



UNIVERZITET U NOVOM SADU
TEHNOLOŠKI FAKULTET



Nada L. Grahovac, dipl. inž. tehnologije – master

**Praćenje ostataka sulfonilurea u zemljištu u
realnim uslovima primenom visoko-pritisne tečne
hromatografije**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Novi Sad, 2016. godina

**UNIVERZITET U NOVOM SADU
TEHNOLOŠKI FAKULTET**

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada: VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Nada L. Grahovac, dipl. inž.tehnologije– master
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Dr Zvonimir Suturović, redovni profesor
Naslov rada: NR	Praćenje ostataka sulfonilurea u zemljištu u realnim uslovima primenom visoko-pritisne tečne hromatografije
Jezik publikacije: JP	Srpski (latinica)
Jezik izvoda: JI	Srpski / Engleski
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	AP Vojvodina
Godina: GO	2016.
Izdavač: IZ	Tekst autora
Mesto i adresa: MA	21 000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1

Fizički opis rada: FO	7 poglavlja / 161 stranica / 54 slike / 34 tabele / 299 literaturna navoda)
Naučna oblast: NO	Tehnološko inženjerstvo
Naučna disciplina: ND	Prehrambeno inženjerstvo
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	Tečna hromatografija, mikrotalasna ekstrakcija, sulfonilurea herbicidi, zemljište, disipacija
UDK	
Čuva se: ČU	U biblioteci Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, 21000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1
Važna napomena: VN	-
Izvod: IZ	<p>U okviru doktorske disertacije razvijena je brza i selektivna metoda za određivanje i praćenje ostataka herbicida na bazi sulfonilurea (nikosulfuron, oksasulfuron, tribenuron metil, tritosulfuron, triasulfuron, rimsulfuron i prosulfuron) u zemljištu primenom visoko pritisne tečne hromatografije sa UV detektor sa nizom fotoosetljivih dioda (HPLC-UV-DAD). Razdvajanje sulfonilurea je izvedeno uz primenu Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ kolone. U cilju definisanja odgovarajućih uslova analize, ispitan je i definisan uticaj najznačajnijih eksperimentalnih faktora. Usvojeni su sledeći optimalni uslovi gradijentne elucije: mobilna faza acetonitril (A) i 0,1% sirćetna kiselina (B) t = 0 min, 52% A; t = 2-2,5 min, 47% A; t = 2,5-5 min, 52% A, pri konstatnom protoku od 1 mL min⁻¹ i temperaturi kolone od 25^oC. Na osnovu odziva analitičkog signala, njegove reproduktivnosti i linearnosti, talasna dužina od 240 nm je usvojena kao odgovarajuća. Utvrđeno je da je uticaj matriksa bio izražen te je stoga za kvantitativno određivanje sadržaja SU u uzorcima zemljišta primenom HPLC-UV-DAD metode korišćena MMC kalibraciona kriva. Pri analizi ekstrakata nekontaminiranog zemljišta ostvarena je granica kvantitativnog određivanja za nikosulfuron, oksasulfuron, tribenuron metil, tritosulfuron, triasulfuron, rimsulfuron i prosulfuron od 3,16 µg kg⁻¹, 3,40 µg kg⁻¹, 3,76 µg kg⁻¹, 4,13 µg kg⁻¹, 3,60 µg kg⁻¹, 3,04 µg kg⁻¹ i 2,97 µg kg⁻¹, redom. Za potrebe osetljivijih, selektivnijih i tačnijih određivanja SU u zemljištu, definisana je metoda uz primenu tečne hromatografije sa tandemskom masenom spektrometrijom (HPLC-MS-MS). HPLC-MS-MS je korišćena kao referentna tehnika za proveru rezultata koji su dobijeni primenom HPLC uz UV-DAD detektor. Definisan je efikasan postupak za pripremu uzoraka zemljišta u cilju hromatografskog određivanja SU. Najefikasnija ekstrakcija ostvarena je primenom smeše dihlormetan-acetonitril (2:1, v/v), zakišeljene sirćetnom kiselinom (0,8%, v/v), uz dodatak uree (0,3 g/ 10g zemljišta). Postupak mikrotalasne ekstrakcije u zatvorenom sistemu omogućio je najbolje uslove za ekstrakciju SU. U cilju izdvajanja SU, iz matriksa ekstrakata zemljišta, primenjena je ekstrakcija na čvrstoj fazi</p>

	<p>(SPE) sa silika gelom kao adsorbensom. Definisana metoda za određivanje ispitivanih SU, kao i razvijeni postupak pripreme uzoraka, uspešno je primenjen u analizi realnih uzoraka zemljišta. Veoma dobre vrednosti testa povrata ostvarene pri analizi primenom HPLC-UV-DAD metode, potvrdile su pre svega ispravnost postupka pripreme uzoraka, a delom i kompletne metode. Tačnost razvijene metode za određivanje SU u zemljištu potvrđena je paralelnim analizama uzoraka zemljišta korišćenjem HPLC-MS-MS. Primenom Studentovog <i>t</i>-testa (upareni), utvrđeno je da se rezultati paralelnih analiza statistički značajno ne razlikuju ($P=95\%$). Istraživanja u okviru disertacije obuhvatila su i praćenje disipacije nikosulfurona, rimsulfurona, oksasulfurona i prosulfurona u različitim komercijalnim dozama primene tokom 50 dana u polju na tri različite dubine (0-15 cm, 15-30 cm i 30-45 cm), kao i laboratorijskim uslovima na dve temperature (25°C i 30°C). Vreme polurazgradnje (DT_{50}) ispitivanih SU (nikosulfuron, oksasulfuron i prosulfuron) definisano Mittag-Lefler-ovom funkcijom u ogleđima u laboratorijskim uslovima na 25°C iznosilo je 0,65 dana ($50\text{ g ha}^{-1}\text{ a.k.}$), 0,64 dana ($160\text{ g ha}^{-1}\text{ a.k.}$) i 0,66 dana ($30\text{ g ha}^{-1}\text{ a.k.}$), redom, a na 30°C za nikosulfuron 0,20 dana ($50\text{ g ha}^{-1}\text{ a.k.}$) i prosulfuron 0,49 dana ($50\text{ g ha}^{-1}\text{ a.k.}$). DT_{50} za ispitivane SU u polju, takođe definisano Mittag-Lefler-ovom funkcijom, iznosilo je 72 minuta (0,05 dana), 0,23 dana, 0,12 dana i 0,15 dana, za nikosulfuron, rimsulfuron, oksasulfuron i prosulfuron, redom. Značajno veća disipacija koja je utvrđena istraživanjima u okviru ove disertacije najverovatnije je uzrokovana uticajem abiotičkih i biotičkih procesa, kao i faktora spoljašnje sredine.</p>
Datum prihvatanja teme od strane Senata: DP	22.10.2015.
Datum odbrane: DO	
Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO	predsednik: dr Snežana Kravić, docent, Tehnološki fakultet Novi Sad, Univerzitet u Novom Sadu mentor: dr Zvonimir Suturović, redovni profesor, Tehnološki fakultet Novi Sad, Univerzitet u Novom Sadu član: dr Ankica Kondić Špika, naučni savetnik, Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad

**UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF TECHNOLOGY**

KEY WORDS DOCUMENTATION

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monographic documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD Thesis
Author: AU	MSc Nada Grahovac
Mentor: MN	Dr Zvonimir Suturović, Full professor
Title: TI	Monitoring of residues of sulfonylurea in soil under real conditions by using high pressure liquid chromatography
Language of text: LT	Serbian, latin
Language of abstract: LA	Serbian / English
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	AP Vojvodina
Publication year: PY	2016
Publisher: PU	Author's reprint
Publication place: PP	Serbia, 21000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1
Physical description: PD	7 chapters, 161 pages, 54 figures, 34 tables, 299 references
Scientific field SF	Technological engineering
Scientific discipline SD	Food engineering

Subject, Key words SKW	Liquid chromatography, microwave extraction, sulfonylurea herbicides, soil, dissipation
UC	
Holding data: HD	Library of Faculty of Technology, 21000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1, Serbia
Note: N	-
Abstract: AB	<p>In this thesis a fast and selective method for determination and monitoring of residues sulfonylurea herbicides (SU) (nicosulfuron, oxasulfuron, tribenuron methyl, tritosulfuron, triasulfuron, rimsulfuron and prosulfuron) in soil, by applying high-performance liquid chromatography with UV detector with diode array diodes (HPLC-UV-DAD) was developed. The separation of the sulfonylurea was performed by use of a Zorbax Eclipse XDB-C18 column. In order to define appropriate conditions of analysis, the influence of the most significant the experimental factors was investigated and defined. The following optimal conditions for gradient elution: mobile phase acetonitrile (A) and 0.1% acetic acid (B) $t = 0$ min, 52% A; $t = 2-2.5$ min, 47% A; $t = 2.5-5$ min, 52% A were adopted at a constant flow rate of 1 mL min^{-1} and column temperature of 25°C. On basis of the response of the analytical signal, its reproducibility and linearity, the wavelength of 240 nm was adopted as an appropriate. The influence of the matrix was expressed and therefore for the quantitative determination of investigated SU in soil samples application of HPLC-UV-DAD methods was used MMC calibration curve. In the analysis of extracts of nocontaminated soil limits of quantitation for nicosulfuron, oxasulfuron, tribenuron methyl, tritosulfuron, triasulfuron, rimsulfuron and prosulfuron was achieved $3.16 \mu\text{g kg}^{-1}$, $3.40 \mu\text{g kg}^{-1}$, $3.76 \mu\text{g kg}^{-1}$, $4.13 \mu\text{g kg}^{-1}$, $3.60 \mu\text{g kg}^{-1}$, $3.04 \mu\text{g kg}^{-1}$ and $2.97 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectively. The method by using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS-MS) was defined in order to find more sensitive, more selective and more accurate way to determine concentration SU in soil. HPLC-MS-MS was used as the reference technique for checking results that have been obtained by HPLC with UV-DAD detector. An efficient procedure preparation of soil samples for the purpose chromatographic determination of SU was defined. Using a mixture of dichloromethane-acetonitrile (2: 1, v / v), acidified with acetic acid (0.8%, v / v), with the addition of urea (0.3 g / 10 g soil) was applied as the most effective way for extraction SU. Microwave extraction process in a closed system allowed the best conditions for the extraction of SU. In order to extract SU from matrix extracts soil the solid phase the extraction (SPE) with silica gel as an adsorbent was used. The defined method for determination of investigated</p>

	<p>SU, as well as the developed procedure of sample preparation, was successfully applied in the analysis of real samples of soil. The correctness of procedure of sample preparation was confirmed with very good values of recovery test which was applied in the analysis by using HPLC-UV-DAD. The accuracy of the developed method for determination of SU was confirmed by coupled analysis soil samples using HPLC-MS-MS. The results of parallel analysis does not differ significantly at 95% confidence level. It was obtained using Student <i>t</i>-test (paired). The method developed in this thesis was used for monitoring the dissipation of nicosulfuron, rimsulfuron, oxasulfuron prosulfuron, in different commercial doses of application during 50 days in field at three different depths (0-15 cm, 15-30 cm and 30-45 cm) and for laboratory conditions at two temperatures (25°C and 30°C). The half-life time (DT₅₀) of investigated SU were calculated by use of Mittag-Lefler function in experiments under laboratory conditions at 25°C. The values of DT₅₀ for nicosulfuron, prosulfuron and oxasulfuron read: 0.65 days (50 g ha⁻¹ a.k.), 0.64 days (160 g ha⁻¹ a.k.) and 0.66 days (30 g ha⁻¹ a.k.), respectively. In the same type of experiments at 30°C we get DT₅₀ for nicosulfuron equals 0.20 days (50 g ha⁻¹ a.k.) and for prosulfuron equals 0.49 days (50 g ha⁻¹ a.k.). The values of DT₅₀ on experiments in field were obtain also by use of Mittag-Lefler's function, and half-life times for nicosulfuron, rimsulfuron, oxasulfuron and prosulfuron from the commercially recommended doses, equal 72 minutes (0.05 days), 0.23 days, 0.12 days and 0.15 days, respectively. Significantly greater dissipation which was determined in this thesis was probably caused by the influence of abiotic and biotic processes as well as environmental factors.</p>
Accepted on Senate on: AS	October 22, 2015
Defended: DE	
Thesis Defend Board: DB	<p>president: dr Snežana Kravić, Assistant professor, Faculty of Technology Novi Sad, University of Novi Sad</p> <p>mentor: dr Zvonimir Suturović, Full professor, Faculty of Technology Novi Sad, University of Novi Sad</p> <p>member: dr Ankica Kondić-Špika, Principal research fellow, Institute of Field and Vegetable Crops, Novi Sad</p>

Sadržaj

1. Uvod	1
2. Teorijski deo	4
2.1. Pesticidi i njihova klasifikacija.....	4
2.2. Parametri i procesi koji određuju sudbinu pesticida u zemljištu.....	7
2.2.1. Rastvorljivost pesticida.....	7
2.2.2. Kisela jonizaciona konstanta pesticida (pK_a).....	8
2.2.3. Postojanost pesticida.....	9
2.2.3.1. Matematički model koji opisuje disipaciju pesticida u zemljištu.....	10
2.2.4. Adsorpcija-desorpcija.....	13
2.2.4.1. Jednačina raspodele.....	16
2.2.5. Karakteristike zemljišta.....	17
2.2.6. Mobilnost pesticida u zemljištu.....	20
2.2.7. Transformacija pesticida.....	23
2.2.7.1. Hemijska i mikrobiološka degradacija pesticida.....	24
2.2.7.2. Fotodegradacija pesticida.....	27
2.3. Herbicidi.....	27
2.4. Sulfoniluree.....	30
2.4.1. Nikosulfuron.....	34
2.4.2. Rimsulfuron.....	36
2.4.3. Prosulfuron.....	38
2.4.4. Oksasulfuron.....	40
2.5. Uticaj sulfonilurea herbicida na plodored i životnu sredinu.....	41
2.6. Zakonska regulativa.....	42
2.7. Metodologija određivanja sulfonilurea herbicida u zemljištu.....	45
2.7.1. Priprema uzoraka za analizu.....	47
2.7.1.1. Mikrotalasna ekstrakcija.....	48
2.7.2. Imunohemijske metode.....	50
2.7.3. Elektrohemijske metode.....	50
2.7.4. Kapilarna elektroforeza.....	51

2.7.5. Hromatografske metode.....	52
2.7.5.1. Teorijske osnove hromatografije.....	52
2.7.5.2. Mehanizmi razdvajanja.....	59
2.7.5.3. Tečna hromatografija visokih performansi.....	60
2.7.5.3.1. Karakteristike hromatografske kolone.....	62
2.7.5.3.2. Detektori.....	64
2.7.5.4. Sprega tečne hromatografije i masene spektrometrije.....	71
2.7.5.5. Određivanje SU primenom gasne hromatografije.....	72
2.7.5.6. Određivanje SU primenom tečne hromatografije.....	72
3. Cilj istraživanja.....	74
4. Eksperimentalni deo.....	76
4.1. Aparati i pribor.....	76
4.2. Hemikalije i rastvori.....	78
4.3. Uzorci.....	79
4.3.1. Ogled u laboratoriji.....	79
4.3.2. Ogled u polju.....	80
4.3.3. Određivanje fizičko-hemijskih karakteristika zemljišta.....	83
4.3.4. Priprema uzoraka.....	83
4.3.4.1. Ekstrakcija odabranih SU.....	83
4.3.4.2. Prečišćavanje ekstrakta zemljišta primenom ekstrakcije na čvrstoj fazi...84	
4.4. Uslovi rada HPLC-UV-DAD za određivanje odabranih sulfonilurea.....	86
4.5. Uslovi rada HPLC-MS-MS za određivanje odabranih sulfonilurea.....	86
4.6. Određivanje sulfonilurea u uzorcima zemljišta.....	87
4.7. Definisane tačnosti razvijene metode i ispravnosti postupka pripreme uzoraka.....	88
4.8. Određivanje granice detekcije i granice kvantifikacije odabranih sulfonilurea.....	89
4.9. Utvrđivanje ispravnosti metode HPLC-UV-DAD za kvalitativnu i kvantitativnu analizu ostataka ispitivanih sulfonilurea u zemljištu.....	90
5. Rezultati i diskusija.....	91
5.1. Fizičko-hemijske osobine uzorka zemljišta.....	91
5.2. Definisane optimalnih uslova HPLC-UV-DAD za određivanje odabranih SU.....	92

5.2.1. Uticaj sastava rastvarača.....	93
5.2.2. Izbor talasne dužine.....	93
5.2.3. Uticaj gradijentne elucije.....	99
5.2.4. Uticaj koncentracije sulfoniluree na analitički signal.....	102
5.2.5. Granica detekcije i granica kvantifikacije.....	104
5.2.6. Uticaj matriksa na analitički signal.....	105
5.2.7. Ispitivanje tačnosti definisane metode.....	105
5.3. Definisanje optimalnih uslova rada visoko-pritisne tečne hromatografije sa MS-MS detektorom za određivanje sadržaja odabranih sulfonilurea.....	106
5.3.1. Optimizacija MS-MS parametara.....	106
5.3.2. Linearnost odziva detektora, granica detekcije i granica kvantifikacije za HPLC- MS-MS.....	111
5.4. Definisanje postupka pripreme uzoraka zemljišta.....	113
5.4.1. Optimizacija uslova ekstrakcije.....	113
5.4.1.1. Uticaj smeše rastvarača na mikrotalasnu i ultrazvučnu ekstrakciju.....	113
5.4.1.2. Uticaj temperature ekstrakcije na mikrotalasnu ekstrakciju.....	118
5.4.1.3. Uticaj odnosa rastvarača i ispitivanog materijala na efikasnost ekstrakcije.....	118
5.4.1.4. Uticaj vremena na efikasnost mikrotalasne ekstrakcije.....	119
5.4.2. Ispitivanje mogućnosti primene ekstrakcije na čvrstoj fazi (SPE) u cilju prečišćavanja ekstrakata zemljišta.....	121
5.5. Određivanje sadržaja ispitivanih SU u predhodno tretiranom zemljištu sa odgovarajućim formulacijama herbicida	124
5.6. Disipacija ispitivanih SU u zemljištu.....	131
6. Zaključci.....	137
7. Literatura.....	140

1. Uvod

Prema podacima Ujedinjenih Nacija u narednih 50 godina očekuje se nagli porast broja stanovnika na Zemlji, koji bi prema prognozama, do 2050. godine mogao iznositi oko 9,3 milijarde (United Nations - Population Division, 2011). S obzirom da će to uzrokovati i značajno povećanje zahteva za hranom, predviđa se pretvaranje oko 10^9 hektara prirodnih ekosistema u poljoprivredno zemljište. Povećanje proizvodnje hrane će biti moguće postići samo kroz izvođenje održive poljoprivredne prakse koja podrazumeva smanjenje degradacije životne sredine uz očuvanje prirodnih resursa u cilju zadržavanja visokih prinosa. Smanjena upotreba pesticida, jedan je od temelja održive poljoprivrede i razvoja (FAO, 2002). Savremena intenzivna poljoprivredna proizvodnja zahteva visok stepen upotrebe različitih sredstava za zaštitu biljaka. Međutim, usled intenzivne primene, pesticidi se danas neretko u značajnim količinama nalaze u životnoj sredini, a naročito u zemljištu što predstavlja ozbiljan problem. Stroge kriterijume u pogledu proizvodnje zdravstveno bezbedne hrane i zaštite životne sredine može da zadovoljiti samo racionalna upotreba pesticida. Pored toga, uz sve prednosti koje nam pružaju, pesticidi imaju i čitav niz nedostataka. Ostaci pesticida u zemljištu, vodi, vazduhu i hrani mogu rezultovati štetnim efektima po ljudsko zdravlje i životnu sredinu. Pesticidi koji se primenjuju direktno na zemljište, mogu dospeti do površinskih voda, isprati se u dublje slojeve zemljišta i na taj način dospeti u podzemnu vodu. Negativne posledice intenzivne primene pesticida, a pre svega herbicida, osim po zdravlje ljudi, ogledaju se i u pojavi rezistentnih biotipova. Perzistentni pesticidi u zemljištu mogu prouzrokovati oštećenja narednih useva u plodoredu (fitotoksičnost), a posebno u slučaju predoziranja. Takođe, ostaci nekih herbicida primenjenih u predusevu, mogu pojačati fitotoksičnost herbicida u narednom usevu. Zagađenje zemljišta pesticidima predstavlja problem koji zahteva njihovo sistematsko praćenje.

Otkriće sulfonilurea (SU) označilo je početak nove ere u tehnologiji hemijskog suzbijanja jednogodišnjih i višegodišnjih, širokolisnih i uskolisnih vrsta korova. Herbicidi iz grupe SU su snažni inhibitori acetolaktat sintetaze (eng. acetolactate synthase, ALS), ključnog enzima koji učestvuje u biosintezi amino-kiselina sa razgranatim alifatičnim nizom u biljkama. Ova jedinjenja

su veoma brzo prihvaćena, pre svega zbog njihove efikasnosti. Naime, njihova količina primene je i do hiljadu puta manja (g ha^{-1}), u odnosu na ranije herbicide, što je dovelo do smanjenja količine primene herbicida za useve. Osim toga, njihova primena u suzbijanju korova se povećala zbog širokog spektra delovanja i široke mogućnosti primene. U odnosu na druge herbicide SU su ekološki bezbedniji zbog niže koncentracije primene. Kada je u pitanju njihova toksičnost, potvrđeno je da se ne ubrajaju u mutagena i teratogena jedinjenja, pokazuju slabu toksičnost za pčele, domaće i divlje životinje (Mitić & Kecman, 2010).

Savremeni trendovi u oblasti kontrole zemljišta i bezbednosti osetljivih useva na ostatke SU ističu značaj određivanja tragova supstanci koji mogu izazvati nepoželjne efekte. Sulfonilurea herbicidi pripadaju ovoj grupi supstanci, jer su fitotoksični i hronična izloženost čak i niskom nivou ostataka ovih pesticida može nepovoljno uticati na rast osetljivih useva. Eksperimenti su pokazali da postoji ekstremna osetljivost leguminoza na sulfoniluree zbog produžene postojanosti istih u zemljištu, što potvrđuje i praksa. Ova grupa herbicida zbog povećane upotrebe i polarne prirode jedinjenja predstavlja potencijalni kontaminant podzemnih voda. Zagađenje podzemnih voda SU predstavlja potencijalni problem zbog mogućeg ograničenja upotrebe pijaće vode (Perreau i sar. 2007; Niu i sar. 2009; Fenoll i sar. 2012). Poseban problem predstavljaju ostaci SU u površinskoj vodi, jer male doze primene ne umanjuju rizik za vodene biljke i alge. Na primer, količine SU herbicida iznad $3 \mu\text{g L}^{-1}$ su veoma toksične za neke mikroalge i perifitonske zajednice (Peterson i sar. 1994; Fahl i sar. 1995). U cilju prevencije fitotoksičnih efekata, kao i posledica koje mogu izazvati svojim kretanjem do podzemne, odnosno površinske vode, neophodna je njihova kontrola u smislu kvalitativnog i kvantitativnog određivanja u zemljištu. S obzirom na to da se radi o kompleksnom matriksu i da su od značaja veoma male koncentracije analita, posebna pažnja se mora posvetiti postupku pripreme uzoraka. Potreba za određivanjem i praćenjem sadržaja SU u zemljištu, analitičarima nameće zadatak za razvoj brze, tačne, reproduktivne i osetljive metode. Dodatni problem predstavlja istovremeno praćenje više SU herbicida koji imaju slične strukture kao i hemijsku i termičku nestabilnost u uzorcima životne sredine. Zbog toga je neophodno da analitičke metode poseduju i visoku selektivnost.

Interesovanje za prisustvo SU u zemljištu i njihove moguće toksične efekte za osetljive useve koji se smenjuju su doveli do razvoja velikog broja različitih metoda. Danas se u ove svrhe koriste analitičke tehnike, kao što su tečna hromatografija visokih performansi (eng. high performance (pressure) liquid chromatography, HPLC), kapilarna elektroforeza, polarografija i

voltometrija. Hromatografske tehnike pružaju niz prednosti kao što su velika osetljivost, velika moć razdvajanja pikova (rezolucija) i relativno jednostavna priprema uzoraka za analizu.

Najčešći postupak određivanja ostataka SU u zemljištu podrazumeva korišćenje HPLC tehnike, a faze u tom postupku su sledeće: ekstrakcija SU iz uzoraka zemljišta, prečišćavanje analita od interesa korišćenjem pogodnog sorbenta i određivanje SU izabranom tehnikom. Svaki od ovih koraka zahteva veliku pažnju analitičara zbog uticaja velikog broja faktora na ekstrakciju i prečišćavanje analita, kao i podešavanje različitih parametara za njihovo izvođenje i interpretaciju rezultata.

Priprema uzorka za analizu je kritičan deo u svakom analitičkom postupku. Pri razvoju odgovarajućeg postupka pripreme uzoraka neophodno je da primenjena tehnika omogući kvantitativno izolovanje analita iz matriksa uzorka. Ekstrakcija SU se izvodi uz primenu rastvora različitih pufera ili organskih rastvarača u zavisnosti od karakteristika samog uzorka, kao i zahteva same analize. Osnovni nedostatak najčešće primenjivanih klasičnih ekstrakcionih tehnika, ekstrakcija uz intenzivno mućkanje i ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, su dugo vreme izvođenja ekstrakcije i mogućnost razgradnje analita. Stoga se sve više ispituje mogućnost primene novih, efikasnijih, brzih metoda ekstrakcije uz upotrebu manje količine rastvarača, kao što su ekstrakcija jonskim tečnostima i ekstrakcija organskim rastvaračima u zatvorenim sistemima potpomognuta mikrotalasima. U cilju dobijanja što čistijeg ekstrakta zemljišta, teži se primeni metode ekstrakcije koja bi omogućila dobijanje analita od interesa sa što manje interferirajućih supstanci iz uzorka.

Ispitivanja koja se predviđaju u ovoj disertaciji treba da doprinesu donošenju odgovarajućih regulativa u našoj zemlji u smislu maksimalno dozvoljenih količina SU u zemljištu. Zbog toga je neophodno razviti metodu koja bi bila dovoljno osetljiva i selektivna, ali i brza i relativno jednostavna kako bi se mogla primeniti za određivanje i praćenje sadržaja SU u velikom broju uzoraka zemljišta, svakako uz odgovarajuću tačnost.

2. Teorijski deo

2.1. Pesticidi i njihova klasifikacija

Prva generacija pesticida uključuje korišćenje visoko toksičnih, neorganskih jedinjenja, a prvi poznati pesticid koji se koristio bio je sumpor. Do 15. veka za suzbijanje štetočina u usevima korišćene su toksične hemikalije kao što je arsen (kalcijum arsenat, olovo arsenat), živa i olovo (Tuzimski & Sherma, 2015). Brojni podaci ukazuju na upotrebu nikotina, rotenoida, piretrina, petroleja i cijanovodične kiseline u tom periodu. Druga generacija pesticida uključuje korišćenje sintetičkih organskih jedinjenja. Prvi važan sintetički organski pesticid bio je dihlor-difenil-trihlorektan (DDT), prvi put sintetizovan 1873. godine od strane nemačkog naučnika Othmar Zeidler (Zeidler, 1874), a njegove insekticidne efekte 1939. godine je otkrio švajcarski hemičar Paul Hermann Müller (<http://www.britannica.com>). Otkriće DDT imalo je veliki uticaj na kontrolu štetočina i ubrzo je širom sveta našao veliku upotrebu zbog širokog spektra delovanja, istrajnosti i jednostavnog nanošenja (Keneth, 1992).

Prema FAO (FAO, 1986), pesticidi predstavljaju supstancu ili mešavinu supstanci namenjenih za sprečavanje, uništavanje ili kontrolu štetočina, uključujući i vektore humanih i animalnih bolesti, prouzrokovaoče biljnih bolesti gljivičnog, bakterijskog i virusnog porekla, kao i neželjene vrste biljaka (korova), koji izazivaju štetu u vreme vegetacije, proizvodnje, prerade, skladištenja ili transporta poljoprivrednih kultura i životnih namirnica. Za pesticide u poljoprivrednoj proizvodnji koristi se naziv sredstva za zaštitu bilja. U Republici Srbiji (RS) primena sredstava za zaštitu bilja u poljoprivredi i šumarstvu, njihova registracija, kontrola, promet i uvoz regulisani su Zakonom o sredstvima za zaštitu bilja (Službeni glasnik RS, 41, 2009). Do sada na tržištu Evropske unije (EU) registrovan je 1331 pesticid (EU Pesticides database, 2015), dok je prema izveštaju Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede RS iz 2015. godine u našoj zemlji u prometu 246 pesticidnih aktivnih materija, sadržanih u 990 preparata, među kojima su najbrojniji herbicidi, zatim fungicidi, i na kraju insekticidi (Biljni lekar, 2015).

Pesticidi se mogu klasifikovati prema nameni, hemijskoj strukturi, načinu prodiranja u organizam i mehanizmu delovanja. U tabeli 2.1 je prikazana podela pesticida prema nameni (Tuzimski & Sherma, 2015). Upotreba pesticida je postala potrebna u cilju poboljšanja poljoprivredne produktivnosti, neophodne zbog rasta svetske populacije, a njihovi ostaci u hrani, usevima i zemljištu predstavljaju jedan od vodećih problema u svetu (Rice i sar., 2007).

Zbog dugotrajnog korišćenja u poljoprivredi dosta napora se ulaže na smanjenje mogućih štetnih uticaja na životnu sredinu i opšte zdravlje populacije zbog čega je došlo do znatne revizije regulativa koje određuju maksimalno dozvoljene količine (MDK) u smislu smanjenja ostataka pesticida u namirnicama i proširenja liste sa drugim pesticidima (EU Pesticides database, 2015).

Tabela 2.1. Podela pesticida prema nameni

Grupa pesticida	Namena
Akaricidi	suzbijanje štetnih grinja
Algicidi	uništavanje algi
Arboricidi	uništavanje drvenastih biljaka
Atraktanti	privlačenje štetočina
Baktericidi	uništavanje bakterija
Desikanti	sušenje biljaka pre berbe
Defolijanti	opadanje lišća biljaka
Fumiganti	suzbijanje insekata i drugih organizama
Feromoni	poremećaj normalnog ponašanja insekata
Fungicidi	suzbijanje štetnih gljivica
Herbicidi	suzbijanje korovskih biljaka
Insekticidi	uništavanje štetnih insekata
Larvicidi	suzbijanje larvi insekata ili grinja
Moluskocidi	suzbijanje štetnih puževa
Repelenti	odbijanje štetočina
Nematocidi	suzbijanje valjkastih crva
Ovicidi	uništavanje jaja opasnih insekata i grinja
Pedikulicidi	uništavanje svih vrsta vaši
Rodenticidi	suzbijanje glodara
Termiticidi	uništavanje termita

Od 2010. godine vrednosti MDK ostataka pesticida u Pravilniku za namirnice i useve su usklađene sa vrednostima u Evropskoj uniji (Službeni glasnik RS, 2010). U životnu sredinu dospevaju ogromne količine različitih pesticida, a mnogi od njih se ne razlažu na manje opasna jedinjenja, već se nagomilavaju u zemljištu i vodi i transformišu u još opasnije oblike. Sudbina pesticida u životnoj sredini u velikoj meri zavisi od faktora životne sredine. Ovi procesi su kompleksni i dinamični i nalaze se pod uticajem zemljišta i životne sredine i nizom drugih

faktora kao što su: klimatski faktori (temperatura, vlažnost i vetrenje), abiotski faktori zemljišta (tekstura, minerali, gline i pH) i biotski faktori zemljišta (mikrobiološka masa i biološka raznovrsnost) (Morrica i sar., 2001; Wanner i sar., 2005). Bez obzira na način primene pesticida najveći deo dospeva u zemljište, što je razlog za dalje istraživanje njihove sudbine u zemljištu. Iz zemljišta procesima oticanja/spiranja, posebno više polarni pesticidi, mogu dospeti do podzemnih i površinskih voda i na taj način kontaminirati vodu i zemljište. Razumevanje sudbine pesticida u zemljištu je od fundamentalnog značaja za tačnu procenu rizika po kvalitet životne sredine kao i njihovo ekološko ponašanje sa ciljem bezbedne upotrebe postojećih i novih pesticida. Svako korišćenje pesticida nosi rizik narušavanja ravnoteže ekosistema, posebno ukoliko se koriste nestručno u pogledu načina upotrebe i vremena primene. Mnogi od njih se ne razlažu na prostija, manje opasna jedinjenja, već se nagomilavaju u podzemnoj i površinskoj vodi ili zemljištu i transformišu u još opasnije oblike. Pesticidi ulaze u ljudski organizam i organizam životinja preko lanca ishrane i vode, najčešće u malim, tzv. rezidualnim količinama, a posledice njihovog delovanja nisu zanemarljive. Negativan uticaj sredstava za zaštitu bilja na ljudsko zdravlje uključuje mnoge efekte: disfunkciju imunog, reproduktivnog i endokrinog sistema, hronično oštećenje nervnog sistema, akutnu neurološku toksičnost, ili pojavu raka (Himel i sar., 1990).

Toksičnost pesticida na nivou jedinke, individue i organizma se najčešće izražava srednjom letalnom dozom (LD_{50}), srednjom letalnom koncentracijom (LC_{50}) i/ili srednjom efektivnom koncentracijom (EC_{50}) (Mitić & Kecman, 2010). Abiotički i biotički faktori utiču na dejstvo toksičnih supstanci na organizme u životnoj sredini.

Srednja letalna (smrtna) doza (LD_{50}) predstavlja količinu (dozu) supstance koja prouzrokuje smrt 50% ispitivanih organizama u određenom periodu ekspozicije (izražava se u mg supstance na kg telesne mase ispitivane jedinke).

Srednja letalna (smrtna) koncentracija (LC_{50}) predstavlja koncentraciju supstance u vazduhu, vodi ili drugom supstratu, koja prouzrokuje smrt 50% izloženih organizama u određenom vremenskom periodu (izražava se u mg supstance na litar vazduha ili vode).

Srednja efektivna koncentracija (EC_{50}) predstavlja koncentraciju supstance pri kojoj 50% individua daje odgovor, nakon određene dužine izlaganja.

Na nivou individue, prema dužini ekspozicije vrsta toksičnog efekta može biti akutna i hronična, a prema tipu efekta subletalna i letalna. Kod *akutne toksičnosti*, štetan efekat (smrtnost,

imobilizacija, inhibicija rasta) kod jedinki nastupa nakon kratkotrajnog izlaganja visokim koncentracijama/dozama pesticida. Kod *hronične toksičnosti*, štetan efekat (efekat po reprodukciju, rast, smrtnost) kod jedinki nastupa nakon produženog izlaganja nižim koncentracijama/dozama pesticidima.

2.2. Parametri i procesi koji određuju sudbinu pesticida u zemljištu

Sudbina pesticida u zemljištu zavisi od mnogih parametara koji definišu njihovu pokretljivost i postojanost. Interakcija pesticida sa zemljištem je kompleksna, kontrolisana je brojnim fizičkim, hemijskim i biološkim reakcijama, koje se u dosta slučajeva odvijaju istovremeno.

Osobine pesticida predstavljaju važan faktor prilikom određivanja njihove sudbine u zemljištu. Među značajnijim svojstvima pesticida su: rastvorljivost pesticida, jonizaciona konstanta pesticida (pK_a), postojanost pesticida (vreme poluraspada) kao i sposobnost sorpcije.

Zemljišna svojstva značajno utiču na sudbinu pesticida u zemljištu. Značajnija svojstva zemljišta koja utiču na sudbinu pesticida su: sadržaj organske materije, tekstura zemljišta, permeabilnost zemljišta, vrednost pH zemljišta, dubina i nagib zemljišta.

Za ponašanje i sudbinu pesticida u zemljištu su odgovorni transportni, transfer i transformacioni procesi (Logan, 2012). Prethodno navedeni procesi (simultani ili sukcesivni) uključuju: spiranje, adsorpciju-desorpciju, isparavanje, ispiranje, degradaciju i usvajanje od strane biljke. Pored toga, ovi procesi se mogu grupisati u procese koji utiču na transport pesticida (adsorpcija, isparavanje, spiranje, ispiranje ili usvajanje biljkama) i njihovu postojanost (fotoliza, hemijska i mikrobiološka degradacija).

Svako od prethodno navedenih svojstava pesticida, se ne može pojedinačno posmatrati u cilju realnog predviđanja njihove sudbine u zemljištu. Sudbina pesticida i njihovo ponašanje u zemljištu zavisi od međusobne kombinacije svih prethodno navedenih svojstava, njihove kombinacije sa tipom zemljišta, kao i klimatskim uslovima u polju (temperatura i padavine).

2.2.1. Rastvorljivost pesticida

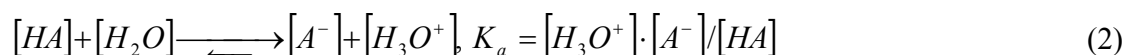
Rastvorljivost pesticida je važna karakteristika u predviđanju njegovog ponašanja u vodi i kretanja u zemljištu. Agrohemijska rastvorljivost u vodi je u funkciji temperature, pH vrednosti i jonskih sila, a pod uticajem je i drugih supstanci kao što je rastvorena organska materija (eng. dissolved organic matter, DOM) (Pierzynski i sar., 2005). Za procenu rastvorljivosti organskih

molekula u vodi koriste se dve metode: a) na osnovu hemijske strukture (K_{ps}) i b) na osnovu oktanol/voda podeonog koeficijenta (K_{OW}). Podeoni koeficijent ukazuje na obrnut odnos između rastvorljivosti organskog jedinjenja u vodi i oktanolu, može se prikazati na sledeći način:

$$K_{OW} = \frac{\text{koncentracija organske hemikalije u oktanolu (mg L}^{-1}\text{)}}{\text{koncentracija organske hemikalije u vodi (mg L}^{-1}\text{)}} \quad (1)$$

2.2.2. Kisela jonizaciona konstanta pesticida (pK_a)

Jedna od važnijih karakteristika zemljišta koja može da utiče na hidrolizu pesticida je vrednost pH zemljišnog rastvora, naročito pesticida koji su po prirodi kiseli kao što su SU. Pesticidi kisele prirode se ponašaju kao slabe kiseline (disosuju u vodenim zemljišnim rastvorima), te se u zemljišnom rastvoru javljaju u anjonskom i neutralnom obliku, a relativna količina navedenih oblika bliže je određena kiselinskom ravnotežnom konstantom pesticida (pK_a) i vrednošću pH rastvora (Kah & Brown, 2006). Opšta ravnoteža se može predstaviti na sledeći način:



, gde se $[H_3O^+]$, $[A^-]$ i $[HA]$ definiše kao koncentracija hidronijum jona (protona), anjona i neutralnih oblika (u mol L⁻¹). Pored toga, kiselinska ravnotežna konstanta pesticida (pK_a) se definiše,

$$pK_a = -\log K_a, \quad pH = -\log [H_3O^+] \quad (3)$$

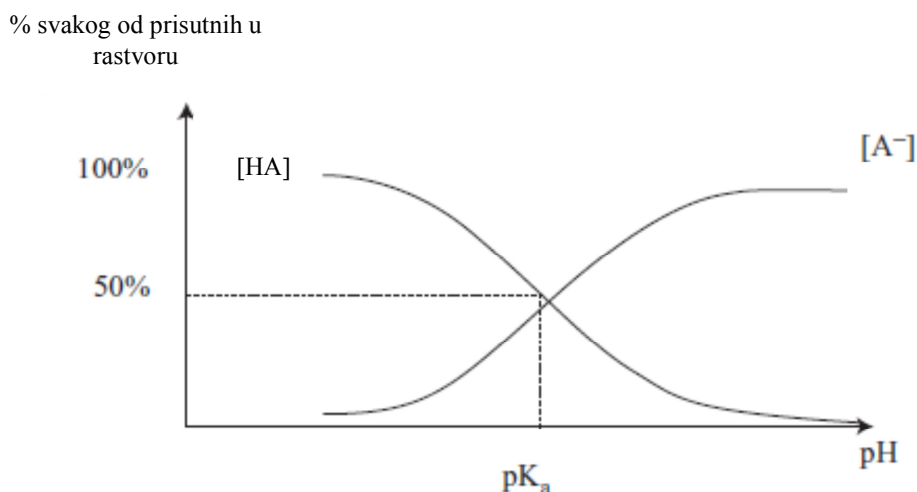
Odnos koncentracija neutralnog oblika i anjona je u funkciji vrednosti pH rastvora, može se prikazati na sledeći način:

$$\frac{[HA]}{[A^-]} = 10^{(pK_a - pH)} \quad (4)$$

Porastom vrednosti pH rastvora raste koncentracija anjonskih formi u rastvoru (Slika 2.1).

Pesticidi kisele prirode se prvenstveno javljaju u anjonskom obliku na vrednostima pH zemljišta većim od njihove pK_a vrednosti (Beyer i sar., 1988; Hay, 1990; Sarmah 1998; Sarmah, 2000). U tom slučaju, ukoliko vrednost pH zemljišta opada, udeo neutralnih delova ovog tipa pesticida raste, a ovi oblici su odgovorni za jaču sorpciju od strane matriksa zemljišta u odnosu na anjonske oblike. U slučaju neutralne reakcije zemljišta očekivana je smanjena sorpcija pesticida

kisele prirode, kao i značajna zastupljenost njihovih anjonskih oblika u zemljišnom rastvoru u odnosu na njihove neutralne oblike.



Slika 2.1. Promena neutralnih ili jonskih oblika u rastvoru u odnosu na vrednost pH rastvora (pretpostavka da je koeficijent aktivnosti ~ 1). $[HA]$ je koncentracija protonovanog oblika kiseline, pK_a je njegoa disociona konstanta ($[HA] = 1/(1+10^{pH-pK_a})$), $[A^-]$ je koncentracija disosovanog oblika

Naime, neutralni molekuli ne nailaze na odbijanje od strane negativno naelektrisanih čestica zemljišta (Kah & Brown, 2006). Hidrofobnost neutralnih formi je veća od jonskih (Lee i sar., 1990; Hyun i sar., 2003), a hidrofobna adsorpcija pesticida kisele prirode u zemljištu je predložena kao značajan mehanizam sorpcije kada su dati pesticidi u molekulskom obliku (Ukrainczyk & Ajwa 1996).

2.2.3. Postojanost pesticida

Parametar koji određuje postojanost pesticida u zemljištu je vreme poluživota. Vreme poluživota, odnosno poluraspada (eng. disappearance time, DT_{50} tj. $t_{1/2}$) se definiše kao vreme potrebno da sadržaj pesticida opadne na polovinu od početne vrednosti (Stephenson i sar., 2006). Vrednost za vreme poluraspada pesticida je važna za razumevanje potencijalnog uticaja pesticida na životnu sredinu. Ukoliko je ova vrednost niska, pesticid se brzo degradira pri datim uslovima u zemljištu i time je uticaj na životnu sredinu manji, ukoliko su proizvodi njegove razgradnje bezopasni za živi svet u zemljištu i naredni planiran plodored. Predviđanje poluraspada pesticida u zemljištu je veoma važan parametar za agronomsku praksu. Vreme poluraspada daje informacije za preostalu količinu pesticida koja bi mogla dovesti do oštećenja planiranih useva

kao i do narušavanja mikrobiološke strukture zemljišta i povećane toksičnosti za određene korisne mikroorganizme u zemljištu. Ukoliko se disipacija odvija prema reakciji prvog reda, tj. ako se koncentracija pesticida pretpostavi u obliku $y(t)=y_0 e^{-kt}$, vreme poluraspada se određuje iz sledećeg izraza (Martins, 2001):

$$DT_{50} = \frac{1}{k} \ln 2 \quad (5)$$

Koncentracija u trenutku kada je izvršeno tretiranje je y_0 , a k je konstanta koja se može dobiti iz eksperimentalnih podataka.

Pojedini autori su zaključili da postojanost pesticida zavisi od komercijalne doze primene pesticida (Eleftherohorinos & Kotoula-Syka, 1989; Kotoula-Syka i sar., 1993a; Kotoula-Syka i sar., 1993b; Bedmar i sar., 2006) kao i od karakteristika zemljišta (postojanost raste sa porastom vrednosti pH i smanjenjem sadržaja organske materije) (Smith & Hsiao, 1985; Goetz i sar., 1989; Castro i sar., 2002).

2.2.3.1. Matematički model koji opisuje disipaciju pesticida u zemljištu

U literaturi se mogu naći primeri u kojima se proces disipacije pesticida opisuje sistemom diferencijalnih jednačina prvog reda (Martins & Mermound, 1998; Martins & Mermound, 1999; Martins i sar. 2001; Morrica i sar. 2001; Poppell i sar. 2002). Rešavanjem sistema ovih jednačina dobija se eksponencijalna zavisnost koncentracije pesticida od vremena (e^{-kt}). U znatnom broju istraživanja za određivanje vremena poluraspada pesticida je korišćen izraz (5), dobijen na osnovu eksponencijalne funkcije koja opisuje disipaciju pesticida tokom vremena.

U ovoj disertaciji će biti predložen drugi, uopšteniji model za određivanje vremena poluraspada ispitivanih SU. Naime, proces disipacije može se opisati i sistemom običnih diferencijalnih jednačina proizvoljnog realnog reda, manjeg od jedan. Frakcioni izvod je nelokalni operator (Podlubny, 1999). Ukoliko se radi o izvodu po vremenskoj koordinati što je ovde slučaj, tada na trenutnu vrednost funkcije utiču vrednosti funkcije u svim prethodnim trenucima vremena, tj. uzima se u obzir istorija promene koncentracije pesticida. Diferencijalne jednačine koje uključuju izvode proizvoljnog realnog reda nazivaju se frakcione diferencijalne jednačine i one se u poslednjih tridesetak godina primenjuju u mnogim oblastima fizike, hemije, biologije, inženjerstva i medicine (Hilfer, 2000; Dokoumetzidis & Macheras, 2009; Magin, 2010; Grahovac & Žigić, 2010; Grahovac i sar., 2012; Flores-Tlacuahuac & Biegler, 2014; Atanacković

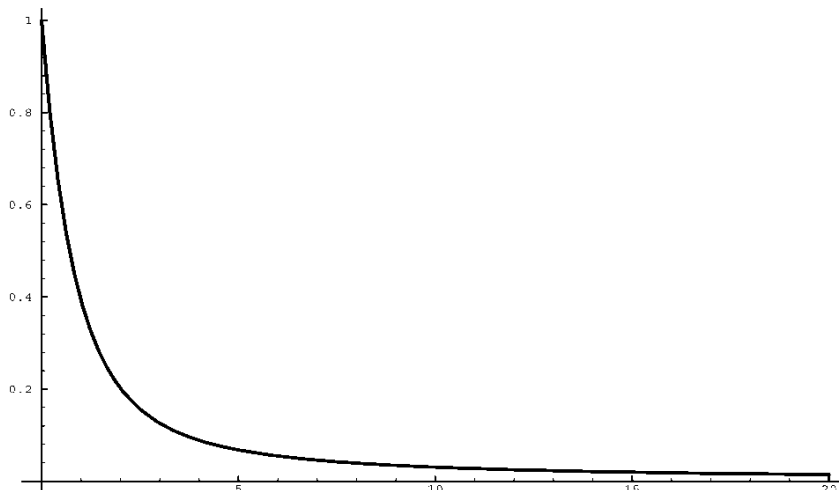
i sar., 2014; Popović i sar., 2015). Rešenja frakcionih diferencijalnih jednačina se mogu prikazati i u formi Mittag-Leffler-ovih funkcija (MLF). Ova funkcija se može koristiti za dobijanje koncentracije pesticida u zemljištu tokom vremena, te će biti u nastavku kratko opisana. Mittag-Leffler-ova funkcija je funkcija $E_\alpha(z)$ definisana sledećim beskonačnim redom:

$$E_\alpha(z) = \sum_{n=0}^{\infty} \frac{z^n}{\Gamma(\alpha n + 1)}, \quad \alpha \in \mathbf{C}, \operatorname{Re} \alpha > 0, \quad (6)$$

Ova funkcija je dobila ime prema švedskom matematičaru Gösta Mittag-Leffler koji je 1903. godine uveo i analizirao ovu funkciju. Mittag-Leffler-ova funkcija je jednoparametarska funkcija, i predstavlja direktno uopštenje eksponencijalne funkcije. Ako je parametar $\alpha=1$, funkcija iz izraza (6) predstavlja razvoj eksponencijalne funkcije u beskonačan red. Osim ovog specijalnog slučaja za određene vrednosti parametra i nezavisno promenljive, pomoću ove funkcije mogu se opisati i trigonometrijske i hiperboličke funkcije (Srivastava & Tomovski, 2009). Mittag-Leffler-ova funkciju koja zavisi od dva argumenta su u svojim radovima analizirali nemački matematičar Wiman (1905. godine) i francuski naučnik Pierre Humbert (1953. godine) i ovu funkciju su definisali na sledeći način

$$E_{\alpha,\beta}(z) = \sum_{n=0}^{\infty} \frac{z^n}{\Gamma(\alpha n + \beta)}, \quad \alpha, \beta \in \mathbf{C}, \operatorname{Re} \alpha > 0, \operatorname{Re} \beta > 0, \quad (7)$$

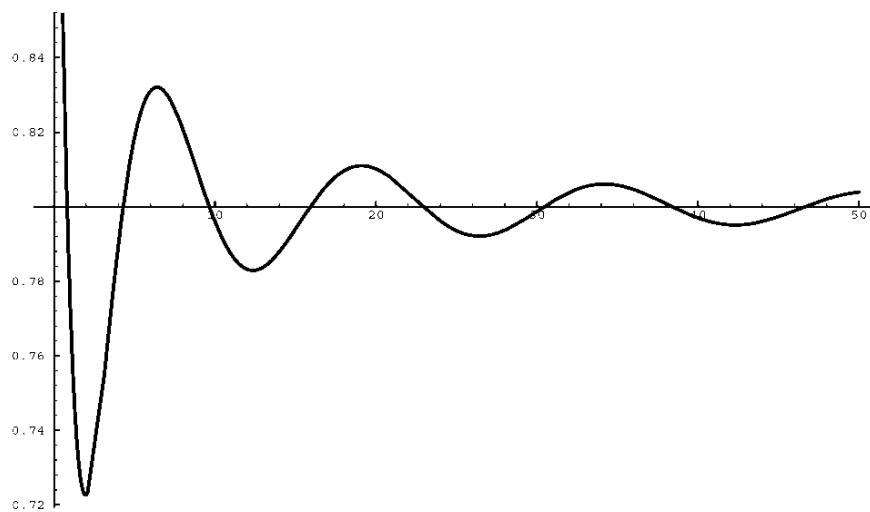
Na ovaj način izraz (7) predstavlja uopštenje funkcije pod izrazom (6). Gorenflo i saradnici (2002) su za izračunavanje Mittag-Lefflerove funkcije koristili numerički algoritam i program. Na slici 2.2 je prikazan oblik funkcije za parametre $\alpha = 0,75$, $\beta = 1$, $\arg(z) = \pi$,



Slika 2.2. Mittag-Lefflerova funkcija $E_{\alpha,\beta}(z)$ za $\alpha = 0,75$, $\beta = 1$, $\arg(z) = \pi$.

dok je na slici 2.3 prikazana Mittag-Lefflerova funkcija za $\alpha = 1,25$, $\beta = 1$, $\arg(z) = \alpha\pi$ (Gorenflo i sar., 2002). U prvom slučaju se radi o monotono opadajućoj funkciji, a u drugom slučaju o periodičnoj funkciji kojoj se smanjuje amplituda.

Mittag-Lefflerove funkcije su do početka šire primene frakcionog računa bile važne u klasičnoj kompleksnoj analizi, a takođe su imale teorijsku primenu u rešavanju integralnih jednačina. Njihov značaj kako u matematici tako i u drugim naukama je porastao kada je u potpunosti razrešena njihova veza sa problemima frakcionog računa (70-tih godina prošlog veka) (Gorenflo i sar., 2014).



Slika 2.3. Mittag-Lefflerova funkcija $E_{\alpha, \beta}(z)$ za $\alpha = 1,25$, $\beta = 1$, $\arg(z) = \alpha\pi$.

Sadržaj pojedinih herbicida u zemljištu tokom vremena se može modelirati korišćenjem jednoparametarske Mittag-Leffler-ove funkcije definisane izrazom (6). U ovom slučaju koncentracija herbicida (y) se može napisati u sledećem obliku:

$$y(t) = c E_{\alpha}(-bt), \quad (8)$$

pri čemu su parametri α , b i c nepoznati. Eksperimentalne vrednosti sadržaja ispitivanih herbicida dobijenih primenom HPLC-UV-DAD, u prikazanoj funkciji su označene sa y_{EXPI} , a dobijene su za vremena uzorkovanja (t_i) od 0, 2, 6, 15 dana, od vremena tretiranja zemljišta, na jednoj dubini. Vrednosti parametara α , b i c određene su primenom metoda najmanjeg kvadrata, koja je omogućila određivanje minimuma određene funkcije (Grahovac i sar., 2012)

$$\theta(t, \alpha, b, c) = \sum_{i=1}^N [y(t_i, \alpha, b, c) - y_{EXPI}]^2 \quad (9)$$

Fitovanje je urađeno primenom komercijalnog softverskog paketa Mathematica, pri čemu je za izračunavanje Mittag-Leffler-ove funkcije korišćen numerički algoritam (Gorenflo i sar., 2014).

Vreme poluraspada (DT_{50}) (nakon određivanja koeficijenata α , b i c) može se definisati rešavanjem sledeće algebarske jednačine,

$$y(DT_{50}, \alpha, b, c) - \frac{y_{EXPI}}{2} = 0 \quad (10)$$

primenom klasične Njutnove metode. U izrazu (10) y_{EXPI} predstavlja sadržaj ispitivanog herbicida nultog dana, tj. dana kada je izvršeno tretiranje zemljišta.

2.2.4. Adsorpcija-desorpcija

Zemljište je jedan od glavnih regulatora mobilnosti herbicida u životnoj sredini. Mnogi hemijski i biološki procesi, koji određuju zadržavanje ili transport pesticida, odvijaju se na površini zemljišta. Ovi procesi uključuju fenomen adsorpcije, hemijsku i biološku degradaciju (Cheng, 1990, Boesten, 1993; Martins & Mermoud, 1998). Adsorpcija pesticida na zemljištu je jedna od važnijih karakteristika koja određuje njihovu sudbinu. Količina pesticida koja će se zadržati na zemljištu, odnosno u zemljišnom rastvoru, je posledica interakcije pesticida i aktivnih centara zemljišta.

Sposobnost pesticida da se adsorbuje na aktivne centre zemljišta i njihova tendencija da se desorbuje sa istog, predstavljaju važan faktor koji utiče na kontaminaciju zemljišta i podzemne vode. Adsorpcija zavisi od nekoliko faktora koji se odnose na karakteristike zemljišta (mineralni sastav, sadržaj organske materije, hemijski sastav zemljišnog rastvora) i fizičko-hemijske karakteristike pesticida (struktura molekula, naelektrisanje i rastvorljivost). Pesticid koji se adsorbuje za aktivne centre zemljišta je privremeno inaktiviran, i na taj način se donekle sprečava njegov štetan uticaj na biološki svet zemljišta, i čini ga manje bioraspoloživim za mikrobiološku razgradnju. Pored toga, pojedini mikroorganizmi nisu u mogućnosti da koriste pesticide u adsorbovanom stanju (Ainsworth i sar., 1993).

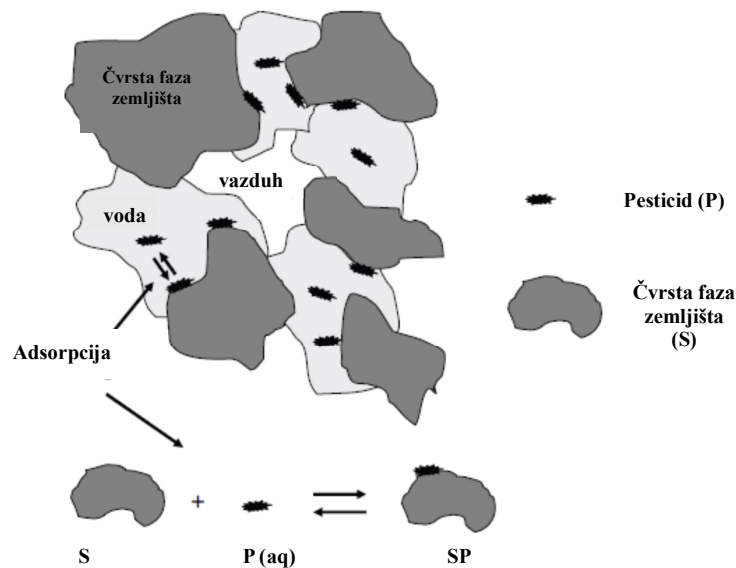
U zemljištu, aktivni centri odgovorni za adsorpciju su najčešće koloidne čestice, organska materija i glina. Organska materija i glina, zbog hemijskog afiniteta prema agrohemijskim molekulima, imaju izraženiju adsorpcionu moć, veliku dodirnu površinu zbog čega su ovi sorbenti pogodni za adsorpciju pesticida. Adsorpcija na površini gline ili organske materije se najčešće odvija putem sledećih interakcija: van der Waals-ovih sila, vodoničnih veza (H-veza),

dipol-dipol interakcija, jonska izmena, kovalentno vezivanje, protonacija, izmena liganada, katjonske i/ili hidrofobne interakcije.

Katjonske vrste pesticida adsorbuju se za zemljište elektrostatičkim privlačenjem, dok se anjonski molekuli mogu adsorbovati na pozitivno naelektrisane koloidne čestice zemljišta. U kiselim zemljištima, pesticidi koji imaju amino grupe, nakon njihove protonacije do kvaternog amonijum jona ($-\text{NH}_3^+$) mogu formirati H-vezu sa atomima kiseonika u filosilikatnoj površini, ili sa atomima azota iz organske materije. Međutim, pesticidi sa kiselim funkcionalnim grupama najčešće ostaju u neutralnom obliku ($-\text{COOH}$). Pored toga, nepolarni pesticidni molekuli mogu interagovati sa hidrofobnim delovima organske materije zemljišta.

Adsorpciona moć utiče na mobilnost pesticida duž profila zemljišta, i na taj način i na njegovu bioaktivnost, postojanost, biorazgradnju, ispiranje kao i proces isparavanja. Adsorpcija pesticida za aktivne centre zemljišta se može smatrati kao prvi korak ka hemijskoj degradaciji herbicida.

Distribucija pesticida u zemljištu zavisi od raspodeljivanja između zemljišnog rastvora i čvrste faze zemljišta (Slika 2.4).



Slika 2.4. Distribucija pesticida u zemljištu

Interakcija između pesticida i bilo koje komponente zemljišta može se opisati ravnotežnom adsorpcijom na sledeći način:



gde S predstavlja čvrstu fazu zemljišta, $P_{(aq)}$ pesticid u zemljišnom rastvoru, a SP predstavlja pesticid vezan za aktivni centar zemljišta. Mesta vezivanja pesticida u zemljištu pri adsorpciji su brojna i raznovrsna. Ova mesta najčešće obezbeđuju minerali u zemljištu (glina, Fe i Mn oksidi) i organska materija u zemljištu. Prethodno pomenuta jednačina (11) daje ideju opšteg procesa koji uključuje adsorpciju, ali ne precizira mehanizam kojim se odvija, jer su mehanizmi raznovrsni u složenom sistemu kao što je zemljište (formiranje površinskih kompleksa, elektrostatičke interakcije, hidrofobne interakcije, jonska izmena, itd).

Pojedina istraživanja ukazuju na izraženu negativnu korelaciju između sorpcije pesticida i vrednosti pH zemljišta, tj. sorpcija slabo kiselih pesticida se povećava sa opadanjem vrednosti pH zemljišta (Shea, 1986; Reddy i sar. 1995; Gonzalez & Ukrainczyk 1996). Do sličnih zaključaka su došli i istraživači koji su koristili zemljišta sa različitim vrednostima pH koje su dobili prethodnim podešavanjem vrednosti pH zemljišta pre izvođenja eksperimenta za proveru sorpcije (Mersie & Foy 1985; Shea 1986; Wehtje i sar., 1987). Hyun & Lee (2004) su proučavali sorpciju prosulfurona sa promenom vrednosti pH na deset različitih minerala i primetili smanjenje sorpcije prosulfurona sa povećanjem vrednosti pH za sve ispitivane minerale. Vicari i saradnici (1996) su zapazili najjaču sorpciju rimsulfurona za zemljište kada su njegove vrednosti pH bile najniže. U studijama koje su obuhvatile zemljišta sa različitim vrednostima pH (4,2-7,0) primećena je pozitivna korelacija sorpcije SU herbicida i organskog ugljenika, dok su vrednost pH zemljišta i sadržaj organske materije bili negativno korelirani (Mersie & Foy 1985; Borggaard & Streibig, 1989). Gonzalez & Ukrainczyk (1996) su uočili izraženiju negativnu korelaciju između sorpcije nikosulfurona i vrednosti pH za četiri zemljišta iz Brazila, dok nije bilo značajne korelacije za deset ispitivanih zemljišta iz Iowa (USA). Moguće objašnjenje za prethodno navedeno ponašanje herbicida može biti da su u ispitivanju sorpcije bila uključena zemljišta sa nižim opsegom vrednosti pH zemljišta (pH 4,6-5,2) iz Brazila u odnosu na zemljišta iz Iowa (USA) (6,0-8,2). U okviru ove studije, primećena sorpcija nikosulfurona za zemljište iz Iowa (USA) je bila najviše u korelaciji sa sadržajem gline, dok je sorpcija nikosulfurona za ispitivano zemljište iz Brazila bila najviše u korelaciji sa sadržajem organskog ugljenika. Ove razlike se mogu protumačiti u smislu razlika u mineralogiji gline iz Iowa (USA) zemljišta (2:1=glina:minerali) i zemljišta iz Brazila (kaolinit, Al i Fe oksidi).

Kao što je poznato, sorpcija većine hemikalija je egzoterman proces i za očekivati je da će sorpcija opada sa porastom temperature (Hamaker & Thompson, 1972). Thirunarayanan i

saradnici (1985) su zaključili u studiji koja je obuhvatila četiri zemljišta sa različitim vrednostima pH zemljišta (pH 6,2-8,1) na različitim temperaturama (10-40⁰C), malo izraženiju sorpciju pesticida na nižim temperaturama. Uopšteno, opadanje sorpcije pesticida sa porastom temperature može biti rezultat porasta kinetičke energije molekula ispitivanih pesticida, usled približavanja sorptivnoj površini zemljišta i zbog toga nižem elektrostatičkom privlačenju i njihovoj sorpciji.

Za definisanje bioraspoloživosti pesticida u zemljištu neophodno je razumevanje njihove interakcija i određivanje koncentracije pesticida u zemljišnom rastvoru.

Kako bi se razumeli prethodno navedeni procesi neophodno je definisati adsorpcione izoterme. Adsorpciona izoterma pokazuje odnos koncentracije (C) pesticida u zemljišnom rastvoru koja odgovara P (aq) u jednačini (11) i količine adsorbovanog pesticida (q), koja odgovara SP u jednačini (11), na konstantnoj temperaturi i nakon postignute ravnoteže (Stumm, 1992).

2.2.4.1. Jednačina raspodele

Tendencija pesticida da bude adsorbovan je određena zemljišnim adsorpcionim koeficijentom (K_d). Jednačina raspodele se izražava kao (Cooke i sar., 2004; Pateiro-Moure i sar., 2009):

$$q = K_d C \quad (12)$$

Parametar K_d se definiše kao odnos koncentracije pesticida adsorbovanog za zemljište (q) i koncentracije zaostale u zemljišnom rastvoru (C) u uslovima ravnotežne raspodele. Što je veća vrednost koeficijenta K_d , veći je afinitet pesticida za površinu zemljišta, što rezultira nižom biodostupnosti za mikroorganizme u zemljištu. Primena jednačine (12), moguća je samo ako dati sistem u ispitivanom opsegu koncentracija ima linearan odziv. Ako eksperimentalni podaci ne pokazuju linearni odziv za ispitivani opseg koncentracija, korišćenje K_d vrednosti dobijene iz linearne regresije će uzrokovati lošu procenu ponašanja pesticida. Preporučuje se da se procena adsorpcione izoterme izvrši na osnovu više tačaka u opsegu ispitivanih koncentracija.

