

Univerzitet u Nišu
Prirodno-matematički fakultet
Odsek za hemiju

**Razvoj i primena kinetičkih metoda analize za
kvantitativno određivanje pojedinih pesticida**

Doktorska disertacija

Emilija T. Pecev - Marinković, magistar hemijskih nauka

Niš, 2011.

	PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET NIŠ
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	
Redni broj, RBR:	
Identifikacioni broj, IBR:	
Tip dokumentacije, TD:	monografska
Tip zapisa, TZ:	tekstualni
Vrsta rada, VR:	Doktorska disertacija
Autor, AU:	Mr Emilija Pecev-Marinković
Mentor, MN:	Dr Zora Grahovac
Naslov rada, NR:	Razvoj i primena kinetičkih metoda analize za kvantitativno određivanje pojedinih pesticida
Jezik publikacije, JP:	srpski
Jezik izvoda, JI:	srpski i engleski
Zemlja publikovanja, ZP:	Srbija
Uže geografsko područje, UGP:	Srbija
Godina, GO:	2011.
Izdavač, IZ:	autorski reprint
Mesto i adresa, MA:	Niš, Višegradska 33
Fizički opis rada, FO: (poglavlja/ strana/ citata/ tabela/ slika/ grafika/ priloga)	10 poglavlja, 220 strana, 188 citata, 69 tabela, 94 slika
Naučna oblast, NO:	hemija
Naučna disciplina, ND:	fizička hemija i analitička hemija
Predmetna odrednica/Ključne reči, PO:	Pesticidi:diflubenzuron, bromacil, difenzokvat-metil sulfat, dimetoat, bromfenoksim, ancimidol; kinetičke metode-inhibitorni efekat; SPE ekstrakcija; HPLC analiza
UDK	543.23 + 54.062 : 632.951 + 632.954
Čuva se, ĆU:	biblioteka
Važna napomena, VN:	Rad je rađen u laboratoriji PMF-a

Izvod, IZ:	Predložene su nove kinetičke metode za određivanje mikrokoličina pesticida: diflubenzurona (DFB), bromacila, difenzokvata-metil sulfata (DFQ), dimetoata, bromfenoksima (BrFX) i ancimidola. Indikatorske reakcije za određivanje DFB, bromacila, DFQ, BrFX i ancimidola se zasnivaju na njihovom inhibitornom efektu u reakciji oksidacije sulfanilne kiseline vodonik-peroksidom u fosfatnom puferu u prisustvu Cu^{2+} jona. Indikatorska reakcija za određivanje dimetoata bazira se na njegovom inhibitornom efektu u reakciji oksidacije sulfanilne kiseline kalijum-perjodatom u acetatnom puferu u prisustvu Fe^{3+} jona i 1,10-fenantrolina. Određeni su optimalni uslovi pri kojima pomenuti pesticidi pokazuju najjače inhibitorno dejstvo. Izračunata je tačnost i reproduktivnost određivanja DFB (0,31 do 3,10; 6,23 do 2,25 %), bromacila (2,70 do 16,20 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$; 4,06 do 0,40 %), DFQ (0,36 do 1,80 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$; 3,61 do 1,0 %) dimetoata (196,70 do 28,10 ng/cm^3 , 1,26 do 6,0 %), BrFX (0,041 do 0,46 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$; 1,34 do 2,37 %) i ancimidola (2,15 do 21,50 ng/cm^3 ; 6,65 do 0,30 %). Izračunata je granica detekcije i granica određivanja pomenutih pesticida. Na osnovu zavisnosti brzine katalitičke i katalitičko-inhibitorne reakcije od koncentracije svakog reaktanta pojedinačno i pH vrednosti pufera postavljene su kinetičke jednačine za odgovarajuće procese. Ispitan je uticaj većeg broja stranih jona na brzinu katalitičko-inhibitorne reakcije. Metode su primenjene za određivanje DFB u uzorcima pečuraka, bromacila i ancimidola u vodama i zemljištu, DFQ u uzorcima južnog voća, dimetoata u vodama i mleku, BrFX u sokovima. Priprema uzoraka za analizu vršena je solid-phase ekstrakcijom i tečno-tečnom ekstrakcijom, a kao uporedna metoda za verifikovanje rezultata kinetičke metode korišćena je HPLC analiza. Rezultati dobijeni dvema metodama su u saglasnosti.
Datum prihvatanja teme, DP:	12.07.2010.
Datum odbrane, DO:	
Članovi komisije, KO:	Predsednik: Član: Član, mentor:

Obrazac Q4.09.13 - Izdanje 1

	PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET NIŠ
KEY WORDS DOCUMENTATION	

Accession number, ANO:	
Identification number, INO:	
Document type, DT:	Monography
Type of record, TR:	Textual
Contents code, CC:	Ph.D.dissertation
Author, AU:	Emilija Pecev-Marinković MSc
Mentor, MN:	Zora Grahovac PhD
Title, TI:	Development and application of kinetic methods of analysis for quantitative determination of certain pesticides
Language of text, LT:	Serbian
Language of abstract, LA:	Serbian and English
Country of publication, CP:	Serbia
Locality of publication, LP:	Serbia
Publication year, PY:	2011.
Publisher, PB:	Author's reprint
Publication place, PP:	Niš, Višegradska 33
Physical description, PD: (chapters/pages/ref/tables/pictures/graphs/applications)	10 chapters, 220 pages, 188 references, 69 tables, 94 pictures
Scientific field, SF:	Chemstry
Scientific discipline, SD:	Physical Chemistry and Analytical Chemistry
Subject/Key words, S/KW:	Pesticides: diflubenzuron, bromacil, difenzoquat-methyl sulfat, dimethoat, bromofenoxim, ancyimidol; kinetic methods-inhibited effects; SPE Extraction; HPLC analysis
UC	$543.23 + 54.062 : 632.951 + 632.954$
Holding data, HD:	Library
Note, N:	

Abstract, AB:

The new kinetic methods for determination of microgram amounts of pesticides: diflubenzuron (DFB), bromacil, difenzoquat-methylsulphate (DFQ), dimethoate, bromofenoim (BrFX) and ancymidol were described. Indicatory reaction for determination DFB, bromacile, DFQ, BrFX and ancymidol is based on their inhibited effects in oxidation reaction of sulphanile acid with hydrogen-peroxide in phosphate buffer in presence of Cu^{2+} ions. Indicatory reaction for dimethoate determination is based on its inhibited effect in oxidation reaction of sulphanile acid with potassium-periodate in acetate buffer in presence of Fe^{2+} ions and 1,10-phenanthroline. Optimal conditions for determination of those pesticides were found. The accuracy and precision of the method was calculated. The limit detection of pesticides which can be determined by this method was calculated by the method given by Perez-Bendito and Silva. On the basis of the dependence between the rate of catalyzed, and inhibited reaction and concentration of reactants, kinetic equations for each reaction were calculated. To assess the selectivity of the method, the influence of several foreign ions on the rate of inhibitory reactions was examined. The developed method was applied to the determination of DFB in mushrooms, bromacile and ancymidol in water and soil, DFQ in fruit samples, dimethoate in water and milk, BrFX in fruit drinks. Solid-phase extraction and liquid-liquid extraction were used for the samples preparation. HPLC analysis was used like an comparative method to verify results of kinetic method.

Accepted by the Scientific Board on, ASB:

12.07.2010.

Defended on, DE:

Defended Board, DB: President:

Member:

Member, Mentor:

Obrazac Q4.09.13 - Izdanje 1

*Sačuvajmo veru, jer bez nje nema života,
ali ne odbacujmo ni sumnju,
jer bez nje nema napretka
i pokušajmo, bar ponekad, da posumnjamo
u ono što sami mislimo da činimo - jer to je teže,
ali donosi zrelije plodove.*

Doktorska disertacija je rađena u laboratoriji Katedre za analitičku hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu.

Temu za doktorsku disertaciju predložila je dr Zora Grahovac, redovni profesor PMF-a u Nišu, kojoj se ovom prilikom zahvaljujem na svestranoj pomoći i sugestijama tokom izrade rada.

Veliku zahvalnost dugujem dr Snežani Mitić redovnom profesoru PMF-a u Nišu koja je stučnim savetim, sugestijama i primedbama doprinela kvalitetu ove doktorske disertacije.

Zahvaljujem se dr Mirjani Obradović redovnom profesoru PMF-a u Nišu i dr Ranku Simonoviću redovnom profesoru PMF-a u Kosovskoj Mitrovici što su se rado prihvatali ocene ove doktorske disertacije.

Posebnu zahvalnost dugujem svome ocu i profesoru dr Todoru Pecevu koji me je svih godina moga rada podržavao, davao mi stručne savete iz oblasti kinetičkih metoda analize i verovao u moj uspeh i majci koja je imala razumevanja za moj rad.

Zahvaljujem se svom suprugu Draganu na strpljenju, pomoći i podršci tokom izrade doktorske disertacije i sinu Todoru na radosnim osmesima i zagrljajima.

Svima se najiskrenije zahvaljujem.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DEO	4
2.1. Pesticidi – opšte osobine	5
2.2. Osobine pesticida	6
2.2.1. Fizičke osobine pesticida	6
2.2.2. Hemijske osobine pesticida	13
2.2.2.1. Hemijska reaktivnost (stabilnost)	14
2.3. Toksikološke osobine pesticida	14
2.4. Posledice štetnog dejstva pesticida	16
2.4.1. Hemijska kontaminacija hrane	17
2.4.2. Vrste trovanja	18
2.5. Podela pesticida	18
2.6. Osnovni putevi rasprostiranja pesticida	22
2.6.1. Pesticidi u zemljištu	23
2.6.2. Pesticidi u atmosferi	23
2.6.3. Pesticidi u hidrosferi	24
2.7. Dejstvo pesticida na biljke	26
2.8. Ulazak pesticida u lanac ishrane	27
2.9. Pesticidi u organizmu toplokrvnih životinja i čoveka	29
2.10. Mehanizam delovanja pesticida	30
3. HERBICIDI, INSEKTICIDI I METODE ODREĐIVANJA	33
3.1. Herbicidi – opšte osobine	34
3.1.1. Mehanizam dejstva herbicida.....	35
3.2. Bromacil.....	38
3.2.1. Metode za određivanje bromacila.....	40
3.3. Difenzokvat – metil sulfat.....	43
3.3.1. Metode za određivanje difenzokvat – metil sulfata.....	45
3.4. Bromfenoksim.....	47
3.4.1. Metode za određivanje bromfenoksima.....	48
3.5. Ancimidol.....	50
3.5.1. Metode za određivanje ancimidola.....	53
3.6. Insekticidi – opšte osobine	54
3.6.1. Mehanizam dejstva insekticida	55
3.7. Diflubenzuron	57
3.7.1. Metode za određivanje diflubenzurona	62
3.8. Dimetoat	65
3.8.1. Metode za određivanje dimetoata	70
4. KINETIČKE METODE I METODE ODVAJANJA	73
4.1. Osnovni pojmovi hemijske kinetike	74
4.2. Teorija reakcionih brzina	76
4.3 Faktori koji utiču na brzinu hemijske reakcije	76

4.3.1. Uticaj koncentracije reaktanata	76
4.3.2. Uticaj temperature	77
4.3.3. Uticaj rastvarača	78
4.3.4. Uticaj katalizatora	79
4.3.5. Uticaj aktivatora	80
4.4. Metode za određivanje katalitički aktivnih supstanci u rastvoru na osnovu kinetičkih podataka	81
4.5. Ekperimentalne metode za praćenje brzine hemijskih reakcija.....	86
4.6. Karakteristike kinetičkih metoda analize.....	87
4.7. Aktivacija i inhibicija.....	93
4.7.1. Uticaj konstante formiranja na kompleks katalizator-inhibitor.....	96
4.7.2. Analitičke upotrebe inhibitornog efekta.....	96
4.8. Regresiona i korelaciona analiza.....	98
4.8.1. Regresiona analiza.....	98
4.8.2. Korelaciona analiza.....	101
4.9. Hromatografija.....	102
4.9.1. HPLC hromatografija.....	104
4.10. Solid - Phase Ekstrakcija (SPE).....	107
5. REZULTATI I DISKUSIJA	112
5.1. Kinetičko određivanje mikrokoličina diflubenzurona.....	113
5.1.1. Primena kinetičke metode za određivanje diflubenzurona u uzorcima pečuraka	121
5.2. Kinetičko određivanje mikrokoličina bromacila.....	125
5.2.1. Primena kinetičke metode za određivanje bromacila u uzorcima vode i zemljjišta.....	131
5.3. Kinetičko određivanje mikrokoličina difenzokvat-metil sulfata.....	136
5.3.1. Primena kinetičke metode za određivanje difenzokvat-metil sulfata u uzorcima voća.....	143
5.4. Kinetičko određivanje mikrokoličina dimetoata.....	148
5.4.1. Primena kinetičke metode za određivanje dimetoata u uzorcima vode i mleka	157
5.5. Kinetičko određivanje mikrokoličina bromfenoksima.....	161
5.5.1. Primena kinetičke metode za određivanje bromfenoksima u sokovima	168
5.6. Kinetičko određivanje mikrokoličina ancimidola.....	171
5.6.1. Primena kinetičke metode za određivanje ancimidola u uzorcima vode i zemljjišta	178
6. EKSPERIMENTALNI DEO	183
6.1 Eksperimentalni postupak.....	184
6.1.1. Aparati.....	184
6.1.2. Reagensi.....	184

6.1.3. Spektrofotometrijski postupak za praćenje brzine indikatorske reakcije.....	186
6.1.4. Priprema uzorka za analizu.....	187
7. ZAKLJUČAK	192
8. SUMMARY	196
9. LITERATURA	200
10. BIOGRAFIJA SA BIBLIOGRAFIJOM.....	215

Skraćenice

ADI - Prihvatljivi dnevni unos (Acceptable Daily Intake)

ATP - Adenozin-5'-tri fosfat

ALS - Acatolaktat sintetaza

ACN - Acetonitril

APCI-MS - Atmospheric pressure chemical ionization

Ad-SSWV - Adsorptivna striping talasna voltametrija

ASE - Accelerated Solvent Extraction

BrFX - Bromfenoksim

CAS - Servis za hemijske apstrakte (Chemical Abstract Service)

CE-ICP-MS - Kapilarna elektroforeza kuplovana sa indukovano spregnutom plazmom i masenim spektrometrom

DFB - Diflubenzuron

DFQ - Difenzokvat-metil sulfat

DMI-GC-ToF-MS - Difficult matrix introduction-gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry

DAD - Diode Array Detection

DDT – Dihlor-difenil-trihlor etan

DHM - Dihlormetan

DCM - Dihlormetan

DT₅₀ - Vreme potrebno da se razradi 50 % pesticida od početne koncentracije

DNOC - 4,6-dinitro-o-krezol

DNBPA - Akriloil-3-hidroksipropil-3,5-dinitro benzoat

2,4-D – Dihlorfenoksi sirćetna kiselina

EGTA - Etilenglikol-bis (2-aminoetiletar)-NNN'N'- tetra sirćetna kiselina

EPA - Agencija za zaštitu spoljne sredine

FMAE - Usmerena mikrotalasna potpomognuta ekstrakcija (Focused microwave-assisted extraction)

FAO - Organizacija Ujedinjenih Nacija za hranu i agrikulturu (Food and Agriculture Organization of the United Nations)

GC-NPD - Gasna hromatografija sa azotno-fosfornim detektorom

GC-FID - Gasna hromatografija sa plameno jonizacionim detektorom

GC-MS - Gasna hromatografija sa masenim detektorom

HPLC-TMS - Hromatografija pod visokim pritiskom-tandem masena spektrometrija

HRAC/Moa - Herbicide Resistance Action Committee/Mechanism of action

HCH - Heksahlorcikloheksan

HPLC - Hromatografija pod visokim pritiskom

HPLC-UV-DAD - Hromatografija pod visokim pritiskom sa UV i DAD detekcijom

HPTLC - Tankoslojna hromatografija pod visokim pritiskom

IUPAC - Međunarodno Udruženje za čistu i primenjenu hemiju (International Union of Pure and Applied Chemistry)

ITM - Jon trap maseni

IC - Infracrveno zračenje

ISO/TCO - Internacionalna Organizacija za Standardizaciju/Tehnički Komitet (International Organization for Standardisation/Technical Committee)

LD₅₀ - Srednje letalna doza

LC₅₀ - Srednje letalna doza za vodene organizme

LC-ESI/MS/MS - Tečna hromatografija kuplovana elektrosprej ionizacijom-tandem masena spektrometrija

LP-GC/MS - Gasna hromatografija pod niskim pritiskom sa masenim spektrometrom

LC-MS-MS - Tečna hromatografija tandem masena spektrometrija

MDL ili LD₁₆ - Minimalna letalna doza

MDK - Maksimalno dozvoljena doza

MCPA - 2-metil-4-hlorfenoksi sirćetna kiselina

MRL - Maksimalno dozvoljene količine

MEKC - Micelarna elektrokinetička hromatografija

MSPE - Matriks čvrsto-tečna ekstrakcija

NTA - Nitrilo-tri sirćetna kiselina

NMR - Nuklearno magnetna rezonanca

OUN - Organizacija Ujedinjenih Nacija

PDU - Prihvatljiv dnevni unos

SA - Sulfanilna kiselina

SADPCI-MS - Površinska desorpcija pod atmosferskim pritiskom hemijska ionizacija-masena spektrometrija (Surface desorption atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry)

SFE - Superkritična fluidna ekstrakcija (Supercritical Fluid Extraction)

SPME - Čvrsto-tečna mikroekstrakcija

SBSE - Stir Bar Sorptive Extraction

SRM - Selektovani reakcioni monitoring (Selected reaction monitoring)

SFC - Superkritična fluidna hromatografija

SIM - Selektovani jon monitoring (Selected Ion Monitoring)

2,4,5-T - 2,4,5-Trihlor fenoksi sirćetna kiselina

TOF - Time of flight

UV - Ultra violetno zračenje

WHO - Svetska Zdravstvena Organizacija (World Health Organization)

QTOF - Kvadripol time of flight (Quadrupole)

1. UVOD

Čovekov kontakt sa otrovima vremenom je postajao sve veći i bliži, dobivši, u naše vreme razmere koje nisu mogle ni da se zamisle. Nekada su otrovi izazivali strah kod ljudi, a danas kao da čovek od njih manje zazire, iako za to nema realnih osnova, jer otrov je bio i ostao stalna potencijalna opasnost.

Čovek se postepeno privikava na otrove, ne biološki, jer takva adaptacija nije moguća, već mentalno, na stanje u kojem živi kao na normalne uslove. Ukoliko se prisustvo otrova u životu savremenog čoveka prihvati kao neminovnost, onda je dobro poznavanje otrova od najvećeg značaja, radi korišćenja njihovog delovanja, uz što manje štetnih posledica.

Danas u životnu sredinu dospevaju ogromne količine različitih hemijskih jedinjenja. Mnoga od njih se ne razlažu na prostije neškodljive proizvode, već se nagomilavaju u atmosferi, vodi ili zemljištu i transformišu se u još škodljivije proizvode. Zbog veoma raširene upotrebe brojnih hemikalija u procesima proizvodnje i prerade namirnica, kao i sve veće zagađenosti životne sredine, dolazi do ulaska velikog broja nenutritivnih komponenata u lanac ishrane čoveka. Iako se ove supstance u namirnicama najčešće nalaze u malim tzv. rezidualnim količinama, posledice njihovog delovanja nisu zanemarljive.

Mnogi sastojci namirnica su hemijski stabilna jedinjenja, dok su druga veoma nestabilna. U postupcima proizvodnje namirnica, njihove prerade, prometa i čuvanja prehrambeni proizvodi mogu se neželjeno „obogatiti“ stranim supstancama kao što su toksični elementi, hormoni, rezidue pesticida.

Za razliku od većine zagađujućih supstanci koje se u životnu sredinu unose bez određenog cilja, pesticidi se unose sa namerom da pomognu čoveku - povećanjem prinosa u poljoprivredi i suzbijanjem štetnih organizama.

Analitičaru su u analizi rezidua pesticida u hrani i vodi neophodne osnovne informacije o njihovim osobinama, o opasnostima koju predstavljaju po zdravlje ljudi i putevima njihovog ulaska u lanac ishrane.

Nekontrolisana primena pesticida u pogledu vrste i količine datog jedinjenja, kao i u pogledu pogrešno izabranog perioda vremena koje je potrebno da protekne od tretiranja biljke do njihovog ubiranja (karenca) dovodi do neželjenih posledica na zdravlje ljudi, korisnih insekata i životinja. Iz tog razloga neophodna je kontrola prisutnih pesticida u hrani, vodi i zemljištu.

Određivanje pesticida i njihova stalna kontrola je veoma važna jer se pesticidi razlikuju po hemijskoj strukturi, načinu delovanja, biotransformaciji, načinu eliminacije iz organizma kao i po različitom stepenu toksičnosti. Prema podacima koje su objavljene od strane epidemioloških studija, uticaj dugotrajne izloženosti reziduama pesticida dovodi do pojave malignih oboljenja, alergija i oštećenja brojnih vitalnih organa. Iz navedenih razloga postoji stalna potreba za razvojem novih, osjetljivih analitičkih metoda za kvantitativno praćenje i određivanje pesticida u biološkom materijalu i hrani.

Ova doktorska disertacija je doprinos razvoju novih kinetičkih metoda u cilju kvantitativnog određivanja mikrogramskih količina pesticida: diflubenzurona, bromacila, dimetoata, bromfenoksima, difenzokvat-metilsulfata i ancimidola, kao i primena datih metoda za njihovo određivanje u uzorcima hrane, vode i zemljišta.

Kinetičke metode hemijske analize pružaju mogućnost za brzo i veoma selektivno određivanje niskih koncentracija raznih supstanci u rastvoru. Isto tako, kinetičke metode analize ne zahtevaju skupu opremu i koriste lako dostupne reagense, te ih to čini pristupačnim za analizu u laboratorijskim uslovima.

Pregledom literature (Science Citation Index i Chemical Abstract) nisu pronađeni podaci iz oblasti kinetičkih metoda analize za određivanje mikrogramskih količina pesticida, tako da je zadatak ove doktorske disertacije sledeći:

- ispitati uticaj pomenutih pesticida na brzinu odabrane indikatorske reakcije;
- primeniti spektrofotometrijski postupak za praćenje brzine reakcije;
- za obradu kinetičkih podataka primeniti tangensnu metodu zbog postojanja linearne zavisnosti apsorbance rastvora tokom prvih 5-6 minuta od početka odigravanja reakcije.

U cilju razrade što osetljivije metode za određivanje mikrogramskih količina pesticida biće potrebno sledeće:

- ispitati optimalne eksperimentalne uslove pri kojima ispitivani pesticid pokazuje najjače delovanje na brzinu indikatorske reakcije;
- ispitati zavisnost brzine reakcije od koncentracije svakog pojedinačnog reaktanta i odrediti red reakcije u odnosu na svaki reaktant pojedinačno;
- postaviti kinetičke jednačine za ispitivane procese;
- odrediti tačnost i reproduktivnost određivanja pomenutih pesticida odabranom kinetičkom metodom;
- odrediti minimalnu koncentraciju pesticida koja se može odrediti datom reakcijom, izračunati granicu određivanja i granicu detekcije;
- ispitati uticaj stranih jona na tačnost i reproduktivnost određivanja pesticida kinetičkom metodom;
- ispitati mogućnost primene date kinetičke metode za određivanje pesticida u realnim uzorcima.

2. TEORIJSKI DEO

2.1. Pesticidi - opšte osobine

Uloga hrane u životu čoveka je višestruka. Hranom se unoše mikroelementi i vitamini čime hrana ostvaruje svoju zaštitnu funkciju. Pored toga u organizam se zagađenom hranom i vodom mogu uneti mnoge strane supstance koje štetno deluju. Zbog veoma raširene upotrebe brojnih hemikalija u procesima proizvodnje i prerade namirnica, kao i sve veće zagađenosti životne sredine, dolazi do ulaska velikog broja nenutritivnih komponenata u lanac ishrane čoveka. Postoji više od 60000 kontaminanata hrane i vode sa još uvek malo poznatim posledicama na ljudsko zdravlje. Iako se ove supstance u namirnicama nalaze u malim tzv. rezidualnim količinama, posledice njihovog delovanja nisu zanemarljive.

Mnogi sastojci namirnica su hemijski stabilna jedinjenja, dok su drugi veoma nestabilna. U postupcima proizvodnje namirnica, njihove prerade, prometa, čuvanja, prehrambeni proizvodi mogu da se neželjeno „obogate“ stranim supstancama kao što su toksični elementi, hormoni, lekovi, rezidui pesticida (Mirić i Šobajić, 2002).

Pesticidi kao hemijska sredstva za suzbijanje štetnih mikroorganizama, insekata, glodara, korova, zauzimaju posebno mesto, jer su toksični za korisne organizme i čoveka. Potencijalna opasnost je izraženija jer se pesticidi masovno primenjuju u agronomiji, šumarstvu, stočarstvu u konstruktivne svrhe, a takođe se mogu primeniti kao hemijska oružja i u destruktivne svrhe. Nestručna i neracionalna primena hemijskih jedinjenja, a posebno pesticida, može biti toksična tokom proizvodnje, prometa, primena, pa kasnije tokom razgradnje. Shvatajući ozbiljnost i složenost ove problematike, danas se u razvijenim zemljama vrlo intenzivno i komplesno proučavaju mogućnosti njihove racionalne primene, s potencijalnim opasnostima toksičnog delovanja na korisne organizme (Soldatović i sar., 1980).

Pod pesticidima se podrazumevaju hemijska jedinjenja organskog, neorganskog i prirodnog porekla, koja se primenjuju u poljoprivredi, šumarstvu, veterinarstvu, prehrambenoj industriji i komunalnoj higijeni radi suzbijanja fitopatogenih organizama, štetnih insekata, nematoda, glodara, ptica, kao i za suzbijanje korova i regulisanje rasta biljaka. Pesticid potiče od latinske reči *pestis* - zaraza, bolestina, kuga i *cedere* - ubiti, uništiti.

Istorija korišćenja pesticidnih sredstava veoma je duga. Sumpor je korišćen u Kini još hiljadite godine pre nove ere kao fungicidno sredstvo, a u Evropi je primenjen kao fungicid tek 1800. godine. Ekstrakt lista duvana je korišćen 1690. godine kao insekticid. Bakar-sulfat je 1882. godine uveden u zaštitu vinove loze, a 10 %-ni rastvor sumporne kiseline je na početku XX veka služio za uništavanje nekih vrsta korova. 1930. godina se smatra početkom ere korišćenja modernih pesticida.

Prema zvaničnim podacima FAO, ukoliko se ne bi koristili pesticidi samo u toku jedne godine, biljne bolesti i štetni insekti i korovi smanjili bi svetsku proizvodnju hrane za 25-30 %, a gubici uskladištenih namirnica povećali bi se za još 10-15 %. Racionalnom primenom hemijskih sredstava, pre svega herbicida, proizvodi se samo u SAD višak žita dovoljan da ishrani pola milijarde stanovnika. Ukupan prinos svih kultura povećan je, u proseku, 2 do 3 puta primenom pesticida (Živanović, 2002).

U svetu i kod nas su poznate masovne i ekstenzivne štete u poljoprivredi koje su nanosile biljne i životinjske bolesti s jedne strane, i korovi s druge strane. Između 1842. i 1847. godine zbog štete u poljoprivredi u svetu je vladala glad koja je prouzrokovala smrt četvrtine stanovništva i emigraciju još četvrtine u zemlje Afrike i Australije. I danas prema saopštenju OUN-a, svake godine insekti pojedu trećinu svetskog prinosa žitarica. Ako se tome doda podatak da različite vrste korova prouzrokuju štetu od oko 75 milijardi dolara godišnje u svetskoj proizvodnji hrane, onda se stiče prava slika potrebe za pesticidima. Zbog toga oni nesumnjivo pružaju čoveku neprocenjivu korist u zaštiti gajenih kultura.

2.2. Osobine pesticida

Kod pesticida se mogu razlikovati tri grupe osobina koje karakterišu njihova svojstva. To su :

- fizičke
- hemijske i
- toksikološke osobine.

Fizičke osobine određuju ponašanje i postojanost pesticida u različitim uslovima u kojima se ova jedinjenja mogu naći.

Hemijske osobine određuju reaktivnost i postojanost na različite hemijske uticaje.

Toksikološke osobine karakterišu otrovnost i način delovanja na biljke i druge životne organizme.

2.2.1. Fizičke osobine pesticida

Poznavanje fizičkih osobina pesticida preduslov je za njihovu uspešnu primenu, za razumevanje njihovog ponašanja u zemljištu, vodi i atmosferi, kao i za njihovo čuvanje. Savremena primena pesticida zahteva dobro poznavanje osobina pesticida među kojima fizičke osobine igraju veoma važnu ulogu.

Fizičke osobine, pored hemijskih, imaju jak uticaj na aktivnost pesticida na različite vrste štetnih organizama, na spoljnu sredinu, na mašine za primenu i na ukupno njihovo ponašanje. Veliki praktični značaj imaju sledeće fizičke osobine pesticida:

- izgled (agregatno stanje)
- boja
- miris
- tačka mržnjenja i topljenja
- gustina
- viskozitet
- koeficijent difuzije
- indeks prelamanja svetlosti
- optička aktivnost
- površinski napon
- napon pare

- dipolni momenat
- dielektrična konstanta
- električna provodljivost
- toplota topljenja i toplota isparavanja
- kritična temperatura i kritični pritisak
- isparavanje
- rastvorljivost
- podeoni koeficijent
- zapaljivost.

Izgled (agregatno stanje)

Pod normalnim atmosferskim uslovima (temperatura vazduha 20°C i vazdušni pritisak 101,325 kPa) pesticidi se mogu nalaziti u tečnom ili čvrstom agregatnom stanju. Većina pesticida se pri normalnim uslovima nalazi u čvrstom agregatnom stanju.

Boja

U čistom stanju, pesticidi kao organska jedinjenja redeapsorbuju vidljive zrake nego IC ili UV, te su najčešće zbog toga bezbojni ili beli. U hemijski čistom stanju većina pesticida je bezbojna ili bele boje, dok tehnički proizvodi mogu biti slabije ili jače obojeni, što zavisi od vrste jedinjenja, tehnološkog postupka, načina proizvodnje, količine primesa i nečistoća. U identifikaciji pesticida boja može biti važan pokazatelj koji ukazuje na prisustvo određenih grupa u molekulu.

Miris

Pesticid čiji je napon pare dovoljno visok ima izvestan miris. Pesticidi mogu imati karakteristični miris i mogu biti bez mirisa.

Intenzitet mirisa pesticida koji pripadaju istoj klasi jedinjenja zavisi od stepena isparljivosti. Jači miris imaju pesticidi sa nižom tačkom ključanja. Mirisi pesticida mogu biti veoma različiti jer pripadaju velikom broju različitih hemijskih jedinjenja.

Tačka mržnjenja i topljenja

Tačka mržnjenja, odnosno topljenja, predstavlja temperaturu na kojoj pesticid prelazi iz tečnog u čvrsto agregatno stanje i obrnuto. Za primenu i čuvanje pesticida, izuzetno je važno poznavati tačku mržnjenja i topljenja. Na tačku topljenja ima uticaj oblik molekula. Račvast oblik molekula snižava tačku topljenja pošto molekul postaje sve više loptast, površina mu se smanjuje, a time i intermolekulske sile.

Tačka topljenja je karakteristična i konstantna za svaki pesticid i zbog toga predstavlja važan podatak za identifikaciju pesticida i stepen utvrđivanja njihove čistoće. Poznavajući tačku mržnjenja i tačku topljenja moguće je odrediti u kakvom će se agregatnom stanju nalaziti pesticid za vreme čuvanja i posle primene pod određenim meteorološkim uslovima. U tabeli 1 date su vrednosti za tačke topljenja nekih pesticida.

Tabela 1. Tačke topljenja nekih pesticida

Pesticid	Tačka topljenja (°C)
Butahlor	-5
Acetohlor	0
Cijanofos	14-15
Klonazol	25
Bifenetrin	51-66
Amitraz	86-88
Bromadiolon	200-210
Karbedazim	302-307

Tačka ključanja

Tačka ključanja predstavlja temperaturu na kojoj pesticid iz tečnog agregatnog stanja prelazi u paru, odnosno gas. Tačka ključanja predstavlja važnu karakteristiku pesticida, jer se na osnovu nje može prosuditi o postojanosti tog jedinjenja u određenim uslovima. Pesticidi sa nižom tačkom ključanja kraće se zadržavaju na zemlji i delovima biljaka, tj. brže isparavaju i za kraće vreme mogu se postići veće koncentracije pesticida u vazduhu. Pesticidi sa visokom tačkom ključanja teže isparavaju i njihovim običnim isparavanjem mogu se postići visoke koncentracije para u vazduhu. Tačka ključanja pesticida zavisi od njegove prirode, te ima veliku vrednost za karakterizaciju i identifikaciju nepoznatog pesticida.

Tabela 2. Tačke ključanja nekih pesticida

Pesticid	Tačka ključanja (°C)
Fosfin	-87,4
Fention	87
Alahlor	100
Cikloat	145-146
Hlordan	175
Dikamba	>200
Dikrotofos	400

Gustina

Gustina je masa jedinice zapremine. Vrednosti gustine daju se u g/cm³. Ona opada pri povišenju temperature, a ove promene su različite za različite pesticide. Poznavanje gustine, naročito za pesticide u tečnom agregatnom stanju ima veliki značaj. Pesticidi koji u tečnom agregatnom stanju imaju veću gустину od jedinice, a ne rastvaraju se u vodi, zadržavaju se u donjim slojevima i obrnuto.

Tabela 3. Gustine nekih pesticida

Pesticid	Gustina (g/cm ³)
Fenmedifam	0,34-0,54
Butilat	0,95
Acetohlor	1,13
Dihlorprop	1,42
2,4-D	1,56
Dikamba	1,57
Haloksifor	1,64

Viskozitet

Viskozitet je veoma važna fizička osobina pesticida, od koje zavise mogućnosti njihove primene u različitim uslovima. Viskoznost je osobina tečnosti ili gasova da se opiru promeni oblika, tj. opiru se pokretanju susednih čestica, jednih u odnosu na druge.

Optička aktivnost

Neki pesticidi i rastvori pesticida imaju osobinu da obrću ravan polarizovane svetlosti bilo u pravcu kretanja kazaljke na satu, bilo u obrnutom pravcu. Takvi pesticidi su optički aktivni. Rotaciona moć, merena u standardnim uslovima, predstavlja specifičnu fizičku konstantu veoma korisnu za karakterizaciju i identifikaciju nekog optički aktivnog pesticida. Za dokazivanje enantiomernih oblika ovo je jedini kriterijum za razlikovanje, jer čisti enantiomeri imaju identične sve ostale fizičke osobine (tačku topljenja, tačku ključanja, gustinu, indeks prelamanja), a razlikuju se samo po tome što različito obrću ravan polarizovane svetlosti udesno (desnogiri) i ulevo (levogiri).

Tabela 4. Specifične rotacije nekih pesticida

Pesticid	Specifična rotacija
Tralometrin	$\alpha_D + 21^\circ$
Transflutrin	$\alpha_D^{29} + 15,3^\circ$
Streptomycin	$\alpha_D + 84^\circ$
Deltrametrin	$\alpha_D + 61^\circ$
Mekoprop-P	$\alpha_D + 14,1^\circ$
Bioaletrin	$\alpha_D^{30} - 78,5^\circ$

Napon pare

Napon pare pesticida je pritisak pri kome se na datoj temperaturi uspostavlja ravnoteža između gasovite i čvrste ili tečne faze. Povećava se sa povećanjem temperature i kada se izjednaci sa postojećim atmosferskim pritiskom pesticid u tečnom agregatnom stanju ključa. Napon pare je u vezi sa tačkom ključanja pesticida i ukoliko je on viši, tačka ključanja je niža i obrnuto.

Pesticidi sa malim naponom pare isparavaju sporo. Napon pare opada sa sniženjem temperature. Poznavanje napona pare nekog pesticida ima praktičan značaj. Ova fizička konstanta primenjuje se u mnogim teorijskim ispitivanjima. Brzo isparavanje pesticida je nepoželjno, naročito kada se radi sa otrovnim i zapaljivim pesticidima. Za izražavanje isparljivosti pesticida primenjuje se relativna skala izražena brojevima u odnosu na etar kao jedinicu. Po toj skali pesticidi se dele na:

- lako isparljive sa relativnom isparljivošću do 5
- srednje isparljive, sa relativnom isparljivošću od 5 do 35
- teško isparljive sa relativnom isparljivošću iznad 35.

U tabeli 5 data je komparacija rastvorljivosti, napona pare i isparljivosti nekih pesticida.

Tabela 5. Komparacija između rastvorljivosti u vodi, napona pare i isparljivosti pesticida

Pesticid	Rastvorljivost u vodi (mg/dm ³)	Napon para (μPa) na 25°C	Isparljivost
Pebulat	60	4666270	233333
Vernolat	90	1333220	66666
Cikloat	85	826596	41333
Propanid	15	11333	566
Atrazin	33	13	1
Simazin	5	2	0,14
Alahlor	242	2933	146

Dipolni momenat

Dipolni momenat je proizvod rastojanja između pozitivnog i negativnog nanelektrisanja u molekulu i jačine jednog od nanelektrisanja. On određuje hemijske osobine pesticida, odnosno njegovo učešće u reakcijama koje se odigravaju u rastvoru. Od polarnosti pesticida zavise specifična moć rastvaranja, isparljivost, stepen asocijacije. Polarni pesticidi bolje rastvaraju polarna jedinjenja i manje su isparljivi od nepolarnih. Oni su po pravilu aktivni rastvarači, koji utiču na osobine drugih polarnih jedinjenja u rastvoru, učestvuju u intermedijarnim reakcijama i utiču na smer i brzinu konačne reakcije.

Toplota topljenja i toplota isparavanja

Toplota topljenja pesticida je količina toploće potrebna da se određena količina (1g ili 1 mol) prevede iz čvrstog u tečno stanje.

Toplota isparavanja je količina toploće potrebna da se određena količina pesticida prevede iz tečne u gasovitu fazu.

Isparavanje

Isparavanje je pojava kada pesticid iz tečnog ili čvrstog agregatnog stanja prelazi u stanje pare odnosno gasa. Isparavanje se vrši na svakoj temperaturi. Veće je i brže ukoliko je viša temperatura supstance koja isparava. Pod isparljivošću se podrazumeva količina pesticida koja može da ispari u vazduhu do maksimalne koncentracije (koncentracija zasićenja) i izražava se u mg/dm³ i g/cm³ ili mg/m³.

Rastvorljivost

Ova osobina pesticida označava njegovu rastvorljivost u vodi ili drugim rastvaračima. Ona predstavlja količinu pesticida koja se pri određenoj temperaturi rastvara u jedinici zapremine rastvarača. Raste sa porastom temperature. Kod pesticida u čvrstom agregatnom stanju brzina rastvaranja zavisi ne samo od hemijske prirode već i stepena usitnjjenosti, odnosno krupnoće čestica. Kada voda sadrži maksimalnu količinu rastvorenog pesticida, rastvor je zasićen. Pesticidi koji su slabo rastvorni u vodi teže se spiraju sa tretiranih biljnih delova i zemljišta.

U dekontaminaciji i detekciji pesticida veoma je važno poznavati rastvorljivost pesticida, jer od toga zavisi na koji će se način i pomoću kojih supstanci izvršiti njegova dekontaminacija, odnosno ekstrakcija iz različitih materijala.

Tabela 6. Rastvorljivost nekih pesticida u vodi

Pesticid	Rastvorljivost (mg/dm ³) 20-25°C
Aletrin	Praktično nerastvoran
Amitraz	$1 \cdot 10^{-7}$
Befenetrin	$1 \cdot 10^{-4}$
Dihlobenil	18
Cijanazin	170
Bentazon	570
Dikvat	700000
Dilapon	900000

Razni pesticidi se rastvaraju u vodi na istoj temperaturi u različitoj količini. Rastvorljivost im se kreće od nekoliko miligrama do nekoliko stotina grama u litru vode. Prilikom rastvaranja obrazuju rastvore, suspenzije, emulzije. Obim i brzina

rastvaranja čvrstih pesticida u rastvaračima zavisi od mnogobrojnih činilaca. Polaznu tačku pri izboru rastvarača predstavlja pravilo: „slično se rastvara u sličnom“. Rastvorljivost pesticida je važna fizička osobina jer od nje zavisi apsorpcija pesticida, pokretljivost u živim organizmima i zemljištu. U tabeli 6 su dati podaci o rastvorljivosti nekih pesticida u vodi.

Podeoni koeficijent

Podeoni koeficijent K_{ow} u sistemu oktanol-voda predstavlja veoma važnu fizičku karakteristiku pesticida. On predstavlja raspodelu nekog pesticida između oktanola i vode u nekom određenom odnosu. Odnos koncentracije pesticida koji je rastvoren u dve tečne faze - oktanol (o) i vode (w) koje se ne mešaju i koje se nalaze u ravnoteži (faze oktanol i voda), na određenoj temperaturi jeste konstantan (koeficijent podele K). Podeoni koeficijent se izražava jednačinom:

$$K = \frac{C_o}{C_w} \quad (1)$$

Zapaljivost

Zapaljivost se određuje na osnovu tačke paljenja, temperature zapaljivosti i temperature samopaljenja. Tačka paljenja (flash point) je temperatura pri kojoj se postiže minimalna koncentracija zapaljivosti, odnosno moguće je pripaljivanje pesticida.

Temperatura zapaljivosti je temperatura na kojoj je moguće kontinualno sagorevanje pesticida, započeto u prisustvu plamena. Temperatura samopaljenja je temperatura na kojoj se pesticid spontano pali, bez prisustva plamena.

Tačka paljenja pesticida se kreće od 10 do preko 400 °C. U tabeli 7 su date vrednosti za temperaturu paljenja nekih pesticida.

Tabela 7. Tačke paljenja nekih pesticida

Pesticid	Tačka paljenja (°C)	Pesticid	Tačka paljenja (°C)
Etilendihlorid	12-15	Acetohlor	>110
Butralin	35	Butilat	115
Buprimat	>50	Pebulat	124
Klomazon	70-75	Fenitrotion	188
Mekoprop-P	70-80	Fenoksikarb	224
Cineb	90	Cikloat	>100

2.2.2. Hemijske osobine pesticida

Postojanje velikog broja pesticida koji pripadaju različitim grupama hemijskih jedinjenja otežava detaljnije razmatranje njihovih osobina. Ipak, to ne isključuje mogućnost razmatranja nekih opštih hemijskih osobina uslovljenih hemijskim sastavom i strukturu molekula pesticida. U molekulu pesticida postoji strogo određeni raspored atoma kao i određen raspored njihovih hemijskih veza. Ovaj raspored i karakter hemijskih veza, između atoma, čini unutrašnju hemijsku strukturu molekula pesticida.

Hemijske i toksikološke osobine pesticida zavise od njegovog elementarnog sastava i njegove hemijske strukture. Na osnovu poznate hemijske strukture mogu se odrediti hemijske osobine datog pesticida. Hemijska struktura molekula može se izraziti pomoću strukturne formule koja mora biti jedna za dati pesticid. Hemijska struktura molekula pesticida može da se odredi proučavanjem njihovih osobina pomoću hemijskih i fizičkih metoda.

Prava „nauka“ o pesticidima nastala je neposredno pre i za vreme II svetskog rata zahvaljujući razvoju organske hemije. Tridesetih godina dvadesetog veka, hemijska industrija je naročitu pažnju posvetila mogućnosti korišćenja novosintetisanih jedinjenja u borbi sa štetočinama i bolestima biljaka. Prvu grupu sintetisanih pesticida činila su organofosforna jedinjenja, a zatim organohlorna, karbamatna i druga jedinjenja. U hemijskom smislu pesticidi mogu biti derivati ugljovodonika, alkohola, aldehida, hinona, karbonskih kiselina, organskih jedinjenja sumpora.

Hemijske osobine pesticida zavise pre svega od strukture molekula. Kod pesticida postoji direktna veza između hemijske strukture i bioaktivnog odnosno toksičnog dejstva (Melnikov, 1974). Izvesni atomi i hemijski radikali koji ulaze u sastav aktivnih materija direktno unose svoje toksične osobine, kao što je slučaj sa halogenim elementima ili teškim metalima. Tako jedinjenja sa jednim atomom hlora u molekulu imaju samo fumigantno dejstvo, a sa dva i više molekul ispoljava insekticidno i baktericidno dejstvo (Kalajanova-Simeonova, 1980).

Hemijski karakter, tj. reakciona sposobnost, pojedinih atoma u sastavu molekula pesticida menja se u zavisnosti od toga sa kakvim su atomima ili atomskim grupama oni vezani u molekulu. Hemijski karakter nekog atoma u sastavu molekula pesticida i njegovo ponašanje prilikom reakcije zavisi od prirode atoma i od njegovog položaja u molekulu. Svaki atom ili radikal utiče na druge atome i na osobine molekula kao celine.

U molekulu pesticida najčešće je zastupljena kovalentna hemijska veza. Kod mnogih pesticida, kao organskih jedinjenja, ova veza je u većoj ili manjoj meri polarizovana. Osnovu molekula pesticida čini ugljenikov lanac. U zavisnosti od oblika, odnosno strukture ugljenikovog lanca, sva organska jedinjenja i pesticidi dele se u dve osnovne grupe:

- sa otvorenim ugljenikovim lancem- ACIKLIČNA
- sa zatvorenim ugljenikovim lancem- CIKLIČNA
- karbociklična
- heterociklična.

Veliki broj pesticida pripada grupi heterocikličnih jedinjenja. U njima su pored ugljenikovih atoma zastupljeni i atomi azota, sumpora, kiseonika. Takođe u sastav ovih pesticida ulaze atomske grupe (NH_2 , NH , CO , COOH , NO_2 , OH , CH_3 , CH_2 i dr.) i ove grupe određuju pripadnost pesticida klasi organskih jedinjenja. Grupe koje određuju hemijsko ponašanje pesticida su funkcionalne grupe. Postojanje azota u nekim pesticidima u oblicu nitrozo (NO) i nitro (NO_2) grupe daje ovim jedinjenjima karakter otrova sa izraženim delovanjem.

Hemijske osobine pesticida treba razmatrati i sa gledišta medijuma u kome se pesticidi nalaze. Voda predstavlja najčešći medijum u kome se pesticid nalazi pre i posle apsorpcije.

Svako hemijsko jedinjenje koje ispoljava svojstvo pesticida ima svoj hemijski naziv. U upotrebi su najčešće dve nomenklature koje se koriste u davanju hemijskih naziva jedinjenja. To su IUPAC i C.A.S. Iz tog razloga kod navođenja hemijskog naziva pesticida treba dati podatke o nomenklaturi. Svaki pesticid ima broj pod kojim je registrovan kod CAS. Obično jedno jedinjenje ima jedan CAS broj.

Pored hemijskog naziva svaki pesticid ima generički (trivialni) naziv koji daje ISO/TSO. Često se može sresti i oficijelni kod-broj pod kojim je neki pesticid uveden kod Svetske Zdravstvene Organizacije (WHO). Svaki preparat pesticida ima svoj trgovачki, fabrički ili zaštićen naziv.

2.2.2.1. Hemijska reaktivnost (stabilnost)

Poznato je da stabilnost pesticida zavisi od njihovih hemijskih osobina, pa zbog toga različiti pesticidi različito reaguju na unutrašnje i spoljašnje uticaje. Unutrašnji uticaj ogleda se u nestabilnosti pesticida pri dužem čuvanju. Pojedini pesticidi se pri dužem stajanju menjaju i usled razlaganja, polimerizacije, gube bitne hemijske karakteristike. Ovakvim pesticidima se dodaju razna hemijska jedinjenja tzv. stabilizatori, radi usporeњa navedenih procesa. Mnogi pesticidi ispoljavaju visok stepen stabilnosti za vreme čuvanja u optimalnim uslovima. Promenom uslova čuvanja (temperatura, pritiska vode ili kiseonika, pH, svetlosti) za neke od pesticida stabilnost molekula se drastično smanjuje, skoro do tog stepena da postanu neaktivni i neupotrebljivi.

2.3. Toksikološke osobine pesticida

Toksičnost pesticida je jedna od važnih osobina koja karakteriše delovanje nekog pesticida na živi organizam. Ona uglavnom zavisi od sposobnosti delovanja pesticida na različitim konstituentima ćelije koji igraju važnu ulogu u biohemiskim i fiziološkim procesima. Sam pojam otrovnosti-toksičnosti često se pogrešno shvata. Švajcarski fizičar Paracelsus je tvrdio da toksični efekti neke supstance zavise od doze. Imajući u vidu da je pojam otrovnosti uslovan, što znači da pojedini živi organizmi različito reaguju na isto hemijsko jedinjenje, razumljivo je što definicija pojma otrova nije laka i što je dovodila do različitih mišljenja.

Danas se pod otrovom podrazumevaju hemijske supstance stvorene izvan živog organizma, ili one koje luče živa bića (toksini). Unete u organizam čoveka mogu prouzrokovati bolest ili smrt. Razlog zbog čega se hemijski novosintetisana jedinjenja smatraju toksičnim je taj da nisu proizvod evolucije živih organizama i da kao takva ne nastaju prirodnim procesima. Danas je prihvaćena definicija prema kojoj je otrov ona materija (supstanca) koja u malim količinama deluje na organizme bilo da razlaže njihovo tkivo, bilo da inhibira važne fiziološke procese (Mokranjac, 1973). Pesticid se ne mora tretirati kao otrov, ali zbog dugotrajne izloženosti, svakodnevnim unošenjem određene količine datog jedinjenja ono kasnije pokazuje svoje toksično dejstvo.

Pojam doze se uvodi da bi se kvantifikovali podaci o toksičnosti pesticida i drugih toksičnih supstanci. Doza predstavlja količinu neke supstance koja je potrebna da bi se postigao određeni efekat u organizmu. Doza je ona količina otrova koja izaziva smrt, uginuće ili trovanje bez letalnog ishoda.

Za svaki pesticid postoji izvesna količina ispod koje taj pesticid u organizmu ne prouzrokuje dejstva koja se na današnjem nivou metodike mogu registrovati. Ova količina se naziva granična količina.

Kada se odredi doza bez efekta ona postaje baza za mnoge druge parametre u toksikologiji. Dopušteni dnevni unos (ADI) je kao veličina nastala na bazi doze bez efekta. Ona predstavlja onu količinu pesticida koja se može unositi u organizam čoveka u toku dužeg vremenskog perioda bez oštećenja organizma.

Kad se želi izraziti otrovnost pesticida na čoveka i razne vrste drugih organizama koristi se letalna doza i govori se o srednje letalnoj dozi LD₅₀. Ona predstavlja količinu toksične supstance izraženu u mg/kg telesne težine tretiranih organizama koja izaziva 50 % smrtnosti. Podatak o LD₅₀ može se smatrati jednom od najvažnijih karakteristika pesticida, ali ga treba upotrebljavati zajedno sa ostalim karakterističnim toksičnim svojstvima pesticida (Milošević i Vitorović, 1992).

Minimalna letalna doza MDL ili LD₁₆ predstavlja najmanju količinu otrova koja u toku 24 časa prouzrokuje smrt 16 % tretiranih organizama.

Tolerantna doza ili maksimalno dozvoljena doza MDK predstavlja količinu pesticida izraženu u miligramima na kilogram telesne težine koju čovek može da konzumira svakodnevno do kraja života, bez posledica na organizam.

U literaturi se za slučaj inhalacionog trovanja, tj. trovanja putem organa za disanje navodi letalna koncentracija LC.

Apsolutna smrtna koncentracija (LC₁₀₀) predstavlja količinu otrovne supstance koja u definisanom vremenskom periodu izaziva 100 % smrtnost kod izloženih individua.

Srednja smrtna koncentracija (LC₅₀) predstavlja količinu otrovne supstance koja u definisanom vremenskom periodu izaziva 50 % smrtnost kod izloženih individua.

Ove veličine nisu jednake za sve organizme, niti za jedinke iste vrste. Ljudi koji boluju od hroničnih bolesti osetljiviji su od zdravih, deca od odraslih (čak do 6 puta). I među ljudskim rasama ima razlika. Ispitivanja su pokazala da ljudi crne i žute rase bolje podnose insekticide na bazi DNOC i DNBPA nego ljudi bele rase (Paget i Barnes, 1964).

