazin, DE-TBA=Deetiltetrabutilazin, LIN=Linuron, ACE=Acetoklor, MET=Metolaklor

^a nije određivan

^b nije detektiran

^c određivan i detektiran, ali nisu navedeni podaci za pojedinu rijeku

U Tablici 8 prikazane su koncentracije nekih herbicida u vodama za piće, u nekoliko zemalja svijeta, koje su određene u posljednjem desetljeću. U mnogim zemljama, maksimalno dopuštena koncentracija pojedinačnih herbicida u vodi za piće je 100 ng L^{-1} .² U većini navedenih studija te su koncentracije niže od graničnih vrijednosti, ali deetilatrazin, razgradni produkt atrazina, u Luksemburgu⁵² te acetoklor u Hrvatskoj² u pojedinim su uzorcima premašili maksimalno dozvoljene koncentracije.

Tablica 8. Masene koncentracije nekih herbicida i njihovih razgradnih produkata u vodi za piće

Lokacija (period uzorkovanj a)	Masena koncentracija / ng l^{-1}										Referenca
	ATR	SIM	TBA	DE-ATR	DE-TBA	CTL	DIU	LIN	ACE	MET	
Italija (06./2010.)	<0,05- 15,14	<0,09 -1,59	<0,05- 49,91	<0,07- 13,09	<0,06- 18,99	- ^a	-	<0.11 -0,44	-	-	[51]
Luksembur g (proljeće, 2009.)	n.d.-57	0-5	n.d.-1	n.d. ^b -120	-	n.d-6	n.d.- 11	n.d.	-	n.d.	[52]
Kanada (2015.- 2018.)	n.d.-41	-	-	n.d.-63	-	-	-	-	-	-	[53]
Hrvatska (2014.)	n.d.-68	-	n.d.-20	n.d.-65	n.d.-14	n.d.- 19	n.d.- 13	n.d.	n.d.- 117	n.d.- 15	[2]

ATR=Atrazin, SIM=Simazin, TBA=Terbutilazin, DE-ATR=Deetilatrazin, DE-TBA=Deetiltrabutilazin, CTL=Klorturon, DIU=Diuron, LIN=Linuron, ACE=Acetoklor, MET=Metolaklor

^a nije određivan

^b nije detektiran

U Tablici 9 prikazane su koncentracije nekih herbicida u uzorcima mora prikupljenima u posljednjem desetljeću. Masene koncentracije većine spojeva uglavnom su bile u niskom području ng L^{-1} , ali su u nekim uzorcima koncentracije pojedinih herbicida dosezale nekoliko desetaka ng L^{-1} , poput diurona i irgarola u Japanu te irgarola i terbutilazina u Španjolskoj.

Tablica 9. Masene koncentracije nekih herbicida u morskoj vodi

Lokacija (period uzorkovanja)	Masena koncentracija / ng L ⁻¹										Referenca
	ATR	SIM	TBA	TBR	IRG	DE-ATR	DE-TBA	DIU	ACE	MET	
Portugal (proljeće, 2013.)	n.d. ^b	12,2	8,4	12,4	-	12,5	- ^a	-	12,3	n.d.	[32]
Portugal, (jesen, 2013.)	3,7	12,1	5,5	12,5	-	9,8	-	-	7,4	n.d.	[32]
Japan (2008.- 2009.)	-	-	-	-	11-55	-	-	10-62	-	-	[54]
Danska (2012.)	-	-	-	n.d.- 2,2	n.d.- 13	-	-	-	-	-	[55]
Španjolska (2015.)	n.d.- 3,8	n.d.- 24	n.d.- 59	n.d.- 0,91	n.d.- 85	-	-	n.d.- 20	-	-	[56]
Sjeverno more (2009.- 2010.)	0,51- 4,0	0,082 -4,6	0,014 -28,7	n.d.- 3,3	n.d.- 3,5	0,123-6,3	-	-	-	n.d.- 17,6	[57]

ATR=Atrazin, SIM=Simazin, TBA=Terbutilazin, TBR=Terbutrin, IRG=Irgarol, DE-ATR=Deetilatratin, DE-TBA=Deelitetrabutilazin, DIU=Diuron, ACE=Acetoklor, MET=Metolaklor

^a nije određivan

^b nije detektiran

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. *Kemikalije*

TRIAZINSKI HERBICIDI I RAZGRADNI PRODUKTI

- atrazin, simazin, propazin, terbutilazin, deetiltatrazin, deetilterbutilazin, deizopropilatrazin, sebutilazin iz smjese pesticida br. 41, $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, u acetonitrilu, proizvođač LGC Standards (Njemačka)
- prometrin iz otopine od $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, u acetonitrilu, proizvođač HPC Standards (Njemačka)
- terbutrin iz otopine od $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, u acetonitrilu, proizvođač LGC Standards
- irgarol (cibutrin) iz otopine od 1 mg mL^{-1} , u acetonitrilu, proizvođač LGC Standards
- unutarnji (interni) standardi: atrazin- d_5 , terbutrin- d_5 i simazin- d_{10} iz pojedinačnih otopina, $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, u acetonu, proizvođač HPC Standards

FENIL-UREA HERBICIDI

- klortoluron, izoproturon, diuron i linuron iz smjese pesticida br. 134, $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, u acetonitrilu, proizvođač LGC Standards
- unutarnji (interni) standardi: izoproturon- d_6 i diuron- d_6 iz pojedinačnih otopina, $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, u acetonu, proizvođač HPC Standards

KLORACETANILIDNI HERBICIDI

- acetoklor iz otopine $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, u acetonitrilu, proizvođač HPC Standards
- alaklor iz otopine $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, u metanolu, proizvođač HPC Standards
- metolaklor iz otopine $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, u metanolu, proizvođač HPC Standards
- unutarnji (interni) standard: alaklor- d_3 iz otopine $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, u acetonu, proizvođač HPC Standards

OSTALE KEMIKALIJE:

- Argon, 5.0
- Dušik, 5.0
- metanol, *Reag. Ph. Eur. Gradient Grade for HPLC*, proizvođač BDH Prolabo (Ujedinjeno Kraljevstvo)
- mravlja kiselina, ACS reagent, > 96%, proizvođač Sigma-Aldrich (Njemačka)
- ultračista (Mili-Q) voda, proizvođač Millipore (SAD)

3.1.2. Instrumenti i pribor

- Vakuumski uređaj za višestruku ekstrakciju tekućih uzoraka s cijevima za propuštanje velikih volumena i nastavkom za sušenje (Supelco, SAD)
- Uređaj za uparavanje u struji dušika (Turbovap LV, Zymark Corporation, SAD)
- Vezani sustav tekućinska kromatografija-tandemna spektrometrija masa (Thermo Electron Corporation, SAD) koji se sastoji od visokotlačne crpke (Surveyor MS Pump) opremljene uređajem za uklanjanje plinova, automatskim injektorom s grijačem kolone (Surveyor autosampler) te spektrometrom masa s tri kvadrupola (TSQ Quantum AM)
- Staklene bočice volumena 7 mL s navrtnim čepovima zaštićenim teflonskom brtvom
- Staklene bočice volumena 2 mL s pripadajućim čepovima za autosampler
- Automatske pipete s promjenjivim nastavcima
- Kolone za ekstrakciju na čvrstoj fazi napunjene s 200 mg polimernog materijala Oasis HLB (Waters, SAD)
- Sustav za filtraciju pod vakuumom
- Filtri sa staklenim vlaknima veličine pora 0,45 μm (GF/F; Whatman, SAD), promjera 47 mm
- Staklene menzure volumena 500 mL
- Staklene boce volumena 500 mL s navrtnim čepom
- Staklene epruvete za uparavanje
- Staklene pipete

3.1.3. Priprava otopina

Za pripravu otopina za kalibraciju upotrebljavane su smjese pesticida br. 41 i 134 opisane u poglavlju 3.1.1., te zajednička otopina preostalih herbicida (prometrin, terbutrin, irgarol, acetoklor, alaklor, metolaklor) koja je pripravljena iz njihovih izvornih otopina u istoj masenoj koncentraciji ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) te označena kao radna otopina 3. Iz tih su otopina pripravljene zajedničke radne otopine 1 i 2, koje su sadržavale svih 18 analita u pojedinačnoj koncentraciji od $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$, odnosno $1 \mu\text{g mL}^{-1}$. Iz izvornih otopina unutarnjih standarda pripravljena je otopina u kojoj su masene koncentracije pojedinačnih spojeva bile $2 \mu\text{g mL}^{-1}$, a koja je služila za dodatak unutarnjih standarda u otopine za kalibraciju te u modelne i realne uzorke. Sve navedene otopine pripravljene su u metanolu. S druge strane, otopine za kalibraciju pripravljene su u smjesi vode i metanola [ψ (H_2O , MeOH) = 1:1], prema Tablici 10. Njihov volumen bio je 1 ml.

Tablica 10. Priprava otopina za kalibraciju

Otopina za kalibraciju	Konc. / ng mL^{-1}	Dodatak radne otopine 1 ¹ / μL	Dodatak radne otopine 2 ² / μL	Dodatak otopina br. 41 ³ , 134 ³ i radne otopine 3 ³ / μL	Dodatak otapala ⁴ / μL	Dodatak otopine IS ⁵ / μL
1	0,2	2	-	-	988	10
2	0,5	5	-	-	985	10
3	1	10	-	-	980	10
4	2	20	-	-	970	10
5	5	-	5	-	985	10
6	10	-	10	-	980	10
7	20	-	20	-	970	10
8	50	-	-	5+5+5	975	10
9	100	-	-	10+10+10	960	10

¹ $\gamma = 0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$

² $\gamma = 1 \mu\text{g mL}^{-1}$

³ $\gamma = 10 \mu\text{g mL}^{-1}$

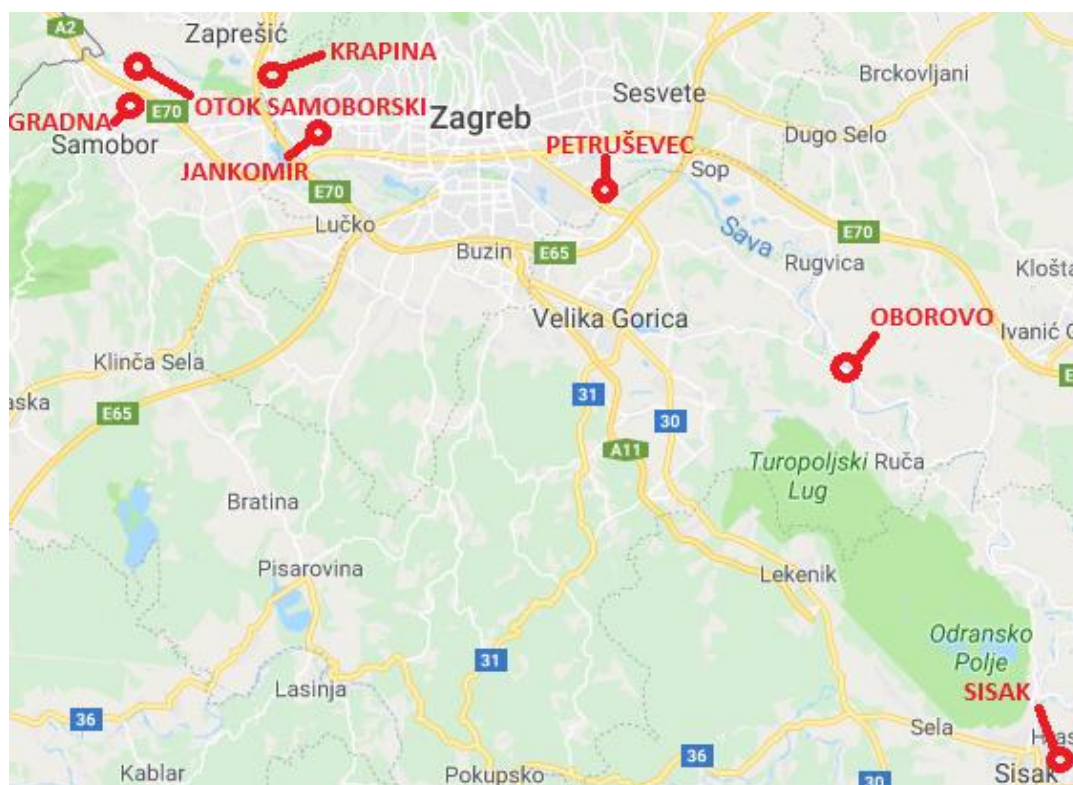
⁴ ψ (H_2O , MeOH) = 1:1

⁵ $\gamma = 2 \text{ ng mL}^{-1}$

3.1.4. Uzorkovanje

Prikupljeno je nekoliko tipova prirodnih voda - riječna voda, voda za piće te morska voda. Uzorci riječne i morske vode prikupljeni su u tamne staklene boce volumena 1 L, dok su uzorci vode za piće prikupljeni u plastične boce istog volumena.

Riječna voda prikupljena je u studenom 2018. i u lipnju 2019., na pet lokacija duž toka rijeke Save, a dodatno je prikupljen i po jedan uzorak njezinih pritoka Gradne i Krapine, neposredno prije utoka u Savu (Slika 10).