Sve više studija ukazuje na činjenicu da je adsorpcija hidrofobnih organskih pesticida u pozitivnoj korelaciji sa sadržajem ukupnog organskog ugljenika (eng. total organic carbon, TOC) u zemljištu i relativno nezavisna od drugih svojstava zemljišta. Zbog toga se, koeficijent raspodele K_d ponekad definiše na osnovu TOC (Laor i sar., 1996):

$$K_0C = \frac{K_d}{0,01TOC} \quad (13)$$

gde je K_0C adsorpcioni koeficijent, a TOC sadržaj ukupnog organskog ugljenika. S obzirom da većina eksperimentalnih podataka ne odgovara linearnoj zavisnosti, potrebno je koristiti Freundlich-ovu ili Langmuir-ovu adsorpcionu izoterma.

Freundlich-ova zavisnost je možda najčešće primjenjivan model u hemiji zemljišta za opisivanje nelinearnog adsorpcionog ponašanja herbicida (Kibe i sar., 2000). To je empirijski model adsorpcije (Stumm, 1992) i može se napisati kao:

$$q = K_f C^{1/n} \quad (14)$$

gde K_f predstavlja koeficijent distribucije, a n faktor korekcije. Važno je napomenuti da kada je $n=1$ jednačina (14) postaje jednačina (12) i $K_f = K_d$.

Parametre K_f i $1/n$ iz Freundlich-ove izoterme istraživači često koriste za donošenje zaključaka koji se odnose na mehanizme adsorpcije pesticida u zemljištu, ovakve interpretacije su često teorijskog karaktera (Sparks, 1986; Sparks, 2003).

Langmuir-ova izoterma se posebno koristi u oblastima koje opisuju adsorpciju pesticida na koloidnoj površini (Zanini i sar., 2006; Xi i sar., 2010). Langmuir-ova adsorpciona jednačina se može opisati kao:

$$q = \frac{K_L C_b}{1 + K_L C} \quad (15)$$

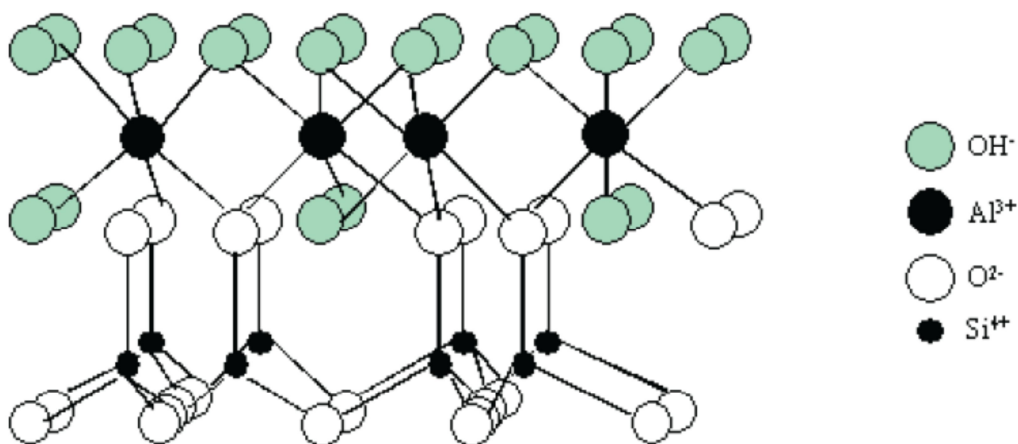
gde K_L predstavlja konstantu koja se odnosi na jačinu vezivanja, a C_b predstavlja maksimalnu količinu pesticida koja se može adsorbovati. Međutim, pojedini istraživači koriste ovaj model za opisivanje adsorpcije pesticida za zemljište (Gimsing i sar., 2007). Kao i kod K_f , K_L je korisna za komparativne svrhe, ali ne pruža informaciju o reakcionim mehanizmima.

2.2.5. Karakteristike zemljišta

Zemljište predstavlja prirodnu tvorevinu nastalu dejstvom različitih abiotičkih činilaca i živih organizama. Hemijska svojstva zemljišta zavise od pedogeneze (proces formiranja zemljišta), tj. uticaja pedogenetskih faktora. Najznačajniji pedogenetski faktor koji utiče na hemijska svojstva zemljišta je geološka podloga sa svojim mineraloškim sastavom. Stoga su hemijske osobine zemljišta često jedan od kriterijuma za određivanje kategorije pri klasifikaciji zemljišta.

Zemljište je složeni sklop koji se sastoji iz materija koje se javljaju u tri agregatna stanja: čvrstom (mineralna i organska materija), tečnom (voda) i gasovitom (vazduh). Ono sadrži 50% čvrstog materijala (45% mineralna i 5% organska materija), a 50% prostora su pore (šupljine) u zemljištu. Mineralne materije u zemljištu predstavljaju pesak, mulj i glinu. Između čvrstih čestica zemljišta formira se prostor poznat kao pore (šupljine) zemljišta, koje su značajne za kretanje (transport) vode, rastvorenih materija i vazduha. Procesi adsorpcije zavise od sastava i svojstva čvrste komponente zemljišta kao i od osobina pesticida. Čvrste čestice zemljišta se formiraju uglavnom od minerala i organske materije u zemljištu. Ove komponente obezbeđuju specifična mesta za adsorpciju pesticida. Svojstva i ponašanje čvrstih čestica zemljišta su bila predmet ispitivanja mnogih studija (Greenland & Hayes, 1978; Dixon & Weed, 1990).

Minerali gline sadrže aktivna mesta za adsorpciju koja su smeštena u tetraedarskoj strukturi i formirana su od siloksana (siloksan šupljine) (Slika 2.5). Ove šupljine ograničene su sa šest usamljenih elektronskih parova (od atoma kiseonika) i daju nukleofilni karakter datoj površini, i na taj način omogućavaju adsorpciju polarnih ili pozitivno naelektrisanih molekulskih vrsta (Sposito, 1984). Ukupan naboj ove površine je promenljiv zbog prisustva hidroksilnih grupa u njihovoj strukturi, koja može da izgubi ili primi protone, a zavisi od vrednosti pH zemljišnog rastvora. Ako voda uđe u siloksanke šupljine minerala gline, njeni molekuli će se jako polarizovati, što će znatno smanjiti mobilnost vode. Siloksanke šupljine se protežu duž celog tetraedra i daju visoku adsorpcionu moć glini.



Slika 2.5. Strukturni prikaz gline

Organska materija zemljišta je komponenta čvrste faze zemljišta, koja je povezana sa mineralnim delom. Udeo organske materije u zemljištu je mali u odnosu na mineralni deo, ali ima

veliki značaj za osobine zemljišta. Ona znatno utiče na strukturu zemljišta, zemljišni kapacitet adsorpcije katjona i snadbevanje biljaka pristupačnim hranjivima. Organska materija zemljišta je nastala biološkim putem, transformacijom mrtvih organizama zemljišne flore i faune, a podložna je promenama, znatno više nego mineralni deo zemljišta. Na kvalitativni i kvantitativni sastav organske materije zemljišta utiču biljni i životinjski svet, reljef, mehanički sastav zemljišta, temperatura, vlažnost i hemijske reakcije koje se odvijaju u zemljištu. Ona je veoma složena, predstavlja mešavinu različitih organskih supstanci, a prema hemijskom sastavu organsku materiju zemljišta čine nehuminske i huminske materije (fulvo kiseline, himatomelanske kiseline, huminske kiseline, humini i humusni ugalj). Na osnovu stabilnosti pojedinih komponenata od kojih je sačinjena organska materija zemljišta, može se izdvojiti nekoliko frakcija (Ćirić, 2014):

- *rastvorljiva organska materija* zemljišta (sačinjena od organskih čestica manjih od 0,45 μm , a period transformacije je kraći od 10 godina),

- *čestična organska materija* (sačinjena od humifikovanih čestica od 53-200 μm , a period transformacije je kraći od 10 godina),

- *humus*, predstavlja najveći deo organske materije zemljišta (sastoji se od huminskih i nehuminskih materija, kao što su huminske i fulvo kiseline, polisaharidi, proteini i dr., a period transformacije je nekoliko desetina godina) i

- *inertna organska materija* (sačinjena od kondenzovanih aromatičnih jedinjenja, kao što je humusni ugalj, a period transformacije traje stotinama i hiljadama godina).

Humus je amorfne prirode, ulazi u sastav koloidne frakcije zemljišta sa velikim brojem reaktivnih mesta po jedinici mase i nosilac je negativnog naelektrisanja zemljišta (Ćirić, 1984; Miljković, 1996). U novijoj literaturi umesto termina organska materija zemljišta i humus, sve više se pominje organski ugljenik (Spiegel i sar., 2005).

Značaj pojedinih svojstava zemljišta za sudbinu i ponašanje pesticida se može ukratko sumirati (Huang & Iskandar, 2000):

- *tekstura zemljišta* utiče na brzinu kretanja vode i rastvorenog pesticida u vodi kroz zemljište. Zemljište sa finom teksturom ima veću specifičnu površinu i manju propustljivost, duže je vreme kontakta pesticida i zemljišta kao i veća površina sorpcije za vezivanje pesticida. Pored toga, zemljište sa većim sadržajem gline pogodno je za vezivanje pesticida zbog male veličine pora i veće površine za sorpciju.

- *propustljivost (permeabilnost) zemljišta* se definiše kao brzina kretanja vode kroz slojeve zemljišta i ovaj parametar može da utiče na duže zadržavanje pesticida u zemljištu. Brže kretanje vode kroz slojeve zemljišta utiče na kraće vreme kontakta između pesticida i zemljišta.
- na rastvorljivost pesticida u zemljištu kao i na mnoge biološke procese utiče *vrednost pH zemljišnog rastvora*. U dosta slučajeva rastvorljivost pesticida je veća pri nižim vrednostima pH zemljišnog rastvora, i često je slabija njihova sorpcija u takvim uslovima.
- *organska materija zemljišta* utiče na sorptivni potencijal zemljišta za pesticide. Pored toga, ona predstavlja izvor energije za mikroorganizme koji su bitni za njihove dalje transformacije.
- količina vode koja se upija u dublje slojeve zemljišta zavisi od *nagiba zemljišta*.
- *dubina zemljišta* utiče na vreme kontakta između pesticida i čestica zemljišta.

2.2.6. Mobilnost pesticida u zemljištu

Transportni procesi su odgovorni za pomeranje herbicida od početne tačke nakon njihove primene na zemljištu kroz sistem zemljište-voda. U tabeli 2.2 je prikazan rizik za transport pesticida do podzemne vode u zavisnosti od svojstva zemljišta, pesticida i količine padavina.

Tabela 2.2. Rizik za transport pesticida do podzemne vode u zavisnosti od svojstava zemljišta, pesticida i količine padavina (Kuhad i sar., 2004).

Rizik za transport pesticida u podzemnu vodu		
	Nizak rizik	Visok rizik
Karakteristika pesticida		
Rastvorljivost u vodi	Slaba	Dobra
Adsorpcija za zemljište	Visoka	Niska
Postojanost	Niska	Visoka
Karakteristika zemljišta		
Tekstura	Fina glina	Grub pesak
Organska materija	Visok sadržaj	Nizak sadržaj
Makropore	Nekoliko, male	Puno, velike
Dubina do podzemnih voda	40 m ili više	8 m ili manje
Količina padavina		
Kiša	Male zapremine u retkim intervalima	Velike zapremine u čestim intervalima

Molekuli aktivne materije pesticida posle primene preparata izvesno vreme će biti na mestu na kojem su naneti, a zatim se pod uticajem vode mogu transportovati u dublje slojeve zemljišta (ispiranje), lateralno se kretati po površini zemljišta (spiranje), isparavati, usvajati od strane biljke i/ili vezati za aktivne centre zemljišta ili metabolisati od strane prisutnih organizama u zemljištu.

Struktura zemljišta zajedno sa njegovom teksturom (glina, mulj i sadržaj peska) predstavljaju važnu ulogu u transportnim procesima pesticida pored karakteristika pesticida. Kada je zemljište sa manjim sadržajem gline i većim sadržajem peska znatno je brže kretanje vode i rastvorljivih pesticida zajedno sa vodom. Međutim, znatno je sporije kretanje vode, kao i rastvorljivih pesticida u vodi, kroz slojeve zemljište sa većim sadržajem gline i organske materije, što može biti jedan od razloga za lakše vezivanje pesticida (Fishel, 2005).

Isparavanje pesticida predstavlja proces konveziije pesticida iz tečnog u gasovito stanje i njegovo kretanje dalje je određeno kretanjem vazduha. Intezitet isparavanja pesticida zavisi od napona pare (Henrijeve konstante). Što je veća vrednost napona pare aktivne materije pesticida veća je i tendencija pesticida ka isparavanju. U velikom broju slučajeva, gubitak pesticida isparavanjem je znatno manji u odnosu na spiranje. Brzina isparavanja aktivne materije pesticida zavisi od temperature, vlažnosti vazduha (niža vlažnost veća mogućnost za isparavanje), kretanje vazduha, karakteristika zemljišta i dr.

Ispiranje pesticida (vertikalno pomeranje kroz zemljišni profil) je jedan od važnijih procesa sa aspekta zaštite životne sredine, jer predstavlja potencijalnu opasnost za zagađenje podzemnih voda. U slučaju da je razgradnja pesticida dovoljno brza u poređenju sa brzinom ispiranja, doći će do degradacije pesticida pre nego što on dospe do podzemne vode. Brzina ispiranja određuje koliko dugo će se pesticidi zadržati u površinskim slojevima zemljišta. Za procenu potencijala ispiranja pesticida pored poznatih fizičko-hemijskih i adsorpcionih karakteristika pesticida, neophodno je poznavati i karakteristike zemljišta. Ukoliko je poznat koeficijent sorpcije K_0C mnogo lakše je odrediti potencijal ispiranja ispitivanog pesticida. Parametri dobijeni iz adsorpcione izoterme su korisni za indirektnu procenu ispiranja pesticida u zemljištu. Model koji se odnosi na pokretljivost herbicida je takozvani GUS indeks (eng. Groudwater Ubiquity Score, GUS) koji se definiše na sledeći način (Gustafson, 1989):

$$GUS = \log DT_{50} (4 - \log K_0C) \quad (16)$$

gde GUS predstavlja bezdimenzioni indeks, a DT_{50} vreme poluraspada pesticida u zemljištu. GUS indeks je empirijski, polukvantitativan način za opisivanje mogućnosti kretanja pesticida u podzemnu vodu. Prema Oliveira i saradnicima (2001) za pesticide sa $GUS < 1,8$ smatra se da nisu skloni ispiranju, oni sa $GUS > 2,8$ su skloni ispiranju, dok se oni sa $1,8 < GUS < 2,8$ smatraju prelaznim. Vreme poluraspada treba biti definisano za ispitivano zemljište, jer se njegova vrednost menja od zemljišta do zemljišta (Bedmar i sar., 2006; Juhler i sar., 2008).

Kriterijumi za procenu pokretljivosti pesticida su predstavljeni u tabeli 2.3 (Roberts, 1996). Kako bi se razumeli procesi koji utiču na bioraspodivnost pesticida potrebno je definisati adsorpcione izoterme za ispitivani tip zemljišta. Osim toga, vrlo je važno uzeti u obzir prisutnost mikroorganizama u zemljištu, koji mogu značajno uticati na vrednost poluraspada pesticida (Soloneski & Larramendy, 2011). Pesticidi koji se slabije adsorbuju za aktivne centre zemljišta uz veću postojanost prema degradaciji će biti više podložni procesu ispiranja, odnosno veća je vetovatnoća da će se naći u podzemnoj vodi.

Tabela 2.3. Kriterijum za procenu pokretljivosti i postojanosti pesticida u zemljištu.

Klasa pokretljivosti jedinjenja	Kritična vrednost K_0C ($mL g^{-1}$)	Klasa postojanosti jedinjenja	Vreme poluraspada (DT_{50}) u danima
nepokretno	> 4000	nepostojano	< 5
slabo pokretno	4000-500	slabo postojano	5-22
umereno pokretno	499-75	umereno postojano	22-60
pokretno	74-15	veoma postojano	> 60
veoma pokretno	< 15		

Zemljišne kolone se najčešće koriste za ispitivanje kretanja pesticida (Beckie & McKercher, 1990; Günther i sar., 1993; Veeh i sar., 1994). Kretanje SU u zemljištu zavisi od njihove prirode (slabe kiseline) kao i od vrednosti pH zemljišta na koje su nanete. Predhodni rezultati su potvrdili brže kretanje SU kroz zemljište sa porastom vrednosti pH zemljišta i smanjenjem sadržaja organske materije u zemljištu (Beckie & McKercher, 1990; Rouchaud i sar., 2001). Afyuni i saradnici (1997) su u izvedenom eksperimentu sa zemljišnim kolonama simulirali padavine i zaključili da nije dolazilo do kretanja nikosulfurona u dublje slojeve zemljišta, a time, donekle isključili mogućnost njegovog ispiranja do zona ispod uzorkovanog sloja.

Saramah (1998) je u svojim istraživanjima došao do zaključka da aspiracija vode iz zemljišta od strane korena zasejane biljne vrste može da utiče na transport pojedinih pesticida u dublje slojeve zemljišta.

Studije u zemljišnim kolonama su korisne za utvrđivanje relativne mobilnosti pesticida, ali aktuelno kretanje u polju se verovatno razlikuje od studije u posmatranim kolonama. Razlog može biti interakcija nekoliko procesa koji uključuju degradaciju, sorpciju i njihovo kretanje pod dinamičnim realnim vremenskim uslovima, zbog čega je za interpretaciju dobijenih rezultata u zemljišnim kolonama neophodno razmotriti hidrologiju analiziranog predela uz njegove karakteristike (Bergström, 1992).

Spiranje pesticida predstavlja horizontalno premeštanje molekula pesticida po površini zemljišta. Ovaj proces je posebno izražen kada je akumulacija vode na površini zemljišta veća od njenog kretanja u dublje slojeve zemljišta. Količina pesticida koja će učestvovati u ovom procesu zavisi od niza faktora kao što su: geografske karakteristike terena (nagib površine zemljišta), klimatski faktori, fizičko-hemijske karakteristike pesticida i zemljišta.

Usvajanje pesticida od strane biljke zavisi od fizičko-hemijskih karakteristika pesticida i zemljišta (vrednost pH, temperatura, sadržaj vlage i organske materije), vrste biljke, faze rasta i njene namene.

Transfer procesi se odnose na distribuciju pesticida između čvrste i tečne faze zemljišta (zemljište i zemljišni rastvor) ili između čvrste i gasovite faze (zemljište i vazduh koji se nalazi u zemljištu). Ovaj proces je ekvivalentan njihovoj pokretljivosti, najčešće previsoka pokretljivost pesticida dovodi do njihove smanjene efikasnosti kao i do zagađenja površinskih i podzemnih voda. Transfer pesticida sa jednog na drugo mesto u zemljištu može se odvijati adsorpcijom, isparavanjem, spiranjem, ispiravanjem ili usvajanjem.

2.2.7. Transformacija pesticida

Jedan od glavnih procesa gubitka pesticida nakon njihove primene je transformacija (degradacija). Aktivne materije pesticida u zemljištu podležu hemijskoj, mikrobiološkoj i fotohemijskoj degradaciji, pri čemu dolazi do promene hemijske strukture aktivne materije pesticida, odnosno njihove degradacije. Procesima transformacije moguće je formiranje toksičnijih degradacionih proizvoda pesticida, zbog čega je od velike važnosti ispratiti ovaj proces u zemljištu nakon primene pesticida (Aksu, 2005). Neka istraživanja su pokazala da biljne vrste kao što su pšenica, ovas i ječam mogu relativno brzo metabolisati pojedine pesticide (SU herbicide) do polarnih inaktivnih produkata (Sweetser i sar., 1982).

2.2.7.1. Hemijska i mikrobiološka degradacija pesticida

Hemijska degradacija (abiotička transformacija) pesticida najčešće uključuje reakcije hidrolize, jonizacije i/ili oksidacije/redukcije (Evangelou, 1998). Mikrobiološka degradacija (biotička transformacija) pesticida se dešava pod uticajem prisutnih organizama (gljive, bakterije i drugi specifični mikroorganizmi) u zemljištu. Jedna od ove dve degradacije može biti dominantna, u dosta slučajeva obe navedene degradacije učestvuju istovremeno u molekularnoj degradaciji pesticida.

U zemljištu, abiotička transformacija se javlja u tečnoj fazi (zemljišni rastvor) i na dodirnoj površini čvrsto-tečne faze. U zemljišnom rastvoru, hidroliza i redoks reakcije su češće abiotičke transformacije, katalizovane su glinom, organskom materijom i oksidima metala prisutnim u zemljištu. Reakcija hidrolize pesticida je pH zavisna i povezana je sa prisustvom molekula vode, H_3O^+ i OH^- jona, kao i vrednosti pK_a samog pesticida. Kao što je poznato, reakcija hidrolize slabo kiselih pesticida je pH zavisna i povezana je sa prisustvom vode u zemljištu (Bos i sar., 1995). Na postojanost pesticida u zemljištu pored njene vrednosti pH utiče i količina prisutne vode. Voda kao rastvarač i transportni agens, olakšava kako biološke tako i nebiološke procese i ponaša se kao reagens u hidrolitičkim reakcijama degradacije pojedinih pesticida (Hurle & Walker, 1980). Prethodna istraživanja ukazuju na znatno bržu degradaciju pesticida u mokrom zemljištu, u odnosu na suvo zemljište (Walker & Brown, 1983). U slučaju porasta sadržaja vode u zemljištu dolazi do brže degradacije pojedinih pesticida, što je potvrđeno smanjivanjem poluvremena njihove degradacije. Proizvodi hidrolize su najčešće više polarni nego polazna jedinjenja. Hidroliza nikosulfurona je bila intenzivnija u kiselim (>70%) ili neutralnim rastvorima, dok je njegova hidroliza bila slabijeg intenziteta sa povećanjem vrednosti pH rastvora (Sabadie, 2002). Pored toga, stepen hidrolize nikosulfurona je bio znatno slabijeg intenziteta na vrednosti pH rastvora od 8,0 do 10,0 (Sabadie, 2002). Schneiders i saradnici (1993) su zaključili da je stepen hidrolize rimsulfurona u puferovanim vodenim rastvorima takođe pH zavistan, kao i znatno jačeg intenziteta u kiseloj i neutralnoj sredini. Vrednost pH zemljišta (zemljišnog rastvora) znatno utiče na postojanost pesticida (slabe kiseline) u zemljištu, jer vodena stabilnost ovih pesticida zavisi od pH. Laboratorijske studije su pokazale bržu degradaciju SU (uglavnom kroz hemijsku hidrolizu) sa smanjenjem vrednosti pH zemljišta (Walker i sar., 1989). Pored toga, u drugim istraživanjima potvrđeno je smanjenje degradacije nikosulfurona u puferovanim vodenim rastvorima (na 30°C) od 1,39 do 346,5 dana, ako su se vrednosti pH vodenih rastvora povećavale od 4,0 do 11,0,

redom (Sabadie, 2002). Ovi podaci su u dobrom slaganju sa prethodnom dobijenim rezultatima koji jasno ukazuju na znatno bržu hidrolizu nikosulfurona sa smanjenjem vrednosti pH (Berger & Wolfe, 1996), što je potvrđeno i u drugim studijama za većinu SU herbicida (Beyer i sar., 1988; Brown, 1990). Slično, u sterilnom zemljištu u kojem je pH bila podešavana na šest različitih nivoa (pH 4,0 do 9,0) procenat smanjenja SU herbicida posle šest nedelja inkubacije iznosio je 90% i 10% za zemljište na pH 4,0 i pH 9,0, redom (Flom i sar., 1986).

Brzina oksido-redukcionih reakcija zavisi od vrednosti pH sredine i od vrednosti redoks potencijala ispitivanog pesticida. Jonizovani oblici pesticida se u pogledu adsorpcije i rastvorljivosti značajno razlikuju od neutralnih molekula. Jonizovani oblici pesticida se u većem stepenu adsorbuju i njihova rastvorljivost je veća u odnosu na neutralne forme.

Pesticidi u zemljištu mogu da deluju na mikroorganizme tako što menjaju njihovu brojnost, aktivnost i ritam razmnožavanja. Direktnim delovanjem, pesticidi mogu da smanje propustljivost citoplazmatičnih membrana i na taj način naruše procese katabolizma, disanja i sinteze organskih jedinjenja unutar ćelija nedegadirajućih mikroorganizama i da izazovu njihovu smrt. Stoga, aktivna mikrobiološka populacija zemljišta predstavlja indikator kvaliteta zemljišta koji reaguje na promene u zemljištu (Nannipieri i sar., 2002). Indirektnim delovanjem pesticida u zemljištu moguće je narušavanje nekih osnovnih životnih funkcija kod mikroorganizama kao što je biosinteza proteina (smanjen rast) i struktura ćelijskih membrana (narušava se odnos van i unutar ćelijskih enzima) i dr. Efekti pesticida na mikroorganizme mogu se proceniti na nivou cele zajednice (npr. respiracija, enzimska aktivnost, biomasa, ukupan broj bakterija, i dr.), ili na nivou pod-zajednica (npr. specifična fiziološka ili filogenetska grupa). Biotičke transformacije pesticida u zemljištu se mogu podeliti na biorazgradnju (pesticidi se koriste kao podloga za rast mikroorganizama), kometabolizam (pesticidi se transformišu od strane mikroorganizama i koriste kao izvor energije), akumulaciju (pesticidi se akumuliraju u mikroorganizmima), polimerizaciju (pesticidi se vezuju za druge organske molekule) i nastajanje sekundarnih efekata pri mikrobiološkoj aktivnosti (pesticidi se transformišu sekundarnim mikrobiološkim procesima, kao što su pH i redoks reakcije) (Bollag i sar., 1990). Ove reakcije se dešavaju pod uticajem mikroorganizama, a u pojedinim slučajevima su uključene i abiotičke transformacije, posebno u transformacijama koje se odnose na polimerizaciju i nastajanje sekundarnih efekata pri mikrobiološkoj aktivnosti.

Kao što je ranije rečeno, zemljište karakteriše heterogenost u fizičkim-hemijskim i strukturnim karakteristikama i ono pruža različita mikro-staništa za mikrobiološki svet. Distribucija zemljišnih mikroorganizama varira horizontalno i vertikalno, a najveća zastupljenost mikroorganizama je u površinskom sloju (0-10 cm). Sa dubinom u zemljištu opada sadržaj organske materije kao i sadržaj organskog ugljenika koji predstavljaju izvor energije za veći deo mikroorganizama zemljišta, zbog čega sa dubinom u zemljištu opada i prisutnost mikroorganizama. Zbog moguće biotičke transformacije pesticida od velike važnosti je poznavanje prostorne distribucije mikroorganizama u zemljištu.

U zemljištu, biorazgradnja je jedan od procesa nestajanja pesticida i kontrolisana je biotičkim faktorima (npr. mikrobiološka aktivnost) i nizom fizičko-hemijskih procesa kao što su difuzija, adsorpcija i desorpcija (Chen i sar., 2009). Ukoliko se dešava degradacija pesticida mikroorganizmima koji su u stanju da koriste pesticid kao izvor ugljenika i energije za rast, ovaj proces je poznat kao proces mineralizacije. Ovaj metabolički proces rezultira porastom mikroorganizama uz potpuno nestajanje pesticida i njegovo pretvaranje u ugljen dioksid, vodu i mineralne materije.

Bioraspoloživost pesticida za biotičke transformacije zavisi od različitih faktora, uključujući fizičke karakteristike sorbenta u zemljištu (npr. oblik čestica, veličinu i unutrašnju poroznost), hemijska svojstva sorbata i sorbenta i biološke faktore (npr. mikrobiološka zastupljenost). Generalno, pretpostavka je da su adsorbovana jedinjenja manje dostupna za degradirajuće mikroorganizme, koji prvenstveno koriste pesticide u vodenoj fazi. U tom smislu, pesticid je dostupan za biorazgradnju samo nakon desorpcije pesticida sa površine zemljišta, i njegove difuzije u zemljišni rastvor. Adsorbovani pesticidi su više zaštićeni od mikrobiološkog napada kao rezultat zaštite pesticida u organo-hemijskom matriksu zemljišta (Ainsworth i sar., 1993). Osim toga, organska materija zemljišta utiče na procese adsorpcije i stoga, utiče i na dostupnost pesticida mikroorganizmima koji ih degradiraju (Benoit i sar., 1999). Nicholls (1991) je u svojim istraživanjima utvrdio ubranu biotičku transformaciju pesticida kod neutralnog tipa zemljišta, a kao razlog navodi prisustvo specifičnih mikroorganizama. Mikroorganizmi ispoljavaju značajne katalitičke efekte u površinskoj sloju ispitivanog zemljišta, čak ako su prisutni i u maloj količini. Njihovo delovanje je još izraženije uz prisustvo veće količine vode u zemljištu.

Klimatski uslovi i temperatura mogu imati uticaj na stepen hidrolize pesticida u matriksima životne sredine (Agüera López i sar., 2014). Na stepen abiotičkih i biotičkih procesa u zemljištu

veliki uticaj ima i temperatura (Hurle & Walker, 1980). Stepen transformacije pesticida putem hemijske hidrolize i mikrobioloških procesa očekivano raste sa porastom temperature (Oppong & Sagar, 1992; James i sar., 1995).

U polju, na biotičku transformaciju pesticida, pored unutrašnjih faktora u zemljištu (npr. temperatura, prisustvo kiseonika, naelektrisanje, dostupnost vode, vrednost pH zemljišnog rastvora i dr.), utiče prisustvo drugih kontaminanata koji imaju tendenciju kako za adsorpciona mesta u zemljištu tako i za potencijalno degradirajuće mikroorganizme i na taj način će biti smanjena biotička transformacija pesticida (Haws i sar., 2006).

2.2.7.2. Fotodegradacija pesticida

Fotohemijska degradacija (fotoliza) pesticida predstavlja degradaciju aktivne materije pesticida pod dejstvom sunčeve svetlosti. Proces fotodegradacije se smatra važnim procesom razgradnje pesticida, a ovaj proces se odvija na površini zemljišta, u vazduhu ili na listu tretirane biljke (Headley i sar., 2010). U zemljištu ovaj proces može biti direktan ili indirektan. U direktnom procesu fotolize, sunčevu svetlost direktno apsorbuje aktivna materija pesticida, zbog čega mu se menja hemijska struktura. Kod indirektno fotolize, prvo dolazi do apsorpcije fotona od strane drugih molekula (intermedijera, npr. nitrati ili huminske kiseline), a potom do transfera energije ciljanoj aktivnoj materiji pesticida. Brzina reakcije indirektno fotolize zavisi od energije potrebne za degradaciju pesticida, prisustva intermedijera (fotosenzitera) koji omogućavaju proces indirektno fotolize i od inteziteta zračenja. Faktori koji utiču na fotolizu pesticida su vreme trajanja izlaganja pesticida, intezitet sunčevog zračenja i karakteristike pesticida.

2.3. Herbicidi

Ideja o primeni herbicida u poljoprivredi počinje krajem XIX veka, kada su zapažena herbicidna svojstva nekih neorganskih jedinjenja, kao što su fero-sulfat, bakar-sulfat i natrijum-nitrat. Ubrzan razvoj prirodnih nauka u XIX veku, omogućio je stvaranje osnove za razvoj herbicida. Prvi selektivni herbicidi (2,4-D, MCPA i 2,4,5-T) bili su namenjeni za suzbijanje širokolisnih korova u usevima žita. Od tog vremena do danas sintetizovan je veliki broj organskih jedinjenja. Oni su našli primenu u poljoprivredi za kontrolu velikog broja korova i trava. Herbicidi mogu delovati i na gajenu biljku (usev). Od izuzetnog značaja je poznavati kako, kada, i pod kojim uslovima herbicid deluje na korovsku i gajenu biljku. Njegovo delovanje nastupa

često u određenim fazama razvoja biljne vrste, a zavisi i od ekoloških uslova. Od ukupne potrošnje pesticida u poljoprivredi oko 50% predstavljaju herbicidi (Seccia i sar., 2011).

Herbicidi se klasifikuju u grupe na osnovu hemijske sličnosti, ili kako je predložio Herbicide Resistance Action Committee (HRAC), u skladu sa mestom i načinom delovanja (Tabela 2.4) (Schmidt, 1997). Prema hemijskom sastavu herbicidi mogu biti neorganskog i organskog porekla. Herbicidi neorganskog porekla su se primenjivali u početnom periodu zaštite bilja, dok se danas gotovo isključivo primenjuju herbicidi na bazi organskih jedinjenja.

Tabela 2.4. Klasifikacija herbicida prema mehanizmu delovanja (Schmidt, 1997)

Grupa po HRAC ¹	Mehanizam delovanja	Hemijska grupa	WSSA ² grupa
A	Inhibitori acetil-CoA karboksilaze	Ariloksi fenoksi propionati Cikloheksandioni	1
B	Inhibitori acatolaktat sintetaze (ALS)	Sulfoniluree Imadazolinoni Triazolopirimidini Pirimidiniltiobenzodati	2
C1	Inhibitori fotosinteze u fotosistemu II	Triazini Triazinoni Uracil Fenilkarbamati	5
D	Inhibitori transporta elektrona u fotosistemu I	Dipiridini	22
F ₃	Inhibitori biosinteze karotenoida	Triazoli Izoksazolidinoni Feniluree	11 13 11
K ₂	Inhibitori mitoze	Karbamati Benzil etri	23 27
K ₃	Inhibitori deobe ćelija	Hloracetamidi Karbamati Acetamidi Benzamidi Oksiacetamidi	15
L	Inhibitori biosinteze celuloze	Nitrili Benzamidi	20 21
N	Inhibitori biosinteze lipida	Tiokarbamati Fosforditionati Benzofurani Hlorkarbonske kiseline	8 26

¹ HRAC - Herbicide Resistance Action Committee

² WSSA - Weed Science of America

Prema karakteru dejstva na biljke, herbicidi se dele na totalne herbicide (uništavaju sve biljke) i selektivne herbicide (uništavaju samo određene vrste biljaka, korovske biljke). Međutim, prema načinu delovanja herbicidi se mogu podeliti na herbicide kontaktnog dejstva i translokacione herbicide. Herbicidi kontaktnog dejstva, deluju pri direktnom kontaktu na nadzemne delove biljke i na taj način narušavaju životne procese u biljci, nakon čega se uništavaju samo oni delovi biljke sa kojima je herbicid bio u kontaktu. Translokacioni herbicidi ili herbicidi sistemičnog dejstva se prenose sprovodnim sistemima po organizmu biljke. Apsorbuju se brzo i prenose po celom organizmu biljke, nakon čega izazivaju njeno uništavanje.

Glavni mehanizam delovanja različitih grupa herbicida često se razmatra preko njihovog delovanja na disanje, intermedijarni metabolizam, različite sinteze (nukleinskih kiselina, proteina i lipida) i fotosintezu.

U zavisnosti od vremena primene, postoje herbicidi koji se koriste pre sejanja useva (eng. presowing), pre nicanja useva (eng. preemergence) i posle nicanja useva (eng. postemergence).

Biohemijski i fiziološki procesi u biljci su izuzetno složeni, međusobno isprepletani i veoma povezani. Kako bi se razumeo mehanizam delovanja herbicida, potrebno je poznavati biohemijske procese u biljci. Ovo je jedan od razloga zbog čega se isti herbicidi, prema mehanizmu delovanja, često svrstavaju u različite grupe, jer se njihov efekat ispoljava na dva ili više mesta unutar biljke. Primarno mesto delovanja herbicida je teško utvrditi s obzirom na različite efekte delovanja u biljci nakon primene.

Prema mehanizmu delovanja možemo razvrstati herbicide u šest grupa i to: 1) inhibicija fotosinteze (transport elektrona, sinteze ATP, fotosintetskih pigmenata, metabolizma ugljenika); 2) inhibicija biosinteze pigmenata; 3) inhibicija biosinteze lipida; 4) inhibicija biosinteze aminokiselina; 5) inhibicija deobe ćelija; 6) inhibicija aktivnosti auksina.

Sulfoniluree (SU) su grupa supstituisanih urea razvijenih početkom 1970. godine. Glavne podgrupe su pirimidinil SU i triazinil SU. Ova grupa herbicida je veoma efikasna u suzbijanju korova zbog njihovog širokog spektra delovanja, male rezidualne aktivnosti, široke mogućnosti primene, i male toksičnosti za sisare (Brown, 1990; Perucci i sar., 1999; Yan i sar., 2014; Pang i sar., 2016).

2.4. Sulfoniluree

Ovi herbicidi, su snažni inhibitori acatolaktat sintetaze (ALS) tj. acetohidroksi-kisele sintetaze (AHAS) i uvedeni su u upotrebu kasnih sedamdesetih godina prošlog veka. Ovaj enzim je prisutan u biljkama, gljivama, kvascima i algama (Duggleby & Pang, 2000). Od samog početka njihove primene izazvali su veliko interesovanje od strane proizvođača i potrošača. Zahvaljujući svojim specifičnostima (mala količina primene, niska toksičnost za sisare, selektivnost za mnoge useve, širok spektar dejstva na korove i visoka efikasnost) našli su široku primenu u poljoprivredi (Volenberg i sar., 2001). Od 15 hemijskih grupa kojima pripadaju inhibitori acatolaktat sintetaze, samo pet su komercijalizovane kao herbicidi, a to su: sulfoniluree (SU) (Graham-Bryce i sar., 1980; Chaleff & Mauvais, 1984, European Union, 2002), imidazolinoni (Manley i sar., 1999), triazolopirimidini (Gerwick i sar., 1990), sulfonilaminokarboniltriazolinoni (Santel i sar., 1990) i piridiniltiobenzoati (Stidham i sar., 1991). Iako su navedene grupe strukturno različite, one imaju isti mehanizam delovanja, inhibiraju acatolaktat sintetazu (ALS) (Bos i sar., 1995).

Prve sulfoniluree su bile derivati triazinskih jedinjenja, te su njihova svojstva i aktivnost upoređivani sa izvornim triazinskim herbicidima. Prva istraživanja u oblasti sulfonilurea su vezana za ime holandskog istraživača Koog-a, koji je sredinom 1966. godine dokazao postojanje herbicidne aktivnosti sulfonilurea i to patentirao. Istraživanja je nastavio George Levitt 1970. godine i utvrdio da sulfoniluree (Slika 2.6) imaju slabu herbicidnu aktivnost u količini od 2 kg ha⁻¹ (Sauers & Levitt, 1984, Janjić, 2003).



Slika 2.6. Strukturna formula sulfoniluree prema Levitt-u

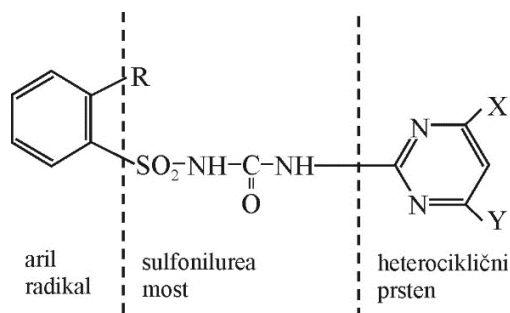
Utvrđeno je da se uvođenjem različitih supstituenata u oba fenil prstena, znatno povećava herbicidna aktivnost dobijenih jedinjenja. Tako je Levitt sa svojim saradnicima sintetizovao jedinjenja koja su imala 100 puta veću aktivnost nego konvencionalni herbicidi (Slika 2.7), a daljnim istraživanjima u pogledu variranja strukture dobijene su još aktivnije sulfoniluree (Janjić, 2003).

Molekuli herbicida SU sastoje se od aril radikala (fenil, naftil, tiofen, furan i piridin), heterocikličnog prstena (pirimidina, triazina, triazola) i sulfonilurea mosta (Slika 2.8) koji zajedno imaju veoma važnu ulogu kod određivanja aktivnosti herbicida (Tabela 2.5) (Janjić,

2003). Herbicidna aktivnost ne zavisi samo od prirode sulfonilurea grupe, nego i od položaja ove grupe u odnosu na druge supstituente u aril radikal.



Slika 2.7. Povećavanje aktivnosti sulfonilurea zamenom anilina sa aminopirimidinom
Kada je u pitanju fenil grupa, najjaču herbicidnu aktivnost imaju jedinjenja kod kojih je supstituent u orto položaju u odnosu na sulfonilurea most. Visoku herbicidnu aktivnost imaju jedinjenja kod kojih je heterociklični prsten, simetrični prsten pirimidina ili triazina, koji sadrži alkil i alkoksi supstituent u položaju X i Y (Budimir & Gašić, 1997).



Slika 2.8. Strukturna formula sulfoniluree

Za sulfoniluree je karakterističan visok podeoni koeficijent u sistemu oktanol-voda (K_{ow}) pri vrednosti $pH \approx 5$ i veoma nizak napon pare kao i mala (do srednja) rastvorljivost u vodi pri neutralnoj vrednosti pH.

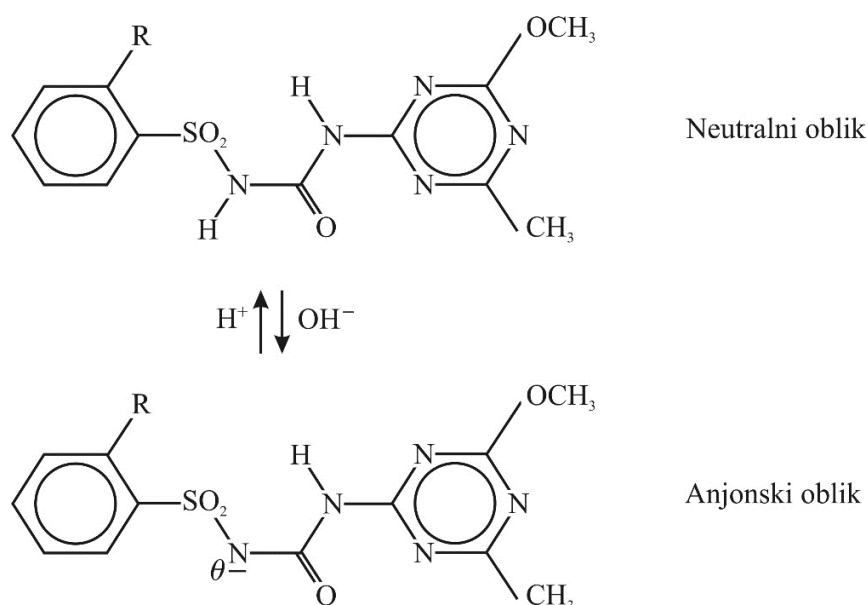
Tabela 2.5. Prikaz hemijskog sastava sulfonilurea herbicida i nivoa aktivnosti u zavisnosti od aril grupe i hemijskog sastava sulfonilurea mosta

Aril radikal	Nivo aktivnosti ($g\ ha^{-1}$)
CO_2CH_3	1-2
NO_2	4-8
SO_2CH_3	8-16
Cl	8-16
CO_2H	> 400
OH	> 2000
Sulfonilurea most	
$-SO_2NHCONH-$	1-2
$-CH_2SO_2NHCONH-$	8-16
$-SO_2NHCON(CH_3)-$	16-31
$-OSO_2NHCONH-$	31-62

Sa povećanjem pH vrednosti u sistemu oktanol-voda (K_{OW}) povećava se rastvorljivost sulfonilurea u vodi, odnosno smanjuje se podeoni koeficijent (Janjić, 2003).

Ovi herbicidi zbog niskog napona pare su neisparljiva jedinjenjima. SU su slabe kiseline, i četiri jedinjenja koja će biti ispitivana u disertaciji (nikosulfuron, rimsulfuron, oksasulfuron i prosulfuron) imaju pK_a vrednosti od 3-5 (Schmuckler i sar., 2000, United States Department of Agriculture - Agricultural Research Service (USDA-ARS), 2001).

U neutralnom i alkalnom zemljištu SU bi trebalo da su više zastupljene u anjonskom obliku (Slika 2.9) (Beyer i sar. 1988).



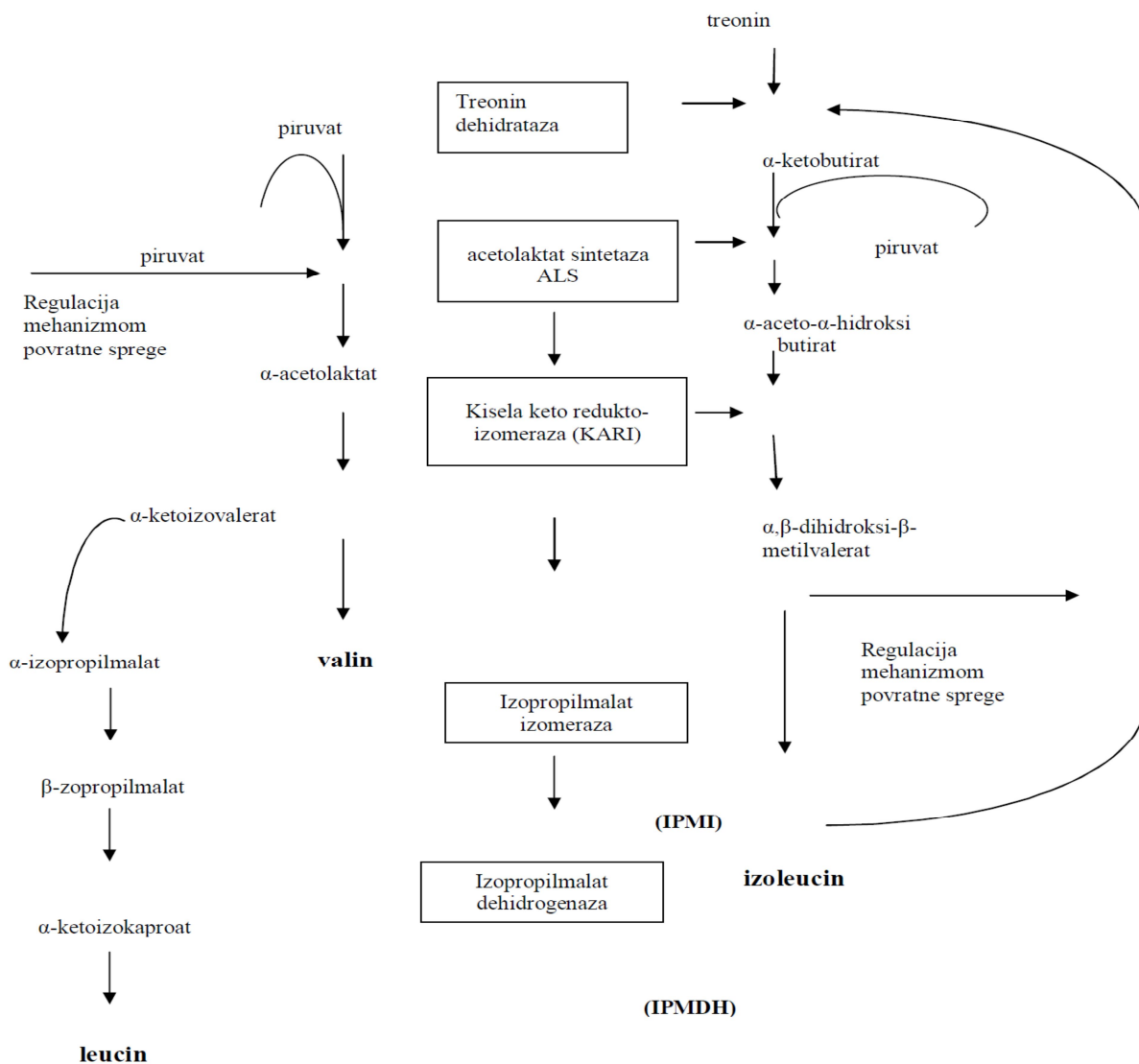
Slika 2.9. Molekulska struktura sulfonilurea herbicida u neutralnom i anjonskom obliku

Sulfoniluree se primenjuju pre i posle nicanja useva, apsorbuju se podzemnim i nadzemnim biljnim delovima i prenose do meristemskih tkiva, akropetalno i bazipetalno. Nivo apsorpcije zavisi od: faze razvoja biljke, temperature vazduha, vlažnosti zemljišta, dodatka đubriva, kombinacije sa drugim herbicidima, biljne vrste kao i načina primene herbicida (Casida & Lykken, 1969). Inhibicija sinteze aminokiselina u biljkama je relativno nov mehanizam delovanja herbicida. Acetolaktat sintetaza (ALS) je prvi zajednički enzim u biosintezi aminokiselina valina, leucina i izoleucina, koji katalizuje dve paralelne reakcije (Slika 2.10) (Monaco i sar., 2002).

Prva reakcija je kondenzacije dva molekula piruvata u α -acetolaktat, a druga reakcija predstavlja spajanje molekula piruvata sa molekulom α -ketobutirata u α -aceto- α -hidroksibutirat (Monacco i sar., 2002, McCourt & Dugleby, 2006). Acetolaktat sintetaza je prekursor u sintezi

valina i leucina, dok je α -aceto- α -hidroksibutirat prekursor u sintezi izoleucina (Eberlein i sar., 1997). SU herbicidi onemogućavaju da enzim ALS katalizuje navedene reakcije. Primarni željeni efekat za korovsku biljku podrazumeva onemogućenu sintezu aminokiselina (valin, leucin i izoleucin) tj. zaustavljenu sintezu proteina u mladim delovima korovske biljke, a zbog umanjene sinteze proteina dolazi do inhibicije deobe ćelija.

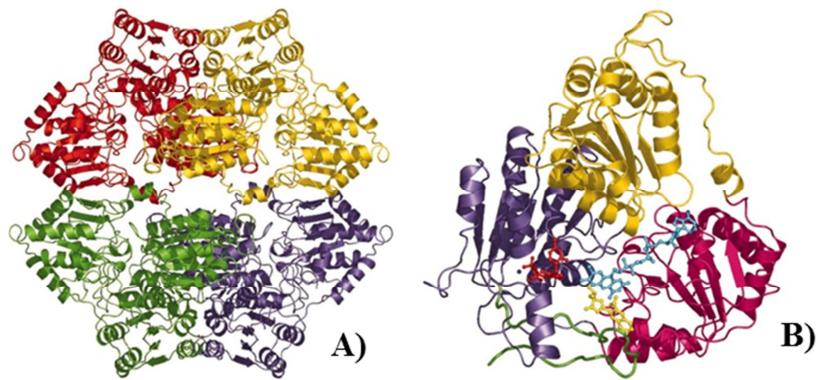
Slabija efikasnost SU herbicida je primećena kod odraslih korovskih biljka, što se može objasniti činjenicom da njihova tkiva imaju veće rezerve proteina i za procese metabolizma mogu u izvesnom stepenu nadoknaditi potrebe za aminokiselinama iz rezervi na neko kraće vreme.



Slika 2.10. Biosinteza aminokiselina leucina, valina i izoleucina u hloroplastima

Pored primarnih efekata mogući su i sekundarni efekti na osetljivim korovskim biljkama kao što su oštećenja u vidu nekroze apikalnih meristema, koja dalje zaustavljaju rast korovske biljke u slučaju njihove primene preko zemljišta, dok pri folijarnoj primeni dovode do pojave ljubičaste boje duž središnjeg lisnog nerva na biljci (Lovell i sar., 1996). Svi navedeni efekti su uključeni u mehanizme koji dovode do uginuća korovskih biljaka. Efikasnost i selektivnost sulfonilurea herbicida je zasnovana na različitoj brzini metabolizma za različite korovske biljke.

Najčešće, većina AHAS enzima koji su poznati imaju katalitičku podjedinicu (~65kDa) i manju regulatornu podjedinicu koja varira u veličini između 9-54 kDa u zavisnosti od porekla (McCourt & Dugleby, 2006) (Slika 2.11).



Slika 2.11. Opšti prikaz *Arabidopsis thaliana* AHAS. A) Tetramerska struktura sa svojim monomerima B) Pojedinačne podjedinice α (86-280), β (281-451) i γ (463-639) su prikazane na slici u obojeno žuto, crveno i plavo, redom. C-terminalni ostatak je obojen zeleno. ThDP, Mg, i FAD su prikazani kao lopta- i štapić- modeli i obojeni su crveno, tamno plavo, cijano i žuto, redom.

Za funkcionisanje enzima neophodne su obe podjedinice (Zohar i sar., 2003). U biljkama je AHAS prisutan u veoma malim koncentracijama (kod ječma oko 0,005% od ukupnih proteina).

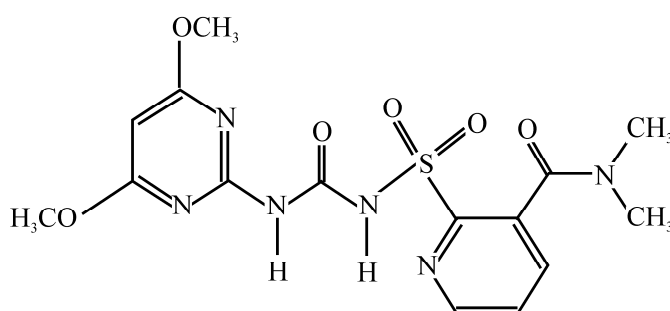
U Evropskoj Uniji (EU) nikosulfuron, rimsulfuron, prosulfuron i oksasulfuron su registrovani i uključeni u Aneks I Direktive 91/414/EEC (Council Directive 91/414/EEC, 1991). Prema mehanizmu delovanja klasifikovani su u grupu B herbicidnih jedinjenja od strane Herbicide Resistance Active Committee (HRAC). Navedene aktivne materije su u Republici Srbiji registrovane u sredstvima za zaštitu bilja i nalaze se u prometu (Biljni lekar, 2015).

2.4.1. Nikosulfuron

Nikosulfuron pripada klasi pirimidinil SU, a pripada grupi sistematskih herbicida koji deluju tako što se apsorbuju listom i korenom. Koristi se za kontrolu višegodišnjih travnastih korova

(*Elymus repens*, *Sorghum halepense*), jednogodišnjih korova (*Alopecurus myosuroides*, *Poa annua*, *Lolium spp.*, *Setaria spp.*, *Digitaria spp.*, *Echinochloa crus gall*) i širokolisnih korova (*Chenopodium album*, *Matricaria chamomilla*, *Stellaria media*, *Solanum nigrum*, *Amaranthus spp.*, *Galium aparine*, *Polygonum spp.*, *Sinapis*).

Sintetizovan je 1990. godine od strane E.I. Du Pont de Nemours and Co. (Švajcarska) i Ishihara Sangyo Kaisha (Japan) (E.I. du Pont de Nemours and Company, 2005). Hemijska struktura nikosulfurona prikazana je na slici 2.12, dok su neki fizičko-hemijski parametri dati u tabeli 2.6 (MacBean, 2012).



Slika 2.12. Strukturna formula nikosulfurona

Akutna srednja oralna i dermalna letalna doza (LD_{50}) za miševе je veća od 5000 mg kg^{-1} i 2000 mg kg^{-1} , redom, dok je inhalaciona (LC_{50} , 4 h) za pacove veća od $5,47 \text{ mg dm}^{-3}$ vazduha.

Tabela 2.6. Fizičko-hemijske karakteristike nikosulfurona

Izgled	Bezbojni kristali	
Naziv po IUPAC-u	2-[(4,6-dimethoxypyrimidin-2-yl) carbamoylsulfamoyl] -N,N-dimethylpyridine-3-carboxamide	
Molekulska formula	$C_{15}H_{18}N_6O_6S$	
Molekulska masa	$410,4 \text{ g mol}^{-1}$	
Rastvorljivost (25°C)	voda	$0,07 \text{ g dm}^{-3}$ (pH 7)
	dihlormetan	160 g dm^{-3}
	hlороform, DMF	64 g dm^{-3}
	acetonitril	23 g dm^{-3}
	n- heksan	$<0,02 \text{ g dm}^{-3}$
	aceton	18 g dm^{-3}
	etanol	$4,5 \text{ g dm}^{-3}$
Tačka topljenja	$169-172^{\circ}\text{C}$	
Napon pare	$<8 \times 10^{-7} \text{ mPa}$	
Henry-eva konstanta	$<1,48 \times 10^{-11} \text{ Pa m}^3\text{mol}^{-1}$	
pK_a	4,6	
Koeficijent raspodele oktanol-voda (K_{ow})	0,44 (pH 5); 0,02 (pH 7)	

Primenjuje se u granicama 35-70 g ha⁻¹, što je mnogo manje u odnosu na druge prethodno primenjivane herbicide (nekoliko kg ha⁻¹).

Toksičnost nikosulfurona za neke vodene organizme (u mg L⁻¹) iznosi: zelene alge (EC₅₀, 72 h) > 0,182, dafnije (LD₅₀, 48 h) >1000, kalifornijska pastrmka i plavoškrga sunčanica (LD₅₀, 96 h) >1000. Ukoliko je sadržaj nikosulfurona veći od 2250 mg kg⁻¹ on postaje toksičan za ptice i kontaktno za pčele, (LC₅₀, 48h) > 20 µg po pčeli (Mitić & Kecman, 2010).

Nikosulfuron pripada trećoj grupi otrova (postaje opasan samo ako je njegov sadržaj veći od 2000 mg kg⁻¹ kada je u kontaktu sa kožom čoveka) prema Svetskoj zdravstvenoj organizaciji (engl. World Health Organization, WHO) (Mitić & Kecman, 2010, MacBean, 2012).

U zemljištu pod aerobnim uslovima nikosulfuron dokazano ima vrlo nisku perzistentnost. Degradacijom se proizvodi pet metabolita (HMUD¹, ADMP², ASDM³, AUSN⁴ i UCSN⁵). (European Food Safety Authority (EFSA), 2007). Nijedan od navedenih metabolita ne smatra se dovoljno važnim u pogledu toksičnosti za sisare kao i praćenje prema trenutno vodećim EU dokumentima (European Food Safety Authority (EFSA), 2007).

Degradacija nikosulfurona u zemljištu pod anaerobnim uslovima je sporija u odnosu na degradaciju pri aerobnim uslovima (European Food Safety Authority (EFSA), 2007). U pojedinim istraživanjima vreme poluraspada u aerobnim uslovima (DT₅₀) u zemljištu je iznosilo od 24-43 dana (20⁰C), a vreme za koje se raspadne 90% od ukupne količine nikosulfurona (DT₉₀) je iznosilo od 80-143 dana (20⁰C). U vodi DT₅₀ je iznosilo 15 dana (pH 5, 20⁰C) (MacBean, 2012).

2.4.2. Rimsulfuron

Rimsulfuron (Slika 2.13) je sistematski folijarni herbicidi koji se translocira u celu biljku i koncentriše u različitim delovima u biljci tokom njenog rasta.

Ovaj herbicid se primenjuje za suzbijanje jednogodišnjih i višegodišnjih travnih korova, kao i nekih širokolisnih korova, pre i posle nicanja u kukuruzu, paradajzu i krompiru. Inicijalni simptomi toksičnog delovanja rimsulfurona pojavljuju se na ćelijama meristema tretiranih korovskih biljaka. Za razliku od nikosulfurona ovaj herbicid ima delovanje i preko zemljišta.

¹ HMUD: 2-[(4-hydroxy-6-methoxypyrimidin-2-yl)carbamoyl]sulfamoyl]-N,N-dimethylpyridine-3-carboxamide;

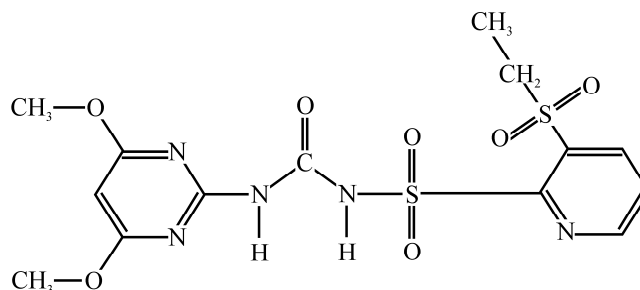
² ADMP: 4,6-dimethoxypyrimidin-2-amine

³ ASDM: N,N-dimethyl-2-sulfamoylpyridine-3-carboxamide;

⁴ AUSN: 2-[(carbamimidoylcarbamoyl)sulfamoyl]-N,N-dimethylpyridine-3-carboxamide

⁵ UCSN: 2-[(carbamoylcarbamoyl)sulfamoyl]-N,N-dimethylpyridine-3-carboxamide

Herbicidna aktivnost rimsulfurona zavisi od osetljivosti korova, vrednosti pH zemljišta, procenta organske materije i temperature zemljišta.



Slika 2.13. Strukturna formula rimsulfurona

Ovim herbicidom uspešno se suzbijaju sledeće korovske biljke: *Alopecurus myosuroides*, *Avena fatua*, *Digitaria sanguinalis*, *Echinochloa crus-galli*, *Lolium multiflorum*, *Panicum capillare*, *Poa annua*, *Setaria glauca*, *Setaria viridis*, *Amaranthus retroflexus*, *Stellaria media* (svi od kotiledona do četiri lista).

Prvi put rimsulfuron je registrovan 1991. godine od strane E.I. Du Pont de Nemours and Co. Primenjuje se najčešće u količini od 15 g ha⁻¹. U tabeli 2.7 prikazane su neke fizičko-hemijske osobine rimsulfurona (MacBean, 2012).

Tabela 2.7. Važnije fizičko-hemijske karakteristike rimsulfurona

Izgled	Bezbojni kristali	
Naziv po IUPAC-u	1-(4,6-dimethoxypyrimidin-2-yl)-3-(3-ethylsulfonyl-2-pyridylsulfonyl)urea	
Molekulska formula	C ₁₄ H ₁₇ N ₅ O ₇ S ₂	
Molekulska masa	431,4 g mol ⁻¹	
Rastvorljivost (25 ⁰ C)	voda (nepuferovana)	< 10 mg L ⁻³
	voda (puferovana pH 7)	7,3 g dm ⁻³
Tačka topljenja	172-173 ⁰ C	
Napon pare	1,5 x 10 ⁻³ mPa (25 ⁰ C)	
Henry-eva konstanta	8,3 x 10 ⁻⁸ Pa m ³ mol ⁻¹	
pKa	4,0	
Koeficijent raspodele oktanol-voda (K _{OW})	0,0345 (pH 7, 25 ⁰ C)	

Oralna toksičnost (LD₅₀) rimsulfurona za pacove je veća od 5000 mg kg⁻¹, a dermalna LD₅₀ za kuniće je veća od 2000 mg kg⁻¹, dok je inhalaciona toksičnost LC₅₀ (4 sata) za pacove >5,4 mg dm⁻³ vazduha. Toksičnost rimsulfurona za organizme u vodi (mg L⁻¹) iznosi: alge (EC₅₀) ukoliko je veća od 1,6, dafnije (LD₅₀, 48 h) >360, kalifornijska pastrmka i plavoškrva sunčanica (LD₅₀, 96 h) > 390; šaran > 900; grgorac > 2000. Ukoliko je sadržaj rimsulfurona veći od 2250 mg kg⁻¹

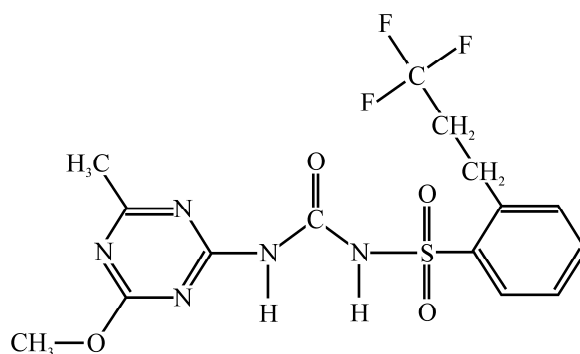
postaje toksičan za ptice i divlje patke, a za pčele (LC₅₀) kontaktno >100 µg po pčeli (Mitić & Kecman, 2010). WHO rimsulfuron svrstava u U grupu otrova (malo verovatno da predstavlja akutnu opasnost za čoveka, ukoliko je njegov sadržaj > 5000 mg kg⁻¹) (Mitić & Kecman, 2010).

Degradacija rimsulfurona hemijskim putem je u pojedinim istraživanjima bila brza u zemljištu, dok je mikrobiološka degradacija bila manje izražena (MacBean, 2012). Brzina degradacije zavisila je od vrednosti pH zemljišta. Poluvreme raspada u zemljištu se kretalo od 10-20 dana (25⁰C, laboratorijska studija) (MacBean, 2012).