Uzveši LD₅₀ kao veličinu za poređenje svi pesticidi se po svojim toksičnim osobinama svrstavaju u četiri grupe. Ova podela data je u tabeli 8.

Tabela 8. Podela pesticida prema toksičnosti

Grupa	Toksičnost	LD ₅₀ (mg/kg)
I grupa	Ekstremno toksični	do 50
II grupa	Visoko toksični	50-250
III grupa	Srednje toksični	250-1000
IV grupa	Malo toksični	1000-5000

Količina pesticida u namirnicama i vodi zavisi od njihove perzistencije. Ona predstavlja vreme zadržavanja nekog pesticida u prirodnoj sredini i ona zavisi od hemijskih, fizičkih i bioloških faktora.

Nivo pesticida u namirnicama zavisi od poštovanja karence pesticida. Karenca predstavlja period od primene pesticida do berbe ili setve biljnih kultura, odnosno to je poslednji rok primene nekog pesticida pre berbe ili žetve.

2.4. Posledice štetnog dejstva pesticida

Za razliku od većine zagadjujućih supstanci koje se u životnu sredinu unose bez određenog cilja, pesticidi se unose sa namerom da pomognu čoveku, povećanjem prinosa u poljoprivredi, voćarstvu, vinogradarstvu i šumarstvu suzbijanjem štetnih organizama. Uticaj pesticida na biocenoze je veoma složen i raznovrstan. Posledice delovanja pesticida zavise od karaktera ili dela ekosistema, ali i od fizičko-hemijskih osobina upotrebljenih preparata.

Sistematska primena pesticida predstavlja neposredno dejstvo na biocenuzu i vodi do delimičnog uništavanja korisnih insekata-oprašivača, mrava, negativno deluje na ribe, beskičmenjake i ptice, a takođe na životinje i čoveka.

Nepovoljno delovanje pesticida uglavnom zavisi od njihovih fizičko-hemijskih karakteristika. Njihova toksičnost zavisi pre svega od fizičko-hemijskih karakteristika kao što su isparljivost, rastvorljivost u vodi, organskim rastvaračima, mastima i uljima, načina primene i mogućnosti kontaminacije aerosolima i suspenzijama, meteoroloških uslova u trenutku kontakta. Neracionalna primena pesticida jedan je od najvažnijih faktora zagađivanja životne i radne sredine kao i trovanja ljudi i životinja. U SAD se godišnje beleži između 10000 i 20000 trovanja uzrokovanih pesticidima. U Iraku je 1972. godine od fungicida na bazi žive bilo otrovano preko 100000 ljudi.

Indirektne kontaminacije su znatno šire jer one obuhvataju dodatni unos pesticida preko vazduha, vode i hrane i njima je u principu znatno ugroženiji živi svet u vodama, biljni i životinjski svet na kopnu. Masovni pomor ribe izazvan endosulfanom (1974. god) zabeležen je u sливу Zapadne i Velike Morave u dužini od oko 50 km.

U poljoprivredi su kao hemijska sredstva za zaštitu biljaka primenjivani neorganski pesticidi koji su sadržavali arsen, živu i druge elemente. Ovi preparati poseduju veliku toksičnost i ispoljavaju neposredno dejstvo na žive organizme

uzrokujući njihovo uništavanje. Zbog toga su oni primenjivani sa velikom predostrožnošću u odnosu na čoveka i u ograničenim količinama. Istovremeno pesticidi ove klase ne ispoljavaju sposobnost akumulacije u organizmu i dovoljno se brzo razlažu u životnoj sredini.

Značajna narušavanja u biocenozama registruju se pri sistematskoj primeni visokotoksičnih pesticida, organohlornih jedinjenja, naročito preparata DDT i HCH (heksahlorcikloheksan). Ovi preparati se loše razlažu u vodi i zemljištu, poseduju sposobnost akumulacije u biljkama i organizmima životinja, pa njihova dugotrajna primena u neograničenim količinama ispoljava značajna dejstva na biocenoze. Veliku opasnost predstavlja prisustvo ove klase pesticida u lancima ishrane. Pesticidi se akumulirajući u jednim organizmima, postepeno putem lanca ishrane lako predaju drugim. U vodenim ekosistemima pesticidi lancem ishrane prelaze od planktonskih organizama ka ribama, a od njih ka pticama. Pri tome sadržaj preparata u svakoj narednoj karici lanca raste stotinu pa i hiljadu puta (Marković i sar., 1996).

Štetni efekti pesticida posledica su neracionalne i nestručne upotrebe, rukovanja ili čuvanja kao i zloupotrebe ili udesa. Pri tom su žrtve ljudi, životinje i životna okolina. Navodi se sledeći primer: eksplozija u skladištu aktivnih materija za formulaciju pesticida pored materijalne štete prouzrokovala bi hemijsku kontaminaciju u smrtonosnim koncentracijama u prečniku od oko 60 km^2 , znaci trovanja kod ljudi nastupili bi u roku od nekoliko minuta a u toku prvih 24 časa polovina bi umrla bez obzira na preduzete mere lične i kolektivne zaštite. Hemijska kontaminacija atmosfere, zemljišta, rastinja i vode zadržala bi se na istom prostoru u periodu od 3 do 6 nedelja (Jović, 1978).

Neadekvatnom hemizacijom poljoprivrede uspostavljeno je već danas stabilno kruženje pesticida i njihovih degradacionih proizvoda u životnoj sredini. Kao posledicu nalazimo pesticide i njihove rezidue u hrani. Nađeno je da više od polovine uzoraka hrane sadrži nedozvoljene visoke koncentracije rezidua pesticida (Adamović, 1967). Zbog različite brzine razgradnje pesticidi se u manjoj ili većoj meri nagomilavaju u zemljištu. Degradacija pojedinih pesticida može trajati 5 do 10 godina (primer DDT-a čiji su ostaci pronađeni i posle 20 godina), što zavisi od geološkog sastava zemljišta, načina obrade, vlažnosti, temperature. Zemljište kontaminirano pesticidima utiče na njegove biocentričke odnose, a posledično na površinske i podzemne vode (Barnabéj, 1976).

2.4.1. Hemijska kontaminacija hrane

Hemijska kontaminacija hrane i vode potiče od nemernih ljudskih aktivnosti (tzv. antropogena kontaminacija) i iz prirodnih izvora. Putem vazduha, iz zemljišta, zagadenih vodotokova u hranu može dospeti veliki broj zagadivača koje emituju industrijska postrojenja i izdunvi gasovi motornih vozila.

Tokom proizvodnje, prerade, prometa i čuvanja namirnica koristi se veliki broj hemijskih sredstava, kao što su sredstva za zaštitu biljaka od izazivača različitih bolesti, štetočina, kao i sredstva koja štite proizvedene namirnice od kvarenja. Smatra se da

preko hrane i vode za piće u organizam dospeva najveći broj hemijskih zagađivača životne sredine (oko 90%). Neki od njih u organizam mogu dospeti iz više različitih izvora. Nitrati su na primer prirodni sastojci povrća, ali u biljke mogu dospeti iz sredstava za đubrenje zemljišta ili putem kiselih kiša. Takođe se nitrati i nitriti koriste i kao aditivi u procesu proizvodnje nekih prehrambenih proizvoda životinjskog porekla.

Dakle, kontaminanti su sve supstance koje nemerno dospevaju u namirnice pri proizvodnji, prometu, transportu, čuvanju ili su poreklom iz ambalažnog materijala ili zagađene okoline, i u njima se nalaze kao ostaci (reidue). Zagađenje namirnica ovim hemijskim jedinjenjima označava se kao hemijska kontaminacija.

2.4.2. Vrste trovanja

Sa gledišta trovanja, toksičnost pesticida može se podeliti na: akutnu toksičnost, subakutnu toksičnost, hroničnu toksičnost.

Akutna toksičnost nastaje posle jednokratnog unošenja pesticida.

Subakutna toksičnost je toksičnost koja nastaje posle unošenja pesticida u toku 5 do 90 dana.

Hronična toksičnost se definiše kao toksičnost koja nastaje posle dvogodišnjeg oralnog unošenja pesticida.

Hronična toksičnost prati se u toku celog životnog veka eksperimentalnih životinja.

Prema uzrocima razlikuju se sledeći oblici trovanja:

- zločinačka trovanja
- samoubilačka trovanja
- zadesna trovanja
- profesionalna trovanja
- medicinska trovanja.

2.5. Podela pesticida

U proizvodnji, prometu i primeni danas se u svetu nalazi ogroman broj pesticida (oko 5 miliona jedinjenja). Od tako velikog broja jedinjenja samo mali broj je našao široku praktičnu primenu. Zbog postojanja velikog broja pesticida i stalne proizvodnje preparata sa novim ili delimično izmenjenim svojstvima, razvoj i nazive proizvoda ove grane hemijske industrije je veoma teško pratiti. Ovo utoliko pre što pojava novog preparata ne znači da je došlo do otkrića nove aktivne supstance pesticida. Zato se javlja potreba da se primene različite klasifikacije i podele pesticida. Najčešće se pesticidi dele prema:

- nameni
- vrsti štetnih bioloških agenasa koje suzbijaju ili se sprečava njihova pojava
- specifičnom delovanju u pojedinim fazama razvića
- karakteru dejstva na štetne biološke agense
- mehanizmu delovanja
- vremenu primene
- stabilnosti molekula u praktičnim uslovima primene
- stepenu otrovnosti za različite vrste organizama
- stepenu dejstva preko kože
- stepenu akumulacije u organima toplokrvnih životinja
- stepenu izazivanja mutacija na biljkama, životinjama ili drozofili
- stepenu kancerogenosti kod ljudi i životinja
- hemijskoj strukturi.

U tabelama 9, 10 i 11 data je klasifikacija pesticida prema stepenu toksičnosti u našoj zemlji i prema kriterijumima WHO i EPA.

Tabela 9. Podela pesticida kao otrova prema srednje smrtnoj dozi LD₅₀ (Službeni list SRJ 15/95)

Grupa otrova	LD ₅₀ (mg/kg)		LC ₅₀ (mg/dm ³) inhalaciono
	oralno	dermalno	
I	< 25	< 50	< 0,5
II	25-200	50-400	0,5-2
III	200-2000	400-2000	2-20

Prema nameni ili vrsti štetnih organizama koji se suzbijaju ili se sprečava njihova pojava pesticidi se mogu podeliti na nekoliko grupa:

- herbicidi - jedinjenja koja se koriste za uništavanje korovskih biljaka
- insekticidi - sredstva koja štite ljudе i biljke od insekata
- akaricidi - sredstva koja se koriste za suzbijanje pregalja i njihovih razvojnih stadijuma larvi, jaja
- fungicidi (i baktericidi) - sredstva koja se koriste za uništavanje štetnih nižih biljaka, gljivica i plesni
- nematocidi - sredstva koja se koriste protiv nematoda (valjkastih glista)
- rodenticidi - sredstva koja se koriste za uništavanje glodara
- antihelmintici - sredstva koja se koriste za suzbijanje glista
- defolijanti - sredstva koja izazivaju prevremeno opadanje lišćа
- desikanti - sredstva koja izazivaju sušenje biljaka.

Podela pesticida prema stepenu toksičnosti nije identična u svim zemljama.

Oštra granica između pojedinih grupa pesticida ne postoji jer pojedini pesticidi mogu istovremeno da deluju na više vrsta štetočina.

Prema stabilnosti molekula pesticida u uslovima spoljašnje sredine pesticidi se mogu podeliti na:

- veoma stabilne (vreme razlaganja na netoksične komponente duže od 2 godine)
- stabilne (vreme razlaganja na netoksične komponente od 6 meseci do 2 godine)
- srednje stabilne (vreme razlaganja na netoksične komponente od 1 do 6 meseci)
- slabo stabilne (vreme razlaganja na netoksične komponente kraće od mesec dana).

Tabela 10. Klasifikacija pesticida na osnovu akutne toksičnosti po kriterijumima Svetske Zdravstvene Organizacije (WHO)

Grupa otrova	Klasa	LD ₅₀ za pacove (mg/kg telesne težine)			
		Oralna doza		Dermalna doza	
		čvrsto	tečno	čvrsto	tečno
I _a	ekstremno toksični	≤ 5	≤ 20	≤ 10	≤ 40
I _b	visoko toksični	5-50	20-200	10-100	40-400
II	srednje toksični	50-500	200-2000	100-1000	400-4000
III	slabo toksični	≤ 501	≤ 2001	≤ 1001	≤ 4001

Na osnovu stepena akumulacije u organizma toplokrvnih životinja pesticidi se mogu podeliti na:

- pesticide visokog stepena akumulacije (koeficijent akumulacije manji od 1)
- pesticide izraženog stepena akumulacije (koeficijent akumulacije između 1 i 3)
- pesticide srednjeg stepena akumulacije (koeficijent akumulacije između 3 i 5)
- pesticide slabo izraženog stepena akumulacije (koeficijent akumulacije veći od 5).

Koeficijent akumulacije predstavlja broj koji se dobija kada se suma doza koje izazivaju 50% smrtnosti eksperimentalnih životinja pri višestrukoj primeni podeli sa dozom koja izaziva 50% smrtnosti pri jednokratnoj primeni.

Prema stepenu izazivanja mutacija na biljkama, životinjama i na drozofili pesticidi se dele u pet grupa:

- supermutageni pesticidi - izazivaju 100 % mutacija na biljkama i životinjama
- jako mutageni pesticidi - izazivaju 5 - 10 % mutacija na drozofili

- srednje mutageni pesticidi - izazivaju 2 - 5 % mutacija na drozofili
- slabo mutageni pesticidi - izazivaju 1 - 2 % mutacija na drozofili
- veoma slabo mutageni pesticidi - izazivaju 0,5 - 1 % mutacija na drozofili.

Tabela 11. Klasifikacija pesticida po kriterijumima Agencije za zaštitu spoljne sredine (EPA)

Grupa otrova	Oralna LD ₅₀ (mg/kg)	Akutna toksičnost za pacove		Efekat na oči	Efekat na koži
		Dermalna LD ₅₀ (mg/kg)	Inhalaciona LC ₅₀ (mg/dm ³)		
I	≤ 50	≤ 200	≤ 0,2	koroziva i neprovidnost rožnjače	koroziva
II	50-500	200-2000	0,2-2,0	neprovidnost rožnjače iritacija	iritacija 72 sata
III	500-5000	2000-20000	2,0-20	reverzibilna u toku 7 dana	srednja iritacija 72 sata
IV	≤ 5000	≤ 20000	≤ 20	ne irritira	srednja ili slaba iritacija 72 sata

Prema stepenu isparljivosti i opasnosti pesticidi se dele u sledeće grupe:

- jako opasni pesticidi- pesticidi čija je zasićena koncentracija veća ili jednaka toksičnoj
- opasni pesticidi- pesticidi čija je zasićena koncentracija veća od tolerantne
- slabo opasni pesticidi- pesticidi čija zasićena koncentracija ne pokazuje znake intoksikacije.

Prema hemijskoj strukturi pesticidi se klasifikuju na:

- organska jedinjenja
- neorganska jedinjenja
- pesticide prirodnog porekla.

Sve ove klasifikacije ne uzimaju u obzir hemijsku strukturu jedinjenja iako pesticidi i njihovi preparati imaju tačno definisanu strukturu. Ovo može da odigra važnu ulogu u sistemu klasifikovanja pesticida.

2.6. Osnovni putevi rasprostiranja pesticida

Danas je poznato više od 55000 različitih hemijskih jedinjenja, proizvoda hemijske delatnosti čoveka, koja na različite načine dospevaju u spoljnu sredinu. Mnoga od njih predstavljaju opasnost za različite vrste živih organizama jer prouzrokuju neželjene efekte u životu mikroorganizama, biljaka, životinja i čoveka. Od tog broja, svega oko 0,9 % učestvuju pesticidi i njihovi metaboliti (Melnikov i sar., 1977).

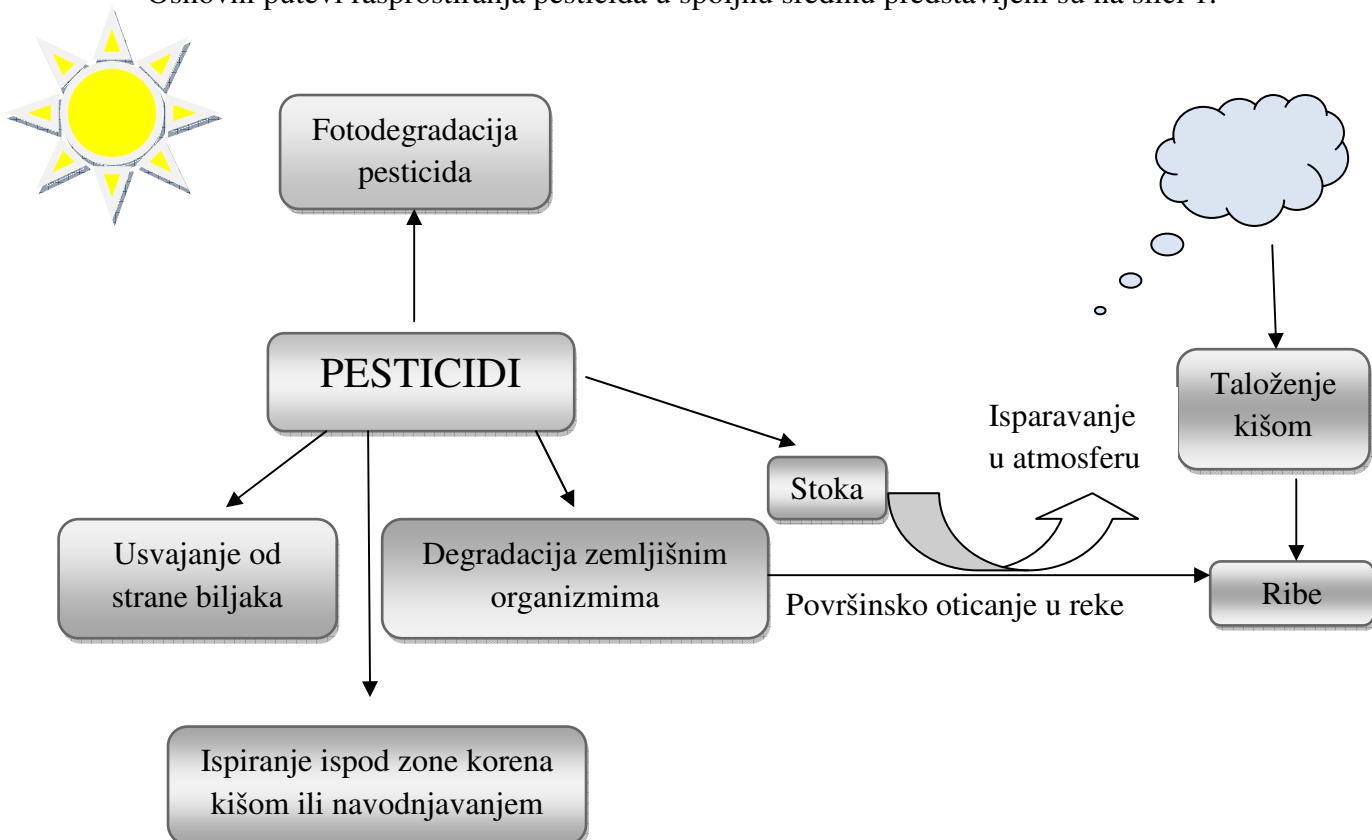
Sva hemijska jedinjenja su uključena u proces kruženja materije i energije. Dužina kruženja različitih hemijskih jedinjenja je nejednaka, a neka nestabilna jedinjenja ne prolaze kroz sve faze kruženja.

Perzistentna jedinjenja, posebno ona koja sadrže Hg, As, Pb, Se, Cd i druge teške metale mogu se nakupiti u pojedinim delovima spoljne sredine i naneti ozbiljne posledice (Vročinski, 1980).

Biokoncentracija elemenata Cd, Pb, As u hidrobiontima u morima je već dostigla opasne koncentracije.

Stabilni i lipofilni pesticidi veoma se intenzivno nagomilavaju u hidrobiontima (Vročinski 1980; Khan 1977). Na primer koeficijent biokoncentracije DDT-a u pastrmci je 124, pentahlorfenola 5360, karbarila 947, 2,5-dihlor-4-nitrosalicilanilida 10000. Pri tako visokoj koncentraciji u hidrobiontima i drugim delovima spoljne sredine oni se mogu nagomilavati u proizvodima za ishranu dece.

Osnovni putevi rasprostiranja pesticida u spoljnu sredinu predstavljeni su na slici 1.



Slika 1. Osnovni putevi rasprostiranja pesticida u spoljašnjoj sredini

2.6.1. Pesticidi u zemljištu

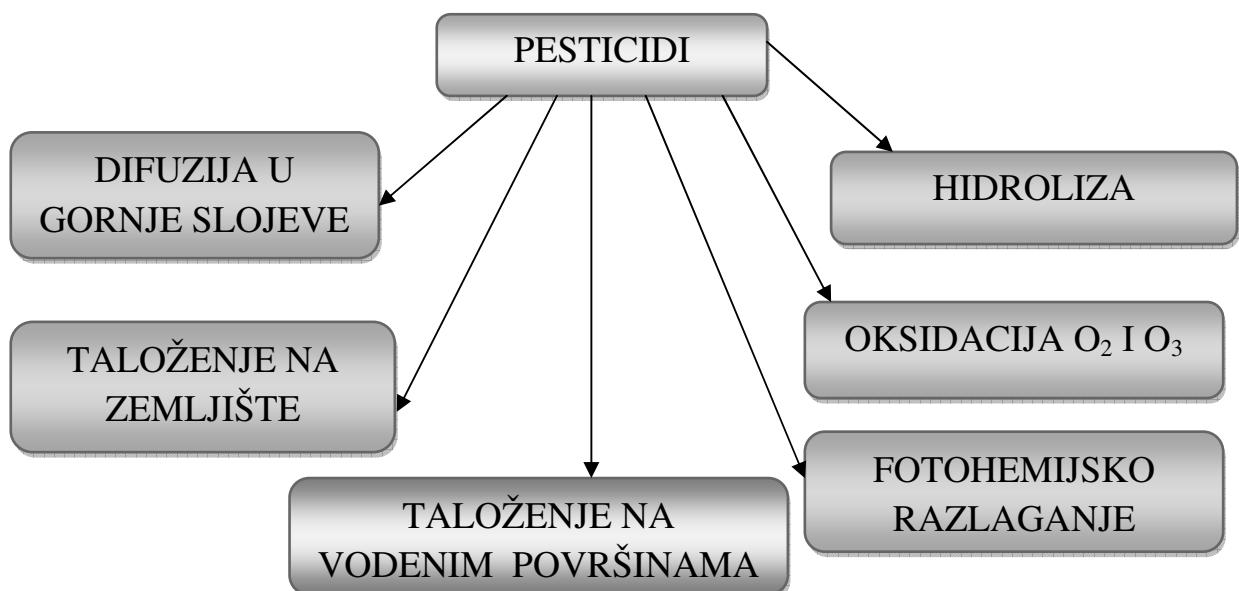
S obzirom da su široko primenjivani u poljoprivredi, šumarstvu i komunalnoj higijeni, pesticidi spadaju u zagađivače životne sredine (Aleksandrov, 1996). Spiranjem pesticida sa tretiranih kultura padavinama i sa površine zemljišta oni se prvo akumuliraju u površinskim vodama. Stabilnost dospelih pesticida određena je fizičko-hemijskim osobinama aktivne materije, koncentracije i tehničke primene, tipa zemljišta i meteoroloških uslova. Usled prisustva humina i glina zemljište može da veže velike količine pesticida. To su kompleksi između huminskih kiselina i herbicida, odnosno insekticida (Felbeck, 1956).

Herbicidi su zbog intenzivne upotrebe i dugog perioda razlaganja najveći zagađivači zemljišta. Na dubini od 15 cm mogu se naći u koncentraciji od 40-80 % od primarno nanete količine. Većina organofosfornih jedinjenja, zbog hidrolitičkog razlaganja, u zemljištu postaje inaktivna u toku jedne godine.

Reakcije koje se odvijaju u zemljištu jako utiču na rast i razvoj biljke i na intenzitet procesa u zemljištu i biljnog organizmu. Takođe reakcije koje se odvijaju u zemljištu utiču na dinamiku i pravac razgradnje pesticida, na procese usvajanja i transformacije u biljkama.

2.6.2. Pesticidi u atmosferi

U atmosferu pesticidi mogu dospeti direktno iz vazduha prilikom primene avionima i helikopterima, ili sa zemlje primenom mašina i aparata. Mogu dospeti u atmosferu i isparavanjem sa površine zemlje, vode, biljaka i drugih površina na kojima se nalaze. Pesticidi koji se odlikuju većom isparljivošću na određenoj temperaturi u većoj količini dospevaju u atmosferu.



Slika 2. Transformacija pesticida u atmosferi

Isparavanje pesticida sa površine zemlje je nešto sporije, jer se oni vezuju za koloide zemljišta. Jedan isti pesticid sa površine zemlje različitog sastava isparava različitom brzinom. Pesticidi ne ostaju trajno u atmosferi. Deo pesticida se kondenzuje i dospeva na zemlju i vodu, a drugi deo biva podvrgnut fotohemijskom razlaganju. Opšta šema transformacije pesticida u atmosferi predstavljena je na slici 2.

2.6.3. Pesticidi u hidrosferi

Pesticidi i druga hemijska jedinjenja mogu u vodu dospeti direktno (tretiranjem vodenih površina) ili indirektno iz atmosfere, iz zemljišta (preko poplavnih i podzemnih voda), kao i preko proizvoda životne delatnosti čoveka i životinja. Za razumevanje razlaganja pesticida u vodi neophodno je poznavati uticaj određenih faktora kao što su rastvorljivost u vodi, interakcija sa vodom, fotohemajska stabilnost, uticaj temperature i sunčeve radijacije. Od ukupnog delovanja ovih činilaca zavisi opšta stabilnost pesticida u vodi (Wolfe i sar., 1990).

Na stabilnost pesticida u vodi utiče njihova isparljivost. Ukoliko je veći napon pare pesticida, utoliko on lakše isparava iz vode u atmosferu. Neki pesticidi u vodenom rastvoru lako hidrolizuju. Ona je veća na višoj temperaturi vode. Brzo se hidrolizuju jedinjenja iz grupe estara fosforne kiseline.

Kinetika pesticida u vodi može se predstaviti sledećim jednačinama:

$$\vartheta_{dospeca} + \frac{dc_{pesticida}}{dt} = k_1 \cdot c + k_2 \cdot c + k_3 \cdot c + k_4 \cdot c \quad (2)$$

$$\vartheta_{razgradnje} - \frac{dc_{pesticida}}{dt} = k_5 \cdot c + k_6 \cdot c + \dots + k_{11} \cdot c \quad (3)$$

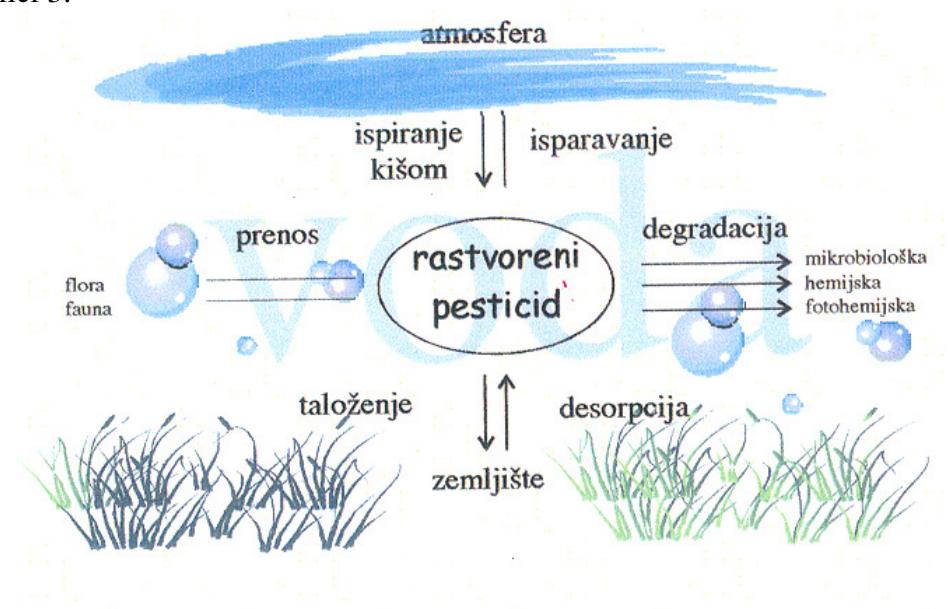
gde su k odgovarajuće konstante brzina sledećih procesa: sa k_1 definisana je brzina spiranja sa površine zemljišta, sa k_2 brzina prenosa podzemnim vodama, sa k_3 atmosferskim padavinama, sa k_4 desorpcija iz sedimenata i vodenih organizama, sa k_5 adsorpcija sedimentima, sa k_6 i k_7 brzina adsorpcije vodenom florom i faunom, sa k_8 brzina isparavanja, sa k_9 brzina termičkog razlaganja, sa k_{10} brzina hidrolize i sa k_{11} brzina fotohemijskog razlaganja, dok je c koncentracija pesticida (Vročinskij i Telitčenko, 1980).

Prema postojanosti u vodenoj sredini, pesticidi su podeljeni u 4 grupe.

U prvoj grupi nalaze se oni postojani manje od 5 dana, u drugoj postojani od 5 do 10 dana, u trećoj grupi od 10 do 30 dana i u četvrtoj grupi su pesticidi postojani preko 30 dana (Baranova, 1983). Mali je broj pesticida koji pripada prvim dvema grupama, a izuzetno veliki broj pripada trećoj i četvrtoj grupi. Na primer pesticid hlorofos i metafos mogu se dokazati u vodi od 55 do 65 dana nakon dospeća, 2,4-

dihlorfenoksi sirćetna kiselina u periodu od 250 dana, a heksahloran i posle 360 dana od dospeća u vodu (Aleksandrov, 1996).

Dospevši u vodu pesticidi neko vreme ostaju nepromjenjeni ali ispoljavaju primetno dejstvo na organoleptička svojstva vode, hidrohemski i biološki režim prirodnih voda. Vremenom se transformišu fizičkim, hemijskim i biološkim procesima datim na slici 3.



Slika 3. Transformacije rastvorenog pesticida u vodi

Količina pesticida u opštem slučaju ima sledeću zavisnost: $c = f(A, B, C)$, gde su A faktori vezani za fizičko-hemijske osobine pesticida, B su faktori vezani za sredinu (sastav zemljišta, padavine) i C su faktori vezani za uslove primene (dužina tretiranja, procenat aktivne materije, utrošak).

Zahvaljujući adsorpciji i sorpciji pesticida od strane sedimenata i vodene flore i faune, koncentracija organohlornih pesticida u vodi snižava se brzo. Ova pojava, međutim, stvara lažnu sliku o samoprečišćavanju vode jer se stabilni pesticidi iz ove grupe dugo zadržavaju i akumuliraju. Ovi procesi dovode do sekundarnog zagađenja (Crnjajeva i Jakovleva, 1988). Zbog značajne stabilnosti pesticida u sedimentima i vodenim organizmima, povećava se opasnost od njihove migracije u lancu ishrane vodenog ekosistema. Prema ovoj osobini, svi pesticidi su podeljeni u 4 klase:

1. nestabilni pesticidi sa periodom razlaganja do 10 dana i koeficijentom akumulacije k_a do 50;
2. pesticidi koji su stabilni od 11 do 30 dana i koeficijentom akumulacije k_a od 51 do 200;

3. visoko stabilni pesticidi koji se u sedimentima i vodenim organizmima mogu naći nakon 30 dana i koeficijentom akumulacije k_a od 201 do 1000;

4. izuzetno stabilni pesticidi sa k_a većim od 1000.

Povećanje temperature vode ubrzava razlaganje pesticida, isto deluje i povećanje pH. Tako na primer razlaganje lindana na trihlorfenole započinje pri pH=7, a pri pH=11 lindan je potpuno razložen (Scott, 1976). Na razlaganje pesticida utiče i količina kiseonika rastvorenog u vodi. U otvorenim vodenim sistemima, nakon 24 časa, ostaje 33,3 % fosalona, dok u vodi zatvorenog sistema njegova koncentracija nakon 5 dana iznosi 55,5 %, a tek posle 19 dana 33,3 %. U vodi sa slobodnom agregacijom ovaj pesticid potpuno nestaje tek nakon 26 dana, a u vodi bez agregacije nakon 125 dana (Goldberg, 1987).

U procesu razgradnje pesticida značajnu ulogu igraju mikroorganizmi. U česmenskoj vodi, gde su mikroorganizmi minimalno zastupljeni, koncentracija fenulona nije se izmenila u toku 80 dana (veštačka smeša vode i pesticida i praćenjem njegove koncentracije svakodnevno) dok je u jezerskoj vodi njegova koncentracija opala na 40 % od početne nakon 30 dana. (Brewer, 1979)

U vodi živi veliki broj organizama različitog karaktera, mikroorganizmi, biljke, životinje koji doprinose razlagajući pesticida. Pod uticajem planktona dolazi do posebnog razlaganja pesticida.

Tabela 12. Razlaganje herbicida i insekticida pod uticajem planktona

Kultura	Ostaci posle 2 nedelje			
	Atrazin	2,4-D (estar)	Diazinon	Metoksihlor
<i>Chlorella sp.</i>	91	33	96	34
<i>Gorollela sp.</i>	-	17	94	37
<i>Manorophidium sp.</i>	99	13	90	65
<i>Kaliella sp.</i>	99	27	82	63
<i>Nitzshia sp.</i>	98	64	78	40

Isparljivost pesticida sa površine vode pokorava se opštim fizičkim zakonitostima isparljivosti rastvorenih materija u rastvaraču.

2.7. Dejstvo pesticida na biljke

Različiti pesticidi poseduju različite fiziološke aktivnosti u odnosu na biljke. Nejednaka otpornost biljaka prema delovanju pesticida određena je hemijskim sastavom, dozama i oblicima preparata, načinom i vremenom obrade, fazama rasta, anatomskom i morfološkom građom biljke, njenih organa i tkiva. Utvrđeno je da među

biljkama nema nijedne sistematske jedinice u okviru koje bi svi predstavnici bili podjednako otporni na dejstvo pesticida.

Uticaj pesticida na biljke počinje od momenta kontakta i prodora kroz lišće, stablo i korenje. Različiti pesticidi se ponašaju različito. Većina herbicida i insekticida sistematskog delovanja, akaricidi i neki fungicidi dosta brzo prodiru i kreću se po biljci, ispoljavajući opšti uticaj na ceo biljni organizam. Neki preparati koji nisu sposobni da se kreću, lokalizuju se na mestima prvobitnog prodora ispoljavajući lokalno dejstvo. Pri nepravilnoj primeni, pesticidi mogu da oštećuju biljke, da izazivaju opekatine, odumiranje tkiva. Opekatine biljaka izazivaju H^+ joni u radnom rastvoru i one zavise od stepena elektrolitičke disocijacije jedinjenja. Posebno štetno dejstvo je izraženo kod preparata koji u sebi sadrže višak mineralnih kiselina i kiselih soli. Za biljke su opasni i aromatični ugljovodonici koji se nalaze u mineralnim uljima. Pri obradi biljaka u razvoju, pesticidi u biljni organizam prodiru uglavnom kroz lišće u obliku tečnost i pare. Hidrofilni pesticidi mogu da prođu kroz vodenu fazu kautikule najpre u kisele komponente kutina, zatim u pektin i vodopropustljivu citoplazmatičnu membranu.

Neracionalna i nestručna primena pesticida je često prouzrokovala prilične štete, posebno na početku intenzivne hemizacije u poljoprivredi. Tako je, 1965. godine, na više hiljada hektara plantaže i drugih zasada jabuka u nekadašnjoj SFRJ izazvana sterilnost zbog pogrešne primene pesticida karbarila u periodu cvetanja i posle cvetanja. Tokom sedamdesetih godina prošlog veka, zbog zakasnele primene preparata na bazi dikamba, izazvana je sterilnost pšenice koja je bila u punom razvoju u intenzitetu od 5 do 100 %.

Biljni svet je uticaju pesticida bio izložen u toku vietnameskog rata. Amerikanci su na teritoriji Vijetnama u periodu od 1962. do 1970. godine bacili preko 50000 tona herbicida i time uništili oko 1530000 hektara šuma i useva (Karakčijev, 1988). U tretiranim oblastima Vijetnama došlo je do naglog razmnožavanja štetnih insekata i životinja, koji su poznati vektori - prenosnici tropskih zaraznih bolesti. Tamo gde su mangrove šume najviše uništavane nastali su močvarni predeli i došlo je do bujanja bambusa, paprati i razmožavanja malaričnih komaraca. Pojava velikog broja pacova povezana je sa pojavom velikih količina organskih materija, zbog razlaganja lišća, korova i drveća (Kalojanova-Simeonova, 1980).

2.8. Ulazak pesticida u lanac ishrane

Unošenje rezidua pesticida vodom za piće i hranom je najznačajniji put kojim je opšta populacija izložena pesticidima.

Namirnice životinjskog porekla mogu da sadrže rezidue pesticida ukoliko se životinje hrane zagodenom biljnom hranom (rezanci šećerne repe, lucerka, cerealije, soja) ili ako je na životnjama vršeno suzbijanje parazita i insekata. Ispitivanja vršena u

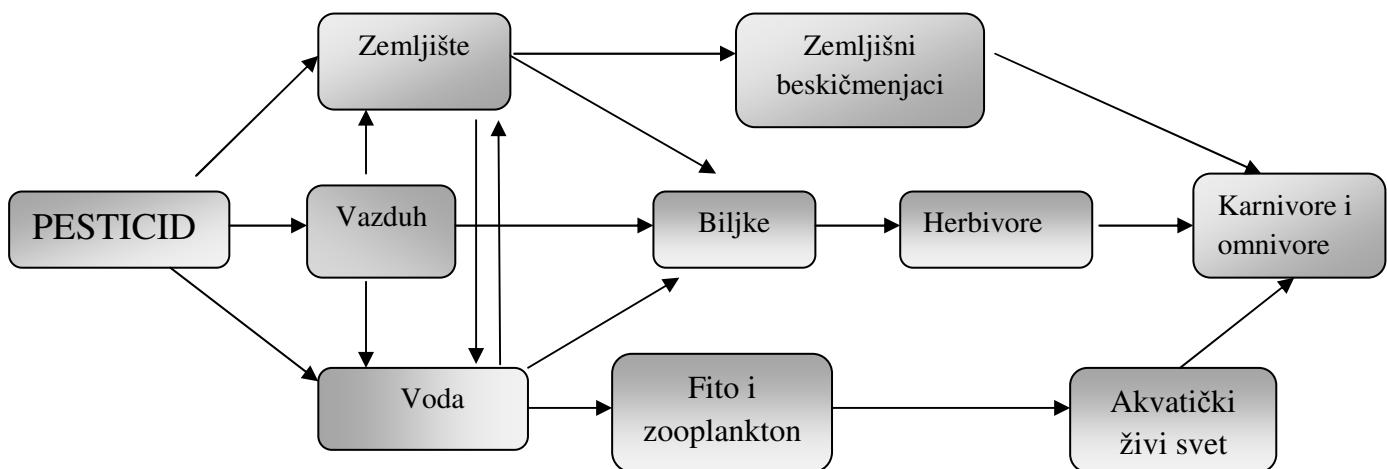
Italiji i Velikoj Britaniji pokazala su da stanovnici ovih zemalja unose pesticide hranom u količini koja je ispod 1 % prihvatljivog dnevnog unosa (tabela 13).

Tabela 13. Unos rezidua nekih pesticida hranom i vodom za piće u Italiji i Velikoj Britaniji

Zemlja	Pesticid	*PDU ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dan}$)	Ostvareni dnevni unos ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dan}$)
Italija (1986/87)	Lindan	10	0,3
	DDT	20	0,1
	Malation	20	0,8
	Paration	5	0,5
V. Britanija (1970/80)	Lindan	10	0,04
	Dieldrin	0,1	0,02
	DDT	20	0,05

*PDU iz vremena u kome je vršeno ispitivanje

Namirnice biljnog porekla mogu da sadrže rezidue pesticida kao posledicu tretiranja biljnih kultura u toku rasta i razvoja kao i za vreme njihovog skladištenja. Biljke mogu da resorbuju pesticide iz zemljišta tretiranog pesticidima. Na slici 4. su prikazani mogući putevi zagađenja namirnica pesticidima.



Slika 4. Mogući putevi zagađenja namirnica pesticidima

Perzistentni i neperzistentni pesticidi su identifikovani u krvi, urinu i adipoznom tkivu profesionalno izloženih osoba, ali i u opštoj populaciji zbog osobine većine pesticida da se akumuliraju u organizmu. Organohlorni pesticidi se lako akumuiraju u lancu ishrane zbog svoje liposolubilnosti.

Hrana pod kojom se podrazumevaju organske materije koje se koriste kao energetski i gradivni materijal je čovekova potreba i odvajkada je najvažniji deo borbe za opstanak ljudske vrste bilo nalaženje dovoljne količine hrane. Danas je situacija povoljnija. Najveći broj zemalja rešio je problem prehrane.

Brojni zagađivači i prisustvo široke palete zagađujućih supstanci u životnoj sredini, doprineli su da se poslednjih godina značajna pažnja posveti kvalitetu i zdravstvenoj ispravnosti hrane odnosno namirnica. Izvori zagađivanja hrane mogu se podeliti u više grupa.

Prvu grupu čine određeni prirodni organizmi (gljive, biljke, ribe, školjke) koji u sebi sadrže toksične supstance. Njihove toksične osobine vezane su za posebna, fiziološki aktivna jedinjenja, i za smeše hemijskih supstancija.

Drugu grupu čine životne namirnice i voda iz kojih se priprema hrana, a koje su zagađene toksičnim supstancama životne sredine koje su sposobne da se uključe u lanac ishrane.

Treći izvor zagađivanja predstavlja sam čovek koji svesno dodaje hrani različite supstance sa ciljem da se hrana učini privlačnijom i sa ciljem njenog dužeg održavanja u nepromjenjenom obliku.

2.9. Pesticidi u organizmu toplokrvnih životinja i čoveka

Pesticidi mogu u organizam čoveka i životinja dospeti na sledeći način:

- preko usta
- preko kože
- preko organa za disanje.

Brzina dejstva pesticida dospelih u organizam čoveka ili životinja zavisi od puteva prodiranja. Posle apsorpcije pesticid biva transportovan krvlju do različitih tkiva i organa. Brže će nastupiti dejstvo pesticida čija resorpcija počinje u želucu. Rastvorljivost pesticida je značajna za njihovu brzu resorpciju u organizmu životinja i čoveka.

Apsorpcija pesticida protiče selektivno, tako da se i hemijski slični pesticidi ne apsorbuju istom brzinom. Digestivni sistem u pojedinim delovima ima različite pH vrednosti i poseduje različite enzimatske sisteme, tako da će pesticid prolazeći kroz ovaj sistem nailaziti na različite fiziološke uslove. Tako na primer, pesticid koji se ne rastvara u kiselinama prolazi kroz želudac bez apsorpcije i tek prelaskom u creva, pod uticajem bazne sredine, dolazi do njegovog rastvaranja i apsorpcije.

Pesticidi dospeli u organizam oralno, prelaze u krv i odlaze u jetru. U jetri se ovi pesticidi delimično zadrže, ili putem žuči odmah izlučuju.

Pesticidi dospeli na kožu razvijaju svoje dejstvo na mestu kontakta ili se preko kože resorbuju i deluju unutar organizma. Neki pesticidi, kao DNOC mogu se apsorbovati kroz kožu i izazvati trovanje.

Udisanjem para nekih pesticida, može se izazvati trovanje. Oni tada deluju na disajne puteve lokalno ili se preko pluća resorbuju i deluju negde na drugom mestu u organizmu. Inhalaciono mogu delovati pesticidi koji lako isparavaju. Pesticidi u pluća dospevaju u obliku gasa, pare ili aerosola. Brzina trovanja aerosolima jednaka je brzini trovanja pri intravenskom unošenju pesticida. Povećanjem brzine disanja, povećava se prodiranje pesticida u pluća.

Pesticidi na organizam čoveka mogu imati lokalno i sistemsko dejstvo.

Lokalno dejstvo je pojava toksičnog efekta na mestu kontakta pesticida sa organizmom.

Ako neki pesticid deluje negde u organizmu, ali van mesta kontakta govori se o sistemskom dejstvu.

Prema mogućnosti trovanja ljudi pesticidima razlikuju se sledeće grupe:

- ljudi koji se bave proizvodnjom, transportom i prometom
- ljudi koji se bave primenom pesticida
- ljudi koji se hrane hranom zagađenom pesticidima.

Mogućnost trovanja ovih kategorija ljudi u značajnom stepenu može biti smanjena ako bi se u radu pridržavali propisanih mera predostrožnosti.

Intoksikacija pesticidima može se ispoljiti akutno i hronično.

Hroničnom trovanju nisu izloženi samo ljudi koji se bave proizvodnjom, transportom, prometom i primenom pesticida, već i čitava populacija zbog unošenja hrane zagađenom pesticidima (Janjić, 2005).

2.10. Mehanizam delovanja pesticida

Mnogobrojni naučni radovi su pokazali da su mehanizmi delovanja pesticida izuzetno složeni i komplikovani. Ta složenost potiče otuda što su sami procesi i reakcije u živim organizmima veoma složeni, komplikovani, međusobno isprepletani i često nedovoljno poznati, a pogotovo ako se u njih umeša toksična supstanca koja se u ovim procesima i sama menja, a i remeti ceo sistem koji je inače dinamičan i gde postoje različite interakcije između pojedinih komponenti.

Sve precizniji i noviji instrumenti omogućili su detaljnija proučavanja na nivou ćelije i molekulskih kompleksa. Uporedo sa detaljnim proučavanjem i poznavanjem mehanizma delovanja pojedinih pesticida i razvojem postupaka za transfer gena stvorene su transgene biljke koje su potpuno tolerantne na totalne herbicide. Isto tako, u

novije vreme je otkriveno 20 do 30 pesticida sa sasvim novim mehanizmom delovanja (Janjić, 2009).

Svi metabolički procesi u živim organizmima su katalizovani procesi. Pod uslovima koji postoje u živim ćelijama, hemijske reakcije se ne odvijaju spontano nego u njima učestvuju mnogobrojni enzimi. Aktivnost enzima zavisi od različitih aktivatora i inhibitora. Inhibitori su često molekuli pesticida.

Apsorpcija, transport, a uz to i biotransformacija molekula pesticida su veoma značajni za ispoljavanje delovanja pesticida. Neko jedinjenje može da ispolji svoje delovanje samo ako dospe u dovoljnoj količini do mesta delovanja.

Mehanizam delovanja pesticida je povezan sa inhibicijom ili stimulacijom ključne reakcije na primarnom mestu delovanja. Inhibicija zavisi od koncentracije pesticida koji se pojavljuje kao inhibitor. Zahvaljujući primeni inhibitora otkriveni su vrlo složeni mehanizmi delovanja složenih fermentisanih sistema. Za bilo kakvo ispitivanje odnosa doze i efekta pesticida u organizmu veoma je značajno poznavati mehanizam dejstva pesticida.

Delovanje pesticida u živim organizmima zasniva se na inhibiciji sinteze biomolekularne strukture i funkcionalne organizacije ćelije putem obrazovanja proteina, nukleinskih kiselina, lipida i funkcionalnih komponenata ćelije. Njihovo delovanje se zasniva na remećenju procesa sinteze i razgradnje biomolekula u specifičnim aktivnostima ćelije kao i dezintegraciji transfera i transformaciji hemijske energije i njenog korišćenja u raznim oblastima biološke aktivnosti ćelije. Sve te hemijske reakcije koje se odvijaju pod dejstvom molekula pesticida najčešće se odvijaju jedna pored druge, ali konsekventno, na principima osnovnih zakona termodinamike i hemijske kinetike.

Prisustvo apolarnih i više vrsta funkcionalnih grupa na bočnim radikalima aminokiselina u osnovnom lancu enzima, kao i postojanja izvesne količine slobodnih amino kiselina predstavlja osnovu za interakciju sa molekulom pesticida i njihovim metabolitima. Inhibicija enzimske aktivnosti može nastati kao rezultat vezivanja molekula pesticida ili njegovog metabolita za funkcionalne grupe aktivnog centra enzima čime ga blokiraju i onemogućuju interakciju sa pravim supstratom. Često jedan pesticid oštećuje više raznih enzima. Ako pesticid oštećuje više enzima onda će se njegov toksični efekat manifestovati samo u slučaju da on ošteti vitalno važne enzime, ili više različitih pesticida oštećuju isti enzimski sistem. U tom slučaju pesticidi, iako različitog hemijskog sastava izazivaju isti toksični efekat, ali mehanizam delovanja ne mora biti isti.

U sagledavanju suštine mehanizma dejstva pesticida značajno bi bilo takozvano primarno mesto preko koga pesticid ispoljava svoje dejstvo. To je prva i ključna reakcija koja je inhibirana pod uticajem pesticida.

Zbog postojanja velikog broja pesticida koji pripadaju različitim grupama nemoguće je govoriti o svim mehanizmima njihovog delovanja. Razumevanje mehanizma delovanja pesticida ima teorijski i praktični značaj. Istraživačima ova znanja obezbeđuju teorijsku osnovu za objašnjenje i interpretaciju rezultata koji su dobijeni u eksperimentalnom radu. Praktičarima omogućavaju razvijanje postupaka, procedura,

načina, količina i vremenom primene radi pojačavanja, ubrzavanja, sprečavanja toksičnog delovanja pesticida. A sintetičarima-hemičarima i toksikoložima razvoj novih pesticida koji su manje toksični i još u većem stepenu selektivni za određene organizme.

3. HERBICIDI, INSEKTICIDI I METODE ODREĐIVANJA

3.1. Herbicidi - opšte osobine

Prvi počeci primene herbicida datiraju od vremena kada je čovek primetio da neke materije uništavaju biljke. Oni su nastali kao jedinjenja novijeg datuma. Tek krajem XIX veka zapažena su herbicidna svojstva nekih neorganskih jedinjenja kao što su fero-sulfat, bakar-sulfat, natrijum-nitrat.

Ubrzan razvoj prirodnih nauka u XIX veku omogućio je i stvaranje osnove za razvoj nauke o herbicidima. Prvi selektivni herbicidi 2,4-D, MCPA i 2,4,5-T, bili su namenjeni suzbijanju širokolistnih korova u usevima žita, a razvijeni tajno u samom početku II svetskog rata, kao potencijalni hemijski agensi. Njihovo otkriće i primena izjednačava se sa najkrupnijim pronalascima u poljoprivredi. Od tog vremena do danas sintetizovan je veliki broj organskih jedinjenja.

Pod herbicidima se podrazumevaju različita hemijska jedinjenja organskog i neorganskog porekla koja služe za uništavanje biljaka. Potiče od latinske reči *herba* - trava, biljka i *cido, cedere* - ubiti, uništiti. Praktično se pod herbicidima podrazumevaju samo ona jedinjenja koja se koriste ili su predviđena za borbu protiv korovskih biljaka. Herbicidi mogu delovati i na gajene biljke. Zbog toga je važno poznavati delovanje svakog herbicida na korovske i gajene biljke. Od izuzetnog značaja je poznavati kako, kada, na koji način i pod kojim uslovima herbicid deluje, pošto njegovo delovanje nastupa često u određenim fazama svake biljne vrste, a zavisi i od ekoloških uslova.

Po hemijskom sastavu herbicidi mogu biti neorganskog i organskog porekla. Herbicidi neorganskog porekla primenjivali su se na samom početku pojave herbicida, a intenzivna proizvodnja herbicida usledila je posle II svetskog rata.

Po karakteru dejstva na biljke herbicidi se dele u dve grupe:

- totalne (koji uništavaju sve biljke)
- selektivne (koji uništavaju samo određene vrste biljaka tzv. korovske biljke)

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. Pri njihovoj primeni se narušavaju životni procesi u biljci, a pojedini delovi biljaka stradaju. Uništavaju samo one delove biljke sa kojima su došli u kontakt.

Translokacioni herbicidi ili herbicidi sistemičnog dejstva prenose se sprovodnim sistemima po organizmu biljke. Apsorbuju se brzo i raznose po celom organizmu biljke izazivajući njen uništavanje.