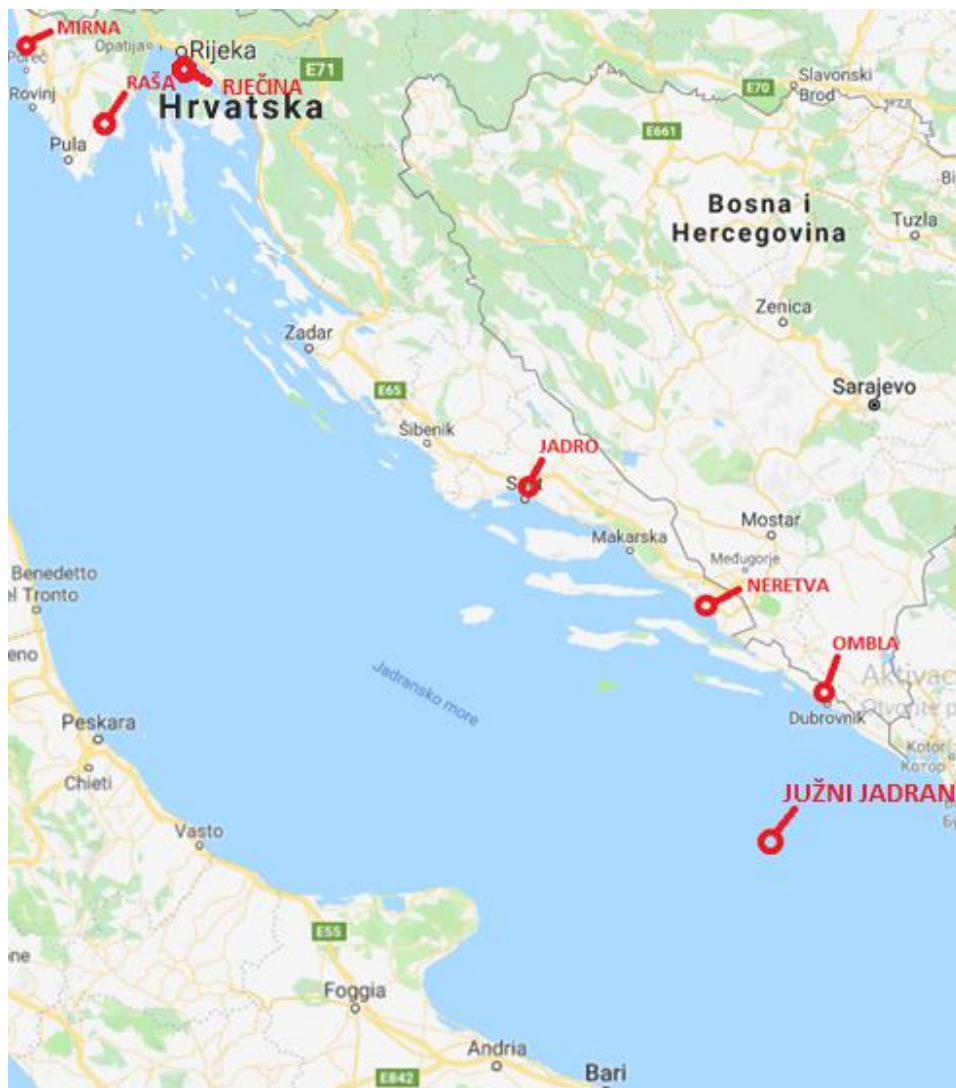
Slika 10. Lokacije uzorkovanja riječne vode

Voda za piće prikupljena je na više lokacija na području grada Zagreba te na nekoliko lokacija sa šireg zagrebačkog područja (Slika 11). Pritom su uzorci s područja grada Zagreba, uzorak iz Velike Gorice te jedan uzorak iz Brdovca prikupljeni iz javne vodoopskrbne mreže, dok su drugi uzorak iz Brdovca te uzorak iz Jertovca prikupljeni iz privatnih bunara.



Slika 11. Lokacije uzorkovanja vode za piće

Morska voda prikupljena je na nekoliko lokacija u Jadranskom moru u srpnju 2019. (Slika 12). Pritom su uzorci s većine lokacija prikupljeni u neposrednoj blizini ušća rijeka (Mirna, Raša, Jadro, Neretva i Ombla), tako da se u tim slučajevima može govoriti o bočatoj vodi. Uzorak označen kao „Rječina“ prikupljen je nedaleko od obale u Kvarnerskom zaljevu u blizini Rijeke, dok je uzorak označen kao „Južni Jadran“ prikupljen na otvorenom moru.



Slika 12. Lokacije uzorkovanja morske vode

3.2. METODE

3.2.1. Ekstrakcija na čvrstoj fazi

Prije ekstrakcije, uzorci (500 mL) su profiltrirani kroz filter sa staklenim vlaknima veličine pora 0,45 μm . U svaki uzorak dodano je 5 μL smjese unutarnjih standarda. Uzorci su ekstrahirani na Oasis HLB kolonama, primjenom vakuumskog uređaja za višestruku ekstrakciju uzoraka na čvrstoj fazi. Prije nanošenja uzoraka, kolone su kondicionirane s 5 mL metanola i 5 mL ultračiste vode. Uzorci su propuštani brzinom od približno 10 mL min^{-1} . Kolone su nakon toga isprane s 10 mL ultračiste vode te sušene približno 30 minuta u struji ekstračistog dušika. Ciljani spojevi desorbirani su s kolona propuštanjem 5 mL metanola brzinom od približno 1 mL min^{-1} . Ekstrakti su prikupljeni u bočice od 7 mL te pohranjivani na $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Na dan analize, ekstrakti su prebačeni epruvete za uparavanje te upareni do suha u blagoj struji dušika na temperaturi od $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Suhi ostaci otopljeni su u 500 μL smjese vode i metanola [ψ (H_2O , MeOH) = 1:1] te prebačeni u staklene bočice od 2 mL.

3.2.2. Instrumentna analiza (LC-MS/MS)

Ciljani spojevi analizirani su vezanim sustavom tekućinska kromatografija – tandemna spektrometrija masa (LC-MS/MS). Za kromatografsko razdvajanje upotrebljavala se kolona Gemini C_{18} (150 mm \times 3 mm, 5 μm ; Phenomenex, SAD), uz primjenu binarne gradijentne eluacije, pri čemu je eluens A bila smjesa vode i mravlje kiseline (ψ = 1000:1), eluens B metanol, a protok pokretne faze 0.4 mL min^{-1} . Volumen injektiranja bio je 15 μL , a temperatura kolone $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Sastav pokretne faze prikazan je u Tablici 11.

Tablica 11. Sastav pokretne faze za separaciju herbicida vezanim sustavom LC-MS/MS

Vrijeme / min	Eluens A	Eluens B
	φ^a / %	φ^a / %
0	50	50
30	30	70
31	5	95
34	5	95
35	50	50
45	50	50

^avolumni udio

Za detekciju i kvantitativno određivanje ciljanih spojeva upotrebljavala se tandemna spektrometrija masa u tzv. MRM (engl. *multiple reaction monitoring*) načinu rada, pri čemu je za dobivanje iona korišteno elektroraspršenje u pozitivnom polaritetu. Napon kapilare u ionskom izvoru iznosio je 3500 V, a temperatura kapilare 350 °C. Kao pomoćni plin za raspršenje i uparavanje koristio se dušik (40 i 10 relativnih jedinica), a kao plin za sudare (koliziju) upotrebljavao se argon (oko 0,2 Pa). Pritom su se pratile višestruke tranzicijske reakcije, što znači da su za svaki analit odabrani po jedan ion prekursor (roditeljski ion) i dva iona produkta (ioni potomci). Ti su ioni odabrani izravnom infuzijom otopina ciljanih spojeva ($\gamma = 10 \mu\text{g mL}^{-1}$) u spektrometar masa. Tijekom procesa automatizirane optimizacije, za svaki spoj odabrane su po dvije karakteristične tranzicije, kao i optimalna kolizijska energija (engl. *collision energy*; CE) te napon na otvoru leće (engl. *tube lens offset*) s kojima je postignut najveći intenzitet odabranih tranzicija. Iznimka je bio deetilterbutilazin kod kojeg je odabrana samo jedna tranzicija. MRM tranzicije analita i izotopno obilježenih unutarnjih standarda, kao i pripadajuće kolizijske energije, prikazane su u Tablici 12.

Tablica 12. Parametri za određivanje odabranih herbicida vezanim sustavom LC-MS/MS praćenjem višestrukih tranzicijskih reakcija

Kratica spoja	Vrijeme zadržavanja / min	Ion-prekursor / m/z	Ion-produkt 1 / m/z	CE* (1) / V	Ion-produkt 2 / m/z	CE* (2) / V
DIP-ATR	3,4	174,1	132,0	17	104,0	26
DE-ATR	4,7	188,1	146,1	18	104,1	24
SIM-d ₁₀	7,6	212,1	137,1	20	134,2	19
SIM	7,8	202,1	132,1	18	68,2	32
DE-TBA	9,0	202,1	146,1	15	-	-
PRM	10,7	242,1	158,1	23	200,1	19
TBR-d ₅	10,8	247,2	191,1	20	69,2	37
TBR	11,1	242,2	186,1	19	68,2	38
CTL	11,2	213,1	72,2	14	140,0	23
ATR-d ₅	11,4	221,2	179,1	18	69,2	36
ATR	11,7	216,1	174,0	18	68,2	29
IPR-d ₆	12,4	213,1	78,2	18	171,1	14
IPR	12,6	207,1	72,2	16	165,1	15
DIU-d ₆	14,0	239,1	78,2	15	160,0	28
DIU	14,1	233,1	72,2	15	160,0	28
IRG	14,2	254,2	198,1	19	108,1	28
SBA	16,6	230,1	174,1	17	104,1	31
PRA	17,1	230,1	188,1	17	146,0	23
LIN	18,4	249,0	182,1	17	160,0	16
TBA	18,5	230,1	174,1	17	104,1	31
ALA-d ₃	23,6	273,1	238,1	11	162,2	17
ACE	23,7	270,1	224,1	10	148,2	20
ALA	23,9	270,1	238,1	11	162,2	19
MET	24,3	284,1	252,1	15	176,2	25

*CE-Kolizijska energija

DIP-ATR=Deizopropilatrazin, DE-ATR=Deetilatrazin, SIM-d₁₀=Simazin d₁₀, SIM=Simazin, DE-TBA=Deetiltetrabutilazin, PRM=Prometrin, TBR-d₅=Terbutrin d₅, TBR=Terbutrin, CTL=klortoluron, ATR-d₅=Atrazin d₅, ATR=Atrazin, IPR-d₆=Izoproturon d₆, IPR=Izoproturon, DIU-d₆=Diuron d₆, DIU=Diuron, IRG=Irgarol, SBA=Sebutilazin, PRA=Propazin, LIN=Linuron, TBA=Terbutilazin, ALA-d₃=Alaklor d₃, ACE=Acetoklor, ALA=Alaklor, MET=Metolaklor

Za obradu rezultata upotrebljavala se odgovarajuća procesna metoda. Pritom se za kvantitativno određivanje masenih koncentracija analita primjenjivala metoda unutarnjeg standarda (interna kalibracija).

3.2.3. Kalibracija

Kalibracijske otopine, koje su sadržavale sve ciljane spojeve, pripravljalje su se prije svake serije analiza u koncentracijskom rasponu od 0.2 ng mL^{-1} do 100 ng mL^{-1} , a osim analita dodavali su se i odgovarajući izotopno obilježeni unutarnji standardi u fiksnoj koncentraciji od 20 ng mL^{-1} . Provodila se kalibracija unutarnjim standardom, a baždarni pravac se konstruirao na temelju poznatih koncentracija kalibracijskih otopina te omjera intenziteta odziva analita i odgovarajućeg unutarnjeg standarda uz primjenu programa Xcalibur 2.0.5. Kao unutarnji standardi za 1,3,5-triazinske herbicide upotrebljavali su se atrazin- d_5 (za atrazin, propazin, terbutilazin, deetilatriazin, deilterbutilazin, deizopropilazin i sebutilazin), terbutrin- d_5 (za terbutrin, prometrin i irgarol) te simazin- d_{10} (za simazin). Kao unutarnji standardi za fenil-urea herbicide upotrebljavali su se izoproturon- d_6 (za izoproturon i klortoluron) te diuron- d_6 (za diuron i linuron). Za sve kloracetanilidne herbicide (alaklor, acetoklor i metolaklor) kao unutarnji standard upotrebljavao se alaklor- d_3 .

3.2.4. Validacija metode

Postupak validacije metode obuhvatio je sljedeće parametre: selektivnost, linearnost, istinitost, preciznost, djelotvornost ekstrakcije, utjecaj matrice, granice detekcije te granice kvantitativnog određivanja. Istinitost i preciznost metode, djelotvornost ekstrakcije te utjecaj matrice određeni su zasebno za svaku pojedinu matricu, u eksperimentima koji su se provodili u kvadruplikatu ($n=4$), a u kojima su ciljani spojevi dodavani u različitim fazama obrade uzoraka.

Selektivnost metode postignuta je praćenjem višestrukih tranzicijskih reakcija. Za gotovo sve spojeve (analite i izotopno obilježeni unutarnje standarde) odabran je po jedan ion-prekursor i dva iona-produkta, tj. praćene su po dvije karakteristične tranzicije, čime su postignute četiri identifikacijske točke za svaki analit. Prva tranzicija upotrebljavala se za kvantitativno određivanje, a druga za potvrdu identiteta analita. Za pozitivnu potvrdu bilo je neophodno i slaganje vremena zadržavanja ciljanih spojeva u kromatogramu uzorka s vremenom zadržavanja u kromatogramu standardne otopine, kao i omjera dviju tranzicija ($RSD < 30 \%$).

Linearnost metode određena je injektiranjem standardnih otopina u rasponu od $0,2 \text{ ng mL}^{-1}$ do 100 ng mL^{-1} koje su sadržavale i odgovarajuće izotopno obilježene unutarnje standarde

u koncentraciji od 20 ng mL⁻¹. Masene koncentracije standardnih otopina prikazane su u Tablici 10.

Istinitost metode određena je ekstrakcijom i analizom uzorka riječne i morske vode te vode za piće (izvorske vode) u koje su dodani analiti i izotopno obilježeni unutarnji standardi u masenoj koncentraciji od 50 ng L⁻¹. Određena je i koncentracija svih analita u originalnom uzorku. Istinitost određivanja (%) izračunata je prema jednadžbi:

$$\text{Istinitost (\%)} = \frac{(\gamma_2 - \gamma_1)}{\gamma_0} \times 100,$$

u kojoj je γ_0 nominalna koncentracija analita u uzorku, γ_1 koncentracija analita u originalnom uzorku, a γ_2 koncentracija analita u uzorku nakon dodatka analita. Kriteriji prihvatljivosti su u rasponu od 70 % do 120 %. U istom eksperimentu određena je i preciznost metode, izražena kao relativno standardno odstupanje (RSD). Kriterij prihvatljivosti je ≤ 20 %.

Djelotvornost ekstrakcije (analitički povrat) određena je ekstrakcijom i analizom uzorka riječne i morske vode te vode za piće (izvorske vode) u koje su analiti dodani prije i poslije ekstrakcije u koncentraciji od 50 ng L⁻¹. Djelotvornost ekstrakcije izračunata je prema sljedećoj formuli:

$$\text{Djelotvornost ekstrakcije (\%)} = \frac{(A_{be} - A_{orig})}{(A_{ae} - A_{orig})} \times 100,$$

u kojoj je A_{be} prosječan odziv analita dodanog u uzorak prije ekstrakcije, A_{ae} prosječan odziv analita dodanog u uzorak nakon ekstrakcije, a A_{orig} prosječan odziv analita u originalnom uzorku.