Glavni metaboliti rimsulfurona u zemljištu su IN-70941¹, IN-70942² i IN-E9260³ (European Food Safety Authority (EFSA), 2005).

2.4.3. Prosulfuron

Aktivna materija prosulfuron (Slika 2.14) ima širok spektar delovanja na jednogodišnje i višegodišnje širokolisne korove.



Slika 2.14. Strukturna formula prosulfurona

Svetska zdravstvena organizacija (WHO) prosulfuron svrstava u III grupu otrova (Mitić & Kecman, 2010). Važniji fizičko-hemijski parametri prosulfurona su dati u tabeli 2.8 (MacBean, 2012). Prosulfuron je registrovan 1994. godine od strane Ciba-Geigy (sada Syngenta AG). Primenjuje se najčešće u količini od 12-30 g ha⁻¹.

Prosulfuron se apsorbuje listom i korenom i transportuje ksilemom i fleomom do ćelija meristema u korovskoj biljci. Spada u grupu selektivnih translokacionih i folijarnih herbicida sa rezidualnim delovanjem. Primenjuje za suzbijanje sledećih jednogodišnjih i višegodišnjih širokolisnih korova: *Ambrosia artemisifolia*, *Amaranthus retroflexus*, *Bilderdycia convolvulus*,

¹ IN-70941: N-(4,6-dimethoxy-2-pyrimidinyl)-N-[3-(ethylsulfonyl)-2-pyridinyl]urea

² IN-E9260: 3-(ethylsulfonyl)-2-pyridinesulfonamide

³ IN-70942: N-[3-(ethylsulfonyl)-2-pyridinyl]-4,6-dimethoxy-2-pyrimidinamine

Chenopodium album, *Ch. hybridum*, *Datura stramonium*, *Marticaria chamomilla*, *Polygonum aviculare*, *Sinapis arvensis* i *Xanthium strumarium*.

Oralna toksičnost (LD₅₀) prosulfurona za pacove je veća od 986 mg kg⁻¹, a dermalna LD₅₀ za kuniće je >2000 mg kg⁻¹, dok je inhalaciona toksičnost LC₅₀ (4 sata) za pacove >5000 mg m⁻³ vazduha.

Tabela 2.8. Važnije fizičko-hemijske karakteristike prosulfurona

Izgled	Bezbojni kristali	
Naziv po IUPAC-u	1-(4-methoxy-6-methyl-1,3,5-triazin-2-yl)-3-[2-(3,3,3-trifluoropropyl)phenylsulfonyl]urea	
Molekulska formula	C ₁₅ H ₁₆ F ₃ N ₅ O ₄ S	
Molekulska masa	419,4 g mol ⁻¹	
Rastvorljivost (25 ⁰ C)	voda (pH 4.5)	29 mg dm ⁻³
	voda (puferovana pH 7)	7,3 g dm ⁻³
	voda (puferovana pH 5,0)	87 mg dm ⁻³
	voda (puferovana pH 6,8)	4000 mg dm ⁻³
	etanol	8,4 g dm ⁻³
	acetone	160 g dm ⁻³
	toluen	6,1 g dm ⁻³
	n-heksan	0,0064 g dm ⁻³
dihlormetan	180 g dm ⁻³	
Tačka topljenja	155 ⁰ C	
Napon pare	<3,5 x 10 ⁻³ mPa (25 ⁰ C)	
Henry-eva konstanta	<3 x 10 ⁻⁴ Pa m ³ mol ⁻¹	
pKa	3,76	
Koeficijent raspodele oktanol-voda (K _{OW})	0,0899 (pH 7, 25 ⁰ C)	

Toksičnost prosulfurona za neke vodene organizme (mg L⁻¹) iznosi: zelene alge (EC₅₀) ukoliko je veća od 0,11, dafnije (LD₅₀, 48 h) >120, račiče (LD₅₀, 96 h) >150, kalifornijska pastrmka, šaran i som >100.

U zemljištu degradacijom prosulfurona je moguće nastajanje metabolita: CGA150829¹, CGA300406², CGA349707³, CGA325025⁴ (European Food Safety Authority (EFSA), 2014). Prema dosadašnjim raspoloživim podacima, navedeni metaboliti nisu pokazali toksičnost za sisare (European Food Safety Authority (EFSA), 2014). Poluvreme degradacije prosulfurona u zemljištu se kretalo u pojedinim istraživanjima od 5-23 dana, u zavisnosti od temperature, vlažnosti zemljišta i procenta organskog ugljenika (MacBean, 2012).

¹ CGA150829: 4-methoxy-6-methyl-1,3,5-triazin-2-amine

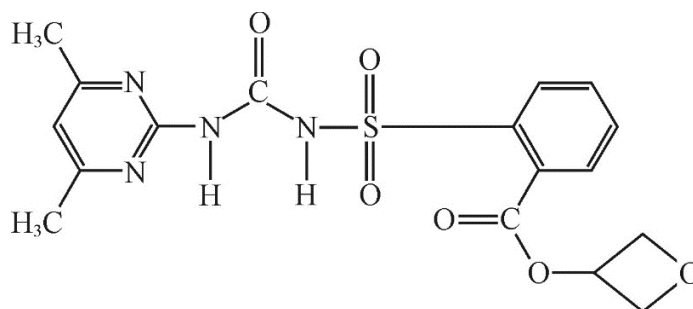
² CGA300406: N-[(4-methyl-6-oxo-1,6-dihydro-1,3,5-triazin-2-yl)carbamoyl]-2-(3,3,3-trifluoropropyl)benzenesulfonamide

³ CGA349707: N-(carbamimidoylcarbamoyl)-2-(3,3,3-trifluoropropyl)benzenesulfonamide

⁴ CGA325025: N-[(4-amino-6-methyl-1,3,5-triazin-2-yl)carbamoyl]-2-(3,3,3-trifluoropropyl)benzenesulfonamide

2.4.4. Oksasulfuron

Oksasulfuron se primenjuje za suzbijanje širokolisnih i travnih korova u usevu soje. Strukturna formula oksasulfurona je prikazana na slici 2.15, dok su neke važnije fizičko-hemijske osobine oksasulfurona prikazane u tabeli 2.9 (MacBean, 2012).



Slika 2.15. Strukturna formula oksasulfurona

Predhodne studije pri ispitivanju akutne toksičnosti oksasulfurona za čoveka i životinje su pokazale da je slabo toksičan.

Tabela 2.9. Fizičko-hemijske karakteristike oksasulfurona.

Izgled	Beli ili bezbojni prašak	
Naziv po IUPAC-u	oxetan-3-yl 2-[(4,6-dimethylpyrimidin-2-yl) carbamoylsulfamoyl]benzoate	
Molekulska formula	$C_{17}H_{18}N_4O_6S$	
Molekulska masa	$406,4 \text{ g mol}^{-1}$	
Rastvorljivost (25°C)	voda puferovana (pH 7,8)	19 g dm^{-3}
	dihlormetan	$6,9 \text{ g dm}^{-3}$
	etil acetat	$2,3 \text{ g dm}^{-3}$
	<i>n</i> -heksan	$0,0022 \text{ g dm}^{-3}$
	<i>n</i> -oktanol	$0,099 \text{ g dm}^{-3}$
	acetone	$9,3 \text{ g dm}^{-3}$
	metanol	$1,5 \text{ g dm}^{-3}$
Tačka topljenja	158°C (uz razlaganje)	
Napon pare	$< 2 \times 10^{-3} \text{ mPa}$	
Henry-eva konstanta	$< 3,2 \times 10^{-5} \text{ Pa m}^3 \text{ mol}^{-1}$	
pK_a	5,1	
Koeficijent raspodele oktanol-voda (K_{OW})	5,62 (pH 5); 0,15 (pH 7); 0,01 (pH 8,9)	

Apsorbuje se korenom i stablom biljke. Folijarno apsorbovan oksasulfuron se translocira do ćelija meristema stabla, a izvesna količina dospeva i do korenovog sistema. Dodatak uljnih aditiva preparatu oksasulfurona povećava folijarnu apsorpciju, biljka postaje uništena za 1-3 nedelje, zavisno od korovske vrste i uslova rastenja. Ukoliko se apsorbuje korenom, dospeva u

sve nadzemne delove biljke. Ovim herbicidom uspešno se suzbijaju korovi: *Abutilon theophrasti*, *Ipomoea* spp., *Sorghum halepense* i *Sorghum bicolor*. Primenjuje se u količini od 60-90 g ha⁻¹.

Prvi put je registrovan 1996. godine od strane Novartis Crop Protection AG (sada Syngenta AD), Švajcarska. Oralna LD₅₀ oksasulfurona za pacove je >5000 mg kg⁻¹. Dermalna LD₅₀ za kuniće >2000 mg kg⁻¹, dok je inhalaciona LC₅₀ za pacove preko 5,08 mg dm⁻³ vazduha (Mitić & Kecman, 2010). Toksičnost oksasulfurona za vodene organizme (mg L⁻¹) iznosi: alge (EC₅₀, 5 dana) >0,145, dafnije (LD₅₀, 48 h) >89,4, kaliforniska pastrmka (LD₅₀, 96 h) >116 i plavoškrga sunčanica (LD₅₀, 96 h) >111 (Mitić & Kecman, 2010).

Ukoliko je sadržaj oksasulfurona veći od 2250 mg kg⁻¹ postaje toksičan za ptice, belorepe prepelice i divlje patke, a za pčele (LC₅₀) kontaktno >25 µg po pčeli (Mitić & Kecman, 2010). Svetska zdravstvena organizacija (WHO) oksasulfuron svrstava u treću grupu otrova.

Vreme polurazgradnje (DT₅₀) oksasulfurona u zemljištu pri laboratorijskim uslovima iznosi 10 dana, a u polju manje od 2 nedelje. Degradacija oksasulfurona se prvenstveno dešava mikrobiološkim i hidrolitičkim putem u zemljištu u zavisnosti od vrednosti pH zemljišta, sadržaja organske materije i strukture zemljišta (European Food Safety Authority (EFSA), MacBean, 2012).

2.5. Uticaj SU herbicida na plodored i životnu sredinu

Sulfoniluree su fitotoksične te hronična izloženost, čak i niskom nivou ostataka ovih pesticida, može uticati na rast osetljivih planiranih useva (Fletcher i sar, 1993; Obrigawitch i sar, 1998; Singh & Singh, 2002; Barros i sar, 2007). Ovi herbicidi, u zavisnosti od karakteristika zemljišta i klimatskih uslova, mogu zaostajati u zemljištu i ispoljavati rezidualni efekat, te predstavljaju rizik za naredne osetljive useve ukoliko je u zemljištu zaostalo i 1% od primenjene doze (Cessna i sar., 2006; Azcarate i sar., 2015). Eksperimenti su pokazali da postoji ekstremna osetljivost leguminoza na SU zbog produžene postojanosti istih u zemljištu (Moyer i sar., 1989). Za ovu grupu herbicida još uvek nije dovoljno istražena postojanost i prostiranje u zemljištu nakon primene (Almvik i sar., 2007).

Povećana primena SU može dovesti do kontaminacije životne sredine i poljoprivrednih proizvoda, kao i do direktnih i/ili indirektnih toksičnih efekata na hranu i biološke sisteme (Tadeo i sar., 1996; Battaglin i sar., 2000; Tadeo i sar., 2000; Weber i sar., 2007; Kang i sar., 2011; Gure i sar., 2015).

Pored fitotoksičnog dejstva njihovi ostaci u zemljištu mogu značajno kontaminirati podzemne vode, a samim tim i čoveka. Povećana upotreba SU kao i njihova visoka rastvorljivost u vodi, uz značajnu mobilnost u zemljištu, su dovoljni razlozi da se SU detektuju u podzemnoj vodi. Zagađenje podzemne vode sa SU može uticati na ograničenje i upotrebu pijaće vode (Perreau i sar., 2007; Niu i sar., 2009; Fenoll i sar., 2012). Poseban problem predstavljaju ostaci SU u površinskoj vodi, jer niske doze primene ne znače smanjen rizik za vodene biljke i alge (Peterson i sar., 1994; Nyström i sar., 1999; Seguin i sar., 2001). Ukoliko su herbicidi na bazi SU prisutni u površinskoj vodi u količini od nekoliko $\mu\text{g L}^{-1}$ postaju izuzetno toksične za neke mikroalge (Fahl i sar., 1995).

2.6. Zakonska regulativa

Sve do 1991. godine, države članice Evropske unije (EU) su koristile različite pristupe u registraciji i regulaciji pesticida što je predstavljalo veliko opterećenje za poljoprivrednu praksu. Stoga je EU ujednačila regulaciju herbicida i drugih sredstava za zaštitu bilja prema Direktivi 91/414/EEC koja je formalno usvojena 1993. godine (Flynn & Naylor, 2002; Council Directive 91/414/EEC, 2005). Herbicidi i druge poljoprivredne hemikalije koje se koriste u Evropskoj uniji sada su regulisane smernicama u okviru Organizacije za ekonomsku saradnju i razvoj (eng. Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD), nedavno i od strane Evropske komisije (EC) (<http://ecb.jrc.ec.europa.eu/>). Osim toga, unapređenje procesa registracije i regulacije pesticida u Evropi potpomognuto je zaključcima od strane REACH (eng. Registration, Evaluation Authorization and Restriction of Chemicals) koji se bavi registracijom, evaluacijom, autorizacijom, ograničavanjem hemikalija i donošenjem propisa.

Unutar EU trenutna procena rizika pesticida na životnu sredinu se uređuje sa jedne strane u skladu sa Uredbom (EC) 1107/2009 (Regulation (EC) No 1107/2009), koja se bavi izdavanjem proizvoda za zaštitu bilja na tržište, i Direktivom za održivo korišćenje (Directive 2009/128/EC), a sa druge strane Direktivom za vodu (eng. Water Framework Directive (WFD)) (Directive 2000/60/EC). WFD se bavi kratkoročnim rizicima koji su izraženi kroz maksimalno prihvatljive koncentracije i standarde kvaliteta životne sredine (eng. maximum acceptable concentrations environmental quality standards, MAC-EQS)) i dugoročnim rizicima, izraženim kao godišnji proseki i standardi kvaliteta životne sredine (eng. annual average environmental quality standards

AS-EQS)). Uredba o pesticidima (EC) 1107/2009 takođe razlikuje kratkoročne i dugoročne rizike (Brock i sar., 2011).

Osim toga, u EU procena ekoloških rizika od strane hemijskih supstanci se vrši upoređivanjem predviđene koncentracije jedinjenja koja negativno utiču na životnu sredinu na bilo koji način (eng. Predicted environmental concentration, PEC), sa koncentracijom jedinjenja koja nema efekat na životnu sredinu (eng. Predicted noeffect concentration, PNEC) (Technical Guidance Document, 2003). PEC je pokazatelj očekivane koncentracije jedinjenja u životnoj sredini, uzimajući u obzir početnu koncentraciju pesticida (odmah nakon dospevanja), njegovu distribuciju i stepen degradacije u životnoj sredini, kao i mogućnosti njegovog uklanjanja iz životne sredine. PNEC je koncentracija pri kojoj se ne očekuju neželjeni efekti na okruženje u životnoj sredini.

Ako je $PEC > PNEC$, to znači da ispitivano jedinjenje može prouzorkovati negativne efekte u okruženju. Odnos $PEC/PNEC$ predstavlja rizik na osnovu čije vrednosti se odlučuje da li ispitivano jedinjenje treba biti uključeno u program monitoringa kako bi se postavile granične vrednosti za ispitivano jedinjenje prema EQS.

Pored svega navedenog, Evropska komisija je pokrenula forum za koordinaciju modela praćenje pesticida u životnoj sredini kao i njihove upotrebe (eng. Forum for the Co-ordination of Pesticide Fate Models and their Use, FOCUS). Ovaj forum predstavlja saradnju predstavnika regulativnih agencija, akademske zajednice i industrije. FOCUS je postavio smernice za utvrđivanje stepena ispiranja pesticida u podzemne vode, za određivanje perzistentnosti pesticida u zemljištu i njihovog prisustva u površinskim vodama.

Prema FOCUS PELMO modelu za nikosulfuron u podzemnoj vodi se predviđa PEC vrednost iznad $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$, dok za pojedine metabolite nikosulfurona (ADMP i MU-466) prema istom modelu predviđa se maksimalna količina od $0,75 \mu\text{g L}^{-1}$, izuzev za AUSN, UCSN i ASDM metabolite. Nikosulfuron se slabije kreće u dublje slojeve zemljišta i njegovi metaboliti se ne smatraju od značaja prema važećem EU dokumentu o važnosti metabolita (European Food Safety Authority, 2007).

Upotrebom rimsulfurona se ne očekuje kontaminacija podzemne vode, i njegove PEC vrednosti koje su određene su ispod $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ na osnovu rezultata FOCUS modela za podzemnu vodu. PEC vrednosti za površinsku vodu nisu procenjene. Sadržaji metabolita rimsulfurona IN-70941 određene ovim modelom su veće od $0,75 \mu\text{g L}^{-1}$, ali manje od $10 \mu\text{g L}^{-1}$, dok za metabolit

IN-E9260 se predviđaju sadržaji manji od $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$. Međutim, na osnovu dobijenih vrednosti za metabolite i njihove procene na podzemnu vodu, potvrđeno je da metaboliti rimsulfurona nisu od značaja (European Food Safety Authority, 2005).

Za predviđanje PEC vrednosti prosulfurona u podzemnoj vodi korišćeni su FOCUS modeli (PEARL 4.4.4 i PELMO 4.4.3), maksimalno određena vrednost za prosulfuron je $1,67 \text{ mg L}^{-1}$ što je veće od ograničenja od $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ za vodu za piće. Predloženo je da upotreba prosulfurona bude ograničena na upotrebu svake treće godine kako bi se smanjila mogućnost izlaganja podzemne vode iznad parametara ograničenja (European Food Safety Authority, 2014).

Kako European Food Safety Authority (EFSA) nije još uključila oksasulfuron u pregled procene rizika za životnu sredinu, ograničenja za ovu aktivnu materiju nisu još dostupna od strane EFSA (European Food Safety Authority, 2012).

Kod nas, Uredbom o programu sistematskog praćenja kvaliteta zemljišta, indikatorima za ocenu rizika od degradacije zemljišta i metodologiji za izradu remedijacionih programa (Sl. glasnik RS, br. 25/2010) definisane su granične vrednosti za mali broj pesticida u zemljištu, ali ne i za SU herbicide. Osim toga, granične vrednosti za SU nisu regulisane Pravilnikom o dozvoljenim količinama opasnih i štetnih materija u zemljištu i metodama za njihovo ispitivanje (Sl. list, br. 5/1992) propisane su maksimalno dozvoljene količine opasnih i štetnih materija u zemljištu do kojih dolazi ispuštanjem, ili nepravilnom upotrebom mineralnih đubriva i sredstava za zaštitu bilja, a koje mogu da oštete ili promene proizvodnu sposobnost poljoprivrednog zemljišta, ili kvalitet poljoprivrednih kultura. Ovim Pravilnikom definisane su granične vrednosti samo za ostatke atrazina i simazina u srednje teškim i teškim zemljištima za proizvodnju poljoprivrednih kultura (sloj zemljišta 0-30 cm).

Pregledom dostupne literature u porastu su ispitivanja ostatka SU u usevima usled povećane primene u svetu.

Regulative koje se bave maksimalno dozvoljenim količinama (MRL) ostataka pesticida u namirnicama su znatno pooštrene, zbog sve veće zabrinutosti za opšte zdravlje populacije (EU Pesticides database, 2015).

U Evropskoj Uniji (EU), pristupanje bezbednosti hrane počelo je sa Regulativom Evropske komisije (Regulation (EC) 178/2002, Regulation (EC) 396/2005, Regulation (EC) 149/2008) i uspostavljanjem nezavisnog tela za procenu rizika od strane Evropske agencije za sigurnost hrane (European Food Safety Authority (EFSA) 2014). Maksimalno dozvoljene količine (eng.

maximum residue limits, MRL) pesticida su regulisane na osnovu preporuke od strane EFSA (EU MRL database http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm) i na osnovu rizika koji su procenila i ostala Evropska regulativna tela. Od 2003. godine, EFSA pruža naučne savete, uključujući pitanja koja imaju direktan ili indirektan uticaj na sigurnost hrane za upotrebu od strane pesticida. EFSA je povezana sa Evropskom Komisijom i članicama Evropskog parlamenta kroz različite zakonodavne alate (uredbe, direktive ili odluke), a EU razvija procedure za procenu rizika u oblasti ostataka pesticida u lancu hrane. United States Environmental Protection Agency (US EPA, 2014) je u obavezi da razmotri uticaj pesticida u životnoj sredini i efekte procene rizika pesticida na ljudsko zdravlje.

Republika Srbija je donela Pravilnik kojim su vrednosti MRL za pojedine SU, kako za namirnice tako i za žitarice, usklađene sa vrednostima u Evropskoj uniji (Službeni glasnik RS, 2014). Ovim Pravilnikom definisana MRL za prosulfuron kreće se u intervalu od 0,02-0,1 mg kg⁻¹, za nikosulfuron i oksasulfuron od 0,05-0,1 mg kg⁻¹, a za rimsulfuron 0,05-0,2 mg kg⁻¹. Navedene vrednosti odnose se na razne proizvode kao što su sveže ili smrznuto voće i povrće, ceralije, meso i proizvodi od mesa, jaja, zrno kafe, leguminoze, čaj, lekovito bilje, biljke za proizvodnju šećera, začini i drugi proizvodi.

2.7. Metodologija određivanja sulfonilurea herbicida u zemljištu

Sulfoniluree su fitotoksične i hronična izloženost niskom nivou ostataka ovih pesticida može uticati na rast osetljivih useva (Brown, 1990; Singh & Singh, 2002). Eksperimenti su pokazali da postoji ekstremna osetljivost leguminoza na sulfoniluree zbog postojanosti istih u zemljištu (Moyer i sar., 1989). Za ovu grupu herbicida još uvek nije dovoljno istražena njihova postojanost i prostiranje u različitim tipovima zemljištu nakon primene (Almvik i sar., 2007). U cilju prevencije fitotoksičnih efekata na osetljive useve, kao i posledice tretiranja sa herbicidima na bazi sulfonilurea, neophodna je kontrola u pogledu kvalitativnog i kvantitativnog određivanja istih u zemljištu.

Pri razvoju metode za određivanje SU u zemljištu, analitičar se susreće sa problemima kao što su složenost matriksa zemljišta i niske koncentracije SU u uzorku. Određivanje SU u zemljištu je složeno i otežano, jer su njihove strukture veoma slične, a mogu biti prisutne kao smeša nekoliko jedinjenja. Zbog prisustva potencijalno interferirajućih supstanci, potrebno je razviti selektivnu metodu, dok niske koncentracije SU nameću uslov da razvijena metoda

poseduje odgovarajuću osetljivost. Interesovanje za SU i njihova postojanost, disipacija, mogućnost ispiranja i fitotoksični efekti doveli su do razvoja velikog broja različitih metoda za njihovo određivanje (Yan i sar., 2014). Pored toga, u većini slučajeva razvijena metoda se može primeniti samo za specifičnu vrstu analiziranog zemljišta.

Biotestovi se koriste za procenu SU herbicida prema osetljivim usevima analizom reakcije koja sledi nakon njihove primene na živim organizmima (Streibig, 1988, Günther i sar., 1989). Pored toga, biotest je dovoljno osetljiv za merenje koncentracije SU od nekoliko ng kg^{-1} koje mogu biti fitotoksične za osetljive useve (Ferris i sar., 1995). Ovi testovi su bili među prvim testovima za određivanje ostataka SU u zemljištu, a zasnivali su se na korišćenju osetljivih biljnih vrsta (kukuruz, suncokret, šećerna repa, soja, pšenica, mahunarke, pamuk i sočivo) (Sarmah i sar., 1998, Noy & Hollaway, 2001; Paul i sar., 2009). S druge strane, ovi testovi su se pokazali kao nespecifični, dugotrajni i zahtevaju kalibraciju za svaki tip zemljišta i svaki sloj u zemljišnom profilu, a dobijene rezultate je ponekada teško protumačiti. Određivanje sadržaja SU u nepoznatim uzorcima zemljišta korišćenjem biotestova je nemoguće bez prethodne kalibracije sa uzorkom slepe probe za isti tip zemljišta (Günther i sar., 1989; Stork & Hannah, 1996; Castro i sar., 2002). Ova tehnika se danas retko koristi, jer je zamenjena daleko jednostavnijim i elegantnijim instrumentalnim tehnikama. Tačna hromatografija sa masenom spektrometrijom (eng. high performance liquid chromatography-mass spectrometry, HPLC-MS) se najčešće koristi za određivanje i praćenje sadržaja SU u različitim matriksima i za potvrdu tačnosti i validaciju novih razvijenih metoda koje se koriste za određivanje SU (Yan i sar., 2004; Gervais i sar., 2008; Yan i sar., 2011).

Za rutinsko određivanje SU poželjno je koristiti brze i jednostavne metode, jer one omogućavaju analizu velikog broja uzoraka u kratkom vremenskom periodu (Fenoll i sar., 2012). U ove svrhe se često koriste polukvantitativne metode ("screening" metode), koje omogućavaju analizu velikog broja uzoraka za relativno kratko vreme. Ove metode se najčešće koriste za potvrđivanje prisustva ostataka SU iznad određene koncentracije, a nakon toga se za tačnije određivanje primenjuju neke druge metode. Rutinske metode za određivanje SU koje se najčešće koriste su imunohemijske metode tj. enzimsko-imunološke metode (eng. enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) i elektrohemije metode. Navedene metode su jednostavne, pogodne za "screening" testove kao i za veliki broj uzoraka, a pored toga ne zahtevaju skupu opremu i reagens.

Za potrebe kvantitativnog određivanja SU, kao i za potvrdu tačnosti nove metode za određivanje ostataka SU, koriste se preciznije i tačnije metode. Stoga, kvantitativno određivanje SU najčešće se izvodi sa kapilarnom elektroforezom, gasnom hromatografijom i visokopritisnom tečnom hromatografijom. Kapilarna elektroforeza kao i hromatografske tehnike, pružaju niz prednosti među kojima je najznačajnije simultano praćenje više različitih SU pri određenim i prethodno definisanim uslovima, posebno kada su u pitanju nepoznati uzorci zemljišta. Navedene metode poseduju odgovarajuću osetljivost određivanja i selektivnost. Međutim, nedostatak navedenih metoda je skupa i sofisticirana instrumentacija, u nekim slučajevima složena priprema uzoraka, kao i neophodnost velikog iskustva analitičara.

2.7.1. Priprema uzoraka za analizu

Zemljište se nakon uzorkovanja mora čuvati na adekvatan način, odnosno u mraku i pri niskim temperaturama (oko -20°C), s obzirom da temperatura, prisustvo kiseonika i UV zračenje mogu uticati na razgradnju SU (Sondhia & Singhai, 2008; Sondhia, 2008; Wu i sar., 2010).

Nakon uzorkovanja, reprezentativni uzorak je neophodno pripremiti za analizu. Bez obzira koja tehnika će biti primenjena za određivanje SU, veliku pažnju potrebno je posvetiti odabiru najefikasnije pripreme uzorka koja treba da obezbedi i adekvatno prečišćavanje uzorka, uz mogućnost koncentrovanja SU.

Prvi korak pri određivanju sadržaja SU iz uzoraka zemljišta je ekstrakcija. Zemljište ima veoma složen matriks, pa je efikasna ekstrakcija željenih SU najvažniji korak u njihovom određivanju. Za ekstrakciju SUs iz zemljišta najčešće se koriste sledeće mešavine rastvarača: voda:acetonitril (80:20, v/v), aceton:0,15 mol L^{-1} NaHCO_3 (2:8,v/v), fosfatni pufer (pH=7,8):metanol (8:2, v/v), aceton:voda (3:1, v/v), dihlormetan-metanol-TFA (9:1:0,1, v/v) i dihlormetan-metanol (9:1, v/v) (Font i sar., 1998; Hogendoorn i sar., 2001; Ye i sar., 2006; Sondhia, 2008; Wu i sar., 2009; Wu i sar., 2010; Miao i sar., 2015).

Ekstrakcione tehnike koje su najviše primenjivane su ekstrakcija uz mućkanje (Sondhia, 2008), ekstrakcija uz intenzivno mućkanje (Wu i sar., 2009), ekstrakcija organskim rastvaračem potpomognuta mikrotalasima (Font i sar., 1998; Hogendoorn i sar., 2001), ekstrakcija korišćenjem jonskih tečnosti (Fang i sar., 2010), ultrazvučna ekstrakcija (Yan i sar., 2014) i superkritična ekstrakcija (Berger, 1995; Asiabi i sar., 2013).

Za prečišćavanje ekstrakta se koriste tečno-tečna ekstrakcija (Wu i sar., 2010), ekstrakcija na čvrstoj fazi (eng. solid phase extraction, SPE) (Ye i sar., 2006) i disperzivna ekstrakcija na čvrstoj fazi (eng. dispersive solid-phase extraction, DSPE) (Wu i sar., 2009). Kod DSPE ekstrakcije, sorbent se direktno dodaje u ekstrakt za uklanjanje nečistoća iz prvobitnog ekstrakta (Wu i sar., 2009).

Kod nekih metoda, uglavnom gasno hromatografskih, pri određivanju SU nakon ekstrakcije i prečišćavanja ekstrakta neophodno je izvesti proces derivatizacije analita. Postupak derivatizacije i uslovi zavise od vrste derivata koji se stvaraju, kao i njihove stabilnosti.

2.7.1.1. Mikrotalasna ekstrakcija

U analitičke svrhe mikrotalasi su prvi put primenjeni 1975. godine za digestiju uzorka iz kojih su analizirani metali (Abu-Samra i sar., 1975), dok je 1986. godine prvi put primenjena ekstrakcija potpomognuta mikrotalasima (eng. microwave assisted extraction, MAE) za ekstrakciju pesticida iz zemljišta (Ganzler i sar. 1986). Agencije za zaštitu životne sredine (eng. Environmental protection agency, EPA) je 2000. godine usvojila ekstrakciju potpomognutu mikrotalasima kao standardnu metodu za ekstrakciju srednje isparljivih i neisparljivih komponenti iz čvrstih uzoraka.

Oblast mikrotalasnog zračenja u elektromagnetnom spektru se nalazi između radiotalasa i infracrvenog zračenja (oblast frekvencije 0,3-300 GHz), a za rad se koristi 2,45 GHz kako ne bi došlo do interferencije sa drugim uređajima (Paré & Bélanger, 1997).

Da bi došlo do zagrevanja, odnosno do interakcije reakcione smeše sa mikrotalasima, potrebno je da ista poseduje supstancu koja ima dipolni momenat. Samo zagrevanje reakcione smeše mikrotalasima može se objasniti dipolarnom polarizacijom i kondukcijom. Primenom adekvatne frekvence zračenja dolazi do kretanja dipola, oni su dosta osetljivi na spoljašnje električno polje, gube energiju usled trenja i nastoje da se orjentišu u pravcu polja rotacijom. Kod dipolarne polarizacije, rotirajući dipoli ne mogu da slede brze izmene smera polja, kašnjenje molekula za promenljivim električnim poljem dovodi do prevođenja elektromagnetne u toplotnu energiju. Kondukcijom može doći do zagrevanja u mikrotalasnem polju usled translatorskog kretanja jona u pravcu električnog polja, tačnije usled konvertovanja kinetičke u toplotnu energije (Lidström i sar., 2001).

Sposobnost supstance sa dipolnim momentom prisutne u reakcionoj smeši da konvertuje elektromagnetu u toplotnu energiju zavisi od njenih dielektričnih svojstava i izražava se tangensom (uglom) gubitka ($\tan \delta$). Tangens gubitka ($\tan \delta = \epsilon'' / \epsilon'$) predstavlja odnos između faktora gubitka (ϵ'') i dielektrične konstante (ϵ'). Faktor gubitka određuje efikasnost sa kojom se apsorbovana energija prevodi u toplotnu, a dielektrična konstanta opisuje stepen polarizvanosti molekula u električnom polju, tj. sposobnost rastvarača da apsorbuje mikrotalasnu energiju. Dielektrična svojstva rastvarača zavise od temperature i njegovog viskoziteta. Rastvarači koji imaju veću dielektričnu konstantu znatno brže će se zagrevati (polarni rastvarači), dok nepolarni rastvarači ne apsorbuju mikrotalasnu energiju zbog čega se neće zagrevati.

Mikrotalasna ekstrakcija se u osnovi razlikuje od ostalih konvencionalnih ekstrakcionih tehnika. Prenos toplote i mase se odigrava u istom smeru (iz unutrašnjosti ka rastvaraču, direktnom migracijom) za razliku od konvencionalnih tehnika (Font i sar., 1998; Hogendoorn i sar., 2001). Pri mikrotalasoju ekstrakciji je moguće primenuti čiste rastvarače ili smeše rastvarača sa različitim vrednostima faktora gubitka (Mitra, 2003). Rastvarači sa manjom dielektričnom konstantom se češće koriste za mikrotalasnu ekstrakciju, jer se postiže selektivnije zagrevanje uzorka i brže kretanje komponenti od interesa iz uzorka u rastvarač.

Na tržištu je dostupan otvoreni i zatvoreni sistem za mikrotalasnu ekstrakciju. Kod otvorenog sistema se ekstrakcija izvodi pri atmosferskom pritisku, dok se kod zatvorenog sistema izvodi pod povišenim pritiskom (Slika 2.16).



Slika 2.16. Aparat za mikrotalasnu ekstrakciju u zatvorenom sistemu

Zatvoreni sistem ima niz prednosti kao što su postizanje viših temperatura, skraćanje vremena ekstrakcije, smanjenje količine rastvarača, nema gubitaka (isparavanjem) jedinjenja od interesa, znatno je smanjena kontaminacija uzorka, postoji mogućnost za simulatanu ekstrakciju više uzoraka. Ekstrakcija se izvodi u posudama koje su odgovarajuće konstrukcije i materijala (perfluoroalkoksi, polieterimid). Nedostatak je što ne postoji mogućnost dodavanja rastvarača tokom ekstrakcije i što je količina uzorka ograničena.

Mikrotalasna ekstrakcija u zatvorenom sistemu se često koristi za ekstrakciju pesticida (Molins i sar., 2000; Haroune i sar., 2015; Wang i sar., 2016; Wu i sar., 2016) kao i za određivanje SU iz uzoraka zemljišta (Font i sar., 1998; Hogendoorn i sar., 2001).

2.7.2. Imunohemijske metode

Imunoadsorpcioni testovi sa vezanim enzimom (ELISA test) koriste se za određivanje SU u uzorcima zemljišta. Zasniva se na mikrotitracijama, usled prisustva ciljanog jedinjenja dolazi do obojenosti test-rastvora. Enzimsko imunološke metode imaju visoku osetljivost i specifičnost sa umerenom cenom koštanja (Seiden i sar., 2000; Lee i sar., 2002). Pogodni su za brza terenska određivanja. Jedan od glavnih nedostataka je dobijanje lažno pozitivnih rezultata (eng. cross-reactivity). Naime, u složenim uzorcima kao što je zemljište, mogući su lažno pozitivni rezultati zbog prisustva interferenci od strane matriksa uzorka koji mogu reagovati sa antitelima, pored analita od interesa. Pored toga, ELISA ne može biti korišćena za analizu smeše sulfonilurea, kao ni za određivanje njihove molekulske strukture. Osetljivost ove tehnike se kreće od $0,1 \mu\text{g kg}^{-1}$ do $10 \mu\text{g kg}^{-1}$, u zavisnosti od „kitova“ koji se koriste (Hollaway i sar., 1999; Kolár i sar., 2002; Liu i sar., 2013).

2.7.3. Elektrohemijske metode

Elektroanalitičke metode se sve češće koriste u analizi tragova različitih pesticida zbog visoke osetljivosti i selektivnosti (İnam i sar., 2006). Elektrohemijske metode su jeftine, osetljive i dosta brze. Za određivanje SU koristi se elektrohemijska striping analiza, odnosno adsorpciona striping voltometrija, koja podrazumeva akumulaciju (koncentrovanje) analita od interesa adsorpcijom pri odgovarajućem potencijalu, a rastvaranje depozita je uz diferencijalnu pulsnu voltometriju ili pravougonu voltometriju na visećoj kapi žive (eng. hanging mercury drop electrode, HMDE) (Olmedo i sar., 1997). Sarıgül & İnam (2009a) su polarografski određivali

sadržaj triasulfuron herbicida korišćenjem Briton-Robinson pufera pomoću diferencijalne pulsne polarografije i ciklične voltametrije. Optimalni uslovi za analitičko određivanje triasulfurona su bili na pH 3,0 i redukcionni potencijal od -1031 mV. Granica detekcije i granica kvantifikacije za ispitivani triasulfuron je iznosila 0,06 i 0,19 $\mu\text{g mL}^{-1}$, redom.

Voltametrijsko ponašanje ciklosulfamurona je ispitivano pravougonom stripping voltametrijom (eng. square wave stripping voltammetry, SWSV) na statičkoj kapi žive (eng. static mercury drop electrode, SMDE) (Sargül & Inam, 2009b). Limit detekcije za ciklosulfamuron je iznosio 3,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ u pufer rastvoru pH 6,0, ($E_{\text{acc}}=-400$ mV, Ag/AgCl, $t_{\text{acc}}=75$ s). Bandžuchová i saradnici (2013) su ispitivali voltametrijsko ponašanje triasulfurona korišćenjem modifikovane srebrno amalgamske elektrode (eng. mercury meniscus modified silver solid amalgam electrode, m-AgSAE) i viseće kapi žive (HMDE). Triasulfuron je davao najveći strujni odgovor i smanjenje pika u pufer rastvoru pH 3,0 (m-AgSAE) i 2,5 (HMDE), redom. Diferencijalna pulsna voltametrija sa optimizovanim radnim parametrima bila je primenjena za analizu model rastvora koji sadrže triasulfuron sa dobrom osetljivošću (limit detekcije (m-AgSAE) = $6,4 \times 10^{-8}$ mol L^{-1} i limit detekcije (HMDE) = $2,7 \times 10^{-9}$ mol L^{-1}).

Prethodno pomenute tehnike daju nisku granicu detekcije, širok dinamički opseg i dobru preciznost. Dakle, voltametrija i stripping analiza može da bude alternativa pri rutinskoj analizi SU.

2.7.4. Kapilarna elektroforeza

Kapilarna elektroforeza omogućava razdvajanje i određivanje komponenata iz smeše koristeći električno polje uspostavljeno u kapilari. Kapilara daje nov format kretanju čestica u električnom polju. Elektroendoosmoza je glavni i fundamentalni princip svake kapilarne elektroforeze, a korišćenje ovih sila u razdvajanju molekula iz smeše umnogome izdvaja ovu analitičku tehniku od ostalih postupaka razdvajanja. Ona nastaje kao rezultat specifične distribucije jona oko unutrašnjeg zida kapilare, izrađene od stopljenog silikata. Ova tehnika je posebno pogodna za termalno nestabilna jedinjenja, kao što su SU.

Kapilarnom elektroforezom je moguće brzo određivanje SU u zemljištu uz korišćenje kapilarnih kolona od stopljene silike (Chen i sar., 2000; Quesada-Molina i sar., 2010). S obzirom da su u pitanju slabo kisela jedinjenja, koja su jonizovana, pravilnim odabirom pufera postiže se dobro razdvajanje i selektivno određivanje više SU u zemljištu ovom tehnikom. Najčešće

korišćeni detektori pri određivanju SU kapilarnom elektroforezom su UV detektor sa nizom dioda i maseno spektrometrijski detektor (Garcia i sar., 1992). UV detektor sa nizom dioda omogućava direktno određivanje SU u ekstraktu zemljišta (El-Debs i sar., 2014).

2.7.5. Hromatografske metode

2.7.5.1. Teorijske osnove hromatografije

Tečno-čvrsta hromatografija (eng. liquid solid chromatography, LSC) je bila prva vrsta hromatografije koja je korišćena. Ruski botaničar Mihail Semenovič Cvet je 1903. godine primenio eluacionu metodu na koloni formiranoj u staklenoj cevi od praškastog kalcijum-karbonata da bi razdvojio pigmente hloroplasta iz petrol-etarskog ekstrakta (Tswett, 1905). Zbog krajnjih efekata razdvajanja koji su se ogledali u dobijenim odvojenim zonama pigmenta hloroplasta (karotenoida i hlorofila) ova metoda je dobila naziv hromatografija (grč. χρώμα: *chroma* - boja i γραφειν: *grafein* - pisati). Sa pooštavanjem kriterijuma definisanih od raznih regulatornih tela u odnosu na pouzdanost primenjenih metoda, razvoj hromatografskih metoda je išao u pravcu povećanja njihove osetljivosti, selektivnosti, pouzdanosti, preciznosti i opsega primene, kako bi se u jednoj analizi dobilo što više podataka o prisustvu različitih jedinjenja prisutnih u tragovima. Danas se ni jedna analiza kompleksnog materijala ne može izvesti bez primene hromatografskih metoda analize.

Analitičko određivanje komponenata u uzorku često zahteva njihovo međusobno razdvajanje ili razdvajanje od medijuma u kome se nalaze. Razdvajanje komponenata u dosta slučajeva je izuzetno komplikovano zbog složenosti uzoraka, osetljivosti komponenata na različite uticaje (svetlost, pH, oksidansi i dr.), a veoma često i zbog njihove velike sličnosti.

Klasične metode razdvajanja kao što su kristalizacija, destilacija, filtracija i dr. uglavnom ne zadovoljavaju postavljene zahteve u pogledu selektivnosti. Zbog toga se za ove namene primenjuju savremenije metode razdvajanja kao što su hromatografske metode, metode razdvajanja u električnom polju, ultrafiltracija, ultracentrifugiranje i dr. S obzirom na veoma različite principe ovih metoda razdvajanja, nije moguće načiniti njihovu univerzalnu klasifikaciju. Ipak, klasifikacija na principu dejstva različitih sila koje deluju na komponente prilikom razdvajanja ima najmanje nedostataka. Svi procesi u metodama razdvajanja, koji se koriste u analitičke svrhe, odvijaju se u rastvorima u užem smislu (izuzev gasne hromatografije).

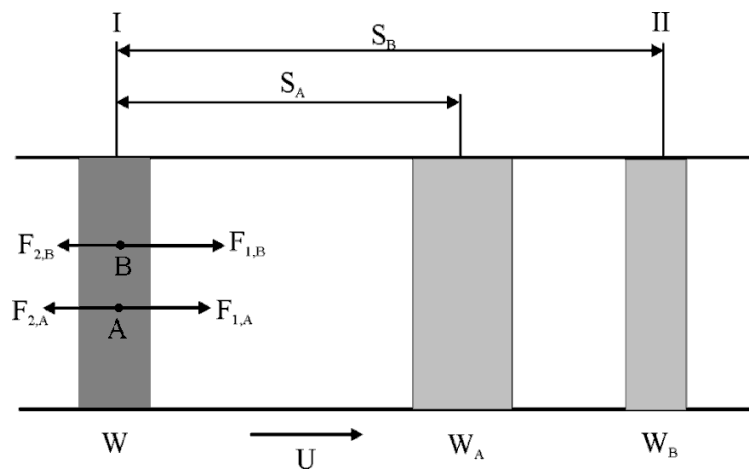
Međutim, iako u praktičnom izvođenju postoje bitne razlike, principijalne razlike u odnosu na ostale metode razdvajanja su minimalne (Marjanović, 2001).

Ako se posmatra molekul nošen kretanjem rastvarača, može se konstatovati da na molekul deluju dve grupe sila:

- sile koje ubrzavaju kretanje molekula (F_1) mogu da budu:
 - solvodinamičke
 - elektrostatičke ili elektrokinetičke
 - gravitacione
 - sile koje usporavaju kretanje molekula (F_2) mogu da budu:
 - sile trenja
 - elektrostatičke
 - sile interakcije dipola
- } homogen sistem
- osmotske
 - adsorpcione
 - efekti molekulskog sita
 - elektrokinetičke
 - difuzione
- } nehomogen sistem

Efekat dejstva ovih sila direktno je proporcionalan koeficijentu raspodele između faza za pojedine rastvorene supstance.

Ova klasifikacija načinjena je na bazi karaktera sila (F_1 i F_2) koje na komponente (A i B) deluju u delu prostora u kome se odvija proces razdvajanja (Slika 2.17).



Slika 2.17. Šematski prikaz procesa razdvajanja

Kao što se sa slike 2.17. vidi sa I je označeno početno, a sa II krajnje stanje. Tokom procesa razdvajanja na komponente A i B deluju sile (F) koje ubrzavaju kretanje (indeks 1) i one koje usporavaju kretanje (indeks 2). Sa S_A i S_B su označeni pređeni putevi, a sa w , w_A i w_B su označene odgovarajuće širine zona. Da bi se komponente iz smeše razdvojile, potrebno je da se iz zajedničkog prostora u kome se nalaze (stanje I), procesom razdvajanja, dovedu u odvojene delove prostora (stanje II). Ukoliko bi ovi prostori bili beskonačno male zapremine, tada bi se uslov razdvajanja mogao veoma jednostavno matematički izraziti $S_A \neq S_B$, što znači da nakon nekog vremena ($t = \text{const}$) ili dužine ($L = \text{const}$) komponente A i B pređu različite puteve, čime se postiže njihovo potpuno razdvajanje.

Da bi komponente prešle različite puteve, moraju se kretati različitim brzinama ($u_A \neq u_B$), a da bi se kretale različitim brzinama, mora biti zadovoljen uslov $\Delta F_A \neq \Delta F_B$ (Marjanović, 2001).

Gde je:

$$\Delta F_A = F_{1,A} - F_{2,A} \quad (17)$$

$$\Delta F_B = F_{1,B} - F_{2,B} \quad (18)$$

Kada je reč o komponentama sličnih karakteristika, očigledno je da ne postoje velike razlike u navedenim veličinama, pa metode razdvajanja moraju imati takve osobine, da pri malim razlikama osobina dovedu do efikasnog razdvajanja što se postiže podešavanjem uslova rada i korišćenjem takvih metoda u kojim se ove razlike ispoljavaju.

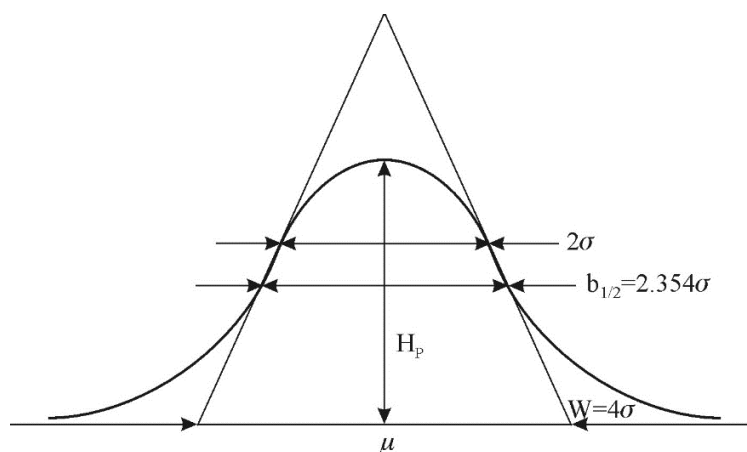
Efikasnost hromatografskog razdvajanja, odnosno kvantitativna mera stepena razdvajanja između dva susedna pika izražava se faktorom razdvajanja (engl. resolution factor, RF), koji se definiše sledećom relacijom (Marjanović & Krstić, 1998) :

$$R = \frac{S_A - S_B}{\frac{w_A}{2} + \frac{w_B}{2}} = \frac{2(S_A - S_B)}{w_A + w_B} \quad (19)$$

Sa S_A i S_B su označeni pređeni putevi komponentata pri hromatografskom razdvajanju, a sa w , w_A i w_B su označene odgovarajuće širine zona (Slika 2.17). Zbog statističke raspodele, sadržaj komponentata A i B u razdvojenim zonama (Gausove krive normalne raspodele), smatra se da je razdvajanje zadovoljavajuće ako je $R=1$, (tzv. 4σ razdvajanje, gde je σ standardna devijacija), a idealno ukoliko je $R \geq 1,5$. Rezolucija se može poboljšati povećanjem razlike pređenog puta za komponente A i B ili smanjenjem širine zona. Faktor razdvajanja se može računati iz izraza (Marjanović & Krstić, 1998):

$$R = \frac{1,18 \cdot (S_A - S_B)}{b_{1/2,A} + b_{1/2,B}} \quad (20)$$

Kako veliki broj krivih u instrumentalnim metodama analize ima oblik gotovo identičan Gausovoj krivoj normalne raspodele, na slici 2.18 je prikazana karakteristična kriva sa bitnim veličinama i njihovim međusobnim vezama (Marjanović, 2001).



Slika 2.18. Karakteristične veličine na Gausovoj krivoj normalne raspodele i njihove međusobne veze (H –ordinata maksimuma krive, visina pika (H_p); σ –standardna devijacija, odnosno srednja mera širine pika; $b_{1/2}$ –širina pika na polovini visine; W –širina pika na osnovici; μ –apscisa maksimuma pika)

U realnim eksperimentalnim uslovima se teško određuje širina zone w , posebno pri nepotpunom razdvajanju pikova. Zbog toga se za definisanje faktora razdvajanja često koristi širina pika na polovini visine $b_{1/2}$ (izraz 20). Kvalitativnu karakteristiku predstavlja retenciono vreme, odnosno vreme koje prođe od momenta injektovanja do pojave maksimuma na piku ispitivane komponente (Marjanović & Krstić, 1998).

Manji broj ekvivalentnih teorijskih podova (eng. Height Equivalent to a Theoretical Plate, HETP) uslovljava manju efikasnost hromatografskog razdvajanja i obrnuto. Broj teorijskih podova će biti veći, a visina poda manja ukoliko je vreme zadržavanja supstance u koloni veće, a proširenje pika manje. Ove vrednosti se razlikuju za različite supstance, pa se pri izražavanju njene vrednosti uvek mora naglasiti na koju komponentu se data vrednost odnosi.

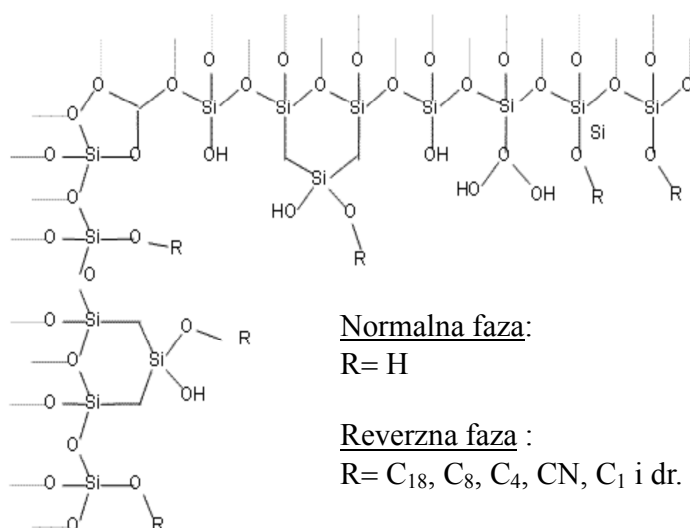
Prema načinu izvođenja kao i karakteru mobilne i stacionarne faze, odnosno prema fenomenu dominantnom u procesu razdvajanja, tečna hromatografija se može podeliti u sledeće vidove (Marjanović, 2001):

- 1) adsorpciona hromatografija – fenomen adsorpcije
- 2) podeona hromatografija – fenomen raspodele između dve faze

- 3) hromatografija na izmenjivačima jona – fenomen izmene jona
- 4) hromatografija na molekulskim sitima – fenomen molekuskog sita
- 5) afinitetna hromatografija – fenomen visokospecifičnog afiniteta

U hromatografiji pri konstantnom vremenu i dužini kolone, hromatogram predstavlja raspodelu koncentracije po dužini pređenog puta. Hromatogram sadrži podatke o kvalitetu i kvantitetu ispitivanih supstanci.

Proces tečno-hromatografskog razdvajanja koji se odvija na nepokretnoj fazi koja je polarnija od pokretne faze naziva se **normalno-fazna** hromatografija (jer je istorijski ovaj proces prvi primenjen) (Slika 2.19).



Slika 2.19. Površina stacionarne faze u normalnoj i reversno faznoj tečnoj hromatografiji

U obrnutom slučaju, kada je pokretna faza polarnija od nepokretne, radi se o **reversno-faznoj** hromatografiji (eng. reversed phase chromatography). Na ovaj način je preokrenut redosled eluiranja sa kolone u odnosu na normalnu hromatografiju, te je po tome tehnici i dodeljeno ime.

Kod adsorpcione hromatografije nepokretna (stacionarna) faza je čvrsta (adsorbens), dok mobilna faza može biti tečna (eng. Liquid Solid Chromatography, LSC) ili gasovita (eng. Gas Solid Chromatography, GSC). Dominantan fenomen u razdvajanju je adsorpcija (promena koncentracije na graničnoj površini faza) i izvodi se kao kolonska ili laminarna tehnika. Na adsorpciju, a time i na hromatografsko razdvajanje uticaj imaju priroda i karakter adsorbensa

(adsorbenta), adsorbata (supstanca koja se adsorbuje), osobine rastvarača (ili gasa) koji povezuje sistem u celinu, temperatura pri kojoj se hromatografska razdvajanja izvode i moguće interakcije između molekula adsorbata i rastvarača (međusobno i jednih sa drugim), kao i konkurentnih interakcija adsorbata i rastvarača sa adsorbensom. Adsorpcija se odvija na površini adsorbensa na aktivnim centrima koji se nalaze na spoljašnoj površini čestica adsorbensa ili njegovim porama. Do adsorpcije dolazi usled stvaranja vodoničnih veza, asocijacije dipola, dejstva jonskih sila, stvaranja helatnih kompleksa i dejstva disperzionih sila. Prema prirodi sila koje se javljaju pri adsorpciji, može se zaključiti da njihovo dejstvo zavisi od polarnosti molekula. Polarni molekuli mogu da stupe u interakciju preko jonskog naboja, stalnog dipola ili uz stvaranje vodonične veze. Napolarni molekuli u interakciju stupaju uglavnom preko disperzionih sila (Marjanović, 2001).

U podeonoj hromatografiji supstance se razdvajaju između tečne mobilne faze (rastvarača) i tečne stacionarne faze koja je naneta (vezana) na inertni nosač ili na zidove kolone. U tečnoj podeonoj hromatografiji, hromatografija na normalnim fazama se označava slučaj u kojem je stacionarna faza polarna, a mobilna faza je nepolarna. Redosled razdvajanja supstanci u hromatografiji na normalnim fazama sličan je razdvajanju supstanci u adsorpcionoj hromatografiji na polarnim adsorbensima. Pri razdvajanju nepolarnih supstanci, koje su mnogo bolje rastvorene u nepolarnoj mobilnoj fazi nego u stacionarnoj fazi, i tada se za efikasno razdvajanje ovih supstanci kao nepokretna faza koristi nepolarni rastvarač, a kao mobilna faza polarni rastvarač.

Ovaj slučaj je poznat kao hromatografija na obrnutim fazama i redosled eluiranja supstanci je obično obrnut od onog na normalnim fazama. Kako bi se razdvajanje u podeonoj hromatografiji izvodilo samo na bazi fenomena raspodele između dve faze, moraju se kao mobilna i stacionarna faza upotrebiti rastvarači koji se ne mešaju (Marjanović, 2001).

Napredovanjem tehnologije u pripremi površina stacionarnih faza kojima su punjene kolone, u pokušaju da se pronade što univerzalnija stacionarna faza za razdvajanje različitih jedinjenja na istoj koloni, u poslednjih nekoliko godina pojavili su se i prelazni vidovi hromatografskog razdvajanja. Vodena normalno fazna hromatografija (eng. aqueous normal-phase chromatography) se odvija na stacionarnoj silika fazi koja umesto normalnih silanola (-Si-OH) na površini ima terminalne grupe u vidu hidrida (-Si-H) (Pesek & Matyska, 2006). U osnovi mobilne faze je organski rastvarač, kao metanol ili acetonitril, sa prisustvom vode. Ova hromatografija se koristi za istovremenu separaciju polarnih i nepolarnih jedinjenja. U upotrebi je

od skoro još jedna modifikacija normalno fazne hromatografije, a to je HILIC (eng. hydrophilic interactions liquid chromatography) (Alpert, 1990). Stacionarna faza kod ovog tipa razdvajanja može biti običan nemodifikovan silika gel, amino, anjonska, katjonska, zwitterjonska modifikacija. Mobilna faza u HILIC hromatografiji je obično kombinacija organskog rastvarača acetonitrila i vode. Smatra se da je mehanizam razdvajanja kompleksna mešavina fizičkih fenomena i da sadrži osobine podeone hromatografije, u kombinaciji sa vodoničnim i slabim elektrostatičkim interakcijama. Koristi se uglavnom za separaciju polarnih jedinjenja.

U adsorpcionoj hromatografiji, kako klasičnoj kolonskoj tako i u HPLC, koriste se adsorbensi koji imaju veliku specifičnu površinu i zapreminu pora kao i određenu veličinu i raspodelu veličine čestica. Najznačajniji polarni hromatografski adsorbensi su silika gel i aluminijum-oksidi. Sve više se primenjuje silika gel polarnih vezanih faza koji sadrži organske funkcionalne grupe kao što je cijano ili nitrilo (-CN), amino (-NH₂) ili alkoholne (-OH) vezane za silika gel preko nepolarnog kratkog lanca. Aktivna mesta na površini silika gela su Si-OH grupe, tzv. silanoli. Aktivni centri na površini aluminijum-oksida su hidroksilne grupe i anjoni kiseonika (O²⁻) (Lončar, 2010).

Inertni nosač u podeonoj hromatografiji ima zadatak da veže stacionarnu fazu i da svojom površinom učini dodirnu površinu faza velikom. On mora biti hemijski inertan prema supstancama koje se razdvajaju i da nema adsorpcionu sposobnost. Kao inertni nosači polarnih stacionarnih faza najčešće se koriste inaktivirani silikatni materijali (silika gel, kisel gur), materijali izrađeni od diatomejske zemlje (celit) i slabi adsorbensi (celuloza, škrob, saharoza). Kao nosači nepolarnih stacionarnih faza koriste se različite plastične mase ili hidrofobizirani nosači polarnih faza. Inaktiviranje silikatnih nosača izvodi se vezivanjem silanolnih grupa (-SiOH) koje predstavljaju aktivne centre na kojim može doći do adsorpcije sa visokoreaktivnim derivatima silana (npr. dimetil-dihlor-silan, DMCS i dr.) (Marjanović, 2001).

U poslednje vreme su razvijeni postupci koji povezuju inaktivaciju silanolnih grupa sa hemijskim vezivanjem stacionarnih faza čime se može u potpunosti promeniti karakter nosača ili adsorbensa (Marjanović, 2001).

U tečnoj adsorpcionoj hromatografiji retencija rastvorka se može kontrolisati u širokom opsegu izbora pokretne faze (eluenta). U dosta slučajeva, izbor eluenta više utiče na razdvajanje rastvoraka nego izbor nepokretne faze. Ako se neki rastvarač jače adsorbuje na nepokretnu fazu, veća je njegova eluciona jačina tj. njegova sposobnost da istisne molekule rastvorka adsorbovane

na nepokretnoj fazi. Tokom hromatografskog procesa rastvarač i rastvorak stupaju u različita međudejstva od kojih je zbog jačine, najznačajnija vodonična veza. U zavisnosti od sposobnosti građenja vodoničnih veza, rastvarači se mogu podeliti u nepolarne (*n*-pentan, *n*-heksan, cikloheksan), slabo polarne (hloroform, metilenhlorid, benzen), polarne rastvarače tipa proton – akceptor (acetonitril, piridin, dioksan, tetrahidrofuran) i polarne rastvarače tipa amfolita (voda, alkoholi, kaboksilne kiseline) (Marjanović, 2001, Lončar, 2010).

Pokretne faze u podeonoj hromatografiji na obrnutim fazama su smeše organski rastvarač-voda. Od organskih rastvarača najčešće se koriste metanol, aceton, dioksan, izopropilalkohol i dr. Veliki broj razdvajanja u podeonoj hromatografiji izvodi se vodenim rastvorom pufera, a vrednost pH pokretne faze mora biti manja od 7,5, jer silika gel hidrolizuje u baznim rastvorima.

U slučaju da je nepokretna faza polarna, koriste se manje polarne pokretne faze i obrnuto, ako je nepokretna faza nepolarna tada se koriste polarne pokretne faze (Lončar, 2010).

2.7.5.2. Mehanizmi razdvajanja

Klasifikacija različitih tehnika izvodi se na osnovu tipa i mehanizma distribucije pri razdvajanju komponenata od interesa. U praksi hromatografsko razdvajanje je rezultat različitih mehanizama kao što je prikazano u tabeli 2.10.

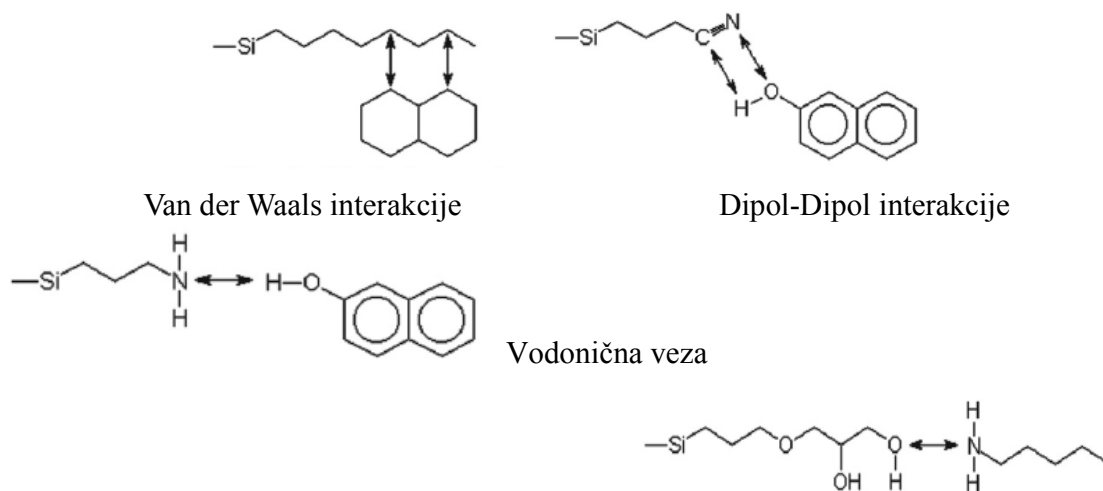
Alternativno, međumolekularne interakcije se mogu klasifikovati u (Lončar, 2010):

- Polarne interakcije, uključuju hidrofilne grupe poput hidroksi, primarni amin, karboksilne kiseline, amida, sulfata i amonijum kvaternerne grupe
- Nepolarne interakcije, koje uključuju hidrofobne alkil grupe
- Nepolarne interakcije (karbonil i cijano grupe)
- Jonske interakcije između katjona i anjona.

Tabela 2.10. Mehanizam razdvajanja u tečnoj hromatografiji

Adsorpcija	Selektivna adsorpcija/desorpcija na čvrstoj fazi
Raspodela	Selektivna raspodela između dve nemešljive tečnosti
Jonska izmena	Razlike u jonoizmenjivačkim svojstvima
Jonski parovi	Formiranje jonskih parova i selektivna razmena ili adsorpcija ovih jonskih parova
Gel propustljivost/efekat molekuskog sita	Razlike u molekuskovj veličini ili sposobnosti za rasprostiranje unutar ili van pora sistema

Različite intra- i intermolekulske interakcije između molekula analita sa mobilnom i stacionarnom fazom su od velike važnosti u hromatografiji (Marjanović, 2001) i prikazani su na slici 2.20.