Potrebno je istaći da se u poljoprivredi i šumarstvu upotrebljavaju jedinjenja koja se ne mogu po svojoj nameni svrstati u herbicide jer ne uništavaju biljke, već utiču na metabolizam biljke tako što ubrzavaju, usporavaju ili modifikuju pojedine fiziološke procese. Ova jedinjenja nazivaju se fiziotropi ili regulatori rastenja. Ovakva jedinjenja se upotrebljavaju za ubrzavanje oživljavanja sadnog materijala, prekidanje perioda

mirovanja, za stimulaciju rasta i povećanje prinosa, za usporavanje rasta, za sprečavanje klijanja.

Prema vremenu primene herbicidi se dele na:

- herbicide koji se primenjuju pre setve ili sadnje gajenih biljaka (presowing)
- herbicide koji se primenjuju pre nicanja gajenih biljaka (preemergence)
- herbicide koji se primenjuju posle nicanja gajenih biljaka (postemergence).

U grupu herbicida se takođe navode defolijanti ili desikanti, koji se po karakteru dejstva približavaju herbicidima kontaktnog dejstva. Defolijanti i desikanti se mogu upotrebljavati u vojne svrhe (Audus, 1976).

3.1.1. Mehanizam dejstva herbicida

Za razumevanje mehanizma dejstva herbicida potrebno je dobro poznavati biohemijske procese u biljci. Mnogi biohemski i fiziološki procesi su izuzetno složeni, međusobno isprepletani i jako povezani. Zato se isti herbicidi, po mehanizmu delovanja, često svrstavaju u različite grupe, jer se njihov efekat ispoljava na dva ili više mesta. Poremećaj jedne aktivnosti u ćeliji remeti čitav niz procesa, ali uvek ostaje pitanje šta je tu primarno mesto delovanja, a šta su posledice koje su nastale inhibicijom nekog važnog procesa.

Sve mehanizme delovanja herbicida svrstavamo u šest grupa:

- inhibicija fotosinteze
- inhibicija biosinteze pigmenata
- inhibicija biosinteze lipida
- inhibicija biosinteze aminokiselina
- inhibicija deobe ćelija
- inhibicija aktivnosti auksina.

Danas se koriste herbicidi za svega 15-20 ciljnih mesta delovanja. Još 33 enzima je identifikovano, ali se herbicidi koji na ove enzime deluju još ne koriste komercijalno. U tabeli 14 data je klasifikacija herbicida prema mehanizmu delovanja.

Herbicidi su jedinjenja čija se delovanja na biljke zasnivaju na njihovoj fiziološkoj aktivnosti. Glavni mehanizam delovanja različitih grupa herbicida obično se razmatra preko njihovog delovanja na disanje, intermedijarni metabolizam, sintezu nukleinskih kiselina, proteina, lipida i fotosinteze.

Primarno mesto delovanja herbicida je teško utvrditi s obzirom na multiple efekte i različite opsege delovanja različitih koncentracija, naročito *in vitro* uslovima. Više od polovine danas poznatih herbicida ispoljava svoje delovanje na proces fotosinteze (Corbett i sar., 1984).

Da bi primena herbicida bila racionalna i bezbedna oni moraju da zadovolje sledeće kriterijume:

- moraju biti visoko selektivni za gajene biljke i netoksični za druge organizme
- moraju delovati brzo i efikasno u manjim dozama
- moraju se brzo degradirati u spoljašnjim uslovima
- njihova proizvodnja i primena mora biti jeftina.

Samo mali broj herbicida zadovoljava ove kriterijume (Ashton i Crafts, 1981).

Tabela 14. Klasifikacija herbicida prema mehanizmu delovanja (HRAC/Moa, 1998)

Grupa po HRAC*	Mehanizam delovanja	Hemiska grupa	WSSA grupa**
B	Inhibitori acatolaktat sintetaze (ALS)	Sulfoniluree Imadazolinoni Triazolopirimidini Pirimidiniltiobenzodati	2
C ₁	Inhibitori fotosinteze u fotosistemu II	Triazini Triazinoni Uracil Fenilkarbamatni	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	Karbamatni Benzil etri	23 27
K ₃	Inhibitori deobe ćelija	Hloracetamidi Karbamatni Acetamidi Benzamidi Oksiacetamidi	15
L	Inhibitori biosinteze celuloze	Nitrili Benzamidi	20 21
N	Inhibitori biosinteze lipida	Tiokarbamatni Fosforditionati Benzofurani Hlorkarbonske kiseline	8 26

*HRAC - Herbicide Resistance Action Committee

**WSSA - Weed Science of America

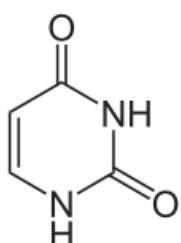
Prilikom proučavanja primarnog mehanizma delovanja herbicida treba koristiti niske koncentracije herbicida, jer se samo u tom slučaju može utvrditi njihovo specifično delovanje. Herbicidi koji deluju na fotosintezu podeljeni su u grupe prema njihovom primarnom delovanju na:

- herbicide koji inhibiraju transport elektrona
- herbicide koji razdvajaju transport elektrona od transporta protona
- herbicide koji odvode elektrone sa normalnog, fiziološkog puta u elektron-transportnom lancu (akceptori elektrona)
- inhibitori sinteze ATP
- inhibitori sinteze fotosintetskih pigmenata
- inhibitori metabolizma ugljenika.

3.2. Bromacil

Uracili su mala grupa zemljišnih herbicida čiju hemijsku osnovu molekula čini šestočlani heterocoklični prsten sa dva atoma azota. Uvedeni su u primenu 1961. godine. Ispoljavaju relativno slabu selektivnost i veoma često se koriste kao totalni herbicidi na nepoljoprivrednim površinama.

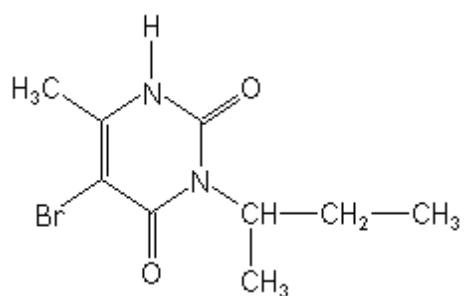
Strukturna formula uracila prikazana je na slici 5. Ovi heterociklusi nazivaju se diazini. Uracil je najvažniji predstavnik diazina, jer u njegove derivate spadaju fiziološki važna jedinjenja koja se dobijaju hidrolizom nukleinskih kiselina. Herbicidi koji su našli široku praktičnu primenu sintetizovani su na bazi piridazina i uracila. Bromacil je derivat uracila.



Slika 5. Strukturna formula uracila

Od herbicida kao jedinjenja sa šestočlanim heterocikličnim prstenom sa dva heteroatoma najznačajniji su heterociklusi sa dva atoma azota. To su tri izomerna heterociklusa:

- piridazin
- pirimidin ili uracil i
- pirazin.



Slika 6. Strukturna formula bromacila

Bromacil je herbicid koji pripada grupi uracil pesticida. Po IUPAC-ovoj nomenklaturi ima naziv 5-bromo-6-metil-3-(1-metilpropil)uracil. Strukturna formula bromacila prikazana je na slici 6. Komercijalni naziv bromacila je Hyvar L, Hyvar X-L, Krovar.

Bromacil je rastvoran u vodenim rastvorima baza, stabilan je pri dejstvu baza, dok se pod dejstvom jakih kiselina razlaže, naročito na povišenim temperaturama.

Tabela 15. Fizičko-hemijske karakteristike bromacila (Hort Research, 2000)

Boja i agregatno stanje	bela kristalna supstanca
Molekulska formula	C ₉ H ₁₃ BrN ₂ O ₂
Molekulska masa (g/mol)	261,12
Tačka ključanja (°C)	411
Tačka topljenja (°C)	158-159
Napon pare (mPa) na 25 °C	0,033
Podeoni koeficijent	2,11
Adsorpcioni koeficijent	32
Rastvorljivost u vodi (mg/dm ³) na 25 °C	850
Rastvorljivost u polarnim rastvaračima	Umereno rastvoran u acetonu, ACN i etanolu

Koristi se za zaštitu biljaka od korova na neposejanim njivama, kao i na površinama zasađenim voćem i ananasom (Clayton i Clayton, 1981). Bromacil se nanosi na zemljište pre i u toku perioda aktivnog rastenja korova (Toxnet, 1975-1986). Naročito veliku primenu ima protiv mnogobrojnih trava i za uništavanje korovskih biljaka u poljima zasađenim citrusima i tada se nanosi u manjim količinama. U većim količinama koristi se za sterilizaciju zemljišta kao i za totalno suzbijanje nekih višegodišnjih korova (Melnikov i sar., 1980).

Najčešće se proizvodi u obliku soli natrijuma i litijuma. Priprema se u tri formulacije, u kombinaciji sa drugim herbicidima, kao što su: Chemagro Terminex - A (sadrži amitrol i diuron), Hyavar X i Krovar I DF (sadrži diuron).

Mehanizam delovanja bromacila je na inhibiciju fotosinteze. Herbicide koji deluju na fotosintezu Clanton i Black (1985) podelili su u grupe prema njihovom primarnom mestu delovanja na:

- herbicide koji inhibiraju transport elektrona
- herbicide koji razdvajaju elektron transport od transporta protona (ucoupler)
- herbicide koji dovode elektrone sa normalnog, fiziološkog puta u elektron-transportnom lancu (akceptori elektrona)
- inhibitori sinteze ATP
- inhibitori sinteze fotosintetskih pigmenata
- inhibitori metabolizma ugljenika.

Ne podleže hidrolizi pod normalnim uslovima. Primarni put razgradnje je fotolizom u vodi pod alkalnim uslovima i razgrađuje se mikrobnom biodegradacijom u anaerobnom zemljištu.

U poljima tretiranim bromacilom vreme razgradnje mu je bilo 124-155 dana (USEPA, 1996).

Inhibitori elektronskog transporta

Najveći broj herbicida (oko 50 %) deluje na „mestu uree“ između fotosistema I i II. U herbicide koji inhibiraju elektron-transport spadaju: triazini, uracili i piridazini.

Uracili deluju na inhibiciju fotosinteze u fotosistemu II. Reakciju Hill-a u izolovanim hloroplastima inhibiraju za 50 % u veoma malim koncentracijama (1-5 μM).

Bromacil, kao i svi uracil herbicidi, deluje na inhibiciju fotosinteze u fotosistemu II, tako što svoje primarno delovanje ispoljava u inhibiciji transporta elektrona u fotosistemu II.

Toksičnost bromacila

U laboratorijskim istraživanjima, bromacil je slabo toksičan kada se unosi oralno, dermalno ili inhalaciono u organizam i svrstava se u IV kategoriju otrova - malotoksični herbicid. Iritira oči, kožu i respiratorni trakt.

Ispitivanja na psima su pokazala da 100 mg/kg bromacila unetih oralno u organizam izazivaju mišićnu slabost, vodu na ustima, dijareju, širenje zenica, povraćanje i razdražljivost.

Pacovi koji su pojeli po jediničnu dozu bromacila gube telesnu masu, bledi su, iscrpljeni i ubrzano dišu. Akutna oralna doza za pacove LD₅₀ je 5200 mg/kg telesne težine.

Za četiri sata od unošenja 250 mg/kg, ovca postaje mlitava i nepravilno hoda (OHS Inc., 1991).

LC₅₀ za ribe iznosi 50 do 60 mg/dm³, pri ekspoziciji od 48 sati.

Bromacil nije toksičan za pčele i druge insekte.

3.2.1. Metode za određivanje bromacila

Poznato je dosta analitičkih metoda za određivanje bromacila u raznim uzorcima. Nema podataka o kinetičko-spektrofotometrijskim metodama za njegovo određivanje.

Bromacil je određivan HPLC metodom nakon solid-phase ekstrakcije u uzorcima zemljišta. Recovery je 90 %, LOD je 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Turin i Bowman, 1993).

Boyd-Boland (1995; 1996) i saradnici određivali su bromacil u uzorcima vode, vina, sokova i drugim prirodnim uzorcima gasnom hromatografijom (GC-MS) i HPLC metodom sa masenom detekcijom MS. Preciznost metode je 8-22 %, a LOD 0,1 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$. Isto tako su razradene metode za određivanje bromacila gasnom hromatografijom sa azotno-fosfornom detekcijom (GC-NPD) i plameno-jonizacionim detektorom GC-FID (Hernandezi sar., 2000; Krutz i sar., 2003).

Li i saradnici (2007) određivali su bromacil gasnom hromatografijom sa masenom detekcijom (GC-MS) nakon solid-phase ekstrakcije. Kalibraciona kriva je linearna u intervalu koncentracija od 0,05 do 5 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$. Recovery je 108 %, a RSD je 4,4 %.

Pojedini istraživači su određivali strukturu bromacila i sintetizovali ga NMR i IR spektroskopijom (Ren i sar., 2008).

Fluidna ekstrakcija pod visokim pritiskom (Presured Fluid Extraction) je nova metoda za određivanje bromacila i drugih herbicida u ilovači na Havajima. Recovery se kreće između 79 i 104 % sa standardnom devijacijom 1 - 7 % u uzorcima gde je bilo vode, a u uzorcima gde je rađena Soxlet ekstrakcija Recovery je 91 % i standardna devijacija je 6 % (Zhu i sar., 2000).

Za određivanje bromacila u smeši fenola i herbicida korišćena je derivatna spektrofotometrija. RSD je 0,05 - 4 %, a recovery 97 - 110 % (Baranowska i Pieszko, 2000).

Bromacil je određivan u zemljištu na poljima ananasa gasnom hromatografijom kuplovanom sa selektivnim jon monitoring modom (SIM). Kalibraciona kriva se kreće od 0,01 do 25 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$. Recovery je od 91 do 101 % i LOD iznosi 5 ng/g (Zhu i Li, 2002).

Alavi (2008) i saradnici su takođe određivali bromacil u zemljištu gde se uzgaja ananas na Havajima gasnom hromatografijom kuplovanom sa elektron impact masenim selektivnim detektorom (GC-MSD). LOD iznosi 50 ng/g i recovery 70 - 120 %.

Bromacil je određivan tečno-tečnom ekstrakcijom (LLE), solid-phase ekstrakcijom (SPE), solid-phase mikro ekstrakcijom (SPME), gasnom hromatografijom sa masenom detekcijom (GC-MS) i HPLC metodom u biološkim uzorcima. Kalibraciona kriva je linearna u intervalu koncentracija od 0,16 - 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$. LOD iznosi od 0,12 - 0,14 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ kod uzoraka plazme i krvi, a u uzorcima urina 0,11 - 0,12 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ (Kumazawa i Suzuki, 2000).

Interlaboratorijska analiza je vršena za određivanje bromacila u različitim vodama gasnom hromatografijom korišćenjem različitih kolona. Kalibraciona kriva je linearna u intervalu koncentracija od 0,1 - 0,5 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$ i recovery 46,8 - 100,8 % (Senseman i sar., 2003).

Bromacil je određivan u površinskim vodama HPLC metodom. Kalibraciona kriva je u intervalu koncentracija 0,019 - 66 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$ sa preciznošću do 2 % (EPA 2008).

Bromacil je određivan u sojinom ulju gasnom hromatografijom sa MS detekcijom. Bromacil je izdvajan tečno - tečnom ekstrakcijom i disperzivnom tečno - čvrstom ekstrakcijom (SPE). Recovery se kreće od 80 - 114 % sa RSD između 2 i 14 % za koncentracioni interval od 0,04 - 0,16 mg/kg. LOQ skoro svih ispitanih uzoraka manji je od maksimalno dozvoljenih vrednosti (MRL) bromacila u ulju (Nguyen i sar., 2010).

Isti istraživači (Nguyen i sar., 2009) su razvili multirezidualnu metodu (GC - MS, LC-TMS i LC/ESI-MS/MS) za određivanje velikog broja pesticida (118) u voćnom soku. Recovery se kreće između 77 i 140%, RSD je ispod 14 %, a LOQ iznosi 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Razrađena je metoda za direktno određivanje rezidua bromacila i diurona u prirodnim vodama tečnom hromatografijom (LC). Kalibraciona prava je linearna u intervalu koncentracija od 0,2 - 1 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$. Recovery se kreće između 83 i 107 %. RSD je od 3 - 8 % (Sancho i sar., 1997).

Pinto i Lancas (2009) su razradili tečni ekstraktionski sistem pod pritiskom (Pressurized Solvent Extraction) za izdvajanje bromacila iz zemljišta, a za identifikaciju i njegovo određivanje koristili HPLC metodu kuplovanu sa diodnom detekcijom (HPLC-DAD). LOD iznosi 0,025 mg/kg, a LOQ je 0,038 mg/kg. Linearnost je od 0,08 - 1,50 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$.

Derivatna spektrofotometrija razvijena je za određivanje bromacila u vodi i zemljištu u intervalu koncentracija od 1 - 50 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$. Recovery se kreće između 98 i

120 % za vodu sa RSD 0,6 - 4,9 % dok je za zemljište od 90 - 130 % sa RSD 1,5 - 4,8 % (Baranowska i Pieszko, 2002).

Razrađena je mikrotalasna tečno-čvrsta mikroekstrakciona metoda za kvantitativno određivanje rezidua pesticida u paradajzu u intervalu koncentracija od 10 - 5000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i korelacionim koeficijentom $r = 0,99$. LOD iznosi 8 $\mu\text{g}/\text{kg}$, a LOQ 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$. RSD je ispod 15 %. Validacija metode vršena je novom FMAE/SPME metodom (Guillet i sar., 2009).

Ultra-HPLC-TMS metoda je razrađena za određivanje bromacila u biološkim uzorcima i otpadnim vodama u intervalu koncentracija 0,025 - 0,1 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$. LOD iznosi 0,1 pg (Marin i sar., 2009).

3.3. Difenzokvat - metil sulfat

U nizu jedinjenja sa 6 atoma u prstenu otkriven je veliki broj pesticida koji imaju praktičnu upotrebu u klasi pirana, piridina i dipiridina.

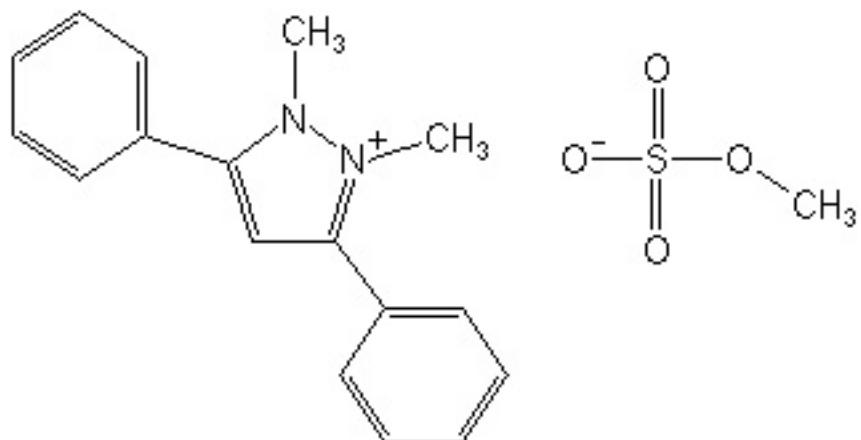
Fungicidna i herbicidna svojstva su karakteristična za mnoge derivate piridina. Pri njihovom hidriranju umanjuje se fungicidna i herbicidna aktivnost, ali se pojavljuju insekticidna svojstva. Pripadaju grupi šestočlanih heterocikličnih jedinjenja sa jednim heteroatomom.

Svojstva herbicida ispoljavaju derivati 2,2'-dipiridina i 4,4'-dipiridina. Pri alkalovanju 4,4'-dipiridina metilhloridom, dimetilsulfatom, 3-metilsulfatom i 3-metilditiofosfatom obrazuju se kvaternarne amonijumove soli koje se pojavljuju kao jaki kontaktni herbicidi totalnog dejstva. Soli ovih jedinjenja predstavljaju higroskopne kristalne materije koje se brzo rastvaraju na vazduhu, te se zbog toga ova jedinjenja ne proizvode u kristalnom obliku već u obliku 20 % vodenog rastvora.

Difenzokvat inhibira fotosintezu u fotosistemu I. Fotosistem I čine grupe proteina i pigmenata čiji reakcioni centar (P 700) apsorbuje svetlost na talasnoj dužini 700 nm. Herbicidi dipiridini su akceptori elektrona u fotosistemu I. Za ispoljavanje delovanja dipiridina u fotosistemu I od značaja su njihove sledeće osobine:

- velika rastvorljivost u vodi uz disocijaciju na pozitivni i negativni jon, pri čemu se pozitivni jon lako može apsorbovati u biljna tkiva;
- negativan hemijski oksido-redukcion potencijal (- 349 mV za dikvat i - 446 mV za parakvat);
- nezavistan od pH, a sličan potencijalu nekog jedinjenja za elektrone transportnog lanca;
- pozitivan jon lako prima elektron;
- redukovana forma je stabilna (a oksiduje se u prisustvu kiseonika), a aktivna forma se stalno obnavlja.

Dipiridini u biološkim sistemima učestvuju u redukciono - oksidativnim reakcijama.



Slika 7. Strukturalna formula difenzokvat-metil sulfata

Difenzokvat-metil sulfat (slika 7) je herbicid koji po svojoj hemijskoj strukturi pripada grupi derivata dipiridina i grupi kvaternarnih amonijum herbicida. Ova grupa hemijskih jedinjenja po svojoj osnovi razne biološke aktivnosti zauzima jedno od prvih mesta među organskim jedinjenjima.

Prema IPAC-u naziv mu je 1,2-dimetil-3,5-difenil-1-H-pirazol metil sulfat. Drugi naziv mu je finaven, mataven i avenže.

Od sinteze parakvata i dikvata pa do otkrivanja novih herbicidnih svojstava prošlo je mnogo vremena. Od tada pa do današnjih dana veliki broj istraživača je radio na proučavanju različitih svojstava ovih herbicida. Sve je to doprinelo da danas bude poznato šta ova jedinjenja mogu da prouzrokuju u živim organizmima i spoljašnjoj sredini. Poslednjih godina je više podataka o tome kako parakvat, dikvat i difenzokvat deluju na biljke, životinje i čoveka.

Difenzokvat je formulisan kao so metil sulfata, selektivan herbicid za kontrolu u poljima ječma, ovsa, repe i lana.

Hemiske i fizičke karakteristike difenzokvata date su u tabeli 16.

Tabela 16. Fizičko-hemiske karakteristike difenzokvata

Boja i agregatno stanje	Bela so, blago higroskopna
Molekulska masa (g/mol)	360,43
Empirijska formula	C ₁₈ H ₂₀ N ₂ O ₄ S
Tačka ključanja (°C)	>100
Tačka topljenja (°C)	155-157
Tačka isparavanja (°C)	82
Napon pare (μPa) na 20 °C	13,33
Podeoni koeficijent pri pH = 7, na 20 °C	2,45·10 ⁻¹
Adsorpcioni koeficijent	74,1
Rastvorljivost u vodi (mg/dm ³)	750 g/dm ³ na 25 °C 780 g/dm ³ na 37 °C 850 g/dm ³ na 56 °C
Rastvorljivost u polarnim rastvaračima	DCM, hloroform, alkohol, aceton

Toksičnost difenzokvata-metil sulfata

Prema podacima Svetske Zdravstvene Organizacije (WHO) difenzokvat pripada II grupi otrova. Iritantan je za oči i kožu, nije otrovan za pčele.

Akutna oralna toksična doza LD₅₀ za pacove iznosi 470 mg/kg, LD₅₀ za miševe iznosi 920 mg/kg, a perkusiona doza LD₅₀ za zečeve iznosi 3540 mg/kg.

Degradira se u aerobnim uslovima za 2 dana, a u anaerobnim uslovima za 7 dana.

3.3.1. Metode za određivanje difenzokvat-metil sulfata

Difenzokvat je određivan kapilarnom elektroforezom kuplovanom sa masenom spektrometrijom u intervalu koncentracija od $0,7 - 20 \mu\text{g}/\text{dm}^3$. (Moyano i sar., 1996)

Castro i saradnici (2000) određivali su difenzokvat HPLC-MS metodom u intervalu koncentracija od $6 - 85 \text{ ng}/\text{dm}^3$. Recovery metode kreće se iznad 70 %.

Simultano određivanje parakvata, dikkvata i difenzokvata u uzorcima mineralne vode vršeno je kapilarnom elektroforezom kuplovanom sa masenom spektrometrijom. Interval koncentracija kreće se od $0,5 - 2,5 \text{ mg}/\text{dm}^3$ i od $1 - 10 \mu\text{g}/\text{dm}^3$ (Núñez i sar., 2002).

Galceran i saradnici (1997) određivali su difenzokvat kapilarnom elektroforezom sa indirektnom UV detekcijom u vodama. Granica određivanja metode iznosi $0,8 \mu\text{g}/\text{cm}^3$.

HPLC metoda kuplovana sa atmosferskom ionizacijom pod pritiskom i masenom spektrometrijom primenjena je za određivanje difenzokvata u intervalu koncentracija $0,1 - 4 \mu\text{g}/\text{dm}^3$. Metoda je primenjena za određivanje difenzokvata u pijaćoj vodi (Castro i sar., 1999).

Difenzokvat je određivan kapilarnom elektroforezom u pijaćim i mineralnim vodama. LOD je $1,1 \mu\text{g}/\text{dm}^3$ za uzorce pijaće vode i $0,4$ za uzorce mineralne vode. Kalibraciona kriva je linearna u intervalu koncentracija od $0,7$ do $24,5 \mu\text{g}/\text{dm}^3$. RSD je 11,6 %. Recovery je iznad 80 %. RSD je ispod 9 % (Núñez i sar., 2002).

Difenzokvat je određivan pored drugih kvaternarnih amonijum herbicida tečnom hromatografijom tandem masenom spektrometrijom (LC-MS-MS) u vodama. Kalibraciona kriva je linearna u intervalu koncentracija od 50 do $500 \text{ ng}/\text{dm}^3$. RSD je 13,3 %. LOD iznosi $0,04 \mu\text{g}/\text{dm}^3$. RSD se kreće do 13,3 %. Recovery za difenzokvat na različitim kolonama posle prekoncentracije se kreće od 30,7 do 90,1 % (Castro i sar., 2001).

Tečno hromatografska metoda sa elektrosprej jonizacijom i maseno-spektrometrijskom detekcijom (LC-ESI/MS/MS) je korišćena za određivanje kvaternarnih amonijum herbicida u krvi. Recovery se kreće od 79,7 - 105,1 %, linearost kalibracione prave od $5,0 - 200 \text{ ng}/\text{cm}^3$. Preciznost metode pri koncentraciji difenzokvata $10 \text{ ng}/\text{cm}^3$ je 18,6 %. Granica određivanja za pojedine pesticide se kreće od $3,6 - 20,4 \text{ ng}/\text{cm}^3$ (Ariffin i Anderson, 2006).

Simultano određivanje kvaternarnih amonijum herbicida u vodama vršeno je tečnom hromatografijom sa 2 masena analizatora (TOF i SRM). Kalibraciona kriva za difenzokvat korišćenjem TOF analizatora je linearna u intervalu koncentracija $0,05 - 20 \mu\text{g}/\text{dm}^3$, dok je korišćenjem SRM analizatora kalibraciona kriva $0,005 - 1,0 \mu\text{g}/\text{dm}^3$. Recovery je 90 %. LOD je od $0,1 - 7 \mu\text{g}/\text{dm}^3$ (TOF) i $0,02 - 0,3 \mu\text{g}/\text{dm}^3$ (SRM). Kalibracione krive su u intervalu $1,0 - 400 \mu\text{g}/\text{dm}^3$ (SRM) i $15 - 800 \mu\text{g}/\text{dm}^3$ (TOF) (Núñez i sar., 2004).

Ista grupa autora (Núñez i sar., 2004) je određivala kvaternarne amonijum herbicide koristeći 2 analizera jon-trap-maseni (ITM) i hibrid kvadripol time-of-flight (QTOF) sa masenim spektrometrom da bi se utvrdila fragmentacija organskih molekula. Relativna greška metode gde je korišćen QTOF je manja od 0,0023 %.

Núñez i saradnici (2001) simultano su određivali dikkv, parakv i difenzokvat kapilarnom elektroforezom u vodama sa limitom detekcije ispod $15 \mu\text{g}/\text{dm}^3$.

Tečna hromatografija sa UV-VIS detektorom je razrađena za određivanje difenzokvata u uzorcima vode i zemljista nakon SPE u opsegu koncentracija od $0,4 - 4$

$\mu\text{g}/\text{dm}^3$. Recovery je od 92 - 98 %, preciznost metode od 4,3 - 10,4 % i LOD je 0,08 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$ (Ibáñez, 1998).

Díez i saradnici (2006) koristili su dve ekstrakcione metode za odvajanje kvaternarnih amonijum herbicida i to: ekstrakciju ACN i disperzivnom SPE. Ove metode su upoređivali sa klasičnim multi-rezidualnim metodama za ekstrakciju herbicida iz uzorka ječma. Nakon ekstrakcije difenzokvat su određivali gasnom hromatografijom time-of-flight sa masenim detektorom (GC-TOF/MS) i tečnom hromatografijom-tandem masenom spectrometrijom (LC-MS/MS). Granica detekcije iznosi 1,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Recovery se kreće od 30,5 - 45,7 %. RSD od 2,5 do 20,2% za ispitivani interval koncentracija od 10 - 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Dikvat herbicidi određivani su micelarnom elektrokinetičkom hromatografskom metodom (MEKC) u piјaćoj vodi. Kalibraciona kriva je u intervalu koncentracija od 6,5 - 130,5 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$, dok je RSD 7,2 %. LOD za difenzokvat je 1 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$ (Núñez i sar., 2002).

Ahmad (1983) je koristio HPLC metodu za određivanje difenzokvata u vodama u koncentracionom intervalu od 5 - 20 ppb. Recovery metode iznosi 97 %, dok je granica detekcije 0,25 ppb.

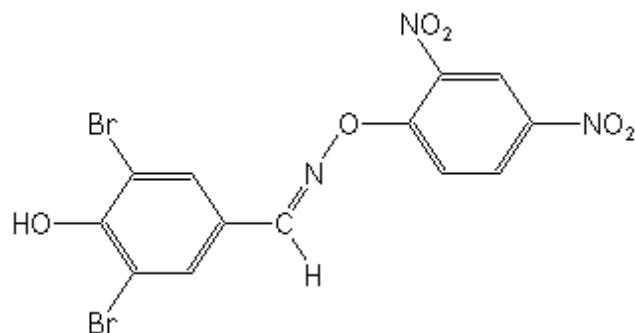
Tadashi i saradnici (1998) određivali su difenzokvat kapilarnom elektroforezom u cerealijama gasnom hromatografijom sa MS detektorom (GC/MS). Recovery metode je oko 80 %, relativna greška je ispod 6 %, dok je granica određivanja 1 g/kg.

Reverzno-fazna HPLC metoda sa UV detekcijom je korišćena za kvantitativno određivanje difenzokvata, na talasnoj dužini 254 nm, na koloni C₁₈ i sa eluentom metanol - voda. Koeficijent varijacije metode iznosio je 0,41 % i recovery od 98,7 do 100,36 %. Retencione vreme bilo je oko 6,6 minuta. Koeficijent linearne korelacijske je 0,9999 (Wang i Zong, 1999).

Herbicidi dikvat, parakvat i difenzokvat određivani su u piјaćoj vodi micelarno elektrokinetičkom hromatografijom (MEKC). LD je od 2,6 do 5,1 mg/dm³. Korišćenjem sweeping-MEKC osetljivost metode je povećana 500 puta, a korišćenjem CSEI-sweeping-MECK povećana je 50000 puta. Detekcioni limit je ispod 1 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$ kada su herbicidi određivani metodom CSEI-sweeping-MECK. Validacija metode je izvršena sa dobrom reproduktivnošću (RSD < 22 %). Rezultati dobijeni ovom metodom u spajkovanim uzorcima vode bili su ispod dozvoljenih koncentracija datih od strane US Environmental Protection Agency (EPA) (Núñez i sar., 2002).

3.4. Bromfenoksim

Bromfenoksim (slika 8) je folijarno-aplikovani kontaktni herbicid koji se apsorbuje putem lišća i stabljika sa ograničenom translokacijom. Pripada grupi herbicida sa hemijskom grupom dinitrofenil oksim. Prema IUPAC-u naziv mu je 3,5-dibromo-4-hidroksibenzaldehid 2,4-dinitrofenilosim. Drugačije se naziva: Bromfenim, Faneron.



Slika 8. Hemijska struktura bromfenoksim-a

Tabela 17. Fizičko-hemijske karakteristike bromfenoksim-a

Boja i agregatno stanje	Kristalna so bele boje
Molekulska masa (g/mol)	461,02
Empirijska formula	C ₁₃ H ₇ Br ₂ N ₃ O ₆
Tačka ključanja (°C)	476
Tačka topljenja (°C)	196-197
Tačka paljenja (°C)	241,7
Napon pare (mPa) na 25 °C	1,16·10 ⁻⁶
Podeoni koeficijent pri pH=7, na 20 °C	2·10 ³
Rastvorljivost u vodi (mg/dm ³) na 20 °C	9,0 pri pH = 10 0,6 pri pH = 3,8
Rastvorljivost u polarnim rastvaračima	Dobro rastvoran

Fenoksi herbicidi su hemijske supstance koje ometaju delovanje hormona za rast biljaka i koriste se za zaštitu letnjih i zimskih kultura od korova. Koriste se u poljima pamuka i za prskanje borovnice i hrasta. Bromfenoksim se koristi za post-pojavnu kontrolu godišnjeg širokolisnatog korova kod žitarica, kukuruza, semenih useva, pašnjaka i novo zasadjenog busenja. Fizičko-hemijske karakteristike bromfenoksim-a date su u tabeli 17.

Ekotoksikologija bromfenoksim-a

Bromfenoksim pripada III grupi otrova prema podacima Svetske Zdravstvene Organizacije (WHO).

Akutna oralna doza za sisare LD₅₀ iznosi 1100 mg/kg, za ribe LC₅₀ iznosi 0,18 mg/dm³, dok za alge akutna doza LC₅₀ iznosi 2,3 mg/dm³.

Akutna oralna doza LD₅₀ za miševe iznosi 1217 mg/kg telesne mase, dok akutna inhalaciona doza iznosi 0,242 mg/dm³ tokom vremena ekspozicije od 6 sati.

Metabolizam degradacije bromfenoksima

Malo je informacija u literaturi o metabolizmu bromfenoksima, ali je jasno da se degradira u bromoksinil i ovo razlaganje odvija se u svim ekosistemima. Degradira se brzo u prirodnim aerobnim vodama i na svetlosti.

Bromoksinil je detektovan kod biljaka kao metabolit razgradnje bromfenoksima i može se očekivati da će sledeći metabolit biti isti kao kod razgradnje bromoksinila.

Nakon oralnog unosa bromfenoksima u organizam sisara on se degradira na bromoksinil i 2,4-dinitrofenol koji se dalje metabolički razgrađuju.

Hidroksibenzonitrili

Ova klasa jedinjenja se sastoji od dva usko povezana 4-hidroksibenzonitrila: bromoksinila i ioksinila (i njihovih oktanskih estara) i jednog 4-hidroksibenzaldehid oksima: bromfenoksima, koji služi kao benzonitrilni prekursor.

Bromoksinil i ioksinil su fenolni herbicidi i deluju na inhibiciju i sprečavanje oksidativne fosforilacije. Oni deluju kao inhibitori energetskog metabolizma kod biljaka. Ovo svojstvo se takođe odražava kod njihove akutne toksičnosti sisara koja je veća od uobičajenog nivoa toksičnosti herbicida (100-300 mg/kg).

Sva tri herbicida su folijarno-aplikovani kontaktni herbicidi koji se koriste za post-pojavnu kontrolu godišnjeg širokolisnog korova.

Bromfenoksim pokazuje 10 puta manju toksičnost u poređenju sa bromoksinilom.

Rastvorljivost bromoksinila u vodi je veća od uobičajene rastvorljivosti lipofilnih herbicida. Pomenuti herbicidi su detektovani u rečnoj vodi u oblastima gde su vlažno zemljište i polja u bliskoj vezi. Oba herbicida se lako razgrađuju u prirodnoj sredini.

3.4.1. Metode za određivanje bromfenoksima

Benfenati i saradnici (1995) upoređivali su metodu superkritične-fluidne hromatografije (SFC) sa HPLC metodom i određivali bromfenoksim u intervalu koncentracija od 75 do 1500 pg sa granicom detekcije 15 pg. Zaključili su da se primenom SFC metode postiže veća osetljivost i veći opseg linearnosti.

Bromfenoksim je određivan GC i HPLC tehnikama analizom polarno-termalno labilnih pesticida korišćenjem različitih SPE materijala. Recovery nakon ekstrakcije je oko 85 %. Iz 1 litra uzorka termalno labilne komponente određene su HPLC tehnikom. SCAN tehnikom bromfenoksim je određen u intervalu koncentracija od 1 - 10 ng, a SIM tehnikom od 60 - 800 pg. U spajkovanim uzorcima vode bromfenoksim je određivan sa recovery većim od 80 % (Eisert i sar., 1995).

Multirezidualna metoda je razrađena za određivanje bromfenoksima i drugih fenoksi herbicida u masnoj i nemasnoj hrani. Bromfenoksim je određivan u intervalu koncentracija od 20 - 200 ppb. Recovery se kreće od 53 - 75 % pri koncentraciji uzorka

od 200 ppb, 61 - 93 % pri koncentraciji od 80 ppb i 76 - 84 % pri koncentraciji od 20 ppb (Hopper i sar., 1992).

Esterifikaciona metoda je korišćena za pripremanje uzoraka fenoksi herbicida i za njihovo određivanje gasnom hromatografijom. Reproduktivnost metode kreće se ±5 % (Siltanen i Mutanen, 1985).

Karlhuber i saradnici (1975) određivali su bromfenoksim u hmelju gasnom hromatografijom sa masenom fragmentografijom.

Veoma osetljivu HPLC metodu za određivanje bromfenoksima i njegovih metabolita, kao i drugih pesticida sa hidroksilnim grupama razvili su Faller i saradnici (1996). Osetljivost metode je reda pikograma.

Flanagan i saradnici (1989) određivali su bromfenoksim u uzorcima krvi, plazme, seruma i urinu sa granicom određivanja 10 mg/dm^3 i relativnom greškom manjom od 8 %.

3.5. Ancimidol

Regulatori rasta biljaka ili biljni hormoni su hemijska sredstva koja se koriste da ubrzaju rast biljke ili dela biljke. Hormoni su supstance koji se prirodno proizvode u biljkama. Oni kontrolisu normalnu funkciju biljke kao sto su rast, rađanje ploda.

Upotreba regulatora rasta biljaka u SAD počinje 1930. godine. Prvo su otkriveni acetilen i etilen, koji su našli primenu u uzgajanju ananasa. Njihova upotreba je eksponencijalno rasla i oni su danas glavne komponente agrikulturnih proizvoda.

Postoji 6 glavnih klasa regulatora rasta biljaka koje izdaje Američko Društvo za nauku o hortikulturi - American Society for Horticultural Science (<http://www.ashc.org/>). Ova podela data je u tabeli 18.

Svi pesticidi koji se distribuiraju ili prodaju moraju biti registrovani od strane EPA (Američka Organizacija za zaštitu životne sredine) tj. da se mogu koristiti bez ikakvog rizika po ljudsko zdravlje ili životnu sredinu.

Ancimidol pripada grupi herbicida i regulatorima rasta biljaka. Registrovan je za uzgajanje herbaceoznih biljaka i biljaka koje se gaje u staklenicima i u komercijalne svrhe. Utiče na inhibiciju giberelin biosinteze. Pošto giberelin podstiče rast biljke, tretman ancimidolom dovodi do kompaktnijeg rasta, tako što potiskuje rast čvorića i izraslina na biljci. Količina aktivnog sastojka koji je neophodan za optimalni rast, zavisi od veličine saksije, faze rasta, metoda aplikacije, godišnjeg doba i drugih brojnih faktora.

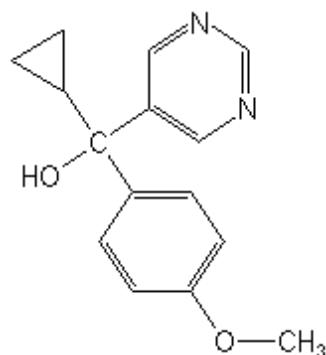
Tabela 18. Regulatori rasta biljaka, njihova funkcija i praktična primena

Grupa regulatora rasta	Funkcija	Praktična primena
Auksini	Rast izdanaka	Tanko stablo biljke, uvećanje korena i formiranje cveta
Giberelini	Stimulišu deobu ćelija i rast	Podstiču rast stabla, cveta i ploda
Citokinini	Stimulišu deobu ćelija	Producuju život cveta i biljke, iniciraju rast pupoljka i korena
Etilenski generatori	Zrenje	Iniciraju jednako zrenje voća i povrća
Inhibitori rasta	Zaustavljaju rast	Potpomažu cvetanje zaustavljanjem rasta krvžica
Retardanti rasta	Usporavaju rast	Usporavaju rast korova na duvanu

Ancimidol je u SAD prvi put registrovan kao pesticid 1973. godine.

Agencija Data Call-in je 1993. godine objavila podatke za registraciju ancimidola, koji su podržavali njegovu preregistraciju. Na tržištu se nalaze dva registrovana proizvoda: tehnička formulacija (koristi se u proizvodnji) i krajnji proizvod koji sadrži 0,0264 % čiste supstance ancimidola.

Ancimidol pripada grupi pirimidinil karbinola. IUPAC-ov naziv mu je (RS)- α -ciklopropil-4-metoksi- α -(pirimidin-5-il)benzil alkohol. Komercijalni naziv mu je A-Rest.



Slika 9. Struktorna formula ancimidola

Ancimidol se ne koristi za upotrebu u prehrambenim namirnicama, tako da čovek nije izložen njegovom uticaju. Budući da se koristi kao regulator rasta biljaka u komercijalne svrhe, postoji potencijalna izloženost ljudi koji rade sa njim, kao i osoba koje se zateknu na mestima tretiranih ovim pesticidom.

Tabela 19. Fizičko-hemijske karakteristike ancimidola

Boja i agregatno stanje	Kristalna supstanca bele boje
Ukus	Nešto aromatičan
Molekulsa masa (g/mol)	256,30
Empirijska formula	C ₁₅ H ₁₆ N ₂ O ₂
Tačka ključanja (°C)	110
Tačka topljenja (°C)	111-112
Napon pare (mPa) na 25 °C	2·10 ⁻⁷
Podeoni koeficijent	1,91
Rastvorljivost u vodi (mg/dm ³) na 20 °C	650
Rastvorljivost u polarnim rastvaračima (mg/dm ³)	u metanolu 250000 acetonu 250000 heksanu 37000

Ancimidol se najčešće koristi za uzgajanje lala, gde ima tri funkcionalne upotrebe:

- za kontrolu ukupne visine stabljike u vreme prodaje
- za kontrolu razvoja stabljike nakon pojave cveta
- za kontrolu smanjenja rasta čvorića, krivljenja stabljike i opadanja cveta.

Ancimidol je najefikasniji kada se koristi u staklenicima, a manje je efikasan na dnevnom svetlu. Kada se programirano i planirano primenjuje utiče na:

- pravilan uzgoj lala
- uniformnost cveta u saksiji
- procenat cvetanja biljaka
- veličinu cveta.

Postoje različiti načini reagovanja na usporen rast i veoma je bitno ustanoviti precizne procedure programiranja i upotrebe zemljišta za sađenje koja se koriste za podsticaj rasta mladica, pa se oni koji koriste ancimidol savetuju da ga upotrebe samo na delu roda. To će pomoći uzgajivačima da se upoznaju sa upotreborom ovog pesticida kod uzgoja lala, kao i da ustanove tačno vreme i količinu njegove upotrebe u uslovima ubrzanog rasta.

Sastav zemljišta i njegova pH vrednost utiču na dejstvo ancimidola koji se posipa po zemlji. Važna je i količina vlage u zemljištu u vreme primene ancimidola. Zemljište mora biti podjednako vlažno.

Degradacija ancimidola DT₅₀ obično se odvija u toku 15 dana, a u laboratorijskim uslovima i do 120 dana.

Vodenom hidrolizom pri pH = 7 i na temperaturi od 20 °C ancimidol se razgradi za 30 dana.

Ekotoksikologija

Akutna inhalacija kod pacova koji su tretirani ancimidolom izaziva neurotoksične efekte. Kada se ancimidol poprska u obliku spreja dolazi do značajne izloženosti, ali bez toksičnih efekata jer su koncentracije ancimidola u formulisanim proizvodima niske (0,0264 %). U ovakovom obliku koncentracija isparenja je niska, a trenutna upotreba je ograničena, tako da se smatra da je potencijalni rizik aplikatora na životnu sredinu skoro beznačajan (EPA-7-F-95-027, 1995).

Ancimidol pripada IV grupi otrova - malotoksični pesticid.

Akutna oralna doza LD₅₀ i LC₅₀ za pojedine organizme data je u tabeli 20.

Prihvatljiva dnevna doza PDU ancimidola kod sisara je 8000 ppm.

Tabela 20. Akutne oralne doze ancimidola za pojedine organizme

Vrsta	LD ₅₀	LC ₅₀ (mg/dm ³)
Miševi	4500 (mg/kg)	
Ptice	5192 (mg/kg)	
Pčele	100 (μ g/pčeli)	
Ribe		100
Vodene biljke		0,193

3.5.1. Metode za određivanje ancimidola

Ancimidol je određivan gasnom hromatografijom u uzorcima biljaka, vode i zemljišta u intervalu koncentracija od 10 - 10000 ng/cm³. Recovery se kreće od 79,3 - 93,3 % (Chand i Lembi, 1991).

Određivanje ancimidola gasno-hromatografskom metodom sa masenim detektorom (GC-MS) u soku od jabuke razradili su Chu i saradnici (2005). Osetljivost metode je 0,01 mg/kg i korelacioni koeficijent je 0,98. Recovery metode je 96,3 %, RSD je 2,2 %. LOD je 4 µg/kg.

Ancimidol je određivan HPLC metodom nakon prekoncentrisanja ciklodekstrinskom hiralnom stacionarnom fazom na silika gelu korišćenjem Staudingerove reakcije (Muderawan i sar., 2006; Lai i sar., 2004; Poon i sar., 2006).

Ispitivan je uticaj ancimidola na klijanje semena nekih biljaka. Ispitivanja su vršena na tri različite temperature i zaključeno je da ancimidol najviše utiče na rast biljaka pri temperaturi od 10 °C (Bojović, 2010).

Ispitivan je uticaj ancimidola i drugih regulatora rasta na lignante u biljkama. Ancimidol je odgovoran za inhibitornu aktivnost sekundarnih metabolita, naročito na deksipodofilotoksin 4-hidroksilaze (Vardapetyan i sar., 2002).

García i saradnici (2004) su ispitivali kristalnu strukturu ancimidola, odnosno njegovu heterocikličnu aktivnost zbog hiralnog C-atoma. Prisustvo C₈ ugljenikovog atoma u molekulu ancimidola utiče da cela komponenta kristališe kao racemska smeša. Ispitivanja su vršena X-Ray detekcijom na temperaturi od 293 K.

Određivanje ancimidola GC metodom u vodenim matricama vršili su različiti naučnici nakon ekstrakcije uzoraka (SPME i SBSE) (Baltussen i sar., 2002; 1999; Pawliszyn, 1997; Sandra i sar., 2001; Blumberg i sar., 1998).

Metivier i Viana (1979) su ispitivali uticaj ancimidola na rast krastavaca. Zaključili su da ancimidol inhibira rast stabljike i smanjuje broj čvorića na stabljici. Smanjuje lišće utičući na hlorofil po jedinici površine lista. Ancimidol doprinosi sinergističkoj promociji rasta lišća porastom mlađih (internoda) grana. Recovery je iznosio oko 95%.

Uticaj enzima inhibitora (ancimidola) ispitivan je dodavanjem istih na početku rasta biljke u roku od 44 - 45 sati. Nakon ekstrakcije, ekstrakti su analizirani HPLC i HPTLC metodom (Bode i Zeeck, 2000).

Maki i saradnici (2005) određivali su ancimidol refraktometrijskom metodom, na osnovu obrtanja ravni polarizovane svetlosti, u semenu biljke *Hosta* i zrnevlu pirinču u intervalu koncentracija od 0 - 3,2 µM pri pH = 5,5.

3.6. Insekticidi - opšte osobine

Insekti predstavljaju čovekov problem od davnina, jer uništavaju namirnice i ugrožavaju zdravlje. U stanju su da se za relativno kratko vreme razmnože u toj meri da potpuno uniše poljoprivredne kulture. Pored toga, znatan broj insekata direktno napada čoveka i domaće životinje, izazivajući oboljenja. Primenom otrova radi suzbijanja insekata čovek je primoran da živi sa otrovima, svestan da je suočen sa trenutnim rizikom (akutna trovanja) a naslućuje i posledice koje se ne mogu u potpunosti oceniti.

Razvoj insekticida počinje u XIX veku, na etiološkoj osnovi zasnovanoj na poznavanju biljnih bolesti, kao i poznavanju štetočina. Polovinom XIX veka već su bili poznati prirodni insekticidi, na primer nikotin, piretin, rotenoid, takođe su bili poznati i preparati na bazi arsena.

Prvi nemetalni organski insekticid upotrebljen je u Nemačkoj 1892. godine (4,6-dinitro-2-metil-fenol antinonin) u borbi protiv omorikovog prelca, ali se nije održao zbog visoke toksičnosti.

Do pojave prvog univerzalnog insekticida sa kontaktnim dejstvom došlo je zahvaljujući Müller-u, čiji je DDT našao primenu u celom svetu, kako za zaštitu biljaka tako i u domenu opšte higijene.

Zahvaljujući DDT-u suzbijeni su insekti - prenosioци bolesti, a u nekim oblastima i istrebljeni. Organohlorni, organofosforni insekticidi i karbamati predstavljaju najznačajnije insekticide (Soldatović i sar., 1980).

Insekticidi (lat. *Insecta* - insekti i *cedere* - ubiti) služe za suzbijanje štetnih insekata. Prema specifičnom dejstvu na pojedine faze razvića insekata insekticidi se dele na:

- ovicide (za suzbijanje jaja insekata)
- larvicide (za suzbijanje larvi insekata)
- adulticide (za suzbijanje odraslih insekata)

Prema načinu suzbijanja i delovanja insekticidi se dele na insekticide koji deluju:

- preko digestivnog trakta insekata
- preko organa za disanje insekata
- kontaktnim putem (kontaktni insekticidi).

Insekticidi se, kao i drugi pesticidi, razvrstavaju u dve velike grupe:

- sa kontaktnim delovanjem
- sa sistemskim delovanjem.

Postoji čitav niz jedinjenja koja ispoljavaju specifično delovanje na insekte. Repelenti ili repulzivna jedinjenja su jedinjenja koja služe za odbijanje insekata, ali i grinja, ptica, glodara.

Atraktanti su jedinjenja koja privlače insekte (grinje, ptice i glodare) prema određenom mestu ili supstratu kako bi se koncentrisano skupili i tako uspešnije suzbili.

Hemosterilizanti služe za izazivanje sterilnosti muških i ženskih individua kako bi se smanjile njihove populacije.

Feromoni su supstance koje proizvode insekti ili se proizvode hemijskim putem, a privlače insekte suprotnog pola.

3.6.1. Mehanizam dejstva insekticida

Iako se radi o veoma staroj grupi hemijskih jedinjenja njihov mehanizam delovanja ni danas nije u potpunosti i u svim detaljima poznat. Smatra se da organohlorovani insekticidi dovode do inhibicije enzima centralnog nervnog sistema, na pr. ATP-aze koji učestvuje u transformaciji i transportu katjona kroz membrane. To znači da je primarno dejstvo ovih jedinjenja nervno tkivo. Toksično dejstvo se ispoljava na centralnom nervnom sistemu i na simpatičkom nervnom sistemu. Njihov efekat se ispoljava na permeabilnost membrana nervnih ćelija za jone.