Utjecaj matrice određen je usporedbom odziva analita u ekstraktu realnog uzorka riječne i morske vode te vode za piće (izvorske vode) s odzivom analita u standardnoj otopini koja je sadržavala analite u istoj masenoj koncentraciji (50 ng L⁻¹ u uzorku, odnosno 50 ng mL⁻¹ u ekstraktu), prema formuli:

$$\text{Utjecaj matrice (\%)} = \frac{(A_{fe} - A_{orig} - A_{std})}{A_{std}} \times 100,$$

u kojoj je A_{fe} prosječan odziv analita dodanog u završi ekstrakt, A_{std} prosječan odziv u standardnoj otopini iste koncentracije (bez matrice), a A_{orig} prosječan odziv analita u originalnom uzorku. Negativna vrijednost utjecaja matrice ukazuje na smanjenje (supresiju) signala, dok pozitivna vrijednost označava pojačanje signala u matrici u odnosu na čisto otapalo.

Instrumentne granice detekcije određene su injektiranjem serije standardnih otopina niskih koncentracija u rasponu od 0,01 do 0,1 ng mL⁻¹ te je procijenjena masa analita injektirana

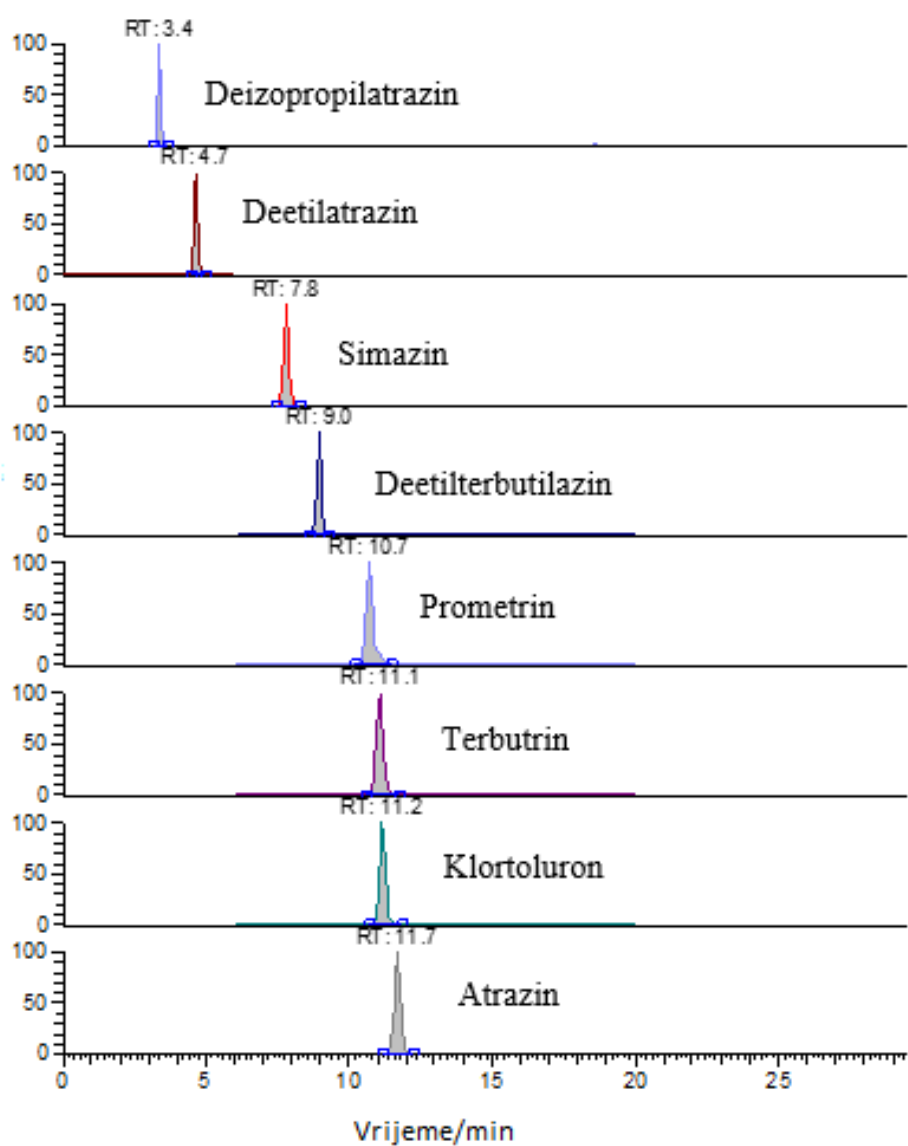
na kolonu kod koje omjer signal/šum iznosi 3. Granice kvantitativnog određivanja metode određene su ekstrakcijom i analizom uzorka izvorske vode u čije su alikvote dodani analiti u niskim koncentracijama (0,2-2 ng mL⁻¹). Originalni uzorak (bez dodatka analita) prethodno je također analiziran te u njemu nisu detektirani ciljani spojevi. Granica kvantitativnog određivanja procijenjena je kao koncentracija kod koje omjer signal/šum iznosi 10.

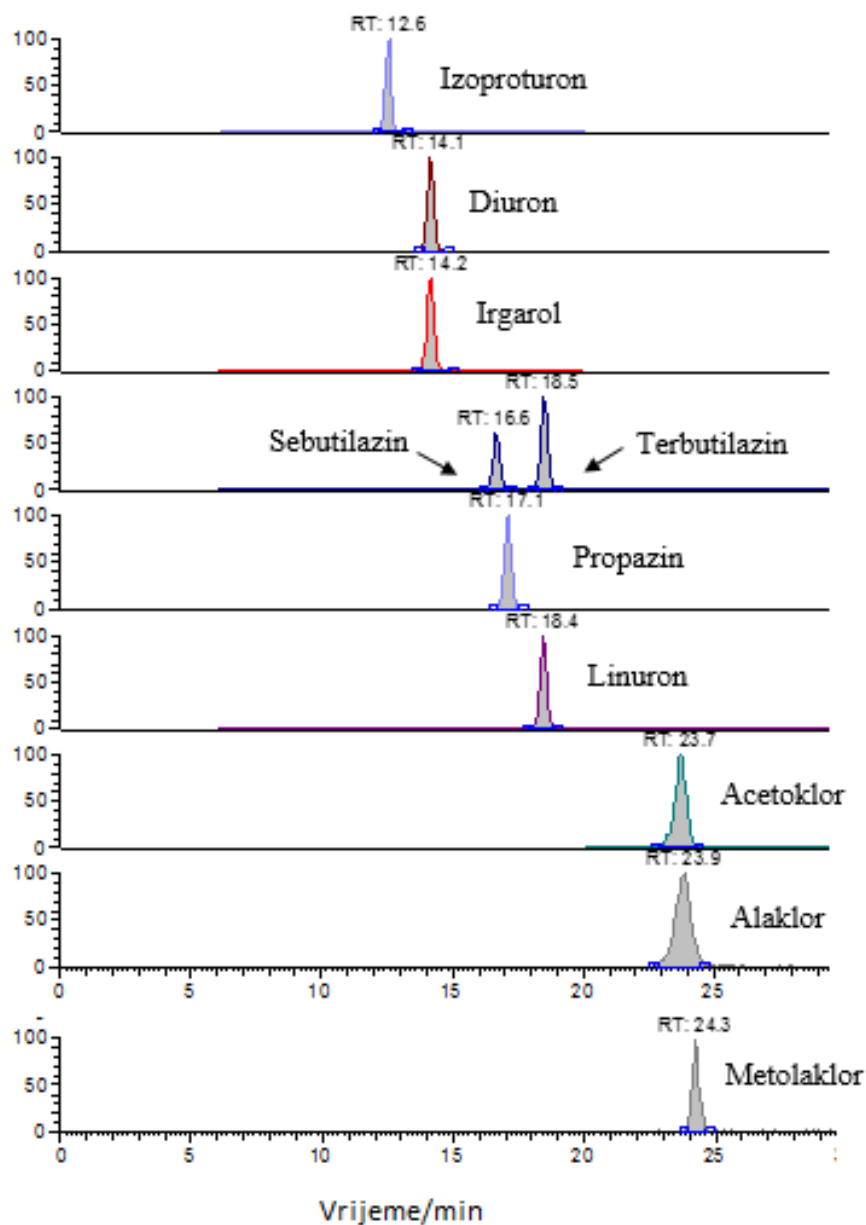
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. RAZVOJ METODE ODREĐIVANJA HERBICIDA U PRIRODNIM VODAMA

Triazinski, fenil-urea i kloracetanilidni spojevi i njihovi razgradni produkti mogu se određivati vezanim sustavom tekućinske kromatografije i tandemne spektrometrije masa s trostrukim kvadrupolom. S obzirom da se radi o relativno polarnim spojevima, za njihovo je razdvajanje korištena kromatografija obrnutih faza. Pritom je kao nepokretna faza upotrijebljena kolona Gemini C₁₈. Radi se o standardnoj kromatografskoj koloni s oktadecilnim skupinama vezanima na površinu silikagela. Pokretna faza sastojala se od dva eluensa: vode s dodatkom 0,1 % mravlje kiseline i metanola. Dodatak mravlje kiseline u vodeni eluens prvenstveno služi za povećanje osjetljivosti maseno-spektrometrijske detekcije, budući da mravlja kiselina predstavlja dodatan izvor protona za nastajanje [M+H]⁺ iona. Međutim, dodatak kiseline često pozitivno utječe i na razdvajanje sastojaka u kromatografiji obrnutih faza, budući da se poboljšava oblik pikova, posebno bazičnih spojeva, zbog potiskivanja disocijacije eventualno zaostalih rezidualnih skupina na površini silikagela.

Budući da je metoda obuhvatila 18 analita, bilo je potrebno pažljivo podesiti kromatografske uvjete kako bi se postiglo njihovo optimalno razdvajanje. Stoga je tijekom razvoja kromatografske metode testirano više gradijentnih programa koji su se razlikovali po omjerima eluensa, kao i po ukupnom trajanju separacije. Konačan gradijentni program trajao je ukupno 45 minuta, pri čemu su svi ciljani spojevi razdvojeni za približno 25 minuta, dok je u preostalom vremenu kolona najprije ispirana pokretnom fazom s većim udjelom organskog otapala, kako bi se uklonile sve nečistoće iz ekstrakta uzoraka koje su eventualno zaostale na koloni, a zatim je bilo potrebno određeno vrijeme kako bi se sastav pokretne faze vratio na početne uvjete, čime su osigurani ravnotežni uvjeti za sljedeću analizu. Na Slici 13 prikazan je tipičan kromatogram standardne smjese svih analita uključenih u metodu.





Slika 13. Kromatogram standardne smjese herbicida u koloni Gemini C₁₈

Redosljed elucije u većini je slučajeva dobro korelirao s koeficijentima raspodjele u sustavu *n*-oktanol/voda (K_{ow}), koji opisuje hidrofobnost kemijskih sastojaka te utječe na njihovo vrijeme zadržavanja u tekućinskoj kromatografiji obrnutih faza. Primjerice, K_{ow} najpolarnijih spojeva raste u nizu deizopropilatrazin > deetilatrazin > simazin (Tablica 2), što odgovara redosljedu njihove elucije. Međutim, kod nekolicine triazina dolazi do određenih odstupanja u redosljedu elucije pa se tako, primjerice, atrazin eluira nakon prometrina i terbutrina, a propazin čak posljednji od svih triazina, iako ima niži K_{ow} od prometrina, terbutrina i irgarola.

To se može objasniti činjenicom da se pH pokretne faze nalazi u području bliskom pK_a vrijednosti triazina. Naime, pK_a vrijednosti atrazina, simazina, propazina i terbutilazina su za približno jednu pH jedinicu niže od pH vrijednosti pokretne faze, što znači da se kod primijenjenih uvjeta ovi spojevi pretežno nalaze u neutralnom obliku, zbog čega se nešto duže zadržavaju na kromatografskoj koloni. S druge strane, prometrin, terbutrin i irgarol, čije su pK_a vrijednosti za jednu pH jedinicu više od pH pokretne faze, pretežno se nalaze u protoniranom obliku, što utječe na njihovo slabije zadržavanje na nepokretnoj fazi, a time i na bržu eluciju. Ako se triazinski spojevi razmatraju zasebno, ovisno o tome imaju li pK_a vrijednost nižu ili višu od pH pokretne faze, redosljed elucije u potpunosti je u skladu s njihovim K_{ow} vrijednostima. Sličan obrazac vrijedi i za fenil-urea herbicide, osim što se klortoluron eluira nešto ranije u odnosu na izoproturon, iako imaju isti K_{ow} (Tablica 4). S druge strane, redosljed eluiranja kloracetanilida nije u potpunosti u skladu s njihovim K_{ow} vrijednostima (Tablica 6). Iako ima najviši K_{ow} , acetoklor se eluira prije preostala dva kloracetanilidna herbicida, što znači da i drugi mehanizmi, osim lipofilne raspodjele, mogu imati utjecaj na zadržavanje ovih spojeva.

Iz kromatograma je vidljivo da je primjenom opisanog gradijentnog programa postignuta zadovoljavajuća separacija većine analita, čak i strukturno sličnih spojeva koje nije uvijek lako razdvojiti kromatografskim metodama. Pritom su oblici pikova bili uglavnom prihvatljivi, s tim da su pikovi bili nešto širi za acetoklor i alaklor. To, međutim, nije imalo utjecaja na pouzdanost određivanja ovih spojeva primjenom opisane metode. Ipak, u nekoliko slučajeva došlo do djelomičnog preklapanja pikova pojedinih analita (npr. prometrin, terbutrin i klortoluron, zatim diuron i irgarol, te acetoklor i alaklor). Iako je potpuno razdvajanje analita svakako poželjno, ono u većini slučajeva nije nužno kad se za detekciju upotrebljavaju visokoselektivne maseno-spektrometrijske metode, kao što je MRM. Čak i slučaju koelucije izobarnih spojeva, kao što su prometrin i terbutrin te acetoklor i alaklor, praćenje višestrukih tranzicija omogućuje nam njihovo nedvosmisleno određivanje, budući da se ti spojevi različito fragmentiraju u kolizijskoj ćeliji te daju različite fragmentne ione.

Međutim, u nekim slučajevima strukturno vrlo slični spojevi mogu dati iste fragmentne ione, kao što je to u našoj metodi bio slučaj s izobarnim spojevima sebutilazinom i terbutilazinom. Štoviše, osim dva najintenzivnija, i ostali fragmentni ioni za ta dva spoja bili su identični. Stoga je za njihovo pouzdano određivanje, tj. za osiguravanje selektivnosti metode, bilo potrebno kromatografski potpuno razdvojiti ta dva spoja, a to je postignuto pažljivim odabirom gradijentnog programa, koji je, iz tog razloga, produžen u odnosu na gradijentni

program koji se upotrebljavao u počecima razvoja metode, a kod kojeg je dolazilo do djelomične koelucije sebutilazina i terbutilazina. Primjenom modificiranog gradijenta, ova dva analita potpuno su razdvojena (Slika 13).