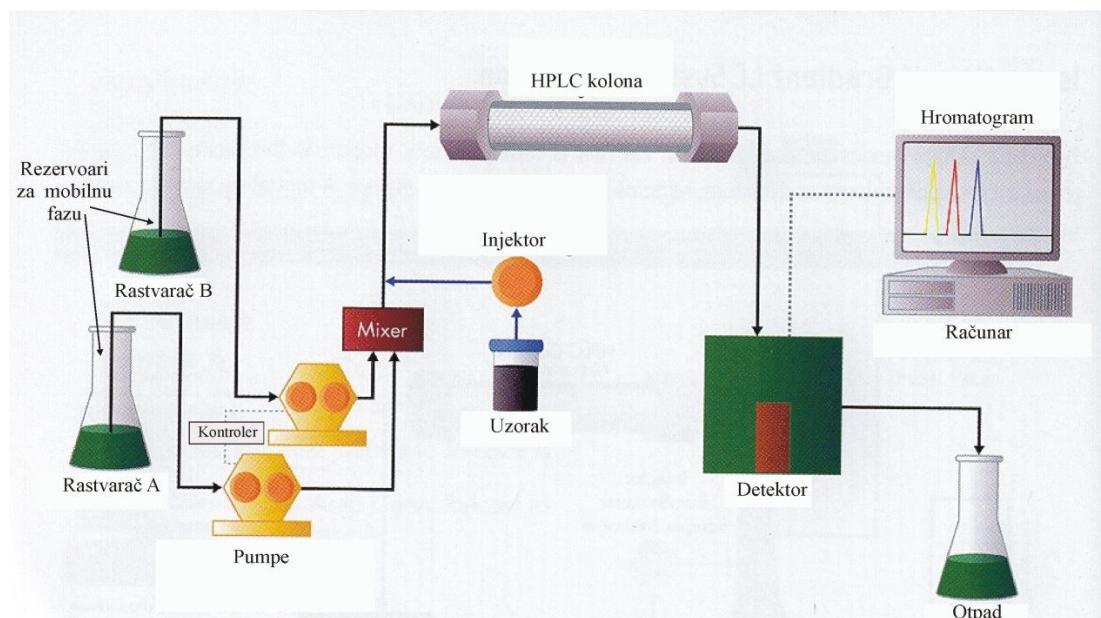
Slika 2.20. Intra- i intermolekulske interakcije u hromatografiji

2.7.5.3. Tečna hromatografija visokih performansi

Potreba za ubrzanjem procesa razdvajanja i određivanja analita od interesa uz istovremeno povećanje efikasnosti, neminovno je dovela do razvoja tehnike koja je prema uslovima rada dobila naziv tečna hromatografija pod visokim pritiskom (visokopritisna tečna hromatografija). Do naglog razvoja i primene HPLC došlo je pre svega zahvaljujući razvoju materijala za punjenje kolona. Sastavni delovi HPLC su prikazani su na slici 2.21.

Rezervoar za rastvarač ili smešu rastvarača (eluent) napravljen je od stakla ili nerđajućeg čelika i ima izlazni otvor za vazduh. Mnogi rastvori i smeše rastvora (naročito vodeni rastvori) sadrže značajne količine azota i kiseonika iz vazduha. Ovi gasovi mogu dovesti do stvaranja mehurića u sistemu za hromatografiju što može izazvati ozbiljan šum na detektoru i dovesti do gubitka efikasnosti u kolonama, zbog čega noviji aparati sadrže polupropustljive membrane unutar degazera (Agilent Tehnologies, 2005). Pumpe postižu i održavaju željeni protok mobilne faze kroz sistem. Obezbeđuju adekvatan ulazni pritisak od oko 1 mL min^{-1} mobilne faze uz odgovarajući protok kroz hromatografski sistem. Najčešće su u upotrebi klipne pumpe sa linearnim (jednosmernim) ili naizmeničnim kretanjem klipa. Postoje dva načina razdvajanja, a to

su izokratski i gradijentni. Kod izokratske hromatografije sastav mobilne faze ostaje isti tokom cele analize, dok se kod gradijentne menja.



Slika 2.21. Šema HPLC (binarni sistem mešanje pod visokim pritiskom)

U poređenju sa klasičnom tečnom hromatografijom, HPLC sistem karakterišu sledeći parametri: visoka rezolucija, mali unutrašnji prečnik kolone, kolone su pakovane česticama manjeg prečnika, visok ulazni pritisak, precizna kontrola pritiska i protoka, kontinualna detekcija sa visokom osetljivošću, brza analiza i mala količina uzorka i rastvarača.

Najčešće primenjivana metoda tečne hromatografije je reverzno fazna hromatografija, pogodna za analizu polarnih i jonogenih analita. Nepolarni, hemijski modifikovani silika gel, ili drugi nepolaran materijal kao što je stiren-divinilbenzen kopolimer, koriste se kao stacionarna faza u kombinaciji sa smešom voda-organski rastvarač. Silika gel se češće koristi kao materijal za punjenje kolona. Konvencionalni hemijski modifikovan silika gel je stabilan u organskim i vodenim rastvaračima u opsegu vrednosti pH rastvora od 2,5-7,5. Interakcija analita sa stacionarnom fazom u koloni kod reverzno fazne hromatografije je relativno slaba interakcija na bazi Van der Valsovih sila. Retencija opada sa porastom polarnosti analita. Smeše vode ili vodenog pufera i organskog modifikatora (metanol, acetonitril, tetrahidrofuran) se najčešće koriste kao eluenti. Tip organskog modifikatora i njegov udeo u eluentu je važan parametar u podešavanju retencije nejonskih analita. Acetonitril zbog manje viskoznosti u smeši sa vodom se

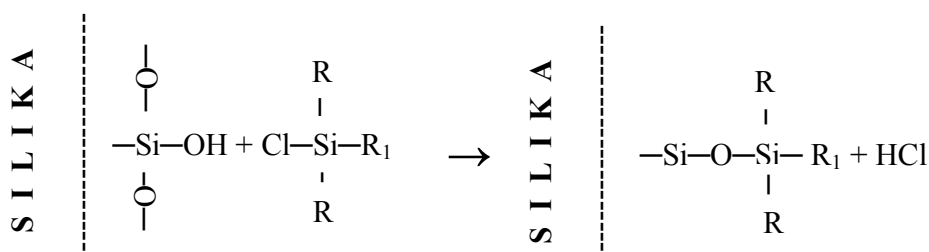
više koristi u odnosu na metanol. U reverzno faznoj hromatografiji puferi se dodaju u mobilnu fazu pri analizi jonogenih analita, kako bi smanjili protolizu.

2.7.5.3.1. Karakteristike hromatografske kolone

Kolone za HPLC najčešće imaju standardne dimenzije 3 mm x 125-300 mm, a izrađene su od nerđajućeg čelika ili tantala. Na oba kraja kolone se nalaze proširenja na kojima je narezan navoj za vezivanje specifične navrtke (nut), namenjene za spajanje kolone sa metalnim kapilarama za dovod i odvod tečnosti. Pored toga, nut služi i za učvršćavanje sita na početku i na kraju kolone, koja služe za uklanjanje potencijalno mogućih grubih nečistoća.

Punjenja kolona mogu biti adsorbensi, inertni nosači, izmenjivači jona, molekulska sita i modifikovani nosači za afinitetnu hromatografiju. Kod HPLC se već duže vreme, a danas gotovo isključivo, koriste punjenja kolona kod kojih je na osnovnom silikatnom materijalu izvedena hemijska modifikacija površine, vezivanjem odgovarajućih supstanci različitog karaktera, tkz. hromatografija na vezanim fazama (eng. Bonded Phase Chromatography, BPC). Površinske silanolne grupe iz polaznog silikatnog materijala vezuju se kako bi se eliminisale adsorpcione osobine inertnog nosača (Marjanović, 2001).

Modifikacija, odnosno hemijsko vezivanje faza, kojim se delimično ili potpuno menja karakter punjenja, može se opisati reakcionom šemom kao na slici 2.22. Za polazni materijal najčešće se koristi silika gel (SILIKA) čije se silanolne grupe vezuju pomoću hloro- ili alkoksiderivata silana, a R grupe su često $-\text{CH}_3$ grupe, dok su R_1 grupe različite, kao što i stepen vezivanja površinskih silanolnih grupa može biti različit. Osobine punjenja kolone pre svega zavise od fizičko-hemijskih osobina ostataka R_1 grupe. U praksi se najčešće koriste: n- C_8 , n- C_{12} , i n- C_{18} , kao i njihova kombinacija sa aromatičnim ostacima. Takođe mogu biti $-\text{NH}_2$ grupe uz alkil deo i $-\text{CN}$ grupe ili dr.



Slika 2.22. Šematski prikaz hemijskog vezivanja faza na silanolne grupe silika gela

Karakterom hemijski veznih faza se ne definiše do kraja ponašanje punjenja u HPLC. Nepotpunim vezivanjem silanolnih grupa dobija se površina punjenja koja delom ima polarni karakter, a delom karakter je zavisen od karakteristika vezane faze (npr. nepolaran, ukoliko je vezana faza n-C₁₈). Kako će se navedeno punjenje ponašati u datoj hromatografskoj analizi (kao adsorbens ili kao nosač na kome se odvija hromatografija na normalnim ili obrnutim fazama) zavisi od sastava mobilne faze. U praksi, isto punjenje se može koristiti za različite namene zavisno od toga da li se kao dominantne koriste preostale silanolne grupe (adsorpciona hromatografija ili podeona hromatografija na normalnim fazama) ili oktadecil grupe (podeona hromatografija na obrnutim fazama) (Marjanović, 2001).

Polazni silikatni materijal ima uticaja na krajnje osobine punjenja sa hemijski vezanom fazom. Bitne osobine polaznog materijala su specifična površina, koja zavisi od prečnika čestica i njegove poroznosti. U HPLC se teži manjem prečniku čestica punjenja (oko 1,8 μm i manje) i optimalnom prečniku pora, dimenzije pora treba da omoguće hemijsko vezivanje faza, bez sternih smetnji uz zadržavanje mehaničke otpornosti (Marjanović, 2001).

Problemi koji mogu nastati, kao što su asimetrični pikovi, često se povezuju sa izabranom kolonom, a uzroci mogu biti različiti: preopterećenje kolone, neželjene interakcija analita i stacionarne faze (primer zaostale silanolne grupe, praznine u koloni pri pakovanju i dr.).

Sferne čestice, koje se koriste pri punjenju kolona smanjuju, pozadinski pritisak (eng. back pressure) i produžavaju vek trajanja svake kolone. Punjenje kolona sa manjim čestica ujednačene veličine, velike gustine, obezbeđuju manji međuprostor između čestica, kao i homogenost i uniformnost pakovanja. Kolone punjene sa gustom pakovanjem česticama, omogućavaju manju difuziju vezanog uzorka između čestica, uzrokujući uže i oštrije pikove, u većem opsegu protoka.

Neke karakteristike kolona, unutrašnji prečnici (engl. inner diameter, ID) i njihovo poređenje prikazano je u tabeli 2.11.

Tabela 2.11. Karakteristike hromatografskih kolona sa različitim unutrašnjim prečnikom

Tip	ID (mm)	Protok (μL min ⁻¹)	V _{inj} (μL)	Relativni kapacitet punjenja ¹
Konvencionalni	4,6	1000	100	8333
Uži prečnik	2,0	200	19	1583
Mikro prečnik	1,0	47	4,7	392
Mikrokapilara	0,32	4,9	0,49	41
Nano prečnik	0,05	0,12	0,012	1

¹ na osnovu injekcione zapremine

Materijali koji se koriste za punjenje kolone su sledeći: silika (silika gel-silicijum dioksid), aluminium oksid, polimeri (polistiren divinilbenzen, polimetilmetakrilat, polivinilalkohol), hibridi (kombinacija silike i polimera). Kod hibridnog tipa kolone vezivanje polimera za silanolne grupe silike može biti monomerno ili polimerno vezivanje.

Kolona se pre analitičkog korišćenja mora uravnotežiti propuštanjem mobilne faze odgovarajućeg sastava na odgovarajućoj temperaturi.

2.7.5.3.2. Detektori

Detektor prevodi signal mase (koncentracije) u električni signal, koji se zatim pojačava, moduliše i meri (registruje). Određivanje analita od interesa u tečnoj hromatografiji, svodi se na upoređivanju intenziteta signala analita (najčešće površine pika) sa intenzitetom signala nekog referentnog materijala (ili standardne supstance) pod istim eksperimentalnim uslovima. Najvažnija osobina detektora je osetljivost (prvi izvod električne veličine po masi ili koncentracije). Važnu praktičnu vrednost, naročito u kvantitativnim određivanjima, imaju apsolutna osetljivost, brzina odziva, linearnost odziva, univerzalnost (specifičnost), šum, mrtva zapremina ili vreme i dr. (Marjanović, 2001). Šum se može definisati kao promena signala detektora bez prisustva analita u toku vremena, i najčešće se javlja elektronski šum. Intenzitet signala analita u odnosu na šum označava se kao odnos signal-šum (Harris, 2010).

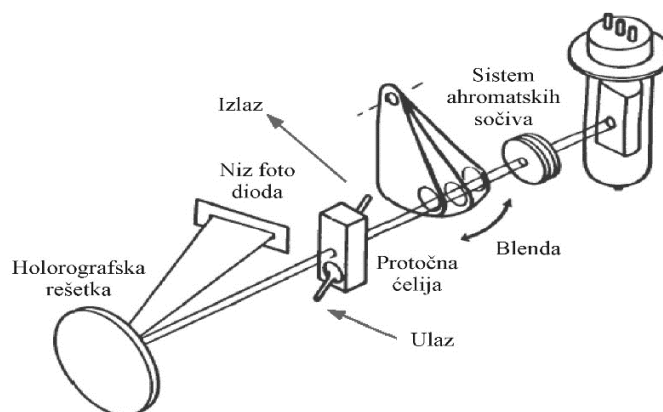
Najveću primenu imaju UV detektori, odnosno detektori zasnovani na apsorpciji zračenja iz UV i vidljive oblasti elektromagnetnog spektra i MS detektori. Na osnovu UV spektra moguće je odrediti klasu jedinjenja, pri čemu MS detektor pruža podatke o molekularnoj masi ispitivanog jedinjenja, kao i njegove strukturne podatke (Settle, 1997). Pored toga, u nešto manjoj primeni su detektori na bazi merenja fluorescencije, detektori na bazi merenja indeksa refleksije i elektrohemijski.

Ultravioletni detektor (engl. ultraviolet detector, UV) se koristi za određivanje jedinjenja koja imaju UV hromoforu i apsorbuju u UV spektralnoj oblasti od 190-400 nm. Supstance koje se mogu analizirati ovim detektorom su svi olefini, svi aromati i sve supstance koje sadrže > CO, >CS, -N=O, -N≡N-, -SO₂, -Br, -S-S-, -NH₂, -O-O grupe (Marjanović & Krstić, 1998). Ovi detektori mere apsorbciju pri konstantnoj talasnoj dužini (ili rasponu talasnih dužina) koristeći protočne ćelije kroz koje protiče eluat (eluent+analit) i eluent (rastvarač ili mobilna

faza). Veza između intenziteta UV zračenja propuštenog kroz ćeliju detektora i koncentracije rastvora data je Lambert-Beer-ovim zakonom (Marjanović & Krstić, 1998):

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c; \quad \text{ili} \quad I_t = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon \cdot l \cdot c} \quad (21)$$

gde su: A - apsorbancija, ε - koeficijent apsorbancije, l - debljina sloja u (cm), c - koncentracija rastvora, I_0 - intenzitet inicijalnog zračenja, I_t - intenzitet propuštenog zračenja. Iz prethodnog izraza se vidi da su dva faktora koja utiču na osetljivost detektora, koeficijent apsorbancije rastvora koji se detektuje i dužina puta elektromagnetnog zračenja koje prolazi kroz ćeliju. Osetljivost ovih detektora povećava se isključivo konstrukcijama koje omogućavaju veću dužinu (l), jer na ostale veličine se ne može uticati. Apsolutna osetljivost UV detektora je najviše do 10^{-10} g mL⁻¹, vreme odziva je malo, linearnost velika i temperaturna zavisnost odziva je relativno mala. Priroda supstance, tj. oblik u kome se supstanca nalazi, mora biti potpuno definisana, uslovi sredine treba da obezbede najstabilniji oblik supstance. Ukoliko se supstanca nalazi u obliku podložnom nestabilnoj ravnoteži, može doći do značajnih grešaka prilikom njenog kvantitativnog određivanja. Greške u izboru talasne dužine mogu da izazovu grube greške merenja (Marjanović, 2001). Novije konstrukcije ovog detektora omogućavaju neprekidno merenje (snimanje) apsorpcionog spektra analita od interesa uz pomoć monohromatora i fotoosetljivih dioda (eng. diode array) (Slika 2.23), što ih čini izuzetno pogodnim za kvalitativnu, a posebno za kvantitativnu analizu (Marjanović, 2001).



Slika 2.23. Šematski prikaz ultravioletnog detektora sa nizom dioda

Na ovaj način uzorak je podvrgnut uticaju elektromagnetnog zračenja svih talasnih dužina iz lampe. Ovaj detektor omogućava da se u veoma kratkim vremenskim intervalima (oko 10 ns) prati zavisnost apsorbancije od talasne dužine (spektar) i zavisnost apsorbancije (i celog spektra)

od vremena (hromatogram) (Marjanović, 2001). Ovaj detektor dozvoljava praćenje signala jedne diode u realnom vremenu, tako da je moguće praćenje hromatograma, dok se razdvajanje odvija (Scott, 2002).

Fluorometrijski detektor spada u red osetljivijih specifičnih detektora (oko 10^{-9} g mL⁻¹). Odziv mu se ne menja sa temperaturom. Građa ovog detektora je veoma slična UV detektoru, razlika je što se merenje inteziteta reemitovanog zračenja izvodi pod uglom od 90° u odnosu na upadni zrak. Pore toga, selekcionni sistemi (optički filteri ili monohromatori) se nalaze na putu ulaznog i izlaznog zraka. Za određivanje analita od interesa ovim detektorom, neophodno je da supstanca fluorescira (Marjanović, 2001).

Detektori na bazi merenja indeksa refrakcije spada u red univerzalnih detektora (svaka supstanca ima svoj indeks refrakcije), ima ograničenje zbog manje osetljivosti (oko 10^{-7} g mL⁻¹) i velikom temperaturnom zavisnošću. Za maksimalnu osetljivost ovog detektora, neophodno je da se temperatura održava sa odstupanjem od $\pm 0,001^{\circ}\text{C}$. Kada se tokom analize u kivetama nađu eluat i eluent različitih indeksa refrakcije, izlazni zrak se deli u dva zraka nejednakih inteziteta, što stvara nejednake električne signale na fotoelementima i odgovarajući odziv detektora. Tokom analize u kivetama sa eluatom i eluentom različitih indeksa refrakcije izlazni zrak se deli u dva zraka nejednakih intenziteta, što stvara nejednake električne signale na fotoelementima i odgovarajući odziv detektora koji je u funkciji razlika u indeksima refrakcije eluata i eluenta, odnosno koncentracije određivane supstance (Marjanović, 2001).

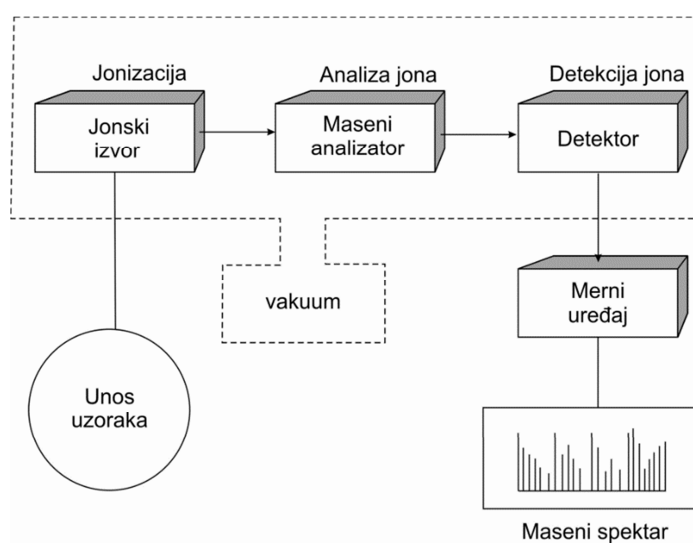
Elektrohemijski detektori se grade na različitim principima (konduktometrijski, voltometrijski, amperometrijski). Ovi detektori imaju osetljivost do 10^{-8} g mL⁻¹, dok im je temperaturna zavisnost između 1,5-2%. Pomoću ovih detektora je moguće određivanje supstanci koje su jonogene ili mogu da reaguju sa radnim elektrodama različitih osobina (Marjanović, 2001).

Detektori u HPLC su najvećim delom nedestruktivni, tako da prolaskom kroz njih razdvojene supstance ostaju nepromenjene. To omogućava da se pojedine frakcije mogu sakupljati pomoću fracionog kolektora i dalje dodatno analizirati nekim drugim instrumentalnim tehnikama. Tumačenje rezultata, obuhvata kvalitativnu analizu na osnovu elucionih (retencionih) vremena i kvantitativnu analizu, na osnovu površina zahvaćenih pikovima, uz prethodno eksperimentalno definisanje funkcije zavisnosti površine zahvaćene pikom od koncentracije određivane supstance (Marjanović, 2001).

Maseni spektrometar

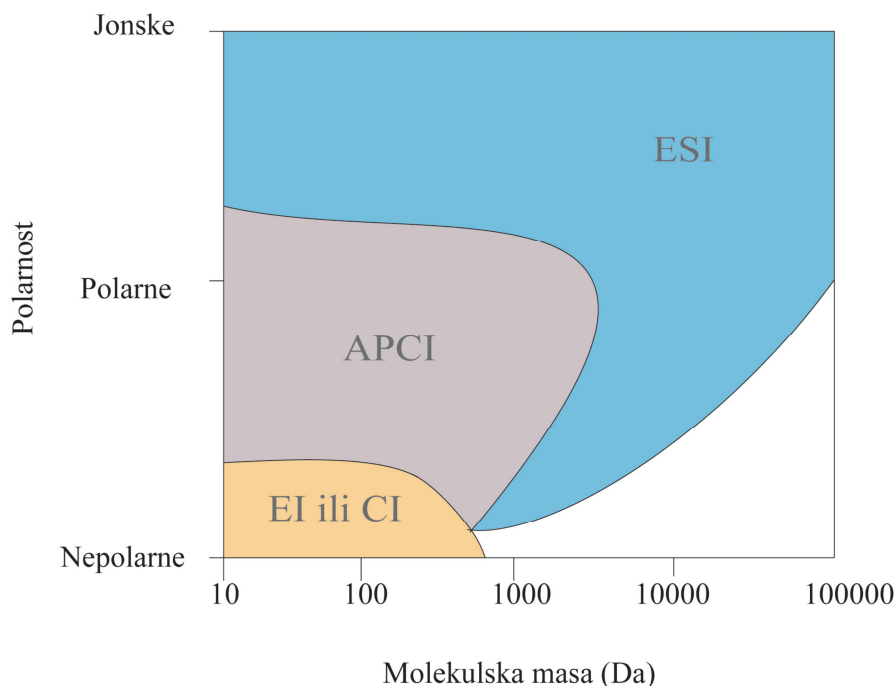
Masena spektrometrija je analitička tehnika koja se primenjuje u kvalitativnoj i kvantitativnoj analizi, za određivanje strukture, molekulske mase i izotopskog sastava složenih organskih molekula. Ovom tehnikom se analiziraju molekuli i njihovi fragmenti na osnovu odnosa mase i naelektrisanja (m/z).

Osnovni delovi masenog spektrometra su: sistem za unošenje uzorka, jonski izvor, maseni analizator, detektor (koji pretvara jonski signal u električni) i sistem za registraciju signala (Slika 2.24).



Slika 2.24. Blok šema masenog spektrometra

Joni nastaju iz neutralnih formi, a razdvajanja čestica se odvija u vakuumu. Ovaj proces se naziva jonizacija i odvija se u jonizacionoj komori. Formirani joni se elektrostatički usmeravaju u maseni analizator, gde se razdvajaju prema njihovom m/z odnosa, nakon čega detektor generiše električni signal, koji se prenosi na računar (Ardrey, 2003). Pored selektivnosti, ova tehnika poseduje i veliku osetljivost (oko 1 pg). Jonski izvor je deo uređaja koji omogućava jonizaciju analita. Proces jonizacije je složen zbog viška unutrašnje energije koja se saopštava molekulu analita, usled čega dolazi do pojave različitih vrsta jona u masenom spektru kao što su: molekulski joni, fragmentni joni, preuređeni joni, višestruko naelektrisani joni i metastabilni joni. Svaki od nastalih jona u masenom spektru nosi određene informacije o uzorku, čime je omogućena kvalitativna analiza, odnosno identifikacija nepoznatog jedinjenja. Izbor jonskog izvora zavisi od molekulske mase ispitivane supstance i njene polarnosti, kao što je prikazano na slici 2.25. (Edmond de Hoffmann, 2007).

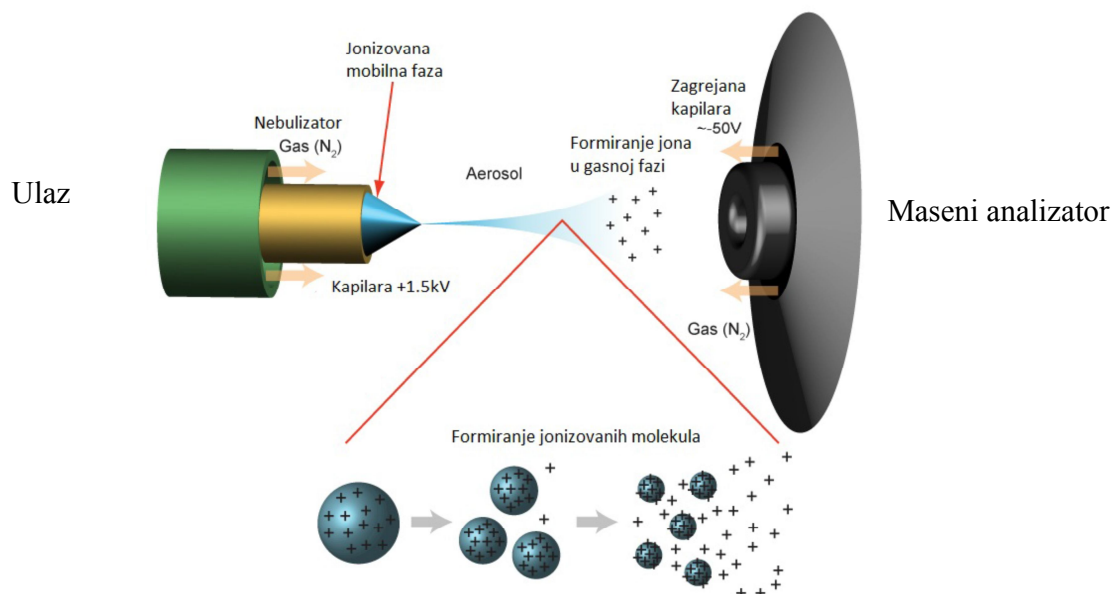


Slika 2.25. Izbor jonskog izvora u zavisnosti od molekulske mase ispitivane supstance i njene polarnosti

Postoji veliki broj jonizacionih tehnika, a neke od njih su:

- 1) Jonizacija elektronima (eng. electron impact, EI);
- 2) Hemijska jonizacija (eng. chemical ionization, CI);
- 3) Jonizacija u električnom polju (eng. field ionization, FI);
- 4) Jonizacija desorpcijom (eng. field desorption, FD);
- 5) Elektrospej jonizacija (eng. electrospray ionization, ESI);
- 6) Jonizacija varnicom (eng. spark source, SS);
- 7) Bombardovanje atomima (eng. fast atom bombardment, FAB);
- 8) Jonizacija potpomognuta laserskom desorpcijom iz matriksa (eng. matrix assisted laser desorption ionization, MALDI).

Elektrospej jonizacija (ESI) je „meka“ jonizaciona tehnika, u okviru koje joni poprimaju relativno malu energiju, zbog čega je fragmentacija smanjena u značajnoj meri. Stoga, pri manjim energijama jonizacije dominantan jon je protonovani jon $[M+H]^+$ na masenom spektru (Slika 2.26). Rastvor sa analitom se uvodi kroz metalnu kapilaru (nebulajzer) na atmosferskom pritisku, pod visokim naponom.



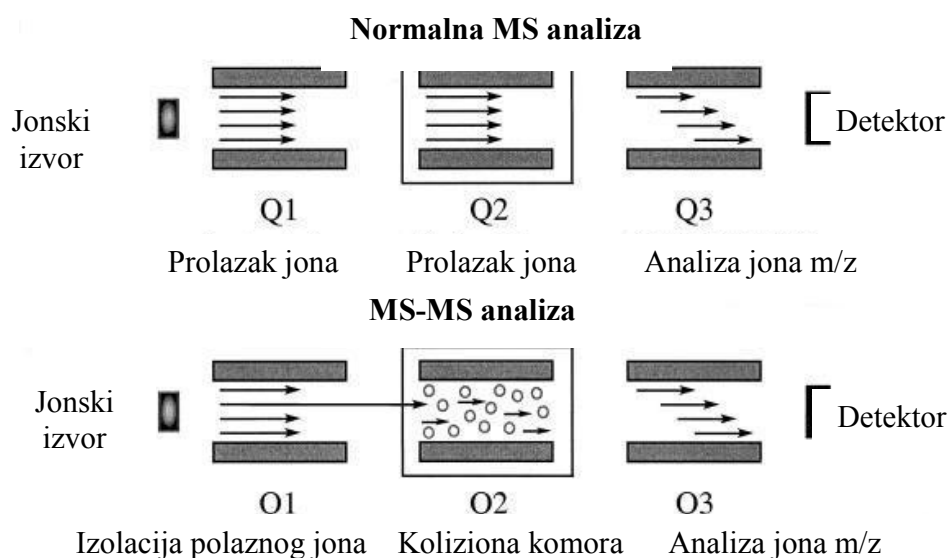
Slika 2.26. Elektrosprej jonizacija u pozitivnom modu

Proizvedeni joni su naelektrisani, što je od velikog značaja, zbog činjenice da maseni spektrometar meri odnos m/z , pa se maseni opseg instrumenta ovim bitno može povećati. Elektrosprej jonizacija je najčešće korišćena jonizaciona tehnika za neutralna, srednje polarna i visoko polarna jedinjenja, koja su termički nestabilna i neisparljiva, koja se mogu protonovati, deprotonovati ili graditi adukte sa katjonima ili anjonima. Termolabilne komponente mogu se jonizovati na ovaj način bez njihove degradacije. Vrsta mobilne faze, vrednost pH, viskozitet, provodljivost, površinski napon i polarnost, značajno utiču na proces elektrosprej jonizacije (Tang i sar., 2010).

Nakon nastajanja jona korišćenjem odgovarajuće jonizacione metode, neophodno je razdvojiti jone po odnosu m/z , odrediti taj odnos i nakon toga izmeriti relativni intenzitet svake grupe jona. Sa razvojem metoda jonizacije usledio je i razvoj masenih analizatora, kako bi se zadovoljili zahtevi analize širokog spektra molekula.

Maseni analizatori mogu u sebi imati više analizatora, a u tom slučaju govorimo o tandem masenoj spektrometriji (MS-MS ili MS^n). Trostruki kvadrupol (QqQ ili MS-MS) je najzastupljeniji uređaj za MS^n tehniku. Hardver se sastoji od tri kvadrupola u seriji (Slika 2.27). Osnovna prednost tandem masene spektrometrije je visoka selektivnost, a identifikacija ispitivanog jedinjenja se ne vrši samo na osnovu molekulske mase, već i na osnovu karakterističnih fragmenata. Prvi od tri kvadrupola u seriji selektivno propušta jon karakterističan

za ispitivani analit (najčešće molekulski jon). U kolizionu ćeliju (drugi kvadrupol, Q2) ulazi jon prekursor iz Q1 (MS1) i u njoj se vrši njegova fragmentacija. Nakon koliziono aktivirane disocijacije koja se dešava u drugom kvadrupolnom filteru, u treći kvadrupolni filter Q3 (MS2) se propuštaju karakteristični joni potomci (fragменти) u kojem se dalje razdvajaju dobijeni fragmenti. Obično se tandem MS eksperimenti izvode sudarom odabranog jona atomima inertnih gasova (Ar, He), filtriranjem i merenjem prekursora i produkata (Ardrey, 2003).



Slika 2.27. Šematski prikaz trostrukog kvadrupolnog masenog spektrometra, QqQ

U okviru trostrukog kvadrupola postoji nekoliko režima rada u zavisnosti od potreba analize i to je:

- 1) **Totalno skeniranje** (eng. full scan) obično se koristi na samom početku razvoja metode, kako bi se pronašao molekulski jon analiziranog jedinjenja (odnosno $[M+H]^+/[M-H]^-$). Koliziona komora je neaktivna, a kvadrupol Q3 vrši analizu jonizovanih molekula.
- 2) **Monitoring selektovanih jona** (eng. selected ion monitoring, SIM) za praćenje specifičnih jona u standardnom rastvoru koji se ubrizgava ili u uzorku koji se rutinski analizira. Prvi kvadrupol tada funkcioniše kao filter i selektuje izabrani jon, a koliziona komora ostaje neaktivna. Stoga se ova opcija koristi za detekciju i kvantifikaciju jedinjenja u tragovima.
- 3) **Monitoring multi reakcija** (eng. multiple reaction monitoring, MRM) se najčešće koristi u kvantitativnoj analizi sa trostrukim kvadrupolom, jer omogućava visoku osetljivost i

selektivnost u analizi većeg broja traženih jedinjenja. Prvi kvadrupol radi kao filter i propušta samo izabrane, tzv. roditeljske jone ili prekursore. Koliziona ćelija se optimizuje tako da se u njoj formiraju dodatni joni, tj. proizvodi. Ovi joni prolaze u treći kvadrupol koji takođe propušta samo izabrane jone. Na ovaj način u MRM opciji kvadrupol radi kao dvostruki filter što drastično smanjuje uticaj matriksa i povećava osetljivost analize.

Nakon što su joni razdvojeni u masenom analizatoru, oni stižu do jonskog detektora. Detektor proizvodi električni signal na osnovu upadnih jona. Najčešće korišćeni detektori su elektronski multiplikator i dinoda visoke energije (eng. high energy dinode, HED).

2.7.5.4. Sprega tačne hromatografije i masene spektrometrije

Identifikacija pesticida prisutnih u malim količinama (rezidue) u različitim matriksima životne sredine, kao i analiza kompleksnih smeša ili analiza nepoznatih uzoraka zahteva multidisciplinarn pristup u hemijskoj analizi.

Tečna hromatografija kuplovana sa tandemskom maseno-spektrometrijskom detekcijom (HPLC-MS-MS) predstavlja spregu jedne separacione i jedne spektroskopske metode. U tačnoj hromatografiji identifikacija nepoznate supstance se zasniva na poređenju retencionih karakteristika sa referentnim materijalom. U matriksima životne sredine mogu biti prisutne supstance koje pokazuju slično hromatografsko ponašanje, što može znatno otežati kvalitativnu i kvantitativnu analizu. Pomoću masene spektroskopije moguće je dobiti maseni spektar traženog jedinjenja, koji je dovoljno specifičan da omogući pouzdanu identifikaciju sa visokom osetljivošću.

Moguća su ograničenja sprege HPLC-MS-MS zbog činjenice da mobilne faze sa većim udelom vode u HPLC analizi mogu predstavljati prepreku za održavanje vakuuma potrebnog za rad masenog spektrometra. Osim toga, u HPLC analizi često se koriste mobilne faze koje sadrže puferske smeše (teško isparljivi fosfatni puffer, boratni i dr.), a pri analizi na masenom detektoru se ove puferske smeše moraju zameniti sa isparljivijim (amonijum acetat, formijat i dr.). Joni alkalnih metala iz puferskih smeša mogu da grade jonske parove i radikale sa analitom i tako onemogućavaju njegovu identifikaciju na masenom detektoru.

Kombinacija HPLC i masene spektrometrije kao detektora omogućuje dobru osetljivost i selektivnost određivanja. Pravilnim izborom mobilne faze i rastvarača za ekstrakciju, moguće je brzo određivanje ostataka pesticida u kompleksnom matriksu kao što je zemljište. Separacione

karakteristike HPLC potpomognute selektivnošću i osetljivošću masenog spektrometra daju kvalitativne i kvantitativne informacije od visokog poverenja, za širok spektar supstanci u različitim matriksima.

2.7.5.5. Određivanje SU primenom gasne hromatografije

Direktno određivanje SU gasnom hromatografijom se veoma retko primenjuje zbog ograničene isparljivosti SU. Slaba isparljivost SU dovodi do nepotpunog eluiranja sa kolone i nereproduktivnih rezultata hromatografskog razdvajanja. Zbog toga se najčešće izvodi derivatizacija, kako bi se dobili isparljiviji derivati SU, i time poboljšala osetljivost i selektivnost određivanja. U ove svrhe najčešće se primenjuju sledeći reagensi za derivatizaciju: diazometan (Ahmad, 1987; Klaffenbach & Holland, 1993; Klaffenbach i sar., 1993; Singh & Paul, 2011), pentafluorobenzil bromidom (Cotterill, 1992) i bor trifluorid dietil etar (Zhang i sar., 2015). Derivati su značajno isparljiviji i stabilniji za određivanje gasnom hromatografijom. Azot fosforni detektor (NPD), elektron apsorbujući detektor (ECD) (Ahmad 1987) i maseni spektrometar (MS) su najčešće korišćeni detektori u analizi SU gasnom hromatografijom (Cotterill, 1992; Klaffenbach & Holland, 1993). Gubitak dela produkata predstavlja nedostatak ove metode, kao i složen postupak derivatizacije ciljanog analita.

2.7.5.6. Određivanje SU primenom tečne hromatografije

Za direktno određivanje teško isparljivih SU i njihovih degradacionih proizvoda najčešće se koriste analitičke metode bazirane na tečnoj hromatografiji pod visokim pritiskom (HPLC), uz primenu odgovarajućih detektora. HPLC ima veliku osetljivost, visoku rezoluciju, dobru selektivnost i ne zahteva suviše složenu pripremu uzoraka za analizu.

Najčešće se izvodi hromatografija na obrnutim fazama (Akiyama i sar., 2002; Liang i sar., 2014; Miao i sar., 2015). Direktno određivanje SU herbicida u zemljištu je moguće primenom HPLC sa UV detektorom merenjem apsorpcije u oblasti od 225 do 254 nm zbog njihove apsorpcije u UV oblasti elektromagnetnog zračenja (Powley i sar., 1998; Hollaway i sar., 1999; Hogendoorn i sar., 2001; Yang i sar., 2010; Fang i sar., 2010; Chen i sar., 2011; Asiabi i sar., 2013; Yan i sar., 2014), kao i UV detektorom sa nizom dioda (UV-DAD) u oblasti talasnih dužina od 225 do 240 nm (Zhu i sar., 2002; Paul i sar., 2009; Wu i sar., 2009). Ostvarene granice detekcije uz primenu navedenih detektora su se kretale u opsegu od 0,1 do 12 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Granice

detekcije uz primenu masenog spektrometra kao detektora su se kretale u opsegu od 0,02 do 6,9 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (Bossi i sar., 1999; Ye i sar., 2006; Degelmann i sar., 2006; Hu i sar., 2010).

Nove generacije kolona koje mogu da izdrže visoke pritiske (do 1000 bara) uz odgovarajuću instrumentaciju koja omogućava rad na tako visokim pritiscima, doveli su do razvoja ultra efikasne tečne hromatografije (eng. ultra performance liquid chromatography, UPLC). Primenom UPLC metoda za određivanje SU vreme analize je znatno kraće, a granice detekciju su u opsegu od 0,08 do 0,26 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (Li i sar., 2014).

3. Cilj istraživanja

Osnovni cilj ovog rada bio je razvoj odgovarajuće analitičke metode koja bi se mogla primeniti za određivanje sadržaja ostataka sulfonilurea herbicida u uzorcima zemljišta. Istraživanja u okviru ove disertacije će obuhvatiti četiri osnovne faze:

1. Razvoj brze, jednostavne, dovoljno osetljive i selektivne metode za određivanje i praćenje ostataka SU herbicida u zemljištu primenom visoko-pritisne tečne hromatografije sa UV detektorom sa nizom dioda (HPLC-UV-DAD).
2. Definisane metode visoko-pritisne tečne hromatografije sa masenim detektorom (HPLC-MS-MS) za potrebe osetljivijih, selektivnijih, a tako i tačnijih određivanja SU u uzorcima zemljišta.
3. Definisane odgovarajućeg postupka pripreme uzoraka zemljišta za analizu SU primenom mikrotalasa i ultrazvuka. U okviru ove faze ispitaće se efikasnost ekstrakcije u zavisnosti od rastvarača za ekstrakciju, temperature i vremena trajanja ekstrakcije. Definišaće se postupak pripreme uzoraka zemljišta i prečišćavanje ekstrakta primenom ekstrakcije na čvrstoj fazi (SPE).
4. Određivanje sadržaja ispitivanih SU u prethodno tretiranom zemljištu (zasejano kukuruzom i sojom) sa odgovarajućim formulacijama pesticida koje sadrže odabrane herbicide na bazi SU. Pratiće se njihova postojanost u zemljištu pri realnim klimatskim uslovima (temperatura i padavine) u određenom periodu.

Prva faza istraživanja, optimizacija uslova HPLC-UV-DAD određivanja sadržaja odabranih sulfonilurea, obuhvatiće definisanje najznačajnijih eksperimentalnih faktora: izbor talasne dužine, sastav mobilne faze i uslove gradijentne elucije, kako bi se postiglo odgovarajuće razdvajanje SU u što kraćem vremenu, kao i određivanje opsega linearnosti, granice detekcije (LOD) i granice kvantifikacije (LOQ). Nakon definisanja opštih analitičkih zahteva (osetljivost, tačnost, reproduktivnost, selektivnost, ponovljivost i linearnost signala) sadržaj sulfonilurea u uzorcima zemljišta biće određen metodom eksternog standarda. Primenljivost i ispravnost metode će se proveriti testom povrata uz primenu MMS standarda.

Eksperimentalni rad u drugoj fazi istraživanja, definisanje HPLC-MS-MS metode, obuhvatiće definisanje najznačajnijih parametara masenog detektora: uticaj napona na

fragmentoru i napona kolizione ćelije za ciljane jone i jone za identifikaciju na analitički signal. Pored toga, definisaće se opseg linearnosti, granica detekcije i granica kvantifikacije.

U okviru treće faze istraživanja, ispitaće se mogućnost primene mikrotalasne i ultrazvučne ekstrakcije u cilju izdvajanja sulfonilurea herbicida iz uzoraka zemljišta. Definisanje odgovarajućeg postupka pripreme uzoraka zemljišta obuhvatiće ispitivanje sledećih faktora: sastav i zapremina smeše rastvarača za ekstrakciju, temperatura i vreme trajanja ekstrakcije odabranih SU iz zemljišta. Ova faza će obuhvatiti i odabir sorbenta za ekstrakciju na čvrstoj fazi kako bi se uklonile ometajuće komponente iz zemljišta koje mogu maskirati ili ometati određivanje sulfonilurea kao i kontaminirati sam instrument na kojem će se obaviti dalje određivanje.

Nakon definisanog postupka pripreme i prečišćavanja uzoraka za analizu, pripremljeni uzorci će se analizirati optimizovanim postupkom tečne hromatografije sa UV-DAD detektorom, a primenljivost i ispravnost metode će se proveriti paralelnom analizom odabranih uzoraka sa HPLC-MS-MS. Razvojem HPLC-UV-DAD metode za određivanje ostataka sulfonilurea u zemljištu omogućiće se brza kontrola zemljišta, u cilju ispravnog planiranja plodoreda za odgovarajući tip zemljišta. Dobijeni rezultati bi trebalo da ukažu na stepen postojanosti odabranih sulfonilurea u polju nakon tretiranja, u zavisnosti od klimatskih uslova i tipa zemljišta.

4. Eksperimentalni deo

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije realizovan je u Laboratoriji za zemljište i agroekologiju, Instituta za ratarstvo i povrtarstvo u Novom Sadu. Deo istraživanja je urađen u Laboratoriji za biohemiju lekovitog bilja i tečnu hromatografiju Departmana za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu.

4.1. Aparati i pribor

Tokom izvođenja eksperimentalnog dela istraživanja korišćena je sledeća oprema:

❖ Tečni hromatograf sa UV-DAD detektorom (Agilent Technologis 1100 Inc, USA)

➤ DAD G 1315A

- 1024 reda optičkih dioda
- Deuterijumska i volframova lampa
- Opseg talasnih dužina od 190-900 nm
- Drift 2 mAU h⁻¹ na 254 nm
- Tačnost ± 1 nm
- Širina otvora 2 nm
- Standardna protočna ćelija od 13 µL

➤ Dvokanalna pumpa G 1312A

- Hidraulični sistem sa dva dvojna klipa
- Protok od 0,1- 5 mL min⁻¹
- Preciznost protoka < 0,3% RSD
- Pritisak do 400 bar (5 mL min⁻¹)
- Pulsiranje pritiska < 2% za protok od 1mL min⁻¹ za izopropanol
- Binarno mešanje pod visokim pritiskom
- Preciznost gradijentnog mešanja < 0,2% SD

➤ Autosempler G 1313A

- Injekcioni opseg od 0,1-100 µL
- Preciznost < 0,5% RSD od površine pika
- Opseg viskoziteta 0,2-50 cP
- Kapacitet autosemplera 100 viala (2 mL)

- Degaser (za uklanjanje rastvorenih gasova) sa 4 kanala G 1322A
 - pH opseg od 1-14
 - Unutrašnja zapremina 12 mL po kanalu
- Prikupljanje i obrada podataka je postignuta korišćenjem ChemStation ver. B.04.03 softver (Agilent Technologies, USA)
- ❖ Tečni hromatograf sa masenim detektorom (Agilent Technologies 1200 Series Rapid Resolution). Za kontrolu instrumenta i akviziciju podataka korišćeni su:
 - G1379B vakuum-degazer,
 - G1312B binarna pumpa,
 - G1367C autosempler,
 - G1316B termostatirani odeljak za kolonu,
 - G1315C DAD detektor
 - G6410A QqQ MS-MS detektor sa elektrosprej (ESI) jonskim izvorom,
 - Kontrola uređaja, prikupljanje i obrada podataka je postignuta korišćenjem MassHunter Workstation Data Acquisition i MassHunter Workstation Qualitative Data Analysis softvera izdanje B.01.03 softver (Agilent Technologies, USA)
- ❖ Kolona: Rapid Resolution HT Zorbax XDB C₁₈ (50 mm × 4,6 mm x 1,8 μm) (Agilent Technologies, USA)
- ❖ Elementalni analizator “CHNSO” (VARIO EL III)
- ❖ Sistem za mikrotalasnu ekstrakciju uzoraka (Milestone Ethos 1)
- ❖ Centrifuga (Eppendorf 5702)
- ❖ Sušnica za sušenje zemljišta sa regulacijom temperature (Memert ULE 700)
- ❖ Vorteks (Vortex RX3, VELP Scientifica)
- ❖ Vakum pumpa (PRISM enterprises, Inc. Mityvac)
- ❖ Sistem za prečišćavanje vode: Milli-Q system (SG Water, Ultra Clear 2002-D UV)
- ❖ Ultrazvučno kupatilo (Elmasonic S 30, radna frekvenca 37 kHz i snaga 320 W)
- ❖ Mlin za zemljište (Cemotec 1090sample Mill, Tecator, Sweden)
- ❖ Termostat (Sutjeska ST 05)
- ❖ pH metar sa staklenom elektrodom (CRISON GLP 21)
- ❖ Scheibler kalcimentar
- ❖ Plameni fotometar (EVANS, Elektoselenium)
- ❖ UV-VIS spektrofotometar (Cary 3E Varian)
- ❖ Sistem za uparavanje, TurboVap® LV evaporator (D1 Devarot, Buchi. Rotavato R-EL 182477)

- ❖ Sistem za filtriranje mobilne faze
- ❖ PTFE (politetrafluoretilen) filteri (0,22 μm) za mobilnu fazu
- ❖ Cijano (CN) kolone za SPE ekstrakciju, 100 mg, 1 mL
- ❖ Silika gel SPE kolone za SPE ekstrakciju, 100 mg, 1 mL
- ❖ Amino (NH_2) kolone za SPE ekstrakciju, 100 mg, 1 mL
- ❖ Diol kolone za SPE ekstrakciju, 100 mg, 1 mL
- ❖ SPE ekstraktor (Supelco manifold)
- ❖ Automatske pipete: Eppendorf 10 - 10 000 μL
- ❖ Tehnička vaga (Scaltec SBC 41)
- ❖ Analitička vaga (Scaltec SBC 31)
- ❖ Membrane Syringe Filters: Regenerated Cellulose, housing: Polypropylene, pore size: 0,45 μm ; diameter: 25mm
- ❖ Uobičajeno laboratorijsko posuđe i pribor (bočice, špricevi, kivete i dr.)
- ❖ Eijekelkamp sonda za uzorkovanje zemljišta

4.2. Hemikalije i rastvori

Tokom izvođenja eksperimentalnog dela rada korišćene su sledeće hemikalije i rastvori:

- ❖ Metanol (HPLC stepena čistoće $\geq 99,9\%$), Sigma Aldrich
- ❖ *n*-Heksan (HPLC stepena čistoće $\geq 99,9\%$), J.T. Baker
- ❖ Acetonitril (HPLC stepena čistoće $\geq 99,9\%$), J.T. Baker
- ❖ Hloroform (HPLC stepena čistoće $\geq 99,9\%$) J.T. Baker
- ❖ Aceton (HPLC stepena čistoće $\geq 99,9\%$) J.T. Baker
- ❖ Dihlormetan (HPLC stepena čistoće $\geq 99,9\%$) J.T. Baker
- ❖ Mravlja kiselina (ultrapure) Sigma Aldrich
- ❖ Sirćetna kiselina (p.a.) Sigma Aldrich
- ❖ Etil-acetat, LiChromosolv, Merck
- ❖ Nikosulfuron (93,5%) Dr. Ehrenstorfer
- ❖ Oxasulfuron (98,0%) Dr. Ehrenstorfer
- ❖ Prosulfuron (98,5%) Dr. Ehrenstorfer
- ❖ Rimsulfuron (99,3%) Dr. Ehrenstorfer
- ❖ Komercijalna formulacija nikosulfurona (Kelvin[®], 40 g L⁻¹)
- ❖ Komercijalna formulacija rimsulfurona (Rimex[®], 250 g kg⁻¹)
- ❖ Komercijalna formulacija prosulfurona (Peak[®], 750 g kg⁻¹)
- ❖ Komercijalna formulacija oksasulfurona (Dynox, 750 g kg⁻¹)

Osnovni standardni rastvori sulfonilurea: Pripremljeni su standardni rastvori pojedinačnih sulfonilurea sadržaja 100 mg L^{-1} . Odmereno je $0,0100 \text{ g}$ analitičkog standarda odgovarajuće sulfoniluree, preneseno u odmerni sud od 100 mL i dopunjeno do crte acetonitrilom i čuvano na -20°C . Osnovni standardni rastvori su bili stabilni tokom 1 meseca.

Radni standardni rastvor smeše sulfonilurea: Pripremljen je standardni rastvor odabranih sulfonilurea sadržaja od oko $100 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ (svaka) razblaživanjem osnovnih standardnih rastvora pojedine sulfonilurea sa acetonitrilom. Ovaj rastvor je korišćen za ispitivanje linearnosti, obogaćivanje (spajkovanje⁵) uzoraka i ispitivanje uticaja matriksa. Rastvor je čuvan na -20°C i bio je stabilan tokom 15 dana.

Standardni rastvori u matriksu: U cilju ispitivanja uticaja matriksa na rezultate određivanja sadržaja sulfonilurea korišćeni su rastvori MMC (eng. matrix-matched calibration) koji su pripremani dodatkom određene količine osnovnog standardnog rastvora ili radnog standardnog rastvora smeše sulfonilurea u poslednjem delu procedure pripreme uzoraka, posle izmene rastvarača u acetonitril nakon uparavanja, odnosno rekonstitucije uzorka. Za pripremu MMC standarda korišćeni su uzorci zemljišta koji su sakupljeni pre tretiranja parcele sa herbicidima, za koje je prethodno HPLC-UV-DAD analizom utvrđeno da nisu kontaminirani ostacima analiziranih sulfonilurea.

4.3. Uzorci

U okviru ove doktorske disertacije analizirano je ukupno 768 uzoraka na ostatke sulfonilurea u zemljištu. Disipacioni eksperiment i disipacija nikosulfurona, rimsulfurona, prosulfurona i oksasulfurona je praćena u polju i u laboratoriji pri kontrolisanoj temperaturi.

4.3.1. Ogled u laboratoriji

Ogled u laboratoriji postavljen je u sudovima (falkonima) na dve kontrolisane temperature od 25°C i 30°C . Uzorci zemljišta koji su korišćeni u ogledu su bili uzorkovani sa parcela na kojima je izveden poljski ogled (pri realnim uslovima), pre tretiranja parcele sa odgovarajućim komercijalnim formulacijama ispitivanih SU. Zemljište je tretirano sa vodenim rastvorom komercijalnih formulacija SU herbicida nikosulfurona, rimsulfurona, oksasulfurona i prosulfurona. Kontrolni uzorci zemljišta su tretirani samo sa dejonizovanom vodom. Laboratorijski ogled je postavljen za četiri komercijalne doze ispitivanih SU preporučena doza, jedna manja i dve veće od preporučene (Tabela 4.1 i Tabela 4.2) u tri

⁵ Spajkovanje (eng. spike), termin usvojen u krugu analitičara za proces dodavanja poznate količine standarda u analizirani uzorak ili model sistem, u cilju određivanja sadržaja analita, utvrđivanja ispravnosti pripreme uzorka ili tačnosti analitičke metode, pod uslovom da su eliminisane sistemske greške.

ponavljana za svaku ispitivanu SU i komercijalnu dozu. Sudovi sa tretiranim zemljištem od 10,00 g (tehnička vaga) su bili postavljeni u termostat na podešene temperature od 25⁰C i 30⁰C. Vlaga u tretiranim uzorcima zemljišta u termostatima je održavana dodavanjem dejonizovane vode na 70% poljskog vodnog kapaciteta (PVC). Količina vode koja je isparila, odnosno koju je bilo potrebno dodati je određivana merenjem posude u toku trajanja eksperimenta. Nakon 24 sata, iz svakog termostata sa tretiranim uzorcima zemljišta je uziman po jedan uzorak koji je služio za određivanje sadržaja vlage gravimetrijskom metodom, sušenjem na 105⁰C. Određivanje sadržaja ispitivanih sulfonilurea u tretiranom zemljištu je izvedeno nakon 2h, a zatim nakon 2, 6, 15, 30 i 50 dana od početka inkubacije. Dinamika uzimanja uzoraka je bila ista i za ogled postavljen u polju.

4.3.2. Ogled u polju

Ogled u polju postavljen je u maju 2012. godine na parcelama Instituta za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad. Ogled je postavljen na lokalitetu Rimski Šančevi (latitude 45°19'26.46"N, longitude 19°51'5.94"E) po metodi slučajnog blok sistema (EPPO, 2007) (Slika 4.1).



Slika 4.1. Ogledna parcela pod zasadom kukuruza neposredno pre tretiranja herbicidima

U cilju ispitivanja disperzije (rasipanja) aktivne komponente (a.k.) u zemljištu, četiri odabrana herbicida su bila primenjena kao vodeni rastvori njihovih komercijalnih formulacija: nikosulfuron (Kelvin[®], 40 g L⁻¹), prosulfuron (Peak[®], 750 g kg⁻¹), rimsulfuron (Rimex[®], 250 g

kg⁻¹) i oksasulfuron (Dynox[®], 750 g kg⁻¹). Ogladne parcele su bile zasejane sa dve biljne vrste kukuruz (hibrid NS 640 ultra) i soja (hibrid Sava), a veličine parcela su bile 15 m² (3 m x 5 m). Parcele pod zasadam kukuruza su tretirane sa odgovarajućim komercijalnim dozama nikosulfurona, rimsulfurona i prosulfurona, a parcela pod zasadam soje je bila tretirana oksasulfuronom. Nanošenje herbicida izvršeno je leđnom prskalicom, tip "Solo" pod pritiskom od 2 atmosfere i 2,8 L vodenog rastvora ispitivanih sulfonilurea za površinu zemljišta od 100 m² (1,7 L za 60m²) u fazi 4-7 listova kukuruza i u fazi od 1 do 3 trolistke soje. Disipacioni eksperimenti za pojedinačne primenjene SU su izvedena na različitim parcelama sa četiri različite doze primene (Tabela 4.1 i Tabela 4.2). Komercijalno preporučene doze primene su bile 50, 20, 50 i 80 g aktivne komponente po hektaru za nikosulfuron, prosulfuron, rimsulfuron i oksasulfuron, redom. Primenjena je komercijalna preporučena doza primene, jedna manja i dve veće od preporučene doze. Kontrolne parcele su tretirane samo sa vodom. Pojedinačni tretmani (primenjene komercijalne doze) sa odgovarajućom formulacijom SU su izvedeni u tri ponavljanja. Uzorci zemljišta su uzorkovani agrohemijском sondom nakon 2 h, a zatim nakon 2, 6, 15, 30 i 50 dana posle primene komercijalnih formulacija SU.

Tabela 4.1. Primenjeni herbicidi i doza primene za ogled pod usevom kukuruza

Tretman	a.k.(g ha ⁻¹)	Preparat	Oznake parcela u polju			
Kontrola	-	-	101	203	312	406
Nikosulfuron	40	Kelvin [®]	102	207	308	410
	50		103	212	304	409
	80		104	204	313	405
	100		105	201	306	407
Prosulfuron	10	Peak [®]	106	210	310	403
	20		107	208	303	402
	30		108	205	311	404
	50		109	211	309	412
Rimsulfuron	40	Rimex [®]	110	202	302	401
	50		111	209	305	413
	80		112	213	307	411
	100		113	206	301	408

Tabela. 4.2. Primenjeni herbicid i doza primene za ogled pod usevom soje

Tretman	a.k.(g ha ⁻¹)	Preparat	Oznake parcela u polju			
kontrola	-	-	101	202	305	404
Oxasulfuron	60	Dynox [®]	102	203	301	402
	80		103	201	303	405
	100		104	205	304	401
	160		105	204	302	403

Uzorci su uzimani sa tri dubine: 0-15 cm, 15-30 cm i 30-45 cm (Tabela 4.3). Neposredno pre tretiranja sa odgovarajućim komercijalnim formulacijama SU prikupljeni su uzorci zemljišta

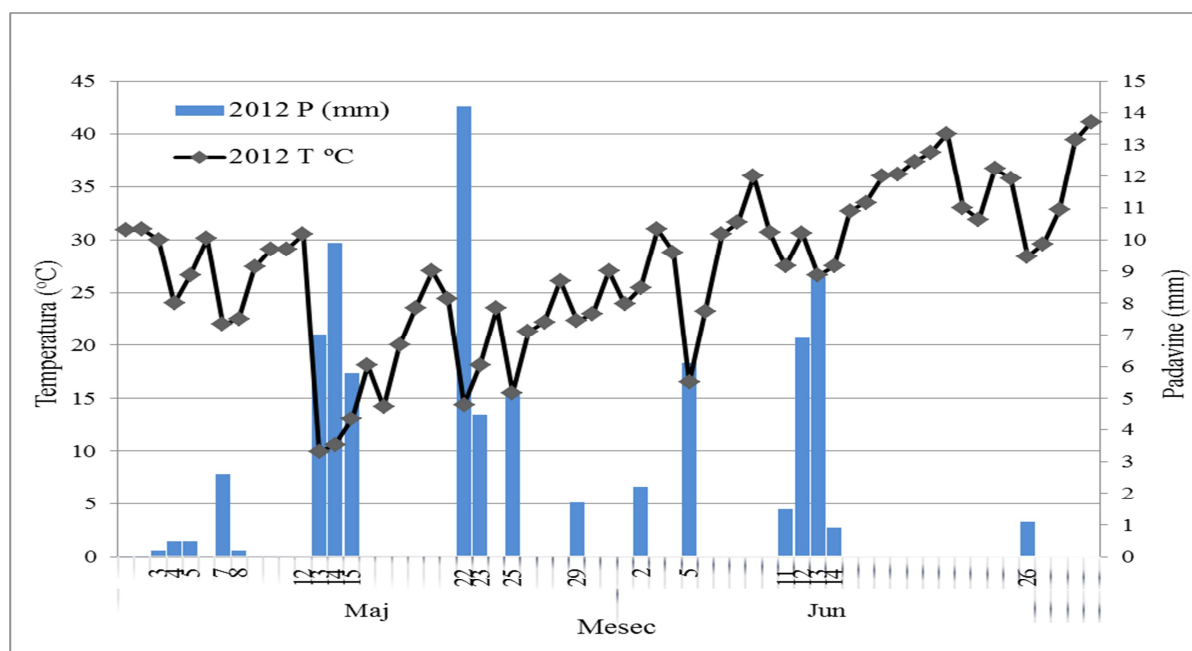
za izvođenje analiza i proveru prisustva istih u zemljištu kao i za kalibraciju u matriksu. Sakupljeni uzorci su stavljeni u polietilenske kese i odmah transportovani do laboratorije. Svaki uzorak je po prijemu u laboratoriju čuvan u zamrzivaču na temperaturi od -20°C . Ispitivanja vezana za analize zemljišta, tretiranog komercijalnim formulacijama SU su izvedena u tri ponavljanja.

Tabela 4.3. Dinamika uzorkovanja u danima po dubinama

Dubina (cm)	Dani nakon tretiranja						
	Pre tretiranja	2 h	2	6	15	30	50
0-15	*	*	*	*	*		
15-30	*				*	*	
30-60	*					*	*

* dan kada je uzet uzorak zemljišta za analizu

Podaci o klimatskim karakteristikama oglednog područja za period maj-jul 2012. godine preuzeti su od Republičkog hidrometeorološkog zavoda Republike Srbije, Opservatorija Rimski Šančevi-Novu Sad (Slika 4.2).



Slika 4.2. Prikaz dnevnih temperatura ($^{\circ}\text{C}$) i padavina (mm) za maj-jun period kada je izvršeno uzorkovanje zemljišta

Prosečne dnevne temperature vazduha za ispitivani period maj-jun su se kretale od $9,9^{\circ}\text{C}$ do $41,1^{\circ}\text{C}$. Ukupna količina padavina za ispitivani period je iznosila 79,7 mm. Veća ukupna količina padavina je zabeležena u maju i iznosila je 52,20 mm u odnosu na jun mesec kada je zabeleženo 27,50 mm padavina. Međutim, prosečne dnevne temperature su bile manje u maju i kretale su se od $9,9^{\circ}\text{C}$ do 31°C u odnosu na jun kada su kretale od $16,5^{\circ}\text{C}$ do $41,1^{\circ}\text{C}$.

4.3.3. Određivanje fizičko-hemijskih karakteristika zemljišta

Za potrebe fizičko-hemijskih analiza deo uzorka je osušen na vazduhu, a zatim samleven u mlinu za zemljište do veličine granula <2 mm.

Mehanički sastav određen je „pipet” metodom. Frakcije su bile definisane u procentima i to kao: glina ($<0,002$ mm), krupani pesak (2-0,2 mm), sitan pesak (0,2-0,02 mm) i prah (0,02-0,002 mm) (ISO 11464:2006).

Vrednost pH određena je u suspenziji zemljišta sa 1 mol L^{-1} KCl (1:2,5 v/v), supstituciona kiselost) (ISO 10390:2010).

Ukupan organski ugljenik i ukupan ugljenik je određen „CHNSO” elementalnom analizom (ISO 10694:2005).

Ukupan sadržaj azota određen je elementalnom analizom (AOAC Official Method 972.43:2006).

Kapacitet izmene katjona (CEC) i sadržaj katjona u izmenjenom obliku je određen ekstrakcijom zemljišta sa natrijum acetatom i amonijum acetatom (Richards, 1954).

Sadržaj kalcijum karbonata (CaCO_3) određen je gasnovolumetrijski (ISO 10693:1995).

Sadržaj organske materije (humus) određen je modifikovanom metodom Tjurin-a na principu oksidacije organskog ugljenika zemljišta sa $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (ISO 14235:1998).

Sadržaj lako pristupačnih oblika fosfora i kalijuma (kao P_2O_5 i K_2O) određen je ekstrakcijom sa amonijum laktatom po Egner i saradnicima (1960). Sadržaj fosfora određen je spektrofotometrijski (na 830 nm), a kalijuma plamenom fotometrijom.