Konvencionalni insekticidi kao što su hlorovani ugljovodonici, organofosfati, karbamati i piretroidi dali su svoj pun efekat u kontroli insekata u prethodnih 60 godina. Nažalost, mnogi od ovih insekticida izazvali su niz neželjenih efekata kod ljudi i korisnih organizama. Isto tako brzi razvoj rezistentnosti na konvencionalne insekticide je zahtevao alternativna rešenja i ekološki prihvratljive metode kontrole insekata kao deo programa integralne zaštite i integralne proizvodnje u poljoprivredi.

Jedan od ovih programa koji je u svetu zauzeo posebnu pažnju jeste program razvoja novih insekticida koji utiču na procese rastenja insekata kao što su:

- inhibitori sinteze hitina
- analozi juvenilnih hormona
- agonisti ecdison hormona.

Insekticidi koji se unose putem digestivnog trakta efikasni su kod insektata koji se hrane biljkama, a to nije slučaj kod svih insekata. Efikasni su za insekte koji grickaju i ližu (gusenice, skakavci, muve), a bez efekta su za insekte koji ubadaju i sišu (vaši, stenice, leptiri).

Prodiranje otrova kroz digestivni trakt kod insekata koji sišu, je moguće kada se koristite insekticidi sa sistemičnim delovanjem koji prodiru u vaskularni sistem biljke i štite je tokom rasta. Ovi insekticidi moraju biti rastvorljivi u vodi, a u biljkama se apliciraju preko korena i najčešće su manje toksični.

Insekti nemaju pluća, a organe za disanje čini im sistem međusobno povezanih traheja, razgranati po celom telu, preko kojih im se ćelije snabdevaju kiseonikom. Zatvaranjem traheja ili udisanjem otrova insekti su lišeni kiseonika.

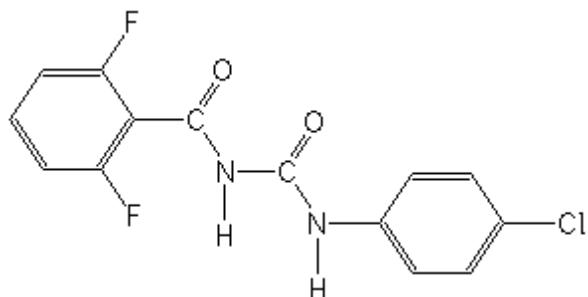
Prodiranje otrova u organizam insekata kontaktnim putem može biti veoma efikasan način suzbijanja insekata. Telo insekata je obavijeno hitinskim omotačem ili hitinom. Pored hitina, ovaj omotač sadrži lipide, lipidoproteine i enzime. Omotač se sastoji od više ovih slojeva manje ili veće debljine (epikutikula, prokutikula, hipoderm). Iz ćelije hipoderma pružaju se brojni citoplazmatični produžeci koji prolaze kroz kutikulu i prenosioci su nervnih impulsa. Na ovakvoj građi kutikule insekata se zasniva prodiranje otrova u organizam, a do uginuća insekta dolazi usled:

- zapušivanja traheja, što prouzrokuje asfiksiju insekata
- delovanja otrova na lipide, čime se otvara put otrovu u organizam insekta
- dejstvo na nervni sistem (ukoliko je u pitanju neurotropni otrov) koji biva brzo ugrožen.

Pojedini insekticidi se posle resorpcije deponuju u masnom tkivu toplokrvnih životinja. Iz masnog tkiva se eliminišu po prestanku ekspozicije. U nepromjenjenom obliku izlučuju se mlekom.

3.7. Diflubenzuron

Diflubenzuron je insekticid i pripada pesticidima sa hemijskom grupom benzoilfenil urea. Po IUPAC-ovoj nomenklaturi naziva se 1-(4-hlorofenil)-3-(2,6-diflubzenzoil)urea. Komercijalni naziv mu je difluron i dimilin. Strukturna formula diflubenzurona prikazana je na slici 10.



Slika 10 . Strukturna formula diflubenzurona

Diflubenzuron je halogenovani benzoilfenil urea, efektni digestivni i kontaktni insekticid, koji deluje kao inhibitor sinteze hitina i inhibira formiranje kutikule. Nema sistemsko dejstvo na biljke i ne ulazi u delove biljaka, a takođe ne inficira insekte prilikom sisanja sokova biljke. Svi organizmi sa hitin sintetazom su osjetljivi na diflubenzuron.

Fizičko-hemijske karakteristike diflubenzurona date su u tabeli 21.

Tabela 21. Fizičko-hemijske karakteristike diflubenzurona

Boja i agregatno stanje	Bela kristalna supstanca
Molekulska formula	C ₁₄ H ₉ ClF ₂ N ₂ O ₂
Molekulska masa	310,70
Tačka ključanja čiste supstance (°C)	257
Tačka topljenja (°C)	228
Napon pare (mPa) na 25 °C	0,00012
Podeoni koeficijent, pri pH = 7, na 20 °C	7,76·10 ³
Adsorpcioni koeficijent	10,000
Rastvorljivost u vodi (mg/dm ³) na 20 °C	0,2
Rastvorljivost u polarnim rastvaračima	dobro rastvoran

Diflubenzuron je stabilan i nakon nedelju dana na temperaturi od 50°C. Rastvor DFB 0,1 mg/dm³ u vodi se pri pH=7 razlaže 8%.

Koristi se u agrikulturi, hortikulturi i šumarstvu kao vlažan prah (25%), uljani disperzionalni koncentrat (45%), suspenzija (48%) i granularna formacija.

Koristi se za suzbijanje raznih insekata, larvi i komaraca, a takođe i protiv larve *Sciaridae* i *Phoridae* u pečurkama ($1\text{g}/\text{m}^3$). Ovaj insekticid nije toksičan za biljke.

U eksperimentalnim životinjama DFB se apsorbuje digestivnim traktom i kontaktno preko kože. U gastrointestinalnom traktu pacova takođe postoji zasićenje nakon apsorpcije diflubenzurona. On se lako transportuje do tkiva, ali se ne akumulira.

Glavni put eliminacije ovog insekticida, kod mačaka, svinja i stoke je izmetom (od 70 do 80%). Kod ovaca, eliminacija DFB je podjednaka urinom i izmetom. Urinarna eliminacija kod pacova i miševa opada proporcionalno sa povećanjem doze diflubenzurona. Manje od 1 % oralne doze se eliminiše vazduhom.

Mehanizam dejstva DFB je proučavan u različitim vrstama. Osnovni način metabolizma ovog insekticida kod sisara je putem inhalacije.

Hidroliza diflubenzurona se može odvijati na nekoj od C – N veza.

Glavni metaboliti kod ovaca, svinja i kokošaka su 2,6-dufluorobenzoeva kiselina i 4-hlorfenil urea, dok su sporedni metaboliti 2,6-difluorobenzamide and 4-chloroaniline.

U pacovima i stoci 80% metabolita su 2,6-difluoro-3-hidroksidiflubenzuron, 4-hloro-2-hidroksi-diflubenzuron i 4-hloro-3-hidroksidiflubenzuron.

Toksičnost diflubenzurona

Benzoilfenil uree su jedinjenja sa selektivnim svojstvima koja deluju na larve insekata. Oni ispoljavaju ingestivno delovanje, a kod nekih vrsta insekata deluju na plodnost, takođe ispoljavaju i ovicidnu i kontaktnu toksičnost. Iz ove serije prvi se komercijalno pojavio diflubenzuron, a zatim hlorflurazon, teflubenzuron i heksaflumuron.

Diflubenzuron pripada IV grupi otrova, što znači da je malo toksičan.

Insekticidi kao što su hlorovani ugljovodonici, organofosfati, karbamati i piretroidi dali su svoj puni efekat u kontroli insekata u prethodnih 60 godina. Danas se posebna pažnja poklanja programu razvoja novih insekticida koji utiču na proces rastenja insekata kao što su:

- inhibitori sinteze hitina
- analozi juvenilnih hormona
- agonisti ecdson hormona.

Inhibitori sinteze hitina ispoljavaju svoje delovanje kod velikog broja različitih rodova insekata. Ovo delovanje ispoljavaju dve različite strukture jedinjenja: derivati benzofilfenil urea i buprofezin.

U nekim radovima tvrdi se da benzofilfenil uree mogu uticati na balans hormona u telu insekata koji dovodi do inhibicije tako važnih procesa kao što je inhibicija sinteze DNA (Soltani i sar., 1984), karbohidratne, fenoksidazne i mikrozomalno oksidazne aktivnosti (Ishaaya i Acher, 1977).

Toksičnost diflubenzurona data je od strane Svetske Zdravstvene Organizacije i prikazana je u tabeli 22.

Tabela 22. Toksičnost diflubenzurona, dnevna doza

Vrsta	Način unošenja pesticida u organizam			
	Oralno LD ₅₀ (mg/kg)	Dermalno LD ₅₀ (mg/kg)	Inhalaciono LC ₅₀ (mg/dm ³)	Intraperitonealno LD ₅₀ (mg/kg)
Pacovi	>4640	>10000	>2,49	-
Miševi	>4640	-	-	>2150
Zečevi	-	>4000	>3,75	-

Maksimalno dozvoljena doza diflubenzurona u hrani, preporučena od Svetske Zdravstvene organizacije, iznosi 1 mg/kg (FAO/WHO), a prihvatljiva dnevna doza je 0,02 mg/kg telesne težine.

Evaluacija efekata diflubenzurona u prirodi

Diflubenzuron se lako apsorbuje u zemljištu samo u prvima slojevima. Poseduje slabu pokretljivost u zemljištu i zadržava se u prečniku do 15 cm od prvog sloja zemlje. Nema mogućnosti da se močvari (raskvašuje) i delimično se može ukloniti sa lišća drveta jakim kišama. Može biti prisutan u površinskim vodama ubrzo nakon tretiranja.

Hidrolizom diflubenzurona nastaju dva degradaciona metabolita: 2,6-difluorobenzeva kiselina (2,6-DFBA) i 4-hlorofenilurea (4-CPU), pri pH rastvora 9. U ovim uslovima vreme raspada mu je 32,5 dana. Visoka temperatura povećava degradaciju DFB u vodenoj sredini.

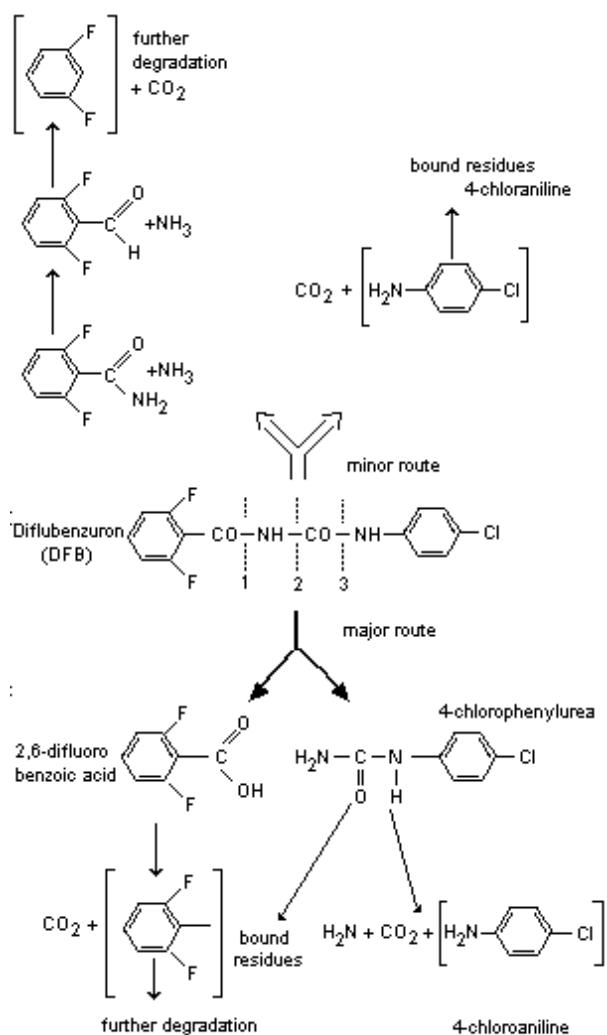
Adsorpcija u sedimentima nastaje za 4 dana, a oba produkta razgradnje 2,6-difluorobenzeva kiselina (2,6-DFBA) i 4-hlorofenilurea (4-CPU) mogu se održati u sedimentima do 30 dana.

Nije zabeleženo da lišće apsorbuje diflubenzuron nakon primene.

Fotoliza diflubenzurona je spora, sa vremenom razlaganja (karencom) od 40 dana. Aerobna degradacija u vodi je mikrobiološki proces sa vremenom razlaganja od par dana.

U zemljištu, degradacija DFB zavisi od pH, temperature, formulacije zemljišta, organskih materija u zemljištu.

Degradacija u zemljištu mikrobiološkom hidrolizom je brz proces, sa karencom od par dana i produktima razgradnje 2,6-difluorbenzovom kiselinom i 4-hlorofenilureom, a manji metabolit je p-hloranilin. Na slici 11 opisani su putevi metabolizma DFB-a u zemljištu.



Slika 11. Metabolizam diflubenzurona u zemljištu (FAO/WHO, 1982)

Efekat diflubenzurona na ljudima i životinjama

Kod eksperimentalnih životinja uočeno je da se diflubenzuron apsorbuje digestivnim traktom, a manje putem kože.

Methemoglobinemija se manifestuje kod životinja nakon oralnog, dermальног ili inhalacionog unošenja DFB u organizam.

Metabolički put diflubenzurona ispitana je u raznim vrstama i ovaj metabolizam u nekim životinjama prikazan je na slici 12.

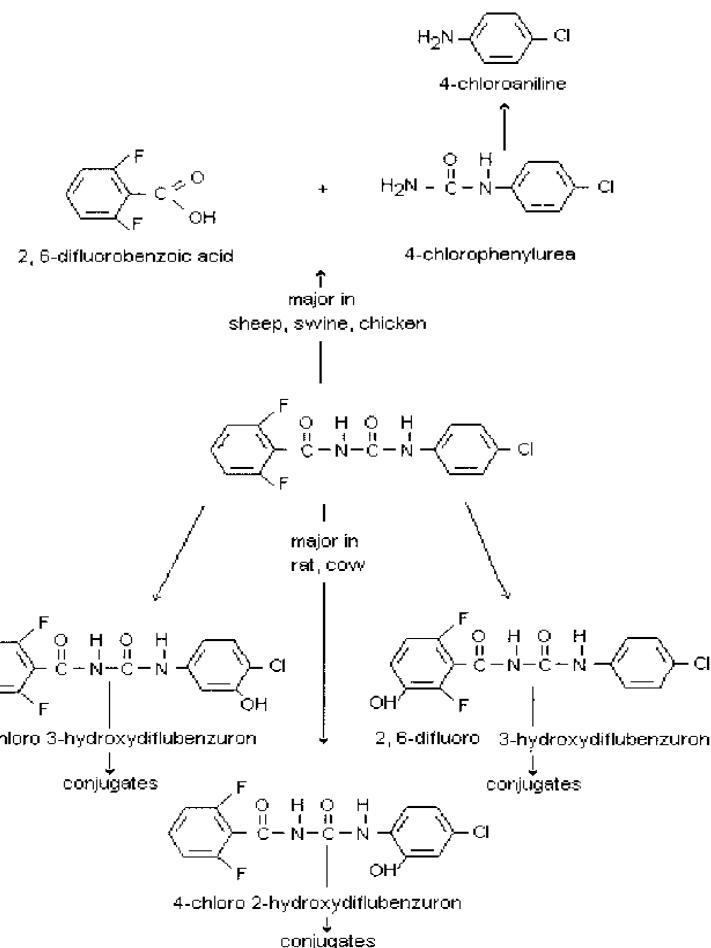
Ribe nisu osetljive na DFB i njegove metabolite. Duga izloženost ovom insekticidu takođe ne prouzrokuje štetne posledice kod riba, jer nije postojan u vodi usled hidrolize.

Akutna, oralna i dermalna trovanja diflubenzuronom kod ljudi su veoma retka. DFB ne iritira kožu i ne izaziva alergijske reakcije.

Radnici koji su izloženi uticaju 4-hloranilina, metabolitu diflubenzurona, mogu oboleti od methemoglobinemije.

Neki ljudi koji imaju manjak NADH-methemoglobin reduktaze mogu biti osetljivi na 4-hloranilin. Primarna manifestacija toksičnog dejstva diflubenzurona je methemoglobinemija.

DFB ne prouzrokuje druge oblike trovanja, niti je mutagen i kancerogen kod eksperimentalnih životinja (miševa i pacova), dok je njegov metabolit, 4-hloranilin mutagen (*in vitro*) i kancerogen.



Slika 12. Metabolizam diflubenzurona u životinjskom organizmu (FAO/WHO, 1982)

3.7.1. Metode za određivanje diflubenzurona

Postoji veliki broj analitičkih metoda za određivanje diflubenzurona u različitim matricama, od toga je najveći broj HPLC i GC metoda.

Barns i saradnici (1995) su razradili HPLC metodu sa hemijskom ionizacijom pod atmosferskim pritiskom i masenim detektorom (HPLC/APCI-MS) za određivanje DFB u pečurkama. Granica detekcije je $0,02 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ i kalibraciona kriva je linearna u intervalu koncentracija od 0,025 do 1,0 $\text{ng}/\mu\text{l}$. Recovery za spajkovane uzorke u intervalu koncentracija od 0,06 - 0,58 mg/kg je 85,5%, a RSD oko 14,5%.

HPLC metoda sa UV detekcijom za određivanje DFB, triflumurona, teflubenzurona u grožđu i vinu razradili su Miliadis i saradnici (1999). Kalibraciona kriva je linearna u intervalu koncentracija od 0,05 do 5,0 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$, recovery 85,8 - 101,6 % za grožđe i 69,1 - 104,8 za uzorke vina. LOQ je manji od 0,01 mg/kg za uzorke grožđa i 0,01 mg/dm^3 za uzorke vina.

Diflubenzuron je određivan u paradajzu HPLC metodom sa fluorescentnom detekcijom. LOD iznosi od 5 - 21 ng/cm^3 sa RSD < 0,5 %. Recovery se kreće između 79 i 102 % (Martinez-Galera i sar., 2001).

Simultana kvantitativna HPLC metoda sa DAD detekcijom je razrađena za određivanje 13 urea pesticida. Recovery za DFB 90 - 117 %, a LOD 0,006 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$ (Dommarco i sar., 1998).

Balinova (1998) je razradila HPLC metodu za određivanje DFB u jabukama i paradajzu. Recovery je 98,2 - 102,6 % za jabuke i LOQ je 0,05 mg/kg , a za paradajz 85,8 - 97,4 %.

Diflubenzuron je određivan u jabukama gasnom hromatografijom (GC). Kalibraciona kriva je linearna u intervalu koncentracija od 0,05 - 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$, LOQ je 0,03 mg/kg i recovery je 80 - 88 % a RSD < 10%. (Mensah i sar., 1997)

Za određivanje DFB u citrusima korišćena je tečna hromatografija (LC) gde je LD 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i recovery 87 - 102 % (Valenzuela i sar., 2000).

Barnes i saradnici (2005) razvili su HPLC/APCI-MS metodu za određivanje DFB u sokovima od šljiva, jagoda i crnog grožđa. Kalibraciona kriva je u linearu intervalu koncentracija 0,05 - 0,50 ng/cm^3 , recovery je 70 - 78 % i RSD 15 %. LOD je 0,01 - 0,05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ što odgovara 0,003 - 0,014 mg/kg .

HPLC metoda sa luminol hemiluminiscentnom detekcijom je razvijena za određivanje DFB u paradajzu. Kalibraciona kriva je linearna u intervalu koncentracija 0,05 - 0,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$, LOD $0,0025 \mu\text{g}/\text{cm}^3 \approx 0,0005 \text{ mg}/\text{kg}$. RSD se kreće između 79,7 i 94,2 %, dok je LOQ $0,05 \mu\text{g}/\text{cm}^3 \approx 0,01 \text{ mg}/\text{kg}$ (Martinez-Galera i sar., 2008).

Diflubenzuron je određivan u soku od narandže tečnom hromatografijom sa post-column photochemically induced fluorescence derivatization i fluorescentnom detekcijom nakon solid-phase mikroekstrakcije (SPME). LOQ je 0,02-0,04 mg/kg , Recovery je 85-110 % i RSD je 1,8 - 7,4 % (Vázquez i sar., 2008).

Tečno-hromatografsku metodu sa elektro-sprej ionizacijom i masenom detekcijom (LC-ESI-MS) za određivanje DFB u rečnoj vodi i povrću predložili su Martínez i saradnici (2007). Kalibraciona kriva je linearna u intervalu koncentracija od 6,67 - 133,33 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Recovery se kreće od 79 do 114 %, a LOD je između 1,0 - 3,2 ng/cm^3 .

Rezidue diflubenzurona su određivane u lišću divljeg kestena HPLC metodom sa UV detekcijom. Kalibraciona prava je linearna od 0,1 do 15 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$, LOD iznosi 0,74 ng i LOQ 0,44 ng/cm³. Recovery se kreće od 96,3 do 99,6% (Nejmanová i sar., 2006).

Diflubenzuron je određivan tankoslojnom hromatografijom (TLC) nakon ekstrakcije uzoraka zemljišta ultrasolventnom ekstrakcijom i tradicionalnom ekstrakcijom. Kalibraciona kriva je linearna od 0,01 do 2,0 μg , LOD je 2 ng i recovery se kreće od 79,1 do 92,8 % (Babić i sar., 1998).

Multirezidualnu analizu pesticida u svežem voću i povrću superkritičnom-fluidnom ekstrakcijom (SFE) i HPLC metodom dali su Kaihara i saradnici (2000). Recovery se kreće od 61,3 - 103,6 %. LOD je 0,05 ng/cm³.

Gasno-hromatografska metoda sa masenom detekcijom (DMI-GC-ToF MS) je korišćena za određivanje diflubenzurona u grejpfrutu i ananasu. RSD za ananas je 16 %, a za grejpfrut 6%. Kalibraciona prava je linearna u opsegu koncentracija od 10 - 200 ng/cm³ i LOD je 5 ng/cm³ (de Koning i sar., 2003).

Huang i saradnici (2002) su razvili HPLC metodu sa hemiluminiscentnom detekcijom za određivanje DFB u lišću biljaka. Kalibraciona prava metode je linear u intervalu koncentracija od 0,053 - 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$. RSD je 4,12 % za koncentraciju DFB 2,0 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$, LOD je 0,03 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$.

Razvijena je prekoncentraciona i tečno-hromatografska metoda za određivanje benzoilurea pesticida u podzemnim vodama korišćenjem C₁₈ kolone sa fluorescentnom detekcijom nakon fotohemijske indukovane fluorescencije (PIF). Recovery za DFB je 95,3 - 104,9 %, LOQ je ispod 0,04 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$, a LOD je 0,01 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$. Kalibraciona kriva je linear u intervalu koncentracija od 0,07 - 0,70 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$, a RSD je 3,4 % za koncentraciju DFB od 0,07 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$ i 5,2 % za koncentraciju od 0,70 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$ (García i sar., 2006).

Tečno hromatografska metoda sa elektrosprej jonizacijom i tandem masenom spektrometrijom (LC/ESI-MS/MS) je razvijena za selektivno i osetljivo određivanje 7 benzoilfenilurea rezidua insekticida u hrani za bebe, soku od limuna i pulpi paradajza. Recovery se kreće od 84 - 98 % za koncentracije DFB 0,01 i 0,02 i RSD 2 - 10 % (Sannino i Bandini, 2005).

Određivanje diflubenzurona u krastavcu predložili su Gil-García i Martínez-Galera (2007) metodom tečne hromatografije. RSD se kreće od 5,3 do 9,8 % za koncentracije DFB od 1,0 - 5,0 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$. LOD je 0,09 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$, a LOQ je 0,29 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$.

Prva analitička metoda zasnovana na luminol hemiluminiscenciji za osetljivu detekciju DFB u soku od paradajza razrađena je od Martínez-Galere i saradnika (2008). Metoda je kuplovana tečnom hromatografijom sa post-column fotoderivativacijom i detekcijom baziranoj na hemiluminiscentnoj reakciji. Kalibraciona prava je linear u intervalu koncentracija od 0,05 do 0,50 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$. LOD iznosi 0,025 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$, a LOQ je 0,05 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$. RSD je manje od 10 %. Recovery je od 79,7 - 94,2 %.

Poznata je i HPLC metoda za određivanje diflubenzurona u sokovima od breskve. Kalibraciona prava je linear u intervalu koncentracija 0,01 - 10 mg/cm³, sa korelacionim koeficijentom $r = 0,9999$. Detekcioni limit iznosi 0,005 mg/dm³, dok je recovery 88,49 - 101,6 %. RSD se kreće od 1,99 - 3,47 % (Zhou i sar., 2009).

Isti autori su razradili HPLC metodu za određivanje DFB u sokovima od grožđa. Kalibraciona prava ima linearnost od 0,01 do 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$, sa korelacionim koeficijentom $r = 0,9995$. Detekcioni limit iznosi 0,005 mg/dm³, dok je recovery 80,84 - 92,86 %. RSD se kreće od 2,04 do 3,11 % (Zhou i sar., 2009).

Metodu za simultano određivanje diflubenzurona i triflumurona u masnoj vuni razvili su Wang i saradnici (2008). Za određivanje pomenutih insekticida koristili su

HPLC metodu sa DAD detekcijom. LD i LQ iznose 0,22 mg/kg i 0,73 mg/kg, respektivno. Kalibraciona kriva je linearna u intervalu koncentracija od 0,41 do 41,0 mg/dm³, sa korelacionim koeficijentom r = 0,9996. Recovery za spajkovane uzorke koncentracija od 0,76 do 10,25 mg/kg iznosi 86,3 - 96,7 % i RSD se kreće od 4,2 - 8,7 %.

Fan i saradnici (2009) su takođe određivali diflubenzuron u masnoj vuni HPLC metodom kuplovanom sa akceleracionom rastvornom ekstrakcijom (ASE). Linearnost kalibracione prave je od 0,1 do 10 mg/dm³ i r = 0,9999. LOQ iznosi 0,05 mg/kg.

Santos i saradnici (2009) su određivali diflubenzuron u ribama i ribnjacima koji su bili izloženi uticaju ovog insekticida, tečnom hromatografijom sa DAD detekcijom nakon SPE. LOD je iznosio 32 µg/kg, a LOQ 110 µg/kg.

Jedanaest benzoilurea insekticida određivano je u povrću (brokuli i pasulj) tečnom hromatografijom sa masenom spektrometrijskom detekcijom LC/MS/MS. Insekticidi su odvojeni na koloni C₁₈ i detektovani sa elektrosprej jonizacijom/masenom detekcijom ESI/MS. Kalibraciona prava je linearna od 3 do 200 µg/kg. Za tri koncentracije spajkovanog povrća (10, 20 i 50 µg/kg) recovery se kreće od 69 - 109 %, sa RSD do 16 % (n = 5). LOQ iznosi 10 µg/kg, a LOD 3 µg/kg (Ying i sar., 2009).

HPLC metoda sa UV detekcijom korišćena je za određivanje sedam benzoilurea insekticida u matricama povrća i to: paradajz, krastavac, kupus i kineski kupus. Recovery nakon ekstrakcije iznosio je od 80 - 120 %. LOQ je 0,02 mg/kg. Kalibraciona prava je linearna u intervalu koncentracija od 0,02 - 1,5 mg/dm³ (Hongmei i sar., 2006).

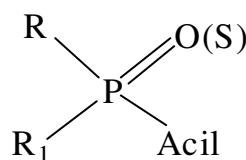
Diflubenzuron i još sto pesticida određivani su skrining metodom (screening) u ekstraktima voćnih sokova tečnom hromatografijom (LC-TOF MS). Recovery metode se kreće od 70 - 110 %. Kalibarciona prava je linearna u intervalu koncentracija od 0,1 - 50 µg/dm³. RSD je od 1,2 - 6,3 %. LOD iznosi 6 ng/dm³ (García-Reyes i sar., 2008).

Simultano određivanje 103 rezidua pesticida i diflubenzurona u uzorcima čaja tečnom hromatografskom sa masenom detekcijom LC-MS/MS objavili su Huang i saradnici (2009). Kalibraciona prava je linearna u intervalu koncentracija od 0,05 - 0,20 mg/kg. LOQ je 0,05 mg/kg. Recovery se kreće između 68 i 98,1 %. RSD je 11,3 % (n = 6).

3.8. Dimetoat

Fosfor i njegova jedinjenja danas imaju veliki značaj u mnogim oblastima nauke i tehnike. Organska jedinjenja fosfora se primenjuju u proizvodnji plastičnih masa, koriste se u velikom obimu u zaštiti bilja, za proizvodnju insekticida, herbicida i fungicida. Istraživanja organofosfornih jedinjenja počela su pre više od 150 godina, a naročito su intenzivna poslednjih 70 godina.

Schreder i njegovi saradnici 1937. godine su dali osnovnu strukturu za jedinjenja sa kontaktnim insekticidnim delovanjem, koja je 1950. god. razvijena u strukturu sa opštim oblikom prikazanim na slici 13.



Slika 13. Struktura jedinjenja sa kontaktnim insekticidnim delovanjem

Gde su R i R₁ - alkil, alkoksi, amino grupe;
acil grupa je anjon neorganske i organske kiseline (Cl, F, SCN i CH₃COOH) ili neka druga kiselinska grupa (enolati, merkaptidi).

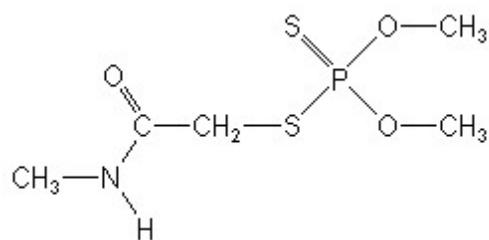
Prema Schrederu da bi neko organsko jedinjenje fosfora bilo biološki aktivno treba da ima:

1. kiseonik ili sumpor koji su vezani dvostrukom vezom za petovalentni fosfor
2. R i R₁ grupa predstavljaju radikale koji su vezani za fosfor preko kiseonika (alkoksi -OR ili aridoksi -OAr grupe), preko azota (amido -NR₂ ili direktno alkil -R, aril -Ar)
3. acil grupa je uglavnom anjon neorganske ili organske kiseline (F, CN, SCN, RCOO) kao i neki kiselinski ostatak (enol grupa ili merkapti grupa) ili uopšte X-Y=Z grupa.

Dimetoat pripada estrima ditiofosforne kiseline ili ditiofosfatima. Prema IUPAC-ovoj nomenklaturi naziv mu je S-metilkarbamoil-metil-O,O-dimetil fosforoditioat ili O,O-dimetil-S-(N-metilkarbamoilmethyl)fosforoditioat.

Osim naziva dimetoat u literaturi su poznati i komercijalni nazivi: Fosfamid, Cygon, Roxion, Rogor, Fostion MM, Bi 58.

Dimetoat je sistemski insekticid i koristi se za prskanje voća i žitarica. Strukturalna formula dimetoata data je na slici 14.



Slika 14 . Struktorna formula dimetoata

Tabela 23. Fizičko-hemijske karakteristike dimetoata

Boja i agregatno stanje	Obojena kristalna supstanca
Molekulska masa	229,3
Molekulska formula	C ₅ H ₁₂ NO ₃ PS ₂
Tačka ključanja (°C)	117
Tačka topljenja (°C)	51-52
Flash point (°C)	107
Napon pare (Pa) na 25 °C	1,1·10 ⁻³
Podeoni koeficijent	5,959
Adsorpcioni koeficijent	/
Rastvorljivost u vodi (mg/cm ³) na 20 °C	25
Rastvorljivost u polarnim rastvaračima	Dobro rastvoran

Mehanizam delovanja dimetoata

Mehanizam delovanja se zasniva na inhibiciji enzima acetilholinesteraze, usled čega se nagomilava acetilholin. Ona se nalazi u nervnim tkivima, žlezdama i eritrocitima, a pseudoholinesteraza u plazmi i jetri.

Prilikom dejstva pesticida na acetilholinesterazu enzim je fosforilizovan, a organofosforni estar je hidrolizovan.

Od fosforilacije zavisi antiholinesterazna aktivnost organofosfornih jedinjenja. Inhibicija holinesteraze organofosfornih jedinjenja zavisi od afiniteta prema enzimu i brzine fosforilacije enzima.

Slobodan molekul enzima može da prihvati drugi molekul acetilholina. Organofosforna jedinjenja imaju sličnu strukturu kao acetilholin.

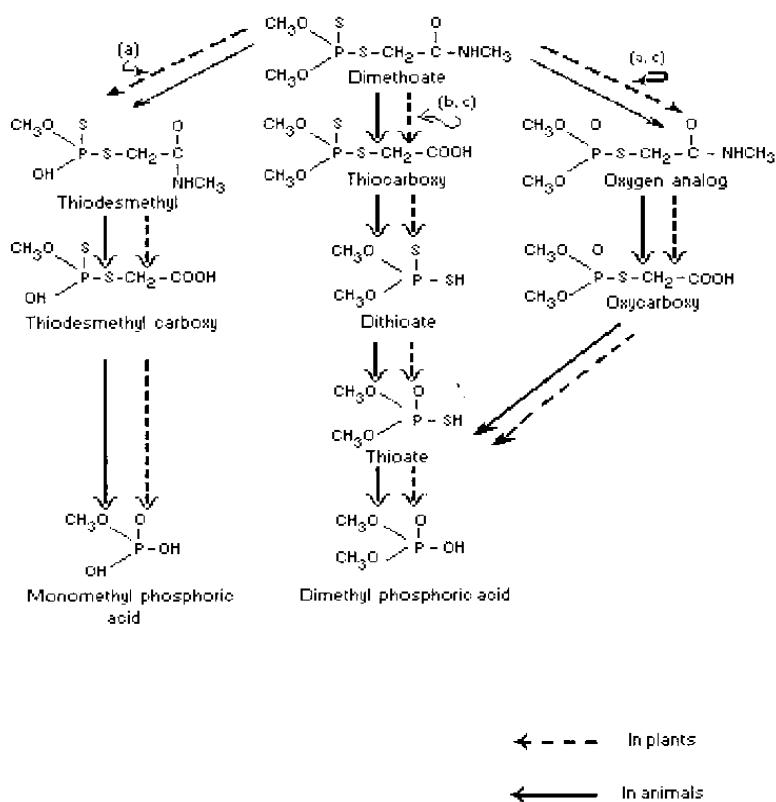
Fosforna grupa se vezuje u estarskom položaju, a ostatak molekula interaguje sa brojnim amino grupama koje se nalaze na površini aktivnog enzima (Corbett i sar., 1984). Fosforilacija enzima lakše se odvija nego acetilacija, a estarska veza je relativno stabilna na hidrolizu.

Toksično delovanje dimetoata

Dimetoat pripada Ib grupi otrova. Dimetoat se javlja u tri formulacije: emulzija, prah i granule.

Ispitivanja na pacovima su pokazala da molarna koncentracija čiste supstance koja je neophodna da izazove inhibiciju 50 % holinesteraze u mozgu pacova (in vitro) iznosi $8,5 \cdot 10^{-3}$ mol/dm³.

Osnovni metabolički putevi razgradnje dimetoata su oksidacionom desulfuracijom i hidrolizom. Ometoate je metabolit koji izaziva trovanja kod sisara i insekata. Brzo se degradira u jetri pacova, a slabo u drugim tkivima.

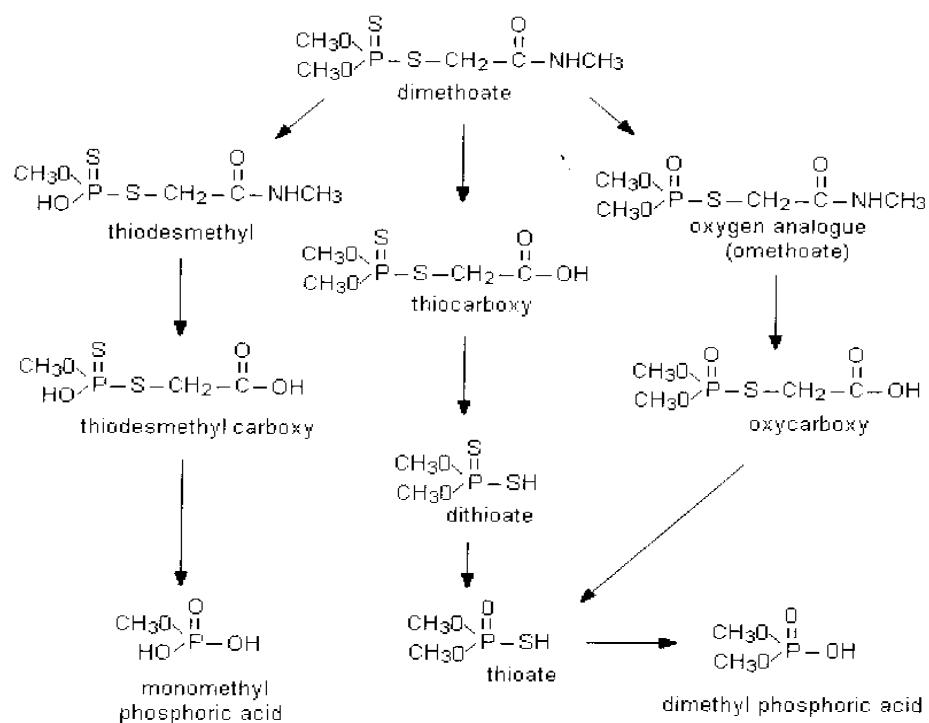


Slika 15. Mehanizam razgradnje dimetoata u biljkama i životinjama (Lucier, 1967)

Degradacijom dimetoata nastaju mnogo toksičniji produkti, nego što je početna supstanca. Jedan od produkata degradacije nastaje tiokso-oksidacijom i vodi formiraju oksidovanog homologa dimetoata koji podleže hidrolizi, nakon čega se formira tiokarboksil derivat koji se smatra glavnim metabolitom u organizmu sisara. Tiokarboksil derivati nisu pronađeni u biljkama tretiranim dimetoatom, a oksidovani analozi dimetoata nađeni su u semenu biljaka. Mehanizam razgradnje dimetoata u biljkama i životinjama prikazan je na slici 15.

Ispitivanja vršena na psima, hranjenim kontaminiranim hranom koja je sadržala 2, 10 i 50 ppm dimetoata, tokom 13 nedelja, pokazala su da nema štetnih efekata pri pomenutim koncentracijama. Samo je aktivnost holinesteraze malo umanjena pri koncentraciji dimetoata od 50 ppm.

Razne studije su pokazale da se dimetoat apsorbuje digestivnim traktom i koncentriše se u jetri, bubrežima i urinu. Brzo se eliminiše iz organizma pacova i čoveka. Nakon 24 časa od unošenja dimetoata u organizam pacova, 76 - 90 % je eliminisano iz organizma urinom. Dok se kod svinja, za isto vreme, eliminiše 25 - 40 % izmetom. U tabeli 24 dati su podaci o akutnim toksičnim dozama dimetoata u organizmima pojedinih životinja. Mehanizam degradacije dimetoata u organizmu pacova prikazan je na slici 16.



Slika 16. Mehanizam degradacije dimetoata u organizmu pacova

Ispitivanje toksičnog dejstva dimetoata vršeno je na ljudima tokom vremena od 4 nedelje. Ispitanici su uzimali 2,5 mg vodenog rastvora dimetoata (0,04 mg/kg telesne težine), ali nisu uočeni toksični efekti ni značajnije promene u aktivnosti holinesteraze. Isti rezultati su dobijeni kod 2 ispitanika koji su uzimali 21 dan dozu od 9 mg vodenog rastvora dimetoata ili 0,13 mg/kg telesne težine.

Maksimalno dozvoljene doze dimetoata u hrani predložene od Svetske Zdravstvene Organizacije (WHO/FAO) za pacove iznose 5 ppm što odgovara koncentraciji od 0,4 mg/kg telesne težine.

Tabela 24. Akutna toksičnost dimetoatom kod životinja

Životinja	Put trovanja	LD ₅₀ (mg/kg)
Pacovi-mužjaci	oralno	280-350
	intraperitonealno	175-325
	intravenozno	450
Pacovi ženke	oralno	300-356
	intraperitonealno	350
Miševi ženke	oralno	-
Hrčci mužjaci	oralno	200
Svinje	oralno	600
Zečevi	oralno	450

Akutna toksičnost LOD kod pacova pri oralnom unošenju dimetoata je LD₅₀ od 50 - 60 mg/kg i dermalna LD₅₀ veća od 7000 mg/kg.

Karenca dimetoata je 2 do 5 dana u različitim biljkama. Njegova razgradnja zavisi od tipa zemljišta, pH i temperature.

Tabela 25. Maksimalno preporučljive doze dimetoata u voću i povrću

Voće i povrće	Doze lbs*/100 gal**	Pre ubiranja (dana)
Jabuka i kruška	0,5	28
Pasulj	0,25-0,5	0
Krastavac	0,25-0,5	3
Zeleno povrće	0,25	14

*lbs = 0,453 kg; **1 gal = 378,5 dm³

Za čoveka je MDK iznosi 0,2 mg/kg telesne težine na dan, dok je PDU 0,02 mg/kg telesne težine.

Šira populacija nije izložena uticaju dimetoata vazduhom i vodom. Rezidue dimetoata manje su od 1 mg/kg u hrani. Njegovo prisustvo u prirodi nije zapaženo, mada je toksičan za pčele i ptice.

Dimetoat se apsorbuje u organizmu oralno, inhalaciono i putem kože. Nakon oralnog unošenja, dimetoat se u krvi detektuje za 30 minuta.

3.8.1. Metode za određivanje dimetoata

Poznato je da za određivanje dimetoata postoji veliki broj analitičkih metoda kao što su HPLC i GC.

Dimetoat je određivan kinetičko-spektrofotometrijskom metodom koja se bazira na njegovom inhibitornom dejstvu u reakciji oksidacije malahitno zelenog kalijum-perjodatom u prisustvu Mn(II) jona. Dimetoat je određivan u dva intervala koncentracija od 4,58 do 41,22 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ i od 45,80 do 229,0 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$. Granica detekcije je 1,24 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$, a granica određivanja 4,13 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$. Metoda je uspešno primenjena za određivanje dimetoata u vodi i mleku (Živanović, 2002).

Dimetoat je određivan u uzorcima krvi tečnom hromatografijom spregnutom sa masenom spektrometrijom (LC-MS). Linearnost metode se kreće u intervalu koncentracija 0,5 - 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$, sa korelacionim koeficijentom $r = 0,992$ za $n = 24$. Pouzdanost metode je 96,6 do 106,1 % i tačnost do 10 %. LOQ iznosi 0,5 ng/cm^3 (Salm i sar., 2009).

Određivanje dimetoata u grožđu, vinima i slatkom vinu vršen je gasnom hromatografijom spregnutom sa masenom spektrometrijom (LP-GC/MS). Recovery za uzorce grožđa iznosio je 117 ± 10 %, dok je LOD 11 ng/g. Za uzorce slatkog vina recovery je iznosio 121 ± 14 % i LOD je 12 ng/g. A za uzorce vina recovery je 95 ± 14 % i LOD je 16 ng/g (Cunha i sar., 2009).

Rezidue dimetoata određivane su u guavi HPLC metodom. Biljka je tretirana sa dozom 80 g na 100 cm^3 vode i 120 g na 100 cm^3 vode. Dimetoat je zatim ispitivan prvog, trećeg, četrnaestog i dvadeset prvog dana od tretiranja. Rezidue su nađene nakon 2,8 - 3,3 dana i to da je polovina razgrađena. Tako da su istraživači zaključili da je plod za jelo podesan nakon 9 dana od primene dimetoata (Khan i sar., 2009).

Singh i saradnici (2009) određivali su prisustvo dimetoata u serumu osoba koje su bile izložene ovom pesticidu. Uzorci su ekstrahovani i analizirani gasnom hromatografijom sa azotno-fosfornim detektorom (GC-NPD). Recovery je iznosio 82,3 %. Linearnost metode je u intervalu koncentracija 0,25 - 4 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$.

Nova metoda je razvijena za određivanje rezidua dimetoata bazirana na kapilarnoj elektroforezi sa indukovano kuplovanom plazmom i masenom detekcijom (CE-ICP-MS). RSD je manje od 5 % za $n = 6$, dok je LOD 0,05 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$, a recovery 90 - 96 % (Yang i sar., 2009).

Dimetoat je određivan u đusu u nanogramskim količinama novom metodom zasnovanoj na površinskoj desorpciji pod atmosferskim pritiskom hemijskom ionizacijom i masenom detekcijom (SADPCI-MS). Linearnost metode je u intervalu koncentracija 0,001 - 10 mg/kg i $r = 0,998$. Recovery se kreće od 80,5 do 120,6 %. LOD je $1,2 \cdot 10^{-11}$ mg/kg (Wang i sar., 2010).

Razrađena je modifikovana ekstrakciona metoda za simultano određivanje 203 pesticida u ljusci pirinča iz Koreje. Dimetoat je određivan gasnom hromatografijom sa masenim detektorom (GC/MS-SIM). LOQ za dimetoat je 0,03 mg/kg. Određivan je u intervalu koncentracija od 0,05 - 0,5 mg/kg, a recovery se kreće između 81 i 99 % (Nguyen i sar., 2008).

Dimetoat je određivan u piјaćoj, podzemnoj i površinskoj vodi tečnom hromatografijom sa masenim detektorom (LC/TMS). Kalibraciona kriva je linearna od 0 do 1000 ng/dm^3 , RSD je ispod 15 %. Recovery je iznosio 70 - 120 % u piјaćoj i podzemnoj vodi i 60 - 70 % u površinskim vodama (Sancho i sar., 2004).

Osetljivu ekstrakcionalno spektrofotometrijsku metodu za određivanje dimetoata predložili su Das (1994) i saradnici. Dimetoat je preveden u molibdo-fosforo kompleks reakcijom sa amonijum-molibdatom i metilenskim plavim u sumpornoj sredini. Sistem se pokorava Lambert-Beerovom zakonu, a linearnost je u intervalu koncentracija dimetoata 0,02 - 0,16 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ i RSD se kreće do 3,2 %. SD je 0,006 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$. Metoda je primenjena za određivanje dimetoata u zemljištu i biljnog materijalu.

Dimetoat je određivan u lišću solid-phase ekstrakcijom (SPE) i HPLC metodom u intervalu koncentracija 0,001 - 0,1 mg/cm^3 . RSD je od 1,7 do 3,8 %. Recovery je 82,8 - 95,6 % (Awadh i sar., 2006).

Pappas i Kyriakidis (2003) određivali su dimetoat u limunu i mandarinama gasnom hromatografijom sa azotno-fosfornim (NPD) i plameno-fotometrijskim (FPD) detektorom. Korišćenjem NP detektora dimetoat je u limunu određivan u intervalu koncentracija 0,1 - 2,5 mg/kg , sa RSD manjim od 7,2 % i recovery 89 - 106 %, dok je u mandarinama u intervalu koncentracija 0,01 - 2,5 mg/kg , RSD < 8,5 % i recovery 85 - 108 %. Korišćenjem FP detektora dimetoat je u limunu određivan u intervalu koncentracija 0,1 - 3 mg/kg , RSD < 4,2 % i recovery je 95 - 103 %. A za mandarine određivane sa FP detektorm kalibraciona kriva je u intervalu koncentracija 0,01 - 3 mg/kg , RSD < 4,3 % i recovery 89 - 108 %.

Dimetoat je određivan u maslinovom ulju adsorptivnom voltametrijom (Ad-SSWV) na bazi osobine ovog pesticida da podleže hidrolizi u baznoj sredini i povećavanje pika pri - 0,780 V. Ekstrakcija je vršena korišćenjem C₁₈ kertridža. LOD je 1,34 ng/cm^3 , recovery 79,9 - 104,5 %. Kalibraciona prava linerana je u intervalu koncentracija od 5 - 100 ng/cm^3 i korelacionim koeficijentom 0,9994. Relativna greška je od 3,19 - 9,08 % za koncentracije od 5 - 50 ng/cm^3 (Díaz i sar., 2006).

Dimetoat je određivan u površinskim vodama Makedonije u intervalu koncentracija od 0,95 - 10,2 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$, HPLC metodom sa UV i DAD detektorom (HPLC-UV-DAD). LOD iznosi 0,31 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$, a LOQ je 0,95 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$, RSD se kreće do 7,2 % (Nestorovska-Krsteska i sar., 2008).

Lal (2008) i saradnici su određivali dimetoat multirezidualnom analizom u vodi i povrću SPE i gasnom hromatografijom (GC). Dimetoat je određivan u intervalu koncentracija od 1 - 20 mg/kg . LOD je 0,02 mg/kg i RSD je do 5,8 %. Recovery se kreće od 94 - 98 %.

Dugo (2005) i saradnici određivali su dimetoat u sicilijanskom i apulianskom maslinovom ulju u intervalu koncentracija od 0,2 - 1 mg/kg . Recovery se kreće od 91 - 95 %. LD iznosi 0,015 mg/kg .

Dimetoat je određivan metodom elektropolimerizacije u intervalu koncentracija od 10 - 100 ng/cm^3 , sa RSD od 2,1 - 3,2 %. DL iznosi 0,5 ng/cm^3 (Du i sar., 2008).

U vodama je dimetoat određivan tečnom hromatografijom sa elektrosprej ionizacijom i masenom detekcijom (LC-ESI-MS). U česmenskoj vodi recovery iznosi 97,1 % i RSD 1,1 %, dok u podzemnim vodama recovery je 80,7 % i RSD od 0,7 %. LOD je 0,01 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$, a LOQ 0,05 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$ (Quieraz i sar., 2004).

Poznata je spektrofluorimetrijska metoda za određivanje dimetoata u vodama. Granica određivanja je 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$, recovery je od 96,66 - 98 %, a RSD od 4,7 - 5,84 % (Lokanath i sar., 2003).

Razrađena je gasno-hromatografska metoda sa plameno ionizacionim detektorom (CG-FPD) za određivanje organofosfornih pesticida u svežem i čokoladnom mleku. Dimetoat je određivan u intervalu koncentracija od 0,02 ppm do 0,1 ppm. Sa RSD od 1 do 9,7 %. Recovery se kreće između 69 i 99 % (Erney, 2005).

Dimetoat je određivan micelarnom elektrokinetičkom kapilarnom hromatografijom (MEKC) u prirodnim vodama i zemljištu u intervalu koncentracija od 0,02 - 0,2 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$. Recovery je u intervalu od 82 - 92 %. RSD je manja od 7 % (Sanchez i sar., 2003).

Dimetoat je određivan u medu, voćnom soku i vinu nakon SPE gasnom hromatografijom sa masenim detektorom (GC-MS) i tečnom hromatografijom sa masenom detekcijom (LC-MS-MS). LOQ iznosi 0,05 mg/kg. Recovery u uzorcima meda je 69,7 - 105,9 %, u uzorcima crvenog vina je od 86,8 do 127,8 %. Dok je srednji recovery 86,8 %. RSD < 24,1 % (Pang i sar., 2006).

Multirezidualnom analizom pesticida u vinima određen je dimetoat u intervalu koncentracija od 10 do 5070 mg/dm³. Za odvajanje dimetoata iz uzorka korišćena je SPE a za njegovo određivanje kapilarna gasna hromatografija sa selektivnim jon monitoringom i masenim detektorom (GC-MSD-SIM). LOD iznosi 2,5 mg/dm³ (Wong i sar., 2003).

Perret (2002) i saradnici su vršili validaciju tečno hromatografske metode sa masenom spektrometrijom (LC/TMS) za određivanje rezidua dimetoata u uzorcima sokova. Za ekstrakciju dimetoata iz uzorka koristili su matriks solid-phase ekstrakciju (MSPE). Detekcioni limit je ispod 0,2 ppb, standardna devijacija od 2 - 50 ng/g. Recovery se kreće od 77 do 102 %.

Dimetoat je određivan kapilarnom gasnom hromatografijom sa masenim detektorom u biljkama. Recovery iznosi 87,3 %. Dimetoat je određivan u koncentracijom intervalu od 0,76 - 3,35 mg/kg sa koeficijentom varijacije 4,2 % (Schmalko i sar., 2002)

Gallardo (2006) i sradnici određivali su dimetoat u urinu i uzorcima krvi koristeći SPE za odvajanje pesticida i gasnu hromatografiju sa masenom detekcijom (GC-MS) za njegovo kvantitativno određivanje. LOD i LOQ za uzorke urina iznose 50 ng/cm³ i 100 ng/cm³, a za uzorke krvi 200 ng/cm³ i 500 ng/cm³, respektivno. Kalibraciona prava za uzorke urina je u intervalu koncentracija od 0,1 do 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$, a za uzorke krvi 0,5 - 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$.