Za obogaćivanje uzoraka upotrebljavala se ekstrakcija na čvrstoj fazi, uz primjenu kolonica Oasis HLB, koje se i inače vrlo često upotrebljavaju za ekstrakciju polarnijih organskih zagađivala iz vodenih uzoraka.^{1,6,35} Te su kolonice punjene sorbensom koji se temelji na kombinaciji divinilbenzena i *N*-vinilpirolidona te omogućuje simultanu i učinkovitu ekstrakciju širokog spektra analita različitih fizikalno-kemijskih svojstava. S obzirom da su ove kolonice u preliminarnim istraživanjima pokazale visoku djelotvornost za ekstrakciju ciljanih herbicida, učinkovitost nekih drugih tipova SPE sorbensa nije istraživana u ovom radu.

4.2. VALIDACIJA METODE

Postupak validacije metode obuhvatio je sljedeće parametre: selektivnost, linearnost, istinitost, preciznost, djelotvornost ekstrakcije (analitički povrat), utjecaj matrice, instrumentne granice detekcije i granice kvantitativnog određivanja metode.

Selektivnost metode postignuta je praćenjem višestrukih tranzicijskih reakcija (MRM način rada spektrometra masa), čime su postignute po 4 tzv. identifikacijske točke, što je u skladu s preporukama za određivanje tragova pesticida u okolišnim uzorcima.⁵⁸ U slučaju sebutilazina i terbutilazina, koji su imali iste tranzicije (Tablica 12), selektivnost je osigurana njihovom potpunom kromatografskom separacijom.

U Tablici 13 prikazani su preostali validacijski parametri koji su bili zajednički za sve matrice – linearnost, instrumentne granice detekcije te granice kvantitativnog određivanja metode.

Tablica 13. Validacijski parametri za herbicide i njihove razgradne produkte

KRATICA SPOJA	r^2	IDL / pg	MQL / ng L ⁻¹
DIP-ATR	0,9973	15	2,0
DE-ATR	0,9996	0,30	<0,20
SIM	0,9996	0,30	<0,20
DE-TBA	0,9997	0,15	<0,20
PRM	0,9996	0,60	<0,20
TBR	0,9994	0,90	<0,20
CTL	0,9986	0,45	<0,20
ATR	0,9998	0,75	0,25
IPR	0,9996	<0,15	<0,20
DIU	0,9984	1,5	0,25
IRG	0,9991	0,15	<0,20
SBA	0,9999	0,75	<0,20
PRA	0,9997	0,15	<0,20
LIN	0,9997	3,0	<0,20
TBA	0,9997	0,45	<0,20
ACE	0,9994	4,5	1,0
ALA	0,9989	3,0	1,0
MET	0,9929	30	2,0

r^2 =koeficijent korelacije, IDL=instrumentna granica detekcije, MQL=granica kvantitativnog određivanja metode
 DIP-ATR=Deizopropilatrazin, DE-ATR=Deetilatratin, SIM=Simazin, DE-TBA=Deefiltetrabutilazin,
 PRM=Prometrin, TBR=Terbutrin, CTL=klortoluron, ATR=Atrazin, IPR=Izoproturon, DIU=Diuron,
 IRG=Irgarol, SBA=Sebutilazin, PRA=Propazin, LIN=Linuron, TBA=Terbutilazin, ACE=Acetoklor, ALA=Alaklor,
 MET=Metolaklor

Linearnost metode određena je injektiranjem standardnih otopina u rasponu od $0,2 \text{ ng mL}^{-1}$ do 100 ng mL^{-1} , koje su sadržavale odgovarajuće izotopno obilježene unutarnje standarde u koncentraciji od 20 ng mL^{-1} . Za sve ciljane analite odziv detektora bio je linearan u navedenom rasponu koncentracija, uz koeficijent korelacije veći od 0,99, odnosno u rasponu od 0,9929 za metolaklor do 0,9999 za sebutilazin.

Instrumentne granice detekcije, određene injektiranjem standardnih otopina u niskom području koncentracija, pokazuju osjetljivost instrumenta za pojedini analit. Te granice procijenjene su u rasponu od $<0,15 \text{ pg}$ za izoproturon do 30 pg za metolaklor.

Granice kvantitativnog određivanja metode, određene pomoću realnog uzorka izvorske vode, odnose se na cijeli postupak ekstrakcije i analize te pokazuju najmanju koncentraciju analita u realnom uzorku koju je moguće kvantitativno odrediti primjenom opisane metode. Za veći broj analita te su granice bile niže od $0,2 \text{ ng L}^{-1}$, što odgovara kalibracijskoj otopini najniže koncentracije u kalibracijskom pravcu. Treba napomenuti da se procijenjene granice odnose na izvorsku vodu (vodu za piće), tako da se vrijednosti za preostale dvije matrice, riječnu i morsku vodu, mogu, zbog razlika u sastavu matrice, u određenoj mjeri razlikovati od vrijednosti navedenih u Tablici 13. Stoga bi u idealnom slučaju te granice trebalo odrediti za svaku matricu zasebno. Međutim, svi uzorci riječnih i morskih voda koji su prikupljeni i analizirani već su sadržavali pojedine analite te bi, stoga, određivanje granica kvantitativnog određivanja za te dvije matrice primjenom navedenog pristupa bilo teško izvedivo i vjerojatno nedovoljno precizno. Osim toga, čak i u istom tipu uzorka (npr. riječna voda) sastav matrice u različitim uzorcima može se znatno razlikovati, što može, kao posljedicu, imati i razlike u granicama određivanja. Stoga je vrijednosti navedene u Tablici 13 potrebno uzeti kao okvirne te se prilikom izračuna koncentracija pojedinih analita u realnim uzorcima, uzimaju u obzir sve koncentracije koje odgovaraju pikovima čiji je omjer signala i šuma 10 ili veći.

4.2.1. Validacija metode za riječnu vodu

U Tablici 14 prikazani su podaci za validacijske parametre za riječnu vodu.

Istinitost metode određena je ekstrakcijom i analizom uzorka riječne vode u koji su dodani analiti i izotopno obilježeni unutarnji standardi u masenoj koncentraciji od 50 ng L^{-1} . Istinitost je izražena u postotcima i u rasponu je od 55 % deetiltetrabutilazin do 223 % metolaklor. Prihvatljive granice istinitosti su od 70 % do 120 %, što znači da je istinitost

prihvatljiva za gotovo sve analite, osim deetiltetrabutylazina i metolaklora, čije je koncentracije, izmjerene u realnim uzorcima, potrebno korigirati s obzirom na istinitost. Glavni razlog lošije istinitosti za ova dva spoja je visok utjecaj matrice koji unutarnji standardi nisu dovoljno dobro kompenzirali, a koji za deetiltetrabutylazin iznosi -48 %, a za metolaklor čak 95 %. Naime, utjecaj matrice za atrazin, čiji se deuterirani analog upotrebljavao kao unutarnji standard za deetiltetrabutylazin, je svega -9 %, dok je utjecaj matrice za alaklor (-34 %), čiji se deuterirani analog upotrebljavao za kvantitativno određivanje metolaklora, također osjetno manji i suprotnog predznaka nego za metolaklor. U ovakvim slučajevima najbolje rješenje predstavlja nabavka izotopno obilježenih analoga problematičnih analita. Nažalost, takvi standardi često nisu dostupni, pogotovo za razgradne produkte poput deetilterbutylazina, ili su preskupi za rutinske analize.

Ponovljivost metode, odnosno preciznost u uvjetima ponovljivosti, određena je u istom pokusu kao i istinitost te je bila u rasponu od 2 % do 12 %, dakle unutar kriterija prihvatljivosti (≤ 20 %).

Djelotvornost ekstrakcije, određena na temelju omjera signala analita dodanog u uzorak prije ekstrakcije i signala analita dodanog nakon ekstrakcije bila je prihvatljiva za sve ciljane spojeve, a njezin raspon bio je od 81 % za irgarol do 108 % za prometrin.

Utjecaj matrice pokazuje razliku u odzivu analita u čistom otapalu i u matrici uzorka te je za većinu spojeva bio niži od 20 %. Nešto veća supresija signala dobivena je za ranije spomenuti deetiltetrabutylazin, alaklor te deetilatratin (-48 %), dok je jako pojačanje signala zabilježeno jedino za metolaklor.

Tablica 14. Validacijski parametri za herbicide i njihove razgradne produkte u riječnoj vodi

KRATICA SPOJA	ISTINITOST / %	PONOVLJIVOST / %	DJELOTVORNOST EKSTRAKCIJE / %	UTJECAJ MATRICE / %
DIP-ATR	110	4	106 ± 14	-20
DE-ATR	79	2	114 ± 15	-48
SIM	106	12	108 ± 15	-12
DE-TBA	55	5	100 ± 10	-56
PRM	93	2	98 ± 5	-14
TBR	92	3	82 ± 4	-13
CTL	121	2	99 ± 11	-2
ATR	107	2	103 ± 10	-9
IPR	94	4	96 ± 12	13
DIU	101	6	100 ± 11	-11
IRG	103	3	81 ± 6	-1
SBA	105	2	101 ± 9	-7
PRA	102	2	101 ± 10	-7
LIN	103	7	96 ± 10	-7
TBA	99	2	102 ± 10	-8
ACE	108	4	103 ± 10	-2
ALA	114	4	102 ± 11	-34
MET	223	4	101 ± 10	95

DIP-ATR=Deizopropilatrazin, DE-ATR=Deetilatratin, SIM=Simazin, DE-TBA=Deetiltetrabutilazin, PRM=Prometrin, TBR=Terbutrin, CTL=klortoluron, ATR=Atrazin, IPR=Izoproturon, DIU=Diuron, IRG=Irgarol, SBA=Sebutilazin, PRA=Propazin, LIN=Linuron, TBA=Terbutilazin, ACE=Acetoklor, ALA=Alaklor, MET=Metolaklor

4.2.2. Validacija metode za vodu za piće (izvorsku vodu)

U Tablici 15 prikazani su podaci za validacijske parametre za vodu za piće (izvorsku vodu).

Istinitost metode bila je u rasponu od 85 % linuron do 130 % metolaklor. S obzirom da su prihvatljive vrijednosti od 70 % do 120 %, istinitost određivanja gotovo svih analita je u skladu sa zahtjevima validacije. Jedino je istinitost metolakra izvan prihvatljivih granica, ali ne radi se o velikom odstupanju. Osim toga, dobivena vrijednost za metolaklor znatno je bliže graničnim vrijednostima u odnosu na istinitost tog spoja u riječnoj vodi.

Ponovljivost metode, odnosno preciznost u uvjetima ponovljivosti, bila je u rasponu od 0,5 % do 11 %, te je također unutar kriterija prihvatljivosti (≤ 20 %).

Za sve analite dobivena je i visoka djelotvornost ekstrakcije. Za gotovo sve spojeve bila je u rasponu od 99 % do 107 %, s iznimkom metolaklora za koji je dobivena vrijednost od 120 %, što je i dalje prihvatljivo.

Utjecaj matrice bio je minimalan za većinu spojeva, što se i moglo očekivati s obzirom da se radi o slabije opterećenoj matrici u odnosu na riječnu vodu. Nešto veća supresija signala određena je za razgradne produkte atrazina – deizopropilatrazin (-22 %) i deetilatrazin (-25 %), koji, kao najpolarniji od ciljanih spojeva, imaju najkraća vremena zadržavanja te se eluiraju u početnom dijelu kromatograma. Očito je da u matrici uzorka dominiraju polarniji spojevi koji uzrokuju smanjenje signala ovih dvaju analita. S druge strane, za metolaklor je ponovno utvrđeno pojačanje signala u matrici u odnosu na čisto otapalo. Međutim, to je pojačanje (34 %) znatno niže nego u riječnoj vodi (95 %). To je i glavni razlog zbog kojeg je istinitost određivanja metolaklora u vodi za piće znatno bolja nego u riječnoj vodi.

Tablica 15. Validacijski parametri za herbicide i njihove razgradne produkte u vodi za piće

KRATICA SPOJA	ISTINITOST / %	PONOVLJIVOST / %	DJELOTVORNOST EKSTRAKCIJE / %	UTJECAJ MATRICE / %
DIP-ATR	102	6	99 ± 10	-22
DE-ATR	102	11	99 ± 17	-25
SIM	105	3	106 ± 10	-7
DE-TBA	112	4	103 ± 10	-8
PRM	109	3	107 ± 14	-0,2
TBR	106	4	101 ± 8	4
CTL	102	3	104 ± 13	-8
ATR	104	4	107 ± 6	-6
IPR	102	3	103 ± 12	-9
DIU	102	0,5	104 ± 14	-9
IRG	117	3	101 ± 15	4
SBA	112	5	106 ± 5	-11
PRA	97	4	106 ± 8	-9
LIN	85	6	99 ± 4	-8
TBA	101	6	105 ± 15	-8
ACE	102	3	104 ± 20	1
ALA	105	5	106 ± 18	-16
MET	130	8	120 ± 20	34

DIP-ATR=Deizopropilatrazin, DE-ATR=Deetilatrazin, SIM=Simazin, DE-TBA=Deiltetrabutylazin, PRM=Prometrin, TBR=Terbutrin, CTL=klortoluron, ATR=Atrazin, IPR=Izoproturon, DIU=Diuron, IRG=Irgarol, SBA=Sebutilazin, PRA=Propazin, LIN=Linuron, TBA=Terbutilazin, ACE=Acetoklor, ALA=Alaklor, MET=Metolaklor

4.2.3. Validacija metode za morsku vodu

U Tablici 16 prikazani su podaci za validacijske parametre za morsku vodu.

Istinitost metode bila je u rasponu je od 50 % deizopropilatrazin do 155 % metolaklor. Nešto niže vrijednosti istinitosti dobivene za dva najpolarnija analita – deizopropilatrazin (50 %) i deetilatrazin (75 %), najvećim su dijelom posljedica nešto veće supresije signala za ta dva spoja. S druge strane, pojačanje signala metolaklora znatno je utjecalo na istinitost određivanja tog spoja (155 %), koja je nešto lošija nego u vodi za piće, ali ipak znatno bolja nego u riječnoj vodi.