4.3.4. Priprema uzoraka

Razvoj pripreme uzoraka zemljišta za određivanje ostataka odabranih sulfonilurea je bio jedan od bitnijih elemenata ove doktorske disertacije, tako da je izvedeno ispitivanje detaljnije opisano u poglavlju „Rezultati i diskusija“.

Priprema uzoraka zemljišta nakon uzorkovanja u polju i laboratoriji je obuhvatala sledeće faze: sušenje na 40°C u sušnici do konstantne mase, usitnjavanje u mlinu za zemljište (veličina čestica <2 mm), ekstrakcija sulfonilurea iz uzoraka zemljišta i prečišćavanje dobijenih ekstrakata na čvrstoj fazi (SPE).

4.3.4.1. Ekstrakcija odabranih SU

Optimizacija postupka ekstrakcije izabranih sulfonilurea iz uzoraka zemljišta je obuhvatila odabir ekstragensa i ekstrakcione tehnike koja obezbeđuje najviši „prinos” odabranih sulfonilurea.

Pri ispitivanju ekstrakcione moći ekstragensa, poređene su sledeće mešavine rastvarača: dihlormetan-metanol, dihlormetan-acetonitril, heksan-metanol, heksan-acetonitril, etil acetat-acetonitril pripremljene za svaku mešavinu rastvarača u različitim odnosima (2:1, 2:5, 2:8, v/v). Samlevenom uzorku zemljišta (10 g) je dodavan ekstrakcioni rastvarač (10 mL). Ekstrakcione tehnike koje su primenjene obuhvatile su ultrazvučnu i mikrotalasnu ekstrakciju u zatvorenom sistemu. Ultrazvučna ekstrakcija je izvođena u ultrazvučnom kupatilu u trajanju od 10 minuta na 50⁰C uz korišćenje povratnog hladnjaka. Mikrotalasnoj ekstrakciji je prethodio korak pred-zagrevanja na 150 i 300 W u trajanju od 2 minuta i nakon toga je sledio korak ekstrakcije na 450 W u trajanju od 10 min. Nakon ekstrakcije (ultrazvučne i mikrotalasne) odvojen je ekstrakt od čvrste faze zemljišta centrifugiranjem, a zatim je postupak ekstrakcije ponovljen još jednom, pri istim uslovima. Dobijeni ekstrakti nakon dva ciklusa ekstrakcije su spojeni i koncentrovani na rotacionom vakuum uparivaču do suva.

Suvi ostatak je rastvoren u dihlormetanu (2 mL) i dalje prečišćavan koristeći ekstrakciju na čvrstoj fazi.

4.3.4.2. Prečišćavanje ekstrakta zemljišta primenom ekstrakcije na čvrstoj fazi

Pri određivanju optimalnih uslova prečišćavanja ekstrakta u okviru ekstrakcije na čvrstoj fazi (SPE) bitno je odrediti punjenje SPE kolone, odnosno stacionarnu fazu, izabrati adekvatan rastvarač za eluiranje interferirajućih supstanci i eluiranje analita kao i odrediti kapacitet SPE kolone.

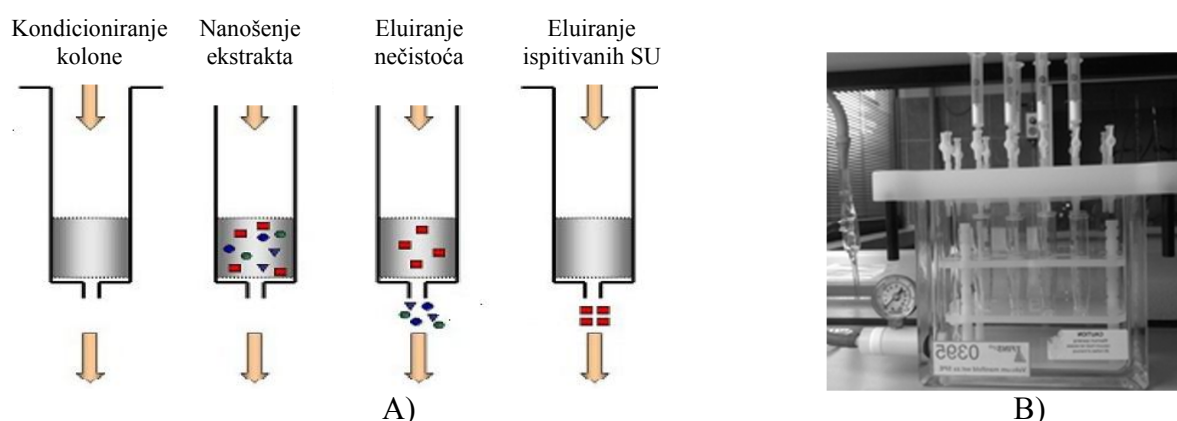
U tabeli 4.4 je dat pregled korišćenih SPE stacionarnih faza koje su ispitane u pogledu efikasnosti prečišćavanja sirovog ekstrakta zemljišta od prisutnih interferirajućih supstanci, koje se najčešće koekstrahuju zajedno sa odabranim SU kao i sredstva za eluiranje odabranih sulfonilurea.

Za ispitivanje efikasnosti prečišćavanja SPE kolona u zavisnosti od uticaja interferirajućih supstanci korišćeno je zemljište za koje je prethodno utvrđeno HPLC-UV-DAD analizom da ne sadrži SU. Posle toga, zemljište je korišćeno za obagaćivanje tj. dodatak poznate količine SU. SPE kolone su prvo kondicionirane sa 1 mL sredstva za kondicioniranje (*n*-heksan), nakon toga je naneto 1 mL ekstrakta zemljišta sa dodatim SU. Posle toga je izvedeno prvo eluiranje interferirajućih supstanci sa 1 mL sredstva za eluiranje interferirajućih supstanci (*n*-heksan) i potom su eluirane odabrane SU sa 3 mL sredstva za eluiranje analita pri protoku od 1 mL min⁻¹. Kako je kondicioniranje i eluiranje bilo pod vakuumom, protok mobilne faze je podešavan pomoću teflonske slavine na vakuum „manifoldu“.

Tabela 4.4. Ispitane SPE stacionarne faze za prečišćavanje ekstrakta zemljišta i sredstva za eluiranje odabranih SU korišćenjem ekstrakcije na čvrstoj fazi.

Punjenje SPE kolone (stacionarna faza)	Eluiranje odabranih sulfonilurea (v/v)
Silika gel	dihlormetan:aceton = 9:1
Silika gel	dihlormetan:aceton = 8:2
Silika gel	dihlormetan:aceton = 7,5:2,5
Silika gel	dihlormetan:aceton = 7:3
Silika gel	dihlormetan:aceton = 6:4
Silika gel	hloroform:metanol = 8:2
Silika gel	hloroform:metanol = 7:3
Silika gel	hloroform:aceton = 8:2
Silika gel	hloroform:aceton = 7:3
Cyano (CN)	hloroform:metanol = 7:3
Cyano (CN)	dihlormetan:aceton = 7,5:2,5
Cyano (CN)	hloroform:aceton = 8:2
Cyano (CN)	dihlormetan:aceton = 8:2
Cyano (CN)	hloroform:metanol = 7:3
Amino (NH ₂)	hloroform:metanol = 7:3
Amino (NH ₂)	dihlormetan:aceton = 7,5:2,5
Amino (NH ₂)	dihlormetan:aceton = 8:2
Amino (NH ₂)	hloroform:aceton = 8:2
Amino (NH ₂)	hloroform:metanol = 7:3

Prikupljeni eluat je uparavan na rotacionom vakuum uparivaču do suva u cilju izmene rastvarača. Suvi ostatak je rastvoren u acetonitrilu (2 mL) zatim filtriran preko membranskog filtera od 0,45 μm . Posle izmene rastvarača izvedeno je hromatografisanje i upoređena je efikasnost prečišćavanja korišćenih stacionarnih faza. Uređaj pomoću koga je vršena SPE ekstrakcija je prikazan na slici 4.3.



Slika 4.3. A) Prečišćavanje ekstrakta zemljišta koristeći ekstrakciju na čvrstoj fazi; B) vakuum „manifold” set za SPE

Pri određivanju optimalnih uslova ekstrakcije na čvrstoj fazi bitno je odrediti kapacitet sorbenta tj. ukupnu količinu supstance, koja se adsorbuje na poznatoj količini sorbenta pod optimalnim uslovima. Određivanje kapaciteta sorbenta izvedeno je nanošenjem zapremine

ekstrakta od 0,5 mL, 0,7 mL, 0,9 mL, 1 mL, 1,2 mL i 1,5 mL model smeše (sadržaj pojedinih SU je iznosio 1 mg L^{-1}) i poređena je efikasnost odabrane stacionarne faze u SPE koloni u zavisnosti od opterećenja kolone model smešom.

Nakon odabira odgovarajuće stacionarne faze SPE kolone, sredstva za eluiranje odabranih SU i zapremine primenjenog ekstrakta, ekstrakcija na čvrstoj fazi je primenjena u cilju prečišćavanja ekstrakta izabranih sulfonilurea iz uzoraka zemljišta od interferirajućih supstanci.

4.4. Uslovi rada HPLC-UV-DAD za određivanje odabranih sulfonilurea

U okviru ovog rada definisana je HPLC metoda za razdvajanje i određivanje odabranih sulfonilurea (nikosulfuron, prosulfuron, rimsusulfuron, oksasulfuron, tribenuron metil, tritosulfuron i tribenuron metil) u model sistemima. U cilju definisanja odgovarajućih uslova analize ispitan je uticaj najznačajnijih eksperimentalnih faktora HPLC kao što je sastav rastvarača, mobilne faze i uslovi gradijentne elucije, što je detaljno i opisano u poglavlju 4. Rezultati i diskusija. Hromatografski sistem, koji je podešen u skladu sa optimalnim uslovima, inspiran je mobilnom fazom do postizanja stabilne bazne linije. Stabilnost sistema proverena je ponovljenim injektovanjem radnih standardnih rastvora odabranih SU do postizanja ujednačenosti površina hromatografskih pikova za tri uzastopna injektovanja. U svrhu identifikacije, vršilo se pojedinačno injektovanje monokomponentnih rastvora odabranih SU, kao i radnog standardnog rastvora njihove smeše.

Kao detektor je korišćen UV detektor sa nizom osetljivih dioda na 240 nm talasne dužine i Rapid Resolution HT Zorbax Eclipse XDB-C18 kolonom (50 mm x 4,6 mm, 1,8 μm) sa veoma gustim vezivanjem organo silanolnih liganada unutar kolone (eng. eXtra Dense Bonding, XDB). Kolona je termostatorirana na 25°C . Korišćena je mobilna faza acetonitril (A) i 0,1% vodeni rastvor sirćetne kiseline (B) sa protokom mobilne faze od 1 mL min^{-1} u gradijentnom modu (0 min 52% A, 2-2,5 min 47% A, 2,5-5 min 52% A; vreme re-ekvilibracije (uravnoteženja) 3 min). Injekciona zapremina je bila 10 μl . Analiza je trajala 8 minuta.

Identifikacija pikova je izvedena na osnovu retencionog vremena i UV spektra na UV-DAD detektoru. Standardni rastvori (model sistemi) su analizirani (injektovani) 3 puta.

4.5. Uslovi rada HPLC-MS-MS za određivanje odabranih sulfonilurea

Tehnika tačne hromatografije kuplovane sa tandemskom maseno spektrometrijskom detekcijom je korišćena za komparativnu analizu prečišćenog ekstrakta zemljišta, kao

referentna metoda. Korišćen je multimod-jonski izvor sa ESI pozitivnom jonizacijom. Pri pozitivnoj jonizaciji formirani su prekursor joni tako što se za molekule odabranih sulfonilurea vezao po jedan proton (atom vodonika). Pored prekursor jona, korišćena su i dva produkt jona od kojih je jon sa pikom veće površine služio za kvatifikaciju SU (eng. quantifier, Q), a jon manje površine za njihovu identifikaciju (eng. qualifier, q). U cilju definisanja odgovarajućih uslova komparativne analize ispitan je uticaj najznačajnijih eksperimentalnih faktora. Za maksimalnu fragmentaciju prekursor jona i formiranje produkt jona, potrebno je bilo optimizovati uslove kolizije energije (eng. collision energy, CE) kao i napone fragmentacije (eng. fragmentation voltage, FV), što je detaljno opisano u poglavlju 4. Rezultati i diskusija.

Parametri jonskog izvora bili su sledeći: temperatura gasa za sušenje 350°C. Azot je korišćen kao gas za raspršivanje pod pritiskom od 40 psi na raspršivaču, protokom gasa od 9 L min⁻¹, naponom kapilare od 2500 V i naponom punjenja 2000 V. Razdvajanje je postignuto na Rapid Resolution HT Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ koloni (50 mm x 4,6 mm, 1,8 μm) temperiranoj na 30°C. Zapremina injektovanja je bila 5 μL. Korišćena je mobilna faza acetonitril (A) i 0,1% vodeni rastvor sirćetne kiseline (B) sa protokom od 1 mL min⁻¹ u izokratskim uslovima eluiranja (70% A i 30% B). Za potrebe skrininga svi analizirani uzorci zemljišta bili su analizirani u MS2 Scan modu (kvadrupol Q1 podešen na transmisiju, koliziona ćelija isključena, kvadrupol Q3 podešen na skeniranje) i u pozitivnom i u negativnom modu. Odabrane SU su praćene u MRM (eng. "multiple reaction monitoring") modu, tranzicije su odabrane za svaku odabranu SUu. Identifikacija pikova za odabrane SU je izvršena preko karakterističnih molekulskih jona i fragmenata ispitivanih supstanci dobijenih MS analizom.

4.6. Određivanje sulfonilurea u uzorcima zemljišta

Nakon definisanja postupka pripreme uzoraka kao i optimalnih uslova HPLC-UV-DAD i HPLC-MS-MS pristupilo se analizi uzoraka zemljišta. Pri određivanju SU primenom HPLC-UV-DAD kvalitativno određivanje je izvedeno na osnovu retencionog vremena i UV spektra, korišćenjem sopstvene baze podataka odabranih SU. Kvalitativna analiza, pri određivanju sulfonilurea HPLC-MS-MS metodom, je izvedena na osnovu karakterističnih jona u masenom spektru.

Pri određivanju odabranih sulfonilurea HPLC-UV-DAD metodom kvantitativno određivanje je izvedeno metodom kalibracione krive, dok je metoda standarda primenjena pri određivanju sulfonilurea HPLC-MS-MS tehnikom. S obzirom da prisustvo interferirajućih

supstanci može uticati na određivanje odabranih SU u realnim uzorcima, ispitan je uticaj matriksa zemljišta na analitički signal. Kalibracija je izvedena u dve serije, prvo sa serijom standarda odabranih SU u rastavaraču (eng. solvent calibration curve, SC). Nakon toga je urađena druga serija standarda koja je pripremljena u matriksu zemljišta (HPLC-UV-DAD analizom zemljišta je potvrđeno da ne sadrže određivane SU), u koje su nakon postupka ekstrakcije i prečišćavanja dodati standardi odabranih SU (eng. matrix matched calibration, MMC). Koncentracije SU u seriji SC su odgovarale koncentracijama standarda u seriji MMC. Iz standarda obe serije formirane su kalibracione krive. Uticaj matriksa je definisan kao odnos nagiba jednačine prave za dve kalibracione krive (SC i MMC), odnosno izračunat na osnovu izraza (Li i sar., 2013; Dong i sar., 2015):

$$\text{SSE (\%)} = \frac{\text{nagib}_{\text{MMC}}}{\text{nagib}_{\text{SC}}} * 100 \quad (22)$$

Kada je uticaj matriksa na suzbijanje ili na povećanje signala ispitivanog analita (eng. signal suppression and enhancement, SSE) jednak 100% (SSE=100%) tada ne postoji uticaj matriksa. Međutim, ukoliko je SSE<100 to ukazuje na supresiju signala (jonizacionog procesa), a kada je SSE>100, ukazuje na pojačavanje signala analita.

Trenutno ne postoji propis za dozvoljen uticaj matriksa na analitički signal. Pregledom postojeće literature ustanovljuje se da uticaj matriksa na analitički signal u velikom broju slučajeva zavisi od ispitivanog matriksa (Seccia i sar., 2011; Dong i sar., 2016).

4.7. Definisane tačnosti razvijene metode i ispravnosti postupka pripreme uzoraka

Za proveru **tačnosti definisane hromatografske metode**, analizirani su standardni rastvori odabranih SU pri prethodno određenim optimalnim uslovima. Dobijeni sadržaji SU su poređeni sa sadržajima pripremljenih standardnih rastvora i izračunat je test povrata (eng. recovery) (%) prema izrazu:

$$\text{Test povrata (\%)} = \frac{c_{\text{odabrane SU određeno}}}{c_{\text{odabrane SU}}} * 100 \quad (23)$$

gde je: $c_{\text{odabrane SU određeno}}$ - predstavlja sadržaj odabrane SU određene u standardnom rastvoru (mg mL^{-1}); $c_{\text{odabrane SU}}$ - predstavlja sadržaj odabrane SU u standardnom rastvoru (mg mL^{-1}).

Za proveru **ispravnosti definisanog postupka prečišćavanja uzoraka** u ekstrakt zemljišta (koji ne sadrži odabrane SU) dodat je model rastvor sa poznatim sadržajem

odabranih SU, te je izvedena ekstrakcija na čvrstoj fazi. Analiza pripremljenih proba je izvedena primenom HPLC-UV-DAD. Test povrata (%) je izračunat na osnovu izraza:

$$\text{Test povrata (\%)} = \frac{c_{\text{odabrane SU određeno}}}{c_{\text{odabrane SU dodato}}} * 100 \quad (24)$$

gde je: $c_{\text{odabrane SU određeno}}$ - predstavlja sadržaj odabrane SU nakon prečišćavanja (mg mL^{-1});
 $c_{\text{odabrane SU dodato}}$ - predstavlja nanet sadržaj odabrane SU na SPE kolonu (mg mL^{-1}).

Za određivanje tačnosti analitičkog postupka ispitivan je povrat odabranih SU i reproduktivnost u vidu relativne standardne devijacije testa povrata (RSD, %). Test povrata je podrazumevao „spajkovanje“ uzoraka zemljišta određenom količinom standarda SU. Vrednost testa povrata je korišćena za potvrdu tačnosti i ispravnosti celokupnog postupka, uključujući fazu pripreme uzorka, prečišćavanje kao i hromatografsko određivanje odabranih SU. Samleveni uzorci zemljišta za test povrata su odmereni u teflonske posude za mikrotalasnu ekstrakciju, nakon toga, u posudu sa odmerenim zemljištem su dodate SU da bi se signal povećao tj. kako bi bio približno jednak sa signalom koji se očekuje kod realnih uzoraka zemljišta nakon primene herbicida u polju. Na osnovu razlike u sadržajima u realnom i spajkovanom uzorku, i tačno dodate količine standarda, rezultati testa povrata su izračunati prema izrazu:

$$\text{Test povrata (\%)} = \frac{c_{\text{ukupno}} - c_{\text{uzorka}}}{c_{\text{dodato}}} * 100 \quad (25)$$

gde je: c_{ukupno} (određen sadržaj odabranih SU u „spajkovanom uzorku“ ($\mu\text{g kg}^{-1}$);

c_{uzorka} (određen sadržaj odabranih SU u uzorku ($\mu\text{g kg}^{-1}$);

c_{dodato} (količina standarda odabranih SU koji je dodat na uzorak zemljišta ($\mu\text{g kg}^{-1}$).

4.8. Određivanje granice detekcije i granice kvantifikacije odabranih sulfonilurea

Granicu detekcije (eng. limit of detection, LOD) i granicu kvantitativnog određivanja (eng. limit of quantification, LOQ) moguće je definisati na različite načine. LOD i LOQ vrednosti za odabrane SU određene su na osnovu merenja opadajućih koncentracija MMC rastvora i merenja odgovora signala pri odnosu signal/šum (eng. „signal/noise“, S/N) ≥ 3 za LOD i S/N ≥ 10 za LOQ vrednost (Tuzimski & Sherma, 2015).

4.9. Utvrđivanje ispravnosti metode HPLC-UV-DAD za kvalitativnu i kvantitativnu analizu ostataka ispitivanih sulfonilurea u zemljištu

Utvrđivanje ispravnosti razvijene HPLC-UV-DAD metode za određivanje ostataka ispitivanih SU je izvedeno poređenjem dobijenih rezultata sa rezultatima dobijenim primenom HPLC-MS-MS metode. Poređenje je izvedeno korišćenjem Studetovog *t*-testa uparenih srednjih vrednosti uz 95% verovatnoću.

5. Rezultati i diskusija

U prvom delu ovog poglavlja su prikazani rezultati vezani za fizičko-hemijske osobine ispitivanog zemljišta. Drugi deo obuhvata razvoj hromatografske metode, visoko-pritisne tečne hromatografijom sa UV detektorom sa nizom diode, za određivanje ostataka SU. U trećem delu su prikazani rezultati vezani za definisanje metode visoko-pritisne tečne hromatografije sa masenim detektorom za potrebe osetljivijih, selektivnijih, a tako i tačnijih određivanja SU-a. Četvrti deo opisuje optimizaciju uslova pripreme uzoraka zemljišta za određivanje SU primenom mikrotalasne i ultrazvučne ekstrakcije, kao i rezultate ispitivanja mogućnosti primene ekstrakcije na čvrstoj fazi za prečišćavanje ekstrakata zemljišta. U petom delu ovog poglavlja su prikazani rezultati određivanja sadržaja ispitivanih SU pod laboratorijskim uslovima na temperaturi od 25⁰C i 30⁰C i u realnim poljskim uzorcima zemljišta primenom HPLC-UV-DAD. Urađene su paralelne analize u cilju poređenja dobijenih sadržaja ispitivanih SU istih ekstrakata zemljišta dobijenih iz poljskog ogleđa primenom HPLC-UV-DAD i HPLC-MS-MS. U okviru ovog podpoglavlja dati su rezultati disipacione studije ispitivanih SU tokom vremena posle primene odgovarajućih komercijalnih formulacija u različitim dozama primene u polju.

5.1. Fizičko-hemijske osobine uzorka zemljišta

Osnovni parametri fizičko hemijskih osobina određeni u zemljištima pod zasadam kukuruza i soje dati su u tabeli 5.1 i 5.2.

Zemljišta na ispitivanim parcelama pripadaju tipu zemljišta černozem, podtip na lesu i lesolikim sedimentima, varijetet karbonatni, forma srednje duboka prema domaćoj klasifikaciji (Škorić i sar., 1985).

Prema odredbama FAO-WRB zemljišta na ispitivanim parcelama se klasifikuju u kalcijni černozem glinasto pahični (engl. Calcic Chernozem Clayic, Pachic, CH-cc-ce, ph) (IUSS Working Group WRB, 2014), a za slučaj ispitivanih horizonata prema teksturi u klasi lake gline, osim podoraničnog podhorizonta humusno-akumulativnog koji je u klasi peskovite gline. Ispitivana zemljišta u ovoj studiji su imala neutralnu vrednost pH (6,9 i 7,2) na osnovu klasifikacije zemljišta prema supstitucionoj kiselosti (vrednost pH u suspenziji zemljišta sa KCl) (Hadžić i sar. 2004).

Tabela 5.1. Fizičko-hemijske karakteristike zemljišta pod zasadom kukuruza

Svojstva	Dubina (cm)		
	0-15	15-30	30-45
Ukupan C (%)	2,70	2,92	3,52
Organski C (%)	1,51	1,38	1,06
pH u KCl	6,90	7,03	7,15
CEC (meq/100g)	23,20	20,80	20,0
Ukupan N (g kg ⁻¹)	0,19	0,14	0,059
Glina (%)	28,00	32,00	34,28
Sitan pesak (%)	37,54	55,10	34,06
Krupan pesak (%)	0,50	0,50	0,30
Prah (%)	33,96	12,40	31,36
CaCO ₃ (%)	2,11	2,95	4,94
Humus (%)	2,81	2,14	0,90
P ₂ O ₅ (mg 100g ⁻¹)	97,23	67,80	9,14
K ₂ O (mg 100g ⁻¹)	35,00	23,00	14,50

Tabela 5.2. Fizičko-hemijske karakteristike zemljišta pod zasadom soje

Svojstva	Dubina (cm)		
	0-15	15-30	30-45
Ukupan C (%)	2,25	2,43	3,43
Organski C (%)	1,72	1,41	1,16
pH u KCl	7,25	7,74	7,88
CEC (meq 100g ⁻¹)	21,30	20,60	19,08
Ukupan N (g kg ⁻¹)	0,15	0,08	0
Glina (%)	21,35	20,28	18,72
Sitan pesak (%)	47,04	44,66	48,54
Krupan pesak (%)	0,60	2,1	0,50
Prah (%)	31,00	32,96	32,24
CaCO ₃ (%)	5,48	22,53	25,55
Humus (%)	2,34	1,28	0,40
P ₂ O ₅ (mg 100g ⁻¹)	22,63	4,69	1,10
K ₂ O (mg 100g ⁻¹)	18,00	8,50	7,50

Prema hemijskim karakteristikama površinski oranični podhorizont humusno-akumulativni sloj zemljišta pod zasadom kukuruza i soje pripadaju klasi neutralnih, srednje karbonatnih i slabo humoznih zemljišta. Zemljište pod zasadom kukuruza ima vrlo visoku obezbeđenost lakopristupačnim fosforom i visoku obezbeđenost lakopristupačnim kalijumom u odnosu na zemljište pod zasadom soje. U oba sučaja sa dubinom pedološkog profila reakcija zemljišta postaje alkalnija, sadržaj CaCO₃ se povećava, dok sadržaj humusa i makrohranjivih elemenata (azota, fosfora i kalijuma) opada.

5.2. Definisane optimalnih uslova HPLC-UV-DAD za određivanje odabranih SU

Poteškoće u analizi više sulfonilurea tečnom hromatografijom sa UV-DAD detektorom se javljaju pri simultanom određivanju nikosulfurona, rimsulfurona, prosulfurona,

oksasulfurona, triasulfurona, tribenuron-metila i tritosulfurona zbog njihove strukturne sličnosti. Pre nego što se pristupilo praćenju disipacije ispitivanih SU u uzorcima zemljišta, optimizovani su eksperimentalni uslovi tečno-hromatografskog razdvajanja odabranih SU u model sistemima i u standardnim rastvorima u matriksu zemljišta. U cilju definisanja odgovarajućih uslova analize ispitan je uticaj najznačajnijih eksperimentalnih faktora HPLC kao što su sastav rastvarača, mobilne faze i uslovi gradijentne elucije.

5.2.1. Uticaj sastava rastvarača

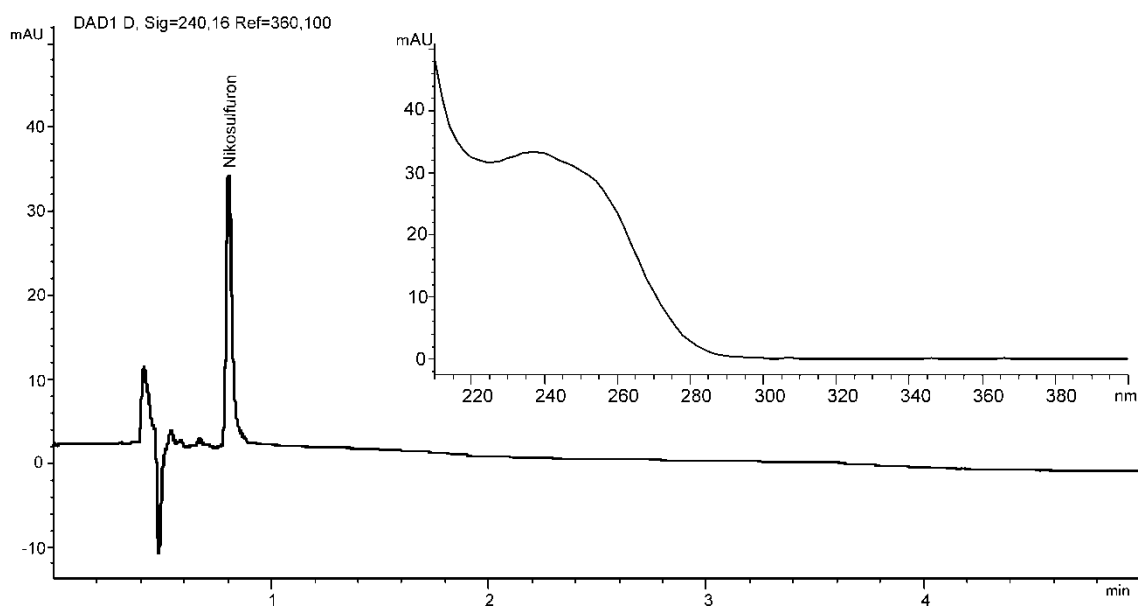
Rezultati prethodne studije (Ostojić, 2009) su pokazali da je acetonitril odgovarajući rastvarač za nikosulfuron, oksasulfuron, triasulfuron, tribenuron-metil i tritosulfuron. Upotrebom acetonitrila su postignuti oštri pikovi sa visokim vrednostima analitičkog signala za odabrane SU (Ostojić, 2009). U okviru ove studije neophodno je bilo ispitati uticaj rastvarača, pored prethodno navedenih SU, i pri određivanju rimsulfurona i prosulfurona, koji nisu bili obuhvaćeni prethodnim ispitivanjima. Za ispitivanje uticaja rastvarača analizirane su vrednosti analitičkog signala za standardne rastvore rimsulfurona ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) i prosulfurona ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) koji su bili pripremljeni u acetonitrilu, tetrahidrofuranu i metanolu kao i u smeši rastvarača acetonitril/voda/fosfatni pufer (pH 7) (40:40:10, v/v) i $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ amonijum hidroksid/acetonitril (50:50, v/v) (Ishigara Sangio Kaisha AD 910605; Ciba-Geigy AF-1179/1; Ciba-Geigy AF-1084/1). Na osnovu vrednosti analitičkog signala, oštine pikova i reproduktivnosti (2,08% - 4,16% (RSD)) utvrđeno je da je acetonitril odgovarajući rastvarač za rimsulfuron i prosulfuron. Stoga je acetonitril usvojen kao odgovarajući rastvarač za pojedine SU te je korišćen u svim daljim ispitivanjima.

5.2.2. Izbor talasne dužine

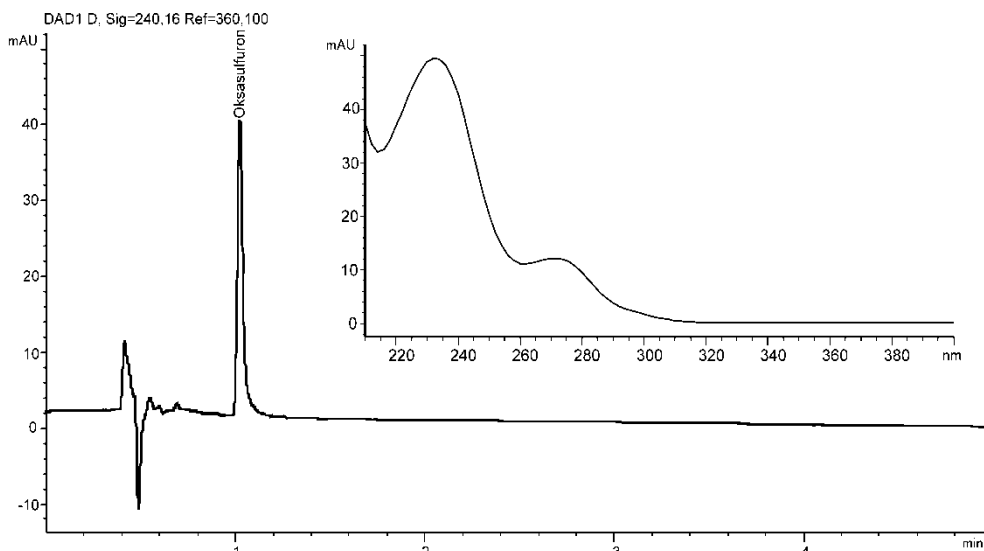
Sulfonilure apsorbuju elektromagnetno zračenje u UV oblasti, te se njihovo tačno i precizno određivanje često izvodi uz primenu UV-DAD detektora. U cilju što selektivnijeg i osetljivijeg određivanja bilo je potrebno odrediti odgovarajuću talasnu dužinu na kojoj će se meriti apsorbancija određivanih SU. U cilju definisanje odgovarajuće talasne dužine praćen je odziv analitičkih signala za odabrane SU u koncentracionom opsegu od $5\text{-}100 \text{ mg L}^{-1}$ na talasnim dužinama od 245, 240 i 230 nm. Odabir talasnih dužina je izveden na osnovu prethodnih istraživanja (Ostojić, 2009). U tabeli 5.3 su prikazane vrednosti analitičkog signala, reproduktivnost, linearnost i odziv analitičkog signala. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost tri uzastopne analize (i.j.= interna jedinica integratora, mAU= interna jedinica predstavlja vrednost strujnog signala detektora). Uzimajući u obzir veličinu

analitičkog signala (površinu pika), reproduktivnost, linearnost i odziv analitičkog signala, kao odgovarajuća talasna dužina (λ) usvojena je talasna dužina od 240 nm (Tabela 5.3). U merenjima se osetljivost definiše izrazom $O = dy/dx$, odnosno prvim izvodom posredno izmerene veličine y po osnovnoj veličini x . S obzirom da se pri merenjima (određivanju) teži linearnim zavisnostima, osetljivost merenja odgovara koeficijentu pravca, odnosno odzivu (Marjanović, 2001). Na osnovu dobijenih vrednosti za odziv detektora može se zaključiti da se selektivnija i osetljivija određivanja za većinu odabranih SU postižu na talasnoj dužini merenja apsorbancije od 240 nm. Stoga je, talasna dužina od 240 nm usvojena kao optimalna, i korišćena je u svim daljim ispitivanjima.

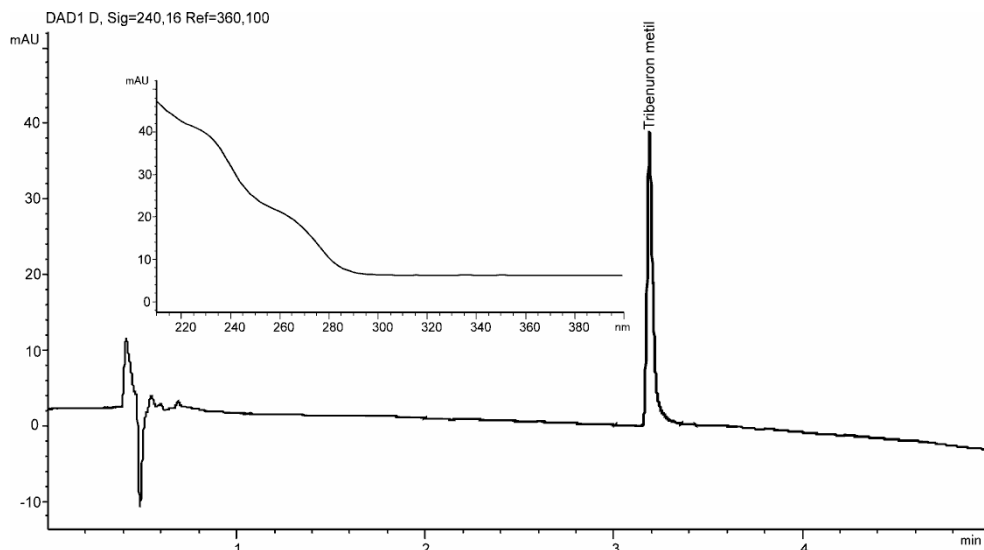
Orginalan zapis hromatograma nikosulfurona, okasulfurona, tribenuron metila, tritosulfurona, triasulfurona, rimsulfurona i prosulfurona i njihovih UV spektara dobijenih primenom Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ kolone na talasnoj dužini od 240 nm prikazani su na slikama od 5.1. do 5.7 (na y-osi se nalazi vrednost strujnog signala detektora izraženog u internim jedinicama (mAU), a na x-osi retenciono vreme u minutama).



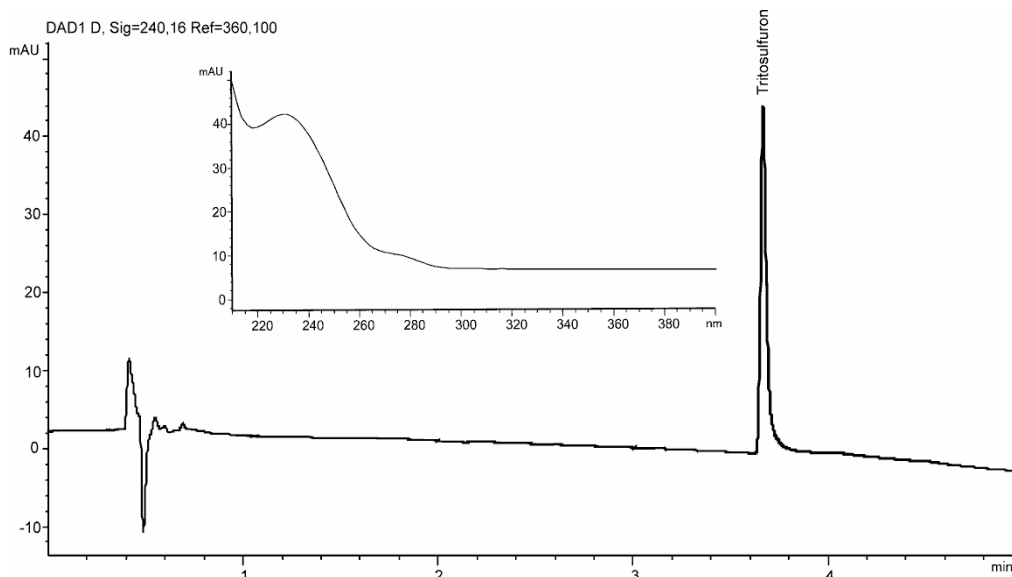
Slika 5.1. Izgled realnog hromatograma i UV spektar nikosulfurona



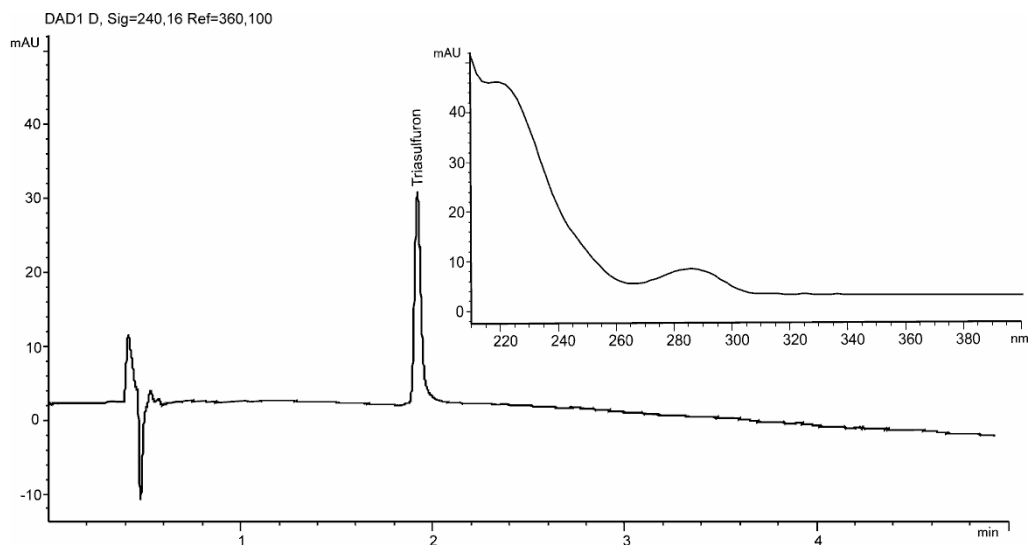
Slika 5.2. Izgled realnog hromatograma i UV spektar oksasulfurona



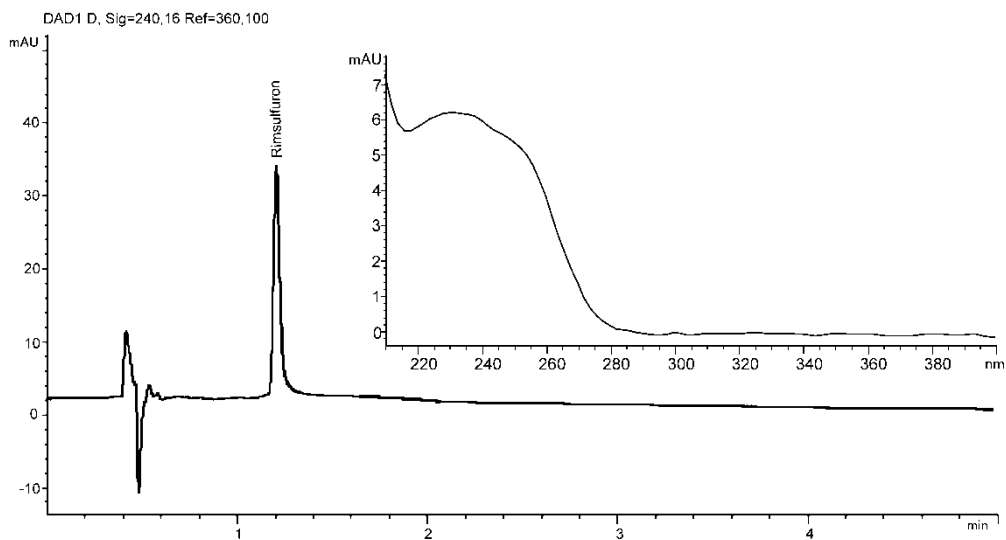
Slika 5.3. Izgled realnog hromatograma i UV spektar tribenuron metila



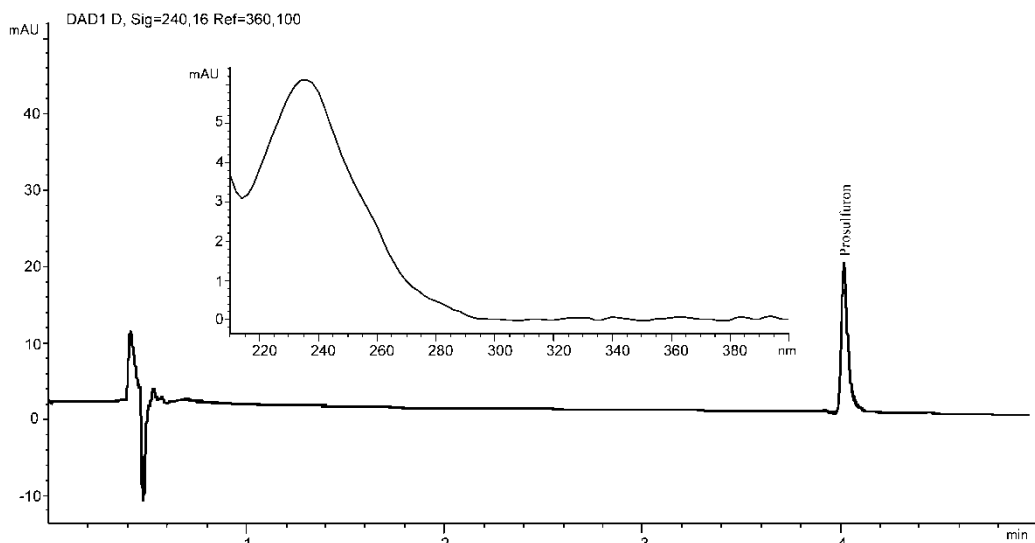
Slika 5.4. Izgled realnog hromatograma i UV spektar tritosulfurona



Slika 5.5. Izgled realnog hromatograma i UV spektar triasulfurona



Slika 5.6. Izgled realnog hromatograma i UV spektar rimsulfurona



Slika 5.7. Izgled realnog hromatograma i UV spektar prosulfurona

Tabela 5.3. Vrednosti analitičkog signala, reproduktivnost, odziv analitičkog signala i linearnost za odabrane SU

Odabrane SU (mg L ⁻¹)	Površina (i.j. ^a)			RSD (%)			Odziv (mAU ^b *L mg ⁻¹)			Linearna zavisnost (R ²)		
	245nm	240nm	230nm	245nm	240nm	230nm	245nm	240nm	230nm	245nm	240nm	230nm
Nikosulfuron												
5	29,87	33,34	26,19	0,641	1,435	0,96	3,092	3,567	2,929	$y=2,691x + 20,674$ (0,9934)	$y=3,108x + 23,713$ (0,9950)	$y=2,608x + 16,904$ (0,9933)
25	94,13	108,44	86,25	1,320	2,990	1,84						
40	134,80	154,87	130,60	0,652	2,383	0,58						
60	176,11	206,00	163,45	1,805	2,130	1,06						
80	225,76	261,88	219,80	4,415	2,213	1,32						
100	297,70	341,17	283,78	1,666	3,258	3,94						
Oksasulfuron												
5	26,85	52,70	46,54	1,379	0,364	1,31	3,965	5,677	4,925	$y=3,790x + 9,027$ (0,9942)	$y=5,062x + 31,747$ (0,9933)	$y=4,382x + 28,009$ (0,9904)
25	117,17	161,93	144,24	1,501	1,591	1,91						
40	155,39	252,70	210,62	2,230	0,863	1,33						
60	225,91	317,72	288,86	1,371	1,680	2,69						
80	304,14	423,95	351,93	3,395	0,662	1,96						
100	399,63	550,77	484,44	3,263	1,304	1,76						
Tribenuron metil												
5	30,84	41,02	35,47	1,709	1,036	1,28	3,469	4,619	4,052	$y=3,093x + 19,409$ (0,9855)	$y=4,139x + 24,769$ (0,9949)	$y=3,598x + 23,424$ (0,9931)
25	105,33	131,45	118,09	2,476	1,745	0,59						
40	145,97	207,26	181,32	3,941	1,669	1,60						
60	205,97	252,90	229,54	3,248	2,637	2,18						
80	243,41	354,68	299,55	3,127	2,020	5,58						
100	343,85	444,45	392,05	1,690	3,092	2,16						

i.j.^a - interna jedinica integratora; mAU^b - interna jedinica predstavlja vrednost strujnog signala detektora

Odabrane SU (mg L ⁻¹)	Površina (i.j. ^a)			RSD (%)			Odziv (mAU ^b *L mg ⁻¹)			Linearna zavisnost (R ²)		
	245nm	240nm	230nm	245nm	240nm	230nm	245nm	240nm	230nm	245nm	240nm	230nm
Tritosulfuron												
5	28,63	29,97	33,59	0,637	1,442	0,63	3,418	3,464	4,042	y=2,975x + 22,860 (0,9894)	y=3,183x + 14,512 (0,9900)	y=3,503x + 27,817 (0,9814)
25	103,64	109,61	116,38	0,949	1,247	3,13						
40	157,36	128,68	189,19	2,344	2,092	2,54						
60	186,46	193,12	222,26	0,992	1,044	1,32						
80	263,46	277,42	328,05	0,940	0,807	1,51						
100	319,91	335,08	363,51	1,521	2,982	3,59						
Triasulfuron												
5	20,75	33,59	47,80	0,691	0,628	1,49	2,919	4,042	6,371	y=2,451x+24,210 (0,9309)	y=3,503x + 27,817 (0,9814)	y=6,177x + 10,055 (0,9871)
25	87,00	116,38	183,07	2,098	3,132	2,21						
40	144,33	189,19	249,07	1,544	2,542	6,88						
60	155,81	222,26	355,23	0,796	1,321	3,29						
80	253,85	328,05	476,82	2,288	1,505	3,82						
100	243,27	363,51	663,08	2,178	3,586	4,22						
Rimsulfuron												
5	19,02	23,45	19,84	1,175	0,798	0,35	2,151	2,557	2,301	y=1,904x + 12,796 (0,9834)	y=2,214x + 17,728 (0,9933)	y=2,014x + 14,824 (0,9812)
25	64,39	78,27	66,71	1,397	0,204	0,93						
40	98,64	112,93	111,02	0,922	1,685	1,72						
60	117,73	147,89	125,59	1,139	1,563	0,95						
80	155,25	186,20	167,61	1,133	0,840	1,34						
100	211,91	243,96	222,64	1,979	1,140	1,02						
Prosulfuron												
5	32,20	37,65	30,30	1,856	0,807	3,10	3,647	4,189	3,456	y=3,21x + 22,563 (0,9936)	y=3,655x + 27,603 (0,9953)	y=2,014x + 14,824 (0,9812)
25	113,13	127,67	103,64	2,499	0,893	0,95						
40	154,40	184,31	156,03	2,039	0,321	5,43						
60	212,55	236,45	191,46	3,851	0,504	1,67						
80	266,07	315,95	266,80	3,454	1,272	4,96						
100	352,14	396,69	323,24	2,648	1,631	1,80						

i.j.^a - interna jedinica integratora; mAU^b - interna jedinica predstavlja vrednost strujnog signala detektora

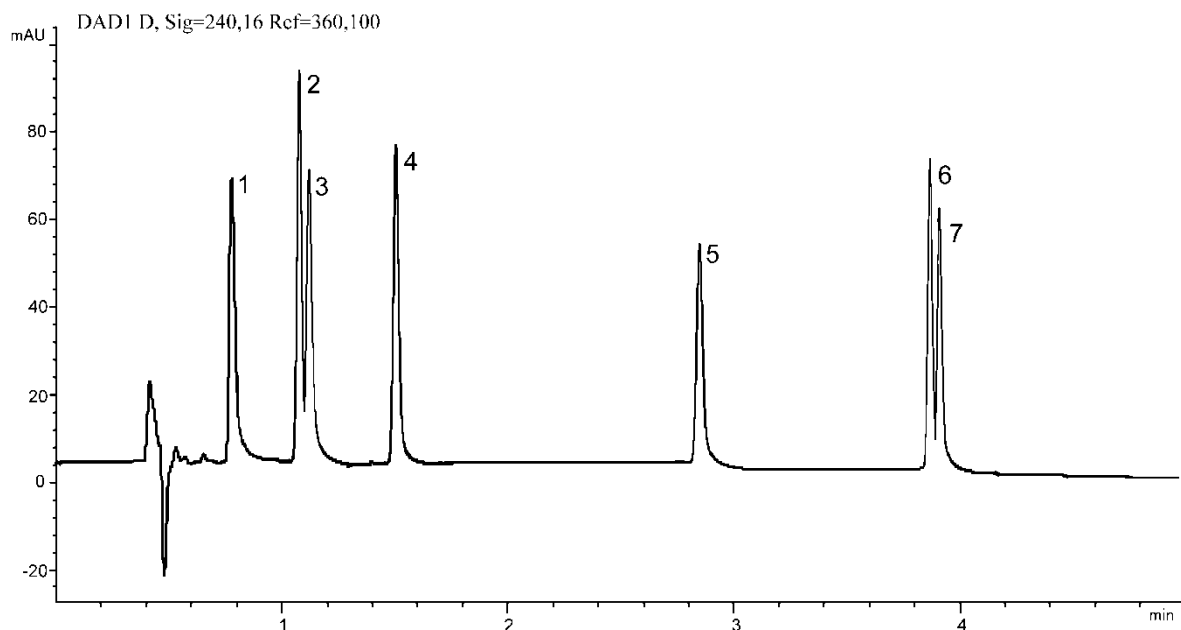
5.2.3. Uticaj gradijentne elucije

Nakon usvajanja acetonitrila kao odgovarajućeg rastvarača i talasne dužine merenja apsorpcije od 240 nm, ispitan je uticaj gradijentne elucije (sastav mobilne faze) na efikasnost razdvajanja ispitivane smeše odabranih SU. Neophodno je bilo posebnu pažnju posvetiti definisanju optimalnog gradijentnog programa u cilju dobijanja što boljeg razdvajanja pikova, zbog sličnih karakteristika ispitivanih jedinjenja. Kao kriterijum za definisanje razdvajanja odabranih SU korišćen je faktor razdvajanja (R). Prema Marjanoviću (2001) za razdvajanje određivanih veličina uobičajeno je mišljenje da vrednosti $R < 1$ ne obezbeđuju dovoljnu selektivnost, dok se razdvajanje sa vrednostima $1 < R < 1,5$ smatra zadovoljavajućim. Razdvajanja kod kojih je $R \gg 1,5$ nisu poželjna, jer traju duže nego što je neophodno. Za susedne pikove istih karakteristika javlja se preklapanja od 16% pri $R = 0,5$ i 2,3% kada je $R = 1$ (Marjanović, 2001).

Osnova za optimizaciju gradijentnog programa bila su istraživanja Polati-ja i sar. (2006), odnosno gradijentni program: $t = 0-11$ min, 45% A; $t = 11-17$ min, 53% A; $t = 25$ min, 60% (A) sa sistemom rastvarača acetonitril (A) i 0,05% sirćetnom kiselinom (B) pri konstantnom protoku od $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Pored toga, osnova za razvoj gradijentne elucije bio je i prethodno definisan gradijentni program: $t = 0$ min, 45% A; $t = 2 - 2,5$ min, 53% A; $t = 2,5-4,5$ min, 60% A, $t = 4,5-5$ min, 45% A primenom sistema rastvarača acetonitril (A) i 0,1% sirćetna kiselina (B) na Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ koloni (50mm x 4,6mm x 1,8 μm) pri konstantnom protoku od 1 mL min^{-1} (Ostojić, 2009).

Optimizacija gradijentnog programa je izvedena korišćenjem standardne smeše odabranih SU (MIX 7): nikosulfuron, oksasulfuron, triasulfuron, tribenuron-metil, tritosulfuron, rimsulfuron i prosulfuron. U cilju povećanja osetljivosti i približavanja sadržaju SU u realnim uzorcima zemljišta nakon primene komercijalnih formulacija, korišćeni su standardni rastvori sa sadržajem odabranih SU od $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ za ova ispitivanja. Standardna smeša prethodno pomenutih SU je korišćena za određivanje retencionih vremena i njihovih UV spektara pri ispitivanju gradijentne elucije.

Pri analizi sedam odabranih SU (nikosulfuron, oksasulfuron, triasulfuron, tribenuron-metil, tritosulfuron, rimsulfuron i prosulfuron) primenom prethodno definisanog gradijentnog programa (Ostojić, 2009) dolazilo je do preklapanja oksasulfurona i rimsulfurona i u nešto manjem stepenu tritosulfurona sa prosulfuronom (Slika 5.8).



Slika 5.8. Izgled realnog hromatograma standardne smeše 7 odabranih SU (1-Nikosulfuron (0,86 min), 2-Oksasulfuron (1,10 min), 3-Rimsulfuron (1,17 min); 4-Triasulfuron (1,54 min); 5-Tribenuron metil (2,91 min); 6-Tritosulfuron (3,93 min) i 7-Prosulfuron (4,04 min) u acetonitrilu pri gradijentnom programu: $t = 0$ min, 45% A; $t = 2 - 2,5$ min, 53% A; $t = 2,5 - 4,5$ min, 60% A, $t = 4,5 - 5$ min, 45% A, primenom Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ kolone na 240 nm

U cilju određivanja sedam odabranih SU usledila su dalja ispitivanja sa sistemom rastvarača acetonitril (A) i vodenim rastvorom sirćetne kiseline (B). U tabeli 5.4 prikazani su ispitivani, kao i usvojeni optimalni hromatografski parametri za određivanje odabranih SU primenom HPLC-UV-DAD metode. Sve analize su izvedene u tri ponavljanja.

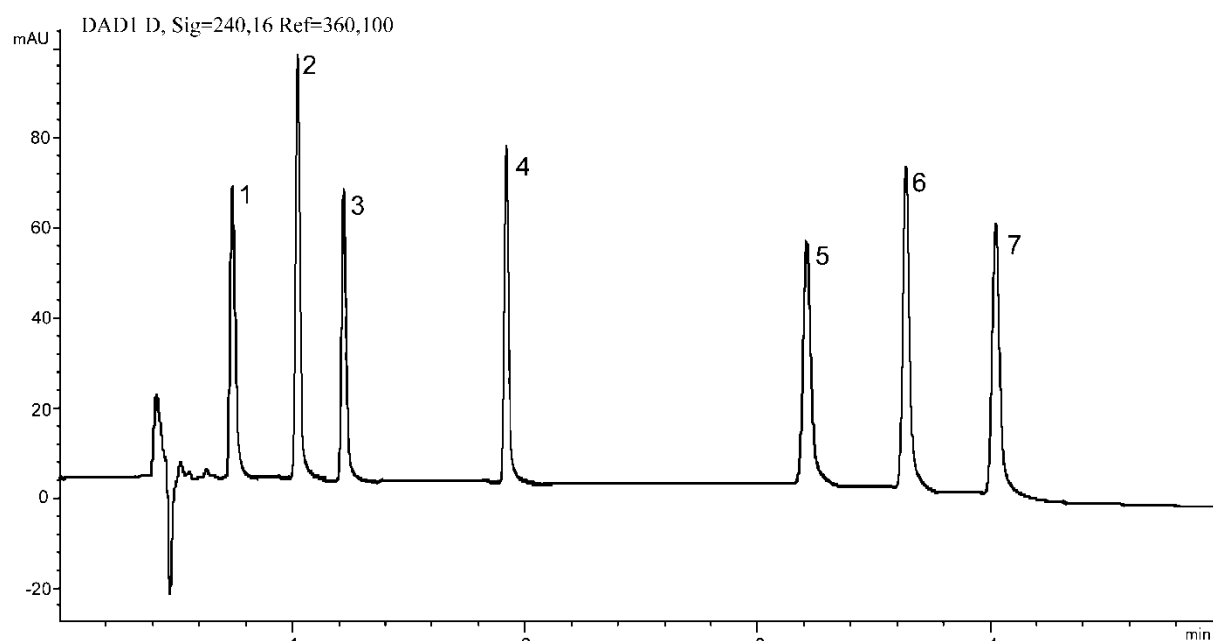
Tabela 5.4. Ispitivani i odabrani hromatografski parametri za određivanje odabranih SU primenom HPLC-UV-DAD metode

Hromatografski parametri	Opseg ispitivani	Optimalni uslovi
Gradijentni program	1) $t = 0 - 11$ min, 45% A; $t = 11 - 17$ min, 53% A; $t = 25$ min, 60% A; 2) $t = 0$ min, 45% A; $t = 2 - 2,5$ min, 53% A; $t = 2,5 - 4,5$ min, 60% A; $t = 4,5 - 5$ min, 45% A; 3) $t = 0$ min, 52% A; $t = 2 - 2,5$ min, 47% A; $t = 2,5 - 5$ min, 52% A	$t = 0$ min, 52% A; $t = 2 - 2,5$ min, 47% A; $t = 2,5 - 5$ min, 52% A
% sirćetne kiseline (rastvor B) za binarni gradijentni program	0,05-0,2	0,1
Brzina protoka mobilne faze (mL min ⁻¹)	0,5-1,2	1
Temperatura kolone (°C)	20-30	25

A: Acetonitril

B: vodeni rastvor sirćetne kiseline (v/v)

Kao usvojeni su sledeći optimalni uslovi: sistem rastvarača acetonitril (A) i 0,1% sirćetna kiselina (B); gradijentni program: $t = 0$ min, 52% A; $t = 2-2,5$ min, 47% A; $t = 2,5-5$ min, 52% A i ekvilibraciju (uravnoteženje) sistema u trajanju od 3 min pri konstantnom protoku od 1 mL min^{-1} na Zorbax Eclipse XDB- C_{18} koloni ($50 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm} \times 1,8 \text{ }\mu\text{m}$). Optimalna temperatura kolone je bila 25°C . Injekciona zapremina je iznosila $5 \text{ }\mu\text{L}$, a talasna dužina merenja apsorbanije 240 nm . Pri ovim uslovima postignuto je dobro razdvajanje sedam odabranih SU (nikosulfuron, oksasulfuron, triasulfuron, tribenuron-metil, tritosulfuron, rimsulfuron i prosulfuron). Faktor razdvajanja se kretao od 0,81-1,15 pri čemu su dobijeni oštri i dobro definisani pikovi. Postignuto je dobro razdvajanje odabranih SU ($R > 1$), izuzev za oksasulfuron i rimsulfuron kod kojih je dobijeno prihvatljivo razdvajanje ($R < 1$). Na slici 5.9 prikazan je originalan zapis hromatograma dobijenog analizom standardne smeše koja sadrži odabrane SU (nikosulfuron, oksasulfuron, tribenuron-metil, tritosulfuron, triasulfuron, rimsulfuron i prosulfuron) pri definisanom gradijentnom programu i optimalnim uslovima iz tabele 5.4.



Slika 5.9. Izgled realnog hromatograma standardne smeše 7 odabranih SU (1-Nikosulfuron (0,79 min); 2-Okasulfuron (1,03 min); 3-Rimsulfuron (1,26 min); 4-Triasulfuron (1,97 min); 5-Tribenuron metil (3,24 min); 6-Tritosulfuron (3,73 min) i 7-Prosulfuron (4,14 min)) u acetonitrilu pri gradijentnom programu: $t = 0$ min, 52% A; $t = 2 - 2,5$ min, 47% A; $t = 2,5-5$ min, 52% A i re-ekvilibraciji 3 min pri konstantnom protoku od 1 mL min^{-1} na Zorbax Eclipse XDB- C_{18} koloni ($50 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm} \times 1,8 \text{ }\mu\text{m}$), temperaturi kolone od 25°C i talasnoj dužini od 240 nm .

Sa slike 5.9. može se uočiti da se odabrane SU sa kolone eluiraju u sledećim retencionim vremenima (t_r): 1-Nikosulfuron (0,79 min); 2-Okasulfuron (1,03 min); 3-Rimsulfuron (1,26

min); 4-Triasulfuron (1,97 min); 5-Tribenuron metil (3,24 min); 6-Tritosulfuron (3,73 min) i 7-Prosulfuron (4,14 min).

Posle definisanja optimalnog gradijentnog programa, u cilju pouzdanijeg kvalitativnog određivanja odabranih SU u uzorcima zemljišta, formirana je sopstvena baza podataka UV spektara. Izvedene su analize standardne smeše sedam odabranih SU različitih sadržaja i eksperimentalno dobijeni UV spektri su uvršteni u bazu podataka UV spektara.

5.2.4. Uticaj koncentracije sulfonilurea na analitički signal

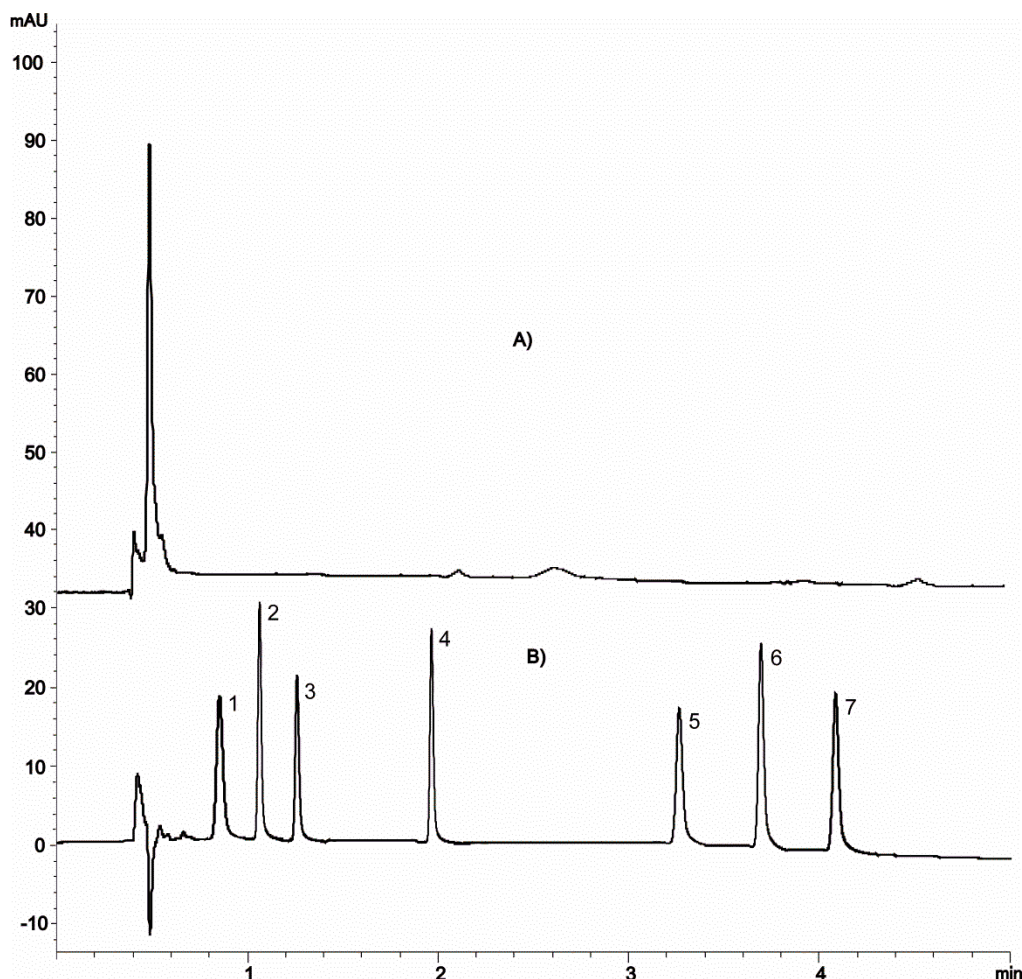
Pri prethodno utvrđenim optimalnim uslovima definisana je zavisnost analitičkog signala od koncentracije odabranih SU. Zavisnosti analitičkog signala od koncentracije je ispitana za dva koncentraciona opsega odabranih SU (model sistemi standardnih rastvora u acetonitrilu) od 0,05-1 mg L⁻¹ i od 5-100 mg L⁻¹. Mobilna faza je bila acetonitril (A) i 0,1% sirćetna kiselina (B) uz gradijentni program: t = 0 min, 52% A; t = 2 - 2,5 min, 47% A; t = 2,5 - 5 min, 52% A i ekvibraciji od 3 min pri konstantnom protoku od 1 mL min⁻¹ na Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ koloni (50 mm x 4,6 mm x 1,8 μm) i temperaturi kolone od 25^oC na talasnoj dužini λ=240 nm. Injekciona zapremina je bila 5 μL. Eksperimenti su izvedeni u tri ponavljanja za svaki ispitivani opseg. U tabeli 5.5 su date vrednosti retencionog vremena (tr), zavisnost analitičkog signala od koncentracije kao i koeficijenti korelacije za oba ispitivana opsega svih 7 SU obuhvaćenih ovom studijom.