Dimetoat je određivan u urinu, nakon ekstrakcije dihlormetanom, HPLC metodom. Linearnost metode je u intervalu koncentracije dimetoata od 0,001 - 0,282 ng/cm³. RSD je manja od 18 %, a recovery iznosi oko 100 % (Montesano i sar., 2007).

4. KINETIČKE METODE I METODE ODVAJANJA

4.1. Osnovni pojmovi hemijske kinetike

Hemijska promena je proces u kome iz jednih hemijskih vrsta, reaktanata, nastaju druge hemijske vrste, proizvodi reakcije.

Osnovni pojam u hemijskoj kinetici jeste brzina hemijske reakcije, koja se definiše kao promena koncentracije reaktanata u jedinici vremena (Bendito i Silva 1988). Metode analize koje se zasnivaju na merenju brzine reakcije nazivaju se kinetičke metode i mogu se klasifikovati prema različitim kriterijumima. Najbolja podela kinetičkih metoda analize je na katalitičke i nekatalitičke (tabela 26.)

Tabela 26. Opšta podela kinetičkih metoda

KATALITIČKE METODE

-NEENZIMSKE	$\left\{ \begin{array}{l} VRSTE \\ REAKCIJA \\ IZMENJENI \\ UTICAJI \end{array} \right\}$	$\left\{ \begin{array}{l} REDOKS \\ HEMILUMINISCENCIJA \\ KOMPLEKSIRANJE \end{array} \right\}$
- ENZIMSKE	$\left\{ \begin{array}{l} HOMOGENE \\ HETEROGENE \\ IZMENJENI \\ UTICAJI \end{array} \right\}$	$\left\{ \begin{array}{l} AKTIVACIJA \\ INHIBICIJA \\ KATALITICKE \\ TITRACIJE \end{array} \right\}$
- ELEKTROHEMIJSKE		$\left\{ \begin{array}{l} AKTIVACIJA \\ INHIBICIJA \end{array} \right\}$

NEKATALITIČKE METODE

- ODREĐIVANJE JEDNE VRSTE
 - ODREĐIVANJE U SMEŠI (DIFERENCIJALNA KINETIKA)
-

Svaki proces, bez obzira na njegovu prirodu, odvija se konačnom brzinom težeći ravnotežnom stanju, uključujući pri tome dve oblasti: KINETIČKU - tokom koje se sistem približava ravnoteži i RAVNOTEŽNU - kada sistem dostiže ravnotežno stanje (slika 17.)

Ako posmatramo reakciju za koju važi sledeći opšti stehiometrijski izraz:



brzinu ove reakcije možemo izraziti preko promene koncentracije bilo koje komponente sa vremenom

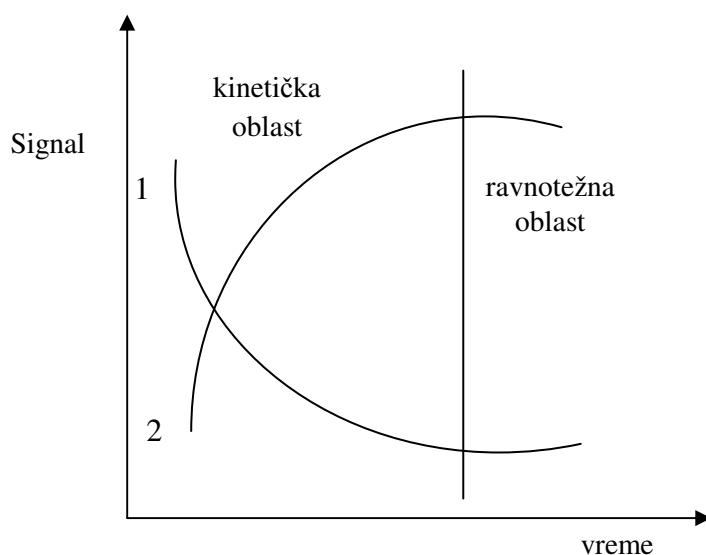
$$v = -\frac{\partial c_A}{\partial t} = -\frac{\partial c_B}{\partial t} = \frac{\partial c_C}{\partial t} = \frac{\partial c_D}{\partial t} \quad (5)$$

a za hemijsku reakciju u opštem slučju:



brzina se može predstaviti jednačinom

$$v = -\frac{1}{a} \cdot \frac{\partial c_A}{\partial t} = -\frac{1}{b} \cdot \frac{\partial c_B}{\partial t} = \frac{1}{c} \cdot \frac{\partial c_C}{\partial t} = \frac{1}{d} \cdot \frac{\partial c_D}{\partial t} \quad (7)$$



Slika 17. Kinetička i ravnotežna oblast hemijske reakcije. Promena analitičkog signala sa vremenom za reaktante (1) i produkte (2)

Brzina termodinamički moguće reakcije zavisi od različitih faktora i to koncentracije reaktanata, temperature, katalizatora, prirode rastvarača, inhibitora, aktivatora i drugih.

4.2. Teorija reakcionih brzina

Hemijska promene može se posmatrati sa dva osnovna aspekta i to kao proces koji se odvija na molekulskom nivou u kome molekul A u interakciji sa molekulom B daje hemijski novu vrstu - produkte reakcije C i D, ali i kao makroskopsku pojavu koja predstavlja proces sastavljen iz n elementarnih hemijskih promena.

Reakcioni sistem može da se posmatra kao skup čestica koje se nalaze u određenim energetskim stanjima, a hemijska promena kao proces u kome dolazi do promene energije. Molekuli reaktanata A i B kao i produkti C i D nalaze se u energetskim stanjima koja su određena odgovarajućim elektronskim, vibracionim i rotacionim kvantnim nivoima. Da bi međusobno reagovali reaktanti se moraju naći u određenim energetskim stanjima. Zato se hemijska promena najčešće posmatra kao sistem koji se menja duž jedne nove koordinate koja se naziva reakcionala koordinata. Duž te koordinate dolazi do preraspodele energije, preraspodele hemijskih veza i određene rekombinacije unutar molekula reaktanata pri čemu se formiraju molekuli produkta. (Hammes, 1960; Polling, 1975; Laidler, 1987; Dondur, 1992) Postoji više teorija reakcionih brzina:

- teorija sudara
- teorija prelaznog stanja
- stohastička analiza
- teorija apsolutnih brzina reakcije.

4.3 Faktori koji utiču na brzinu hemijske reakcije

4.3.1. Uticaj koncentracije reaktanata

Za različite hemijske sisteme vreme prelaza iz početnog u konačno stanje nije isto (bitno se razlikuje). Poznate su reakcije koje se završavaju u delu sekunde, a takođe i reakcije koje se završavaju za mesece i godine.

Uticaj koncentracije reaktanata na brzinu hemijske reakcije dat je osnovnim zakonom hemijske kinetike, zakonom o dejstvu masa (Guldberg i Waage, 1879). Za reakciju (4) brzina se daje izrazom

$$\vartheta = k \cdot [A]^a \cdot [B]^b \quad (8)$$

k-konstanta brzine reakcije, karakteristična je za svaku hemijsku reakciju pri datoј temperaturi.

Pri jediničnoj koncentraciji reaktanata konstanta brzine jednaka je brzini.

Red reakcije **n** jednak je zbiru eksponenata u izrazu za brzinu reakcije

$$n = a + b \quad (9)$$

Eksponenti **a** i **b** u jednačini (9) često nisu jednaki sa stehiometrijskim koeficijentima. Zbog toga u opštem slučaju iz jednačine (6) ne možemo zaključiti o redu reakcije u odnosu na dati reaktant. Red reakcije, kako ukupni, tako pojedinačni ne mora biti uvek ceo broj. U takvim slučajevima mehanizam reakcije je složeniji.

U zavisnosti od toga da li međusobno reaguje jedna čestica, dve ili tri govorimo o *mono-, bi-, ili tri-molekulskim reakcijama*.

4.3.2. Uticaj temperature

U opštem slučaju brzina hemijske reakcije povećava se sa povećanjem temperature jer konstanta brzine reakcije zavisi od temperature. Još je Van't Hoff ustanovio 1884. godine da se pri povećanju temperature za 10°C brzina reakcije povećava dva do tri puta.

Kvantitativno ovu zavisnost možemo izraziti Arrhenius-ovom jednačinom

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{RT} \quad (10)$$

ili u eksponencijalnom obliku

$$k = A \cdot e^{-\frac{E_a}{RT}} \quad (11)$$

gde je **k** - konstanta brzine hemijske reakcije,

A - faktor učestanosti sudara (Arrhenius-ova integralna konstanta),

T - apsolutna temperatura,

E_a - energija aktivacije,

R - univerzalna gasna konstanta ($8,314 \text{ JK}^{-1} \text{ mol}^{-1}$).

Iz jednačina (10) i (11) vidi se da konstanta brzine reakcije raste sa povećanjem temperature, utoliko jače koliko je veća energija aktivacije date reakcije.

Jednačina (10) koristi se za određivanje energije aktivacije i faktora učestanosti (A), ako je konstanta brzine određena na različitim temperaturama. Grafički se to postiže ako se prikaže zavisnost

$$\log k = f(1/T) \quad (12)$$

nagib ove prave jednak je

$$\text{tga} = - E_a / R \quad (13)$$

a energiju aktivacije

$$E_a = - \operatorname{tg} \alpha \cdot R \quad (14)$$

S obzirom na to da određivanje energije aktivacije (u nekim slučajevima i entropija aktivacije) omogućava da se da prepostavka o mehanizmu reakcije, to se u kinetičko-katalitičkim istraživanjima često određuje E_a (Müller i sar., 1980).

4.3.3. Uticaj rastvarača

Do sada poznata katalimetrijska određivanja primenjuju katalitičke reakcije u rastvorima. Rastvarač pri tome znatno utiče kako na brzinu reakcije, tako i na njen mehanizam. Uticaj rastvarača na brzinu reakcije između reaktanata A i B, koja se odvija preko nastajanja aktiviranog kompleksa $^aAB^*$, može se prikazati Kirkwood-ovom jednačinom (Laidler, 1965):

$$\ln k = \ln k_0 + \frac{e^2}{2KT} \left(1 - \frac{1}{\epsilon}\right) M - \frac{3}{8KT} \left(\frac{1-\epsilon}{1+\epsilon}\right) N \quad (15)$$

gde je:

$$M = \frac{(z_A + z_B)}{r_{[AB]^*}} - \frac{z_A^2}{r_A} - \frac{z_B^2}{r_B}$$

$$N = \frac{\mu_A^2}{r_A^3} + \frac{\mu_B^2}{r_B^3} - \frac{\mu_{[AB]^*}^2}{r_{[AB]^*}^3}$$

k_0 - konstanta brzine reakcije u rastvoru rastvarača beskonačne relativne

permitivnosti

ϵ - relativna permitivnost rastvarača

μ_A, μ_B, μ_C - dipolni momenat reaktanata A, B i njihovog aktiviranog kompleksa

z_A, z_B - naelektrisanje A, B

r_A, r_B, r_C -jonski radijusi reaktanata A, B i njihovog aktiviranog kompleksa

e - naelektrisanje protona ($1,602 \cdot 10^{-19}$ C).

Limitirajući faktor hemijske reakcije sa učešćem rastvarača jeste entalpija solvatacije reaktanata i aktiviranog kompleksa. Skoro sve katalitičke reakcije, koje se primenjuju u kinetičkim metodama se odigravaju u vodenoj sredini. Međutim ako je jedan od reagenasa nerastvoran u vodi, ili kada je potrebno odvojiti katalizator od

matrice ekstrakcijom, potrebni su vodeno - organski rastvori. Tada obavezno treba uzeti u obzir promenu brzine reakcije od sastava rastvarača.

Prema Hauptmann-u (1977) i saradnicima za ocenu uticaja rastvarača treba ih podeliti u nekoliko grupa:

- nepolarni aprotični rastvarači
- polarni aprotični rastvarači
- protogenični rastvarači (sadrže $-\text{OH}$ ili $-\text{NH}$ grupe).

Kod jonskih reakcija, povećanje dielektrične konstante rastvarača povećava brzinu reakcije jona istog nanelektrisanja, i smanjuje brzinu reakcije jona različitog nanelektrisanja. Brzina reakcije između neutralnih molekula koji grade izrazito polaran aktiviran kompleks povećava se sa povećanjem polarnosti rastvarača. Kod reakcija ion-molekul gde nastaje slabo polaran aktiviran kompleks, brzina se neznatno menja.

Posebano je veliki uticaj rastvarača na brzinu reakcije kod reakcija koje se odigravaju po jonskom mehanizmu.

4.3.4. Uticaj katalizatora

Katalizator je supstanca koja ubrzava nastanak ravnotežnog stanja date hemijske reakcije pri neznatnom odstupanju od vrednosti promene slobodne energije procesa. Reakcije koje se odigravaju u prisustvu katalizatora zovu se **katalitičke**. Ukoliko se reakcija odvija u jednoj fazi radi se o **homogenoj katalizi**, a ako se reakcija odgrava na granici faza onda govorimo o **heterogenoj katalizi**.

Homogeno katalitičke reakcije su najčešće primenjivane kod katalitičkih metoda analize. Katalitičko dejstvo katalizatora uslovljeno je interakcijom između elektronskih sistema katalizatora i reaktanata. Elektronska struktura reaktanata se menja tako da se među njima reakcija dešava izrazito brzo u toku koje se katalizator oslobođa u početnom obliku. Znači katalizator učestvuje u reakciji menjajući njen mehanizam i snižavajući time slobodnu energiju aktivacije. Razlike u brzinama katalitičke i nekatalitičke reakcije uslovljene su time što je slobodna energija aktivacije za katalitičku reakciju manja od iste za nekatalitičku, te zbog toga takve reakcije protiču brže (Avery, 1974).

Reakcije koje se primenjuju za određivanje koncentracije katalizatora nazivaju se **indikatorske reakcije**, a supstanca čija promena koncentracije služi kao mera za brzinu proticanja reakcije naziva se **indikatorska supstanca** (Jacimirskii, 1967).

Indikatorska reakcija treba da odgovara određenim zahtevima:

- brzina reakcije treba da bude u određenim granicama, jer reakcije koje protiču suviše brzo ili suviše sporo nisu pogodne za analitičke ciljeve. Optimalno vreme za merenje brzine reakcije je 10 do 15 minuta;

- koncentraciju indikatorske supstance treba meriti na brz i jednostavan način;
- koncentracija određivane supstance, za vreme eksperimenta, ne bi trebala da se bitno menja.

Osnovne karakteristike katalizatora su:

- katalizator može da ubrzava samo određenu hemijsku reakciju
- reakcija mora biti termodinamički moguća, tj. da može sama da se odvija
- nakon reakcije katalizator ostaje hemijski nepromenjen
- katalizator ubrzava hemijsku reakciju time što snižava njenu energiju aktivacije, ali ne menja položaj njene ravnoteže.

4.3.5. Uticaj aktivatora

Definiciju aktivatora dali su 1965. godine Bončev i Jacimirski: „Aktivator neke homogeno-katalitičke reakcije je supstanca koja sama ne katalizuje datu reakciju, ali bitno povećava njenu brzinu u prisustvu katalizatora”.

Univerzalni aktivatori ne postoje, jer supstanca koja je u jednoj reakciji aktivator, u drugoj može biti inhibitor, ili neće pokazivati uticaj na brzinu reakcije. Za razliku od koncentracije katalizatora, koja se pri proticanju ne menja, koncentracija aktivatora ne mora, ali može da se promeni za vreme odvijanja reakcije, u zavisnosti od mehanizma dejstva aktivatora na tu reakciju (Bončev, 1972).

Prema mehanizmu delovanja, aktivatori se mogu podeliti na sledeći način:

1. Aktivatori koji olakšavaju kontakt katalizator-supstrat, putem:

- smanjenja elektrostatičkog odbijanja među njima
- stvaranja prelaznog kompleksa sa katalizatorom ili s nekim od liganada u njegovoj koordinacionoj sferi
- velikog trans ili cis uticaja.

2. Aktivatori koji povoljno utiču na uzajamno dejstvo između katalizatora i supstrata, putem:

- povećanja polarizujućeg uticaja katalizatora ili povećanja mogućnosti da supstrat bude polarizator
- stabilizovanja određenog aktivnog oblika katalizatora, reaktanata ili produkata (intermedijarni ili krajnji)
- favorizovanja određene prostorne orijentacije katalizatora i supstrata.

3. Aktivatori koji ne utiču direktno na reakciju katalizator-supstrat, već indirektno ubrzavaju dobijanje proizvoda reakcije, putem:

- dejstva na više različitih etapa istog katalitičkog procesa
- kombinovanog dejstva s drugim aktivatorima prisutnim u rastvoru.

Ispitivanja su pokazala da je dejstvo aktivatora najjače pri postojanju reakcije u rastvoru slobodno-radikalским mehanizmom ili mehanizmom sa prenosom naelektrisanja.

Procesi koordiniranja, koji igraju suštinsku ulogu pri nastanku efekta aktiviranja, mogu biti uzrok i jedne nepoželjne pojave kod homogeno-katalitičkih reakcija, a to je inhibiranje reakcije. Prisustvo koordiniranog aktivatora može ubrzati reakciju samo ako u koordinacionoj sferi katalizatora ima dovoljno slobodnih mesta, koja može zauzeti supstrat ili neko intermedijarno jedinjenje. Međutim, ako aktivator-ligand gradi takav kompleks sa katalizatorom, da zauzima sva mesta u njegovoj koordinacionoj sferi, doći će do smanjenja brzine reakcije, o čemu treba voditi računa pri izboru aktivatora.

U cilju povećanja osjetljivosti indikatorske reakcije, najefikasnijom se pokazala mogućnost korišćenja različitih aktivatora u određenim slučajevima. Primenom aktivatora moguće je povećati osjetljivost indikatorske reakcije za nekoliko redova veličina, a da se reproduktivnost i selektivnost metode bitno ne menjaju. Aktivator se u nekim slučajevima koristi kao maskirajuće sredstvo za određene primešane, što utiče na povećanje reproduktivnosti i selektivnosti metode (Igov i sar., 1980).

4.4. Metode za određivanje katalitički aktivnih supstanci u rastvoru na osnovu kinetičkih podataka

Pri izboru metode analize treba obratiti pažnju na karakter zavisnosti između koncentracije katalizatora i brzine reakcije. Ova zavisnost treba da bude linearna. Za određivanje sadržaja katalitički aktivnih supstanci u rastvoru kinetičkim metodama analize potrebno je izmeriti brzinu reakcije ili dužinu njenog indukcionog perioda.

U zavisnosti od metodike, koja se koristi za određivanje katalitički aktivnih supstanci, postoji više metoda koje su date u tabeli 27.

Tabela 27. Kinetičke metode određivanja

Diferencijalna	Tangensna Fiksno vremena Fiksne koncentracije
Integralna	Tangensna Fiksno vremena Fiksne koncentracije

Metode zasnovane na kinetičkim merenjima

Metode zasnovane na merenju dužine indukcionog perioda

Koncentracija indikatorske supstance se menja u toku reakcije, dok se koncentracije ostalih supstanci (katalizator) ne menjaju ili se neznatno menjaju. Zbog toga je potrebno da koncentracije svih supstanci koje učestvuju u reakciji budu znatno veće od koncentracije indikatorske supstance.

Da bi objasnili osnovne principe obrade rezultata, posmatramo indikatorsku reakciju u prisustvu katalizatora K



Brzina reakcije se može predstaviti

$$v = \frac{\partial x}{\partial t} = (k + k_K [K]) \cdot [A] \cdot [B] \quad (17)$$

gde je dx promena koncentracije indikatorske supstance, koja može biti reaktant (A ili B), ili proizvod (X ili Y). Uvođenjem zamene za x i nakon sređivanja dobija se izraz

$$\frac{\partial x}{\partial t} = (k + k_K [K]) \cdot ([A]_0 - x) \cdot ([B]_0 - x) \quad (18)$$

U zavisnosti od koncentracije polaznih reaktanata x , može se primeniti diferencijalna ili integralna varijanta obrade kinetičkih podataka.

Diferencijalna varijanta

Ako je x , u poređenju sa $[A]$ i $[B]$, neuporedivo mala vrednost, tada se primenjuje diferencijalna varijanta za obradu kinetičkih podataka. Koncentracije polaznih supstanci, na početku reakcije, znatno su veće od x , tako da se njihova koncentracija može smatrati konstantnom, te mogu ući u konstantu brzine ove reakcije. Tada se jednačina (18) može napisati:

$$\frac{\partial x}{\partial t} \approx -\Delta x / \Delta t = k' + k_K' [K] \quad (19)$$

gde je

$$k' = k [A]_0 [B]_0 \quad k_K' = k_K [A]_0 [B]_0$$

Prednost ovog načina obrade podataka uslovljena je time što

- nastaje veoma mala količina proizvoda, pa zbog toga ne protiče povratna reakcija;
- u početnom stadijumu ne dolazi do sporednih reakcija;
- reakcija protiče u uslovima pseudonultog reda.

Zahvaljujući tome poboljšana je preciznost određivanja koncentracije katalizatora i uprošćen odnos između brzine reakcije i katalizatora.

Integralna varijanta

Ukoliko je x uporedivo sa $[A]$ i $[B]$ primenjuje se integralna varijanta za obradu podataka. U prostom slučaju, kada se reaktant B nalazi u višku, i prati se promena reaktanta A može se napisati jednačina:

$$\frac{\partial x}{\partial t} = (k' + k_K' [K]) ([A]_0 - x) \quad (20)$$

gde je $k' = k [B]_0$ i $k_K' = k_K [B]_0$

Integraljenjem jednačine (20) u intervalu vremena od $t = 0$ do t , dobija se

$$\ln \frac{[A]_0}{[A]_0 - x} = (k' + k_K' [K]) t \quad (21)$$

Ukoliko reaktant B nije u višku, nego se značajno menja sa vremenom, onda se integraljenjem jednačine (18) dobija

$$\frac{1}{[A]_0 - x} - \frac{1}{[A]_0} = (k' + k_K [K]) t \quad (22)$$

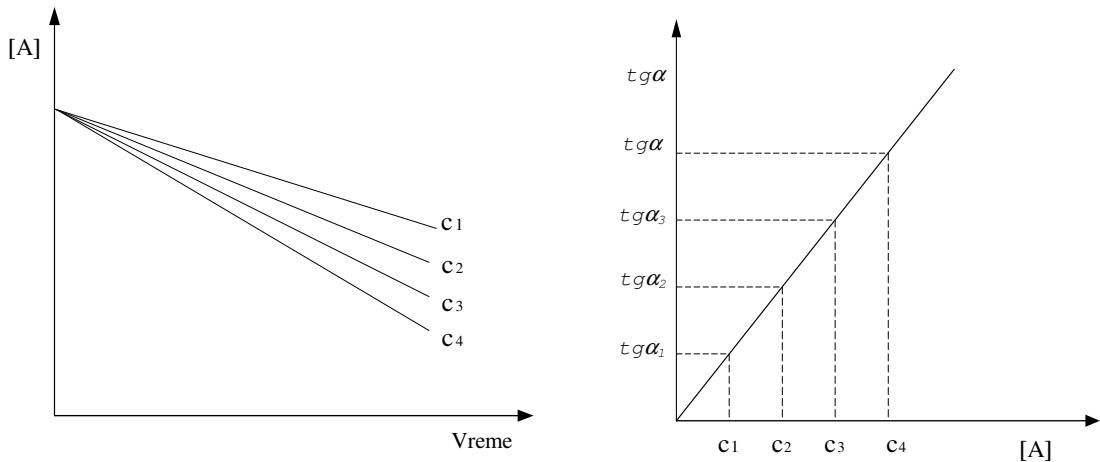
U skladu sa jednačinama (19), (20) i (21), za obradu kinetičkih podataka koriste se sledeće metode: *tangensna metoda, metoda fiksnog vremena, metoda fiksne koncentracije i metoda indukcionog perioda* (Jacimirskii i sar., 1970).

Tangensna metoda

Kod diferencijalne varijante tangensne metode meri se promena koncentracije jedne supstance ili logaritma koncentracije indikatorske supstance tokom vremena (slika 18). Dobijeni podaci grafički se predstavljaju kao zavisnost koncentracije određivane supstance u funkciji od vremena (t). Tangens ugla nagiba prave $\tan \alpha = -\Delta A/dt$ upravo je сразмерan koncentraciji katalizatora (jednačina 19). Da bi odredili koncentraciju

katalizatora primenjuje se metoda kalibracione krive u koordinatama $\text{tg}\alpha$ -koncentracija katalizatora.

Na osnovu dobijenih rezultata crtaju se dve krive (slika 18). Prva predstavlja zavisnost koncentracije (ili logaritma koncentracije) indikatorske supstance od vremena, a druga kalibracionu pravu $\text{tg } \alpha = f[A]$. Grafik zavisnosti koncentracije (ili njoj proporcionalne veličine) od vremena dobija se automatski UV/VIS spektrofotometrom. U tom slučaju tangens ugla se može odrediti znatno tačnije.



Slika 18. Tangensna metoda

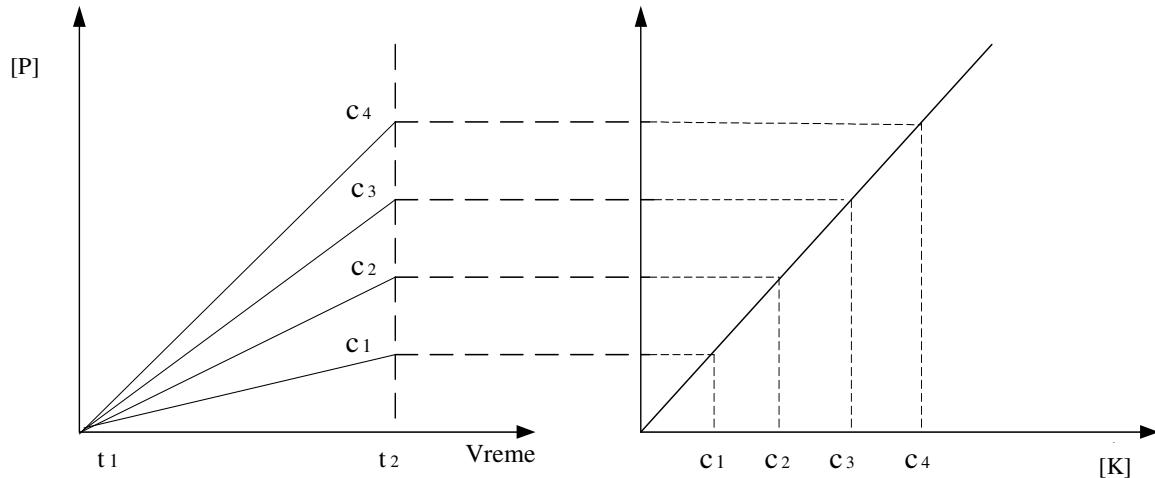
Metoda tangensa se primenjuje kod različitih tipova reakcija. Neke teškoće se mogu pojaviti samo kod višefaznih reakcija gde oblik kinetičke jednačine postaje složen. Ova metoda se sa uspehom primenjuje i kod reakcija sa indupcionim periodom gde druge metode ne mogu da daju tačne rezultate.

Umesto promene koncentracije moguće je pratiti promene neke fizičko-hemijske veličine koja je proporcionalna koncentraciji (apsorbanca, difuziona struja, intenzitet fluorescencije i druge) sa vremenom (Mark i Rechnitz, 1968).

Metoda fiksnog vremena

Ovom metodom se prati promena koncentracije, ili njoj proporcionalne veličine koja nastaje u zadatom intervalu vremena odigravanja indikatorske reakcije pri različitim koncentracijama katalizatora. Ako je u zadatom vremenskom intervalu promena koncentracije sa vremenom linear, koristi se diferencijalna varijanta; ako je pak u rastvoru došlo do bitne promene koncentracije, koristi se integralna varijanta. Kalibraciona prava predstavlja zavisnost merene veličine od koncentracije katalizatora. Ova zavisnost je prikazana na slici 19.

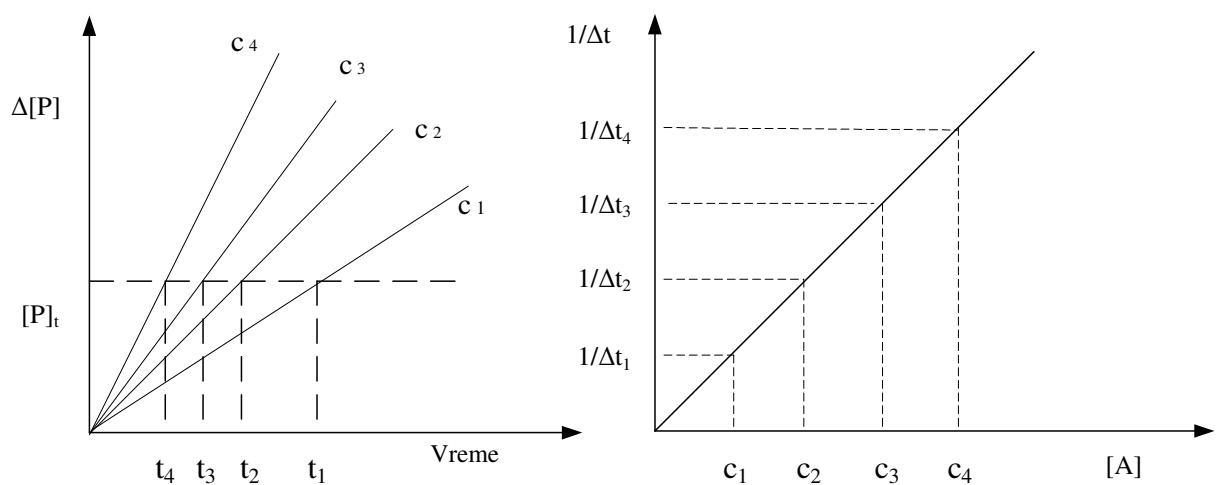
Metoda fiksnog vremena je jednostavnija za izvođenje u poređenju sa metodom tangensa. Rezultati koji se dobijaju ovom metodom su manje tačni, a i metoda nije univerzalna. Npr., u prisustvu jako izraženog dugotrajnog indukcionog perioda teško je dobiti pouzdane rezultate.



Slika 19. Metoda fiksnog vremena

Metoda fiksne koncentracije

Kod ove metode meri se vreme (t) potrebno da koncentracija indikatorske supstance, ili njoj odgovarajuće merene veličine, dostigne tačno određenu vrednost, a za različite koncentracije supstance koju određujemo (katalizatora). Recipročna vrednost proteklog vremena ($1/t$) linearno je zavisna od koncentracije katalizatora ili njoj proporcionalne veličine. Ova zavisnost je prikazana na slici 20.



Slika 20. Metoda fiksne koncentracije

Opisana metoda se primenjuje u uslovima odsustva paralelnog odvijanja nekatalitičke reakcije. Ako se u rastvoru takva reakcija stvarno odvija, onda se reakcija prati do fiksirane vrednosti razlike koncentracije ispitivane supstance ili njoj proporcionalne veličine. Vrednosti razlike mogu se naći automatski ako se na primer u jednu kivetu spektrofotometra stavi rastvor koji sadrži supstancu koja se ispituje, a u drugu rastvor bez te supstance.

Ako ispitivanu reakciju karakteriše prisustvo indupcionog perioda, onda u tom slučaju ne postoji linearna zavisnost između $1/t$ i koncentracije ispitivane supstance ili njoj proporcionalne veličine.

Metoda fiksirane koncentracije je jednostavnija za primenu nego tangensna metoda, ali su dobijeni rezultati manje tačni i metoda je manje univerzalna.

Izborom odgovarajućih reakcionih uslova (koncentracije reaktanata, pH-sredine, temperature) može se postići linearna zavisnost između koncentracije katalizatora i brzine reakcije. U praksi se uglavnom primenjuju indikatorske reakcije koje su modifikovane tako da čine reakcije prvog reda ili pseudo prvog reda (Erofeev i Tulipov, 1977).

4.5. Ekperimentalne metode za praćenje brzine hemijskih reakcija

Za merenje brzine hemijskih reakcija potrebno je pratiti promenu koncentracije sa vremenom bilo kog reaktanta ili proizvoda reakcije. Reakcija, čiju brzinu određuje koncentracija analizirane supstance naziva se indikatorska, a supstanca čijom se promenom koncentracije, eksperimentalno prati brzina reakcije, naziva se indikatorska.

Kod kinetičkih metoda analize, za proučavanje kinetike hemijskih reakcija, najčešće se primenjuju fizičke i fizičko - hemijske metode, ili tzv. indirektne metode. Kao preduslov za primenu neke indirektne metode, neophodno je da postoji što prostiji odnos između merene fizičke osobine i koncentracije analizirane supstance. Najbolje je koristiti one metode gde postoji što prostiji odnos između merene fizičke osobine i koncentracije analizirane supstance. Najbolje je koristiti one metode gde postoji međusobna linearna zavisnost, kao na primer kod apsorbance, električne provodljivosti, indeksa prelamanja, jačine difuzione struje, potencijala date elektrode, intenziteta zamućenosti rastvora.

Međusobna zavisnost između koncentracije analizirane supstance i merene fizičke osobine može se predstaviti tzv. „jednačinom međusobne zavisnosti”:

$$D = k \cdot c \quad (23)$$

u kojoj je D - kvantitativna karakteristika osobine rastvora, k - koeficijent proporcionalnosti, c - koncentracija.

Optičke metode i to fotokolorimetrija i spektrofotometrija, se najviše primenjuju za merenje brzine hemijskih reakcija. One se zasnivaju na merenju promene apsorbance (A) rastvora sa vremenom u funkciji koncentracije analizirane supstance (Bulatov i Kalinkin, 1972).

$$A = \epsilon \cdot l \cdot c \quad (24)$$

ϵ – molarni koeficijent apsorpcije

l – debljina apsorpcionog sloja

Od optičkih metoda za praćenje brzine hemijskih reakcija, koriste se refraktometrijske i luminiscentne metode. U zamućenim koloidnim rastvorima primenjuju se nefelometrijske i turbidimetrijske metode.

Iz grupe elektrohemskijskih metoda, koje se koriste kod kinetičkih metoda analize, najviše se primenjuju sledeće: potenciometrija, polarografija i amperometrija. Elektrohemskijske metode se zasnivaju na korelaciji elektrohemskijske karakteristike određivane supstance od njene koncentracije.

Sve aparature, koje se koriste u okviru nabrojanih metoda za merenje brzine hemijskih reakcija moraju biti snabdevene uređajem za termostatiranje reakcionog sistema.

4.6. Karakteristike kinetičkih metoda analize

Kinetičke metode analize zauzimaju značajno mesto u savremenoj kvantitativnoj hemijskoj analizi. Široku primenu su našle homogeno - katalitičke kinetičke metode. Većina ovih metoda se primenjuje za određivanje metala.

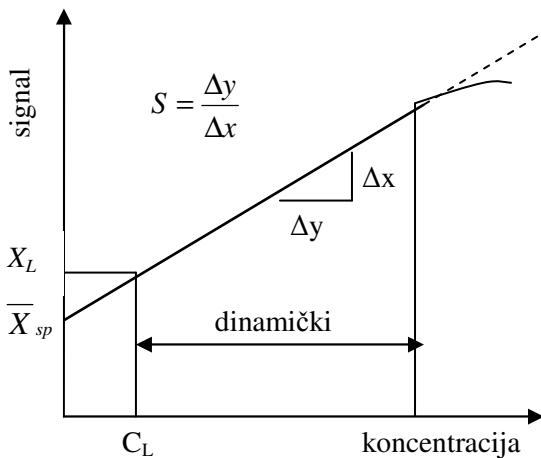
Osnovna karakteristika kinetičkih metoda analize je njihova *osetljivost*. Koristeći kalibracionu krivu definišu se neke veličine koje služe za poređenje različitih metoda (slika 21).

Osetljivost je svojstvo instrumenta, a u instrumentalnoj analizi izražava se kao nagib kalibracione krive $y = f(x)$:

$$S = \frac{\Delta y}{\Delta x} \quad (25)$$

Linearni deo kalibracione krive naziva se dinamičkim opsegom za datu metodu, nagib ovog dela kalibracione krive daje osetljivost metode. Što je veća osetljivost i veći odnos signal/šum, merenje je preciznije i tačnije.

Koncept osetljivosti se identificuje sa nagibom kalibracione krive, tj. sa IUPAC-ovom analitičkom osetljivošću. Osetljivost treba računati kao odnos nagiba i njegove standardne devijacije. Ovo je dobar kriterijum za poređenje analitičkih metoda i tehnika, jer što je veća osetljivost, uži je interval pouzdanosti i veća preciznost.



Slika 21. Kalibraciona kriva i veličine koje se definišu preko nje. \overline{X}_{sp} - srednja vrednost slepe probe, X_L - granični signal merenja, S - nagib kalibracione prave = osetljivost

Prema IUPAC-ovoj definiciji, *limit detekcije* je broj, izražen u jedinicama koncentracije ili količine za datu analitičku metodu. To je najmanja koncentracija ili količina analita za koju se može tvrditi da se statistički razlikuje od slepe probe. Detekcioni limit, C_L može da se izrazi jednačinom:

$$C_L = \frac{X_L - \overline{X}_{sp}}{m} \quad (26)$$

gde je X_L granični analitički signal koji odgovara koncentraciji C_L ;

\overline{X}_{sp} je srednja vrednost slepe probe za n ispitivanja (obično $n \geq 20$);

m je analitička osetljivost.

Detekcioni limit se može izraziti preko standardne devijacije slepe probe, standardne devijacije fitovanja kalibracione prave ili standardne devijacije odsečka S :

$$C_L = \frac{k \cdot S}{m} \quad (27)$$

k je numerički faktor izabran prema željenom nivou pouzdanosti.

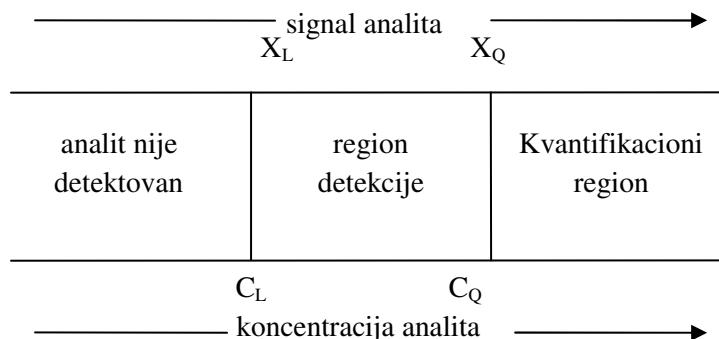
k iznosi 3,3, i ta vrednost bi trebalo da odgovara verovatnoći od 99,86 % (tj. verovatnoći da će 99,86 % X_L nalaziti u datom interval pouzdanosti). Međutim, u većini slučajeva $k = 3,3$ odgovara verovatnoći od 95 %, jer se Gausova kriva ne primenjuje striktno.

Kvantifikacioni limit (granica određivanja) je najmanja koncentracija ispitivane supstance u uzorku koja može biti određena sa prihvatljivom preciznošću i tačnošću, pod datim eksperimentalnim uslovima i izračunava sa na osnovu jednačine:

$$C_Q = \frac{10 \cdot S}{m} \quad (28)$$

Prema tome, postoje tri glavna analitička regiona (slika 22) povezana sa određivanjem supstance i to:

- region u kome se analit ne može pouzdano odrediti, za koncentracije manje od C_L
- detekcioni region, za koncentracije između C_L i C_Q
- kvantifikacioni region, za koncentracije veće ili jednake C_Q .



Slika 22. Regioni analitičkog određivanja

Osetljivost i detekcioni limit u kinetičkim metodama

Poznato je da su visoka osetljivost i nizak limit detekcije koji se pripisuju kinetičkim metodama rezultat katalitičkih reakcija. On je ograničen na merenje inicijalne brzine u reakciji $A + B \rightarrow P$, koja je katalizovana katalizatorom K:

$$\frac{d[P]}{dt} = k \cdot \pi_K \cdot [K]_0 = k \cdot [K]_0 \quad (29)$$

Gde je π_K faktor koji uključuje koncentracije reaktanata (npr. $[A]_0$ $[B]_0$), a doprinos nekatalitičke reakcije uzima se da je jednak nuli. Koncentracija katalizatora je :

$$[K]_0 = \frac{\left(\frac{d[P]}{dt} \right)}{k\pi_k} = \frac{\left(\frac{\Delta P}{\Delta t} \right)}{k\pi_k} \quad (30)$$

Iz jednačine 30 sledi da minimalna koncentracija katalizatora koja se može odrediti zavisi od minimalne promene koncentracije proizvoda koja se može izmeriti određenom instrumentalnom tehnikom. Duže vreme Δt , veća koncentracija reaktanata i veća konstanta brzine smanjuju koncentraciju katalizatora koja se može odrediti.

Teorijski i praktični detekcioni limit se najčešće ne slažu za nekoliko redova veličine. Postoje različiti razlozi za ovo neslaganje, od kojih je najznačajniji efekat pozadine koji potiče od nekatalizovane reakcije. Ako se njen doprinos uzme u obzir, ukupna brzina reakcije je $v = v_c + v_o$, ili

$$\frac{d[P]}{dt} = k \cdot \pi_K [K]_o + k \cdot \pi_K \quad (31)$$

Što je manja brzina nekatalizovane reakcije, niža će biti $[K]_{o,\min}$. Doprinos nekatalizovane reakcije kroz efekat pozadine može se izraziti preko faktora α , koji varira između 0 (odsustvo nekatalitičke reakcije) i 1 (odsustvo katalitičke reakcije). Takav doprinos se može izraziti sledećom jednačinom:

$$[K]_{o,\min} = \frac{\Delta[P]_{\min}}{\Delta t_{\max} k \cdot \pi_K} + \frac{\alpha \cdot v_o}{k \cdot \pi_K} \quad (32)$$

Ako je $v_o = k' \pi_K$, tada je:

$$[K]_{o,\min} = \frac{\Delta[P]_{\min}}{\Delta t_{\max} k \cdot \pi_K} + \alpha \frac{k'}{k} \quad (33)$$

$$\frac{k'}{k} = \exp[-(E_o - E_{kat}) / RT] \quad (34)$$

E_o i E_{kat} su energije aktivacije nekatalitičke i katalitičke reakcije. Prema ovoj reakciji, najniži detekcioni limit se javlja kada se k'/k zanemari.

Dat je izraz za izračunavanje osetljivosti i detekcionog limita katalitičkih metoda inicijalne brzine, fiksnog i varijabilnog vremena:

$$-\frac{\Delta[A]}{\Delta t} = [A]_o (k' + k[K]_o) \quad (35)$$

Detekcioni limit se identificuje sa odsečkom $[A]_o \cdot k'$ krive $-\Delta[A]/\Delta t$ u odnosu na $[K]_0$.

Zbog jednostavnosti, izrazi ne uključuju doprinos nekatalitičke reakcije. Ako je njen doprinos značajan, izraz za detekcioni limit se modifikuje delom koji je proporcionalan odnosu konstanti brzine nekatalizovane i katalizovane reakcije, dok izraz za osetljivost ne treba menjati. Može se zaključiti da:

- osetljivost raste, a detekcioni limit opada sa povećanjem konstante brzine i koncentracije reaktanata,
- u metodi fiksног vremena Δt utiče na isti način na ove parametre, pa je poželjno koristiti integralni oblik,
- u metodi varijabilnog vremena $\Delta[P]$ treba biti što manje, pa je preporučljivo koristiti diferencijalni oblik.

Visoka osetljivost i nizak detekcioni limit katalitičkih reakcija zahtevaju posebnu brigu u pripremi, čuvanju i prenosu rastvora niske koncentracije koji se koriste, kako bi se izbegle greške usled gubitaka ili kontaminacije uzorka. Posebno pažljivo treba prati stakleno laboratorijsko posuđe, jer može izazvati kontaminaciju metalima u tragovima. Dalje, tragovi metala u reagensima, mineralnim kiselinama i vodi koji se koriste u pripremi rastvora i standarda ograničavaju detekcioni limit. Najbolji način za dobijanje vode visoke čistoće je kombinacija destilacije i jonske izmene. Plastika ima prednost u odnosu na staklo, mada skladištenje u polietilenским bocama može dovesti do kontaminacije plastifikatorima koji apsorbuju UV zračenje i mogu biti potencijalni reduktori. Drugi problem kod razblaženih rastvora je mogućnost adsorpcije jona na zidove suda, što se može izbeći upotrebom politetrafluoroetilenskih boca i čuvanjem rastvora na niskom pH u frižideru, a ukoliko je moguće dodati i maskirajući agens koji ne smeta prilikom kinetičkih određivanja.

Osetljivost i detekcioni limit kinetičkih metoda se mogu poboljšati optimizacijom eksperimentalnih uslova (temperatura, pH vrednost, koncentracija reaktanta, jonska jačina, dielektrična konstanta rastvarača), primenom separacionih tehnika i pre svega upotrebom aktivatora. Pored povećanja osetljivosti i smanjenja detekcionog limita, primena aktivatora povećava selektivnost kinetičke analitičke metode.

Srednja, teorijski izračunata, granica određivanja katalizatora iznosi 10^{-17} g/cm^3 , međutim odigravanje i nekatalitičke reakcije u rastvorima dovodi do sniženja granice osetljivosti na 10^{-12} g/cm^3 .

Selektivnost

Osnovni problem koji se javlja kod primene kinetičkih metoda u analitičke svrhe je njihova **selektivnost**. Razlikujemo katalitički selektivne i analitički selektivne indikatorske reakcije. Postoji veliki broj indikatorskih reakcija koje su katalizovane samo jednim ili manjim brojem elemenata. Na primer, reakciju između tiosulfata i Fe(III) katalizuju samo joni Cu(II), u tom slučaju je reakcija katalitički selektivna. Međutim na brzinu nekog katalitički selektivnog procesa mogu da utiču druga jedinjenja koja pokazuju inhibitorno, oksidaciono ili redukciono dejstvo. U prisustvu ovih supstanci kinetička metoda nije selektivna u analitičkom smislu. Zato se može reći

da indikatorska reakcija može biti katalitički veoma selektivna, ali analitička metoda koja primenjuje ovu reakciju ne mora biti analitički selektivna.

Za povećanje selektivnosti indikatorskih reakcija postoje različite mogućnosti. Jedan od načina je simultano određivanje pojedinih katalizatora u smesi na osnovu njihove različite aktivnosti pri različitim pH vrednostima sredine.

Drugi način je maskiranje ometajućih supstanci u katalitički-neaktivna jedinjenja.

Kinetičke metode analize sve veću primenu imaju u savremenoj analitičkoj hemiji za određivanje mikro i ultramikro koncentracija u različitim uzorcima (industrijski proizvodi, biološki materijali). Kinetičke metode mogu se primenjivati ne samo za analizu mikro količina, već i za određivanje relativno velikog broja elemenata u malim količinama uzorka, kao što su razne prevlake, uzorci toksičnih supstanci i drugih.

Prema IUPAC-u, selektivnost je svojstvo koje pokazuje u kom stepenu druge supstance interferiraju pri određivanju analita datom metodom. Krajnji stepen selektivnosti je odsustvo interferencije. Interferent je supstanca koja dovodi do sistematske greške u određivanju analita, i može biti aktivna (direktno interaguje sa analitom, nekom komponentom indikatorske reakcije ili rastvaračem) i inertna (doprinosi pozitivno ili negativno analitičkom signalu bez interakcije sa komponentama reakcionog sistema).

Kinetičke metode su selektivnije od ravnotežnih, jer se zasnivaju na diferencijalnim, a ne apsolutnim merenjima. Zato izostaje interferencija signala od drugih komponenti uzorka sve dok one ne interaguju sa nekom komponentom sistema. Njihova veća selektivnost proizilazi iz dinamike procesa. Kratko vreme mešanja uzorka i reagenasa i činjenica da merenje počinje odmah nakon mešanja smanjuje efekat interferenata. Uticaj interferenata kod ravnotežnih metoda je znatno veći, što je posledica dugog vremena potrebnog za postizanje ravnoteže, u toku kog aktivni interferenti mogu reagovati sa jednom ili više komponenti sistema, uključujući i analit.

Tačnost i preciznost

Tačnost je širok pojam vezan za približnost merenja stvarne vrednosti merene veličine. Takođe je vezan i za nagib merne metode. Tačnost se može odrediti samo ako znamo pravu vrednost merene veličine. U protivnom, koristimo se poređenjem rezultata sa jednom ili više drugih analitičkih tehnika.

Tačnost kod kinetičkih metoda zavisi od pouzdanosti analitičke tehnike upotrebljene za merenje promene koncentracije u funkciji vremena i konstantnosti eksperimentalnih uslova.

Preciznost je mera usaglašenosti rezultata dobijenih iz više paralelnih određivanja iz istog uzorka pod istim uslovima. Definišu se tri nivoa:

1. ponovljivost - preciznost procenjena od strane jednog analitičara, na istim uzorcima, istoj aparaturi u kratkom vremenskom intervalu;

2. srednja preciznost - preciznost procenjena od strane više analitičara, na istoj aparaturi i u istoj laboratoriji u toku više dana;

3. reproduktivnost - preciznost procenjena od strane više analitičara, na različitim aparaturama i u različitim laboratorijama.

Razvoj instrumentalne i kompjuterske tehnologije približava kinetičke metode ravnotežnim u pogledu brzine, preciznosti i jednostavnosti. Međutim, kinetičke metode u velikoj meri zavise i od konstantnosti eksperimentalnih uslova. Metode zasnovane na reakcijama prvog reda su preciznije, pa se preciznost metode može znatno povećati podešavanjem eksperimentalnih podataka modelu prvog reda pomoću linearne regresije.

Preciznost merenja brzine reakcije zavisi od tri faktora:

- šuma praćenog signala,
- reproduktivnosti eksperimentalnih uslova i
- veličine greške uzrokovane sistemima za prikupljanje podataka u vremenu merenja.

Ovaj poslednji izvor greške se može zanemariti zahvaljujući dobroj instrumentaciji.

U cilju poboljšanja reproduktivnosti, a samim tim i tačnosti kinetičkih metoda analize, potrebna je stroga standardizacija eksperimentalnih uslova. Postoji niz faktora koji utiču (pored katalizatora) na brzinu reakcije, kao što su: temperatura, pH, jonska sila rastvora, primese u reagensima i vodi.

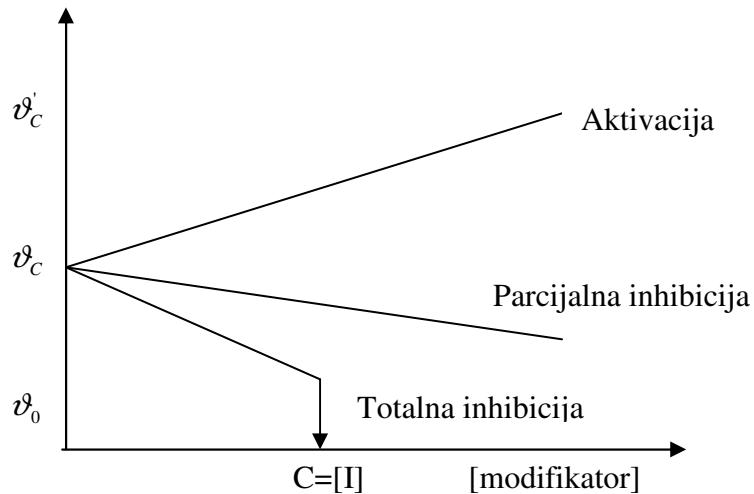
Relativna greška novijih kinetičkih metoda kreće se do 5 % pri granici detekcije katalizatora reda 10^{-9} g/cm³.

4.7. Aktivacija i inhibicija

Efekti koji modifikuju brzinu reakcije su od velikog teorijskog i praktičnog značaja. Obično su povezani sa homogenim katalitičkim reakcijama iako se mogu primeniti na nekatalitičke ili fotohemijske reakcije.

Brzina katalitičke reakcije, ϑ_c može biti pojačana ili smanjena (aktivirana ili inhibirana) dodavanjem određenih supstanci. Na slici 23 su prikazani fenomeni aktivacije i inhibicije koji predstavlja promenu brzine modifikovane reakcije ϑ'_c pri konstantnoj koncentracijom katalizatora c, u funkciji od koncentracije modifikovane supstance (aktivatora ili inhibitora).