Ponovljivost metode bila je u rasponu od 4 % do 11 %, što je slično kao za dvije preostale matrice te unutar kriterija prihvatljivosti (≤ 20 %).

Djelotvornost ekstrakcije i u ovom je slučaju bila prihvatljiva za sve ciljane spojeve, uz raspon od 74 % za deizopropilatrazin do 101 % za tri fenil-urea herbicida.

I u morskoj je vodi utjecaj matrice bio najizraženiji za dva najpolarnija analita – deizopropilatrazin i deetilatrazin te za najmanje polaran spoj – metolaklor. Pritom je, kao i za prethodne dvije matrice, za deizopropilatrazin i deetilatrazin uočena supresija signala, koja je za deizopropilatrazin (-55 %) bila znatno viša u odnosu na preostale matrice. S druge strane, supresija signala deetilatrastina (-46 %), bila je gotovo jednaka kao u riječnoj vodi (-48 %). Pojačanje signala metolaklora (35 %) bilo je gotovo identično kao u vodi za piće (34 %), odnosno mnogo manje nego u riječnoj vodi (95 %).

Tablica 16. Validacijski parametri za herbicide i njihove razgradne produkte u morskoj vodi

KRATICA SPOJA	ISTINITOST / %	PONOVLJIVOST / %	DJELOTVORNOST EKSTRAKCIJE / %	UTJECAJ MATRICE / %
DIP-ATR	50	9	74 ± 21	-55
DE-ATR	75	10	99 ± 5	-46
SIM	107	7	98 ± 9	-4
DE-TBA	108	10	97 ± 8	-12
PRM	112	5	91 ± 18	7
TBR	111	7	85 ± 17	15
CTL	104	9	101 ± 12	-1
ATR	103	7	93 ± 12	3
IPR	107	7	98 ± 13	2
DIU	105	7	101 ± 18	-4
IRG	123	8	87 ± 17	14
SBA	112	7	91 ± 4	1
PRA	98	4	87 ± 4	2
LIN	87	4	101 ± 3	-0,2
TBA	96	5	89 ± 13	1
ACE	111	7	84 ± 29	5
ALA	122	6	88 ± 25	-9
MET	155	11	85 ± 27	35

DIP-ATR=Deizopropilatrazin, DE-ATR=Deetilatrazin, SIM=Simazin, DE-TBA=Deetiltetrabutilazin, PRM=Prometrin, TBR=Terbutrin, CTL=klortoluron, ATR=Atrazin, IPR=Izoproturon, DIU=Diuron, IRG=Irgarol, SBA=Sebutilazin, PRA=Propazin, LIN=Linuron, TBA=Terbutilazin, ACE=Acetoklor, ALA=Alaklor, MET=Metolaklor

4.3. ODREĐIVANJE HERBICIDA U PRIRODNIM VODAMA

Razvijena i validirana metoda primijenjena je za određivanje rasprostranjenosti odabranih herbicida i njihovih razgradnih produkata u porječju rijeke Save, vodama za piće sa šireg zagrebačkog područja te morskoj vodi iz Jadrana.

4.3.1. *Određivanje herbicida u riječnoj vodi*

Analizirani su uzorci vode iz rijeke Save na pet lokacija, od Otoka Samoborskog do Siska, te po jedan uzorak rijeka Krapine i Gradne, neposredno prije utoka u Savu, tijekom dva razdoblja: studeni 2018. i lipanj 2019. Uzorci su prikupljeni u dva razdoblja kako bi se istražilo postoje li razlike u rasprostranjenosti herbicida ovisno o sezoni, tj. godišnjem dobu.

Masene koncentracije istraživanih herbicida i njihovih razgradnih produkata u studenom 2018. prikazane su u Tablici 17. Koncentracije herbicida na svim lokacijama bile su do 3 ng L^{-1} , s iznimkom terbutrina u rijeci Krapini ($8,1 \text{ ng L}^{-1}$). Pritom su terbutrin, atrazin, terbutilazin i metolaklor određeni u svim prikupljenim uzorcima, dok su deetilatrazin, deetilterbutilazin, prometrin, izoproturon i diuron određeni u svim uzorcima Save te u uzorku rijeke Krapine, ali ne i u uzorku rijeke Gradne. S druge strane, irgarol, linuron, acetoklor i alaklor nisu određeni niti u jednom od prikupljenih uzoraka u studenom 2018. Treba napomenuti da u ovim uzorcima nije određivan deizopropilatrazin.

Osim manjeg broja detektiranih herbicida, u uzorku Gradne su i koncentracije herbicida bile niže u odnosu na Savu i Krapinu i nisu prelazile $0,6 \text{ ng L}^{-1}$. S druge strane, koncentracije većine herbicida u Savi bile su slične na svim lokacijama, bez jasnog obrasca koji bi upućivao na veće zagađenje na pojedinoj lokaciji, dok su koncentracije u Krapini za većinu spojeva bile nešto više nego u Savi te je za 7 herbicida maksimalna koncentracija određena upravu u uzorku rijeke Krapine.

Tablica 17. Rasprostranjenost herbicida i njihovih razgradnih produkata u porječju Save u studenom 2018.

UZORAK	$\gamma / \text{ng L}^{-1}$								
	DE-ATR	SIM	DE-TBA	PRM	TBR	CTL	ATR	IPR	DIU
Sava Otok S.	2,4	0,31	0,42	0,26	1,1	<MQL	2,5	1,1	0,39
Gradna	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	0,50	0,13	0,57	<MQL	<MQL
Krapina	1,0	<MQL	0,78	2,3	8,1	0,71	3,0	0,47	1,8
Sava Jankomir	1,3	0,50	0,42	0,43	2,2	<MQL	2,7	1,1	0,65
Sava Petruševac	1,1	0,50	0,44	0,44	2,1	0,13	2,7	0,86	0,41
Sava Oborovo	1,3	0,40	0,34	0,45	2,7	<MQL	2,5	1,9	0,61
Sava Sisak	0,93	0,30	0,33	0,59	1,6	0,38	2,7	0,94	0,51

UZORAK	$\gamma / \text{ng L}^{-1}$							
	IRG	SBA	PRA	LIN	TBA	ACE	ALA	MET
Sava Otok S.	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	0,41	<MQL	<MQL	0,18
Gradna	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	0,11	<MQL	<MQL	0,07
Krapina	<MQL	<MQL	0,17	<MQL	1,8	<MQL	<MQL	1,7
Sava Jankomir	<MQL	<MQL	0,14	<MQL	0,44	<MQL	<MQL	0,25
Sava Petruševac	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	0,49	<MQL	<MQL	0,25
Sava Oborovo	<MQL	0,14	0,14	<MQL	0,39	<MQL	<MQL	0,19
Sava Sisak	<MQL	0,11	0,11	<MQL	0,59	<MQL	<MQL	1,4

MQL = granica kvantitativnog određivanja metode

DE-ATR=Deetilatratin, SIM=Simazin, DE-TBA=Deetiltetrabutilazin, PRM=Prometrin, TBR=Terbutrin, ATR=Atrazin, IPR=Izoproturon, DIU=Diuron, IRG=Irgarol, SBA=Sebutilazin, PRA=Propazin, LIN=Linuron, TBA=Terbutilazin, ACE=Acetoklor, ALA=Alaklor, MET=Metolaklor

Masene koncentracije herbicida i njihovih razgradnih produkata u lipnju 2019. prikazane su u Tablici 18. Koncentracije terbutilazina i metolaklora u Savi bile su znatno više nego u studenom 2018. te su na lokaciji Oborovo dosegnule su 91 ng L^{-1} , odnosno 139 ng L^{-1} . Ovi rezultati nisu neočekivani, s obzirom da se radi o vrlo popularnim herbicidima koji se, prema podacima Ministarstva poljoprivrede, nalaze među pet herbicida s najvišom potrošnjom u Hrvatskoj. Zanimljivo je da je za oba herbicida, kao i za deetilterbutilazin, razgradni produkt terbutilazina, uočen isti obrazac rasprostranjenosti na pojedinim lokacijama na Savi pa su koncentracije opadale u nizu Oborovo > Sisak > Jankomir > Petruševac > Otok Samoborski. Ovi rezultati ukazuju na moguće zajedničko podrijetlo terbutilazina i metolaklora, što se može objasniti činjenicom da se ova dva herbicida često upotrebljavaju zajedno, a zamijenili su nekad masovno

upotrebljavane atrazin i acetoklor.² Koncentracije u rijeci Krapini bile su slične kao u Savi na lokacijama Jankomir i Petruševac, dok su, s druge strane, u rijeci Gradni detektirani samo tragovi terbutilazina, a metolaklor je bio ispod granice određivanja.

Što se tiče ostalih herbicida, njihove su koncentracije bile uglavnom niže od 10 ng L^{-1} , s iznimkom atrazina u uzorku prikupljenom u Sisku (11 ng L^{-1}). Na ostalim lokacijama koncentracije atrazina, ali i njegovog razgradnog produkta deetilatrizina, u lipnju 2019. bile su vrlo slične koncentracijama u studenom 2018. To ukazuje da se vjerojatno radi o ostacima ovog teško razgradivog spoja u okolišu, iz razdoblja kad se masovno upotrebljavao u poljoprivredi. Ipak, unatoč zabrani, ne može se u potpunosti isključiti njegova sporadična upotreba, što bi moglo objasniti nešto višu koncentraciju na lokaciji Sisak, koja nije bila praćena povišenom koncentracijom deetilatrizina. U tom je kontekstu zanimljivo napomenuti da je tvornica Herbos u Sisku dugi niz godina proizvodila velike količine atrazina. Tebutrin je također detektiran u svim uzorcima Save te u uzorku Krapine, pri čemu su njegove koncentracije bile usporedive s koncentracijama određenima u studenom 2018. Ostali herbicidi detektirani su tek sporadično u uzorcima iz lipnja 2018.

Tablica 18. Rasprostranjenost herbicida i njihovih razgradnih produkata u porječju Save u lipnju 2019.

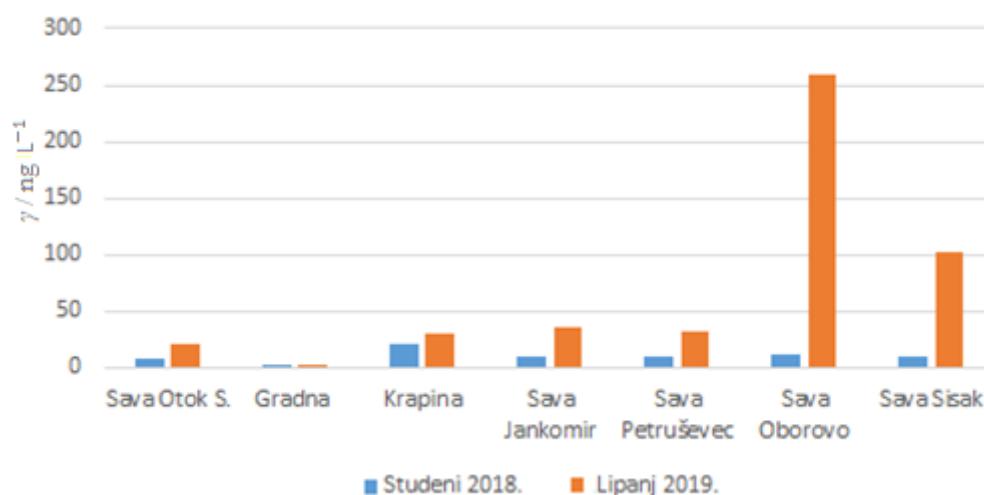
UZORAK	$\gamma / \text{ng L}^{-1}$								
	DIP-ATR	DE-ATR	SIM	DE-TBA	PRM	TBR	CTL	ATR	IPR
Sava Otok S.	<MQL	1,8	<MQL	2,2	<MQL	0,90	<MQL	2,4	<MQL
Gradna	<MQL	1,9	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<LOQ	<MQL
Krapina	<MQL	<MQL	<MQL	3,1	<MQL	1,5	<MQL	2,5	<MQL
Sava Jankomir	<MQL	1,7	<MQL	2,9	<MQL	1,0	<MQL	2,5	<MQL
Sava Petruševac	<MQL	1,8	<MQL	2,5	<MQL	1,4	<MQL	2,1	<MQL
Sava Oborovo	<MQL	3,1	<MQL	15	1,3	4,2	<MQL	3,1	1,7
Sava Sisak	<MQL	2,2	4,4	7,1	1,0	1,7	7,8	11	<MQL

UZORAK	$\gamma / \text{ng L}^{-1}$								
	DIU	IRG	SBA	PRA	LIN	TBA	ACE	ALA	MET
Sava Otok S.	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	5,9	<MQL	<MQL	7,6
Gradna	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	0,80	<MQL	<MQL	<MQL
Krapina	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	11	<MQL	<MQL	13
Sava Jankomir	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	11	<MQL	<MQL	16
Sava Petruševac	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	10	<MQL	<MQL	14
Sava Oborovo	1,2	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	91	<MQL	<MQL	139
Sava Sisak	<MQL	<MQL	<MQL	1,3	<MQL	28	<MQL	<MQL	38

MQL = granica kvantitativnog određivanja metode

DIP-ATR=Deizopropilatrazin, DE-ATR=Deetilatrazin, SIM=Simazin, DE-TBA=Deetiltetrautilazin, PRM=Prometrin, TBR=Terbutrin, CTL=klortoluron, ATR=Atrazin, IPR=Izoproturon, DIU=Diuron, IRG=Irgarol, SBA=Sebutilazin, PRA=Propazin, LIN=Linuron, TBA=Terbutilazin, ACE=Acetoklor, ALA=Alaklor, MET=Metolaklor

Na Slici 14 prikazana je usporedba ukupnih koncentracija herbicida na pojedinim lokacijama u dva uzorkovanja. Iz prikazanih podataka vidljivo je da su ukupne koncentracije herbicida općenito znatno više u uzorcima prikupljenima u lipnju 2019., u odnosu na koncentracije u uzorcima iz studenog 2018., što je u najvećoj mjeri posljedica povećanih koncentracija terbutilazina i metolaklora, a može se objasniti povećanom upotrebom ovih herbicida u poljoprivredi u proljeće u odnosu na jesen. U studiji iz 2014.² također je utvrđena sezonska varijabilnost za pojedine herbicide, među kojima su bili i terbutilazin i metolaklor, u površinskim vodama sa šireg zagrebačkog područja, pri čemu su koncentracije bile najviše u razdoblju od travnja do kolovoza, tj. nakon proljetne aplikacije.