Tabela 5.5. Retenciono vreme (tr), zavisnost analitičkog signala od koncentracije za odabrane SU i njihovi koeficijenti korelacije (R²)

Odabrane SU	Retenciono vreme tr (min)	Opseg sadržaja (mg L ⁻¹)	Zavisnost analitičkog signala od koncentracije	Koeficijenti korelacije (R ²)
Nikosulfuron	0,80	0,05-1 5-100	y = 3,188x + 0,529 y = 3,108x + 23,714	0,9908 0,9950
Oksasulfuron	1,04	0,05-1 5-100	y = 9,173x + 0,135 y = 4,952x + 134,380	0,9992 0,9934
Rimsulfuron	1,28	0,05-1 5-100	y = 4,497x + 0,056 y = 2,214x + 17,729	0,9946 0,9940
Triasulfuron	1,99	0,05-1 5-100	y = 3,089x + 0,426 y = 4,118x + 22,704	0,9971 0,9954
Tribenuron metil	3,26	0,05-1 5-100	y = 3,245x + 0,321 y = 5,115x + 25,114	0,9928 0,9949
Tritosulfuron	3,78	0,05-1 5-100	y = 4,221x + 0,654 y = 5,447x + 19,478	0,9933 0,9937
Prosulfuron	4,16	0,05-1 5-100	y = 6,323 x + 0,895 y = 3,655 x + 27,604	0,9964 0,9953

Postignuta je veoma dobra linearna zavisnost analitičkog signala od koncentracije za oba koncentraciona opsega odabranih SU, što potvrđuju visoki koeficijenti korelativnosti (Tabela 5.5.).

Na slici 5.10 prikazan je originalni hromatogram slepe probe i standardnog rastvora smeše sedam odabranih SU (5 mg L^{-1}), na 240 nm primenom Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ kolone uz prethodno navedene uslove gradijentne elucije.



Slika 5.10. Izgled realnog hromatograma A) slepe probe i B) standardnog rastvora smeše odabranih SU (1-Nikosulfuron (0,80 min); 2-Okasulfuron (1,07 min); 3-Rimsulfuron (1,29 min); 4-Triasulfuron (1,91 min); 5-Tribenuron metil (3,20 min); 6-Tritosulfuron (3,77 min) i 7-Prosulfuron (4,17 min)) sa sistemom rastvarača acetonitil (A) i 0,1% sirćetna kiselina (B) uz gradijentni program: $t = 0 \text{ min}$, 45% A; $t = 2 - 2,5 \text{ min}$, 53% A; $t = 2,5 - 4,5 \text{ min}$, 60% A, $t = 4,5 - 5 \text{ min}$, 45% A, uz Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ kolone na 240 nm

Ponovljivost i reproduktivnost su određeni u rastvorima sadržaja 5 mg L^{-1} i 100 mg L^{-1} odabranih SU. Ponovljivost je određena na osnovu rezultata tri uzastopne analize istog rastvora, dok je reproduktivnost određena na osnovu rezultata tri analize različitih rastvora istog sadržaja odabranih SU u acetonitrilu.

Relativne standardne devijacije analitičkog signala odabranih SU su se u slučaju ispitivanja ponovljivosti kretale od 0,36-1,44% za niži sadržaj (5 mg L^{-1}), i 1,14-3,59% za viši sadržaj (100 mg L^{-1}) odabranih SU.

U slučaju reproduktivnosti, relativne standardne devijacije (RSD) za niži i viši sadržaj odabranih SU su se kretale od 1,31 do 1,87% i 1,43-4,39%, redom.

RSD analitičkog signala su ukazale na dobru reproduktivnost i ponovljivost određivanja odabranih SU pomoću HPLC-UV-DAD metode na talasnoj dužini od 240 nm.

5.2.5. Granica detekcije i granica kvantifikacije

Nakon optimizacije uslova hromatografskog određivanja (HPLC-UV-DAD), određene su granice detekcije (LOD) i granice kvantifikacije (LOQ) za odabrane SU u smeši (Tabela 5.6).

U cilju određivanja granice detekcije odabranih SU praćen je intezitet njihovih analitičkih signala, razblaživanjem standardne smeše njihovih rastvora u „blank” ekstraktu zemljišta (prečišćeni), sve dok njihov odnos signal-šum (signal-to-noise, S/N) nije bio veći ili jednak od 3 ($S/N \geq 3$). Za izračunavanje LOD i LOQ su korišćene standardne devijacije površine pikova odabranih SU dobijene analizom standardne smeše rastvora najniže koncentracije ($n=5$) (poglavlje 4.8).

Prema literaturno dostupnim podacima LOD vrednosti za odabrane SU su se kretale u opsegu od 0,1 do $12 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Zhu i sar., 2002; Paul i sar., 2009; Wu i sar., 2009). Utvrđene granice detekcije u ovom radu su bile u opsegu dobijenih LOD vrednosti od strane drugih autora.

Tabela 5.6. Vrednosti LOD i LOQ pri analizi pojedinačnih sulfonilurea sa HPLC-UV-DAD metodom

Odabrane SU	LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Nikosulfuron	0,95	3,16
Oksasulfuron	1,02	3,40
Tribenuron metil	1,13	3,76
Tritosulfuron	1,24	4,13
Triasulfuron	1,08	3,60
Rimsulfuron	0,91	3,04
Prosulfuron	0,89	2,97

Dobijene LOQ vrednosti za odabrane SU herbicide sa HPLC-UV-DAD metodom u zemljištu u skladu su sa zahtevima standarda SANCO/825/00 (rev. 8.1. od 16/11/2010) za ostatke pesticida u zemljištu ($\text{LOQ}=0,05 \text{ mg kg}^{-1}$) (SANCO/825/00).

5.2.6. Uticaj matriksa na analitički signal

Prisutnost različitih komponenata u uzorku zemljišta kao što su nehuminske i huminske materije (fulvinske kiseline, himatomelanske kiseline, huminske kiseline, humini i humusni ugalj) mogu uticati na intezitet signala tj. na njegovo povećanje ili smanjenje.

Za ispitivanje uticaja matriksa pri određivanju sadržaja odabranih SU u zemljištu primenom HPLC-UV-DAD metode bilo je potrebno uporediti nagibe između kalibracionih krivih čistih standarda u rastvaraču (SC) i standarda istih koncentracija pripremljenih u ekstraktu zemljišta (MMC). Za izračunavanje je korišćen izraz naveden u poglavlju 4.6. Karakteristike formiranih MMC krivih i izračunati matriks efekti prikazani su u tabeli 5.7.

Tabela 5.7. Karakteristike MMC kalibracionih krivih za odabrane SU i uticaj matriksa zemljišta za ispitivani koncentracioni opseg od 5-100 mg L⁻¹

Odabrane SU	Zavisnost analitičkog signala od koncentracije	Koeficijent korelacije (R ²)	Matriks efekat (%)
Nikosulfuron	$y = 2,614x + 19,002$	0,9937	84,11
Oksasulfuron	$y = 4,562x + 113,45$	0,9928	92,13
Tribenuron metil	$y = 2,113x + 13,847$	0,9918	91,25
Tritosulfuron	$y = 6,879x + 24,354$	0,9902	86,54
Triasulfuron	$y = 4,213x + 10,426$	0,9933	87,14
Rimsulfuron	$y = 2,075x + 8,071$	0,9905	93,72
Prosulfuron	$y = 3,344x + 15,106$	0,9940	91,49

Rezultati su pokazali (tabela 5.7) da dolazi do smanjenja inteziteta signala odabranih SU pod uticajem matriksa zemljišta. Vrednosti koeficijenata korelacije za MMC kalibracione krive su se kretale u intervalu od 0,9902-0,9940, a matriks efekat je bio u opsegu od 84,11-93,72%.

Zbog uticaja matriksa, koncentracije odabranih SU u poljoprivrednom zemljištu nakon primene komercijalnih formulacija i njihove disipacije su određivane na osnovu MMC standardnih krivih, kako bi se uticaj matriksa na analitički signal kompenzovao.

5.2.7. Ispitivanje tačnosti definisane metode

U cilju potvrde tačnosti definisane HPLC-UV-DAD metode, analizirani su obogaćeni prečišćeni ekstrakti zemljišta sa odabranim SU u koje je dodavno 5, 10 i 100 µg kg⁻¹, a za

izračunavanje sadržaja istih su korišćene MMC kalibracione krive. Dobijeni rezultati prikazani su u tabeli 5.8.

Tabela 5.8. Rezultati određivanja odabranih SU u obogaćenim ekstraktima zemljišta na tri koncentraciona nivoa (5, 10 i 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$) primenom HPLC-UV-DAD

Odabrane SU	Nivo obogaćivanja ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Test povrata (%)	RSD (%)
Nikosulfuron	100,0	97,47	1,43
	50,0	98,02	1,05
	5,0	98,76	1,72
Oksasulfuron	100,0	94,01	2,14
	50,0	96,13	2,02
	5,0	97,44	1,84
Tribenuron metil	100,0	95,16	3,17
	50,0	97,33	2,14
	5,0	99,15	1,66
Tritosulfuron	100,0	94,94	2,07
	50,0	96,14	1,81
	5,0	98,02	2,37
Triasulfuron	100,0	96,41	1,49
	50,0	98,22	1,25
	5,0	95,79	2,37
Rimsulfuron	100,0	99,17	1,37
	50,0	97,88	1,43
	5,0	99,10	2,67
Prosulfuron	100,0	97,91	1,02
	50,0	98,04	1,52
	5,0	99,83	2,13

Vrednosti testa povrata su se kretale u intervalu od 94,01-99,83% uz dobru ponovljivost određivanja (RSD = 1,02-3,17). Dobijeni rezultati su potvrdili tačnost definisane HPLC-UV-DAD metode za određivanje odabranih SU. Prema uputstvu EU za validaciju metoda za određivanje pesticida, srednja vrednost testa povrata metode bi trebalo da se kreće u opsegu od 70-120% sa $\text{RSD} \leq 20\%$ (SANCO 12571/2013 i 825/00). Određeni sadržaji i izračunate vrednosti testa povrata zadovoljavaju prethodno pomenuti uslov (Tabela 5.8).

5.3. Definisanje optimalnih uslova rada visoko-pritiskne tečne hromatografije sa MS-MS detektorom za određivanje sadržaja odabranih sulfonilurea

5.3.1. Optimizacija MS-MS parametara

U cilju dobrog razdvajanja i određivanja optimalnih tranzicija jona, odnosno jonskih prelaza sedam odabranih SU, izvršeno je podešavanje akvizicionih parametara masenog spektrometra pre kalibracije (kvantifikacije) u odabranom odgovarajućem modu, višestruko praćenih reakcija (MRM). Maseno spektrometrijski uslovi su optimizovani korišćenjem kalibracionih standarda odabranih SU pripremljenih u acetonitrilu, koncentracije 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Za pronalaženje najpovoljnijih uslova jonizacije odabrane SU su analizirane u negativnom i pozitivnom elektrosprej jonizacionom modu (ESI⁻ i ESI⁺). Intenzivniji signali za sve odabrane SU su dobijeni pri pozitivnoj elektrosprej jonizaciji. Odabrani jonski prelazi, energije fragmentacije i kolizije odabranih SU prikazane su u tabeli 5.9.

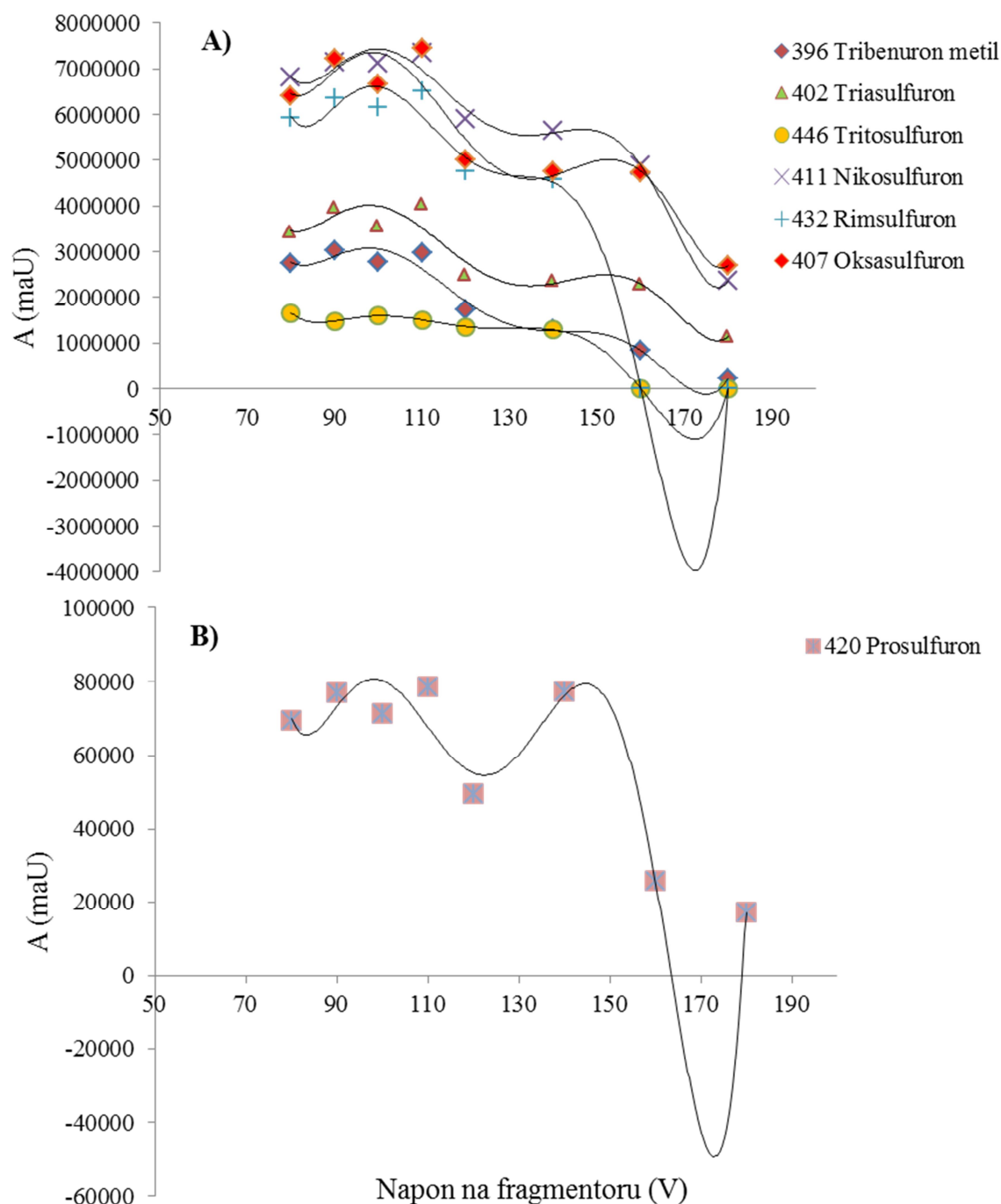
Tabela 5.9. Odabrani jonski prelazi, energije fragmentacije i kolizije odabranih SU

Odabrane SU	Molekulska masa (g mol ⁻¹)		Prekursor jon m/z	Produkt jon m/z	Energija fragmentacije (V _f)	Energija kolizije (V _{col})	tr (min)
Nikosulfuron	410,41	T*	411	182	120	16	1,75
		Q**	411	213	120	12	
Oksasulfuron	406,41	T	407	150	120	16	2,15
		Q	407	210	120	20	
Triasulfuron	401,83	T	402	167	120	15	2,65
		Q	402	141	120	15	
Rimsulfuron	431,44	T	432	325	120	10	2,76
		Q	432	182	120	20	
Tritosulfuron	445,30	T	446	193	120	15	2,94
		Q	446	145	120	12	
Tribenuron-metil	395,39	T	396	155	120	10	3,96
		Q	396	181	120	15	
Prosulfuron	419,38	T	420	266	120	10	4,83
		Q	420	177	120	10	

T* -ciljani joni (eng. target ions)

Q** - joni za identifikaciju (eng. qualifier ions)

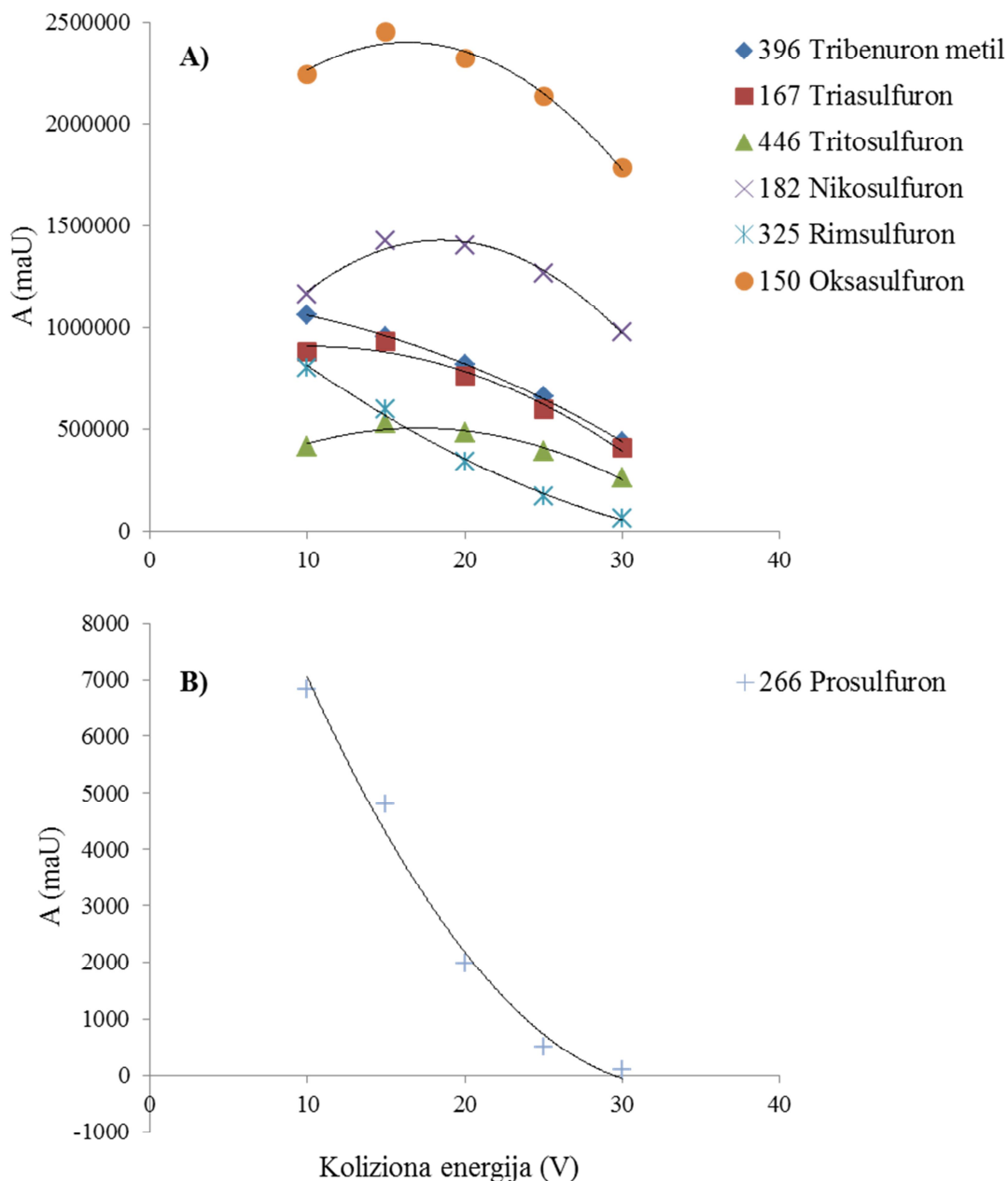
Ispitivanje optimalnih uslova MS-MS sistema se sastojalo iz dve faze. U prvoj fazi je izvedena optimizacija napona na fragmentoru i na taj način su određeni najintenzivniji joni za svih sedam odabranih SU. Molekulski joni odabranih SU su određeni u *Scan* modu na osnovu masenih spektara. Poznati molekulske joni su fragmentisani u *Product Ion* modu, primenom različitih energija fragmentacije. U MS-MS eksperimentima korišćena je metoda praćenja odabrane reakcije (SRM). Eksperimentalnim putem su tražene vrednosti optimalne energije fragmentacije i energije kolizije za odabrana jedinjenja na osnovu odabranih tranzicija kako bi se postigla što bolja osetljivost detektora. Najstabilniji i najintenzivniji fragment je korišćen kao jon za kvantifikaciju, dok je za potvrdu jedinjenja (identifikacioni jon) korišćen sledeći jon sa najvećom abudancom. Svaki produkt jon je kvantifikovan sa jedinstvenom rezolucijom masa. Odabrane SU su analizirane pri naponu fragmentora u rasponu od 80 do 180 V u koracima od 10 i 20 V. Pri naponu od 110 V dobijene su najveće površine pikova za odabrane SU, ali pri ovom naponu nije bilo moguće njihovo pouzdano kvantitativno određivanje zbog neodgovarajuće reproduktivnosti. Pri naponu od 120 V su postignuti reproduktivniji rezultati zbog čega je ovaj napon usvojen kao optimalan napon na fragmentoru za odabrane SU (Slika 5.11).



Slika 5.11. Zavisnost analitičkog signala od napona na fragmentoru za jedan produkt jon za A) tribenuron metil, triasulfuron, tritosulfuron, nikosulfuron, rimsulfuron i oksasulfuron; B) prosulfuron.

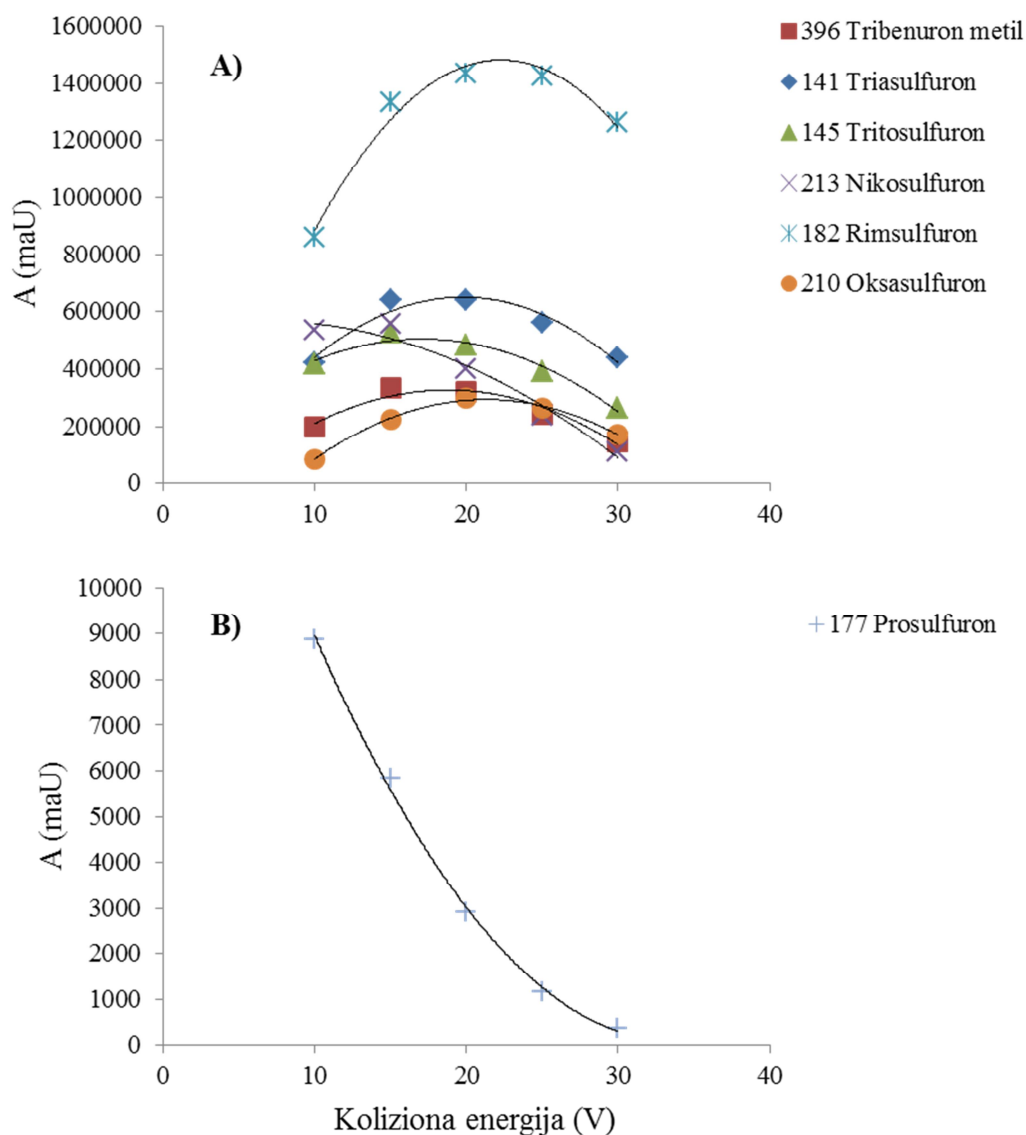
Kolizione energije za „target” i „qualifier” jone odabranih SU ispitivane su u intervalu od 10 do 30 V, u koracima od 5 V. Kao odgovarajuće kolizione energije za „target” jone odabranih SU su usvojene one energije na kojima je postignuta maksimalna vrednost analitičkih signala uz odgovarajuću reproduktivnost.

Odabrane su optimalne kolizijske energije za „target“ jone pojedinačnih SU u vrednostima od: 10 V (tribenuron metil, rimsulfuron i prosulfuron), 15 V (tritosulfuron i triasulfuron) i 16 V (nikosulfuron i oksasulfuron) (Slika 5.12).



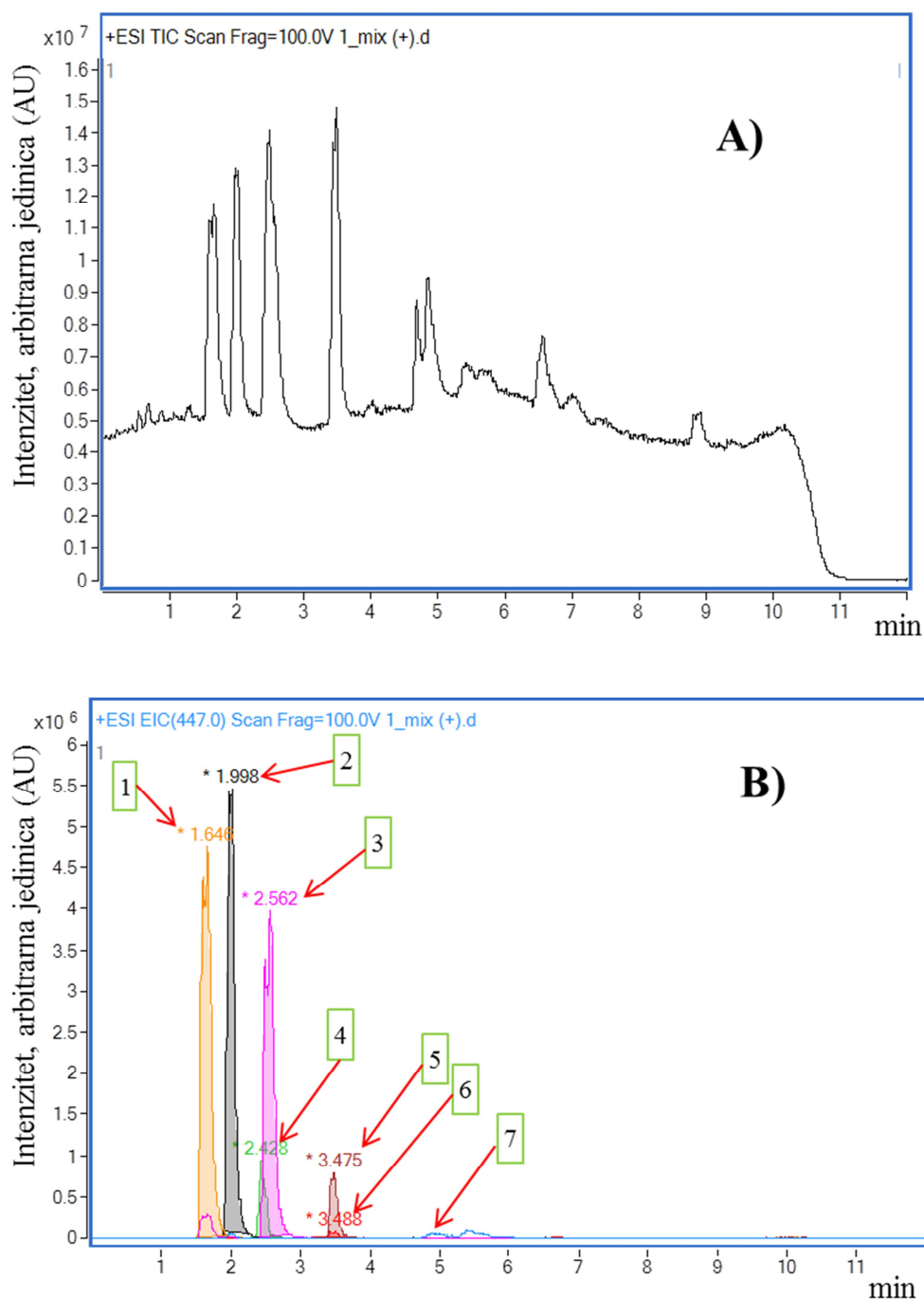
Slika 5.12. Zavisnost analitičkog signala od kolizijske energije za „ciljane“ jone za A) tribenuron metil, triasulfuron, tritosulfuron, nicosulfuron, rimsulfuron i oksasulfuron; B) prosulfuron.

Usvojene kolizijske energije za „qualifier“ jone odabranih SU na kojima se postiže maksimalna vrednost analitičkog signala uz odgovarajuću reproduktivnost iznosile su: 10 V (prosulfuron), 12 V (nikosulfuron, tritosulfuron), 15 V (triasulfuron, tribenuron metil) i 20 V (okasulfuron, rimsulfuron) (Slika 5.13).



Slika 5.13. Zavisnost analitičkog signala od kolizionih energija jona za identifikaciju za A) tribenuron metil, triasulfuron, tritosulfuron, nikosulfuron, rimsulfuron i oksasulfuron; B) prosulfuron.

Na slici 5.14 je prikazan ukupan jonski hromatogram (eng. total ion chromatogram, TIC) i ekstrahovani jonski hromatogram (eng. extracted-ion chromatogram EIC) dobijen HPLC-MS-MS metodom pri prethodno optimizovanim uslovima za odabrane SU ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) pri čemu se može primetiti dobro razdvajanje odabranih SU.



Slika 5.14. A) Ukupni jonski hromatogram (TIC) i **B)** EIC hromatogram odabranih SU u standardnom rastvoru ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$): 1- nikosulfuron, 2-oksasulfuron, 3-triasulfuron, 4-rimsulfuron, 5-tritosulfuron, 6-tribenuron metil i 7-prosulfuron.

5.3.2. Linearnost odziva detektora, granica detekcije i granica kvantifikacije za HPLC-MS-MS

Za proveru linearnosti metode ispitivan je odgovor masenog dektora (površina pika) za kalibracione standardne smeše odabranih SU (model sistemi standardnih rastvora u acetonitrilu) u dva koncentraciona opsega (Tabela 5.10). Eksperimenti su izvedeni u tri

ponavljanja za svaki ispitivani opseg. Određivanje granice detekcije (LOD) i granice kvantifikacije (LOQ) za pojedinačne SU izvedeno je praćenjem inteziteta analitičkog signala pri razblaživanju standardnih rastvora smeša SU u acetonitrilu do postizanja vrednosti odnosa signal/šum veće ili jednake 3 ($S/N \geq 3$). U tabeli 5.10 su prikazane karakteristike formiranih kalibracionih krivih za serije korišćenih standarda odabranih SU, retenciona vremena (t_r) i vrednosti LOD i LOQ analiziranih SU.

Koeficijenti korelativnosti su se kretali u opsegu od 0,9914-0,9989. Postignuta je dobra linearna zavisnost analitičkog signala od sadržaja odabranih SU za oba koncentraciona opsega, što potvrđuju visoki koeficijenti korelativnosti (Tabela 5.10.).

Tabela 5.10. Karakteristike kalibracionih krivi za ispitivane sadržaje odabranih SU, njihove LOD i LOQ vrednosti primenom HPLC-MS-MS metode.

Odabrane SU	t_r (min)	Opseg sadržaja (ng mL ⁻¹)	Zavisnost analitičkog signala od koncentracije	Koeficijent korelacije (R ²)	LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Nikosulfuron	1,75	0,51-85,55 171,10-8555,00	$y = 17281x + 108,56$ $y = 25648x + 4782,30$	0,9927 0,9984	0,163	0,542
Oksasulfuron	2,15	0,32-52,93 105,90-11125,0	$y = 46667x + 80,65$ $y = 65641x + 7442,70$	0,9989 0,9949	0,064	0,213
Tribenuron metil	2,65	0,47-82,41 169,05-8422,00	$y = 13211x + 45,01$ $y = 22711x + 3124,22$	0,9914 0,9922	0,091	0,304
Rimsulfuron	2,76	0,46-76,45 152,90-7645,00	$y = 15405x + 30,187$ $y = 21706x + 3257,01$	0,9989 0,9923	0,079	0,264
Triasulfuron	2,94	0,22-51,04 102,93-12125,0	$y = 18241x + 98,53$ $y = 24641x + 4181,32$	0,9971 0,9947	0,056	0,187
Tritosulfuron	3,96	0,41-72,11 151,84-7515,00	$y = 41661x + 74,32$ $y = 62661x + 7034,88$	0,9956 0,9947	0,065	0,217
Prosulfuron	4,83	0,67-111,25 222,50-11125,00	$y = 14751x + 35,593$ $y = 16571x + 1531,50$	0,9987 0,9954	0,043	0,142

Prema literaturno dostupnim podacima granice detekcije pri određivanju pojedinih sulfonilurea HPLC-MS-MS tehnikom su se kretale u opsegu od 0,02 do 6,9 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (Bossi i sar., 1999; Ye i sar., 2006; Degelmann i sar., 2006; Hu i sar., 2010). Stoga se može zaključiti da su definisane granice detekcije za odabrane SU u ovom radu u opsegu dobijenih LOD vrednosti od strane drugih autora. Ostvarena granica kvantifikacije pri datim uslovima je bila najniža za prosulfuron i iznosila je 0,142 $\mu\text{g kg}^{-1}$, a najviša za nikosulfuron i iznosila je 0,542 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (Tabela 5.10).

5.4. Definisanje postupka pripreme uzoraka zemljišta

Priprema uzoraka za analizu predstavlja kritičan korak u svakom analitičkom postupku. Ona podrazumeva kvantitativno izolovanje analita od interesa iz matriksa, a da pri tome ne dođe do gubitka analita, niti do kontaminacije uzorka. Međutim, pri ekstrakciji željenog analita iz matriksa zemljišta, istovremeno može doći i do izdvajanja većeg broja drugih organskih jedinjenja, koja su prisutna u matriksu, a mogu ometati analizu ciljanog analita. Zbog toga je korak prečišćavanja ekstrakta, često neophodan korak nakon ekstrakcije. Prečišćavanjem ekstrakta se postiže kvantitativno izdvajanje analita od interesa od ostalih koekstrahovanih supstanci.

U okviru pripreme uzoraka zemljišta za određivanje sadržaja odabranih SU neophodno je bilo optimizovati uslove ekstrakcije i prečišćavanja. Prema literaturnom pregledu do sada nije razvijena metoda za simultano određivanje nikosulfurona, oksasulfurona, tribenuron metila, tritosulfurona, triasulfurona, rimsulfurona i prosulfuron iz uzoraka zemljišta.

5.4.1. Optimizacija uslova ekstrakcije

5.4.1.1. Uticaj smeše rastvarača na mikrotalasnu i ultrazvučnu ekstrakciju

U cilju optimizacije postupka ekstrakcije odabranih SU, ispitana je ekstrakciona moć različitih ekstragenasa. Poznato je da se proces mikrotalasne ekstrakcije dešava uz dejstvo mikrotalasa pod uticajem različitih mehanizama, a efekat mikrotalasnog zračenja, kao i efikasnost mikrotalasne ekstrakcije u velikoj meri zavisi od izbora ekstrakcinog rastvarača. Naime, pored dobrih ekstrakcionih svojstava, rastvarač treba dobro da apsorbuje mikrotalasno zračenje. Stoga se kao ekstragenasi za mikrotalasnu ekstrakciju veoma često primenjuju polarni rastvarači koje odlikuje visoka sposobnost apsorpcije mikrotalasnog zračenja i veoma brzo zagrevanje. Međutim u ovoj studiji, čist polaran rastvarač nije mogao biti uključen za ispitivanje efikasnosti ekstrakcije termolabilnih SU, zbog energičnog zagrevanja. Čisti nepolarni rastvarači su transparentni za mikrotalase, odnosno ne apsorbuju mikrotalasno zračenje (poglavlje 2.7.1.1) Veoma često se za korekciju polarnosti ekstrakcione mešavine i povećanje brzine zagrevanja pri mikrotalasnoj ekstrakciji koristi voda ili neki polarniji rastvarač, koji se u malim količinama dodaju rastvaračima transparentnim za mikrotalase (heksan, dihlormetan, etil acetat). Međutim, voda nije korišćena u ovom radu zbog znatno brže degradacije SU u vodenoj sredini, već su korišćeni polarni organski rastvarači (Moser, 2010). Prema literaturnim podacima, dihlormetan u kombinaciji sa metanolom ili njihova mešavina zakišeljena sa trifluorsirćetnom kiselinom, omogućuje efikasnu mikrotalasnu ekstrakciju i zatim određivanje ostataka metsulfuron metila iz zemljišta (Font i sar., 1998,

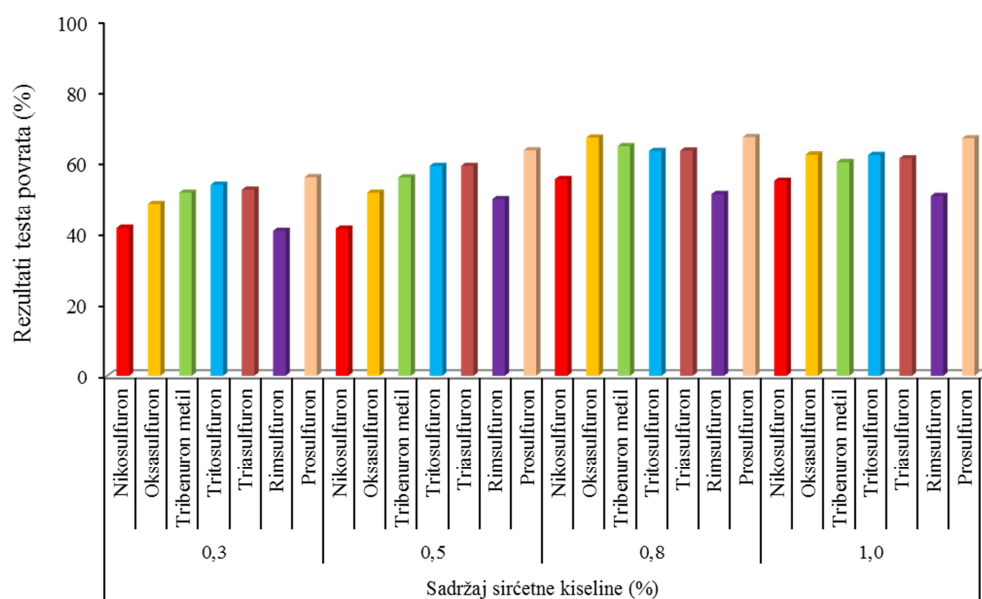
Molins i sar., 2000, Hogendoorn i sar., 2001). Stoga su za ispitivanje efikasnosti ultrazvučne i mikrotalasne ekstrakcije odabranih SU iz zemljišta u ovom radu primenjeni nepolarni rastvarači (dihlormetan, n-heksan i etil acetat) u kombinaciji sa metanolom i acetonitrilom kao više polarnim rastvaračima u cilju povećanja brzine zagrevanja, odnosno povećanja polarnosti ekstrakcione mešavine (Eskilsson & Björklund, 2000).

Ispitivanja su obuhvatila sledeće ekstragense: dihlormetan-metanol, dihlormetan-acetonitril, heksan-metanol, heksan-acetonitril i etil acetat-acetonitril, koji su pripremljeni u različitim odnosima (2:1, 2:5, 2:8, v/v) za svaku smešu. Zemljište je uzeto sa parcele pre obavljenog tretiranja sa komercijalnim formulacijama ispitivanih herbicida, osušeno do konstantne mase i samleveno do veličine čestica <2 mm. Pre dodatka standardnog rastvora odabranih SU na zemljište, isti su bili podvrgnuti analizi u cilju određivanja njihovih sadržaja prema prethodno optimizovanoj HPLC-UV-DAD metodi. Analizom nisu određeni ostaci odabranih SU u uzorcima zemljišta. Nakon toga, samlevenim uzorcima zemljišta dodata je poznata količina standardne smeše SU odabranih za ispitivanje ekstrakcione moći primenjenih ekstragenasa uz ultrazvučnu i mikrotalasnu ekstrakciju. Samleveni uzorak zemljišta (10 g) je meren u ekstrakcionu posudu (stakleni balon za ultrazvučnu i teflonska posuda za mikrotalasnu ekstrakciju) i zatim je dodato 10 mL rastvarača za ekstrakciju. Ultrazvučna ekstrakcija je izvođena u ultrazvučnom kupatilu (20 minuta na 50°C, 37 kHz, snaga 320 W) uz korišćenje povratnog hladnjaka, dok je mikrotalasna ekstrakcija izvođena u mikrotalasnom sistemu (2 min predzagrevanje na 150 W; 2 min predzagrevanje na 300 W i 10 min ekstrakcija na 450 W). Postupak mikrotalasne ekstrakcije je izvođen uz primenu teflonskog jezgra (mešač) kako bi se postiglo što ravnomernije zagrevanje ekstrakcione smeše i izbegla pojava tkz. „toplih tačaka“. Nakon ekstrakcije (ultrazvučne i mikrotalasne) uzorci su centrifugirani (4000 rpm, 15 minuta), a zatim je postupak ekstrakcije sa svežim rastvaračem ponovljen, pri istim uslovima. Dobijeni ekstrakti zemljišta nakon ekstrakcije su spojeni i upareni do suva na rotacionom vakuum uparivaču. Suvi ostatak nakon uparavanja je rastvoren u dihlormetanu, i prečišćen ekstrakcijom na čvrstoj fazi. Prečišćen ekstrakt nakon uparavanja i rastvaranja u acetonitrilu je hromatografisan. Hromatografska merenja su izvedena pri istim uslovima za sve dobijene ekstrakte uz pomoć optimizovane HPLC-UV-DAD metode. Efikasnost ekstrakcionih smeša praćena je preko vrednosti i reproduktivnosti analitičkog signala, odnosno vrednosti testa povrata („prinos“).

Primenom ekstrakcione smeše dihlormetan-acetonitril (2:1, v/v) su dobijene najveće vrednosti testa povrata odabranih SU, koji su varirali u opsegu od 47% do 56% uz

mikrotalasnu ekstrakciju i 32% do 51% uz ultrazvučnu ekstrakciju, dok su „prinosi” sa drugim primenjenim ekstragensima bili ispod 30%. Zbog toga su bila neophodna dodatna ispitivanja u cilju povećanja „prinosa” odabranih herbicida iz uzoraka zemljišta, uz primenu drugih jedinjenja.

Poznato je da su sulfoniluree slabo kisela jedinjenja, te tokom ekstrakcije iz zemljišta mogu biti jonizovane u rastvaraču, što utiče na efikasnost njihove ekstrakcije. Stepenn jonizacije odabranih SU zavisi od njihove pK_a vrednosti, tako da kiselost ekstrakcione smeše može značajno uticati na efikasnost ekstrakcije (Kang i sar., 2011). Stoga je u daljem radu ispitan uticaj sirćetne kiseline u smeši dihlormetan-acetonitril (2:1, v/v), variranjem sadržaja sirćetne kiseline u opsegu od 0,3% do 1,0%. Vrednosti testa povrata za odabrane SU sa smešom dihlormetan-acetonitril (2:1, v/v) zakišeljenu sa sirćetnom kiselinom (0,8%, v/v) uz primenu mikrotalasne (Slika 5.15) i ultrazvučne ekstrakcije su se kretale u opsegu od 40% do 67% i 35% do 57%, redom.

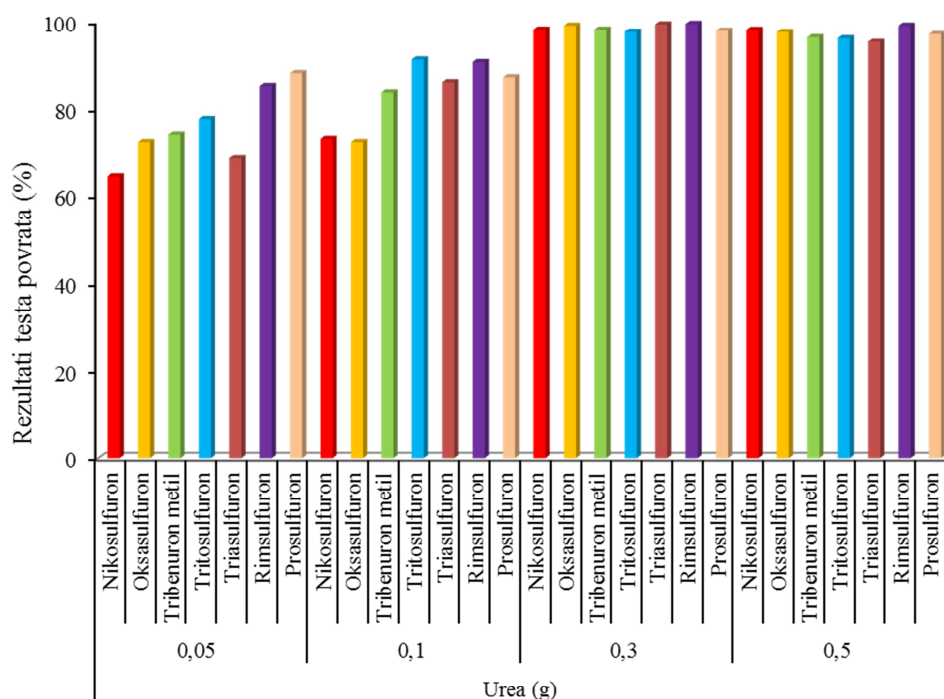


Slika 5.15. Rezultati testa povrata odabranih SU iz zemljišta uz primenu mikrotalasne ekstrakcije korišćenjem smeše dihlormetan-acetonitril (2:1, v/v) zakišeljene sa različitim sadržajem sirćetne kiseline (%)

Najverovatnije je odsustvo vode, koje je uklonjenja iz zemljišta kako bi se smanjila brzina degradacije SU, , pored karakteristika zemljišta, značajno uticalo na jače interakcije (sorpciju) između zemljišta i odabranih herbicida, odnosno otežanu ekstrakciju SU iz uzorka zemljišta (Bos i sar., 1995). Zbog niskih vrednosti testa povrata za odabrane SU usledila su dalja ispitivanja sa ciljem povećanja njihovih ”prinosa” iz uzoraka zemljišta. Istraživanja drugih

autora pokazala su da dodatak uree poboljšava ekstrakciju pojedinih biomolekula iz biljaka (Natarajan i sar., 2009).

U daljem radu je ispitan uticaj dodatka uree na efikasnost mikrotalasne ekstrakcije i ultrazvučne ekstrakcije odabranih SU u smeši dihlormetan-acetonitril (2:1, v/v) zakišeljnom sa sirćetnom kiselinom (0,8%, v/v) (Slika 5.16). Sadržaj uree je variran u opsegu od 0,05 g/10 g zemljišta do 0,5 g/10 g zemljišta. Visoke vrednosti testa povrata su utvrđene u ekstraktima dobijenim sa smešom dihlormetan-acetonitril (2:1, v/v) zakišeljnom sa sirćetnom kiselinom (0,8%, v/v) uz dodatak uree 0,3 g/10 g zemljišta za obe primenjene ekstrakcione tehnike. Visoke vrednosti testa povrata za odabrane SU iz zemljišta ukazuju na pozitivan uticaj dodatka uree i njeno specifično delovanje u smislu slabljenja interakcija između zemljišta i odabranih SU u odsustvu vode. Optimalan sadržaj uree pri kom je postignuta maksimalna efikasnost ekstrakcija analiziranih SU iz zemljišta je iznosio 0,03 g/10 g zemljišta.

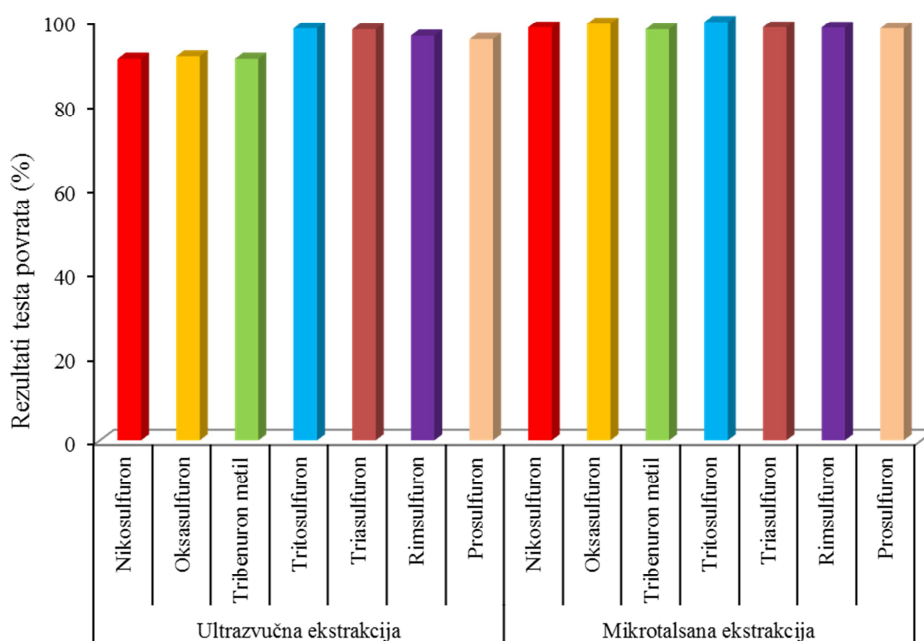


Slika 5.16. Rezultati testa povrata odabranih SU iz zemljišta uz primenu mikrotalasne ekstrakcije korišćenjem smeše dihlormetan-acetonitril (2:1, v/v) zakišeljene sa sirćetnom kiselinom (0,8%, v/v) i različitim sadržajem uree (g/10g zemljišta)

Za sva dalja ispitivanja korišćena je smeša dihlormetan-acetonitril (2:1, v/v) zakišeljena sa sirćetnom kiselinom (0,8%, v/v) uz dodatak uree (0,3 g/10 g zemljišta) koja je izabrana kao optimalna smeša za ekstrakciju odabranih SU iz zemljišta.

Kako bi se eliminisao uticaj rastvarača i doneo zaključak o uticaju ekstrakcione tehnike, izvedeni su eksperimenti korišćenjem istog ekstragensa (smeša dihlormetan-acetonitril (2:1, v/v) zakišljenom sa sirćetnom kiselinom (0,8%, v/v) uz dodatak uree 0,3 g/10 g zemljišta). Dobijeni rezultati (srednja vrednost tri ponavljanja) su prikazani na slici 5.17.

Najveći "prinosi" ekstrahovanih herbicida ostvareni su pomoću mikrotalasne ekstrakcije (97,6-99,4%), dok su neznatno niži "prinosi" ostvareni ultrazvučnom tehnikom (90,6-97,8%). Srednja vrednost standardne devijacije rezultata dobijenih mikrotalasnom ekstrakcijom iznosila je 0,25%, a nakon ultrazvučne ekstrakcije 0,78%. Na osnovu iznetog može se zaključiti da se reproduktivniji rezultati dobijaju primenom mikrotalasne ekstrakcije. Za efikasnu ekstrakciju odabranih SU herbicida iz zemljišta, mikrotalasna ekstrakcija se pokazala efikasnijom sa kraćim vremenom trajanja procesa ekstrakcije što je praktična i ekonomska prednost u odnosu na ultrazvučnu ekstrakciju.

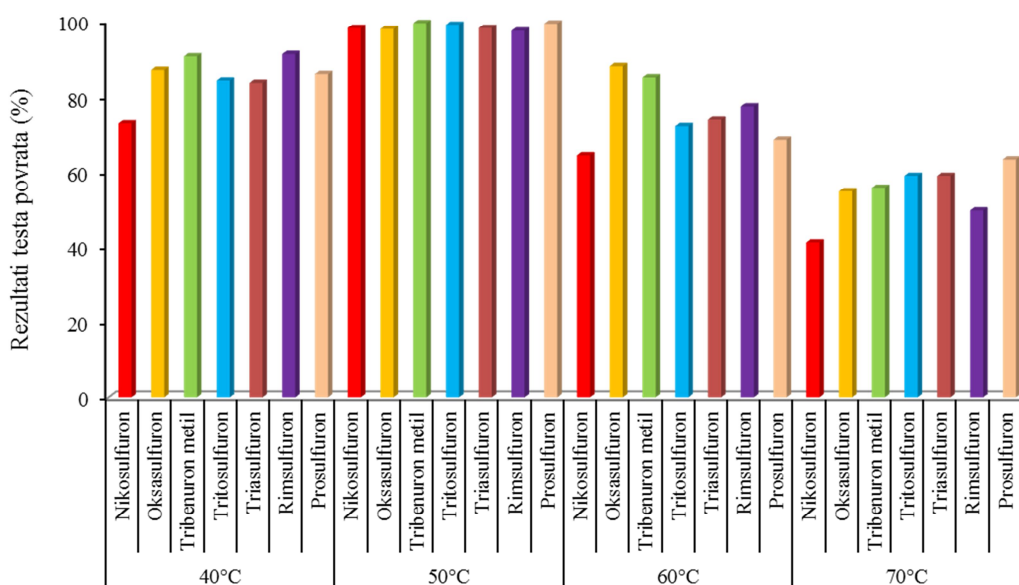


Slika 5.17. Poređenje efikasnosti ekstrakcije primenom optimalne smeše dihlormetan-acetonitril (2:1, v/v) zakišljene sa sirćetnom kiselinom (0,8%, v/v) i sadržajem uree 0,3 g/10 g zemljišta uz ultrazvučnu ekstrakciju (20 minuta na 50°C, 37 kHz, snaga 320 W) i mikrotalasnu ekstrakciju (2 min predzagrevanje na 150 W; 2 min predzagrevanje na 300 W i 10 min ekstrakcija na 450 W)

Za sva dalja ispitivanja odabrana je mikrotalasna ekstrakcija sa smešom dihlormetan-acetonitril (2:1, v/v) zakišljenom sa sirćetnom kiselinom (0,8%, v/v) uz dodatak uree 0,3 g/10 g zemljišta kao ekstragensom.

5.4.1.2. Uticaj temperature ekstrakcije na mikrotalasnu ekstrakciju

Od suštinskog značaja za mikrotalasnu ekstrakciju je izbor odgovarajuće ekstrakcione temperature, zbog mogućnosti temperaturne degradacije termolabilnih SU u mikrotalasnom polju. Uticaj temperature na ekstrakciju odabranih SU iz uzoraka zemljišta ispitan je u opsegu temperatura od 40 do 70°C, korišćenjem smeše dihlormetan-acetonitril (2:1, v/v) zakišeljene sa sirćetnom kiselinom (0,8%, v/v), uz dodatak uree (0,3g/10g zemljišta) kao ekstragenta (Slika 5.18).



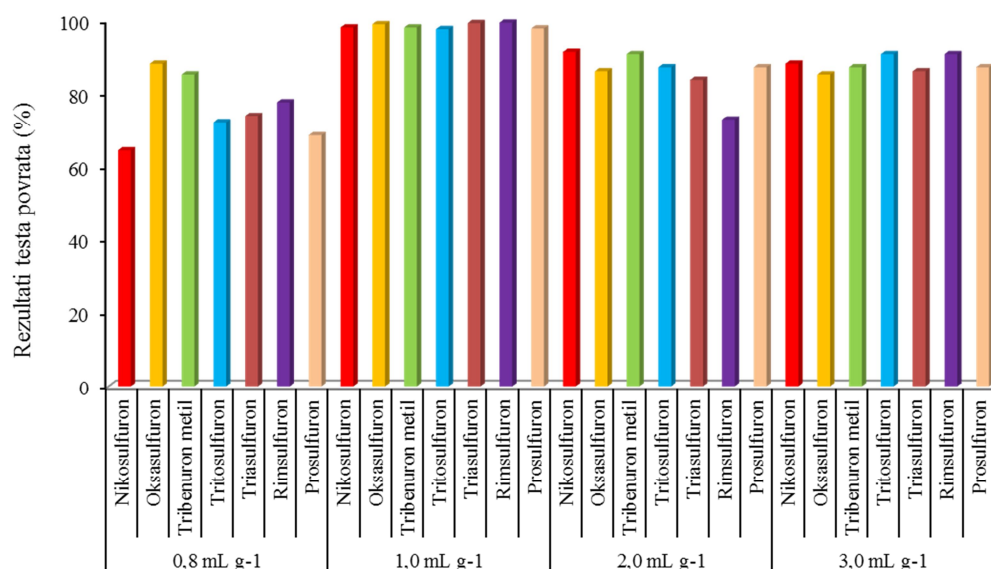
Slika 5.18. Ispitivanje uticaja temperature na mikrotalasnu ekstrakciju odabranih SU iz zemljišta

Najveći „prinosi” odabranih SU (97,4-99,4%) bili su postignuti na temperaturi od 50°C. Ekstrakcione temperature veće ili manje od 50°C su rezultirale smanjenjem vrednosti testa povrata uz istovremeno smanjenje reproduktivnosti određivanja. Ekstrakcione temperature veće od 50°C su verovatno uzrokovale transformacije SU usled efekata lokalnog zagrevanja (Font i sar., 1998, Mitra, 2003). Zbog navedenog, temperatura od 50°C je izabrana kao optimalna temperatura za ekstrakciju odabranih SU iz uzoraka zemljišta.

5.4.1.3. Uticaj odnosa rastvarača i ispitivanog materijala na efikasnost ekstrakcije

Uticaj odnosa rastvarača i količine uzorka zemljišta na „prinos” mikrotalasne ekstrakcije je ispitan u opsegu od 0,8 mL g⁻¹ do 3,0 mL g⁻¹, a dobijeni rezultati testa povrata su prikazani na slici 5.19 (srednja vrednost tri nezavisna ponavljanja).

Rezultati testa povrata odabranih herbicida su varirali od 65,1% do 99,5%. Maksimalni "prinosi" odabranih SU su dobijeni kada je odnos rastvarača i materijala iznosio 1 mL g^{-1} uz dobru reproduktivnost određivanja analiziranih SU (RSD=1,45-2,47%). Povećanje odnosa rastvarača i ispitivanog materijala veće od 1 mL g^{-1} vodilo je smanjenju rezultata testa povrata za odabrane SU iz zemljišta. Moguće objašnjenje može biti povezano sa činjenicom da je tokom ekstrakcije sadržaj odabranih SU iz zemljišta uslovljen ravnotežnim stanjem, odnosno da nakon dostizanja stanja ravnoteže sadržaji odabranih SU iz zemljišta nisu više bili u porastu. Na osnovu toga se može pretpostaviti da se ravnotežno stanje za odabrane SU iz zemljišta postiglo već pri odnosu od 1 mL g^{-1} , kada je sadržaj analiziranih SU dostigao svoj maksimum. Pored toga, manja količina rastvarača neophodnog za ekstrakciju odabranih SU iz zemljišta ima niz praktičnih prednosti, među kojima je i ekonomski aspekt.



Slika 5.19. Uticaj odnosa rastvarača i ispitivanog materijala na efikasnost mikrotalasne ekstrakcije odabranih SU iz zemljišta

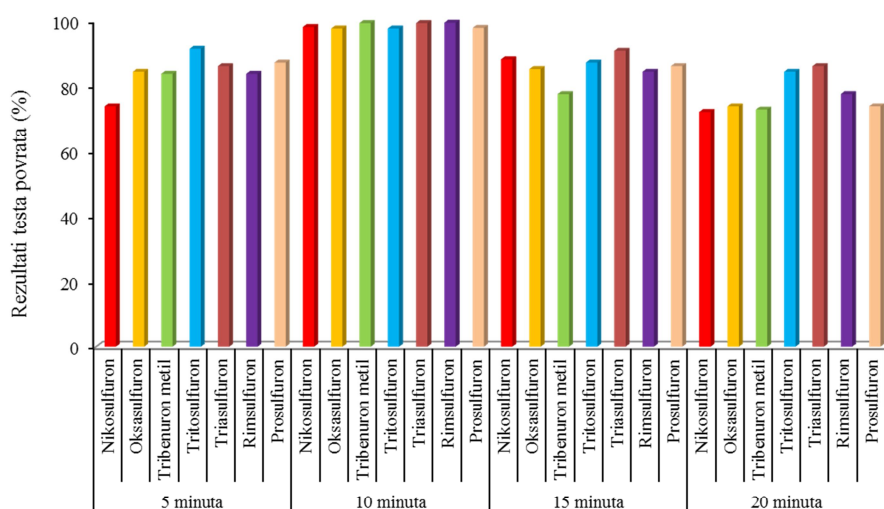
Stoga je odnos rastvarača i materijala od 1 mL g^{-1} usvojen kao optimalan odnos za ekstrakciju analiziranih SU iz uzoraka zemljišta.

5.4.1.4. Uticaj vremena na efikasnost mikrotalasne ekstrakcije

Trajanje mikrotalasne ekstrakcije je još jedan bitan faktor koji se mora pažljivo ispitati. Sa dužim vremenom trajanja ekstrakcije termolabilnih SU herbicida iz zemljišta povećava se rizik od njihove degradacije. Takođe, kraće trajanje procesa ekstrakcije ima niz praktičnih prednosti, među kojima je najznačajniji ekonomski aspekt.

Uticaj vremena na efikasnost mikrotalasne ekstrakcije je ispitivana u opsegu od 5 do 20 minuta. Na slici 5.20 je prikazana efikasnost mikrotalasne ekstrakcije odabranih SU iz zemljišta u zavisnosti od vremena trajanja ekstrakcije.