Kao što se sa slike vidi, ova reakcija je potpuno inhibirana ukoliko je konstanta jednačine inhibitorne reakcije dovoljno velika, tako da je ova brzina jednak brzini nekatalitičke reakcije ϑ_c , za stehiometrijsku proporciju inhibitora (I) prema katalizatoru. Ukoliko konstanta inhibitorne reakcije nije tako velika ili je proizvod reakcije (bilo kompleksan ili precipitirajući) takođe aktivan do nekog nivoa, tada je osnovna reakcija samo delimično inhibirana.



Slika 23. Promene brzine katalitičke reakcije u funkciji od modifikatora

Fenomen inhibicije dopušta određivanje nekih supstanci koje se ponašaju kao inhibitori u katalitičkim reakcijama. Inhibitor reakcije se može odrediti imajući u vidu da je brzina inhibitorne reakcije proporcionalna koncentraciji inhibitora. Na slici 24 prikazani su razni aspekti upotrebe efekata za modifikovanje brzine katalitičke reakcije.

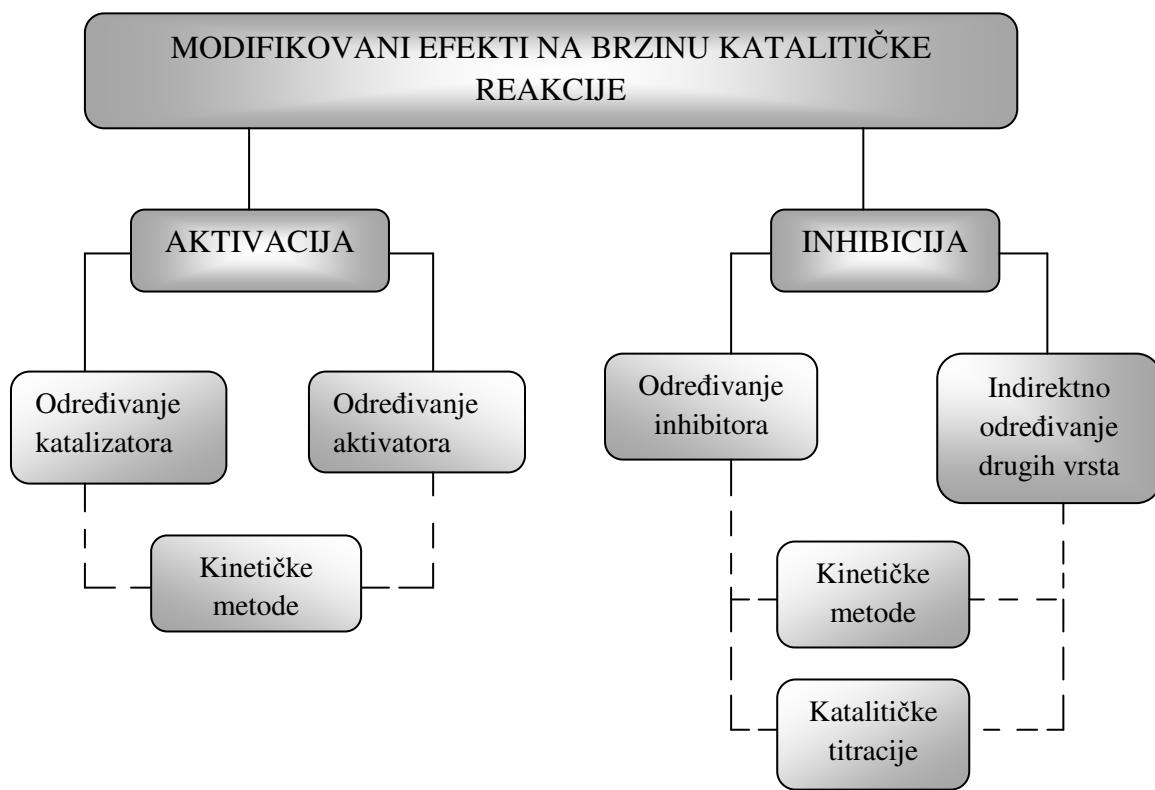
Inhibitorni ili aktivatorni efekti primenjuju se u enzimskim i ne-enzimskim procesima. U enzimskim reakcijama aktivacija ili inhibicija proističu iz prisustva metalnih jona koji se tako mogu odrediti na osnovu njihovog dejstva na katalitička svojstva enzima.

Brzina neenzimskih reakcija je obično modifikovana putem hidroksilnih, poliaminokarboksilnih i hromogenih liganada, od kojih se oni složeni koriste kao inhibitori ili aktivatori. Neorganski anjoni su inhibitori metal-katalitizerskih reakcija, dok se joni metala koriste pri inhibitorskim procesima koji uključuju anjon-katalizatorske reakcije.

Jednačina brzine katalitičke reakcije u prisustvu modifikatora je opšta jednačina koja opisuje ponašanje katalitičkih reakcija, uz dodatni pojam koji se odnosi na brzinu reakcije u prisustvu aktivatora ili inhibitora:

$$\vartheta = \frac{d[P]}{dt} = k' \cdot [C]_0 + k'_1 \pm k'' \cdot [M] \quad (36)$$

gde su k' i k'' konstante pseudo prvog reda u odnosu na katalizator i modifikator; k' uključuje stepen nekatalizovane reakcije a $[M]$ se odnosi na aktivator ili inhibitor u odnosu na to da li je oznaka poslednjeg pojma pozitivna ili negativna.



Slika 24. Efekti modifikatora na brzinu katalitičke reakcije

Određivanje kompleksnih jedinjenja pri niskim koncentracijama je dobilo na značaju u poslednjih nekoliko godina na osnovu njihove široke upotrebe u biološkim, medicinskim i industrijskim procesima. Ove vrste se mogu odrediti u trgovima na osnovu njihovog inhibitornog dejstva u reakcijama katalizovanim metalnim jonima.

Bilo koja vrsta koja interaguje sa katalizatorom u cilju smanjenja (parcijalna inhibicija) ili blokiranja (potpuna inhibicija) katalitičke aktivnosti, može se odrediti na osnovu njenog inhibitornog dejstva, ukoliko je ono proporcionalno njenoj koncentraciji.

Po pravilu, granice detekcije koje se postižu kinetičkim metodama su prilično dobre, iako se inhibitor obično može odrediti jedino putem malog obima koncentracije - zbog toga je upotreba katalitičke titracije u porastu.

Inhibicija se može primeniti na nekatalitičke reakcije. Dok mnoge kinetičke metode za određivanje inhibitora uključuju reakciju sa katalizatorom, gde inhibitor sprečava katalitički ciklus. Ipak inhibitor može imati inter-reakciju sa supstratom i umanjiti brzinu reakcije.

Inter-reakcija između inhibitora i katalizatora je obično formiranje složenih jedinjenja, a veoma retko redoks reakcija ili reakcija izmeštanja liganda.

4.7.1. Uticaj konstante formiranja na kompleks katalizator-inhibitor

Ako prepostavimo da je jedinjenje katalizator-inhibitor katalitički neaktivno, smanjenje katalitičke aktivnosti mora biti funkcija koncentracije inhibitora i konstante formiranja ovog jedinjenja je K_{IC} .

Inhibitor se može na zadovoljavajući način odrediti preko promene reda reakcije od 10 do 20 % u katalitičkoj koncentraciji, ukoliko ove promene rezultiraju znatnim varijacijama u merenom parametru, što zavisi od primenjene tehnike merenja. Za katalitičku koncentraciju $[C]_0$ od $4 \cdot 10^{-4}$ mol/dm³ i prepostavljeni formiranje od 1:1 jedinjenja sa inhibitorom, inhibitor će biti detektovan ukoliko je njegova inicijalna koncentracija $[I]_0$ veća od $4 \cdot 10^{-8}$ mol/dm³.

Sa druge strane ako prepostavimo da je 99 % inhibitora sjedinjeno sa katalizatorom, uslovna konstanta formiranja K'_{IC} trebalo bi da bude reda $3 \cdot 10^{-8}$ da bi inhibitor mogao da bude određen.

Ako inhibitor formira 1:1 jedinjenje sa katalizatorom i ako su oba u jednakoj koncentraciji, katalitička reakcija neće se odigrati (totalna inhibicija) za $K'_{IC} > 10^4 / [C]_0$. U ovom slučaju $K'_{IC} \approx 10^{11}$ za $[C]_0 \approx 10^{-7}$ mol/dm³.

Ove tvrdnje mogu se objasniti na sledeći način:

a) Ako je $K'_{IC} > 10^{11}$ inhibicija neće biti potpuna za $[C]_0 = [I]_0$.

Pri ovim uslovima kalibraciona kriva bi trebalo da pokazuje koncentracije inhibitora jednake ili niže od koncentracije katalizatora

b) Ukoliko je $K'_{IC} < 10^{11}$ inhibicija se neće izvršiti i po pravilu je $[I]_0 > [C]_0$.

Ovo je češći slučaj jer je određivanje inhibitora normalno manje osetljivo od određivanja katalizatora. U praksi, osetljivost raste sa porastom koncentracije katalizatora.

4.7.2. Analitičke upotrebe inhibitornog efekta

Baveći se analitičkiom primenom inhibitornog efekta, po prirodi se inhibitorno dejstvo može podeliti na kinetičko određivanje metalnih i nemetalnih jona.

Reakcije koje su katalizovane nemetalima su retke, tako da se za određivanje ovih jedinjenja koriste indirektne metode. Sa druge strane metal-katalizatorske reakcije su brojne. Kada na ovo dodamo sposobnost metala da formiraju stabilna kompleksna jedinjenja sa anjonima i organskim ligandima, jednostavno je odrediti ove nemetalne vrste.

Mnoge organske supstance mogu se određivati na bazi njihovog inhibitornog dejstva u reakcijama katalizovanim metalnim jonima (tabela 28).

Tabela 28. Kinetičko određivanje organskih supstanci kao inhibitora u katalitičkim reakcijama

Inhibitor	Sistem	Opseg koncentracije	Reference
1,10-fenantrolin	$\text{H}_2\text{O}_2/\text{Cu(II)}$	0,25-25 ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$)	Pantel i Weisz, 1977
NTA	$\text{IO}_4^-/\text{S}_2\text{O}_3^{2-}/\text{Cu(II)}$	$2,5 \cdot 10^{-7}$ - $2,5 \cdot 10^{-6}$ (mol/dm^3)	Nikolelis i Hadjioanou, 1977
EGTA	$\text{IO}_4^-/\text{S}_2\text{O}_3^{2-}/\text{Cu(II)}$	$1,5 \cdot 10^{-7}$ - $1,5 \cdot 10^{-6}$ (mol/dm^3)	Nikolelis i Hadjioanou, 1977
Tioglikolna kiselina	p-NDA/CN ⁻ /Hg(II)	$1,0 - 4,6 \cdot 10^{-7}$ (mol/dm^3)	Phull i Nigam, 1983
Limunska kiselina	2,4-Diaminofenol/ $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe(III)}$	0,04 - 0,30 ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$)	Vasilikiotis i sar., 1983

1,10-fenantrolin inhibira katalitičku aktivnost bakra u reakciji oksidacije hidrogen-peroksidom, dok dimetilglioksim inhibira katalitički efekat Co(II) u reakciji oksidacije *Alizarina S* sa H_2O_2 . Ova tehnika se takođe primenjuje za određivanje liganada koji sadrže sumpor, kao što su tiourea, ditiokarbamati, merkaptani, pesticidi i ugljendisulfidi od kojih svi sprečavaju katalitičku aktivnost p-fenetidin/perjodat sistema i mogu se odrediti pri koncentracijama reda $10 \text{ ng}/\text{cm}^3$.

Neke supstance od biološkog značaja takođe se mogu odrediti na osnovu njihovog inhibitornog efekta, kao što su amino kiseline (glicin, serin, fenilalanin, arginin), koje formiraju 1:1 složena kompleksna jedinjenja sa Cu(II) kao katalizatorom u reakciji oksidacije *Pirokatehola ljubičastog* hidrogen peroksidom. Ove amino kiseline se mogu odrediti na mikromolarnom nivou, iako je njihovo određivanje u većoj oblasti greške (između 5 i 9 %).

Korišćenje inhibitora dopušta ne samo njegovo određivanje, već i određivanje ne-katalizatorskih metala. Ovakva indirektna određivanja su bazirana na otkazivanju katalitičke aktivnosti kompeksiranja sa EDTA-om ili drugim inhibitorom i postepenim obnavljanjem veze sa metalom koji se određuje, a koji reaguje sa ligandom u cilju otpuštanja katalizatora.

Jednako je izvodljivo izmeriti brzinu reakcije koja odgovara datoj količini inhibitora prevazilazeći reakciju metala koji se određuje. U ovom slučaju, inhibitor-katalizator je složeno jedinjenje i može biti stabilnije od jedinjenja formiranog između inhibitora i metalnog jona.

4.8. Regresiona i korelaciona analiza

Regresiona i korelaciona analiza su statističke metodologije koje ispituju vezu između dve ili više statističkih promenljivih.

Regresiona analiza govori u kakvom odnosu stoji jedna promenljiva prema drugoj. Ona se izražava jednačinom u kojoj se poznata vrednost jedne ili više promenljivih koristi za izračunavanje nepoznatih vrednosti ostalih promenljivih. Najnedostavniji postupak regresione analize naziva se *metoda najmanjih kvadrata*. Regresiona analiza najčešće obuhvata dve promenljive, a ako je u pitanju više promenljivih ta tehnika se naziva multiplom regresijom.

Korelaciona analiza pokazuje stepen zavisnosti između promenljivih, pa se njome najčešće određuje da li ima smisla izračunavati jednu promenljivu na osnovu druge.

4.8.1. Regresiona analiza

Regresiona analiza se izvodi putem regresione jednačine:

$$y = mx + b \quad (37)$$

gde je b odsečak na ordinati (vrednost y kada je x jednako nuli), a m je nagib regresione linije. y je nepoznata promenljiva koja se izračunava na osnovu vrednosti poznate promenljive x .

Odnos promenljive y prema promenljivoj x može da bude različit. Ako se vrednost y povećava za svaku uvećanu vrednost x , onda je y direktno zavisna veličina u odnosu na x . U ovom slučaju je nagib regresione linije pozitivan, tako da je $m > 0$.

Suprotno ovome, nagib regresione linije može da bude negativan, kada je $m < 0$. U tom slučaju se vrednost y smanjuje za svaku uvećanu vrednost x . Ukoliko promenljiva y ne zavisi od promenljive x , regresiona linija je paralelna sa x -osom.

Pravac koji se dobije metodom najmanjih kvadrata minimizira zbir kvadrata svih pojedinačnih merenja od tog pravca. Kako bi se dobio pravac koji najbolje odgovara eksperimentalnim tačkama, ovom se metodom određuju standardna odstupanja za m i b .

Za izračunavanje regresione jednačine potreban je izvestan broj parova vrednosti za promenljive x i y .

Odstupanje zbiru kvadrata pojedinačnih vrednosti x i y od srednje vrednosti definiše se preko veličina S_{xx} , S_{yy} i S_{xy} :

$$S_{xx} = \sum (x_i - \bar{x})^2 = \sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{N} \quad (38)$$

$$S_{yy} = \sum (y_i - \bar{y})^2 = \sum y_i^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{N} \quad (39)$$

$$S_{xy} = \sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y}) = \sum x_i y_i - \frac{\sum x_i \sum y_i}{N} \quad (40)$$

gde su x_i , y_i pojedinačni parovi vrednosti za x i y , N je broj parova koji se upotrebljavaju za izradu regresione linije, a \bar{x} i \bar{y} su srednje vrednosti promenljivih x i y , odnosno

$$\bar{x} = \sum x_i / N, \text{ a } \bar{y} = \sum y_i / N$$

Iz veličina S_{xx} , S_{yy} i S_{xy} može se izvesti šest upotrebljivih veličina:

1. Nagib pravca, m :

$$m = S_{xy} / S_{xx} \quad (41)$$

2. Odsečak na ordinati, b :

$$b = \bar{y} - m\bar{x} \quad (42)$$

3. Standardna greška odstupanja od regresione linije, s_r :

$$s_r = \sqrt{\frac{S_{yy} - m^2 S_{xx}}{N - 2}} \quad (43)$$

4. Standardna greška nagiba, s_m :

$$s_m = \sqrt{s_r^2 / S_{xx}} \quad (44)$$

5. Standardna greška odsečka na ordinati, s_b :

$$s_b = s_r \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{N \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2}} = s_r \sqrt{\frac{1}{N - (\sum x_i)^2 / \sum x_i^2}} \quad (45)$$

6. Standardna greška odstupanja rezultata dobijenih iz regresione linije, s_c :

$$s_c = \frac{s_r}{m} \sqrt{\frac{1}{M} + \frac{1}{N} + \frac{(\bar{y}_c - \bar{y})^2}{m^2 S_{xx}}} \quad (46)$$

Jednačina (46) omogućuje izračunavanje standardnog odstupanja od sredine \bar{y}_c skupa M istovetnih analiza kada se koristi regresiona analiza koja sadrži N tačaka. \bar{y} je aritmetička sredina vrednosti y za N tačaka.

Standardna greška odstupanja od regresione linije, s_r (jed. 43) je standardno odstupanje od y kada se odstupanja ne mere od aritmetičke sredine y (kao što je to uobičajno), nego od izvedenog pravca:

$$s_r = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N [y_i - (b + mx_i)]^2}{N - 2}} \quad (47)$$

Broj stepena slobode je $N - 2$, jer se jedan stepen izgubi za izračunavanje m , a jedan za određivanje b .

Još tačnija vrednost promenljive može se izračunati *kompjuterskim programima za linearnu regresiju* kao što su *MS Excel* i *Micro Cal Origin*.

4.8.2. Korelaciona analiza

Kao što je već rečeno, regresionom analizom se dobija jednačina pomoću koje se jedna promenljiva izračunava iz druge promenljive, a korelaciona analiza pokazuje stepen zavisnosti između ove dve promenljive. Korelaciona analiza može da se koristi da bi se pokazalo na koji način regresiona linija objašnjava varijaciju u vrednosti zavisno promenljive, a ako je potrebno da se odredi samo stepen zavisnosti između promenljivih, a nije potrebno da se prouči i priroda te zavisnosti, moguće je koristiti samo korelacionu analizu bez regresione.

Stepen zavisnosti između promenljivih određuje veličina odstupanja podataka oko regresione linije, a izražava se *korelacionim koeficijentom, r*. Izračunava se iz izraza:

$$r = \frac{N \sum xy - \sum x \sum y}{\sqrt{[N \sum x^2 - (\sum x)^2]} \cdot \sqrt{[N \sum y^2 - (\sum y)^2]}} \quad (48)$$

i to direktno iz posmatranih vrednosti promenljivih bez prethodnog određivanja regresione prave.

Ako između dve promenljive postoji apsolutno slaganje, odnosno ako svi podaci leže na regresionoj liniji, korelacioni koeficijent je jednak 1; nasuprot ovome je slučaj kada između promenljivih nema zavisnosti, odnosno kada je korelacioni koeficijent jednak nuli.

Pri tome, potrebno je imati u vidu činjenicu da vrednost korelacionog koeficijenta zavisi od broja merenja (sa porastom broja eksperimentalnih tačaka raste njegova vrednost) i preciznosti merenja (kod nekih merenja dolazi do izražaja veliko odstupanje pojedinih tačaka od srednje vrednosti). Zbog toga je teško definisati njegovu vrednost koja bi se smatrala zadovoljavajućom. Poželjno je da ta vrednost bude veća od 0,90.

Korelacioni koeficijent može biti pozitivnog ili negativnog znaka. Ako je korelacioni koeficijent pozitivan, znači da između promenljivih x i y postoji direktna zavisnost, odnosno ako je negativan zavisnost je inverzna. Prema tome vrednosti za korelacioni koeficijent se kreću od -1 do +1. Znak korelacionog koeficijenta i nagib regresione linije moraju da se slažu.

U suštinskom pogledu za korelaciju sa kaže da je: vrlo visoka, visoka, znatna, neznatna i niska. O tome koje numeričke vrednosti odgovaraju ovakvom gradiranju ne postoje jedinstvena gledišta. Po nekim se korelacija smatra:

- vrlo visokom ako je $0,9 < |r| \leq 1$

- visokom ako je $0,7 < |r| \leq 0,9$
- znatnom ako je $0,5 < |r| \leq 0,7$
- neznatnom ako je $0,2 < |r| \leq 0,5$
- niskom ako je $0,0 < |r| \leq 0,2$

Razume se da gornja skala ima, uglavnom, karakter preporuke.

4.9. Hromatografija

Pod hromatografijom se danas podrazumeva skup analitičkih metoda za analizu uzorka, koji su po svojoj prirodi smeše komponenata, čija hemijska priroda može biti slična, ali i vrlo različita. Pod analizom ovakvih uzorka se do skora podrazumevalo samo razdvajanje uzorka-smeše na njene sastavne komponente, ali je uvođenje najsavremenijih tipova detektora proširilo osnovno značenje hromatografije. Danas hromatografske metode služe ne samo za pročišćavanje složenih uzorka, već i za delimičnu analizu razdvojenih komponenti smeše.

Naziv hromatografija potiče od grčke reči *hromos* – što znači boja i *grapheiri* – pisati. Sam pojam hromatografija datira još od početka 20. veka, kada je ruski naučnik Cveti proučavao zeleni alkoholni ekstrakt iz lista (Čobanov i Kocev, 1971). On usmeravao svoju pažnju na mogućnost adsorpcionog upijanja hlorofila od strane tkiva lista. Cveti je razdvojio hlorofil na dve komponente poznate kao hlorofil A i B na taj način što je u staklenoj cevi (koloni) napunjenoj čvrstim nosačem (kalcijum-karbonatom) na vrh kolone stavio alkoholni ekstrakt hlorofila, a zatim lagano ispirao kolonu petrol-etrom i tako započeo spiranje hlorofila. Prilikom ispiranja, pojedine komponente biljnog ekstrakta kretale su se kroz kolonu različitom brzinom i međusobno se razdvojile u obojene trake ili zone. Pokazalo se da je apsorpcija dva hlorofila različita u odnosu na čvrst nosač, tako da su se izdvojila dva sloja - dva hlorofila A i B. Pošto su razdvojene komponente bile obojene Cveti je ovu metodu nazvao hromatografija. Cveti opisuje i obrazlaže detaljno metod kojem daje naziv hromatografska analiza: „Slično sunčevim zracima u spektru različitih komponenti složenog obojivača raspoređuju se zakonomerno jedan preko drugog na stubu upijača i postaju dostupni za kvalitativno i kvantitativno određivanje.“

Cveti pravilno ocenjuje značaj metoda odvajanja i analize ne samo obojenih, već i bezbojnih materija.

Trebalo je da prođe dosta vremena da bi se shvatili značaj i mogućnosti otkrivene metode odvajanja.

Hromatografske metode spadaju u fizičko - hemijske metode analize, poput spektroskopskih metoda (ultravioletne UV, infracrvene IC, masene MS, nuklearne magnetne rezonance NMR) ili raznih standardnih instrumentalnih metoda (polarimetrija, refraktometrija).

Krajem tridesetih godina prošlog veka razvijena je tankoslojna hromatografija, a 1941. godine Marin i Synge dobili su Nobelovu nagradu za rade iz oblasti hromatografije. Njihov fundamentalni rad postavio je osnove za razvoj tečne, gasne i papirne hromatografije. Prvi rad iz gasne hromatografije publikovan je 1952 (Martin i James), zatim se ova metoda razvila u veoma moćnu analitičku tehniku. Tečna hromatografija se razvila šezdesetih godina prošlog veka, da bi se danas izjednačila sa gasnom hromatografijom.

Princip hromatografskog razdvajanja smeše zasniva se na razlikama u raspodeli pojedinih komponenata smeše između pokretne i nepokretnе faze. Sama raspodela posledica je raznih fizičko-hemijskih procesa kao što su adsorpcija, desorpcija, apsorpcija, podela između dva rastvarača i jonska izmena.

Danas se prema agregatnom stanju pokretne faze, hromatografija u osnovi deli na tečnu i gasnu hromatografiju.

Tečna hromatografija obuhvata:

- hromatografiju na hartiji
- hromatografiju na tankom sloju
- tečnu hromatografiju na koloni
- tečnu hromatografiju pod visokim pritiskom.

Hromatografski sistemi i tehnike kao fizičko-hemijski procesi na kojima se zasniva razdvajanje dati su u tabeli 29.

Tabela 29 . Hromatografski sistemi i tehnike

Pokretna faza	Nepokretna faza	Tehnike	Fizičko-hemijski procesi
Gasna	Čvrsta	Hromatografija gasne faze u koloni i kapilarnoj koloni	Adsorpcija
Gasna	Tečna	Hromatografija gasne faze u koloni i kapilarnoj koloni	Podela, reverzno-fazna podela
Tečna	Čvrsta	Kolona, hromatografija na tankom sloju i na hartiji	Adsorpcija, jonska izmena, gel filtracija
Tečna	Tečna	Kolona, hromatografija na tankom sloju i na hartiji	Podela, reverzno-fazna podela

U zavisnosti od prirode supstance zavisi i koji će se sistem primeniti za razdvajanje smeše. Veoma je teško tačno odrediti koji sistem treba primeniti. Koji tip hromatografije će se koristiti za neki sistem prikazano je u tabeli 30.

Tabela 30. Vrsta hromatografije za razdvajanje smeše

Razdvajanje supstanci	Vrsta hromatografije
Gasovi i isparljive supstance	Hromatografija u gasnoj fazi
Supstance sličnog hemijskog sastava	Podeona hromatografija i reverzno-fazna podeona hromatografija
Supstance različitog hemijskog sastava	Adsorpciona hromatografija
Neorganske i jonske supstance	Jonska izmena, hromatografija na tankom sloju i na hartiji
Jonske i nejonske supstance	Jonska izmena i gel hromatografija
Biološki materijali i jedinjenja velike molekulske mase	Gel hromatografija

4.9.1. HPLC hromatografija

Skraćenica HPLC podrazumeva dva tumačenja: tečna hromatografija pod viskom pritiskom (High Pressure Liquid Chromatography), kao i tečna hromatografija visokih mogućnosti (High Performance Liquid Chromatography). Oba tumačenja su tačna. Naime, HPLC se razlikuje od ostalih tečnih hromatografija (Liquid Chromatography LC) po tome što mobilna, tečna faza funkcioniše pod visokim pritiskom, a s druge strane, upravo ta činjenica je osnov visokih mogućnosti ove hromatografije. Visoki pritisak omogućava kontinuiran protok mobilne faze i uspostavljanje „kvalitetne“ dinamičke ravnoteže sa stacionarnom fazom, koja je uslov dobre selektivne raspodele komponenti datog uzorka (Marković i sar., 1997).

HPLC hromatografija je doživela nagli uspon u poslednjih dvadeset do trideset godina i sa sigurnošću se može reći da predstavlja vodeću istraživačku tehniku, i to ne samo među podeonim hromatografijama nego i u svim hromatografijama uopšte. Ona je nastala kao potreba jednog trenutka, a to je da se pronađe jedna moćna metoda koja će uspešno razdvajati i kvalitativno i kvantitativno biološki važne molekule u odnosu na šta je upotreba drugih hromatografija pokazala puno nedostataka.

HPLC hromatografija uglavnom rešava većinu problema vezanih za razdvajanje velikih bioloških molekula. U ovoj metodi se koristi tehnika eluiranja, prilikom koje pokretna faza konstantnom brzinom protiče kroz cev - kolonu noseći smešu koja se razdvaja i dovodeći u dodir sa nepokretnom fazom koja se nalazi u koloni.

U zavisnosti od svoje hemijske strukture, sastojci smeše pokazuju veću ili manju sklonost da se zadržavaju na nepokretnoj fazi, tako da provode različito vreme u koloni. Posle toga sledi njihova detekcija u obliku električnog signala (pomoću odgovarajućeg detektora), pri čemu se dobija hromatogram-kriva zavisnosti jačine signala od vremena.

Površina zavisnosti direktno je zavisna od koncentracije jedinjenja, a njegov položaj na hromatogramu - vreme zadržavanja, određen je fizičko hemijskim svojstvima jedinjenja.

Na osnovu hromatograma može se saznati sledeće:

- koliko komponenata sadrži analizirana smeša (na osnovu broja signala)
- kolike su koncentracije pojedinih sastojaka (kvantitativno na osnovu relativne površine signala)
- koja su jedinjenja prisutna (kvalitativna analiza na osnovu vremena zadržavanja t_r)

Karakteristike hromatografske analize su:

- kratko trajanje (od nekoliko minuta do nekoliko desetina minuta)
- velika osetljivost detektora (10^{-9} do 10^{-14} g)
- jednostavnost rukovanja i jednostavna interpretacija hromatograma.

Kvalitativna HPLC analiza

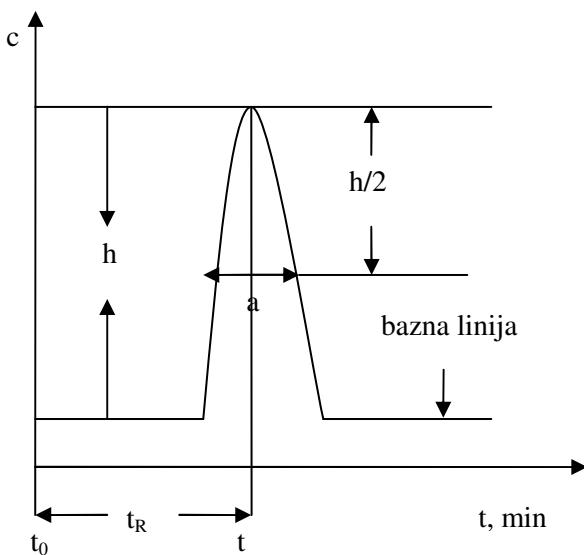
Hromatogram sa pikovima koji je dobijen predstavlja izdvojene komponente koje ukazuju samo na broj komponenti u nekom uzorku, odnosno smeši, ali ništa ne kazuje o vrsti supstance. Kvalitativna analiza podrazumeva identifikaciju koja se vrši poređenjem standarda sa nepoznatom komponentom ispitivanog uzorka. Upoređuje se vreme zadržavanja standarda izdvojene komponente u hromatografskoj koloni, to jedino i ima fizički smisao, jer se vrši merenje vremena od ulaska uzorka u kolonu do dostizanja maksimuma pika izdvojene komponente. Retencionalno vreme (*retenci* - zadržavanje) je vreme koje se meri od trenutka kada se uzorak ubaci u kolonu do izlaska, jedne ili više komponenti iz kolone. Kada se identificuje komponenta tada se metodom standardnog dodatka, odnosno dodatkom određene količine standarda u ispitivanom uzorku, sa apsolutnom sigurnošću identificuje određena komponenta, pod uslovom da se standardni dodatak i izdvojena komponenta po retencionom vremenu potpuno poklapaju. To se utvrđuje na osnovu povećanja visine pika izdvojene komponente.

Kvantitativna HPLC analiza

Kod ove metode visina pika ili tačnije površina ispod pika, izdvojene komponente direktno je proporcionalna koncentraciji (slika 25). Kada se radi o simetričnom piku tada se najčešće koristi metoda poluvisine. Kada se visina pika h pomnoži sa njegovom širinom a na poluvisini $h/2$ dobije se vrednost koja približno predstavlja 94% površine ispod pika. Ako se ista metoda koristi i za standard i za uzorak greška od 6% se poništava, a dobijeni rezultati potpuno zadovoljavaju.

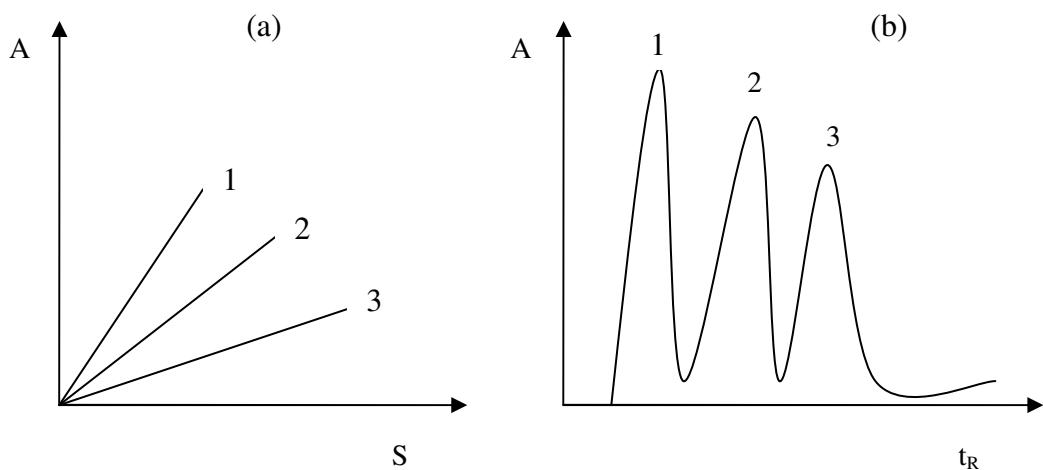
Treba voditi računa da izračunate površine pikova predstavljaju meru relativnih koncentracija u smeši. Ukoliko se žele apsolutne koncentracije komponenata potrebno je napraviti kalibracioni dijagram koji će povezati površine pikova sa apsorbancijama odgovarajućih komponenti. Osnov za povezivanje je kalibracioni dijagram $A = f(S)$, prikazan na slici 26 gde je A - apsorbancija, a S - integrisana površina pikova. Apsorbance A su određene za niz standardnih koncentracija rastvora supstanci, koje se analiziraju HPLC-om. Kada se nakon izvršene HPLC analize odredi integrisana površina za dati pik, sa kalibracionog dijagrama pročita se odgovarajuća vrednost

apsorbancije A na ordinati, a odatle se preko Beer-ovog zakona ($A = abc$) izračuna i tačna koncentracija.



Slika 25. Kvantitativna HPLC analiza

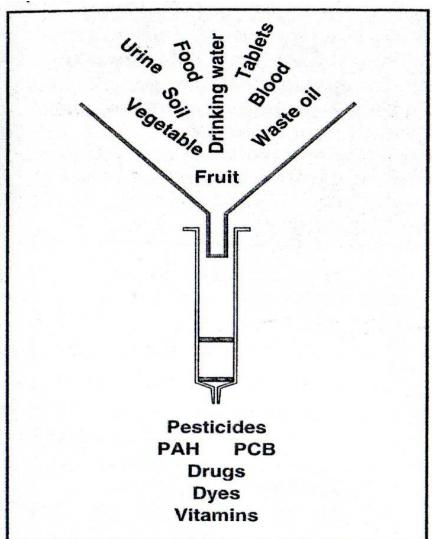
Nekada je potrebno pored određivanja tačne koncentracije komponenti u uzorku i njihova kvantitativna kolekcija (skupljanje). Tada se koriste preparativne kolone, znatno šireg prečnika (i do 1 cm) posebno konstruisane za visoki pritisak. Kolekcija se vrši prostim skupljanjem odgovarajućih frakcija mobilne faze koje sadrže datu komponentu. Početak i kraj kolekcije se vezuje za momente pojavljivanja i nestajanja odgovarajućeg pika na hromatogramu.



Slika 26. Kalibracioni dijagram (a) i hromatogram (b) za tri komponente date smeše, gde je A – apsorbancija, S – površina pika, t_R – retenciono vreme

4.10. Solid - Phase Ekstrakcija (SPE)

Solid phase ekstrakcija (SPE) je jedna značajana metoda kod pripremanja uzorka, i koriste ga mnogi hromatografi današnjice. On ima mogućnosti širokog spektra primene, kao što su analize životnog okruženja, farmaceutske i biohemijске analize, analize hrane i organske hemije.



Slika 27. Izgled kolone (ketridža) za SPE

Prednosti SPE u poređenju sa klasičnim tečno-tečnim ekstrakcijama su upotreba male količine rastvarača, velika ušteda vremena i veliki potencijal automatizacije. Uz to, zadatak pripreme uzorka se često može rešiti upravo korišćenjem SPE, jer su moguće različite interakcije analita sa čvrstom fazom (adsorbensom), a sama metoda se može optimizovati prilagodjavanjem hromatografskih uslova.

SPE nudi mnoštvo adsorbenasa za polarne, hidrofobne ili jonske interakcije, dok je tečno-tečna ekstrakcija ograničena na podelu ravnoteža u tečnoj fazi. **Chromabond** bočice i **Chromafix** ketridži od proizvodača Macherey-Nagel (Nemačka), koji su specijalno namenjeni za SPE, obezbeđuju brže, ekonomičnije i efikasnije sisteme kod pripreme uzorka. Mogu se koristiti za pripremanje uzorka za HPLC (hromatografija pod visokim pritiskom), GC (gasna hromatografija), TLC (tankoslojna hromatografija), UV ili IR spektroskopiju.

Za hromatografske analize velike osetljivosti, osnovno je dobro pripremiti uzorak, jer to štiti hromatografske kolone, a uklanjanjem interferentnih komponenti matriksa postiže se veća osetljivost. Pripremanje jednog specifičnog i selektivnog uzorka je stoga preduslov za jasne, ekonomične i osetljive analize. Glavni ciljevi SPE-e su:

- uklanjanje interferentnih komponenti sa matriksa
- selektivne koncentracije
- izolacije analita.

Često je ovaj korak neophodan, kako bi se dostigla koncentraciona granica detekcije za određivane analite kod kvalitativnih i kvantitativnih analiza, tj. bez obogaćenja često nije moguća analiza u tragovima.

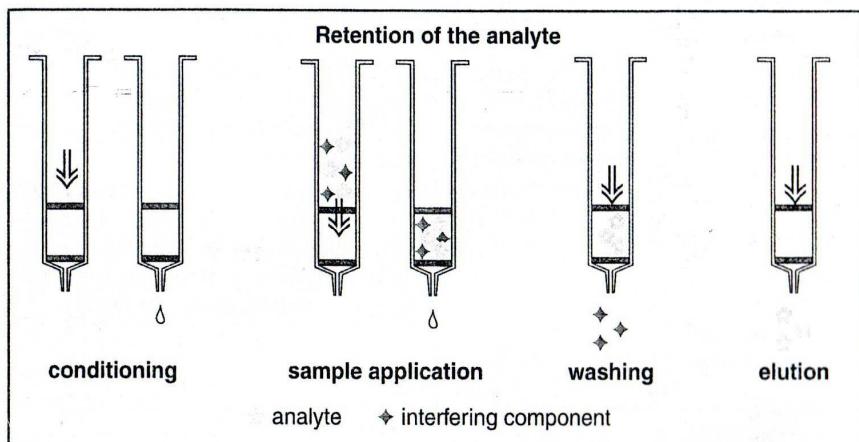
Da bi se dostigao visoki kvalitet Chromabond kolona i Chromafix ketridža, kao i da bi se postigli reproduktivni rezultati ekstrakcije, Chromabond adsorbensi podležu definisanim i strogim kriterijumima kontrole. Kvalitet kontrole početnih materijala, preko svih intermedijarnih koraka, do finalnog proizvoda garantuje trajni kvalitet.

Uopšteno govoreći, SPE se može koristiti za tri veoma važne namene kod savremenih analiza:

- određivanje koncentracije analita
- uklanjanje interferentnih supstanci
- promene matriksa analita, što je potrebno za analize koje slede.

U mnogim slučajevima, sva tri efekta se odigravaju istovremeno.

Analiti mogu biti ili adsorbovani na materijalu za SPE dok interferentne supstance protiču i obrnuto. Najčešće dolazi do dve generalne procedure razdvajanja. Prvi slučaj je prikazan na slici 28.

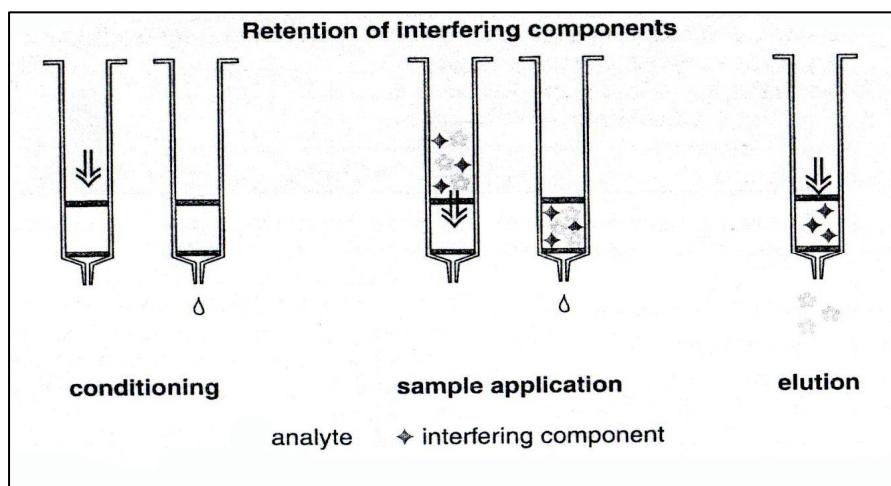


Slika 28. Zadržavanje analita na koloni za SPE ekstrakciju

Uzorak je propušten kroz čvrstu fazu, a molekuli analita su obogaćeni na adsorbensu. Interferentne komponente i molekuli rastvarača (matriks) se ne zadržavaju. Zatim se zaostale interferentne komponente odgovarajućim rastvorom ispiraju sa adsorbensa. Na kraju se analit uklanja eluiranjem pomoću odgovarajućeg rastvarača.

Navedene tvrdnje, ukazuju da optimalni SPE dovodi do slabog kolumnohromatografskog odvajanja. Ako se u hromatografiji supstance nalaze na prednjoj strani razredjivača, ili ako se supstance adsorbuju na vrhu kolone, nije moguće postići efikasnu hromatografiju koja koristi samo jedan eluent. Ova pojava se naziva "digitalna hromatografija".

U nekim slučajevima, druge interferentne komponente mogu da se zadrže na adsorbensu. Tako snažna adsorbcija interferentnih komponenti nudi drugu mogućnost prečišćavanja teških matriksa, kao što su otpadna ulja ili mulj. Ako analiti ne pokažu interakciju sa adsorbensom, i ako se samo interferentne komponente zadrže, može se primeniti čvrsta faza radi jednostavnog "filtriranja" uzorka, kao što je prikazano na slici 29.



Slika 29. Zadržavanje ometajućih supstanci na koloni za SPE ekstrakciju

Adsorbovana supstanca se može ukloniti sa adsorbenta eluiranjem rastvaračem veće snage (tehnika step gradijenta). Medutim, ova metoda se može efikasno iskoristiti za preraspodelu grupa jedinjenja ili pojedinačnog analita na matriksu. Intenzivno se koristi za čišćenje kod SPE.

Nepolarne interakcije se odigravaju između ugljovodoničnih komponenti funkcionalnih grupa adsorbensa i analita. Imajući u vidu da većina organskih jedinjenja imaju nepolarnu strukturu, oni mogu biti adsorbovani od nepolarnih adsorbenasa uz pomoć Van-der-Waals-ovih sila.

Skoro sva organska jedinjenja imaju određeni potencijal za nepolarne interakcije. Izuzeci su jedinjenja koja imaju veliki broj polarnih ili čak jonskih grupa, koje okružuju nepolarni deo skeleta ugljenika (ugljeni hidrati).

Sa druge strane, nemodifikovani silicijum dioksid ne pokazuje nikakve nepolarne interakcije. S obzirom da su funkcionalne grupe većine modifikovanih silicijum dioksida vezane za površinu silicijum dioksida ugljovodonikom, ove modifikovane varijante pokazuju izvestan stepen nepolarnih interakcija.

Tipični adsorbensi nepolarnog karaktera su na pr. C₁₈ ec, C₁₈, C₁₈ Hydra i C₈ modifikovani silicijum dioksid. Njih karakteriše primetno niska selektivnost, jer njihove funkcionalne grupe, alkilni supstituenti, mogu da reaguju sa skoro svim nepolarnim analitima. Ovo se može koristiti za izolaciju grupa supstanci različitih struktura.

Polarne interakcije uključuju vodonične veze, dipol-dipol i $\pi - \pi$ interakcije, do kojih može doći izmedju različitih adsorbenasa i funkcionalnih grupa analita. Neke od

ovih interakcija su moguće između amino, hidroksilnih i karbonilnih grupa aromatičnih prstenova, dvogubih veza i grupa sa hetero-atomima, kao što je slučaj kod azota, sumpura, fosfora i kiseonika. Tipični adsorbensi za polarne interakcije su nemodifikovani silicijum dioksid, CN, NH₂ i OH (diol) modifikovani silicijum dioksid.

Polarna jedinjenja se lako adsorbuju na polarnim adsorbensima iz nekog nepolarnog okruženja i eluiraju se jednim polarnim rastvaračem. Suprotno važi za nepolarna jedinjenja. Ona se jednostavno adsorbuju iz jedne polarne sredine na nepolarne površine. Eluiranje se postiže rastvaračima manje polarnosti.

Jonske interakcije se javljaju izmedju nanelektrisanih analita i jednog adsorbensa sa jednom funkcionalnom grupom suprotnog nanelektrisanja. Katjonske grupe su prisutne kod primarnih, sekundarnih, tercijalnih i kvaternarnih amina i neorganskih katjona, npr. kalcijuma, natrijuma, magnezijuma itd. Primeri neorganskih grupa su karboksilne i sumporne kiseline, fosfati i slične grupe. Razdvajanje koje se događa putem interakcije razmene jona je pojačano na matriksu niske jonske snage i suprotnog jona niske selektivnosti (npr. acetat, Na⁺). Za eluiranje je prioritetan rastvarač visoke jonske snage i visoke selektivnosti (npr. citrat ili Ca²⁺).

Selektivnost i kapacitet SPE

Selektivnost je sposobnost adsorbensa da "napravi" razliku izmedju analita i ostalih komponenti uzorka. Uopšteno govoreći, to opisuje sposobnost čvrste faze da adsorbuje analit, dok se nepoželjne komponente ne zadržavaju.

Selektivnost zavisi od hemijske strukture analita, karakteristika adsorbensa, sastava matriksa uzorka i korišćenog eluenta. Optimalna selektivnost se postiže funkcionalnim grupama analita, koje nisu prisutne u matriksu uzorka i ostalim interferentnim komponentama.

Kapacitet jednog adsorbensa se definiše kao ukupna količina jednog analita, koja je adsorbovana od poznate količine adsorbensa u optimalnim uslovima. Za razmenjivače jona, kapacitet se obično daje u miliekvivalentima po gramu (meq/g). Za ostale silicijum dioksid adsorbense, vrednosti kapaciteta su oko 3 - 5 % od količine adsorbensa. Polistiren-divinilbenzen, baziran na adsorbentnim smolama HR-P i Easy Feature ima izrazito visok kapacitet od 30%. Stoga, ako su kapacitet i količina analita poznati, možemo odrediti potrebnu količinu adsorbensa.

Za ekstrakciju čvrste faze MN nudi adsorbense koji su bazirani na polimernim smolama (Easy, HR-P), materijalima sa modifikovanim površinama silicijum dioksida kao i florisolu, poliamidu i aluminijum oksidu. Specijalne faze za utvrđene aplikacije u farmaceutskim, analizama životne sredine i hromatografije jona kompletiraju program.

Silicijum dioksidi sa modifikovanom površinom su stabilni u pH opsegu od oko 2 do 8. Međutim, u praksi kertridži se često koriste u širem pH opsegu.

Modifikovani silicijum dioksidi su stabilni kod skoro svih organskih rastvarača. To su teški materijali, i oni ne pokazuju ni oticanje ni skupljanje, suprotno poliamidu i adsorbentnim smolama HR-P i Easy.

Tabela 31. Tipični rastvarači za Solid - Phase ekstrakciju

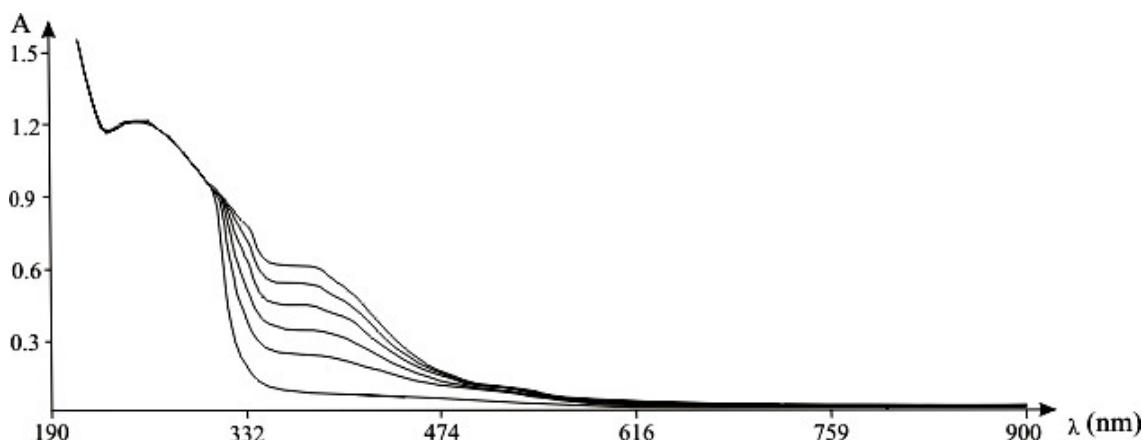
Polarnost rastvarača	Rastvarač	Mešanje sa vodom
Nepolarni	Heksan	ne
	Izooktan	ne
	Petroleumetar	ne
	Cikloheksan	ne
	Ugljen-tetrahlorid	ne
	Hloroform	ne
	Metilen hlorid	ne
	Tetrahidrofuran	da
	Dietiletar	da
	Etil-acetat	da
	Aceton	da
	Acetonitril	da
	Izopropanol	da
	Metanol	da
	Voda	da
Polarni	Acetilna kiselina	da

Preporučeni rastvarači za eluiranje treba da budu samo inicijalni izbor. Primena drugih rastvarača ili njihovih kombinacija se određuje polaritetom koji je neophodan za razdvajanje.

5. REZULTATI I DISKUSIJA

5.1. Kinetičko određivanje mikrokoličina diflubenzurona

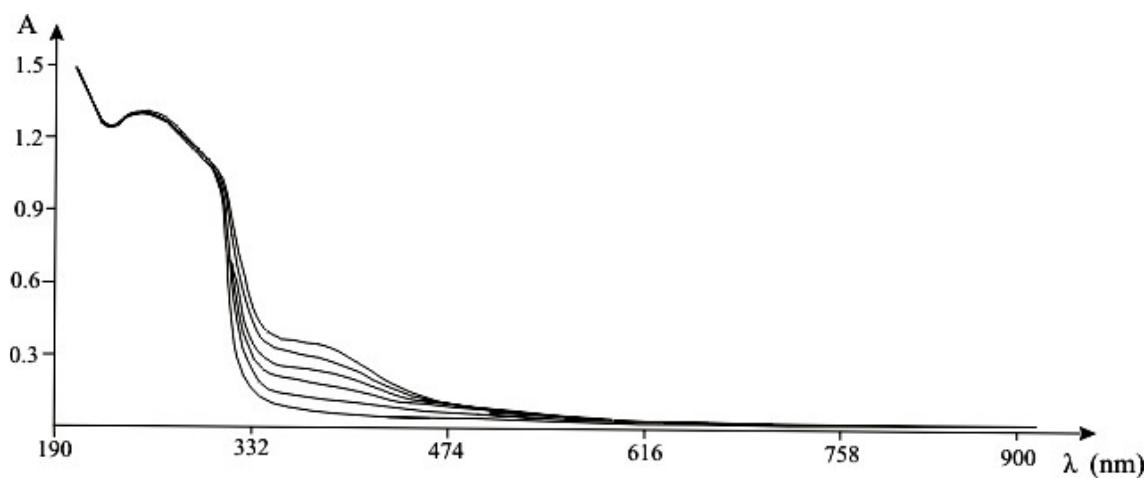
Kinetičko-spektrofotometrijska metoda za određivanje diflubenzurona, bromacila, difenzokvat-metil sulfata, bromfenoksima i ancimidola zasnovana je na indikatorskoj reakciji koji su predložili Alexeiev i saradnici (1976).



Slika 30. Apsorpcioni spektar tokom vremena od 6 minuta u sistemu: fosfatni pufer pH = 7,8; $c(H_2O_2) = 0,2 \text{ mol}/dm^3$; $c(SA) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol}/dm^3$; $c(Cu^{2+}) = 8 \cdot 10^{-6} \text{ mol}/dm^3$; $t = 25,0 \pm 0,1 \text{ } ^\circ\text{C}$.