Slika 14. Usporedba ukupnih masenih koncentracija herbicida i njihovih razgradnih produkata u porječju Save u studenom 2018. i lipnju 2019.

Rezultati dobiveni u ovom radu uglavnom su usporedivi s rezultatima opsežne studije iz 2014., u kojoj su triazinski, fenil-urea i kloracetanilidni herbicidi određivani u površinskim i podzemnim vodama te vodama za piće sa šireg zagrebačkog područja.² Pritom su koncentracije atrazina, terbutilazina i metolaklora u rijeci Savi bile su slične koncentracijama određenima u ovom istraživanju. S druge strane, koncentracije nekih herbicida bile su više nego u našem istraživanju pa su tako maksimalne koncentracije pojedinih spojeva u rijeci Krapini premašile 100 ng L^{-1} . Međutim, potrebno je istaknuti da je navedena studija obuhvatila znatno veći broj uzoraka površinskih voda, dok je cilj ovog rada demonstracija primjenjivosti metode, a ne opsežna studija o rasprostranjenosti herbicida.

4.3.2. Određivanje herbicida u vodi za piće

Analizirani su uzorci vode za piće s 11 lokacija u Zagrebu i okolici tijekom lipnja 2019. Većina uzoraka uzeta je iz javne vodoopskrbne mreže, uz iznimku jednog uzorka iz Brdovca te uzorka iz Jertovca koji su uzeti iz privatnih bunara. Masene koncentracije herbicida prikazane su u Tablici 19.

Polovica istraživanih herbicida i njihovih razgradnih produkata nije detektirana niti u jednom uzorku vode za piće. Sedam spojeva (uključujući 4 triazinska herbicida i 3 razgradna produkta) određeni su u većini uzoraka. Štoviše, simazin, atrazin, deetilatriazin i deetilterbutilazin određeni su u svim uzorcima osim u uzorku iz bunara u Jertovcu, dok je

terbutilazin određen u svim uzorcima osim u vodovodnoj vodi prikupljenoj na Institutu Ruđer Bošković (Medveščak-istok). Zanimljivo je uočiti da se radi isključivo o triazinskim herbicidima i njihovim razgradnim produktima, dok su od preostale dvije skupine herbicida određeni samo acetoklor (u uzorku iz bunara u Brdovcu) te izoproturon (u 3 uzorka vodovodne vode).

Pomalo neočekivano, uzorak iz privatnog bunara u Jertovcu bio je daleko najmanje opterećen ciljanim herbicidima, budući da su u tom uzorku detektirani samo tragovi terbutilazina, i to u vrlo niskoj koncentraciji ($0,12 \text{ ng L}^{-1}$). Drugi bunarski uzorak, uzet u Brdovcu, sadržavao je veći broj herbicida, uključujući i zabranjeni acetoklor, koji nije detektiran niti u jednom preostalom uzorku, kao niti u jednom uzorku riječne vode, premda je u studiji iz 2014.⁷ detektiran u razmjerno velikom broju uzoraka voda za piće.

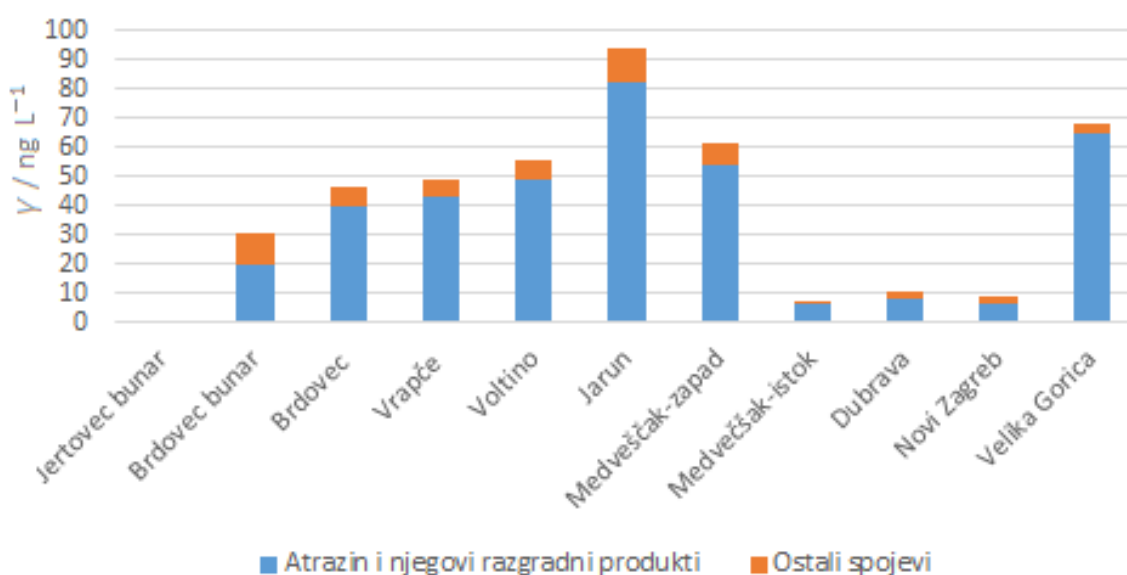
S druge strane, svi uzorci vodovodne vode sadržavali su mjerljive koncentracije većeg broja herbicida, mahom triazina. Pritom su najviše koncentracije određene za atrazin ($2,1 - 42 \text{ ng L}^{-1}$) te njegov razgradni produkt deetilatriazin ($2,7-39 \text{ ng L}^{-1}$), dok su koncentracije svih ostalih herbicida bile niže od 5 ng L^{-1} . Na Slici 14 prikazana je raspodjela masenih koncentracija herbicida i njihovih razgradnih produkata u vodi za piće, iz koje je jasno vidljivo da su atrazin i njegovi razgradni produkti daleko najzastupljeniji u svim uzorcima voda za piće. Pritom su koncentracije deetilatriazina bile vrlo slične koncentracijama roditeljskog spoja, dok su koncentracije deizopropilatriazina u svim uzorcima bile niže od 2 ng L^{-1} .

Tablica 19. Rasprostranjenost herbicida i njihovih razgradnih produkata u vodama za piće sa šireg zagrebačkog područja

UZORAK	$\gamma / \text{ng L}^{-1}$								
	DIP-ATR	DE-ATR	SIM	DE-TBA	PRM	TBR	CTL	ATR	IPR
Jertovec bunar	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL
Brdovec bunar	<MQL	10	1,1	3,0	<MQL	<MQL	<MQL	9,5	<MQL
Brdovec vodovod	0,81	19	1,9	3,1	<MQL	<MQL	<MQL	20	<MQL
Vrapče vodovod	0,75	20	1,4	2,1	<MQL	<MQL	<MQL	22	<MQL
Voltino vodovod	0,92	23	1,6	2,3	<MQL	<MQL	<MQL	25	<MQL
Jarun vodovod	1,8	39	2,9	3,8	<MQL	<MQL	<MQL	42	<MQL
Medveščak - zapad vodovod	0,91	25	1,8	2,4	<MQL	<MQL	<MQL	28	<MQL
Medveščak - istok vodovod	0,29	4,3	0,25	0,43	<MQL	<MQL	<MQL	2,1	<MQL
Dubrava vodovod	0,57	4,5	0,24	0,94	<MQL	<MQL	<MQL	3,3	0,94
N. Zagreb vodovod	0,45	2,7	0,35	0,80	<MQL	<MQL	<MQL	3,0	0,80
V. Gorica vodovod	1,5	35	0,79	1,2	<MQL	<MQL	<MQL	28	1,2

UZORAK	$\gamma / \text{ng L}^{-1}$								
	DIU	IRG	SBA	PRA	LIN	TBA	ACE	ACA	MET
Jertovec bunar	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	0,12	<MQL	<MQL	<MQL
Brdovec bunar	<MQL	<MQL	<MQL	0,19	<MQL	0,49	6,1	<MQL	<MQL
Brdovec vodovod	<MQL	<MQL	<MQL	0,54	<MQL	0,98	<MQL	<MQL	<MQL
Vrapče vodovod	<MQL	<MQL	<MQL	0,51	<MQL	2,3	<MQL	<MQL	<MQL
Voltino vodovod	<MQL	<MQL	<MQL	0,54	<MQL	2,4	<MQL	<MQL	<MQL
Jarun vodovod	<MQL	<MQL	<MQL	0,92	<MQL	4,1	<MQL	<MQL	<MQL
Medveščak - zapad vodovod	<MQL	<MQL	<MQL	0,61	<MQL	2,6	<MQL	<MQL	<MQL
Medveščak - istok vodovod	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL
Dubrava vodovod	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	0,23	<MQL	<MQL	<MQL
N. Zagreb vodovod	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	0,31	<MQL	<MQL	<MQL
V. Gorica vodovod	<MQL	<MQL	<MQL	0,70	<MQL	0,15	<MQL	<MQL	<MQL

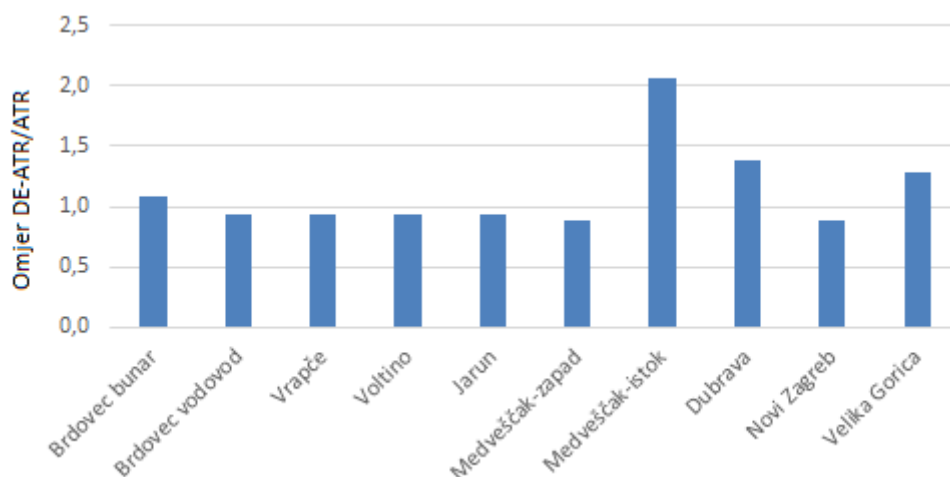
DIP-ATR=Deizopropilatrazin, DE-ATR=Deetilatrazin, SIM=Simazin, DE-TBA=Deetiltetrabutylazin, PRM=Prometrin, TBR=Terbutrin, CTL=klortoluron, ATR=Atrazin, IPR=Izoproturon, DIU=Diuron, IRG=Irgarol, SBA=Sebutilazin, PRA=Propazin, LIN=Linuron, TBA=Terbutilazin, ACE=Acetoklor, ALA=Alaklor, MET=Metolaklor



Slika 15. Raspodjela masenih koncentracija herbicida i njihovih razgradnih produkata u vodi za piće

Relativno visoke koncentracije atrazina i njegovih razgradnih produkata u vodi za piće na prvi su pogled iznenađujući, s obzirom da je upotreba atrazina u Hrvatskoj zabranjena prije desetak godina. Međutim, radi se o teško razgradivom herbicidu koji se masovno upotrebljavao dugi niz godina, uz godišnju potrošnju u Hrvatskoj od oko 500 tona.⁵⁹ Opsežna studija provedena u Njemačkoj⁶⁰ pokazala je da su i 20 godina nakon prestanka upotrebe koncentracije atrazina u podzemnim vodama i dalje blizu granične vrijednosti za vodu za piće od 100 ng L⁻¹, i bez tendencije znatnog smanjenja. Osim toga, naši se rezultati dobro slažu i s rezultatima studije provedene 2014. na zagrebačkom području,² u kojoj je atrazin u vodi za piće određen u rasponu koncentracija od 5 ng L⁻¹ do 68 ng L⁻¹, što upućuje na to da u posljednjih 5 godina nije došlo do znatnijeg smanjenja koncentracija ovog spoja u vodovodnoj vodi. Važno je istaknuti da omjer deetilatriazin/atrazin (engl. *deethylatrazine-to-atrazine mass concentration ratio* - DAR) u podzemnim vodama može poslužiti kao indikator izvora atrazina te njegovog transporta kroz nezasićene zone tla.⁶⁰ Pritom vrlo niski omjeri (< 0,3) ukazuju na točkasti izvor zagađenja, dok više vrijednosti upućuju na difuzno zagađenje povezano s primjenom atrazina na poljoprivrednim površinama. U većini uzoraka vodovodne vode s područja grada Zagreba omjer deetilatriazin/atrazin bio je vrlo sličan i iznosio je približno 0,9 (Slika 16), što ukazuje na difuzno zagađenje, koje je vjerojatno posljedica dugogodišnje izloženosti podzemnih voda ovom otpornom herbicidu. Slični omjeri određeni su u uzorcima vode za piće sa zagrebačkog

područja u studiji iz 2014.,² dok je nešto viši omjer (1,3) određen u uzorku vodovodne vode iz Velike Gorice, što može upućivati na nešto sporiji transport atrazina kroz nezasićene zone tla, zbog čega je došlo do njegove povećane transformacije u deetilatrazin.⁶⁰



Slika 16. Omjer deetilatrazina i atrazina u vodama za piće sa šireg zagrebačkog područja

Zanimljivo je primijetiti da u gradu Zagrebu postoji jasan prostorni obrazac rasprostranjenosti atrazina i njegovih razgradnih produkata pa su tako u zapadnim dijelovima grada (Vrapče, Voltino, Jarun i Medveščak - zapad) njihove koncentracije bile značajno više u odnosu na istočni i južni dio grada (Medveščak - istok, Dubrava i Novi Zagreb-Sopot), pri čemu su maksimalne koncentracije određene u uzorku prikupljenom na Jarunu. Sličan trend, ali uz znatno niže koncentracijske razine, određen je i za ostale triazine (terbutilazin, deetilterbutilazin, simazin). Ovakva je raspodjela vrlo vjerojatno posljedica činjenice da javna vodoopskrbna mreža grada Zagreba i okolice uključuje više crpilišta, s različitim stupnjem antropogenog opterećenja, pri čemu se čini da su crpilišta u zapadnom dijelu grada značajno više zagađena triazinskim herbicidima. U tom je kontekstu zanimljivo napomenuti da su koncentracije atrazinskih spojeva u uzorku vodovodne vode iz Velike Gorice bile slične koncentracijama u zapadnom dijelu Zagreba. Iako su masene koncentracije atrazina u svim uzorcima bile niže od maksimalno dozvoljenih vrijednosti za vodu za piće (100 ng L^{-1}), zbroj masenih koncentracija atrazina i njegovih razgradnih produkata (83 ng L^{-1}) u uzorku s Jaruna tek je nešto niži od postavljene granice. S obzirom da su toksični učinci i način djelovanja triazinskih herbicida i njihovih metabolita slični,⁶¹ metaboliti atrazina (i ostalih triazinskih herbicida) svakako bi trebali biti uključeni u studije koje se bave rasprostranjenošću i

procjenama mogućih nepovoljnih učinaka ovog spoja, ali i u rutinskim određivanjima tragova atrazina u vodi za piće. Međutim, za potvrdu ovih preliminarnih uvida, bilo bi potrebno provesti opsežniju studiju koja bi obuhvatila veći broj uzoraka vodovodne vode na više lokacija, kao i uzorke podzemnih voda s vodocrpilišta u različitim hidrološkim uvjetima.