Rezultati testa povrata za posmatrane SU iz zemljišta su bili u porastu tokom 10 minuta trajanja ekstrakcije (74,53% do 99,76%), nakon čega je dolazilo do pada "prinos" analiziranih SU u dobijenim ekstraktima. Moguće objašnjenje je degradacija termolabilnih herbicida. Maksimalan "prinos" analiziranih SU (98,1-99,4%) je zabeležen pri ekstrakciji u trajanju od 10 minuta, a reproduktivnost određivanja je bila dobra za sve analizirane SU (RSD = 0,67-5,14%).



Slika 5.20. Uticaj vremena mikrotalasne ekstrakcije na "prinos" odabranih SU iz zemljišta

Na osnovu dobijenih rezultata testa povrata, vreme od 10 minuta je usvojeno kao optimalno vreme trajanja mikrotalasne ekstrakcije.

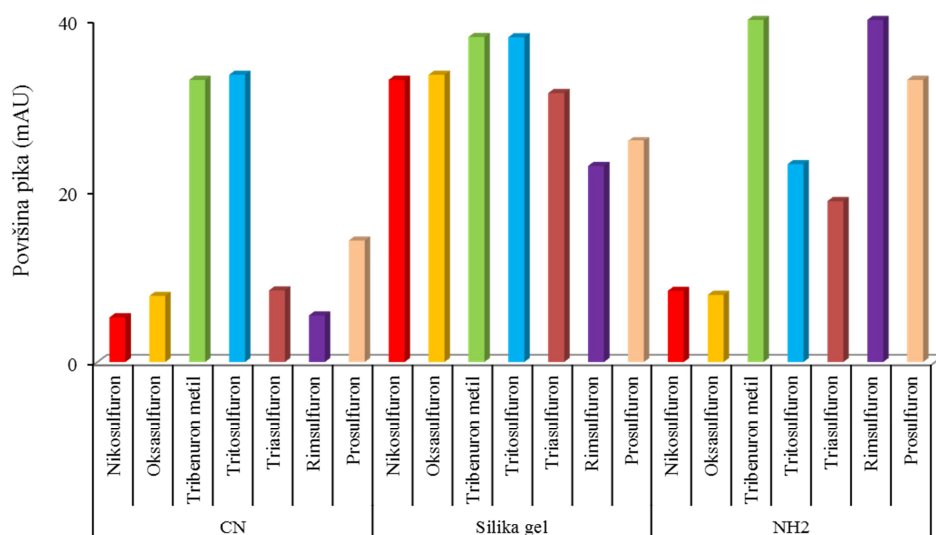
U tabeli 5.11 su prikazani definisani parametri pri kojima se ostvaruje maksimalna efikasnost mikrotalasne ekstrakcije odabranih SU iz zemljišta.

Tabela 5.11. Usvojeni uslovi mikrotalane ekstrakcije odabranih SU iz zemljišta

Ispitivani parametri	Optimalni uslovi
Smeša rastvarača i dodatak modifikatora	dihlormetan-acetonitril (2:1, v/v) zakišeljjen sa sirćetnom kiselinom (0,8%, v/v) uz dodatak uree (0,3 g/10g zemljišta)
Temperatura	50°C
Odnos rastvarača i mase zemljišta	1 mL g ⁻¹
Vreme trajanja ekstrakcije	10 min

5.4.2. Ispitivanje mogućnosti primene ekstrakcije na čvrstoj fazi (SPE) u cilju prečišćavanja ekstrakata zemljišta

Optimizacija ekstrakcije na čvrstoj fazi je obuhvatila ispitivanje i poređenje efikasnosti prečišćavanja odabranih SU iz zemljišta sa dodatkom standardnog rastvora smeše SU, primenom SPE kolona sa različitim stacionarnim fazama i različitim smešama rastvarača za eluiranje odabranih SU (Tabela 4.4). Hromatografskom analizom dobijenih eluata upoređena je efikasnost prečišćavanja (SPE) u zavisnosti od uticaja interferirajućih supstanci prisutnih u ekstraktu zemljišta, i izračunate su vrednosti testa povrata za odabrane SU. Vrednosti testa povrata računane su kao odnos dobijenog sadržaja odabrane SU nakon prečišćavanja i dodate količine odabrane SU u ekstrakt zemljišta. U cilju definisanja uticaja stacionarne faze na prečišćavanje odabranih SU iz ekstrakata zemljišta, ispitane su stacionarne faze koje karakterišu polarne interakcije (vodonične veze, pi-pi interakcije, dipol-dipol interakcije i indukovani dipol-dipol interakcije), kao što su silika gel, NH₂ i CN stacionarna faza (Molins i sar., 1998; Soloneski & Larramendy, 2011). Rezultati uticaja interferirajućih supstanci iz prečišćenih ekstrakata zemljišta na odgovor analitičkog signala odabranih SU prikazani su na slici 5.21.

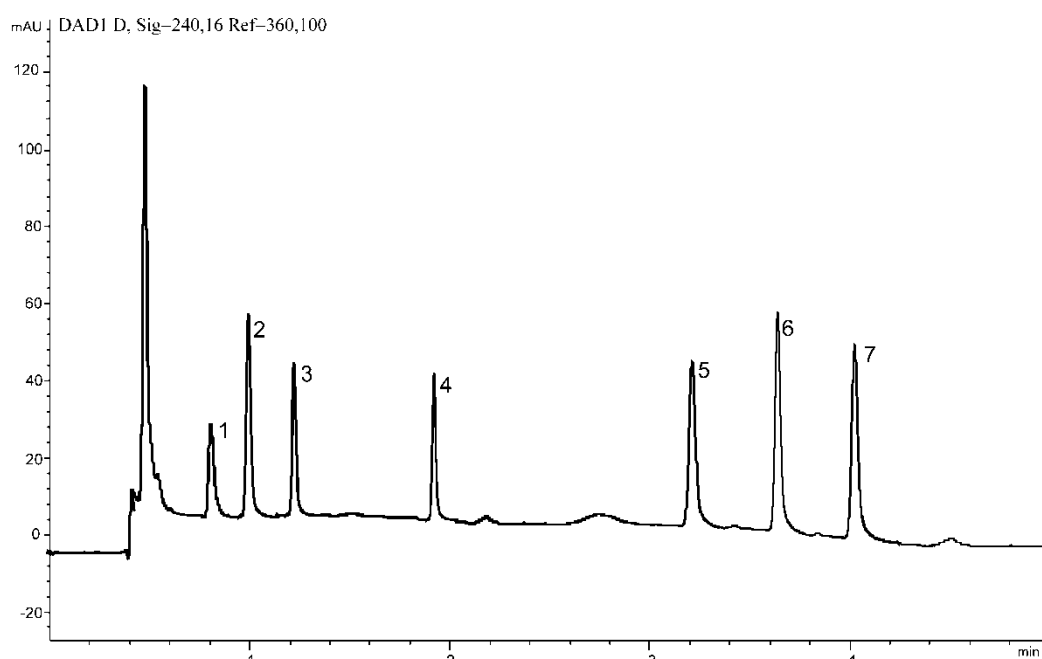


Slika 5.21. Uticaj različitih SPE stacionarnih faza pri prečišćavanju odabranih SU iz ekstrakata zemljišta na osnovu njihove površine pika posle primene n-heksana (1 mL) za eluiranje nečistoća i eluiranje SU sa smešom dihlormetan:acetona (7,5:2,5 v/v), 3 mL

Dobijeni rezultati (predstavljeni kao srednja vrednost tri nezavisna ponavljanja) pokazali su da se nikosulfuron i oksasulfuron jače adsorbuju na NH₂ stacionarnoj fazi, a triasulfuron i rimsulfuron na CN stacionarnoj fazi, te su njihove vrednosti testa povrata u tom slučaju bile

niže (<80%). U slučaju primene NH_2 stacionarne faze za prečišćavanje test povrata za tribenuron metil i rimsulfuron je bio veći od 110% što ukazuje na značajan uticaj interferirajućih supstanci iz ekstrakata zemljišta.

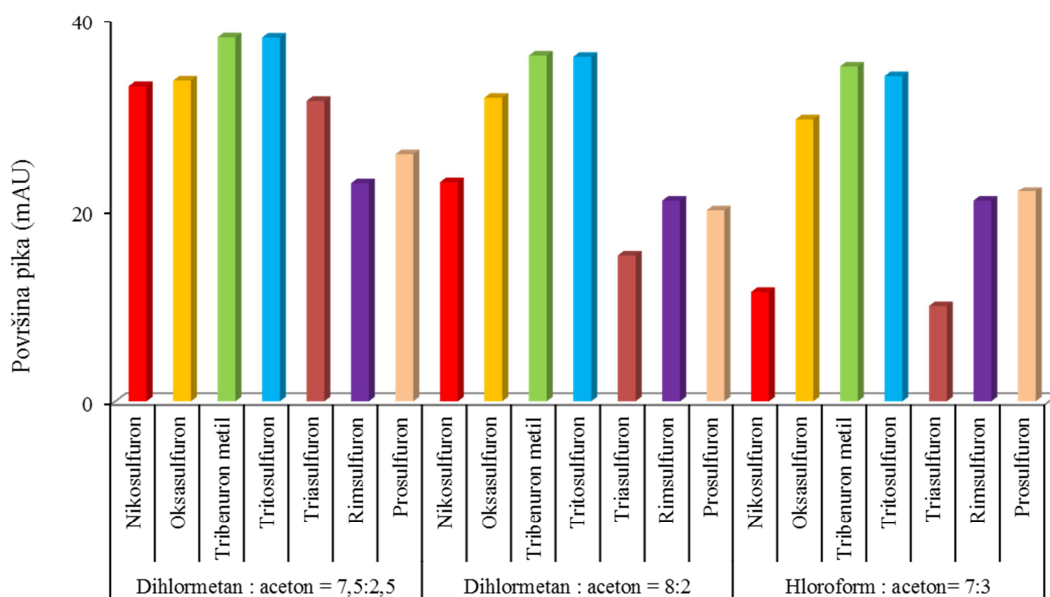
Maksimalni "prinosi" odabranih SU su dobijeni u slučaju primene silika gel stacionarne faze za prečišćavanje ekstrakata zemljišta (91,04-96,11%) uz njihovu dobru reproduktivnost određivanja (RSD=3,17-5,08%). Na slici 5.22 je prikazan hromatogram odabranih SU u dobijenom eluatu nakon prečišćavanja obogaćenog ekstrakta zemljišta, korišćenjem silika gel SPE stacionarne faze za prečišćavanje uz eluiranje nečistoća sa n-heksanom i eluiranje odabranih SU smešom rastvarača dihlormetan:acetone (7,5:2,5, v/v). Kao što se može videti sa slike 5.22 dobijeni su oštri pikovi odabranih SU.



Slika 5.22. Hromatogram odabranih SU u dobijenom eluatu nakon prečišćavanja obogaćenog ekstrakta zemljišta, korišćenjem silika gel SPE stacionarne faze za prečišćavanje uz eluiranje nečistoća sa n-heksanom i eluiranje odabranih SU smešom rastvarača dihlormetan:acetone (7,5:2,5, v/v). (1-Nikosulfuron (0,79 min); 2-Okasulfuron (1,03 min); 3-Rimsulfuron (1,26 min); 4-Triasulfuron (1,97 min); 5-Tribenuron metil (3,24 min); 6-Tritosulfuron (3,73 min) i 7-Prosulfuron (4,14 min).

U cilju definisanja uticaja rastvarača za eluiranje odabranih SU sa silika gel stacionarne faze ispitane su različite smeše rastvarača (dihlormetan, acetone, metanol i hloroform) u različitim odnosima (Tabela 4.4). Primenjene smeše dihlormetan:acetone (7,5:2,5 i 8:2, v/v) i hloroform:acetone (7:3, v/v) su bile najznačajnije za eluiranje odabranih SU na osnovu dobijenih odgovora analitičkog signala (Slika 5.23). Vrednosti analitičkog signala za nikosulfuron i triasulfuron su bile znatno manje od očekivanih u slučaju primene smeše dihlormetan:acetone (8:2, v/v) i hloroform:acetone (7:3, v/v) za eluiranje sa silika gel

stacionarne faze. Kao što se može videti na slici 5.23 najveće vrednosti analitičkog signala za odabrane SU dobijne su elucijom sa smešom rastvarača dihlormetan:aceton (7,5:2,5, v/v).



Slika 5.23. Efekat različitih sredstava za eluiranje na površinu pika odabranih SU

Rezultati testa povrata odabranih sulfonilurea uz primenu silika gel stacionarne faze nakon nanošenja ekstrakta zemljišta u dihlormetanu (1 ml), eluiranja nečistoća sa *n*-heksanom (1 ml) i eluiranja SU su se kretali od 94,4% do 98,9% uz dobru reproduktivnost određivanja (RSD=2,87-5,47%). Zbog činjenice da je bilo od posebnog značaja postići dobre rezultate testa povrata uz odgovarajuću reproduktivnost za sve analizirane SU, odnos rastvarača dihlormetan:aceton=7,5:2,5 (v/v) je odabran kao optimalan za eluiranje odabranih SU sa silika gel stacionarne faze.

U cilju ispitivanja kapaciteta silika gel stacionarne faze u prečišćavanju ekstrakata zemljišta primenjene su zapremine od 0,5 mL do 2 mL obogaćenih ekstrakata zemljišta sa odabranim SU ($c_{\text{odabranih SU}} = 0,8 \text{ mg L}^{-1}$). Zapremine od 0,5 mL do 1 mL nisu značajno uticale na efikasnost prečišćavanja. Utvrđeno je da je rezolucija pri hromatografskom razdvajanju bila značajno lošija kada su nanošene zapremine veće od 1,5 mL. Uzimajući u obzir sastav uzoraka zemljišta i zahteve pouzdanog prečišćavanja ekstrakcijom na čvrstoj fazi, može se smatrati da je za primenjene koncentracije odabranih SU, zapremina uzorka od 1,2 mL bila granična za ovaj tip analiziranog matriksa zemljišta.

Na osnovu rezultata izvedenih ispitivanja usvojen je postupak prečišćavanja ekstrakata zemljišta primenom silika gel SPE kolone, koji je obuhvatio: kondicioniranje kolone sa 1 mL *n*-heksana, nanošenje 1 mL prethodno pripremljenog dihlormetanskog ekstrakta zemljišta, ukljanjanje interferirajućih supstanci sa 1 mL *n*-heksana i eluiranje odabranih SU sa smešom rastvarača dihlormetan-aceton (7,5:2,5,v/v). Eluat sa odabranim SU je uparen, a suvi ostatak je rastvoren u acetonitrilu za potrebe hromatografskog određivanja odabranih SU.

Za potvrdu ispravnosti usvojenog postupka prečišćavanja ekstrakata zemljišta na prethodno kondicioniranu silika gel SPE kolonu je naneta model smeša sa poznatim sadržajem odabranih SU (1 µg, 2 µg i 3 µg). Nakon opisanog načina prečišćavanja, prikupljen eluat je uparen, a suvi ostatak rastvoren u acetonitrilu. Sadržaj odabranih SU je određen primenom HPLC-UV-DAD metode pri prethodno definisanim optimalnim uslovima. Ispitivanja su izvedena u tri ponavljanja, a vrednosti testa povrata su izračunate na opisan način (izraz (24), strana 89).

Srednje vrednosti testa povrata za nikosulfuron, oksasulfuron, triasulfuron, tribenuron-metil, tritosulfuron, rimsulfuron i prosulfuron su bile 98,14%, 99,44%, 97,28%, 94,78%, 96,47%, 95,50% i 97,87%, redom. Veoma dobre vrednosti testa povrata su potvrdile ispravnost definisanog postupka prečišćavanja ekstrakata zemljišta, uz zadovoljavajuću reproduktivnost rezultata (RSD=4,70-6,18%).

5.5. Određivanje sadržaja ispitivanih SU u prethodno tretiranom zemljištu sa odgovarajućim formulacijama herbicida

Nakon što su definisani odgovarajući uslovi za određivanje sulfonilurea primenom HPLC-UV-DAD u uzorcima zemljišta, uz prethodno razvijen postupak pripreme uzoraka, određeni su sadržaji četiri SU (nikosulfuron, rimsulfuron, oksasulfuron i prosulfuron) koje se najčešće nalaze i primenjuju u komercijalnim formulacijama pesticida na našim prostorima. Raspoloživi uslovi za poljski ogled, omogućili su praćenje sadržaja ispitivanih SU za zasade soje (okasulfuron) i kukuruza (nikosulfurona, rimsulfurona i prosulfurona). Uzorci zemljišta su bili uzorkovani u određenim vremenskim razmacima od momenta tretiranja useva komercijalnim formulacijama. Sadržaji SU koji su određeni u uzorcima zemljišta, u okviru laboratorijskog ogleda (25⁰C i 30⁰C) su prikazani u tabelama 5.12 i 5.13, dok su rezultati ogleda izvedenih u polju (pri realnim uslovima) dati u tabelama 5.14 i 5.15. Na osnovu dobijenih rezultata definisana je disperzija, odnosno procena rasipanja ispitivanih SU.

Ispravnost definisane HPLC-UV-DAD metode je proverena i potvrđena, paralelnim analizama odabranih uzoraka zemljišta tečnom hromatografijom sa tandemskim masenim detektorom (HPLC-MS-MS) (Tabela 5.16).

Ogled u laboratoriji je izveden na dve kontrolisane temperature (25°C i 30°C), za različite doze SU, koje su primenjene i u poljskom ogledu. Uzorci zemljišta su uzorkovani nakon 2 h, a zatim nakon 2, 6, 15, 30 i 50 dana posle primene komercijalnih formulacija SU. Sadržaji ispitivanih SU određeni su metodom kalibracione krive (MMC). Na odabranim uzorcima zemljišta, primenjen je test povrata u cilju utvrđivanja tačnosti definisane metode, kao i ispravnosti postupaka pripreme uzoraka.

Sadržaji ispitivanih SU koji su određeni u uzorcima zemljišta u okviru laboratorijskog ogleda za ispitivani period od 50 dana, pri kontrolisanoj temperaturi od 25°C kretali su se od $797,69 \mu\text{g kg}^{-1}$ (0 dan; 100 g ha^{-1} a.k.) do $5,24 \mu\text{g kg}^{-1}$ (30 dan; 80 g ha^{-1} a.k.) za nikosulfuron, zatim za rimsulfuron od $49,02 \mu\text{g kg}^{-1}$ (0 dan; 100 g ha^{-1} a.k.) do $4,12 \mu\text{g kg}^{-1}$ (2 dan; 80 g ha^{-1} a.k.), oksasulfuron od $301,47 \mu\text{g kg}^{-1}$ (0 dan; 160 g ha^{-1} a.k.) do $7,65 \mu\text{g kg}^{-1}$ (6 dan; 160 g ha^{-1} a.k.) i prosulfuron od $274,66 \mu\text{g kg}^{-1}$ (0 dan; 50 g ha^{-1} a.k.) do $4,65 \mu\text{g kg}^{-1}$ (6 dan; 30 g ha^{-1} a.k.) (Tabela 5.12). Relativne standardne devijacije pri određivanju nikosulfurona, rimsulfurona, oksasulfurona i prosulfurona bile su u opsegu od 1,02-5,47%, 2,89-4,74%, 3,74-8,08% i 1,32-3,22%, redom. Vrednosti testa povrata za nikosulfuron, rimsulfuron, oksasulfuron i prosulfuron bile su u opsegu od 90,47-97,26%, 94,32-96,04%, 89,41-94,11%, 90,44-94,16%, redom, čime je potvrđena ispravnost definisane metode.

Tabela 5.12. Rezultati određivanja ispitivanih SU ($\mu\text{g kg}^{-1}$) u zemljištu HPLC-UV-DAD tehnikom pri laboratorijskom ogledu na temperaturi od 25°C (70% PVC)

Ispitivana SU	a.k.(g ha ⁻¹) ^a	Sadržaj ispitivanih SU ($\mu\text{g kg}^{-1}$) \pm RSD					
		0 dan (2h)	2 dan	6 dan	15 dan	30 dan	50 dan
Nikosulfuron	40	389,84 \pm 5,47	49,25 \pm 1,09	25,27 \pm 2,18	7,25 \pm 3,04	< LOQ ^d	< LOQ
	50^b	595,18 \pm 3,24 (91,12) ^c	68,25 \pm 1,02 (92,85)	35,25 \pm 3,54 (96,34)	18,25 \pm 4,03 (97,26)	< LOQ	< LOQ
	80	649,02 \pm 4,87	87,21 \pm 2,11	51,74 \pm 3,47	21,02 \pm 4,05	5,24 \pm 1,08	< LOQ
	100	797,69 \pm 3,94 (90,47)	91,32 \pm 2,89 (96,25)	64,32 \pm 1,24 (96,14)	29,14 \pm 2,44 (96,34)	8,24 \pm 1,32 (95,32)	< LOQ
Rimsulfuron	40	16,41 \pm 2,47	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	50	21,25 \pm 4,25 (96,04)	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	80	43,51 \pm 3,23	4,12 \pm 2,89	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	100	49,02 \pm 4,74 (94,32)	6,47 \pm 4,58 (94,63)	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Oksasulfuron	60	94,47 \pm 7,65	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	80	104,65 \pm 3,84 (90,66)	27,84 \pm 3,74 (94,11)	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	100	198,65 \pm 7,87	31,25 \pm 4,11	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	160	301,47 \pm 8,08 (92,14)	43,25 \pm 4,11 (93,11)	7,65 \pm 6,03 (89,41)	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Prosulfuron	10	79,14 \pm 2,54	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	20	97,65 \pm 3,22 (92,33)	13,74 \pm 2,11 (94,16)	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	30	201,37 \pm 3,11	24,65 \pm 2,44	4,65 \pm 1,32	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	50	274,66 \pm 3,05 (90,44)	43,76 \pm 2,66 (90,65)	9,74 \pm 1,89 (89,65)	< LOQ	< LOQ	< LOQ

^aDoza primene ispitivanog herbicida; ^bBold-komercijalna preporučena doza primene; ^cVrednost testa povrata u procentima (n=3); ^dLOQ granica kvantifikacije ispitivane SU.

Tabela 5.13. Rezultati određivanja ispitivanih SU ($\mu\text{g kg}^{-1}$) u zemljištu HPLC-UV-DAD tehnikom pri laboratorijskom ogledu na temperaturi od 30°C (70% PVC)

Ispitivana SU	a.k.(g ha ⁻¹) ^a	Sadržaj ispitivanih SU ($\mu\text{g kg}^{-1}$) \pm RSD					
		0 dan (2h)	2 dan	6 dan	15 dan	30 dan	50 dan
Nikosulfuron	40	304,12 \pm 6,06	31,25 \pm 2,08	14,23 \pm 2,77	< LOQ ^d	< LOQ	< LOQ
	50^b	547,32 \pm 3,12 (94,19) ^c	49,14 \pm 3,11 (94,15)	24,32 \pm 4,21 (95,14)	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	80	628,47 \pm 7,02	64,21 \pm 2,87	38,35 \pm 5,11	4,18 \pm 2,11	< LOQ	< LOQ
	100	695,23 \pm 5,41 (94,74)	68,54 \pm 6,47 (97,15)	42,98 \pm 2,34 (95,22)	7,32 \pm 2,67 (94,12)	< LOQ	< LOQ
Rimsulfuron	40	12,11 \pm 2,11	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	50	16,65 \pm 4,11 (92,11)	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	80	35,25 \pm 3,87	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	100	41,54 \pm 5,11 (91,02)	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Oksasulfuron	60	81,65 \pm 6,54	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	80	94,88 \pm 4,11 (91,21)	14,54 \pm 5,11 (92,06)	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	100	165,87 \pm 6,98	25,65 \pm 5,65	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	160	287,65 \pm 6,77 (90,09)	32,69 \pm 5,65 (90,08)	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Prosulfuron	10	71,65 \pm 3,25	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	20	88,69 \pm 3,05 (91,39)	9,21 \pm 2,15 (94,01)	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	30	196,32 \pm 2,44	16,43 \pm 2,47	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	50	256,88 \pm 2,11 (92,66)	21,87 \pm 2,02 (89,41)	3,78 \pm 0,89 (93,54)	< LOQ	< LOQ	< LOQ

^a Doza primene ispitivanog herbicida; ^bBold- komercijalna preporučena doza primene; ^cVrednost testa povrata u procentima (n=3); ^dLOQ granica kvantifikacije ispitivane SU..

Rezultati određivanja sadržaja ispitivanih SU određeni u uzorcima zemljišta u okviru laboratorijskog ogleada pri kontrolisanoj temperaturi od 30°C kretali su se od $695,23 \mu\text{g kg}^{-1}$ (0 dan; 100 g ha^{-1} a.k.) do $4,18 \mu\text{g kg}^{-1}$ (15 dan; 80 g ha^{-1} a.k.) za nikosulfuron, zatim za rimsulfuron od $41,54 \mu\text{g kg}^{-1}$ (0 dan; 100 g ha^{-1} a.k.) do $12,11 \mu\text{g kg}^{-1}$ (0 dan; 40 g ha^{-1} a.k.), oksasulfuron od $287,65 \mu\text{g kg}^{-1}$ (0 dan; 160 g ha^{-1} a.k.) do $14,54 \mu\text{g kg}^{-1}$ (2 dan; 80 g ha^{-1} a.k.) i prosulfuron od $256,88 \mu\text{g kg}^{-1}$ (0 dan; 50 g ha^{-1} a.k.) do $3,78 \mu\text{g kg}^{-1}$ (6 dan; 50 g ha^{-1} a.k.) (Tabela 5.13). Reproductivnost određivanja je bila zadovoljavajuća ($\text{RSD}_{\text{nikosulfuron}}=2,08-7,02\%$, $\text{RSD}_{\text{rimsulfuron}}=2,11-5,11\%$, $\text{RSD}_{\text{oksasulfuron}}=4,11-6,77\%$, $\text{RSD}_{\text{prosulfuron}}=0,89-3,25\%$). Vrednosti testa povrata za nikosulfuron, rimsulfuron, oksasulfuron i prosulfuron su se kretale u intervalu od $94,12-97,15\%$, $91,02-92,11\%$, $90,08-92,06\%$ i $89,41-93,51\%$, redom, čime je potvrđena ispravnost definisane metode.

U tabelama 5.14 i 5.15 prikazane su srednje vrednosti određenih sadržaja ispitivanih SU ($n=3$), u polju na dubinama **0-15 cm** (0-15 dana), **15-30 cm** (15. i 30. dan) i **30-45 cm** (30. i 50. dan), kao i reproductivnost određivanja i srednje vrednosti testa povrata ($n=3$).

Sadržaji ispitivanih SU koji su određeni u uzorcima zemljišta uzorkovanim u polju pri realnim uslovima na dubini uzorkovanja od **0-15 cm** kretali su se za nikosulfuron od $703,47 \mu\text{g kg}^{-1}$ (0 dan; 100 g ha^{-1} a.k.) do $4,82 \mu\text{g kg}^{-1}$ (6 dan; 40 g ha^{-1} a.k.), zatim za rimsulfuron od $33,59 \mu\text{g kg}^{-1}$ (0 dan; 100 g ha^{-1} a.k.) do $3,32 \mu\text{g kg}^{-1}$ (2 dan; 50 g ha^{-1} a.k.), oksasulfuron od $273,18 \mu\text{g kg}^{-1}$ (0 dan; 160 g ha^{-1} a.k.) do $3,65 \mu\text{g kg}^{-1}$ (2 dan; 80 g ha^{-1} a.k.) i prosulfuron od $248,81 \mu\text{g kg}^{-1}$ (0 dan; 50 g ha^{-1} a.k.) do $4,15 \mu\text{g kg}^{-1}$ (6 dan; 30 g ha^{-1} a.k.) (Tabela 5.14). Relativne standardne devijacije izvedenih analiza koje su se kretale u intervalima od $0,17-7,15\%$, $2,16-4,32\%$, $1,57-6,41\%$, i $1,25-4,08\%$ za nikosulfuron, rimsulfuron, oksasulfuron i prosulfuron, redom, ukazuju na dobru reproductivnost definisane HPLC-UV-DAD metode. Vrednosti testa povrata su se za nikosulfuron, rimsulfuron, oksasulfuron i prosulfuron kretale u opsegu od $95,05-103,10\%$, $96,54-98,24\%$, $91,65-96,74\%$ i $89,65-97,33\%$, redom. Dobijeni rezultati testa povrata potvrđuju ispravnost primenjenog postupaka pripreme uzoraka zemljišta kao i tačnost definisane hromatografske metode sa UV-DAD detekcijom.

Određeni sadržaji ispitivanih SU, u analiziranim uzorcima zemljišta na dubini od **15-30 cm** iznosili su za nikosulfuron od $30,12 \mu\text{g kg}^{-1}$ (15 dan; 100 g ha^{-1} a.k.) do $7,82 \mu\text{g kg}^{-1}$ (30 dan; 100 g ha^{-1} a.k.) i prosulfuron od $16,80 \mu\text{g kg}^{-1}$ (15 dan; 50 g ha^{-1} a.k.) do $8,90 \mu\text{g kg}^{-1}$ (15 dan; 30 g ha^{-1} a.k.) (Tabela 5.15). Primenom razvijene metode, nisu detektovani rimsulfuron i oksasulfuron. Reproductivnost određivanja je bila veoma dobra, i za nikosulfuron se kretala u opsegu od $0,14-1,17\%$ (RSD), a za prosulfuron od $2,06-3,22\%$ (RSD). Rezultati testa povrata i u ovom slučaju su potvrdili tačnost definisane metode (Tabela 5.15).

Tabela 5.14. Sadržaji ispitivanih SU ($\mu\text{g kg}^{-1}$) u zemljištu određeni tehnikom HPLC-UV-DAD u okviru poljskog ogleda, za dubinu uzorkovanja 0-15 cm i vreme uzorkovanja do 15 dana.

Ispitivana SU	a.k.(g ha ⁻¹) ^a	Sadržaj ispitivanih SU ($\mu\text{g kg}^{-1}$) \pm RSD			
		0 dan (2h)	2 dan	6 dan	15 dan
Nikosulfuron	40	333,13 \pm 7,15	6,31 \pm 0,85	4,82 \pm 0,27	< LOQ ^d
	50^b	427,42 \pm 4,47 (103,10) ^c	8,92 \pm 0,77 (101,58)	5,20 \pm 0,17 (95,05)	< LOQ
	80	620,27 \pm 2,82	41,92 \pm 0,90	8,92 \pm 0,58	< LOQ
	100	703,47 \pm 4,73 (95,23)	51,06 \pm 1,21 (97,65)	15,72 \pm 1,12 (98,19)	< LOQ
Rimsulfuron	40	10,16 \pm 2,16	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	50	13,67 \pm 2,96 (98,24)	3,32 \pm 4,06 (97,11)	< LOQ	< LOQ
	80	17,43 \pm 3,71	5,80 \pm 2,69	< LOQ	< LOQ
	100	33,59 \pm 4,32 (96,54)	7,13 \pm 3,17 (96,88)	< LOQ	< LOQ
Oksasulfuron	60	86,40 \pm 6,41	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	80	97,74 \pm 3,84 (96,74)	3,65 \pm 1,92 (96,13)	< LOQ	< LOQ
	100	161,58 \pm 6,05	4,71 \pm 1,57	< LOQ	< LOQ
	160	273,18 \pm 3,38 (94,12)	15,27 \pm 2,16 (91,65)	6,73 \pm 2,17 (92,87)	< LOQ
Prosulfuron	10	68,41 \pm 1,33	4,24 \pm 1,89	< LOQ	< LOQ
	20	84,02 \pm 2,79 (89,65)	5,46 \pm 2,04 (93,57)	4,29 \pm 3,54 (97,33)	< LOQ
	30	176,84 \pm 2,70	12,58 \pm 5,14	4,15 \pm 1,25	< LOQ
	50	248,81 \pm 3,32 (97,54)	16,15 \pm 4,08 (96,12)	5,25 \pm 2,11 (94,55)	< LOQ

^a Doza primene ispitivanog herbicida; ^b Bold- komercijalna preporučena doza primene; ^c Vrednost testa povrata u procentima (n=3); ^d LOQ granica kvantifikacije ispitivane SU.

Tabela 5.15. Sadržaji ispitivanih SU ($\mu\text{g kg}^{-1}$) u zemljištu određeni tehnikom HPLC-UV-DAD u okviru poljskog ogleda, za dubinu uzorkovanja 15-30 cm (do 30 dana) i 30-45 cm (do 50 dana).

Ispitivana SU	a.k.(g ha ⁻¹) ^a	Sadržaj ispitivane SU ($\mu\text{g kg}^{-1}$) \pm RSD			
		15 dan	30 dan	30 dan	50 dan
		15-30 cm		30-45 cm	
Nikosulfuron	40	8,96 \pm 0,47	< LOQ ^d	< LOQ	< LOQ
	50^b	9,67 \pm 0,13 (99,11) ^c	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	80	19,03 \pm 0,14	< LOQ	3,36 \pm 1,08	< LOQ
	100	30,12 \pm 0,12 (92,28)	7,82 \pm 1,17 (91,13)	9,08 \pm 1,36 (94,12)	< LOQ
Rimsulfuron	40	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	50	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	80	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	100	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Oksasulfuron	60	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	80	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	100	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	160	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Prosulfuron	10	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	20	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	30	8,90 \pm 2,06 (93,17)	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	50	16,80 \pm 3,22 (91,22)	< LOQ	< LOQ	< LOQ

^a Doza primene ispitivanog herbicida; ^b Bold- komercijalna preporučena doza primene; ^c Vrednost testa povrata u procentima (n=3); ^d LOQ granica kvantifikacije ispitivane SU.

Na dubini od **30-45 cm** određen je sadržaj samo nikosulfurona koji se kretao od 9,08 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (30 dan; 100 g ha^{-1} a.k.) do 3,36 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (30 dan; 80 g ha^{-1} a.k.) (Tabela 5.15). Reproductivnost analiza kretala se od 1,08% do 1,36% (RSD). Test povrata i pri ovim analizama potvrdio je tačnost i ispravnost definisane metode (Tabela 5.15).

U cilju definisanja tačnosti HPLC-UV-DAD metode izvedena je i paralelna analiza uzoraka primenom HPLC-MS-MS, a dobijeni rezultati su dati u tabeli 5.16.

Tabela 5.16. Sadržaji ispitivanih SU ($\mu\text{g kg}^{-1}$) u zemljištu određeni tehnikom HPLC-MS-MS u okviru poljskog ogleada za različite dane i različite dubine uzorkovanja zemljišta

Ispitivana SU	a.k.(g ha^{-1}) ^a	Sadržaj ispitivane SU ($\mu\text{g kg}^{-1}$)							
		0 dan	2 dan	6 dan	15 dan	15 dan	30 dan	30 dan	50 dan
		0-15 cm				15-30 cm		30-45 cm	
Nikosulfuron	50^b	431,84	9,12	5,34	1,37	9,80	< LOQ ^c	1,85	< LOQ
	80	622,04	42,01	9,02	2,60	20,09	1,08	3,97	0,84
	100	704,21	51,76	15,91	3,22	31,57	8,64	9,12	0,43
Rimsulfuron	50	14,21	4,56	0,35	< LOQ	0,41	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	80	30,20	6,05	1,24	< LOQ	1,10	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	100	35,64	8,17	1,89	< LOQ	4,94	1,94	< LOQ	< LOQ
Oksasulfuron	80	105,35	4,01	2,54	0,97	0,45	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	100	169,82	4,92	1,06	0,82	0,77	0,16	< LOQ	< LOQ
	160	286,42	16,58	7,01	1,64	1,92	0,98	0,27	< LOQ
Prosulfuron	20	77,83	5,77	4,29	3,39	2,76	1,49	0,37	< LOQ
	30	183,05	13,96	5,00	4,15	9,04	1,54	1,38	< LOQ
	50	259,96	14,05	5,75	5,13	17,16	2,42	1,87	0,24

^a Doza primene ispitivanog herbicida; ^b Bold- komercijalna preporučena doza primene; ^c LOQ granica kvantifikacije ispitivane SU.

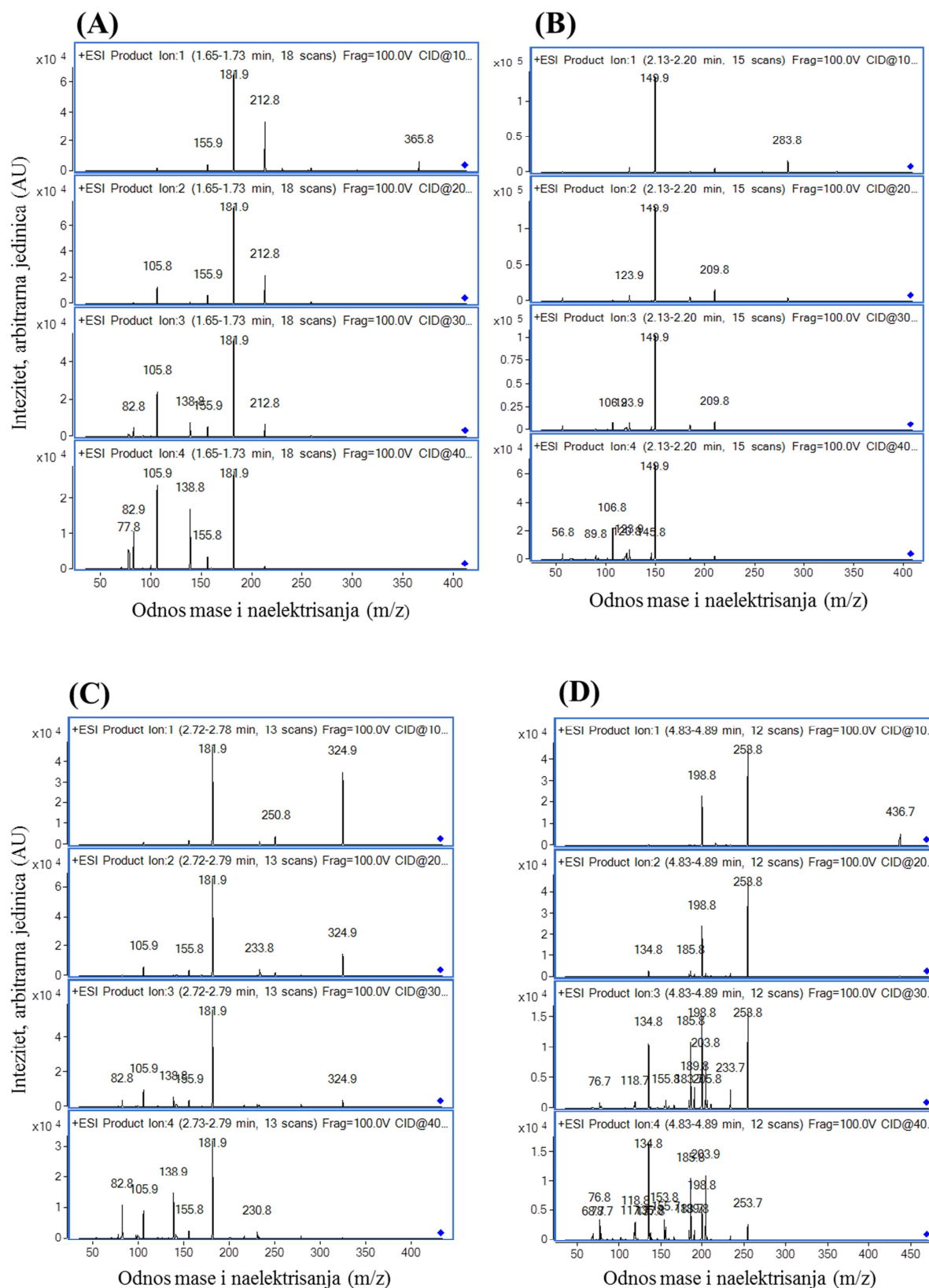
Na slici 5.24 prikazani su maseni spektri ispitivanih SU u zemljištu dobijeni primenom tehnike HPLC-MS-MS.

Određeni sadržaji ispitivanih SU, primenom definisanih metoda, tehnikama HPLC-UV-DAD i HPLC-MS-MS upoređeni su primenom Studentovog *t*-testa uparenih vrednosti (95%).

Nulta hipoteza je bila da se primenom definisanih metoda za određivanje sadržaja ispitivanih SU (HPLC-UV-DAD i HPLC-MS-MS) ne dobijaju različiti rezultati, odnosno da razlike između posmatranih hromatografskih metoda nisu značajne. Izračunate *t*-vrednosti su upoređene sa teorijskim vrednostima pri $\alpha = 0,05$.

Pri analizi uzoraka zemljišta uzorkovanih u površinskom sloju (0-15 cm), nulta hipoteza ($P=0,95$) potvrđena je sledećim rezultatima za nikosulfuron ($f = 8$, $t_{\text{crit}} = 2,31$; $t_{\text{exp}} < t_{\text{crit}}$; $t_{\text{exp}} = 1,96$), rimsulfuron ($f = 5$, $t_{\text{crit}} = 4,30$; $t_{\text{exp}} < t_{\text{crit}}$; $t_{\text{exp}} = 1,33$), oksasulfuron ($f = 6$, $t_{\text{crit}} = 2,45$; $t_{\text{exp}} < t_{\text{crit}}$; $t_{\text{exp}} = 2,26$) i prosulfuron ($f = 8$, $t_{\text{crit}} = 2,31$; $t_{\text{exp}} < t_{\text{crit}}$; $t_{\text{exp}} = 0,82$).

Pri paralelnim analizama uzoraka zemljišta (15-30 cm) Studentov *t*-test uparenih vrednosti ($P=0,95$) takođe je ukazao na to da ne postoji statistički značajna razlika u dobijenim rezultatima merenja za nikosulfuron ($f = 3$, $t_{\text{crit}} = 3,18$; $t_{\text{exp}} < t_{\text{crit}}$; $t_{\text{exp}} = 3,12$) i prosulfuron ($f = 1$, $t_{\text{crit}} = 12,71$; $t_{\text{exp}} < t_{\text{crit}}$; $t_{\text{exp}} = 2,27$).



Slika 5.24. Maseni spektri analiziranih SU dobijenih HPLC-MS-MS za nikosulfuron (A), oksasulfuron (B), rimsulfuron (C) i prosulfuron (D).

U potpovršinskom sloju (30-45 cm) bilo je moguće uporediti rezultate dobijenih sadržaja samo za nikosulfuron. Studentov t -test uparenih vrednosti i u ovom slučaju potvrdio je da ne postoji značajna razlika između rezultata paralelnih analiza ($f=1$, $t_{crit}=12,71$; $t_{exp} < t_{crit}$; $t_{exp}=1,14$).

5.6. Disipacija ispitivanih SU u zemljištu

Na disipaciju herbicida iz grupe SU utiče veliki broj faktora, a naročito vrednost pH zemljišta, njegova temperatura i vlaga, sadržaj organske materije i sadržaj gline (Kah & Brown, 2006; Kah i sar., 2007). Istraživanja iz ove oblasti ukazuju da ostaci SU u zemljištu (naročito u površinskom sloju zemljišta) mogu značajno uticati na razvoj naredne biljne vrste u plodoredu (Monks & Banks, 1991; Kotoula-Syka i sar., 1993a, Kotoula-Syka i sar. 1993b; Vicari i sar., 1994; Junnila i sar. 1994; Moyer, 1995; Bedmar i sar., 2006). Štetan uticaj SU herbicida utvrđen je za više biljnih vrsta kao što su uljana repica, sočivo, kukuruz, grašak, krompir i šećerna repa (Renner & Powell, 1991; Johnson i sar., 1993; Bryce, 2007; Junzhou i sar., 2013; Azimi i sar., 2014).

Rezultati analiza vezanih za disipaciju nikosulfurona, rimsulfurona, oksasulfurona i prosulfurona, dobijenih u ogledima u polju i laboratoriji na dve temperature (25⁰C i 30⁰C) prikazani su u tabelama od 5.12-5.15, kao i u tabelama od 5.17-5.19.

Tabela 5.17. Jednačine regresije i drugi statistički parametri za rasipanje ispitivanih SU herbicida pri laboratorijskim uslovima na temperaturi od 25⁰C

Ispitivana SU	a.k.(g ha ⁻¹) ^a	Regresiona jednačina			Koeficijent korelacije (R ²)	Vreme polurazgradnje, DT ₅₀ (dan)
		$y(t)=c E_{\alpha}(-bt)$				
		α	b	c		
Nikosulfuron	40	0,99	1,02	100,07	0,9995	0,68
	50^b	0,99	1,07	100,09	0,9942	0,65
	80	0,01	2,92	100,27	0,9987	0,34
	100	0,99	1,07	100,09	0,9892	0,65
Oksasulfuron	160	0,90	1,08	100,11	0,9999	0,64
Prosulfuron	30	0,99	1,05	100,10	0,9994	0,66
	50	0,99	0,89	100,06	0,9995	0,12

^a Doza primene ispitivanog herbicida; ^b Bold- komercijalna preporučena doza primene.

Izvedena istraživanja su ukazala da je disipacija ispitivanih SU veoma zavisila od uticaja vremenskih faktora u okviru ogleda na polju, kao i od različitih eksperimentalnih uslova u okviru ogleda u laboratoriji.

Disipacija ispitivanih SU u okviru ove disertacije definisana je primenom Mittag-Leffler-ove funkcije i izražena su vremena poluraspada. Primenjena je jednoparametarska funkcija, definisana jednačinom (6), kao i metodologija prikazana u delu 2.2.3.1 za numeričku

simulaciju disipacije ispitivanih sulfonilurea za laboratorijski ogled (Tabela 5.17 i Tabela 5.18), i za površinski sloj zemljišta u okviru poljskog ogleda (0-15 cm) (Tabela 5.19). Koeficijenti α , b i c određeni su na osnovu dobijenih rezultata istraživanja koji su prikazani u tabelama od 5.17-5.19.

Tabela 5.18. Jednačine regresije i drugi statistički parametri za rasipanje nikosulfurona i prosulfurona pri laboratorijskim uslovima na temperaturi od 30°C

Ispitivana SU	a.k.(g ha ⁻¹) ^a	Regresiona jednačina			Koeficijent korelacije (R ²)	Vreme polurazgradnje, DT ₅₀ (dan)
		$y(t) = c E_{\alpha}(-bt)$				
		α	b	c		
Nikosulfuron	40	0,51	2,62	100,29	0,9995	0,29
	50^b	0,02	4,93	100,49	0,9950	0,20
	80	0,017	4,09	100,41	0,9991	0,24
	100	0,99	1,08	100,09	0,9950	0,64
Prosulfuron	50	0,92	1,43	100,15	0,9999	0,49

^a Doza primene ispitivanog herbicida; ^bBold- komercijalna preporučena doza primene.

Tabela 5.19. Jednačine regresije i drugi statistički parametri za rasipanje ispitivanih SU herbicida pri poljskim uslovima na dubini od 0-15 cm

Ispitivana SU	a.k.(g ha ⁻¹) ^a	Regresiona jednačina			Koeficijent korelacije (R ²)	Vreme polurazgradnje, DT ₅₀ (dan)
		$y(t) = c E_{\alpha}(-bt)$				
		α	b	c		
Nikosulfuron	50^b	0,35	15,01	101,77	0,999	0,05
	80	0,84	2,00	100,21	0,999	0,35
	100	0,46	4,12	100,47	0,999	0,19
Rimsulfuron	50	0,83	3,01	100,32	0,999	0,23
	80	0,90	1,77	100,18	0,999	0,39
	100	0,99	0,87	98,31	0,982	0,78
Oksasulfuron	80	0,54	6,23	100,70	0,999	0,12
	100	0,88	3,02	100,31	0,999	0,23
	160	0,40	5,56	100,63	0,999	0,15
Prosulfuron	20	0,31	5,57	100,62	0,999	0,15
	30	0,81	2,09	100,22	0,999	0,34
	50	2x10 ⁻⁸	8,75	100,87	0,999	0,12

^a Doza primene ispitivanog herbicida; ^bBold- komercijalna preporučena doza primene.

Za ostale potpovršinske slojeve (15-30 cm i 30-45 cm) u okviru ogleda na polju i druge primenjene doze u okviru ogleda u laboratoriji nije bilo moguće uraditi numeričku simulaciju disipacije ispitivanih SU, jer su njihovi sadžaji bili ispod granice kvantitativnog određivanja.

Rezultati ispitivanja vezani za disipaciju SU u zemljištu veoma dobro su se slagali sa Mittag-Leffler-ovom funkcijom, što je potvrđeno visokom vrednošću koeficijenta korelacije (R²>0,99).

Utvrđeno je da je disipacija nikosulfurona ($pK_a = 4,3$) bila znatno intenzivnija u ogledima izvedenim u polju. U okviru ispitivanja vezanih za analize zemljišta tretiranog komercijalnim formulacijama SU nakon dva dana od tretmana, pri realnim uslovima (**0-15 cm**) utvrđeno je da se sadržaj nikosulfurona smanjio za više od 95% od komercijalno preporučene doze ($50 \text{ g ha}^{-1} \text{ a.k.}$). Pri određivanju rimsulfurona ($pK_a = 4,0$) u zemljištu, takođe posle dva dana od tretmana utvrđena je disipacija slabijeg intenziteta u odnosu na nikosulfuron (za oko 20%). Disipacije prosulfurona ($pK_a = 3,8$) i oksasulfurona ($pK_a = 5,1$) su bile približno istog stepena kao i disipacija nikosulfurona. U slučaju primene većih doza nikosulfurona od komercijalno preporučene, utvrđena je disipacija slabijeg intenziteta u odnosu na rezultate analize zemljišta tretiranog komercijalno preporučenom dozom ($80 \text{ g ha}^{-1} \text{ a.k.} > 93\%$ i $100 \text{ g ha}^{-1} \text{ a.k.} > 92\%$). Pri analizama rimsulfurona u zemljištu tretiranom sa koncentracijom od $80 \text{ g ha}^{-1} \text{ a.k.}$, utvrđena je disipacija slabijeg intenziteta za oko 10% u odnosu na komercijalno preporučenu dozu ($50 \text{ g ha}^{-1} \text{ a.k.}$), a u slučaju primene koncentracije od $100 \text{ g ha}^{-1} \text{ a.k.}$, disipacija je bila za oko 3% veća, takođe u odnosu na komercijalno preporučenu dozu. Analize zemljišta tretiranog oksasulfuronom u koncentraciji od $100 \text{ g ha}^{-1} \text{ a.k.}$ ukazale su da je disipacija bila za oko 2% veća od disipacije utvrđene u zemljištu tretiranom komercijalno preporučenom dozom SU ($80 \text{ g ha}^{-1} \text{ a.k.}$), a u slučaju koncentracije od $160 \text{ g ha}^{-1} \text{ a.k.}$, disipacija je bila manjeg intenziteta (za oko 2%). Disipacija prosulfurona u slučaju primene koncentracija većih od komercijalno preporučene doze ($20 \text{ g ha}^{-1} \text{ a.k.}$) je bila sličnog stepena kao i disipacija u slučaju primene komercijalno preporučene doze. Nakon šest dana od tretmana zemljišta, sadržaj rimsulfurona (pri svim primenjenim dozama) bio je ispod granice kvantitativnog određivanja ($LOQ = 3,04 \mu\text{g kg}^{-1}$), dok je sadržaj nikosulfurona, oksasulfurona i prosulfurona (pri svim primenjenim dozama) bio ispod granice kvantitativnog određivanja petnaest dana nakon tretmana zemljišta.

Analize tretiranog zemljišta, uzorkovanog na dubini od **15-30 cm**, nakon petnaest dana od tretmana sa nikosulfuronom ukazale su na mogućnost njegove kvantifikacije, za sve primenjene doze, a nakon trideset dana njegov sadržaj je mogao biti određen samo pri koncentraciji dvostruko većoj ($100 \text{ g ha}^{-1} \text{ a.k.}$) od komercijalno preporučene doze. Pri određivanju nikosulfurona u zemljištu posle trideset dana od tretmana, utvrđeno je da se njegov sadržaj smanjio za više od 74% u odnosu na sadržaj nikosulfurona utvrđen pri analizama zemljišta tretiranog sa dvostruko većom dozom od komercijalno preporučene. Pri analizama zemljišta tretiranog prosulfuronom na ovoj dubini bilo je moguće odrediti njegov sadržaj samo u uzorcima tretiranim ovom SU u dozi primene od $30 \text{ g ha}^{-1} \text{ a.k.}$ i $50 \text{ g ha}^{-1} \text{ a.k.}$

Sadržaji rimsulfurona i oksasulfurona su bili ispod granice kvantitativnog određivanja nakon petnaest dana od primene.

U okviru ispitivanja vezanih za analize tretiranog zemljišta, u uzorcima uzorkovanim na dubini od **30-45 cm**, posle trideset dana od tretmana analitički signal nikosulfurona (100 g ha^{-1} a.k.) je bio detektovan, ali zbog neodgovarajuće reproduktivnosti, nije bila moguće njegovo pouzdano kvantitativno određivanje. Sadržaji ostalih ispitivanih SU su bili ispod granice LOQ na ovoj dubini.

Utvrđeno vreme polurazgradnje nakon primene komercijalno preporučenih doza za nikosulfuron, rimsulfuron, oksasulfuron i prosulfuron iznosilo je 72 minuta (0,05 dana), 0,23 dana, 0,12 dana i 0,15 dana, redom.

U zemljištu tretiranom komercijalnim formulacijama SU u preporučenim doza, nakon dva dana od tretmana u laboratorijskim uslovima (25°C i 30°C) sadržaj nikosulfurona i prosulfurona se smanjio za više od 85% od komercijalno preporučene doze, dok je sadržaj rimsulfurona bio ispod granice kvantitativnog određivanja. Disipacija oksasulfurona je bila približno istog stepena kao i disipacija nikosulfurona na 30°C , dok je utvrđena disipacija slabijeg intenziteta u odnosu na nikosulfuron (za oko 15%) na 25°C

Disipacija nikosulfurona u slučaju primene većih doza od komercijalno preporučene doze je bila približno istog stepena kao i disipacija za komercijalno preporučenu dozu u laboratorijskim uslovima. Sadržaj rimsulfurona u zemljištu tretiranom sa dozom od 100 g ha^{-1} a.k. se smanjio za više od 86% posle dva dana od tretmana na 25°C , dok je njegov sadržaj bio ispod granice kvantitativnog određivanja na 30°C . Disipacija prosulfurona u slučaju primene većih doza od komercijalno preporučene doze je bila približno istog stepena kao i disipacija za komercijalno preporučenu dozu.

Sadržaj nikosulfurona (pri svim primenjenim dozama) je nakon pedeset dana od tretmana zemljišta bio ispod granice kvantitativnog određivanja na 25°C , a na 30°C nakon trideset dana. Posle šest dana od tretmana zemljišta sa rimsulfuronom (pri svim primenjenim dozama) u okviru ispitivanja vezanih za analize zemljišta na 25°C , sadržaj rimsulfurona je bio ispod LOQ, kao i u slučaju oksasulfurona u okviru ispitivanja vezanih za analize zemljišta na 30°C . Sadržaj oksasulfurona i prosulfurona (pri svim primenjenim dozama) je posle petnaest dana od tretmana zemljišta bio ispod granice kvantitativnog određivanja u okviru ispitivanja vezanih za analize zemljišta na 25°C , kao i u okviru ispitivanja vezanih za analize zemljišta na 30°C u slučaju prosulfurona.

Vreme polurazgradnje (DT_{50}) nikosulfurona, oksasulfurona i prosulfurona u laboratorijskim uslovima na 25°C iznosilo je 0,65 dana (50 g ha^{-1} a.k.), 0,64 dana (160 g ha^{-1} a.k.) i 0,66 dana (30 g ha^{-1} a.k.), redom, dok je na 30°C vreme polurazgradnje bilo za nikosulfuron 0,20 dana (50 g ha^{-1} a.k.) i prosulfuron 0,49 dana (50 g ha^{-1} a.k.). Za izvedene oglede u slučaju rimsulfurona (25°C i 30°C) i oksasulfurona (30°C) nije bilo moguće uraditi numeričku simulaciju njihove disipacije, jer su njihovi sadržaji bili ispod granice kvantitativnog određivanja.

Verovatni razlog za značajno smanjenje sadržaja SU već nakon dva dana od dana tretiranja zemljišta, kako u poljskim tako i u laboratorijskim uslovima, je bila njihova hidroliza (Sabadie 1990; Vicari i sar. 1996, Sarmah, 1998; Sarmah i sar. 2000; Sabadie, 2002; Hultgren i sar., 2002; Sarmah & Sabadie 2002; Said-Pullicino i sar. 2004). Hidroliza SU veoma zavisi od karakteristika zemljišta, posebno njegove vrednosti pH (Mersie & Foy 1985; Shea, 1986; Walker i sar., 1989; Borggaard & Streibig, 1989; Reddy i sar. 1995; Ukrainczyk & Rashid, 1995; Gonzalez & Ukrainczyk 1996; Sarmah, 2000; Hyun & Lee 2004; Agüera López i sar., 2014). Ova pretpostavka u skladu je sa značajnim brojem istraživanja vezanih za ispitivanje uticaja abiotičkih faktora na disipaciju sulfonilurea u zemljištu (Flom i sar., 1986; Wehtje i sar., 1987; Beyer i sar., 1988; Walker i sar., 1989; Brown, 1990; Berger & Wolfe, 1996; Sarmah i sar. 2000; Sabadie, 2002; Hultgren i sar., 2002). Veći broj naučnika je pratio ponašanje SU u vodenim rastvorima i utvrdio značajan uticaj vrednosti pH rastvora na hidrolizu (Schneiders i sar. 1993; Sabadie, 2002; Kah & Brown, 2006; Sarmah, 1998).

S obzirom da je vrednost pH ispitivanog zemljišta bila neutralna, verovatno je da su ispitivane sulfoniluree (slabe kiseline $pK_a = 3,8-5,1$) bile u anjonskom obliku, zbog toga što je vrednost pH zemljišnog rastvora bila iznad vrednosti pK_a praćenih sulfonilurea (Sarmah, 2000). Usled toga, sorpcija ispitivanih SU od strane matriksa zemljišta bila je znatno umanjena. Pored toga, sulfoniluree su bile u većem stepenu izložene i dejstvu biotičkih faktora pre svega mikroorganizmima (Nicholls, 1991; Oppong & Sagar, 1992; James i sar., 1995; Sarmah, 1998; Benoit i sar. 1999). Podrazumeva se da je dejstvo specifičnih mikroorganizama mnogo izraženije u prisustvu veće količine vlage u zemljištu. Što se tiče ogleđa u polju, sigurno je da su na visok stepen disipacije uticali i spoljašnji faktori, naročito intenzivan kišni period (16,9 mm padavina za dva dana od momenta tretiranja zemljišta) tokom trajanja ogleđa. Padavine mogu da doprinesu smanjenju sadržaja ispitivanih SU u zavisnosti od karakteristika tretiranog zemljišta (hidroliza), kao i mobilnosti istih u potpovršinske slojeve zemljišta.

Dobijeni rezultati ispitivanja vezani za disipaciju SU praćenih u ovoj disertaciji u skladu su sa istraživanjima većeg broja autora drugih radova u svetu (Dinelli i sar., 1998; Ashburn Poppell i sar. 2002; Hultgren i sar., 2002; Pang i sar. 2016).

Ova studija može biti upotrebljena za identifikaciju potencijalnih problema sa ostacima ispitivanih SU herbicida i predstavlja kvantitativnu procenu njihove postojanosti, koja će varirati za različite eksperimentalne uslove. S obzirom na to da u našoj zemlji ne postoji zakonska regulativa koja propisuje maksimalan sadržaj ostataka SU u zemljištu, dobijeni rezultati bi mogli da doprinesu donošenju odgovarajućih regulativa u smislu maksimalno dozvoljenog sadržaja SU u zemljištu. Kvantitativna procena ovih herbicida u zemljištu je značajna zbog njihove fitotoksičnosti kao i kontaminacije životne sredine usled mogućeg kretanja do podzemne vode, indirektno i samog čoveka. Upravo zbog toga od velikog značaja bi bilo započeti proces kontinualnog praćenja sadržaja ostataka SU nakon njihove primene u različitim tipovima zemljišta (različita podneblja) koji su prisutni u Srbiji i pri različitim klimatskim uslovima, kako bi se potpomoglo donošenje odgovarajućih regulativa u našoj zemlji.

6. Zaključci

1. Razvijena je brza, jednostavna i selektivna metoda za rutinsko određivanje i praćenje ostataka herbicida na bazi sulfonilurea (nikosulfuron, oksasulfuron, tribenuron metil, tritosulfuron, triasulfuron, rimsulfuron i prosulfuron) u zemljištu primenom visokopritisne tečne hromatografije sa UV detektorom sa nizom fotoosetljivih dioda (DAD). Razdvajanje SU je izvedeno uz korišćenje Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ kolone.
2. U cilju definisanja odgovarajućih uslova analize, ispitan je i definisan uticaj najznačajnijih eksperimentalnih faktora. Usvojeni su sledeći optimalni uslovi gradijentne elucije: mobilna faza acetonitril (A) i 0,1% sirćetna kiselina (B), t = 0 min, 52% A; t = 2-2,5 min, 47% A; t = 2,5-5 min, 52% A, re-ekvilibracija 3 min, pri konstantnom protoku od 1 mL min⁻¹ i temperaturi kolone od 25⁰C. Ukupno vreme analize je iznosilo 8 minuta, a injektovana zapremina uzorka je bila 10 µL. Na osnovu odziva analitičkog signala, njegove reproduktivnosti i linearnosti, talasna dužina od 240 nm je usvojena kao odgovarajuća.
3. Dobra linearnost analitičkog signala utvrđena je u opsegu sadržaja smeše SU od 5-100 mg L⁻¹ u model sistemu (R²=0,9934-0,9954), kao i u pripremljenom ekstraktu nekontaminiranog zemljišta (R²=0,9902-0,9940). Utvrđeno je da je uticaj matriksa bio izražen (84,11% za nikosulfuron, 92,13% za oksasulfuron, 91,25% za tribenuron metil, 86,54% za tritosulfuron, 87,14% za triasulfuron, 93,72% za rimsulfuron i 91,49% za prosulfuron) te je stoga za kvantitativno određivanje sadržaja SU u uzorcima zemljišta primenom HPLC-UV-DAD metode korišćena MMC kalibraciona kriva.
4. Pri analizi ekstrakata nekontaminiranog zemljišta ostvarena je granica kvantitativnog određivanja za nikosulfuron, oksasulfuron, tribenuron metil, tritosulfuron, triasulfuron, rimsulfuron i prosulfuron od 3,16 µg kg⁻¹, 3,40 µg kg⁻¹, 3,76 µg kg⁻¹, 4,13 µg kg⁻¹, 3,60 µg kg⁻¹, 3,04 µg kg⁻¹ i 2,97 µg kg⁻¹, redom.
5. Za potrebe osetljivijih, selektivnijih i tačnijih određivanja SU u zemljištu, definisana je metoda uz primenu tečne hromatografije sa tandemskom masenom spektrometrijom (MS-MS). HPLC-MS-MS je korišćena kao referentna tehnika za proveru rezultata koji su dobijeni primenom HPLC uz UV-DAD detektor. Definisani su odgovarajući uslovi

određivanja SU. Najosetljivije određivanje SU je postignuto uz primenu, napona fragmentora od 120 V, optimalna kolizijska energija za „ciljane” jone iznosila je 10 V za tribenuron metil, rimsulfuron i prosulfuron, 15 V za tritosulfuron i triasulfuron i 16 V za nikosulfuron i oksasulfuron. Optimalna kolizijska energija za jone koji su korišćeni za identifikaciju iznosila je 10 V za prosulfuron, 12 V za nikosulfuron i tritosulfuron, 15 V za triasulfuron i tribenuron metil i 20 V za oksasulfuron i rimsulfuron. Granice detekcije ostvarene primenom HPLC-MS-MS iznosile su 0,163 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 0,064 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 0,091 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 0,065 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 0,056 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 0,079 $\mu\text{g kg}^{-1}$ i 0,043 $\mu\text{g kg}^{-1}$, za nikosulfuron, oksasulfuron, tribenuron metil, tritosulfuron, triasulfuron, rimsulfuron i prosulfuron, redom.