Indikatorska reakcija se bazira na oksidaciji sulfanilne kiseline vodonik-peroksidom u fosfatnom puferu. Oni su pomenuto metodu koristili za određivanje Cu^{2+} jona, jer oni pokazuju katalitičko dejstvo u pomenutoj reakciji.

Za određivanje pomenutih pesticida uslovi su modifikovani i prilagođeni novoj reakciji.



Slika 31. Apsorpcioni spektar tokom vremena od 6 minuta u sistemu: fosfatni pufer pH = 7,8; $c(H_2O_2) = 0,2 \text{ mol}/dm^3$; $c(SA) = 6 \cdot 10^{-4} \text{ mol}/dm^3$; $c(Cu^{2+}) = 4 \cdot 10^{-6} \text{ mol}/dm^3$; $c(DFB) = 18,64 \mu\text{g}/cm^3$; $t = 25,0 \pm 0,1 \text{ } ^\circ\text{C}$.

Kinetičko-spektrofotometrijska metoda za određivanje mikrogramskih količina diflubenzurona (DFB) u rastvoru zasniva se na njegovom inhibitornom delovanju u

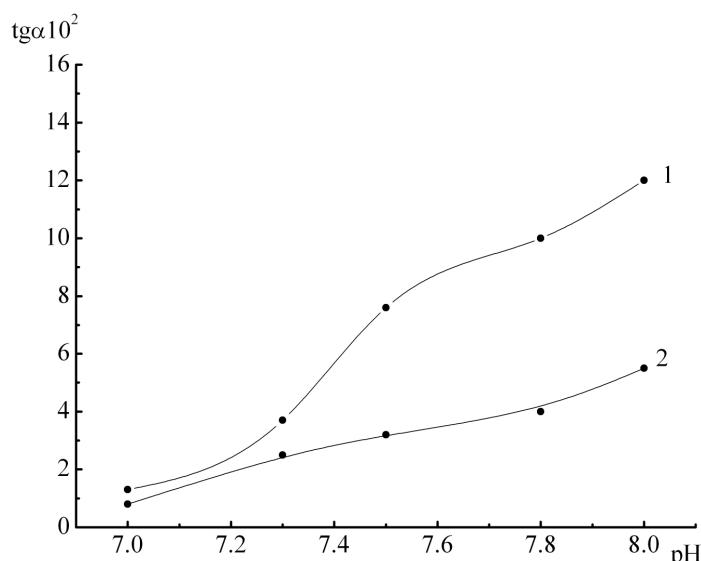
reakciji oksidacije sulfanilne kiseline vodonik peroksidom u fosfatnom puferu u prisustvu Cu^{2+} jona.

Spektrofotometrijskim praćenjem promene apsorbance sa vremenom u sistemu koji sadrži sulfanilnu kiselinu, vodonik peroksid, fosfatni pufer i Cu^{2+} jone, uočeno je linearno povećanje apsorbance tokom vremena na talasnoj dužini 370 nm (slika 30).

Dodatkom malih količina DFB, u sistemu dolazi do značajnog smanjenja brzine reakcije (slika 31).

Za obradu kinetičkih podataka primenjena je tangensna metoda, zbog linearne zavisnosti apsorbance u rastvoru tokom prvih 5-6 minuta od početka odigravanja reakcije.

U cilju razrade što osetljivije metode za određivanje mikrogramskih količina DFB, bilo je potrebno odrediti optimalne uslove odigravanja reakcije. U tu svrhu praćena je promena brzine katalitičke i katalitičko-inhibitorne reakcije od koncentracije svakog reaktanta pojedinačno (H_3O^+ -jona, H_2O_2 , SA, Cu^{2+}).



Slika 32. Zavisnost brzine katalitičke (1) i katalitičko-inhibitorne (2) reakcije od pH u sistemu: $c(\text{SA}) = 8 \cdot 10^{-3} \text{ mol}/\text{dm}^3$; $c(\text{H}_2\text{O}_2) = 0,2 \text{ mol}/\text{dm}^3$; $c(\text{Cu}^{2+}) = 8 \cdot 10^{-6} \text{ mol}/\text{dm}^3$; $c(\text{DFB}) = 18,64 \mu\text{g}/\text{cm}^3$; $t = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

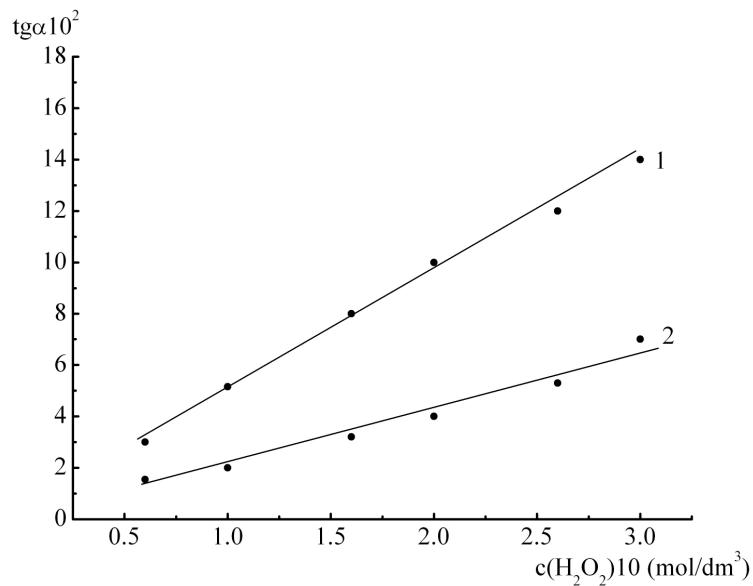
Grafička zavisnost $\text{tg}\alpha$ za katalitičku i katalitičko-inhibitornu reakciju od pH data je na slici 32.

Sa slike 32 se vidi da razlika u brzini između katalitičke i katalitičko-inhibitorne reakcije raste sa povećanjem pH i da je najveća razlika u brzini pri pH fosfatnog pufera 7,8, tako da je ova pH vrednost odabrana za dalja ispitivanja.

Sa slike 32 se vidi da su zavisnosti brzine obe reakcije linearne u celom ispitivanom intervalu pH, tako da je red katalitičke i katalitičko-inhibitorne reakcije u odnosu na koncentraciju $[\text{H}_3\text{O}^+]$ jona -1.

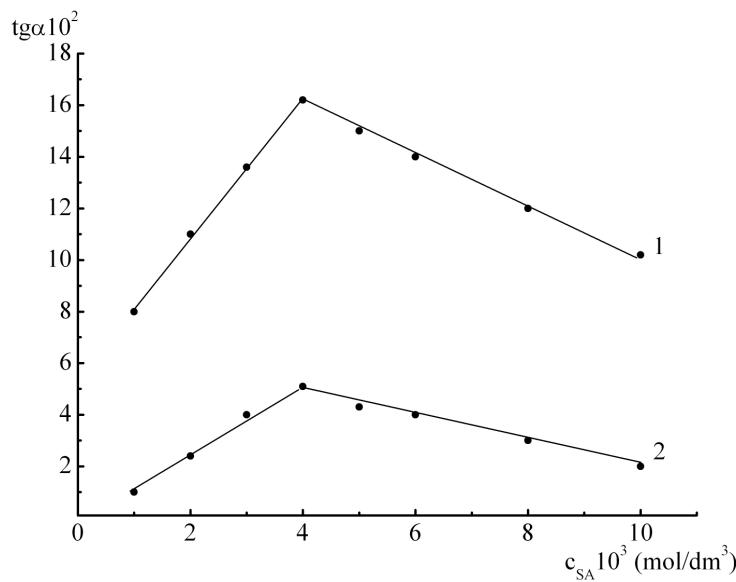
U cilju određivanja optimalnih uslova odigravanja reakcije, ispitana je uticaj koncentracije H_2O_2 na brzinu katalitičke i katalitičko-inhibitorne reakcije.

Grafička zavisnost $\text{tg}\alpha$ za katalitičku i katalitičko-inhibitornu reakciju od koncentracije vodonik peroksida data je na slici 33.



Slika 33. Zavisnost brzine katalitičke (1) i katalitičko-inhibitorne (2) reakcije od H_2O_2 u sistemu: $p\text{H} = 7,8$; $c(\text{SA}) = 8 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$; $c(\text{Cu}^{2+}) = 8 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$; $c(\text{DFB}) = 18,64 \mu\text{g/cm}^3$; $t = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Na slici 33 se zapaža da su brzine katalitičke i katalitičko-inhibitorne reakcije linearne u celom ispitivanom intervalu koncentracija vodonik peroksida, tako da su obe reakcije +1 reda. Za dalji rad odabrana je koncentracija H_2O_2 od $0,2 \text{ mol/dm}^3$ i u daljem ispitivanju održavana konstantnom.

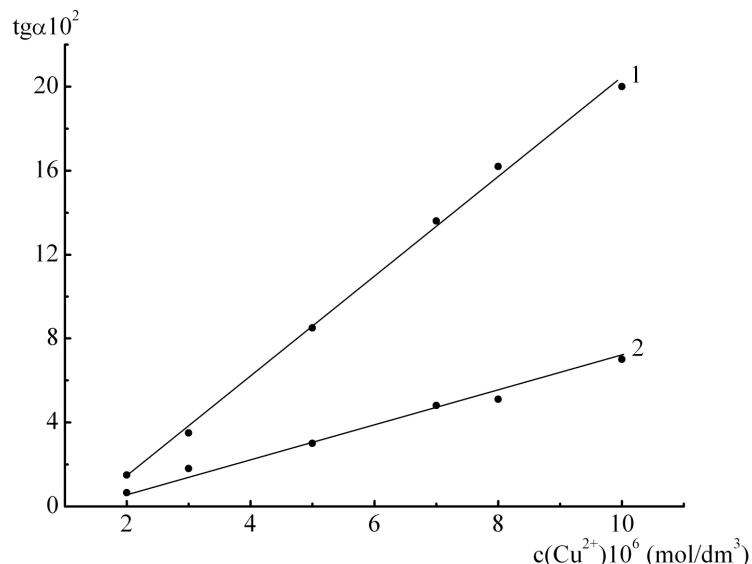


Slika 34. Zavisnost brzine katalitičke (1) i katalitičko-inhibitorne (2) reakcije od koncentracije sulfanilne kiseline u sistemu: $p\text{H} = 7,8$; $c(\text{H}_2\text{O}_2) = 0,2 \text{ mol/dm}^3$; $c(\text{Cu}^{2+}) = 8 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$; $c(\text{DFB}) = 18,64 \mu\text{g/cm}^3$; $t = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Ispitivanjem uticaja koncentracije sulfanilne kiseline na brzinu katalitičke i katalitičko-inhibitorne reakcije vidi se da je maksimalna razlika u brzinama reakcija pri koncentraciji sulfanilne kiseline $4 \cdot 10^{-3}$ mol/dm 3 , tako da je ova koncentracija odabrana kao optimalna i u daljem radu je održavana konstantnom. Ova zavisnost prikazana je na slici 34.

Sa slike 34 se vidi da su katalitička i katalitičko-inhibitorna reakcija +1 reda u intervalu koncentracija sulfanilne kiseline od $1 \cdot 10^{-3}$ do $4 \cdot 10^{-3}$ mol/dm 3 , a -1 reda pri većim koncentracijama.

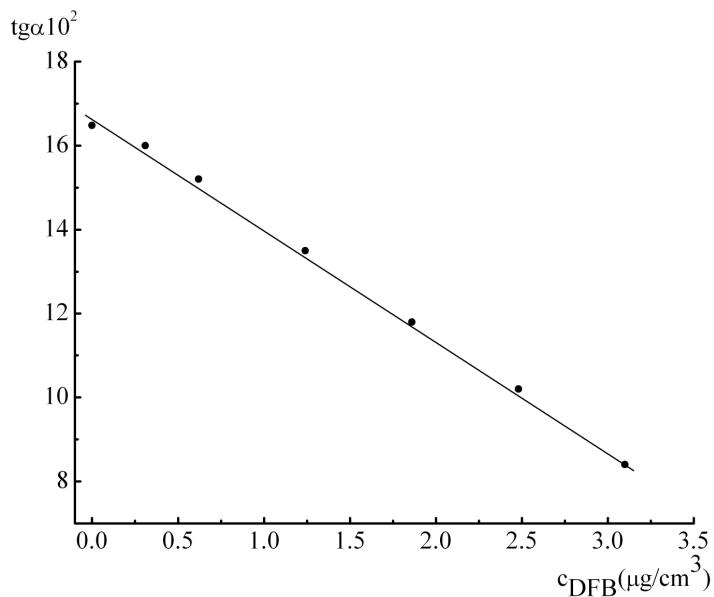
Takođe je ispitivan uticaj koncentracije Cu(II) jona na brzinu katalitičke i katalitičko-inhibitorne reakcije (slika 35).



Slika 35. Zavisnost brzine katalitičke (1) i katalitičko-inhibitorne (2) reakcije od koncentracije Cu²⁺ jona u sistemu: pH = 7,8; c(H₂O₂) = 0,2 mol/dm 3 ; c(SA) = $4 \cdot 10^{-3}$ mol/dm 3 ; c(DFB) = 18,64 µg/cm 3 ; t = $25,0 \pm 0,1$ °C.

Sa slike 35 se vidi da su zavisnosti brzina katalitičke i katalitičko-inhibitorne reakcije linearne u celom ispitivanom intervalu koncentracija Cu(II) jona, tako da su obe reakcije +1 reda. Za dalji rad je odabrana koncentracija bakra od $8 \cdot 10^{-6}$ mol/dm 3 .

Pri optimalnim uslovima odigravanja reakcije : pH = 7,8; c(H₂O₂) = 0,2 mol/dm 3 ; c(SA) = $4 \cdot 10^{-3}$ mol/dm 3 ; c(Cu²⁺) = $8 \cdot 10^{-6}$ mol/dm 3 ; t = $25,0 \pm 0,1$ °C, praćena je zavisnost brzine reakcije od koncentracije DFB.



Slika 36. Kalibraciona kriva za određivanje DFB u intervalu koncentracija $0,31 - 3,10 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ pri optimalnim uslovima određivanja: $pH = 7,8$; $c(H_2O_2) = 0,2 \text{ mol}/\text{dm}^3$; $c(SA) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol}/\text{dm}^3$; $c(Cu^{2+}) = 8 \cdot 10^{-6} \text{ mol}/\text{dm}^3$; $t = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$

Na slici 36 je prikazana zavisnost brzine reakcije od koncentracije inhibitora u intervalu od $0,31$ do $3,10 \mu\text{g}/\text{cm}^3$, a na slici 37 zavisnost brzine reakcije od koncentracije DFB u intervalu od $3,10$ do $31,0 \mu\text{g}/\text{cm}^3$.

Jednačine kalibracione prave na temperaturi $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ za ispitivani interval koncentracija diflubenzurona od $0,31$ do $3,10 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ i od $3,10$ do $31,0 \mu\text{g}/\text{cm}^3$, mogu se prikazati sledećim jednačinama:

$$tg\alpha \cdot 10^2 = -0,02649 \cdot c_{DFB} + 16,72 \quad r = -0,9991 \quad (49)$$

$$tg\alpha \cdot 10^2 = -0,00166 \cdot c_{DFB} + 8,56 \quad r = -0,9968 \quad (50)$$

gde je:

c_{DFB} - koncentracija diflubenzurona

$tg\alpha$ - nagib linearog dela kinetičke krive u koordinatnom sistemu $A = f(t)$

r - koeficijent korelacije.

Na osnovu prikazanih zavisnosti između brzine katalitičke i katalitičko-inhibitorne reakcije oksidacije sulfanilne kiseline vodonik peroksidom u fosfatnom puferu u prisustvu Cu^{2+} jona, od koncentracije svakog reaktanta pojedinačno, postavljene su odgovarajuće kinetičke jednačine za oba procesa.

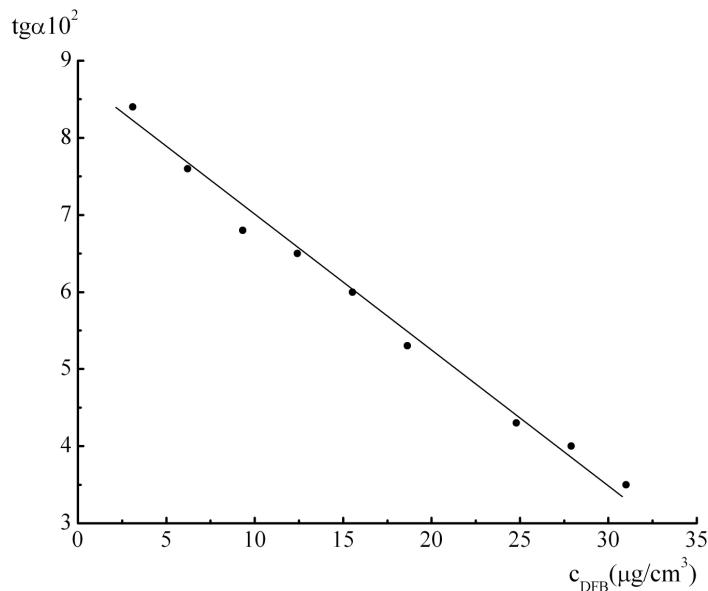
Kinetičke jednačine za katalitičku i katalitičko-inhibitornu reakciju su sledeće:

$$-\frac{dc}{dt} = k_1 \cdot c(H^+)^{-1} \cdot c(H_2O_2) \cdot c(SA) \cdot c(Cu^{2+}) \quad (51)$$

$$-\frac{dc}{dt} = k_2 \cdot c(H^+)^{-1} \cdot c(H_2O_2) \cdot c(SA) \cdot c(Cu^{2+}) \cdot c(DFB)^{-1} \quad (52)$$

gde je :

dc/dt - promena koncentracije indikatorske supstance
 k_1 - uslovna konstanta brzine katalitičke reakcije
 k_2 - uslovna konstanta brzine katalitičko-inhibitorne reakcije.



Slika 37. Kalibraciona kriva za određivanje DFB u intervalu koncentracija 3,10 - 31,0 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ pri optimalnim uslovima određivanja: $pH = 7,8$; $c(H_2O_2) = 0,2 \text{ mol}/\text{dm}^3$; $c(SA) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol}/\text{dm}^3$; $c(Cu^{2+}) = 8 \cdot 10^{-6} \text{ mol}/\text{dm}^3$; $t = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Kinetička jednačina za katalitičku reakciju važi u celom ispitivanom intervalu pH, vodonik peroksida, bakar jona, a u intervalu koncentracije sulfanilne kiseline od $1 \cdot 10^{-3}$ do $4 \cdot 10^{-3} \text{ mol}/\text{dm}^3$.

Kinetička jednačina za katalitičko-inhibitornu reakciju važi u celom ispitivanom intervalu pH, koncentracije vodonik peroksida, bakar jona, a u intervalu koncentracije sulfanilne kiseline od $1 \cdot 10^{-3}$ do $4 \cdot 10^{-3} \text{ mol}/\text{dm}^3$, koncentraciji DFB od 0,31 do 3,10 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ i od 3,10 do 31,0 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$.

Teorijski najmanja koncentracija diflubenzurona koja se može odrediti razrađenom metodom po metodi Perez-Bendito izračunata je na osnovu jednačina (53) i (54):

$$LOD = \frac{3 \cdot S}{nagib} \quad (53)$$

$$LOQ = \frac{10 \cdot S}{nagib} \quad (54)$$

Gde je :

LOD - granica detekcije (Limit of Detection)

LOQ - granica određivanja (Limit of Determination)

Analitički i statistički podaci za kalibracionu pravu, dobijeni metodom linearne regresije u kompjuterskom programu *Origin 6.1*, dati su u tabeli 32.

Tabela 32. Analitičke i statističke karakteristike kalibracione krive za određivanje DFB

Parametri	
Opseg linearnosti ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$)	0,31 - 3,10 3,10 - 31,0 n=7 n=9
Jednačina kalibracione prave	$tga \cdot 10^2 = -0,02649 \cdot c_{DFB} + 16,72$ $tga \cdot 10^2 = -0,00166 \cdot c_{DFB} + 8,56$
$(\text{Nagib} \pm \text{SD}) \cdot 10^2$	$(-0,02649 \pm 0,05016) \cdot 10^2$
$(\text{Odsečak} \pm \text{SD}) \cdot 10^2$	$(16,72 \pm 0,087) \cdot 10^2$
Koeficijent korelacije, r	- 0,9990 - 0,9968
Varijansa $(S \cdot 10^2)^2 (\mu\text{g}/\text{cm}^3)^2$	$2,023 \cdot 10^{-6}$
Granica detekcije ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$)	0,095
Granica određivanja ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$)	0,29

*U statistici se za opisivanje preciznosti vrlo široko koristi i kvadrat standardne devijacije (SD^2) - poznat kao varijansa. U eksperimentalnim radovima se, međutim, više koristi standardna devijacija SD nego SD^2 , jer su jedinice standardne devijacije iste kao i kod merene veličine.

Da bi se odredila tačnost i reproduktivnost određivanja DFB opisanom kinetičkom metodom, pojedinačno su izračunavani tga iz zavisnosti $A = f(t)$ za tri koncentracije DFB u pet ponavljanja. Korišćenjem kalibracione krive i statističkom obradom rezultata merenja dobijeni su rezultati koji su prikazani u tabeli 33.

Tabela 33. Tačnost i reproduktivnost određivanja diflubenzurona

Odmereno ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$)	Nađeno $\bar{x} \pm SD$ ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$)	n	RSD (%)	G (%)	$\frac{\bar{x} - \mu}{\mu} \cdot 100$ (%)	Recovery (%)
0,31	0,29±0,02		5,03	6,23	6,45	93,54
1,24	1,20±0,02	5	1,86	2,28	3,22	96,77
3,10	3,03±0,02		1,83	2,27	2,25	97,74

Gde je:

\bar{x} - srednja aritmetička vrednost

n - broj određivanja,

SD - standardna devijacija srednje vrednosti, $SD = \frac{SD}{\sqrt{n}}$

SD - standardna devijacija pojedinačnog merenja, $SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$, za $n > 25-30$,

$SD \rightarrow \sigma$, $\bar{x} \rightarrow \mu$

RSD – relativana standardna devijacija, $RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \cdot 100 \%$

$\frac{\bar{x} - \mu}{\mu} \cdot 100$ - tačnost metode

G - relativna greška

μ - tačno odmerena vrednost

$Recovery = \frac{nadjeno}{odmereno} \cdot 100 \%$

Za ocenu selektivnosti metode ispitana je uticaj većeg broja stranih jona na brzinu katalitičko-inhibitorne reakcije, pri stalnoj koncentraciji DFB od $6,20 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ (tabela 34).

Tabela 34. Selektivnost određivanja diflubenzurona

Jonska vrsta	q	I, %
Li^+ , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Cl^- , CH_3COO^- , SO_3^{2-} , SO_4^{2-}	10^3	< 5
NH_4^+ , $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$	10^2	< 5
Ca^{2+} , Ni^{2+}	10	5 - 10
Ba^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+}	1	5 - 10
Fe^{2+} , Fe^{3+}	0,1	5 - 10
Co^{2+}	0,1	ometa

q - odnos koncentracije stranog jona i DFB

$$I = \frac{(c_{DFB}^o - c_{DFB})}{c_{DFB}^o}$$

c_{DFB}^o i c_{DFB} - koncentracija diflubenzurona bez i u prisustvu interferirajuće supstance (dobijena iz jednačine kalibracione prave)

Iz tabele 34 može se zaključiti da je selektivnost metode dobra, jer samo joni Co^{2+} ometaju određivanje diflubenzurona pomenutom reakcijom, dok ostali ispitivani joni ne utiču na tačnost određivanja DFB.

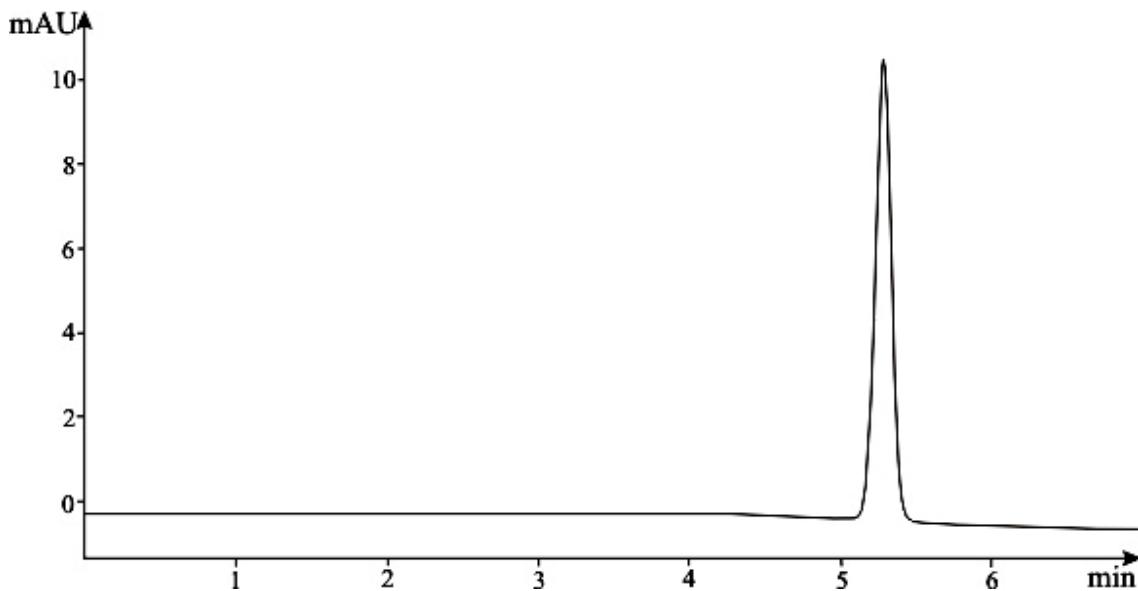
5.1.1. Primena kinetičke metode za određivanje diflubenzurona u uzorcima pečuraka

Na osnovu prethodno razrađene kinetičke metode za određivanje diflubenzurona, koja se bazira na inhibitornom dejstvu DFB u reakciji oksidacije sulfanilne kiseline vodonik peroksidom u fosfatnom puferu pri pH vrednosti pufera 7,8 u prisustvu Cu^{2+} jona i konstruisanih kalibracionih krivih za određivanje DFB u intervalu koncentracija od $0,31$ do $3,10 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ i $3,10$ do $31,0 \mu\text{g}/\text{cm}^3$, metoda je primenjena za određivanje sadržaja DFB u uzorcima pečuraka.

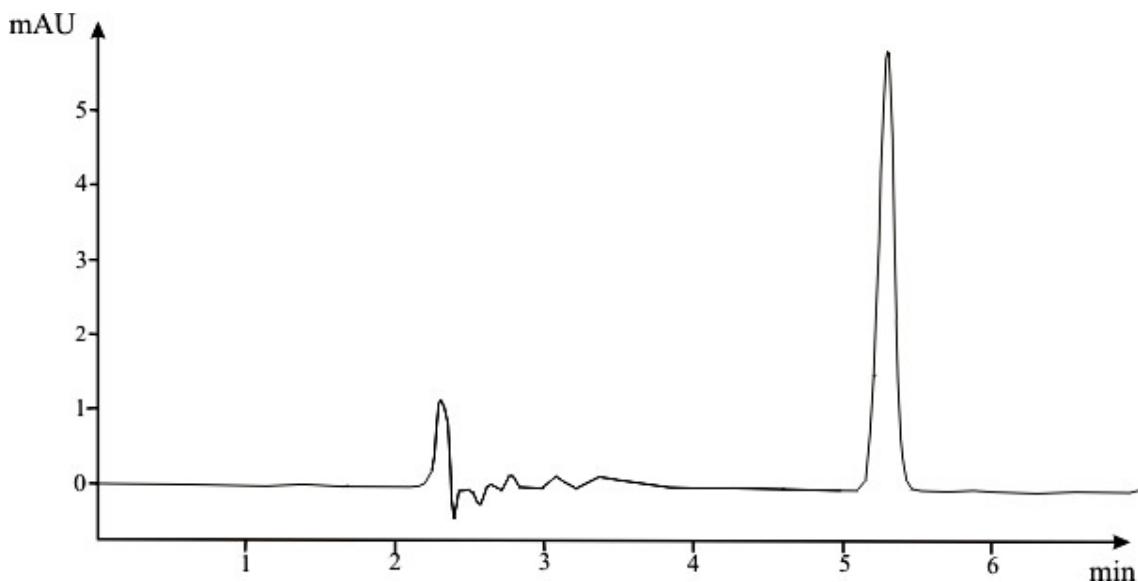
DFB se iz uzorka pečuraka određuje ekstrakcijom po metodi koju su objavili Andersson i Palsheden. Uzorci su pripremani prema postupku koji je opisan u "Eksperimentalnom delu". Kao uporedna metoda korišćena je HPLC analiza. Rezultati određivanja DFB u pečurkama prikazani su u tabelama 35 i 36.

Na slici 38 je prikazan hromatogram standardnog rastvora diflubenzurona. Snimanjem HPLC hromatograma vidi se karakteristični pik na određenoj talasnoj dužini 260 nm i retencionom vremenu od 5,2 minuta za DFB.

HPLC hromatogrami određivanja diflubenzurona u pečurkama prikazani su na slikama 39 i 40.



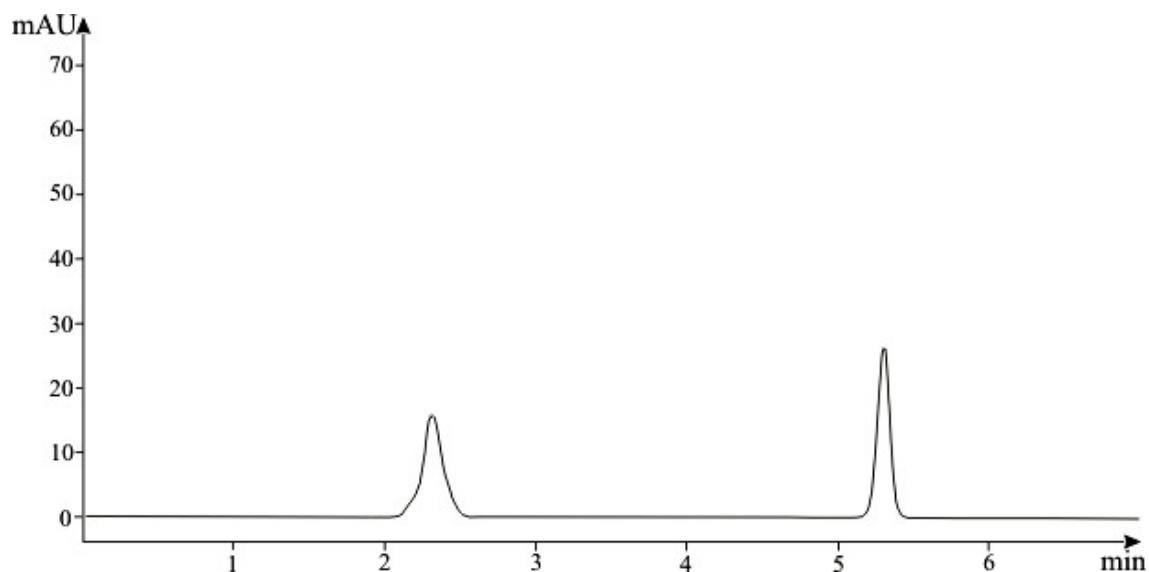
Slika 38. HPLC hromatogram standardnog rasvora diflubenzurona koncentracije 3,10 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ (0,62 mg/kg). Kolona C₁₈ (Zorbax, 5 μm , 250 x 4,6 mm). Mobilna faza: metanol-voda (80:20, v/v). Detekcija 260 nm.



Slika 39. HPLC hromatogram uzorka pečuraka pri koncentraciji DFB 1,10 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ (0,217 mg/kg). Kolona C₁₈ (Zorbax, 5 μm , 250 x 4,6 mm). Mobilna faza: metanol-voda (80:20, v/v). Detekcija 260 nm.

Dobijeni hromatogrami standarda i uzorka pokazuju poklapanje retencionih vremena za analiziranu komponentu - DFB. U cilju kvantitativne analize, određena je integrisana površina za dati pik i sa kalibracionog dijagrama za date vrednosti apsorbancije izračunate su koncentracije diflubenzurona u ispitivanim uzorcima.

Količina DFB koja je određena u ispitivanim uzorcima u skladu je sa referentnom HPLC metodom.



Slika 40. HPLC hromatogram uzorka pečuraka pri koncentraciji DFB $17,30 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ ($3,46 \text{ mg}/\text{kg}$). Kolona C_{18} (Zorbax, $5 \mu\text{m}$, $250 \times 4,6 \text{ mm}$). Mobilna faza: metanol-voda (80:20, v/v). Detekcija 260 nm .

Tabela 35. Tačnost i reproduktivnost određivanja diflubenzurona u uzorcima pečuraka

Tip pečurke	Metoda kalibracione prave ($\bar{x} \pm \text{SD}$)		HPLC metoda	n	RSD (%)	$\frac{\bar{x} - \mu}{\mu} \cdot 100$ (%)	Recovery (%)
	Dodato	Nadeno $\bar{x} \pm \text{SD}$					
Šampinjoni	0,200	$0,192 \pm 0,01$	$0,194 \pm 0,01$	5	1,90	3,80	96,00
Lisičara	0,116	$0,112 \pm 0,01$	$0,114 \pm 0,02$		2,50	3,40	96,50
Vrganj	0,217	$0,210 \pm 0,03$	$0,212 \pm 0,01$		2,41	3,10	96,00
Lisičara	0,148	$0,140 \pm 0,03$	$0,144 \pm 0,02$		2,57	5,10	95,00
Šampinjoni	1,50	$1,452 \pm 0,02$	$1,454 \pm 0,01$		1,23	3,20	96,80
Bukovača	2,00	$1,95 \pm 0,01$	$1,986 \pm 0,01$		1,30	2,50	95,60
Vrganj	3,46	$3,412 \pm 0,02$	$3,428 \pm 0,01$		1,52	1,38	98,00
Šampinjoni	3,80	$3,692 \pm 0,01$	$3,750 \pm 0,01$		2,36	2,84	97,10

Tabela 36. t - i F - vrednosti dobijene primenom dve različite metode za određivanje diflubenzurona u uzorcima pečuraka

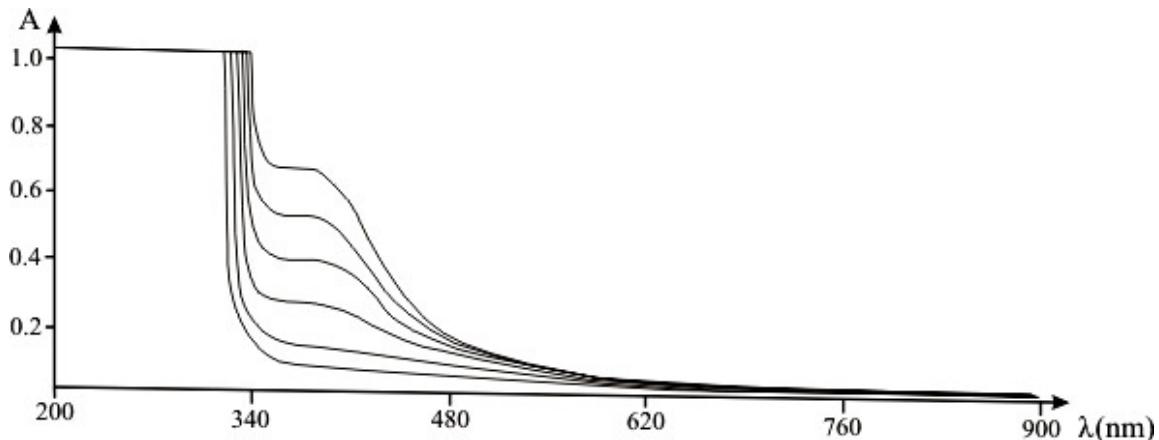
Tip pečurke	Metoda kalibracione prave (mg/kg)		HPLC metoda (mg/kg)	t-test*	F-test*
	Dodato	Nađeno $\bar{x} \pm SD$			
Šampinjoni	0,200	0,192±0,01	0,194±0,01	1,31	1,42
Lisičara	0,116	0,112±0,01	0,114±0,02	1,44	2,83
Vrganj	0,217	0,210±0,03	0,212±0,01	0,37	1,40
Lisičara	0,148	0,140±0,03	0,144±0,02	1,72	1,60
Šampinjoni	1,50	1,452±0,02	1,454±0,01	0,21	1,023
Bukovača	2,00	1,95±0,01	1,986±0,01	0,674	1,163
Vrganj	3,46	3,412±0,02	3,428±0,01	1,10	2,75
Šampinjoni	3,80	3,692±0,01	3,750±0,01	2,10	1,55

*Tablične F - ($v_1 = 4$, $v_2 = 4$) i t - vrednosti ($v = 8$) pri 95 %-tnom nivou poverenja su 6,39 i 2,306, respektivno.

Poređenjem standardnih devijacija F - test i srednjih vrednosti, t - test (Skoog i sar., 1996; Hartmann i sar., 1995), pri 95 %-tnom nivou poverenja i za dati broj stepena slobode, uočeno je da između kinetičke i referentne HPLC metode ne postoji velika razlika u preciznosti, $t_{eksp.} < t_{tab.}$ i $F_{eksp.} < F_{tab.}$.

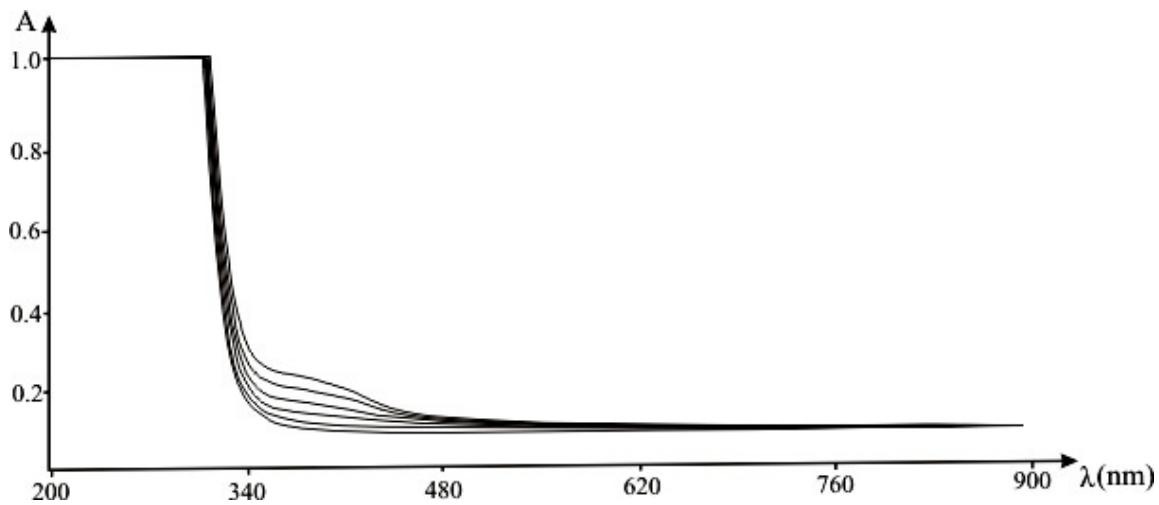
5.2. Kinetičko određivanje mikrokoličina bromacila

Kinetičko-spektrofotometrijska metoda za određivanje mikrogramskih količina bromacila u rastvoru zasniva se na njegovom inhibitornom delovanju u reakciji oksidacije sulfanilne kiseline vodonik peroksidom u fosfatnom puferu u prisustvu Cu^{2+} jona.



Slika 41. Apsorpcioni spektar tokom vremena od 6 minuta u sistemu: fosfatni pufer pH = 7,9; $c(H_2O_2) = 0,2 \text{ mol}/dm^3$; $c(SA) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol}/dm^3$; $c(Cu^{2+}) = 6 \cdot 10^{-6} \text{ mol}/dm^3$; $t = 25,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$.

Spektrofotometrijskim praćenjem promene apsorbance sa vremenom u sistemu koji sadrži sulfanilnu kiselinu, vodonik peroksid, fosfatni pufer i Cu^{2+} jone, uočeno je linearno povećanje apsorbance tokom vremena na talasnoj dužini 370 nm (slika 41). Dodatkom malih količina bromacila, u sistemu dolazi do značajnog smanjenja brzine reakcije (slika 42).

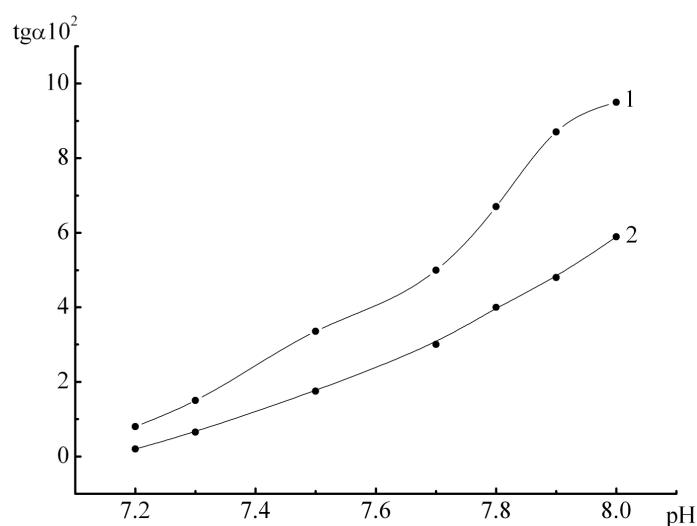


Slika 42. Apsorpcioni spektar tokom vremena od 6 minuta u sistemu: fosfatni pufer pH = 7,9; $c(H_2O_2) = 0,2 \text{ mol}/dm^3$; $c(SA) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol}/dm^3$; $c(Cu^{2+}) = 6 \cdot 10^{-6} \text{ mol}/dm^3$; $c(Bromacil) = 16,20 \mu\text{g}/cm^3$; $t = 25,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$.

Za obradu kinetičkih podataka primenjena je tangensna metoda, zbog linearne zavisnosti apsorbance u rastvoru u toku prvih 5-6 minuta od početka odigravanja reakcije.

U cilju razrade što osetljivije metode za određivanje mikrogramskih količina bromacila, bilo je potrebno odrediti optimalne uslove odigravanja reakcije. U tu svrhu praćena je promena brzine katalitičke i katalitičko-inhibitorne reakcije od koncentracije svakog reaktanta pojedinačno (H_3O^+ -jona, H_2O_2 , SA, Cu^{2+}).

Grafička zavisnost $\text{tg}\alpha$ za katalitičku i katalitičko-inhibitornu reakciju od pH vrednosti fosfatnog pufera data je na slici 43.



Slika 43. Zavisnost brzine katalitičke (1) i katalitičko-inhibitorne (2) reakcije od pH u sistemu: $c(\text{SA}) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$; $c(\text{H}_2\text{O}_2) = 0,2 \text{ mol/dm}^3$; $c(\text{Cu}^{2+}) = 5 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$; $c(\text{Bromacil}) = 16,20 \mu\text{g/cm}^3$; $t = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

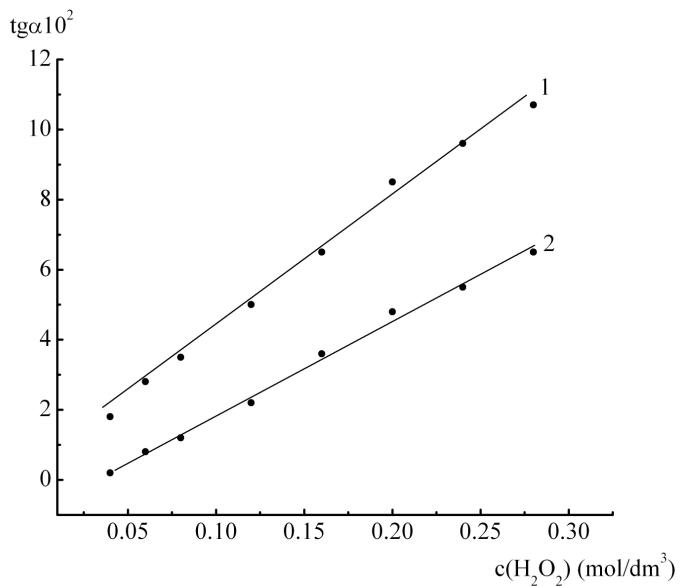
Sa slike 43 se vidi da razlika u brzini između katalitičke i katalitičko-inhibitorne reakcije raste sa povećanjem pH vrednosti i da je najveća razlika u brzini pri pH vrednosti fosfatnog pufera 7,9 i ova pH vrednost odabrana za dalja ispitivanja.

Sa slike 43 se vidi da su zavisnosti brzine obe reakcije linearne u celom ispitivanom intervalu pH, tako da je red katalitičke i katalitičko-inhibitorne reakcije u odnosu na koncentraciju $[\text{H}_3\text{O}^+]$ jona -1.

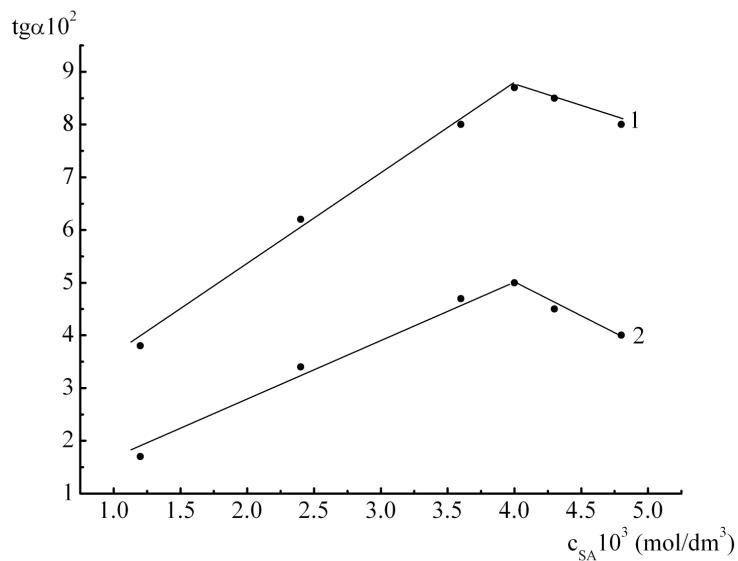
U cilju određivanja optimalnih uslova odigravanja reakcije, ispitana je uticaj koncentracije H_2O_2 na brzinu katalitičke i katalitičko-inhibitorne reakcije.

Grafička zavisnost $\text{tg}\alpha$ za katalitičku i katalitičko-inhibitornu reakciju od koncentracije vodonik peroksida data je na slici 44.

Na slici 44 se zapaža da su brzine katalitičke i katalitičko-inhibitorne reakcije linearne u celom ispitivanom intervalu koncentracija vodonik peroksidu, tako da su obe reakcije +1 reda. Za dalji rad odabrana je koncentracija H_2O_2 od $0,2 \text{ mol/dm}^3$ i u daljem ispitivanju održavana konstantnom.



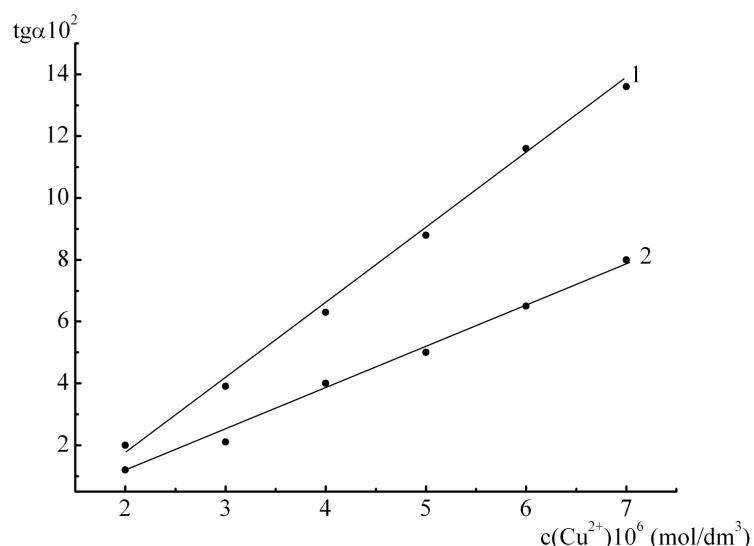
Slika 44. Zavisnost brzine katalitičke (1) i katalitičko-inhibitorne (2) reakcije od H_2O_2 u sistemu: $pH = 7,9$; $c(SA) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$; $c(Cu^{2+}) = 5 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$; $c(Bromacil) = 16,20 \mu\text{g/cm}^3$; $t = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.



Slika 45. Zavisnost brzine katalitičke (1) i katalitičko-inhibitorne (2) reakcije od koncentracije sulfanilne kiseline u sistemu: $pH=7,9$; $c(H_2O_2) = 0,2 \text{ mol/dm}^3$; $c(Cu^{2+}) = 5 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$; $c(Bromacil) = 16,20 \mu\text{g/cm}^3$; $t = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Ispitivanjem uticaja koncentracije sulfanilne kiseline na brzinu katalitičke i katalitičko-inhibitorne reakcije vidi se da je maksimalna razlika u brzinama reakcija pri koncentraciji sulfanilne kiseline $4 \cdot 10^{-3}$ mol/dm³, tako da je ova koncentracija odabrana kao optimalna i u daljem radu je održavana konstantnom. Ova zavisnost prikazana je na slici 45.

Sa slike 45 se vidi da su katalitička i katalitičko-inhibitorna reakcija +1 reda u intervalu koncentracija sulfanilne kiseline od $1 \cdot 10^{-3}$ do $4 \cdot 10^{-3}$ mol/dm³, a -1 reda pri većim koncentracijama.



Slika 46. Zavisnost brzine katalitičke (1) i katalitičko-inhibitorne (2) reakcije od koncentracije Cu²⁺ jona u sistemu: pH = 7,9; c(H₂O₂) = 0,2 mol/dm³; c(SA) = $4 \cdot 10^{-3}$ mol/dm³; c(Bromacil) = 16,20 µg/cm³; t = $25,0 \pm 0,1$ °C.

Ispitivanjem uticaja Cu²⁺ jona na brzinu katalitičke i katalitičko-inhibitorne reakcije (slika 46), vidi se da su zavisnosti brzina katalitičke i katalitičko-inhibitorne reakcije linearne u celom ispitivanom intervalu koncentracija bakra, tako da su obe reakcije +1 reda. Za dalji rad je odabrana koncentracija bakra od $6 \cdot 10^{-6}$ mol/dm³.

Pri optimalnim uslovima odigravanja reakcije: pH = 7,9; c(H₂O₂) = 0,2 mol/dm³; c(SA) = $4 \cdot 10^{-3}$ mol/dm³; c(Cu²⁺) = $6 \cdot 10^{-6}$ mol/dm³; t = $25,0 \pm 0,1$ °C, praćena je zavisnost brzine reakcije od koncentracije bromacila. Na slici 47 je prikazana zavisnost brzine reakcije od koncentracije inhibitora u intervalu od 2,70 do 16,20 µg/cm³.

Jednačina kalibracione prave na temperaturi $25,0 \pm 0,1$ °C za ispitivani interval koncentracija bromacila od 2,70 do 16,20 µg/cm³ može se prikazati sledećom jednačinom:

$$tg\alpha \cdot 10^2 = -0,316 \cdot c_{Bromacil} + 11,70 \quad r = -0,9943 \quad (55)$$

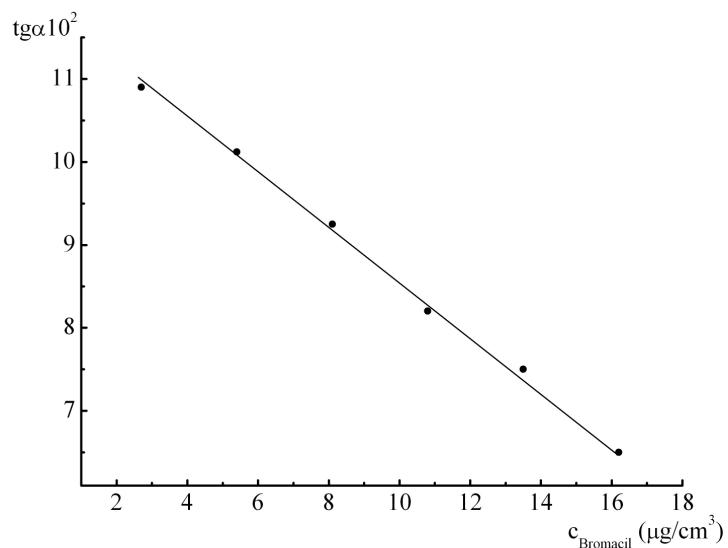
gde je:

$c_{Bromacil}$ - koncentracija bromacila

$\operatorname{tg}\alpha$ - nagib linearne krive u koordinatnom sistemu $A = f(t)$

r - koeficijent korelacije.