Na kraju je potrebno napomenuti da je u ekstraktima svih uzoraka vodovodne vode opaženo jako smanjenje signala unutarnjeg standarda terbutrina (terbutrin- d_3), čiji su odzivi bili i do nekoliko redova veličine niži nego u kalibracijskim otopinama, slijepim probama, ali i u ekstraktima uzoraka voda iz bunara. S obzirom da je toliko jaki utjecaj matrice u ekstraktima vodovodne vode neuobičajen, ali i zbog činjenice da isti učinak nije opažen u bunarskoj vodi, naša je pretpostavka da se ne radi o supresiji zbog utjecaja matrice, nego da je smanjenje signala povezano s dezinfekcijom (kloriranjem) vode za piće prije puštanja u javnu vodoopskrbnu mrežu. Naime, kemikalije koje se upotrebljavaju za dezinfekciju, poput hipoklorita, mogu oksidirati pojedine organske spojeve, uključujući i neke triazinske herbicide, kao što su terbutrin i prometrin, pri čemu nastaju produkti za koje se pokazalo da mogu biti čak i toksičniji od roditeljskih spojeva.⁶² Stoga smo ekstrakte vodovodnih voda dodatno analizirali pretražnom metodom primjenom vezanog sustava tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti i spektrometrije masa visoke rezolucije, kako bismo pokušali detektirati eventualne oksidacijske produkte terbutrina i prometrina. Iako ti produkti u našim ekstraktima nisu detektirani (što može biti i posljedica nešto slabije osjetljivosti pretražne metode i/ili daljnje razgradnje nastalih produkata), ovo zapažanje upućuje na moguću važnost transformacijskih proizvoda koji mogu nastati tijekom procesa obrade vode za piće.

4.3.3. Određivanje herbicida u morskoj vodi

Analizirani su uzorci vode prikupljeni u srpnju 2019. na nekoliko lokacija uz riječna ušća, zatim u Kvarnerskom zaljevu u blizini Rijeke te na jednoj lokaciji na otvorenom moru južnog Jadrana za koju se očekuje da je pod manjim antropogenim utjecajem. Rezultati su prikazani u Tablici 20.

Koncentracije većine herbicida u prikupljenim su uzorcima bile niže od 1 ng L^{-1} , uz nekoliko iznimki. Tako je atrazin na pojedinim lokacijama određen u koncentracijama do $1,4 \text{ ng L}^{-1}$. Tragovi atrazina koji su detektirani u svim uzorcima nisu iznenađenje s obzirom da postojanost ovog nekad vrlo popularnog herbicida. S druge strane, nije neočekivano ni što je

maksimalna koncentracija diurona od 1 ng L^{-1} određena baš u riječkom zaljevu, blizu luke Rijeka, jer se ovaj herbicid upotrebljava i kao protuobraštajno sredstvo na brodovima.⁶³ Jedini preostali herbicid koji je određen u koncentraciji višoj od 1 ng L^{-1} bio je alaklor, i to kod ušća rijeke Omble ($1,5 \text{ ng L}^{-1}$). Iako je većina uzoraka ciljano uzeta u blizini ušća rijeka, gdje bi se, zbog primjene herbicida na poljoprivrednim površinama u dolinama rijeka, moglo očekivati veće zagađenje herbicidima, koncentracije ciljanih spojeva ipak su bile razmjerno niske, što je vjerojatno posljedica velikog razrjeđenja u moru.

Tablica 20. Rasprostranjenost herbicida i njihovih razgradnih produkata u uzorcima
Jadranskog mora

UZORAK	$\gamma / \text{ng L}^{-1}$								
	DIP-ATR	DE-ATR	SIM	DE-TBA	PRM	TBR	CTL	ATR	IPR
Mirna	<MQL	0,58	0,32	0,65	<MQL	0,10	0,06	0,61	<MQL
Raša	<MQL	0,29	<MQL	0,84	0,15	0,17	<MQL	0,69	<MQL
Rječina	<MQL	0,24	0,40	0,40	0,11	<MQL	<MQL	1,1	0,22
Jadro	<MQL	0,38	<MQL	0,21	0,14	0,09	<MQL	0,25	<MQL
Neretva	<MQL	0,24	0,34	0,25	0,10	<MQL	0,10	1,1	<MQL
Ombla	<MQL	0,22	0,42	0,22	0,09	<MQL	0,06	1,1	<MQL
Južni Jadran	<MQL	0,31	0,56	0,32	0,11	<MQL	0,08	1,4	<MQL

UZORAK	$\gamma / \text{ng L}^{-1}$								
	DIU	IRG	SBA	PRA	LIN	TBA	ACE	ALA	MET
Mirna	0,30	0,08	<MQL	<MQL	<MQL	0,60	<MQL	<MQL	<MQL
Raša	<MQL	0,10	<MQL	<MQL	<MQL	0,50	<MQL	<MQL	<MQL
Rječina	1,0	0,28	<MQL	0,15	<MQL	0,27	<MQL	<MQL	<MQL
Jadro	<MQL	0,07	<MQL	<MQL	0,46	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL
Neretva	0,32	0,07	<MQL	0,11	<MQL	0,20	<MQL	<MQL	<MQL
Ombla	0,48	0,17	<MQL	0,15	<MQL	0,24	<MQL	1,5	<MQL
Južni Jadran	0,41	0,15	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL

DIP-ATR=Deizopropilatrazin, DE-ATR=Deetilatrazin, SIM=Simazin, DE-TBA=Deetiltetrabutilazin, PRM=Prometrin, TBR=Terbutrin, CTL=klortoluron, ATR=Atrazin, IPR=Izoproturon, DIU=Diuron, IRG=Irgarol, SBA=Sebutilazin, PRA=Propazin, LIN=Linuron, TBA=Terbutilazin, ACE=Acetoklor, ALA=Alaklor, MET=Metolaklor

§ 5. ZAKLJUČAK

Razvijena i validirana analitička metoda opisana u ovom radu omogućuje selektivno, osjetljivo i pouzdano određivanje tragova 15 triazinskih, fenil-urea i kloracetanilidnih herbicida, kao i 3 razgradna produkta triazina u prirodnim vodama vezanim sustavom tekućinske kromatografije i tandemne spektrometrije masa. Selektivnost metode postignuta je, prije svega, visokospecifičnim načinom rada spektrometra masa (tzv. praćenjem višestrukih tranzicijskih reakcija), ali i uspješnom separacijom ciljanih spojeva na kromatografskoj koloni.

Metoda je sustavno validirana za nekoliko tipova prirodnih voda, uključujući riječnu i morsku vodu te vodu za piće. Upotreba većeg broja izotopno obilježenih analoga ciljanih spojeva, koji su dodavani u uzorke kao unutarnji standardi, osigurala je visoku točnost metode, budući da su navedeni spojevi u većini slučajeva vrlo uspješno kompenzirali eventualne gubitke tijekom obrade uzoraka, utjecaj matrice, kao i promjene odziva instrumenta. Nešto veća odstupanja, zbog većeg utjecaja matrice, dobivena su jedino za metolaklor, posebno u riječnoj vodi te bi, stoga, za pouzdanije određivanje ovog spoja, bilo poželjno metodu proširiti tako da se u nju, kao unutarnji standard, uključi izotopno obilježeni analog metolaklora. Metoda se pokazala i vrlo osjetljivom, budući da su granice kvantitativnog određivanja bile do 2 ng L^{-1} , a za većinu spojeva i niže od $0,2 \text{ ng L}^{-1}$.

Primjenjivost metode uspješno je demonstrirana na odabranim uzorcima prirodnih voda. Pritom su u uzorcima riječnih voda iz porječja Save najzastupljeniji bili kloracetanilidni herbicid metolaklor (do 139 ng L^{-1}) i triazinski herbicid terbutilazin (do 91 ng L^{-1}), što se vrlo dobro slaže s podacima o potrošnji, s obzirom da se navedeni spojevi nalaze među 5 herbicida s najvećom primjenom u Hrvatskoj. Pritom su njihove masene koncentracije bile znatno više u kasno proljeće nego u jesen, što je u skladu s povećanom aplikacijom herbicida tijekom proljeća, pri čemu su najviše koncentracije svih herbicida u proljetnom uzorkovanju određene na lokaciji Sava Oborovo koja se nalazi nizvodno od Zagreba.

S druge strane, u vodovodnoj vodi sa zagrebačkog područja i dalje dominira triazinski herbicid atrazin. Iako je njegova upotreba u Hrvatskoj zabranjena prije desetak godina, ovaj je teško razgradivi spoj i dalje vrlo zastupljen. Štoviše, čini se da se njegove koncentracije u vodovodnoj vodi u posljednjih 5 godina nisu znatnije smanjile. Dodatan problem su i podjednako visoke koncentracije njegovog razgradnog produkta deetilatrizona, što ukazuje na

difuzno zagađenje, koje je vjerojatno posljedica dugogodišnje izloženosti podzemnih voda atrazinu. Pritom je vodovodna voda u zapadnim dijelovima grada znatno više zagađena atrazinom i njegovim razgradnim produktima, uz ukupnu masenu koncentraciju do 83 ng L^{-1} . Iako maksimalno dozvoljena koncentracija od 100 ng L^{-1} u vodi za piće nije dosegnuta niti u jednom uzorku, naši preliminarni uvidi ukazuju na važnost sustavnog praćenja ovih spojeva u prirodnim vodama koje služe kao izvori vode za piće. Pritom bi, osim herbicida, u praćenje svakako trebalo uključiti i njihove razgradne produkte, za koje se pokazalo da mogu biti i toksičniji od roditeljskih spojeva.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA (prema potrebi)

ACE – acetoklor (engl. *Acetochlor*)

ALA – alaklor (engl. *Alachlor*)

ATP – adenzin trifosfat (engl. *Adenosine Triphosphate*)

ATR – atrazin (engl. *Atrazine*)

CE – kolizijska energija (engl. *Collision Energy*)

CTL – klortoluron (engl. *Chlorotoluron*)

DAR – omjer deetilatrazin/atrazin (engl. *Deethylatrazine-to-atrazine mass concentration ratio*)

DE-ATR – deetilatrazin (engl. *Deethylatrazine*)

DE-TBA – deetiltetrabutilazin (engl. *Deethylterbuthylazine*)

DIP-ATR – deizopropilatrazin (engl. *Deisopropylatrazine*)

DIU – diuron (engl. *Diuron*)

ESI – ionizacija elektroraspršenjem (engl. *Electrospray Ionization*)

GC – plinska kromatografija (engl. *Gas chromatography*)

GC-MS/MS – plinska kromatografija spregnuta s tandemnom sprektometrijom masa (engl. *Gas chromatography Tandem Mass Spectrometry*)

GST – glutation-S-transferaza (engl. *Glutathione S-transferase*)

HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*)

HPLC/UPLC – tekućinska kromatografija visoke/ultravisoke djelotvornosti (engl. *High/Ultrahigh Performance Liquid Chromatography*)

IDL - instrumentna granica određivanja metode (engl. *Instrumental Detection Limit*)

IPR – izoproturon (engl. *Isoproturon*)

IRG – irgarol (engl. *Irgarol*)

K_{oc} – koeficijent razdjeljenja između organskog ugljika i vode (engl. *Organic carbon/water partition coefficient*)

K_{ow} – koeficijent razdjeljenja u sustavu *n*-oktanol/voda (engl. *N-octanol/water partition coefficient*)

LC – tekućinska kromatografija (engl. *Liquid Chromatography*)

LC-MS/MS – tekućinska kromatografija spregnuta s tandemnom spektrometrijom masa (engl. *Liquid Chromatograph Tandem Mass Spectrometry*)

LIN – linuron (engl. *Linuron*)

MET – metolaklor (engl. *Metolachlor*)

SQL – granica kvantitativnog određivanja metode (engl. *Method Quantification Limit*)

MRM – praćenje višestrukih tranzicijskih reakcija (engl. *Multiple Reaction Monitoring*)

MS – spektrometrija masa (engl. *Mass Spectrometry*)

PCX – izmjena kationa na polimeru (engl. *Polimer Cation Exchange*)

PRA – propazin (engl. *Propazine*)

PRM – prometrin (engl. *Prometryn*)

QQQ – tri kvadrupola (engl. *Triple Quadrupol*)

RSD – relativna standardna devijacija (engl. *Relative standard deviation*)

SBA – sebutilazin (engl. *Sebutylazine*)

SD – standardna devijacija (engl. *Standard deviation*)

SIM – simazin (engl. *Simazine*)

SPE – ekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *Solid-phase extraction*)

TBA – terbutilazin (engl. *Terbutylazine*)

TBR – terbutrin (engl. *Terbutryn*)

TLC – tankoslojna kromatografija (engl. *Thin layer chromatography*)

UPLC – tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti (engl. *Ultrahigh Performance Liquid Chromatography*)

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. R. Loos, J. Wollgast, T. Huber, G. Hanke, Polar herbicides, pharmaceutical products, perfluorooctanesulfonate (PFOS), perfluorooctanoate (PFOA), and nonylphenol and its carboxylates and ethoxylates in surface and tap waters around Lake Maggiore in Northern Italy, *Anal. Bioanal. Chem.* **387** (2007) 1469–1478.
2. S. Fingler, G. Mendaš, M. Dvorščak, S. Stipičević, Ž. Vasilčić, V. Drevenkar, Herbicide micropollutants in surface, ground and drinking waters within and near the area of Zagreb, Croatia, *Environ. Sci. Pollut. Res.* DOI 10 007 (2016) 1–14.
3. M. N. A. El-Ghany Hasaneen, *Herbicides-Mechanisms and mode of action*, InTech, Rijeka, 2011, str. 81–103.
4. V. Pacakova, K. Štulik, J. Jiskra, High-performance separations in the determination of triazine herbicides and their residues, *J. Chromatogr. A* **754** (1996) 17–31.
5. G. Matolcsy, M. Nadasy, V. Andriska, *Pesticide Chemistry*, Elsevier, New York-Tokyo, 1988, str. 652–724.
6. R. Carabias-Martinez, E. Rodriguez-Gonzalo, E. Herrero-Hernandez, F. J. Sanchez-San Roman, M. G. P. Flores, Determination of herbicides and metabolites by solid-phase extraction and liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* **950** (2002) 157–166.
7. B. Šarkanj, D. Kipčić, Đ. Vasić-Rački, F. Delaš, K. Galić, M. Katalenić, N. Dimitrov, T. Klapac, *Kemijske i fizikalne opasnosti u hrani*, HAH, Osijek, 2010, str. 103–104.
8. J. R. Dean, G. Wade, I. J. Barnabas, Determination of triazine herbicides in environmental samples, *J. Chromatogr. A* **733** (1996) 295–335.
9. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Atrazine> (datum pristupa 06. svibnja 2019.)
10. A. D. Carter, Herbicide movement in soils: principles, pathways and processes, *Weed Res.* **40** (2002) 113–122.
11. https://www.chemicalbook.com/ProductCatalog_EN/171116.htm (datum pristupa 07. srpnja 2019.)
12. K. Lanyi, Z. Dinya, Photodegradation study for assessing the environmental fate of some triazine-, urea- and thiolcarbamate-type herbicides, *Microchem. J.* **80** (2005) 79–87.
13. A. Amine-Khodja, A. Boulkamh, P. Boule, Photochemical behaviour of phenylurea herbicides, *Photochem. Photobiol. Sci.* **3** (2004) 145–156.