6. Definisana je efikasna metoda za pripremu uzoraka zemljišta u cilju hromatografskog određivanja SU. Najefikasnija ekstrakcija ostvarena je primenom smeše dihlormetan-acetonitril (2:1, v/v), zakišeljene sirćetnom kiselinom (0,8%, v/v), uz dodatak uree (0,3 g/10g zemljišta). Postupak mikrotalasne ekstrakcije u zatvorenom sistemu omogućio je najbolje uslove za ekstrakciju SU.
7. U cilju izdvajanja SU, iz matriksa ekstrakata zemljišta, primenjena je ekstrakcija na čvrstoj fazi (SPE) sa silika gelom kao adsorbensom. Najbolja efikasnost elucije odabranih SU ostvarena je primenom smeše rastvarača dihlormetan-aceton (7,5:2,5,v/v) uz prethodno uklanjanje interferirajućih supstanci sa *n*-heksanom. Ponovljivost rezultata analiza, kao i vrednost testa povrata potvrdili su pouzdanost primenjenog postupka izdvajanja SU.
8. Definisana metoda za određivanje ispitivanih SU, kao i razvijeni postupak pripreme uzoraka, uspešno je primenjen u analizi realnih uzoraka zemljišta. Veoma dobre vrednosti testa povrata ostvarene pri analizi primenom HPLC-UV-DAD metode, potvrdile su pre svega ispravnost postupka pripreme uzoraka, a delom i kompletne metode. Tačnost razvijene HPLC-UV-DAD metode za određivanje SU u zemljištu potvrđena je paralelnim analizama uzoraka zemljišta korišćenjem HPLC-MS-MS. Primenom Studentovog *t*-testa uparenih vrednosti, utvrđeno je da se rezultati paralelnih analiza statistički značajno ne razlikuju ($P=95\%$).
9. Istraživanja u okviru disertacije obuhvatila su i praćenje disipacije nikosulfuron, rimsulfuron, oksasulfuron i prosulfuron u različitim komercijalnim dozama primene tokom 50 dana u polju na tri različite dubine (0-15 cm, 15-30 cm i 30-45 cm), kao i u laboratorijskim uslovima na dve temperature (25⁰C i 30⁰C).

10. Vreme polurazgradnje (DT_{50}) analiziranih SU (nikosulfuron, oksasulfuron i prosulfuron) definisano Mittag-Lefler-ovom funkcijom u ogleđima u laboratorijskim uslovima na $25^{\circ}C$ iznosilo je 0,65 dana ($50 \text{ g ha}^{-1} \text{ a.k.}$), 0,64 dana ($160 \text{ g ha}^{-1} \text{ a.k.}$) i 0,66 dana ($30 \text{ g ha}^{-1} \text{ a.k.}$), redom, a na $30^{\circ}C$ za nikosulfuron 0,20 dana ($50 \text{ g ha}^{-1} \text{ a.k.}$) i prosulfuron 0,49 dana ($50 \text{ g ha}^{-1} \text{ a.k.}$).
11. Vreme polurazgradnje SU u polju, takođe definisano primenom Mittag-Lefler-ove funkcije, iznosilo je 72 minuta (0,05 dana), 0,23 dana, 0,12 dana i 0,15 dana za nikosulfuron, rimsulfuron, oksasulfuron i prosulfuron, redom. Značajno veća disipacija koja je utvrđena istraživanjima u okviru ove disertacije najverovatnije je uzrokovana uticajem abiotičkih i biotičkih procesa, kao i faktora spoljašnje sredine.
12. Ogledi izvedeni u cilju praćenja disipacije (u površinskom sloju zemljišta u polju - do 15 cm i laboratorijskim uslovima) nikosulfurona ($50 \text{ g ha}^{-1} \text{ a.k.}$), rimsulfurona ($80 \text{ g ha}^{-1} \text{ a.k.}$), oksasulfurona ($80 \text{ g ha}^{-1} \text{ a.k.}$) i prosulfurona ($20 \text{ g ha}^{-1} \text{ a.k.}$), ukazali su na znatno veći gubitak (za oko 10%) navedenih SU u polju u odnosu na laboratorijske uslove.
13. S obzirom da u našoj zemlji ne postoji zakonska regulativa o maksimalnom sadržaju sulfonilurea u zemljištu rezultati dobijeni u ovoj disertaciji trebalo bi da doprinesu donošenju odgovarajućeg Pravilnika.

7. Literatura

- Abu-Samra, A., Morris, J. S., & Koirtiyohann, S. R. (1975). Wet ashing of some biological samples in a microwave oven. *Analytical Chemistry*, 47(8), 1475-1477.
- Afyuni, M. M., Wagger, M. G., & Leidy, R. B. (1997). Runoff of two sulfonylurea herbicides in relation to tillage system and rainfall intensity. *Journal of Environmental Quality*, 26(5), 1318-1326.
- Agilent Tehnologies (2005). *Maintaining your Agilent HPLC Systems*.
- Agüera López, A., del Mar Gómez Ramos, M., & Fernández Alba, A. R. (2014). Transformation Products of Pesticides in the Environment: Analysis and Occurrence. Transformation Products of Emerging Contaminants in the Environment: Analysis, Processes, Occurrence, Effects and Risks, 385-412.
- Ahmad, I. (1987). Capillary column gas chromatography determination of trace residues of the herbicides chlorsulfuron in agricultural run-off water. *Journal of Association of Official Analytical Chemists* 70, 745-748.
- Ainsworth, C. C., Frederickson, J. K. & Smith, S. C. (1993). Effect of sorption on the degradation of aromatic acids and bases, in D. M. Linn, T. H. Carski, M. L. Brusseau & F. H. Chang (eds), *Sorption and Degradation of Pesticides and Organic Chemicals in Soil*, Soil Science Society of America, Madison, WI, pp. 125–144.
- Akiyama, Y., Yoshioka, N., & Tsuji, M. (2002). Determination of Ten Sulfonyl Urea Herbicides in Unpolished Rice by Solid-phase Extraction Clean-up and LC-Diode Array Detection. *Journal-Food Hygienic Society of Japan*, 43(2), 99-103.
- Aksu, Z. (2005). Application of biosorption for the removal of organic pollutants: a review. *Process Biochemistry*, 40(3), 997-1026.
- Almvik, M., Riise, G., Bolli, R. Christiansen, A., Odenmarck, S., R., Børresen, T., Tveit, C., W. (2007). Transport of sulfonylurea herbicides from a barley field in Norway: Field and laboratory studies, *Bioforsk Report* 3(105) Atlantis, 100(521), 5.
- Alpert, A. J. (1990). Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *Journal of chromatography A*, 499, 177-196.
- AOAC Official Method 972.43. Microchemical Determination of Carbon, Hydrogen, and Nitrogen, Automated Method, in *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 18th edition, Revision 1, 2006. Chapter 12, pp. 5-6, AOAC International, Gaithersburg, MD.
- Ardrey, R. E. (2003). *Liquid chromatography-mass spectrometry: an introduction*. John Wiley & Sons.

- Ashburn Poppell, C., Hayes, R. M., & Mueller, T. C. (2002). Dissipation of nicosulfuron and rimsulfuron in surface soil. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(16), 4581-4585.
- Asiabi, H., Yamini, Y., & Moradi, M. (2013). Determination of sulfonylurea herbicides in soil samples via supercritical fluid extraction followed by nanostructured supramolecular solvent microextraction. *The Journal of Supercritical Fluids*, 84, 20-28.
- Atanacković, T., Pilipović, S., Stanković, B., & Zorica, D. (2014). *Fractional Calculus with Applications in Mechanics: Vibrations and Diffusion Processes (ISTE)*.
- Azcarate, M. P., Montoya, J. C., & Koskinen, W. C. (2015). Sorption, desorption and leaching potential of sulfonylurea herbicides in Argentinean soils. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 50(4), 229-237.
- Azimi, M., Ramezani, K., & Alimoradi, L. (2014). Investigation of Phytotoxicity and Stability of Residuals, Nicosulfuron and Rimsulfuron on Wheat Grown on Two Soil Types. *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, 2(7), 2259-2263.
- Bandžuchová, L., Šelešovská, R., Navrátil, T., & Chýlková, J. (2013). Sensitive voltammetric method for determination of herbicide triasulfuron using silver solid amalgam electrode. *Electrochimica Acta*, 113, 1-8.
- Barros, J. F., Basch, G., & de Carvalho, M. (2007). Effect of reduced doses of a post-emergence herbicide to control grass and broad-leaved weeds in no-till wheat under Mediterranean conditions. *Crop Protection*, 26(10), 1538-1545.
- Battaglin, W. A., Furlong, E. T., Burkhardt, M. R., & Peter, C. J. (2000). Occurrence of sulfonylurea, sulfonamide, imidazolinone, and other herbicides in rivers, reservoirs and ground water in the Midwestern United States, 1998. *Science of the Total Environment*, 248(2), 123-133.
- Beckie, H. J., & McKercher, R. B. (1990). Mobility of two sulfonylurea herbicides in soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(1), 310-315.
- Bedmar, F., Perdigon, J. A., & Monterubbianesi, M. G. (2006). Residual phytotoxicity and persistence of chlorimuron and metsulfuron in soils of Argentina. *Journal of Environmental Biology*, 27(2), 175-179.
- Benoit, P., Barriuso, E., & Soulas, G. (1999). Degradation of 2, 4-D, 2, 4-dichlorophenol, and 4-chlorophenol in soil after sorption on humified and nonhumified organic matter. *Journal of environmental quality*, 28(4), 1127-1135.
- Berger, B. M., & Lee Wolfe, N. (1996). Hydrolysis and biodegradation of sulfonylurea herbicides in aqueous buffers and anaerobic water-sediment systems: Assessing fate pathways using molecular descriptors. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15(9), 1500-1507.

- Berger, T. A. (1995). High efficiency packed column supercritical fluid chromatography of sulfonylurea herbicides and metabolites from large water samples. *Chromatographia*, 41(3-4), 133-140.
- Bergström, L. (1992). Leaching studies of pesticides in Swedish soils measured in field lysimeters. *Monographs-British crop protection Council*, 153-153.
- Beyer, E.M.; Duffy, M.J.; Hay, J.V. & Schlueter, D.D. (1988). Sulfonylureas. In *Herbicides: Chemistry, Degradation and Mode of Action*; Kearney, P.C., Kaufman, D.D., Eds.; Marcel Dekker Inc.: New York, 1988; 117–189.
- Boesten, J. J. (1993). Bioavailability of organic chemicals in soil related to their concentration in the liquid phase: a review. *Science of the total environment*, 134, 397-407.
- Bollag, J. M., Liu, S. Y., & Cheng, H. H. (1990). Biological transformation processes of pesticides. *Pesticides in the soil environment: processes, impacts, and modeling.*, 169-211.
- Borggaard, O. K., & Streibig, J. C. (1989). Chlorsulfuron adsorption by selected soil samples. *Acta Agriculturae Scandinavica*, 39(4), 351-360.
- Bos, J., Jolley, A., & Johnstone, P. (Eds.). (1995). *Herbicide Persistence in Australian Winter Cereal Cropping Systems: The Triazines, the Sulfonylureas, the Dinitroanilines*. Agmedia.
- Bossi, R., Vejrup, K., & Jacobsen, C. S. (1999). Determination of sulfonylurea degradation products in soil by liquid chromatography–ultraviolet detection followed by confirmatory liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 855(2), 575-582.
- Brock TCM, Arts GHP, Ten Hulscher TEM, de Jong FMW, Luttik R, Roex E, Smit CE, van Vliet PJM (2011). Aquatic effect assessment for plant protection products. Wageningen, Alterra, report 2235. Available at <http://edepot.wur.nl/187906>. Accessed December 3, 2014.
- Brown, H. M. (1990). Mode of action, crop selectivity, and soil relations of the sulfonylurea herbicides. *Pesticide Science*, 29(3), 263-281.
- Bryce G., (2007). The phytotoxicity effect of ALS inhibiting herbicide combinations in prairie soils. PhD Thesis. University of Saskatchewan Saskatoon, Saskatchewan, Canada.
- Budimir, M. & Gašić, S. (1997). Herbicidi inhibitori acetolaktat sintaze, *Pesticidi* 12, 77-102.
- Casida, J. E., & Lykken, L. (1969). Metabolism of organic pesticide chemicals in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 20(1), 607-636.
- Castro, M. C., Bedmar, F., Monterubbianesi, M. G., Peretti, A., & Barassi, C. A. (2002). Determination of chlorimuron and metsulfuron residues in two soils of Argentina using a rapid seed-bioassay. *Journal of Environmental Biology*, 23(4), 353-358.

- Cessna, A. J., Donald, D. B., Bailey, J., Waiser, M., & Headley, J. V. (2006). Persistence of the sulfonylurea herbicides thifensulfuron-methyl, ethametsulfuron-methyl, and metsulfuron-methyl in farm dugouts (ponds). *Journal of environmental quality*, 35(6), 2395-2401.
- Chaleff, R. S., & Mauvais, C. J. (1984). Acetolactate synthase is the site of action of two sulfonylurea herbicides in higher plants. *Science*, 224(4656), 1443-1445.
- Chen, C., Yang, L., & Zhou, J. (2011). Trace bensulfuron-methyl analysis in tap water, soil, and soybean samples by a combination of molecularly imprinted stir bar sorption extraction and HPLC-UV. *Journal of Applied Polymer Science*, 122(2), 1198-1205.
- Chen, H., He, X., Rong, X., Chen, W., Cai, P., Liang, W., Li, S. & Huang, Q. (2009). Adsorption and biodegradation of carbaryl on montmorillonite, kaolinite and goethite, *Applied Clay Science* 46: 102–108.
- Chen, Z. L., Kookana, R. S., & Naidu, R. (2000). Determination of sulfonylurea herbicides in soil extracts by solid-phase extraction and capillary zone electrophoresis. *Chromatographia*, 52(3-4), 142-146.
- Cheng, H. H. (1990). Pesticides in the soil environment: processes, impacts, and modeling. *Pesticides in the soil environment: processes, impacts, and modeling*.
- Ciba-Geigy Ltd, Basle, Switzerland AF-1084/1. Uputstvo proizvođača sirovine za određivanje aktivne materije primisulfuron i prosulfuron.
- Ciba-Geigy Ltd, Basle, Switzerland, AF-1179/1. Uputstvo proizvođača sirovine za određivanje aktivne materije oksasulfurona.
- Ćirić, M. (1984). *Pedologija*. Svjetlost, Zavod za udžbenike i nastavna sredstva.
- Ćirić, V. (2014). Kvantitativne i kvalitativne karakteristike organske materije različitih tipova zemljišta, *Doktorska disertacija*, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.
- Cooke, C., Shaw, G. & Collins, C. D. (2004). Determination of solid-liquid partition coefficients (kd) for the herbicides isoproturon and trifluralin in five UK agricultural soils, *Environmental Pollution* 132: 541–552.
- Cotterill, E. G. (1992). Determination of the sulfonylurea herbicides chlorsulfuron and metsulfuron methyl in soil, water and plant material by gas chromatography of their pentafluorobenzyl derivatives. *Pesticide science*, 34(3), 291-296.
- Degelmann, P., Egger, S., Jüring, H., Müller, J., Niessner, R., & Knopp, D. (2006). Determination of sulfonylurea herbicides in water and food samples using sol-gel glass-based immunoaffinity extraction and liquid chromatography-ultraviolet/diode array detection or liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(6), 2003-2011.
- Dinelli, G., Di Martino, E. & Vicari, A. (1998). Influence of soil moisture and temperature on degradation of three sulfonylurea herbicides in soil. *Agrochimica* 42, 50-58.

- Directive 2000/60/EC (2000). Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy. *Off. J. Eur. Union* L327:1–72.
- Directive 2009/128/EC (2009). Directive 2009/128/EC of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 establishing a framework for Community action to achieve the sustainable use of pesticides. *Off. J. Eur. Union* L 309:71–86.
- Directive, C. (1991). Council Directive 91/414/EEC of 15 July 1991 concerning the placing of plant protection products on the market. *Official Journal of the European Communities* L230, 1-32.
- Dixon, J. B. & Weed, S. B. (1990). *Minerals in Soil Environments*, Soil Science Society of America, Inc.
- Dokoumetzidis, A., & Macheras, P. (2009). Fractional kinetics in drug absorption and disposition processes. *Journal of pharmacokinetics and pharmacodynamics*, 36(2), 165-178.
- Dong, B., Zhao, Q., & Hu, J. (2015). Dissipation kinetics of emamectin benzoate and lufenuron residues in cabbage grown under field conditions. *Environmental monitoring and assessment*, 187(12), 1-11.
- Dong, X., Liang, S., Shi, Z., & Sun, H. (2016). Development of multi-residue analysis of herbicides in cereal grain by ultra-performance liquid chromatography–electrospray ionization-mass spectrometry. *Food chemistry*, 192, 432-440.
- Društvo za zaštitu bilja Srbije, Sredstva za zaštitu bilja u prometu u Srbiji 2015. *Biljni lekar*, 2015. 43(1-2).
- Duggleby, R. G., & Pang, S. S. (2000). Acetohydroxyacid synthase. *BMB Reports*, 33(1), 1-36.
- E.I. du Pont de Nemours and Company (2005). DuPont crop protection sulfonylurea herbicides. DuPont brochure K-05825 (09/05),. Available at http://www2.dupont.com/Crop_Protection/hu_HU/assets/downloads/pdfs/DuPont_SU.pdf (accessed Apr 2014).
- Eberlein, C. V., Guttieri, M. J., Mallory-Smith, C. A., Thill, D. C., & Baerg, R. J. (1997). Altered acetolactate synthase activity in ALS-inhibitor resistant prickly lettuce (*Lactuca serriola*). *Weed Science*, 212-217.
- Edmond de Hoffmann, V.S. (2007). *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. John Wiley & Sons.
- EFSA (2014). www.efsa.europa.eu. Accessed December 27, 2014.
- EFSA (European Food Safety Authority), 2005. Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance rimsulfuron. Available at www.efsa.europa.eu

- EFSA (European Food Safety Authority), 2007. Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance nicosulfuron. Available at www.efsa.europa.eu
- EFSA (European Food Safety Authority), 2012. Reasoned opinion on the review of the existing maximum residue levels (MRLs) for oxasulfuron according to Article 12 of Regulation (EC) No 396/20051. Available at www.efsa.europa.eu
- EFSA (European Food Safety Authority), 2014. Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance prosulfuron. Available at www.efsa.europa.eu
- El-Debs, R., Nehmé, R., Claude, B., Motteau, S., Togola, A., Berho, C., & Morin, P. (2014). Coated capillaries with highly charged polyelectrolytes and carbon nanotubes co-aggregated with sodium dodecyl sulphate for the analysis of sulfonylureas by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 1367, 161-166.
- Eleftherohorinos, I.G. & E. Kotoula-Syka (1989). Field persistence of chlorsulfuron and DPX-L5300 in relation to rotational crops. *Weed Res.*, 29(6), 127-134.
- Enger, H., Riehm, H., & Domingo, W. R. (1960). Untersuchungen über die chemische Bodenanalyse als Grundlage für die Beurteilung des Nährstoffzustandes der Böden. II Chemische Extraktionsmethoden zur Phosphor-und Kaliumbestimmung. *Kunigl. Lantbr. Högsk. Ann*, 26, 199-215.
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization), 2007. EPPO standards - efficacy evaluation of plant protection products - PP1/207(2) effects on succeeding crops. *EPPO Bull.* 37, 452-458.
- Eskilsson, C. S., & Björklund, E. (2000). Analytical-scale microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, 902(1), 227-250.
- EU (European Union) (2002). Existing active substances decisions and review reports. http://europa.eu.int/comm/food/fs/ph_ps/pro/eva/existing/index_en.htm.
- EU Pesticides database. 2015, [pristupljeno 20.01.2016.]; Dostupno: http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm
- Evangelou, V. P. (1998). Environmental soil and water chemistry principles and application.
- Fahl, G. M., Kreft, L., Altenburger, R., Faust, M., Boedeker, W., & Grimme, L. H. (1995). pH-dependent sorption, bioconcentration and algal toxicity of sulfonylurea herbicides. *Aquatic toxicology*, 31(2), 175-187.
- Fang, G., Chen, J., Wang, J., He, J., & Wang, S. (2010). N-Methylimidazolium ionic liquid-functionalized silica as a sorbent for selective solid-phase extraction of 12 sulfonylurea herbicides in environmental water and soil samples. *Journal of Chromatography A*, 1217(10), 1567-1574.
- FAO (Food and Agriculture Organization), Roma (Italia). (1986). International code of conduct on the distribution and use of pesticides.

- FAO (Food and Agriculture Organization), Roma (Italia). (2002). World agriculture towards 2015/30.
- Fenoll, J., Hellín, P., Sabater, P., Flores, P., & Navarro, S. (2012). Trace analysis of sulfonylurea herbicides in water samples by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta*, 101, 273-282.
- Ferris, I. G., Fawcett, R., Stork, P., Haigh, B. M., Pederson, N., & Rovira, A. (1995). Persistence and leaching of sulfonylurea herbicides in four sodic soils. In 'Australian Sodic Soils: Distribution, Properties and Management'. (Eds R. Naidu, M. Sumner and P. Rengasamy.) pp. 229–38.
- Fishel F. M., Pesticide-Organism interaction (2005). PI-43 Document, Pesticide Information Office, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.
- Fletcher, J. S., Pfleger, T. G., & Ratsch, H. C. (1993). Potential environmental risks associated with the new sulfonylurea herbicides. *Environmental science & technology*, 27(10), 2250-2252.
- Flom, D. G., Thill, D. C., & Callihan, R. H. (1986). Effect of soil pH on the chemical degradation of chlorsulfuron. *Proceedings: Western Society of Weed Science*. San Diego, CA, 39, 186.
- Flores-Tlacuahuac, A., & Biegler, L. T. (2014). Optimization of fractional order dynamic chemical processing systems. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 53(13), 5110-5127.
- Flynn, D. J., & Naylor, R. E. L. (2002). Herbicide legislation and regulation. *Weed management handbook*, (Ed. 9), 114-133.
- Font, N., Hernandez, F., Hogendoorn, E. A., Baumann, R. A., & Van Zoonen, P. (1998). Microwave-assisted solvent extraction and reversed-phase liquid chromatography–UV detection for screening soils for sulfonylurea herbicides. *Journal of Chromatography A*, 798(1), 179-186.
- Ganzler, K., Salgo, A., & Valkó, K. (1986). Microwave extraction: A novel sample preparation method for chromatography. *Journal of Chromatography A*, 371, 299-306.
- Garcia, F., & Henion, J. (1992). Fast capillary electrophoresis—ion spray mass spectrometric determination of sulfonylureas. *Journal of Chromatography A*, 606(2), 237-247.
- Gervais, G., Brosillon, S., Laplanche, A., & Helen, C. (2008). Ultra-pressure liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry for multiresidue determination of pesticides in water. *Journal of Chromatography A*, 1202(2), 163-172.
- Gerwick, B. C., Subramanian, M. V., Loney-Gallant, V. I., & Chandler, D. P. (1990). Mechanism of action of the 1, 2, 4-triazolo [1, 5-a] pyrimidines. *Pesticide Science*, 29(3), 357-364.

- Gimsing, A., Szilas, C. & Borggaard, O. (2007). Sorption of glyphosate and phosphate by variable-charge tropical soils from Tanzania, *Geoderma* 138: 127–132.
- Goetz, A.J., R.H. Walker, G. Wehtje and B.F. Hajek (1989). Sorption and mobility of chlorimuron in Alabama soils. *Weed Sci.*, 37(3), 428- 433.
- Gonzalez, J. M., & Ukrainczyk, L. (1996). Adsorption and desorption of nicosulfuron in soils. *Journal of environmental quality*, 25(6), 1186-1192.
- Gorenflo, R., Kilbas, A. A., Mainardi, F., & Sergei V. Rogosin. (2014). Mittag-Leffler functions, related topics and applications. Berlin: Springer.
- Gorenflo, R., Loutchko, J., Luchko, Y., & Mainardi, D. T. F. (2002). Computation of the Mittag-Leffler function $E_{\alpha, \beta}(z)$ and its derivative. In *Fract. Calc. Appl. Anal.*, No 4, 491-518.
- Graham-Bryce, I. J., Banin, A., & Kafkafi, U. (1980). The use of pesticides in crop production with special reference to their behaviour in soils. *Agrochemicals in Soils*. Eds. A Banin and U Kafkafi, 191-209.
- Grahovac, N. M., & Žigić, M. M. (2010). Modelling of the hamstring muscle group by use of fractional derivatives. *Computers & Mathematics with Applications*, 59(5), 1695-1700.
- Grahovac, N., Zigic, M., & Spasic, D. (2012). On impact scripts with both fractional and dry friction type of dissipation. *International Journal of Bifurcation and Chaos*, 22(04), 1250076.
- Greenland, D. & Hayes, M. (1978). *The Chemistry of Soil Constituents*, JohnWiley Sons, London, Great Britain.
- Günther, P., Pestemer, W., Rahman, A., & Nordmeyer, H. (1993). A bioassay technique to study the leaching behaviour of sulfonylurea herbicides in different soils. *Weed Research*, 33(2), 177-185.
- Günther, P., Rahman, A., & Pestemer, W. (1989). Quantitative bioassays for determining residues and availability to plants of sulphonylurea herbicides. *Weed Research*, 29(2), 141-146.
- Gure, A., Lara, F. J., García-Campaña, A. M., Megersa, N., & del Olmo-Iruela, M. (2015). Vortex-assisted ionic liquid dispersive liquid–liquid microextraction for the determination of sulfonylurea herbicides in wine samples by capillary high-performance liquid chromatography. *Food chemistry*, 170, 348-353.
- Gustafson, D. I. (1989). Groundwater ubiquity score: a simple method for assessing pesticide leachability. *Environmental toxicology and chemistry*, 8(4), 339-357.
- Hadžić, V., Belić, M., & Nešić, Lj. (2004). *Praktikum iz pedologije*, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.
- Hamaker, J. W., & Thompson, J. M. (1972). Adsorption. In ‘Organic chemicals in the Soil Environment’. (Eds CAI Goring and JW Hamaker.) pp. 49–144.

- Haroune, L., Cassoulet, R., Lafontaine, M. P., Bélisle, M., Garant, D., Pelletier, F., ... & Bellenger, J. P. (2015). Liquid chromatography-tandem mass spectrometry determination for multiclass pesticides from insect samples by microwave-assisted solvent extraction followed by a salt-out effect and micro-dispersion purification. *Analytica chimica acta*, 891, 160-170.
- Harris, D. C. (2010). *Quantitative chemical analysis*. Macmillan.
- Haws, N. W., Ball, W. P. & Bouwer, E. J. (2006). Modeling and interpreting bioavailability of organic contaminant mixtures in subsurface environments, *Journal of Contaminant Hydrology* 82: 255–292.
- Hay, J. V. (1990). Chemistry of sulfonylurea herbicides. *Pesticide Science*, 29(3), 247-261.
- Headley, J. V., Du, J. L., Peru, K. M., & McMartin, D. W. (2010). Mass spectrometry of the photolysis of sulfonylurea herbicides in prairie waters. *Mass spectrometry reviews*, 29(4), 593-605.
- Hilfer, R. (Ed.). (2000). *Applications of fractional calculus in physics*. World Scientific.
- Himel, C. M., Loats, H., & Bailey, G. W. (1990). Pesticide sources to the soil and principles of spray physics. *Pesticides in the Soil Environment: Processes, Impacts and Modeling*, (pesticidesinthe), 7-50.
- Hogendoorn, E. A., Huls, R., Dijkman, E., & Hoogerbrugge, R. (2001). Microwave assisted solvent extraction and coupled-column reversed-phase liquid chromatography with UV detection: use of an analytical restricted-access-medium column for the efficient multi-residue analysis of acidic pesticides in soils. *Journal of Chromatography A*, 938(1), 23-33.
- Hollaway, K. L., Kookana, R. S., McQuinn, D. J., Moerkerk, M. R., Noy, D. M., & Smut, M. A. (1999). Comparison of sulfonylurea herbicide residue detection in soil by bioassay, enzyme-linked immunosorbent assay and HPLC. *Weed Research-Oxford*, 39, 383-398.
- http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm
- <http://ecb.jrc.ec.europa.eu/>
- <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/396883/Paul-Hermann-Muller>.
- Hu, K. F., Sun, T., Liu, S. H., & Qiao, K. Y. (2010). Determination of Multi-residues of Thirteen Sulfonylurea Herbicides in Soil by Ultra Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Instrumental Analysis*, 11, 025.
- Huang, P. M., & Iskandar, I. K. (2000). *Soils and Groundwater Pollution and Prevention*.
- Hultgren, R. P., Hudson, R. J., & Sims, G. K. (2002). Effects of soil pH and soil water content on prosulfuron dissipation. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(11), 3236-3243.
- Hurle, K., & A. Walker (1980). Persistence and its prediction. *Interactions between Herbicides and the Soil* (RJ Hance, Ed.), Academic Press, 83-122.

- Hyun, S., & Lee, L. S. (2004). Factors controlling sorption of prosulfuron by variable-charge soils and model sorbents. *Journal of environmental quality*, 33(4), 1354-1361.
- Hyun, S., Lee, L. S. & Rao, P. S. C. (2003). Significance of anion exchange in pentachlorophenol sorption by variable-charge soils. *Journal of environmental quality*, 32(3), 966-976.
- İnam, R., Sarigül, T., Gülerman, E. Z., & Uncu, N. (2006). Polarographic determination of herbicide thifensulfuron methyl/application to agrochemical pesticide, soil, and fruit juice. *International Journal of Environmental and Analytical Chemistry*, 86(15), 1135-1149.
- Ishigara Sangio Kaisha Ltd, Japan AD 910605. Uputstvo proizvođača sirovine za određivanje aktivne materije nikosulfurona.
- ISO 10390 (2010). Soil Quality — Determination of pH. International Organization for Standardization, Genève, Switzerland.
- ISO 10693 (1995) Soil quality—determination of carbonate content—volumetric method. International Organization for Standardization.
- ISO 10694 (2005). Soil Quality – Determination of TOC and total C – Volumetric Method. International Organization for Standardization, Genève, Switzerland.
- ISO 11464 (2006). Soil Quality — Pretreatment of Samples for Physico-chemical Analysis. International Organization for Standardization, Genève, Switzerland.
- ISO 14235 (1998). Soil quality -- Determination of organic carbon by sulfochromic oxidation. International Organization for Standardization.
- IUSS Working Group WRB (2014): World Reference Base for Soil Resources 2014. International soil classification system for naming soils and creating legends for soil maps. World Soil Resources Reports No. 106. FAO, Rome.
- James, T. K., Klaffenbach, P., Holland, P. T., & Rahman, A. (1995). Degradation of primisulfuron-methyl and metsulfuron-methyl in soil. *Weed research*, 35(2), 113-120.
- Janjić, V. (2003). Sulfonylurea herbicides – mode of action. In: *Plant Physiology in the New Millennium*, Ed. Stephen A. Quarrie, John Innes, Borivoj Krstić, Vaskrsija Janjić, Pub. Yugoslav Society of Plant Physiology.
- Johnson D.H., D.L. Jordan, W.G. Johnson, R.E. Talbert, R.E. Frans (1993). Nicosulfuron, primisulfuron, imazethapyr, and DPX-PE350 injury to succeeding crops. *Weed Technol.* 7 641-644.
- Juhler, R. K., Henriksen, T. H., Ernstsén, V., Vinther, F. P., & Rosenberg, P. (2008). Impact of basic soil parameters on pesticide disappearance investigated by multivariate partial least square regression and statistics. *Journal of environmental quality*, 37(5), 1719-1732.
- Junnila, S., Heinonen-Tanksi, H., Erviö, L. R. & Laitinen, P. (1994). Phytotoxic persistence and microbiological effects of chlorsulfuron and metsulfuron in Finnish soils. *Weed research*, 34(6), 413-423.

- Junzhou, B., Haiwang, Y., Shuping, C., Haicheng, P., & Junliang, X. (2013). Efficacy and Phytotoxicity Trial of Different Dosages of 4% Nicosulfuron SC on Weeds in Corn Fields. *Plant Diseases and Pests*, 4(6), 27.
- Kah, M., & Brown, C. D. (2006). Adsorption of ionisable pesticides in soils. In *Reviews of environmental contamination and toxicology* (pp. 149-217). Springer New York.
- Kah, M., Beulke, S., & Brown, C. D. (2007). Factors influencing degradation of pesticides in soil. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(11), 4487-4492.
- Kang, S., Chang, N., Zhao, Y., & Pan, C. (2011). Development of a method for the simultaneous determination of six sulfonylurea herbicides in wheat, rice, and corn by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(18), 9776-9781.
- Keneth, M. (1992). *The DDT Story*. The British Crop Protection Council, London, UK.
- Kibe, K., Takahashi, M., Kameya, T. & Urano, K. (2000). Adsorption equilibriums of principal herbicides on paddy soils in Japan, *The Science of the Total Environment* 263: 115–125.
- Klaffenbach, P. & Holland, P.T. (1993). Analysis of sulfonylurea herbicides by gas-liquid chromatography. 2. Determination of chlorsulfuron and metsulfuron-methyl in soil and water samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41, 396–401.
- Klaffenbach, P., Holland, P. T., & Lauren, D. R. (1993). Analysis of sulfonylurea herbicides by gas-liquid chromatography. 1. Formation of thermostable derivatives of chlorsulfuron and metsulfuron-methyl. *Journal of agricultural and food chemistry*, 41(3), 388-395.
- Kolár, V., Deng, A., & Fránek, M. (2002). Production and characterization of generic antibodies against s-triazine and sulfonylurea herbicides. *Food and agricultural immunology*, 14(2), 91-105.
- Kotoula-Syka, E., Eleftherohorinos, I. G., Gagianas, A. A., & Sficas, A. G. (1993a). Persistence of preemergence applications of chlorsulfuron, metsulfuron, triasulfuron, and tribenuron in three soils in Greece. *Weed Science*, 246-250.
- Kotoula-Syka, E., Eleftherohorinos, I. G., Gagianas, A. A., & Sficas, A. G. (1993b). Phytotoxicity and persistence of chlorsulfuron, metsulfuron-methyl, triasulfuron and tribenuron-methyl in three soils. *Weed Research*, 33(5), 355-367.
- Kuhad, R. C., Johri, A. K., Singh, A., & Ward, O. P. (2004). Bioremediation of pesticide-contaminated soils. In *Applied bioremediation and phytoremediation* (pp. 35-54). Springer Berlin Heidelberg.
- Laor, Y., Strom, P. & Farmer, W. J. (1996). The effect of sorption on phenanthrene bioavailability, *Journal of Biotechnology* 51: 227–234.
- Lee, J. K., Ahn, K. C., Park, O. S., Ko, Y. K., & Kim, D. W. (2002). Development of an immunoassay for the residues of the herbicide bensulfuron-methyl. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(7), 1791-1803.

- Lee, L. S., Rao, P. S. C., Nkedi-Kizza, P., & Delfino, J. J. (1990). Influence of solvent and sorbent characteristics on distribution of pentachlorophenol in octanol-water and soil-water systems. *Environmental science & technology*, 24(5), 654-661.
- Li, C., Lu, A., Wang, J., Li, J., Ping, H., Luan, Y. & Ha, X. (2014). Determination of five sulfonylurea herbicides in environmental waters and soil by ultra high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry after extraction using graphene. *Journal of separation science*, 37(24), 3714-3721.
- Li, M., Liu, X., Dong, F., Xu, J., Kong, Z., Li, Y., & Zheng, Y. (2013). Simultaneous determination of cyflumetofen and its main metabolite residues in samples of plant and animal origin using multi-walled carbon nanotubes in dispersive solid-phase extraction and ultrahigh performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1300, 95-103.
- Liang, P., Wang, J., Liu, G., & Guan, J. (2014). Determination of sulfonylurea herbicides in food crops by matrix solid-phase dispersion extraction coupled with high-performance liquid chromatography. *Food analytical methods*, 7(7), 1530-1535.
- Lidström, P., Tierney, J., Wathey, B., & Westman, J. (2001). Microwave assisted organic synthesis-a review. *Tetrahedron*, 57(45), 9225-9283.
- Liu, H., Ren, L., Fang, G., Li, H., & Wang, S. (2013). An enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of tribenuron-methyl in water and soil using a molecularly imprinted film as an artificial antibody. *Analytical Methods*, 5(20), 5677-5683.
- Logan, B. E. (2012). *Environmental transport processes*. John Wiley & Sons.
- Lončar, E. (2010). *Molekulska struktura i retencija u tečnoj hromatografiji-monografija*, , Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, Novi Sad.
- Lovell, S. T., Wax, L. M., Horak, M. J., & Peterson, D. E. (1996). Imidazolinone and sulfonylurea resistance in a biotype of common waterhemp (*Amaranthus rudis*). *Weed science*, 789-794.
- MacBean, C., 2012. *The Pesticide Manual*, 16th edition, C. MacBean (Editor), British Crop Protection Council, UK.
- Magin, R. L. (2010). Fractional calculus models of complex dynamics in biological tissues. *Computers & Mathematics with Applications*, 59(5), 1586-1593.
- Manley, B. S., Singh, B. K., Shaner, D. L., & Wilson, H. P. (1999). Imidazolinone resistance in smooth pigweed (*Amaranthus hybridus*) is due to an altered acetolactate synthase. *Weed technology*, 697-705.
- Marjanović, N. J., & Krstić, B. Đ., (1998). *Instrumentalne metode analize u biološkim istraživanjima*, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad.
- Marjanović, N.J. (2001). *Instrumentalne metode analize*, I/1. Metode razdvajanja. Univerzitet u Banja Luci, Banja Luka.

- Martins, J. M., & Mermoud, A. (1998). Sorption and degradation of four nitroaromatic herbicides in mono and multi-solute saturated/unsaturated soil batch systems. *Journal of Contaminant Hydrology*, 33(1), 187-210.
- Martins, J. M., & Mermoud, A. (1999). Transport of rimsulfuron and its metabolites in soil columns. *Chemosphere*, 38(3), 601-616.
- Martins, J. M., Chevre, N., Spack, L., Tarradellas, J., & Mermoud, A. (2001). Degradation in soil and water and ecotoxicity of rimsulfuron and its metabolites. *Chemosphere*, 45(4), 515-522.
- McCourt, J. A., & Duggleby, R. G. (2006). Acetohydroxyacid synthase and its role in the biosynthetic pathway for branched-chain amino acids. *Amino acids*, 31(2), 173-210.
- Mersie, W., & Foy, C. L. (1985). Phytotoxicity and adsorption of chlorsulfuron as affected by soil properties. *Weed Science*, 564-568.
- Miao, S. S., Wu, M. S., Zuo, H. G., Jiang, C., Jin, S. F., Lu, Y. C., & Yang, H. (2015). Core-Shell Magnetic Molecularly Imprinted Polymers as Sorbent for Sulfonylurea Herbicide Residues. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(14), 3634-3645.
- Miljković, N. S. (1996). *Osnovi pedologije*. Prirodno-matematički fakultet, Institut za geografiju.
- Mitić, M., & Kecman, I. (2010). *Pesticidi u poljoprivredi i šumarstvu u Srbiji 2010*. Beograd: Društvo za zaštitu bilja Srbije, Privredni pregled.
- Mitra, S. (2003). *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, USA.
- Molins, C., Hogendoorn, E. A., Dijkman, E., Heusinkveld, H. A., & Baumann, R. A. (2000). Determination of linuron and related compounds in soil by microwave-assisted solvent extraction and reversed-phase liquid chromatography with UV detection. *Journal of Chromatography A*, 869(1), 487-496.
- Molins, C., Hogendoorn, E. A., Heusinkveld, H. A. G., Van Beuzekom, A. C., Van Zoonen, P., & Baumann, R. A. (1998). Effect of organic matter content in the trace analysis of triazines in various types of soils with GC-NPD. *Chromatographia*, 48(5-6), 450-456.
- Monaco, T. J., Weller, S. C., & Ashton, F. M. (2002). *Weed science: principles and practices*. John Wiley & Sons.
- Monks, C. D., & Banks, P. A. (1991). Rotational crop response to chlorimuron, clomazone, and imazaquin applied the previous year. *Weed Science*, 629-633.
- Morrice, P., Giordano, A., Seccia, S., Ungaro, F., & Ventriglia, M. (2001). Degradation of imazosulfuron in soil. *Pest management science*, 57(4), 360-365.
- Moser, S. (2010). Analysis of Sulfonylurea Herbicides. In *20th Annual Quality Assurance Conference (Vol. 19)*.
- Moyer, J. R. (1995). Sulfonylurea herbicide effects on following crops. *Weed technology*, 373-379.

- Moyer, J. R., Bergen, P., & Kozub, G. C. (1989). Chlorsulfuron persistence and response of legumes in an alkaline soil. *Journal of Environmental Science & Health Part B*, 24(1), 37-56.
- Nannipieri, P., Kandeler, E., & Ruggiero, P. (2002). Enzyme activities and microbiological and biochemical processes in soil. *Enzymes in the environment*. Marcel Dekker, New York, 1-33.
- Natarajan, S. S., Krishnan, H. B., Lakshman, S., & Garrett, W. M. (2009). An efficient extraction method to enhance analysis of low abundant proteins from soybean seed. *Analytical biochemistry*, 394(2), 259-268.
- Nicholls, P. H. (1991). Organic contaminants in soils and groundwaters. In *Organic Contaminants in the Environment* (pp. 87-132). Springer Netherlands.
- Niu, H., Shi, Y., Cai, Y., Wei, F., & Jiang, G. (2009). Solid-phase extraction of sulfonylurea herbicides from water samples with single-walled carbon nanotubes disk. *Microchimica Acta*, 164(3-4), 431-438.
- Noy, D. M., & Hollaway, K. L. (2001). Metsulfuron-methyl residues and potential recropping damage in Victorian cropping soils. In *Proceedings of the Australian Weed Conference*, Melbourne, Australia (pp. 42-46).
- Nyström, B., Björnsäter, B., & Blanck, H. (1999). Effects of sulfonylurea herbicides on non-target aquatic micro-organisms: growth inhibition of micro-algae and short-term inhibition of adenine and thymidine incorporation in periphyton communities. *Aquatic toxicology*, 47(1), 9-22.
- Obrigawitch, T. T., Cook, G., & Wetherington, J. (1998). Assessment of effects on nontarget plants from sulfonylurea herbicides using field approaches. *Pesticide science*, 52(3), 199-217.
- Oliveira, R. S., Koskinen, W. C., & Ferreira, F. A. (2001). Sorption and leaching potential of herbicides on Brazilian soils. *Weed Research*, 41(2), 97-110.
- Olmedo, C., Deban, L., Coca, M., Vega, M., & de la Rosa, F. (1997). Electrochemical study of the herbicide Tribenuron Determination in commercial samples. *Fresenius' journal of analytical chemistry*, 357(7), 962-966.
- Oppong, F. K., & Sagar, G. R. (1992). Degradation of triasulfuron in soil under laboratory conditions. *Weed research*, 32(3), 167-173.
- Ostojić N. (2009). Optimizacija uslova za određivanje sulfonilurea visoko pritiskom tečnom hromatografijom u formulacijama pesticida, Master rad, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, pp. 36.
- Pang, N., Wang, T., & Hu, J. (2016). Method validation and dissipation kinetics of four herbicides in maize and soil using QuEChERS sample preparation and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food chemistry*, 190, 793-800.
- Paré, J. R. J., & Bélanger, J. M. R. (1997). *Instrumental methods in food analysis*. Elsevier Science, Amsterdam, The Netherlands.

- Pateiro-Moure, M., Pérez-Novo, C., Arias-Estévez, M., Rial-Otero, R. & Simal-Gándara, J. (2009). Effect of organic matter and iron oxides on quaternary herbicide sorption desorption in vineyard-devoted soils, *Journal of Colloid and Interface Science* 333: 431–438.
- Paul, R., Sharma, R., Kulshrestha, G., & Singh, S. B. (2009). Analysis of metsulfuron methyl residues in wheat field soil: a comparison of HPLC and bioassay techniques. *Pest management science*, 65(9), 963-968.
- Perreau, F., Bados, P., Kerhoas, L., Nélieu, S., & Einhorn, J. (2007). Trace analysis of sulfonylurea herbicides and their metabolites in water using a combination of off-line or on-line solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 388(5-6), 1265-1273.
- Perucci, P., Vischetti, C., & Battistoni, F. (1999). Rimsulfuron in a silty clay loam soil: effects upon microbiological and biochemical properties under varying microcosm conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, 31(2), 195-204.
- Pesek, J. J., & Matyska, M. T. (2006). How to retain polar and nonpolar compounds on the same HPLC stationary phase with an isocratic mobile phase. *LC GC Magazine-North America-Solutions for Separation Scientists*, 30, 89-94.
- Peterson, H. G., Boutin, C., Martin, P. A., Freemark, K. E., Ruecker, N. J., & Moody, M. J. (1994). Aquatic phyto-toxicity of 23 pesticides applied at expected environmental concentrations. *Aquatic Toxicology*, 28(3), 275-292.
- Pierzynski, G. M., Vance, G. F., & Sims, J. T. (2005). *Soils and environmental quality*. CRC press.
- Podlubny, I., 1999. *Fractional differential equations*, Academic Press, San Diego.
- Polati, S., Bottaro, M., Frascarolo, P., Gosetti, F., Gianotti, V., & Gennaro, M. C. (2006). HPLC-UV and HPLC-MS n multiresidue determination of amidosulfuron, azimsulfuron, nicosulfuron, rimsulfuron, thifensulfuron methyl, tribenuron methyl and azoxystrobin in surface waters. *Analytica chimica acta*, 579(2), 146-151.
- Popović, J., Spasić, D., Tosić, J., Kolarović, J., Malti, R., Mitić, I., Pilipović, S., Atanacković, T., 2015. Fractional model for pharmacokinetics of high dose methotrexate in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Commun. Nonlinear Sci. Numer. Simulat.* 22, 451–471.
- Poppell, C.A., Hayes, R.M., Mueller, T.C., 2002. Dissipation of nicosulfuron and rimsulfuron in surface soil. *J. Agric. Food Chem.* 50, 4581-4585.
- Powley, C. R., & de Bernard, P. A. (1998). Screening method for nine sulfonylurea herbicides in soil and water by liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of agricultural and food chemistry*, 46(2), 514-519.
- Pravilnik o količinama pesticida, metala, metaloida i drugih otrovnih supstancija, hemioterapeutika, anabolika i drugih supstancija koje se mogu nalaziti u namirnicama (Službeni list Savezne Republike Jugoslavije broj 5/1992).

- Pravilnik o maksimalno dovoljenim količinama ostataka sredstava za zaštitu bilja u hrani i hrani za životinje i o hrani i hrani za životinje za koju se utvrđuju maksimalno dovoljene količine ostataka sredstava za zaštitu bilja. Službeni glasnik RS, 2010, 25.
- Pravilnik o maksimalno dovoljenim količinama ostataka sredstava za zaštitu bilja u hrani i hrani za životinje i o hrani i hrani za životinje za koju se utvrđuju maksimalno dovoljene količine ostataka sredstava za zaštitu bilja. Službeni glasnik Sl. glasnik RS, br. 29/2014, 37/2014 – isp., 39/2014 i 72/2014.
- Quesada-Molina, C., del Olmo-Iruela, M., & García-Campaña, A. M. (2010). Trace determination of sulfonylurea herbicides in water and grape samples by capillary zone electrophoresis using large volume sample stacking. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 397(6), 2593-2601.
- Reddy, K. N., Zablotowicz, R. M., & Locke, M. A. (1995). Chlorimuron adsorption, desorption, and degradation in soils from conventional tillage and no-tillage systems. *Journal of environmental quality*, 24(4), 760-767.
- Regulation (EC) No 1107/2009. Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 concerning the placing of plant protection products on the market and repealing Council Directives 79/117/EEC and 91/414/EEC. *Off. J. Eur. Union* L309:1–50.
- Regulation (EC) No 178/2002. Commission Regulation (EC) No 178/2002 of the European Parliament and of the Council laying down the general principles and requirements of food law, establishing the European Food Safety Authority and laying down procedures in matters of food safety. *Off. J. Eur. Union* L31:1–24, February 1, 2002.
- Regulation (EC) No. 149/2008 amending Regulation (EC) No. 396/2005 of the European Parliament and of the Council by establishing Annexes II, III and IV setting maximum residue levels for products covered by Annex I thereto. *Official Journal of the European Communities*, No. L 58, 1 March 2008, pp. 1–398.
- Regulation (EC) No. 396/2005 of the European Parliament and of the Council on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC. *Official Journal of the European Communities*, No. L 70, 16 March 2005, pp. 1–16.
- Renner K. A. & G. E. Powell (1991). Response to sugarbeet (*Beta vulgaris*) to herbicide residues in soil. *Weed Technol.* 5, 622-627.
- Rice, P. J., Rice, P. J., Arthur, E. L., & Barefoot, A. C. (2007). Advances in pesticide environmental fate and exposure assessments. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(14), 5367-5376.
- Richards, A. L., 1954. *Diagnosis and Improvement of Saline and Alkali Soils*, Agriculture Handbook No 60, USA.
- Roberts, T. R. (1996). Assessing the environmental fate of agrochemicals. *Journal of Environmental Science & Health Part B*, 31(3), 325-335.

- Rouchaud, J., Neus, O., & Moulard, C. (2001). Analysis of the sulfonylurea herbicide metsulfuron-methyl and its metabolites in the soil of cereal crops. Comparative analytical chemistry of the sulfonylureas. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 79(1), 65-80.
- Sabadie, J. (1990). Hydrolyse chimique acide du metsulfuron methyle. *Weed research*, 30(6), 413-419.
- Sabadie, J. (2002). Nicosulfuron: alcoholysis, chemical hydrolysis, and degradation on various minerals. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(3), 526-531.
- Said-Pullicino, D., Gigliotti, G., & Vella, A. J. (2004). Environmental fate of triasulfuron in soils amended with municipal waste compost. *Journal of environmental quality*, 33 (5), 1743-1751.
- SANCO 825/00, rev. 8.1, Guidance document on pesticide residue analytical methods, European Commission, Health and Consumer Protection Directorate General, 2010.
- SANCO/12571/2013, Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed, European Commission, Health and Consumer Protection Directorate General.
- Santel H. J., Bawden V. M., Sorensen K. M., Mueller K. H., Reynolds J (1990). Flucarbazone-sodium: a new herbicide for grass control in wheat. *Weed Science Am.* 39, 7.
- Sargül, T., & İnam, R. (2009a). A direct method for the polarographic determination of herbicide triasulfuron and application to natural samples and agrochemical formulation. *Bioelectrochemistry*, 75(1), 55-60.
- Sargül, T., & İnam, R. (2009b). Study and determination of the herbicide cyclosulfamuron by square wave stripping voltammetry. *Electrochimica Acta*, 54(23), 5376-5380.
- Sarmah, A. K. (1998). Persistence and mobility of triasulfuron, metsulfuron methyl, and chlorsulfuron in alkaline soils. PhD Thesis. Department of Civil & Environmental Engineering. The University of Auckland, New Zealand.
- Sarmah, A. K., & Sabadie, J. (2002). Hydrolysis of sulfonylurea herbicides in soils and aqueous solutions: a review. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(22), 6253-6265.
- Sarmah, A. K., Kookana, R. S., & Alston, A. M. (1998). Fate and behaviour of triasulfuron, metsulfuron-methyl, and chlorosulfuron in the Australian soil environment: a review. *Australian Journal of Agricultural Research*, 49(5), 775-790.
- Sarmah, A. K., Kookana, R. S., & Alston, A. M. (2000). Leaching and degradation of triasulfuron, metsulfuron-methyl, and chlorsulfuron in alkaline soil profiles under field conditions. *Soil Research*, 38(3), 617-631.
- Sarmah, A. K., Kookana, R. S., Duffy, M. J., Alston, A. M., & Harch, B. D. (2000). Hydrolysis of triasulfuron, metsulfuron-methyl and chlorsulfuron in alkaline soil and aqueous solutions. *Pest management science*, 56(5), 463-471.

- Sauers, R. F., & Levitt, G. (1984). Sulfonylurea synthesis. Pesticide Synthesis through Rational Approaches. Washington, DC: American Chemical Society, 21.
- Schmidt, R. R. (1997). HRAC classification of herbicides according to mode of action. In 1997 Brighton crop protection conference: weeds. Proceedings of an international conference, Brighton, UK, 17-20 November 1997. (No. Volume 3, pp. 1133-1140). British Crop Protection Council.
- Schmuckler, M. E., Barefoot, A. C., Kleier, D. A., & Cobranchi, D. P. (2000). Vapor pressures of sulfonylurea herbicides. *Pest management science*, 56(6), 521-532.
- Schneiders, G. E., Koeppe, M. K., Naidu, M. V., Horne, P., Brown, A. M., & Mucha, C. F. (1993). Fate of rimsulfuron in the environment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(12), 2404-2410.
- Scott, R. P. (2002). Principles and practice of chromatography. Library4science. com, LLC, copyright.
- Seccia, S., Albrizio, S., Fidente, P., & Montesano, D. (2011). Development and validation of a solid-phase extraction method coupled to high-performance liquid chromatography with ultraviolet-diode array detection for the determination of sulfonylurea herbicide residues in bovine milk samples. *Journal of Chromatography A*, 1218(9), 1253-1259.
- Seguin, F., Leboulanger, C., Rimet, F., Druart, J. C., & Bérard, A. (2001). Effects of atrazine and nicosulfuron on phytoplankton in systems of increasing complexity. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 40(2), 198-208.
- Seiden, P., Bossi, R., & Streibig, J. C. (2000). Applicability of ELISA for determination of metsulfuron methyl in soil samples. *Pest management science*, 56(7), 637-643.
- Settle, F.A. (1997). Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry. Prentice Hall.
- Shea, P. J. (1986). Chlorsulfuron dissociation and adsorption on selected adsorbents and soils. *Weed Science*, 474-478.
- Singh, G., & Singh, M. (2002). Bio-efficacy of Metsulfuronmethyl in Combination with Isoproturon for Control of Grassy and Non-grassy Weeds in Wheat. *Indian Journal of Weed Science*, 34(1and2), 9-12.
- Singh, S. B., & Paul, R. (2011). Gas chromatographic method for residue analysis of metsulfuron methyl from soil. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 86(2), 149-151.
- Škorić A., Filipovski G., Ćirić M. (1985): Klasifikacija zemljišta Jugoslavije. Akademija nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine, Posebna izdanja, knjiga LXXVIII, Sarajevo.
- Smith, A. E., & Hsiao, A. I. (1985). Transformation and persistence of chlorsulfuron in prairie field soils. *Weed Science*, 555-557.
- Soloneski, S., & Larramendy, M. L. (2011). Solid-phase extraction for enrichment and separation of herbicides, source: herbicides, theory and applications. Publisher: InTech.

- Sondhia, S. (2008). Persistence of metsulfuron-methyl in wheat crop and soil. *Environmental monitoring and assessment*, 147(1-3), 463-469.
- Sondhia, S., & Singhai, B. (2008). Persistence of sulfosulfuron under wheat cropping system. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 80(5), 423-427.
- Sparks, D. (1986). *Soil Physical Chemistry*, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, USA.
- Sparks, D. (2003). *Environmental Soil Chemistry*, Academic Press, California, USA.
- Spiegel, H., Dersch, G., Dachler, M., Baumgarten, A. (2005). Effects of different agricultural management strategies on soil organic matter. *Soil organic matter and element interactions*, Edited by K. Aichberger and A. Badora, Austrian-Polish Workshop, Arbeitsgemeinschaft für Lebensmittel-, Veterinär- und Agrarwesen (ALVA), Wien. pp. 61-69.
- Sposito, G. (1984). The reactive solid surface in soils, In *The surface chemistry of soils*. Oxford University Press, 143-147, Clarendon Press, ISBN: 0-19-503421-X, New York.
- Srivastava, H. M., & Tomovski, Ž. (2009). Fractional calculus with an integral operator containing a generalized Mittag-Leffler function in the kernel. *Applied Mathematics and Computation*, 211(1), 198-210.
- Stephenson, G. R., Ferris I. G, Holland, P. T, Nordberg, M. (2006). IUPAC Recommendations 2006. Glossary of terms relating to pesticides. International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). Chemistry and the Environment Division. *Pure Appl. Chem.* 78:2075–2154.
- Stidham, M. A. (1991). Herbicides that inhibit acetohydroxyacid synthase. *Weed Science*, 428-434.
- Stork, P. & Hannah, M. C. (1996). A bioassay method for formulation testing and residue studies of sulfonylurea and sulfonamide herbicides. *Weed Research*, 36(3), 271-281.
- Streibig, J. C. (1988). Herbicide bioassay. *Weed Research*, 28(6), 479-484.
- Stumm, W. (1992). *Chemistry of the Solid-Water Interface*, John Wiley Sons, Inc., New York, USA.
- Sweetser, P. B., G. S. Schow, and J. M. Hutchison (1982). Metabolism of chlorsulfuron by plants: biological basis for selectivity of a new herbicide for cereals. *Pesticide biochemistry and physiology* pp. 18-23.
- Tadeo, J. L., Sanchez-Brunete, C., Garcia-Valcarcel, A. I., Martinez, L., & Perez, R. A. (1996). Determination of cereal herbicide residues in environmental samples by gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 754(1), 347-365.
- Tadeo, J. L., Sanchez-Brunete, C., Perez, R. A., & Fernández, M. D. (2000). Analysis of herbicide residues in cereals, fruits and vegetables. *Journal of Chromatography A*, 882(1), 175-191.
- Tang, K. Page, J.S. Kelly, R.T. Marginean, I. (2010) Electrospray Ionization in Mass Spectrometry, in *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry (Second Edition)*, J.C. Lindon, Editor. Academic Press, Oxford, p. 467-474.

- Technical Guidance Document (TGD) (2003). Technical Guidance Document on risk assessment in support of Commission Directive 93/67/EEC on risk assessment for new notified substances, Commission Regulation (EC) No 1488/94 on risk assessment for existing substances and Directive 98/8/EC of the European Parliament and the council concerning the placing of biocidal products on the market. TGD Part II. Institute of Health and Consumer Protection. European Chemicals Bureau.
- Thirunarayanan, K., Zimdahl, R. L., & Smika, D. E. (1985). Chlorsulfuron adsorption and degradation in soil. *Weed Science*, 558-563.
- Tswett, M.S., (1905). Tr .Protok . Varshav . Obshch . 14, Estestvoispyt Otd .Biol .
- Tuzimski, T., & Sherma, J. (Eds.). (2015). *High Performance Liquid Chromatography in Pesticide Residue Analysis* (Vol. 109). Crc Press.
- Ukrainczyk, L., & Ajwa, H. A. (1996). Primisulfuron sorption on minerals and soils. *Soil Science Society of America Journal*, 60(2), 460-467.
- Ukrainczyk, L., & Rashid, N. (1995). Irreversible sorption of nicosulfuron on clay minerals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(4), 855-857.
- United Nations - Population Division: *World Population Prospects: The 2010 Revision*, New York, 2011.
- United States Department of Agriculture - Agricultural Research Service (USDA-ARS). (2001). The ARS Pesticide Properties Database. http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/ad_hoc/12755100DatabaseFiles/PesticidePropertiesDatabase/Allchemicals/listallchemicals.doc.
- Veeh, R. H., Inskeep, W. P., Roe, F. L., & Ferguson, A. H. (1994). Transport of chlorsulfuron through soil columns. *Journal of environmental quality*, 23(3), 542-549.
- Vicari, A., Catizone, P., & Zimdahl, R. L. (1994). Persistence and mobility of chlorsulfuron and metsulfuron under different soil and climatic conditions. *Weed Research*, 34(3), 147-155.
- Vicari, A., Zimdahl, R. L., Cranmer, B. K., & Dinelli, G. (1996). Primisulfuron and rimsulfuron degradation in aqueous solution and adsorption in six Colorado soils. *Weed science*, 672-677.
- Volenberg, D. S., Stoltenberg, D. E., & Boerboom, C. M. (2001). Biochemical mechanism and inheritance of cross-resistance to acetolactate synthase inhibitors in giant foxtail. *Weed Science*, 49(5), 635-641.
- Walker, A., & Brown, P. A. (1983). Measurement and prediction of chlorsulfuron persistence in soil. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 30(1), 365-372.
- Walker, A., Cotterill, E. G., & Welch, S. J. (1989). Adsorption and degradation of chlorsulfuron and metsulfuron-methyl in soils from different depths. *Weed Research*, 29(4), 281-287.

- Wang, H., Ding, J., & Ren, N. (2016). Recent advances in microwave-assisted extraction of trace organic pollutants from food and environmental samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 75, 197-208.
- Wanner, U., Führ, F., & Burauel, P. (2005). Influence of the amendment of corn straw on the degradation behaviour of the fungicide dithianon in soil. *Environmental pollution*, 133(1), 63-70.
- Weber, J. B., Warren, R. L., Swain, L. R., & Yelverton, F. H. (2007). Physicochemical property effects of three herbicides and three soils on herbicide mobility in field lysimeters. *Crop Protection*, 26(3), 299-311.
- Wehtje, G., Dickens, R., Wilcut, J. W., & Hajek, B. F. (1987). Sorption and mobility of sulfometuron and imazapyr in five Alabama soils. *Weed Science*, 858-864.
- Wu, L., Hu, M., Li, Z., Song, Y., Yu, C., Zhang, H., & Wang, Z. (2016). Dynamic microwave-assisted extraction combined with continuous-flow microextraction for determination of pesticides in vegetables. *Food chemistry*, 192, 596-602.
- Wu, Q., Chen, X., Xu, Y., & Han, L. (2010). Dissipation and Residues of Nicosulfuron in Corn and Soil Under Field Conditions. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 85(1), 79-82.
- Wu, Q., Wang, C., Liu, Z., Wu, C., Zeng, X., Wen, J., & Wang, Z. (2009). Dispersive solid-phase extraction followed by dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of some sulfonylurea herbicides in soil by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1216(29), 5504-5510.
- Xi, Y., Mallavarapu, M. & Naidu, R. (2010). Adsorption of the herbicide 2,4-D on organopalygorskite, *Applied Clay Science* 49: 255–261.
- Yan, C., Zhang, B., Liu, W., Feng, F., Zhao, Y., & Du, H. (2011). Rapid determination of sixteen sulfonylurea herbicides in surface water by solid phase extraction cleanup and ultra-high-pressure liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography B*, 879(30), 3484-3489.
- Yan, Q., Li, S. J., Zhan, C. R., & Peng, T. (2004). Simultaneous determination of sulfonylurea herbicides residues in soybeans by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 32(11), 1436-1440.
- Yan, R., Ju, F., Wang, H., Sun, C., Zhang, H., Shao, M., & Wang, Y. (2014). Determination of sulfonylurea herbicides in soil by ionic liquid-based ultrasonic-assisted extraction high-performance liquid chromatography. *Analytical Methods*, 6(24), 9561-9566.
- Yang, L., Zhao, X., & Zhou, J. (2010). Selective enrichment and determination of nicosulfuron in water and soil by a stir bar based on molecularly imprinted polymer coatings. *Analytica chimica acta*, 670(1), 72-77.

- Ye G.B., Zhang W., Cui X., Pan C.P., Jiang S.R. (2006). HPLC-UV and HPLC-MS multiresidue determination of ten sulfonylurea herbicides in soil. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*. 34, 1207–1212.
- Zanini, G., Avena, M., Fiol, S. & Arce, F. (2006). Effects of pH and electrolyte concentration on the binding between a humic acid and an oxazine dye, *Chemosphere* 63: 430–439.
- Zeidler, O. (1874). I. Verbindungen von Chloral mit Brom und Chlorbenzol. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 7(2), 1180-1181.
- Zhang, Y., Wang, J., Wang, G., Gao, C., Yan, Y., & Wen, B. (2015). Optimization of derivatization procedure and gas chromatography–mass spectrometry method for determination of bensulfuron-methyl herbicide residues in water. *Journal of Chromatography B*, 995, 31-37.
- Zhu, Q. Z., Degelmann, P., Niessner, R., & Knopp, D. (2002). Selective trace analysis of sulfonylurea herbicides in water and soil samples based on solid-phase extraction using a molecularly imprinted polymer. *Environmental science & technology*, 36(24), 5411-5420.
- Zohar, Y., Einav, M., Chipman, D. M., & Barak, Z. E. (2003). Acetohydroxyacid synthase from *Mycobacterium avium* and its inhibition by sulfonylureas and imidazolinones. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1649(1), 97-105.