14. D. M. Stamper, O. H. Tuovinen, Biodegradation of the Acetanilide Herbicides Alachlor, Metolachlor and Propachlor, *Crit. Rev. Microbiol.* **24** (1), (1998) 1–22.
15. <https://www.affinise.com/technology/solid-phase-extraction/> (datum pristupa 10. srpnja 2018.)
16. P. Lucci, Current Trends in Sample Treatment Techniques for Environmental and Food Analysis, Chemical Analysis, Rijeka, 2012, str. 127–164.
17. D. A. Skoog, F. J. Holler, T. A. Nieman, *Principles of Instrumental Analysis*, Philadelphia, 1998.
18. M. Banović, *Analitička kemija*, Školska knjiga, Zagreb, 1999.
19. http://free-zg.t-com.hr/Svjetlana_Luterotti/09/091/09131.htm (datum pristupa 11. srpnja 2019.)
20. N. Galić, *Spektrometrija Masa*, Interna skripta, Zavod za analitičku kemiju, PMF, Sveučilište u Zagrebu, 2004.
21. M. Cindrić, A. Marković, A. Horvatić, Sprengute tehnike tekućinski kromatograf-spektrometar masa: osnove metodologije i primjene, *Med. Flum.* **45** (3), (2009) 218–232.
22. <https://www.eag.com/techniques/mass-spec/lc-ms-ms/> (datum pristupa: 16. srpnja 2019.)
23. V. Ravichadran, S. Shalini, K.M. Sundram, H. Rajak, Validation of analytical methods - strategies and importance, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **2** (2010) 18–22.
24. <http://www.labcompliance.com/tutorial/methods/default.aspx> (datum pristupa 23. srpnja 2019.)
25. W. Funk, V. Damman, G. Donnevert, *Quality Assurance in Analytical Chemistry*, Wiley, 2007.
26. ICH Guidance for Industry, Q2B: Validation of Analytical Procedures: Methodology, International Conference of Harmonization
27. A. Lagana, A. Bacaloni, I. De Leva, A. Faberi, G. Fago, A. Marino, Occurrence and determination of herbicides and their major transformation products in environmental waters, *Anal. Chim. Acta.* **462** (2002) 187–198.
28. W. E. Pereira, C.E. Rostad, T. J. Leiker, Determination of trace levels of herbicides and their degradation products in surface and ground waters by gas chromatography/ion-trap mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta.* **228** (1990) 69–75.

29. V. L. Lanchote, P. S. Bonato, A. L. Cardeira, N. A. G. Santos, D. De Carvalho, M. A. Gomes, HPLC Screening And GC-MS Confirmation of Triazine Herbicides Residues in Drinking Water From Sugar Cane Area in Brazil, *Water Air Soil Pollut.* **118** (2000) 329–337.
30. F. J. Rodriguez-Plasencia, F. Navarro-Villoslada, L.V. Perez-Arribas, M.E. Leon-Gonzalez, L.M. Polo-Diez, Preconcentration of triazine herbicides from water by an ion chromatography column and determination by gas chromatography mass spectrometry, *J. Chromatogr.* **760** (1997) 314–318.
31. J. J. Jimenez, J. L. Bernal, M. J. del Nozal, J.M. Rivera, Determination of pesticide residues in waters from small loughs by solid-phase extraction and combined use of gas chromatography with electron-capture and nitrogen-phosphorus detection and highperformance liquid chromatography with diode array detection, *J. Chromatogr. A* (**778**), (1997) 289–300.
32. C. Cruzeiro, M. A. Pardal, E. Rocha, M. J. Rocha, Occurrence and seasonal loads of pesticides in surface water and suspended particle matter from a wetland of worldwide interest – the Ria Formosa Lagoon, Portugal, *Environ. Monit. Assess.* **187** (**169**), (2015) 1–21.
33. P. Auersperger, K. Lah, J. Kus, J. Marsel, High precision for determination of selected herbicides and their degradation products in drinking water by solid – phase extraction and gas chromatography – mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* (**1088**), (2005) 234–241.
34. M. C. Bruzzoniti, C. Sarzanini, G. Costantino, M. Fungi, Determination of herbicides by solid phase extraction gas chromatography – mass spectrometry in drinking waters, *Anal. Chim. Acta.* **578** (2006) 241–249.
35. A. Asperger, J. Efer, T. Koal, W. Engewald, Trace determination of priority pesticides in water by means of high-speed on-line solid-phase extraction–liquid chromatography–tandem mass spectrometry using turbulent-flow chromatography columns for enrichment and a short monolithic column for fast liquid chromatographic separation, *J. Chromatogr. A* (**960**), (2002) 109–119.
36. N. Rodríguez-González, R. Uzal-Varela, M.J. González-Castro, S. Muniategui-Lorenzo, E. Beceiro González, Reliable methods for determination of triazine herbicides and their degradation products in seawater and marine sediments using liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Environ. Sci. Pollut. Res.* **24** (2017) 7764–7775.

37. R. Carabias-Martinez, E. Rodriguez-Gonzalo, E. Herrero-Hernández, J. Hernández-Méndez, Simultaneous determination of phenyl- and sulfonylurea herbicides in water by solid-phase extraction and liquid chromatography with UV diode array or mass spectrometric detection, *Anal. Chim. Acta.* **517** (2004) 71–79.
38. N. Mazzella, F. Delmas, B. Delest, B. Mechin, C. Madigou, J. P. Allenou, R. Gabellec, T. Caquet, Investigation of the matrix effects on a HPLC-ESI-MS/MS method and application for monitoring triazine, phenylurea and chloroacetanilide concentrations in fresh and estuarine waters, *J. Environ. Monit.* **11** (2009) 108–115.
39. N. Rodríguez-González, E. Beceiro-González, M.J. González-Castro, M.F. Alpendurada, On-line solid-phase extraction method for determination of triazine herbicides and degradation products in seawater by ultra-pressure liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* (**1470**), (2016) 33–41.
40. D. Chen, Y. Zhang, H. Miao, Y. Zhao, Y. Wu, Determination of Triazine Herbicides in Drinking Water by Dispersive Micro Solid Phase Extraction with Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography–High-Resolution Mass Spectrometric Detection, *J. Agric. Food Chem.* **63** (44), (2015) 9855–9862.
41. E. Beceiro-Gonzalez, M. J. Gonzalez-Castro, R. Pouso-Blanco, S. Muniategui-Lorenzo, P. Lopez-Mahia, D. Prada-Rodriguez, A simple method for simultaneous determination of nine triazines in drinking water, *Green. Chem. Lett. Rev.* **7** (3), (2014) 271–277.
42. M. I. Acedo-Valenzuela, T. Galeano-Diaz, N. Mora-Diez, A. Silva-Rodriguez, Determination of neutral and cationic herbicides in water by micellar electrokinetic capillary chromatography, *Anal. Chim. Acta.* **519** (2004) 65–71.
43. E. Turiel, P. Fernandez, C. Perez-Conde, C. Camara, Trace-level determination of triazines and several degradation products in environmental waters by disk solid-phase extraction and micellar electrokinetic chromatography, *J. Chromatogr. A* (**872**), (2000) 299–307.
44. X. Song, H. Li, H. M. Al, Q. M. Lin, Detection of herbicides in drinking water by surface-enhanced Raman spectroscopy coupled with gold nanostructures, *J. Food Meas. Charact.* **7** (3), (2013) 107–113.
45. E. Stavra, P. S. Petrou, G. Koukouvinos, C. Kiritsis, I. Pirmettis, M. Papadopoulos, D. Goustouridis, A. Economou, K. Misiakos, I. Raptis, S.E. Kakabakos, Simultaneous determination of paraquat and atrazine in water samples with a white light reflectance spectroscopy biosensor, *J. Hazard. Mater.*, **359** (2018) 67–75.

46. Herrero-Hernandez, M. S. Andrades, A. Alvarez-Martin, E. Pose-Juan, M. S. Rodriguez-Cruz, M. J. Sanchez-Martin, Occurrence of pesticides and some of their degradation products in waters in a Spain wine region, *J. Hydrol.* **486** (2013) 234–245.
47. G. Allinson, A. Bui, P. Zhang, G. Rose, A. M. Wightwick, M. Allinson, V. Pettigrove, Investigation of 10 herbicides in surface waters of a horticultural production catchment in Southeastern Australia, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **67** (3), (2014) 358–373.
48. W. A. Battaglin, E. M. Thurman, S. J. Kalkhoff, S. D. Porter, Herbicides and transformation products in surface waters of the Midwestern United States, *J. Am. Water Resour. As.* **39** (4), (2003) 743–756.
49. Y. Peng, W. Fang, M. Krauss, W. Brack, Z. Wang, F. Li, X. Zhang, Screening hundreds of emerging organic pollutants (EPOs) in surface water from the Yangtze River Delta (YRD): Occurrence, distribution, ecological risk, *Environ. Pollut.*, **241** (2018) 484–493.
50. V. Drevenkar, S. Fingler, G. Mendaš, S. Stipičević, V. Vasilić, Levels of atrazine and simazine in waters in the rural and urban areas of North-West Croatia, *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* **84** (2004) 207–216.
51. S. Maggioni, P. Balaguer, C. Chiozzotto, E. Benfenati, Screening of endocrine-disrupting phenols, herbicides, steroid estrogens, and estrogenicity in drinking water from the waterworks of 35 Italian cities and from PET-bottled mineral water, *Environ. Sci. Pollu. Res.* **20** (2013) 1649–1660.
52. T. Bohn, E. Cocco, L. Gourdot, C. Guignard, L. Hoffmann, Determination of atrazine and degradation products in Luxembourgish drinking water: origin and fate of potential endocrine-disrupting pesticides, *Food Addit. Contam.* **28** (8), (2011) 1041–1054.
53. J. M. Montiel-Leon, S. V. Duy, G. Munoz, M. F. Bouchard, M. Amyot, S. Sauve, Quality survey and spatiotemporal variations of atrazine and desethylatrazine in drinking water in Quebec, Canada, *Sci. Total. Environ.* **671** (2019) 578–585.
54. S. Balakrishnan, K. Takeda, H. Sakugawa, Occurrence of Diuron and Irgarol in seawater, sediments and planktons of Seto Inland Sea, Japan, *Geochem. J.* **46** (2012) 169–177.
55. K. Vorkamp, R. Bossi, K. Bester, U. E. Bollmann, S. Boutrup, New priority substances of the European Water Framework Directive: Biocides, pesticides and brominated flame retardants in the aquatic environment of Denmark, *Sci. Total. Environ.* **470** (471), (2014) 459–468.

56. M. Kock-Schulmeyer, C. Postigo, M. Farre, D. Barcelo, M. Lopez de Alda, Medium to highly polar pesticides in seawater: Analysis and fate in coastal areas of Catalonia (NE Spain), *Chemosphere*, **215** (2019) 515–523.
57. C. Mai, N. Theobald, G. Lammel, H. Huhnerfuss, Spatial, seasonal and vertical distributions of currently-used pesticides in the marine boundary layer of the North Sea, *Atmos. Environ.* **75** (2013) 92–102.
58. SANTE/11813/2017, Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed, Europska komisija, 2015.
59. Z. Ostojić, Problemi atrazina u svijetu i Republici Hrvatskoj, *Glasnik zaštite bilja*, (2000) 46–48.
60. D. Vonberg, J. Vanderborght, N. Cremer, T. Pütz, M. Herbst, H. Vereecken, 20 years of long-term atrazine monitoring in a shallow aquifer in western Germany, *Water Res.* **50** (2014) 294–306.
61. WHO/HSE/WSH/10.01/11/Rev/1, Atrazine and Its Metabolites in Drinking-water, Background document for development of WHO *Guidelines for Drinking-water Quality*, 2011.
62. R. Brix, N. Bahi, M. J. Lopez de Alda, M. Farre, J. M. Fernandez, D. Barcelo, Identification of disinfection by-products of selected triazines in drinking water by LC-Q-ToF-MS/MS and evaluation of their toxicity, *J. Mass Spectro.* **44** (2009) 330–337.
63. S. J. Lambert, K. V. Thomas, A. J. Davy, Assessment of the risk posed by the antifouling booster biocides Irgarol 1051 and diuron to freshwater macrophytes, *Chemosphere* **63** (2006) 734–743.

§ 8. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Ena Jusup

Datum rođenja: 07. 02. 1995.

Mjesto rođenja: Virovitica

Obrazovanje

2002.–2010. Osnovna škola Josip Kozarac, Slatina

2010.–2014. Gimnazija Petra Preradovića, Virovitica

2014.–2017. Preddiplomski studij kemije, Odjel za kemiju, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

2017.–2020. Diplomski studij kemije, Prirodoslovno matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2017. Dani otvorenih vrata na Odjelu za kemiju u Osijeku