Na osnovu prikazanih zavisnosti između brzine katalitičke i katalitičko-inhibitorne reakcije oksidacije sulfanilne kiseline vodonik peroksidom u fosfatnom puferu u prisustvu Cu^{2+} jona, od koncentracije svakog reaktanta pojedinačno, postavljene su odgovarajuće kinetičke jednačine za oba procesa.



Slika 47. Kalibraciona kriva za određivanje bromacila u intervalu koncentracija 2,70 - 16,20 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ pri optimalnim uslovima određivanja: $pH = 7,9$; $c(H_2O_2) = 0,2 \text{ mol}/\text{dm}^3$; $c(SA) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol}/\text{dm}^3$; $c(Cu^{2+}) = 6 \cdot 10^{-6} \text{ mol}/\text{dm}^3$; $t = 25,0 \pm 0,1^\circ C$.

Kinetičke jednačine za katalitičku i katalitičko-inhibitornu reakciju su sledeće:

$$-\frac{dc}{dt} = k_1 \cdot c(H^+)^{-1} \cdot c(H_2O_2) \cdot c(SA) \cdot c(Cu^{2+}) \quad (56)$$

$$-\frac{dc}{dt} = k_2 \cdot c(H^+)^{-1} \cdot c(H_2O_2) \cdot c(SA) \cdot c(Cu^{2+}) \cdot c(Bromacil)^{-1} \quad (57)$$

gde su :

dc/dt - promena koncentracije indikatorske supstance,

k_1 - uslovna konstanta brzine katalitičke reakcije,

k_2 - uslovna konstanta brzine katalitičko-inhibitorne reakcije.

Kinetička jednačina za katalitičku reakciju važi u celom ispitivanom intervalu pH, koncentracije vodonik peroksida, Cu^{2+} jona, a u intervalu koncentracija sulfanilne kiseline od $1 \cdot 10^{-3}$ do $4 \cdot 10^{-3}$ mol/dm³.

Kinetička jednačina za katalitičko-inhibitornu reakciju važi u celom ispitivanom intervalu pH, koncentracije vodonik peroksida, Cu^{2+} jona, u intervalu koncentracija sulfanilne kiseline od $1 \cdot 10^{-3}$ do $4 \cdot 10^{-3}$ mol/dm³, koncentracije bromacila od 2,70 do 16,20 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$.

Izračunata je granica detekcije i granica određivanja bromacila i podaci su dati u tabeli 37.

Analitički i statistički podaci za kalibracionu pravu, dobijeni metodom linearne regresije u kompjuterskom programu *Origin 6.1*, dati su u tabeli 37.

Tabela 37. Analitičke i statističke karakteristike kalibracione krive za određivanje bromacila

Parametri	
Opseg linearnosti ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$)	2,70 - 16,20 n=6
Jednačina kalibracione prave	$\text{tg}\alpha \cdot 10^2 = -0,00316 \cdot c_{\text{Bromacil}} + 11,70$
(Nagib \pm SD) $\cdot 10^2$	$-0,3016 \pm 0,01605$
(Odsečak \pm SD) $\cdot 10^2$	$11,70 \pm 0,16875$
Koeficijent korelacije, r	-0,9943
Varijansa ($S \cdot 10^2$) ² ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$) ²	$2,08 \cdot 10^{-6}$
Granica detekcije ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$)	0,55
Granica određivanja ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$)	1,86

Da bi se odredila tačnost i reproduktivnost određivanja bromacila opisanom kinetičkom metodom, pojedinačno su izračunavani $\text{tg}\alpha$ iz zavisnosti $A = f(t)$ za tri koncentracije bromacila u pet ponavljanja. Korišćenjem kalibracione krive i statističkom obradom rezultata merenja dobijeni su rezultati koji su prikazani u tabeli 38.

Tabela 38. Tačnost i reproduktivnost određivanja bromacila

Odmereno ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$)	Nađeno $\bar{x} \pm SD$ ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$)	n	RSD (%)	G (%)	$\frac{\bar{x} - \mu}{\mu} \cdot 100$ (%)	Recovery (%)
2,70	2,85 \pm 0,02		3,26	4,06	5,55	105,5
8,10	8,22 \pm 0,01	5	3,00	3,74	1,51	101,5
16,20	16,23 \pm 0,01		0,32	0,40	0,18	101,1

*Objašnjenje veličina i odgovarajući izrazi prikazani su u poglavljju 5.1.

U cilju ocene selektivnosti metode ispitana je uticaj većeg broja stranih jona na brzinu indikatorske reakcije na temperaturi $25,0 \pm 0,1$ °C pri stalnoj koncentraciji bromacila od $8,10 \mu\text{g}/\text{cm}^3$. Selektivnost metode je prikazana u tabeli 39.

Iz tabele 39 može se zaključiti da je selektivnost metode dobra, jer samo joni Co^{2+} ometaju određivanje bromacila pomenutom reakcijom, dok ostali ispitivani joni ne utiču na tačnost određivanja.

Tabela 39. Selektivnost određivanja bromacila

Jonska vrsta	q	I, %
Li^+ , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Cl^- , CH_3COO^- , SO_3^{2-} , F^- , SO_4^{2-}	10^2	<5
NH_4^+ , $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$, J^- , Mo^{6+} , V^{3+} , Ca^{2+} , Ba^{2+}	10	<5
Ni^{2+} , W^{6+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+}	1	5-10
Co^{2+}	0,1	ometu

q - odnos koncentracije jona i bromacila

$$I - \text{interferencijski koeficijent}, I = \frac{(c_{\text{Bromacil}}^o - c_{\text{Bromacil}})}{c_{\text{Bromacil}}^o}$$

c_{Bromacil}^o i c_{Bromacil} - koncentracija bromacila bez i u prisustvu interferirajuće supstance (dobijena iz jednačine kalibracione prave)

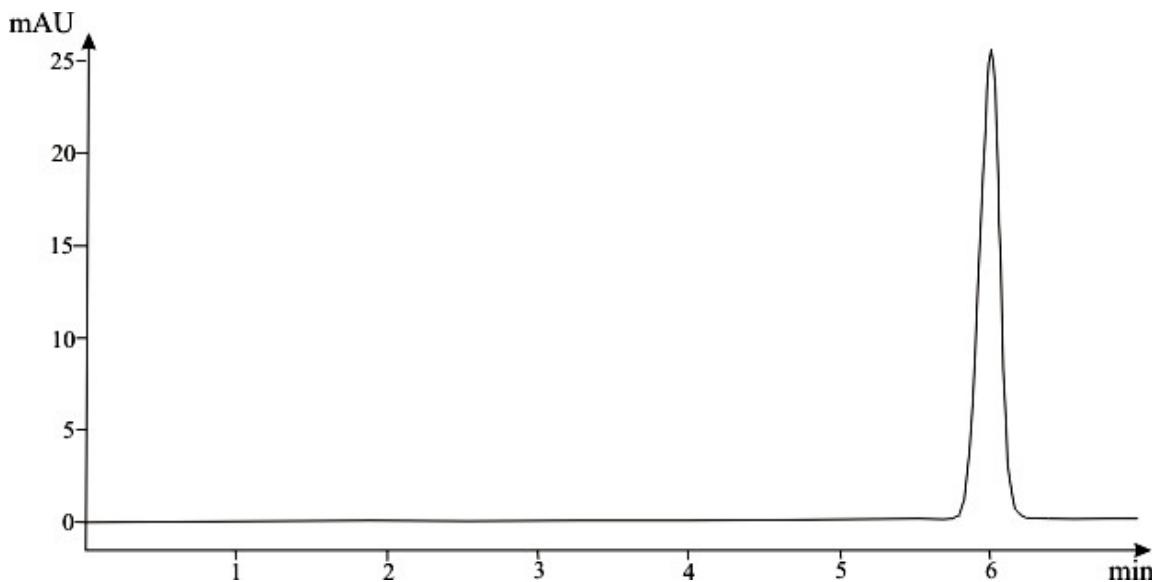
5.2.1. Primena kinetičke metode za određivanje bromacila u uzorcima vode i zemljišta

Na osnovu prethodno razradene kinetičke metode za određivanje herbicida bromacila, koja se bazira na njegovom inhibitornom dejstvu u reakciji oksidacije sulfanilne kiseline vodonik peroksidom u fosfatnom puferu pri pH 7,9 u prisustvu Cu^{2+} jona i konstruisane kalibracione krive za određivanje bromacila u intervalu koncentracija od 2,70 do $16,20 \mu\text{g}/\text{cm}^3$, metoda je primenjena za određivanje sadržaja bromacila u uzorcima vode i zemljišta.

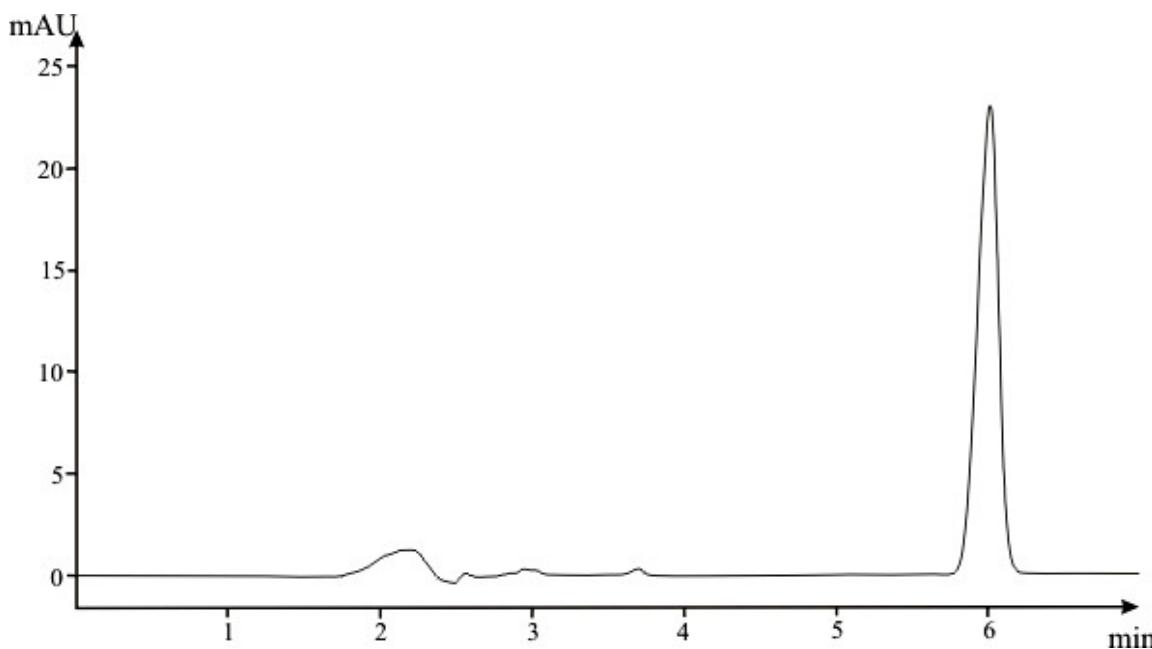
Uzorci su pripremani prema postupku koji je opisan u "Eksperimentalnom delu". Kao referenta metoda korišćena je HPLC analiza. Rezultati određivanja bromacila u uzorcima vode i zemljišta prikazani su u tabelama 40 i 41.

Na slici 48 je prikazan hromatogram standardnog rastvora bromacila.

Snimanjem HPLC hromatograma vidi se karakteristični pik na određenoj talasnoj dužini od 280 nm i retencionom vremenu od 5,8 minuta za bromacil. HPLC hromatogrami određivanja bromacila u uzorcima vode i zemljišta prikazani su na slikama 49 i 50.



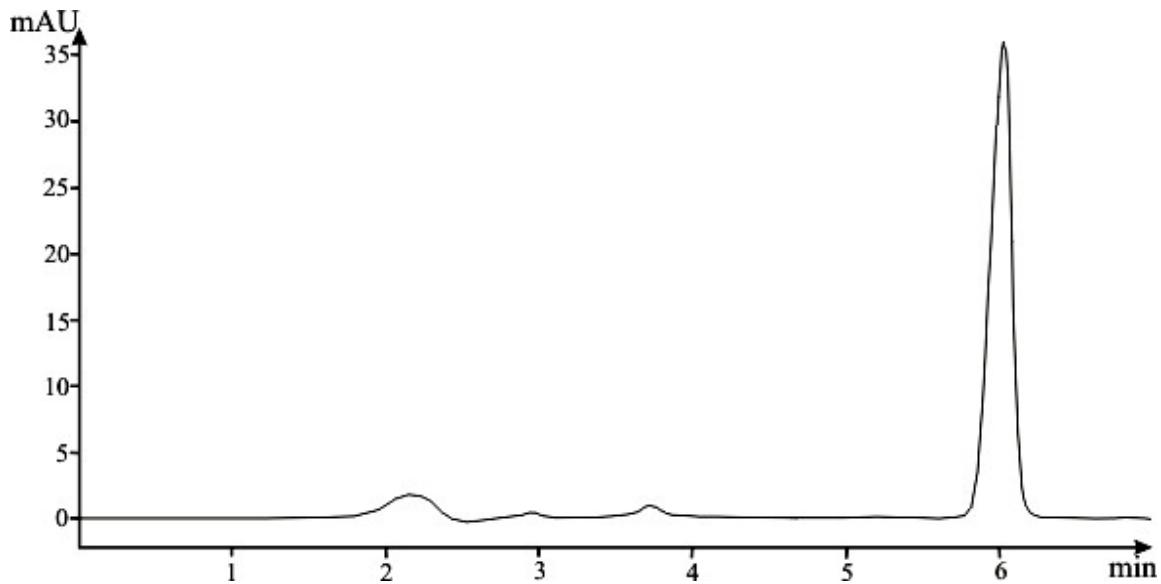
Slika 48. HPLC hromatogram standardnog rastvora bromacila koncentracije $8,1 \mu\text{g}/\text{cm}^3$. Kolona C₁₈ (Zorbax, 5 μm , 250 x 4,6 mm). Mobilna faza: ACN-voda (40:60, v/v). Detekcija 280 nm.



Slika 49. HPLC hromatogram uzorka zemljišta pri koncentraciji bromacila $8,1 \mu\text{g}/\text{cm}^3$. Kolona C₁₈ (Zorbax, 5 μm , 250 x 4,6 mm). Mobilna faza: ACN-voda (40:60, v/v). Detekcija 280 nm.

Dobijeni hromatogrami standarda i uzorka pokazuju poklapanje retencionih vremena za analiziranu komponentu - bromacil. U cilju kvantitativne analize, određena je integrisana površina za dati pik i sa kalibracionog dijagrama za date vrednosti apsorbancije izračunate su koncentracije bromacila u ispitivanim uzorcima.

Količina bromacila koja je određena u ispitivanim uzorcima u skladu je sa referentnom metodom. Podaci o sadržaju bromacila u uzorcima zemljišta i vode određeni kinetičkom i HPLC metodom dati su u tabelama 40 i 41.



Slika 50. HPLC hromatogram uzorka vode pri koncentraciji bromacila $10,40 \mu\text{g}/\text{cm}^3$. Kolona C_{18} (Zorbax, $5 \mu\text{m}$, $250 \times 4,6 \text{ mm}$). Mobilna faza: ACN-voda (40:60, v/v). Detekcija 280 nm .

Tabela 40 . Tačnost i reproduktivnost određivanja bromacila u uzorcima voda

Tip uzorka	Metoda kalibracione prave ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$)		HPLC metoda ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$)	n	RSD (%)	$\frac{\bar{x} - \mu}{\mu} \cdot 100$ (%)	Recovery (%)
	Odmereno	Nađeno $\bar{x} \pm SD$					
Česmenska voda	11,20	$11,65 \pm 0,02$	$10,87 \pm 0,01$		0,46	4,91	95,00
Bunarska voda	8,50	$8,04 \pm 0,01$	$8,28 \pm 0,01$	5	0,72	5,41	94,00
Rečna voda	10,40	$9,83 \pm 0,01$	$9,82 \pm 0,02$		1,21	5,44	94,55

Poređenjem standardnih devijacija F - test i srednjih vrednosti, t - test (Skoog i sar., 1996; Hartmann i sar., 1995), pri 95 %-tnom nivou poverenja i za dati broj stepena slobode, uočeno je da između kinetičke i referentne HPLC metode ne postoji velika razlika u preciznosti, $t_{eksp.} < t_{tab.}$ i $F_{eksp.} < F_{tab.}$.

Tabela 41. Tačnost i reproduktivnost određivanja bromacila u uzorcima zemljišta

Tip uzorka	Metoda kalibracione prave ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$)		HPLC metoda ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$)	n	RSD (%)	$\frac{\bar{x} - \mu}{\mu} \cdot 100$ (%)	Recovery (%)
	Odmereno	Nađeno $\bar{x} \pm SD$					
Zemljište Knez Selo	8,50	$8,16 \pm 0,02$	$8,18 \pm 0,01$	5	1,87	4,00	95,00
Zemljište iz Grdelice	11,20	$10,81 \pm 0,02$	$10,86 \pm 0,01$		0,46	3,57	96,00
Zemljište iz Niša	10,80	$10,26 \pm 0,02$	$10,28 \pm 0,02$		0,80	5,20	95,00

Tabela 42. t - i F - vrednosti dobijene primenom dve različite metode za određivanje bromacila u uzorcima zemljišta

Tip uzorka	Metoda kalibracione prave ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$)		HPLC metoda ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$)	t-test*	F-test*
	Dodato	Nađeno $\bar{x} \pm SD$			
Zemljište Knez Selo	8,50	$8,16 \pm 0,02$	$8,18 \pm 0,01$	0,255	1,167
Zemljište iz Grdelice	11,20	$10,81 \pm 0,02$	$10,86 \pm 0,01$	0,30	1,96
Zemljište iz Niša	10,80	$10,26 \pm 0,02$	$10,28 \pm 0,02$	1,50	1,19

Tabela 43. t - i F - vrednosti dobijene primenom dve različite metode za određivanje bromacila u uzorcima voda

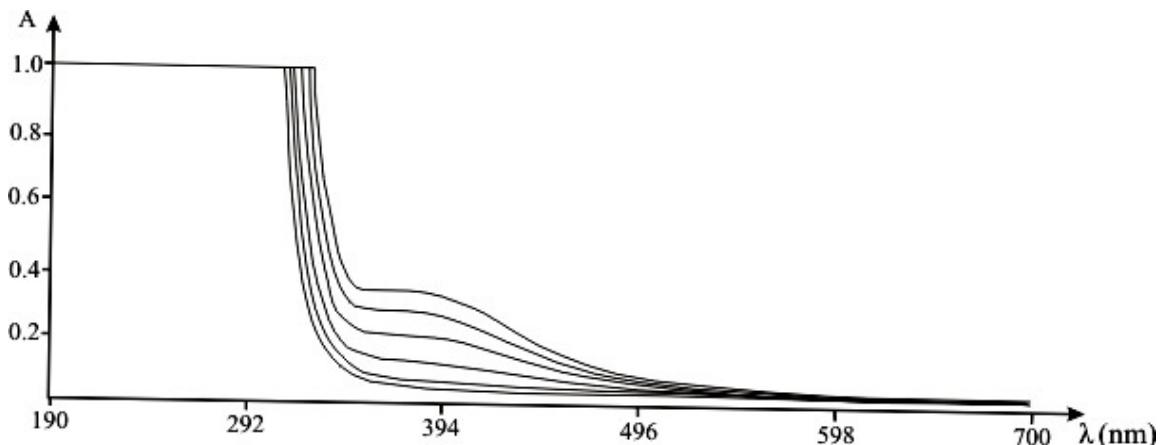
Tip uzorka	Metoda kalibracione prave ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$)		HPLC metoda ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$)	t-test*	F-test*
	Dodato	Nađeno $\bar{x} \pm \text{SD}$			
Česmenska voda	11,20	11,65 \pm 0,02	10,87 \pm 0,01	1,19	1,08
Bunarska voda	8,50	8,04 \pm 0,01	8,28 \pm 0,01	1,12	1,81
Rečna voda	10,40	9,83 \pm 0,01	9,82 \pm 0,02	0,11	3,24

*Tablične F - ($v_1 = 4$, $v_2 = 4$) i t - vrednosti ($v = 8$) pri 95 %-tnom nivou poverenja su 6,39 i 2,306, respektivno.

5.3. Kinetičko određivanje mikrokoličina difenzokvat-metil sulfata

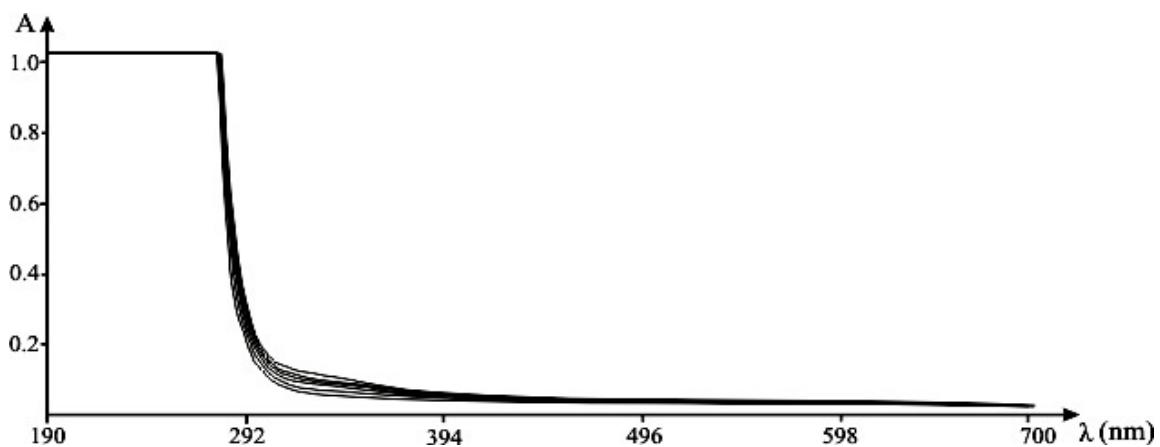
Kinetičko-spektrofotometrijska metoda za određivanje mikrogramskih količina difenzokvat-metilsulfata (DFQ) u rastvoru zasniva se na njegovom inhibitornom delovanju u reakciji oksidacije sulfanilne kiseline vodonik peroksidom u fosfatnom puferu u prisustvu Cu^{2+} jona.

Spektrofotometrijskim praćenjem promene apsorbance sa vremenom u sistemu koji sadrži sulfanilnu kiselinsku (SA), vodonik-peroksid, fosfatni pufer i Cu^{2+} jone, uočeno je linearno povećanje apsorbance tokom vremena na talasnoj dužini 370 nm (slika 51).



Slika 51. Apsorpcioni spektar tokom vremena od 6 minuta u sistemu: fosfatni pufer pH = 7,9; $c(H_2O_2) = 0,2 \text{ mol}/dm^3$; $c(SA) = 6 \cdot 10^{-4} \text{ mol}/dm^3$; $c(Cu^{2+}) = 4 \cdot 10^{-6} \text{ mol}/dm^3$; $t = 25,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$.

Dodatkom malih količina difenzokvata, u sistemu dolazi do značajnog smanjenja brzine reakcije (slika 52).

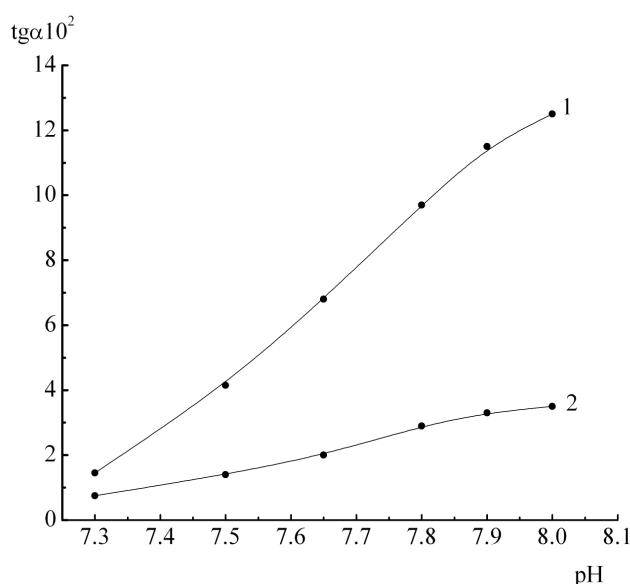


Slika 52. Apsorpcioni spektar tokom vremena od 6 minuta u sistemu: fosfatni pufer pH = 7,9; $c(H_2O_2) = 0,2 \text{ mol}/dm^3$; $c(SA) = 6 \cdot 10^{-4} \text{ mol}/dm^3$; $c(Cu^{2+}) = 4 \cdot 10^{-6} \text{ mol}/dm^3$; $c(DFQ) = 4,32 \mu\text{g}/cm^3$; $t = 25,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$.

Za obradu kinetičkih podataka primenjena je tangensna metoda, zbog linearne zavisnosti apsorbance u rastvoru u toku prvih 5-6 minuta od početka odigravanja reakcije.

U cilju razrade što osetljivije metode za određivanje mikrogramskih količina DFQ, bilo je potrebno odrediti optimalne uslove odigravanja reakcije. U tu svrhu praćena je promena brzine katalitičke i katalitičko-inhibitorne reakcije od koncentracije svakog reaktanta pojedinačno (H_3O^+ -jona, H_2O_2 , SA, Cu^{2+}).

Grafička zavisnost $\text{tg}\alpha \cdot 10^2$ za katalitičku i katalitičko-inhibitornu reakciju od pH vrednosti fosfatnog pufera data je na slici 53.



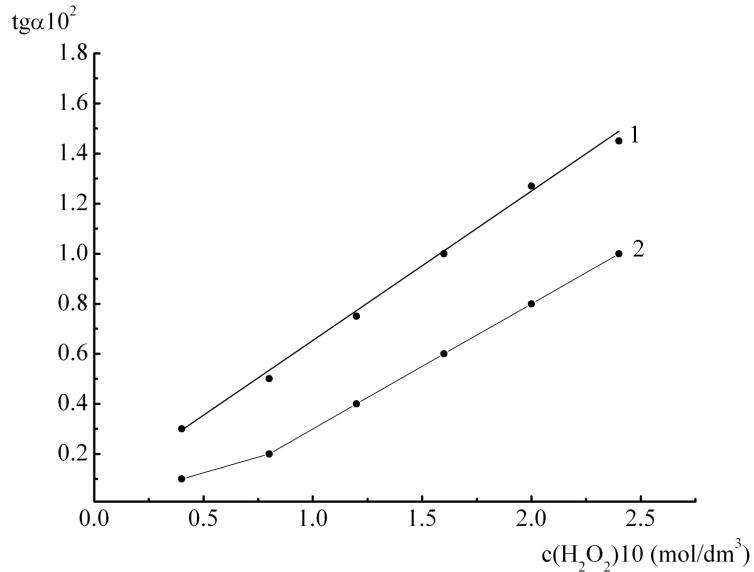
Slika 53. Zavisnost brzine katalitičke (1) i katalitičko-inhibitorne (2) reakcije od pH u sistemu: $c(\text{SA}) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$; $c(\text{H}_2\text{O}_2) = 0,2 \text{ mol/dm}^3$; $c(\text{Cu}^{2+}) = 6 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$; $c(\text{DFQ}) = 28,83 \mu\text{g/cm}^3$; $t = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Sa slike 53 se vidi da razlika u brzini između katalitičke i katalitičko-inhibitorne reakcije raste sa povećanjem pH vrednosti i da je najveća razlika u brzini pri pH fosfatnog pufera 7,9 i ova pH vrednost je odabrana za dalja ispitivanja.

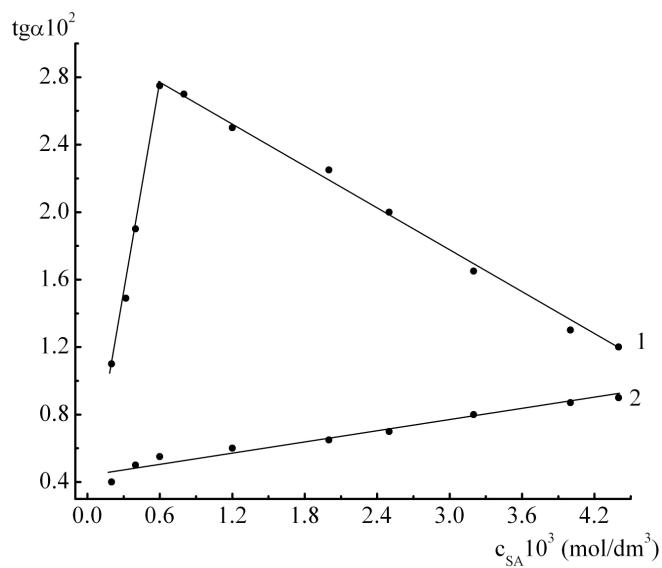
Sa slike 53 se vidi da su zavisnosti brzine obe reakcije od pH linearne u celom ispitivanom intervalu pH, tako da je red katalitičke i katalitičko-inhibitorne reakcije od koncentracije $[\text{H}_3\text{O}^+]$ -1.

Sa slike se vidi da je brzina katalitičke reakcije velika pri datoj koncentraciji $6 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$ Cu^{2+} jona i da dolazi do odstupanja od linearnosti, tako da je u daljim ispitivanjima njegova koncentracija smanjena na $2 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$. Takođe je smanjena koncentracija inhibitora na $7,20 \mu\text{g/cm}^3$.

Ispitivanjem uticaja koncentracije vodonik peroksida na brzinu katalitičke i katalitičko-inhibitorne reakcije (slika 54) vidi se da je najveća razlika u brzini pri koncentraciji H_2O_2 $0,2 \text{ mol}/\text{dm}^3$, tako da je ova koncentracija odabrana za dalja ispitivanja i održavana konstantnom. Obe reakcije su linearne u celom ispitivanom intervalu koncentracija vodonik-peroksida, tako da su +1 reda.



Slika 54. Zavisnost brzine katalitičke (1) i katalitičko-inhibitorne (2) reakcije od H_2O_2 u sistemu: $pH = 7,9$; $c(SA) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol}/\text{dm}^3$; $c(Cu^{2+}) = 2 \cdot 10^{-6} \text{ mol}/\text{dm}^3$; $c(DFQ) = 7,20 \mu\text{g}/\text{cm}^3$; $t = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.



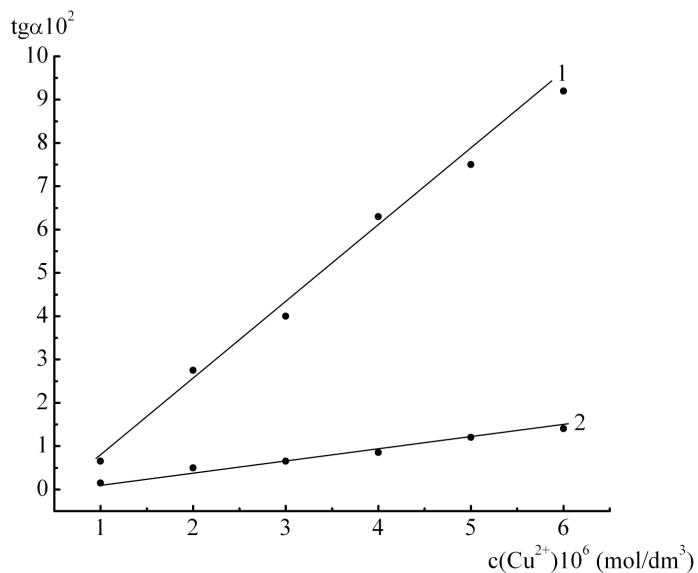
Slika 55. Zavisnost brzine katalitičke (1) i katalitičko-inhibitorne (2) reakcije od koncentracije SA u sistemu: $pH=7,8$; $c(H_2O_2) = 0,2 \text{ mol}/\text{dm}^3$; $c(Cu^{2+}) = 2 \cdot 10^{-6} \text{ mol}/\text{dm}^3$; $c(DFQ) = 7,20 \mu\text{g}/\text{cm}^3$; $t = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Ispitivan je uticaj koncentracije sulfanilne kiseline na brzinu katalitičke i katalitičko-inhibitorne reakcije u intervalu koncentracija SA od $0,2 \cdot 10^{-3}$ mol/dm 3 do $4,2 \cdot 10^{-3}$ mol/dm 3 , ova zavisnost prikazana je na slici 55.

Prilikom ispitivanja uticaja koncentracije SA na brzinu katalitičke reakcije primećeno je da sa smanjenjem njene koncentracije ispod $4 \cdot 10^{-3}$ mol/dm 3 brzina reakcije raste do određene koncentracije i dostiže maksimum pri koncentraciji SA $0,6 \cdot 10^{-3}$ mol/dm 3 . Sa slike 55 se može videti da je najveća razlika u brzini između katalitičke i katalitičko-inhibitorne reakcije pri koncentraciji SA $0,6 \cdot 10^{-3}$ mol/dm 3 . Ova koncentracija je odabrana za dalji rad. Na slici 55 se takođe vidi da brzina katalitičko-inhibitorne reakcije raste u celom ispitivanom intervalu koncentracija, te je red ove reakcije +1.

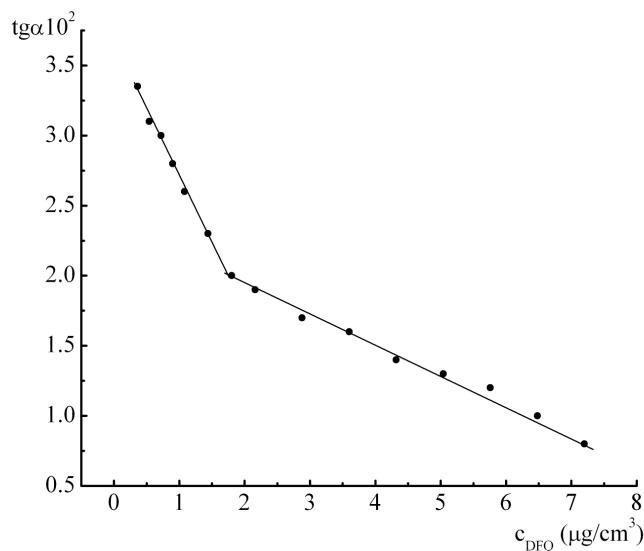
Brzina katalitičke reakcije raste u intervalu koncentracije sulfanilne kiseline od $0,2 \cdot 10^{-3}$ do $0,6 \cdot 10^{-3}$ mol/dm 3 , tako da je u ovom intervalu brzina reakcije +1 reda, pri većim koncentracijama brzina reakcije opada i reakcija je -1 reda.

Ispitivanjem uticaja koncentracije Cu $^{2+}$ jona na brzinu katalitičke i katalitičko-inhibitorne reakcije vidi se da su obe reakcije +1 reda i da rastu sa povećanjem koncentracije bakra u celom ispitivanom intervalu koncentracija. Za dalji rad je odabrana koncentracija Cu $^{2+}$ od $4 \cdot 10^{-6}$ mol/dm 3 (slika 56).



Slika 56. Zavisnost brzine katalitičke (1) i katalitičko-inhibitorne (2) reakcije od koncentracije Cu $^{2+}$ jona u sistemu: pH = 7,9; c(H $_2$ O $_2$) = 0,2 mol/dm 3 ; c(SA) = $0,6 \cdot 10^{-3}$ mol/dm 3 ; c(DFQ) = 7,20 µg/cm 3 ; t = 25,0 ± 0,1 °C.

Pri optimalnim uslovima odigravanja reakcije: $pH = 7,9$; $c(H_2O_2) = 0,2 \text{ mol/dm}^3$; $c(SA) = 0,6 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$; $c(Cu^{2+}) = 4 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$; $t = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$, praćena je zavisnost brzine reakcije od koncentracije DFQ. Na slici 57 je prikazana zavisnost brzine reakcije od koncentracije inhibitora u intervalu od $0,36$ do $7,20 \mu\text{g/cm}^3$.



Slika 57. Kalibraciona prava za određivanje DFQ u intervalu koncentracija od $0,36$ do $7,20 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ pri optimalnim uslovima određivanja: $pH = 7,9$; $c(H_2O_2) = 0,2 \text{ mol/dm}^3$; $c(SA) = 0,6 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$; $c(Cu^{2+}) = 4 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$; $t = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Sa slike 57 vidi se da kalibraciona prava ima tačku preloma pri koncentraciji difenzokvata $1,80 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ i da se sastoji iz dva linearne dela.

Kalibraciona prava na temperaturi od 25°C pri koncentraciji DFQ od $0,36$ do $1,80 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ (slika 58) može se prikazati jednačinom:

$$tg\alpha \cdot 10^2 = -0,91816 \cdot c_{DFQ} + 3,625 \quad r = -0,9977 \quad (58)$$

Dok je kalibraciona prava za koncentraciju DFQ u intervalu od $1,80$ do $7,20 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ data jednačinom (slika 59):

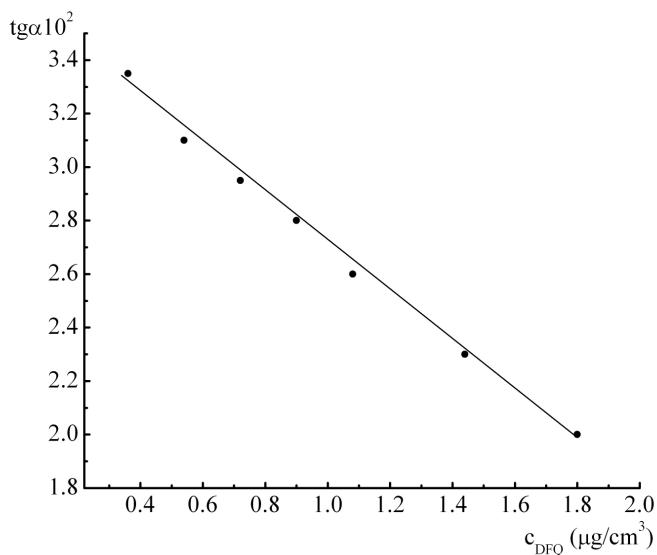
$$tg\alpha \cdot 10^2 = -0,2066 \cdot c_{DFQ} + 2,319 \quad r = -0,9972 \quad (59)$$

gde je:

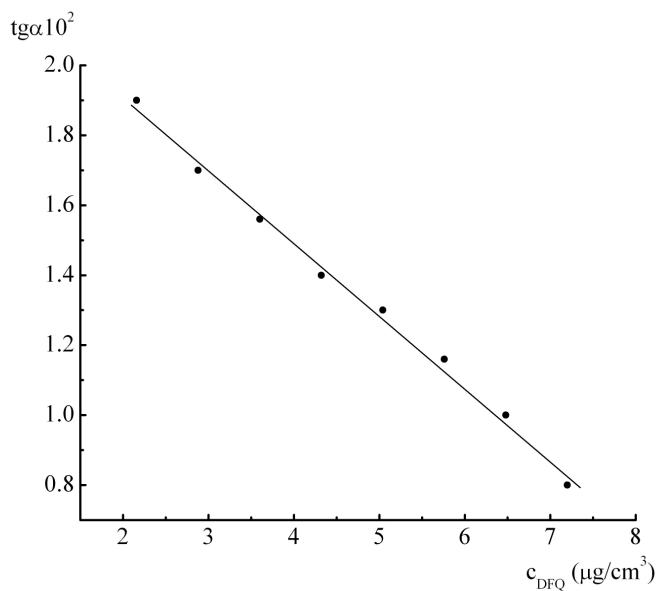
c_{DFQ} - koncentracija difenzokvat-metil sulfata

$tg\alpha$ - nagib linearnog dela kinetičke krive u koordinatnom sistemu $A = f(t)$

r - koeficijent korelacije.



Slika 58. Kalibraciona prava za određivanje DFQ u intervalu koncentracija od 0,36 do 1,80 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ pri optimalnim uslovima određivanja: $pH = 7,9$; $c(H_2O_2) = 0,2 \text{ mol}/\text{dm}^3$; $c(SA) = 0,6 \cdot 10^{-3} \text{ mol}/\text{dm}^3$; $c(Cu^{2+}) = 4 \cdot 10^{-6} \text{ mol}/\text{dm}^3$; $t = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.



Slika 59. Kalibraciona prava za određivanje DFQ u intervalu koncentracija od 1,80 do 7,20 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ pri optimalnim uslovima određivanja: $pH = 7,9$; $c(H_2O_2) = 0,2 \text{ mol}/\text{dm}^3$; $c(SA) = 0,6 \cdot 10^{-3} \text{ mol}/\text{dm}^3$; $c(Cu^{2+}) = 4 \cdot 10^{-6} \text{ mol}/\text{dm}^3$; $t = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Na osnovu kinetičkih ispitivanja i određenih redova reakcije mogu se izvesti kinetičke jednačine za katalitičku (60) i katalitičko-inhibitornu reakciju (61):

$$-\frac{dc}{dt} = k_1 \cdot c(H^+)^{-1} \cdot c(H_2O_2) \cdot c(SA) \cdot c(Cu^{2+}) \quad (60)$$

$$-\frac{dc}{dt} = k_2 \cdot c(H^+)^{-1} \cdot c(H_2O_2) \cdot c(SA) \cdot c(Cu^{2+}) \cdot c(DFQ)^{-1} \quad (61)$$

gde su k_1 i k_2 konstante brzine katalitičke i katalitičko-inhibitorne reakcije, respektivno.

Kinetička jednačina za katalitičku reakciju važi u sledećem intervalu koncentracija: pH od 7,5 do 8; H_2O_2 od 0,03 do 2,5 mol/dm³; SA od $0,2 \cdot 10^{-3}$ do $0,6 \cdot 10^{-3}$ mol/dm³; Cu^{2+} od $1 \cdot 10^{-6}$ do $4 \cdot 10^{-6}$ mol/dm³.

Kinetička jednačina za katalitičko-inhibitornu reakciju važi u sledećem intervalu koncentracija: pH od 7,5 do 7,9; H_2O_2 od 0,075 do 0,2 mol/dm³; SA od $0,2 \cdot 10^{-3}$ do $4,2 \cdot 10^{-3}$ mol/dm³; Cu^{2+} od $1 \cdot 10^{-6}$ do $4 \cdot 10^{-6}$ mol/dm³; DFQ od 0,36 do 1,80 µg/cm³ i 1,80 do 7,20 µg/cm³.

Analitički i statistički podaci za kalibracionu pravu, dobijeni metodom linearne regresije u kompjuterskom programu Origin 6.1, prikazani su u tabeli 44.

Tabela 44. Analitičke i statističke karakteristike kalibracione krive za određivanje DFQ

Parametri	
Opseg linearnosti (µg/cm ³)	0,36 - 1,80 1,80 - 7,20 n = 7 n = 8
Jednačina kalibracione prave	$tga \cdot 10^2 = -0,9182 \cdot c_{DFQ} + 3,625$ $tga \cdot 10^2 = -0,2066 \cdot c_{DFQ} + 2,319$
(Nagib ± SD) · 10 ²	-0,9182 ± 0,027 -0,2066 ± 0,006
(Odsečak ± SD) · 10 ²	3,625 ± 0,03 2,319 ± 0,03
Koeficijent korelacije, r	-0,9977 -0,9972
Varijansa ($S \cdot 10^{-2}$) ² (µg/cm ³) ²	$1,203 \cdot 10^{-7}$
Granica detekcije (µg/cm ³)	0,0552
Granica određivanja (µg/cm ³)	0,184

Da bi se odredila tačnost i reproduktivnost određivanja DFQ opisanom kinetičkom metodom, pojedinačno su izračunavani tga iz zavisnosti $A = f(t)$ za tri koncentracije DFQ u pet ponavljanja. Korišćenjem kalibracione krive i statističkom obradom rezultata merenja dobijeni su rezultati koji su prikazani u tabeli 45.

Tabela 45. Tačnost i reproduktivnost određivanja DFQ

Odmereno ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$)	Nađeno $\bar{x} \pm \text{SD}$ ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$)	n	RSD (%)	G (%)	$\frac{\bar{x} - \mu}{\mu} \cdot 100$ (%)	Recovery (%)
0,36	0,38±0,01	5	2,90	3,61	6,16	105,5
0,80	0,87±0,02		2,05	2,55	3,11	108,7
1,80	1,83±0,01		0,73	1,00	2,00	101,6

*Objašnjenje veličina i odgovarajući izrazi prikazani su u poglavlju 5.1.

U cilju ocene selektivnosti metode ispitana je uticaj većeg broja stranih jona na brzinu katalitičko-inhibitorne reakcije na temperaturi $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ pri stalnoj koncentraciji DFQ $4,32 \mu\text{g}/\text{cm}^3$.

Tabela 46. Selektivnost određivanja DFQ

Jonska vrsta	q	I, %
Li^+ , Na^+ , K^+ , NH_4^+ , SO_3^{2-} , SO_4^{2-} , Cl^- , J^- , NO_3^- , F^- , As^{5+}	10^2	< 5
W^{6+} , Mo^{6+} , CH_3COO^- , As^{3+} , Mg^{2+}	10	5 - 10
Fe^{2+} , Fe^{3+} , V^{5+} , Ca^{2+} , Ba^{2+}	1	5 - 10
Ni^{2+} , Mn^{2+} , $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$	0,1	< 5
Zn^{2+} , Al^{3+} , Sn^{2+} , Co^{2+}	0,01	5 - 10

q - odnos koncentracije jona i difenzokvat-metil sulfata

$$\text{I - interferencijski koeficijent, } I = \frac{(c_{DFQ}^o - c_{DFQ})}{c_{DFQ}^o}$$

c_{DFQ}^o i c_{DFQ} - koncentracija DFQ bez i u prisustvu interferirajuće supstance (dobijena iz jednačine kalibracione prave)

5.3.1. Primena kinetičke metode za određivanje difenzokvat -metil sulfata u uzorcima voća

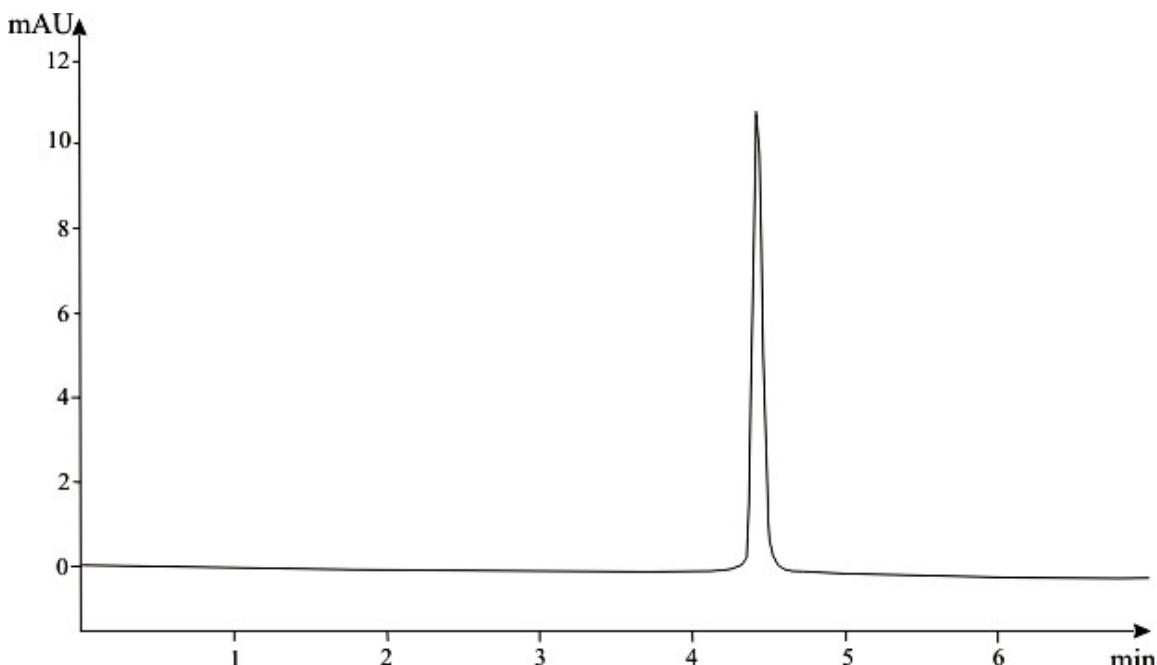
Na osnovu prethodno razrađene kinetičke metode za određivanje difenzokvata-metil sulfata, koja se bazira na njegovom inhibitornom dejstvu u reakciji oksidacije sulfanilne kiseline vodonik peroksidom u fosfatnom puferu pri pH 7,9 u prisustvu Cu^{2+} jona i konstruisanih kalibracionih krivih za određivanje DFQ u intervalu koncentracija od 0,36 do 1,80 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ i od 1,80 do 7,20 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$, metoda je primenjena za određivanje sadržaja DFQ u uzorcima južnog voća (pomorandže, limuna i mandarine).

Uzorci su pripremani prema postupku koji je opisan u "Eksperimentalnom delu". Kao referentna metoda a u cilju verifikovanja rezultata kinetičke metode korišćena je HPLC metoda. Na slici 60 je prikazan hromatogram standardnog rastvora DFQ.

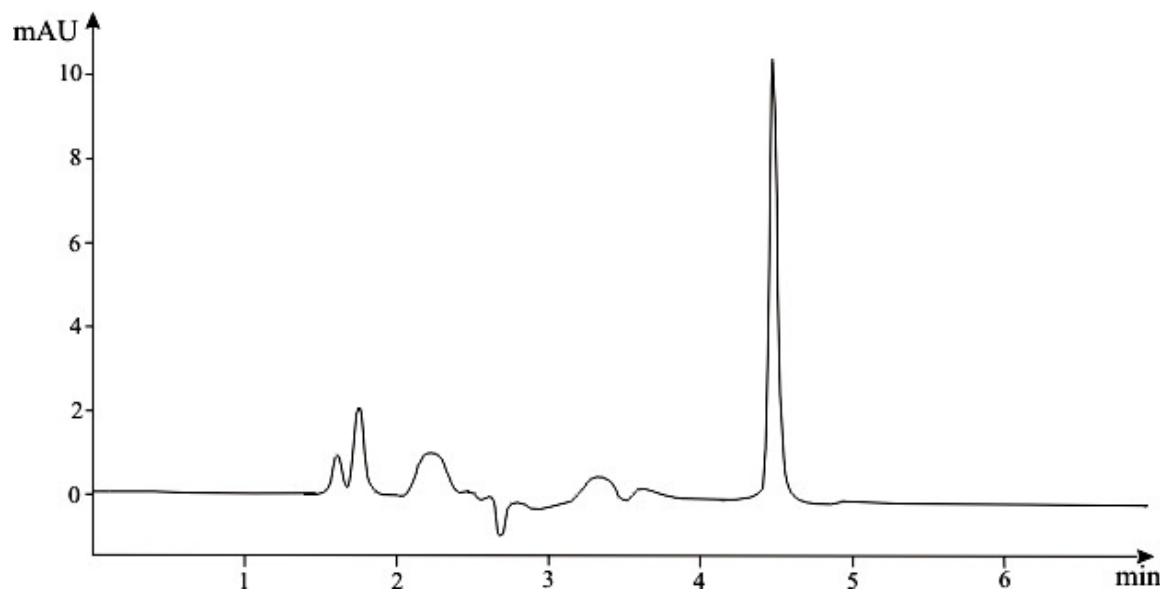
Pozato je da se pomenuti herbicid koristi za prskanje južnog voća, zato je u cilju tačnijeg određivanja vršena analiza blanko uzorka voća. Snimanjem blanko uzorka uočeno je da je voću prisutna određena količina difenzokvata. Metodom standardnog dodatka određena je tačna koncentracija difenzokvata u voću. Kao referenta metoda korišćena je HPLC analiza.

Snimanjem HPLC hromatograma vidi se karakteristični pik na određenoj talasnoj dužini od 215 nm i retencionom vremenu od 4,33 minuta za DFQ.

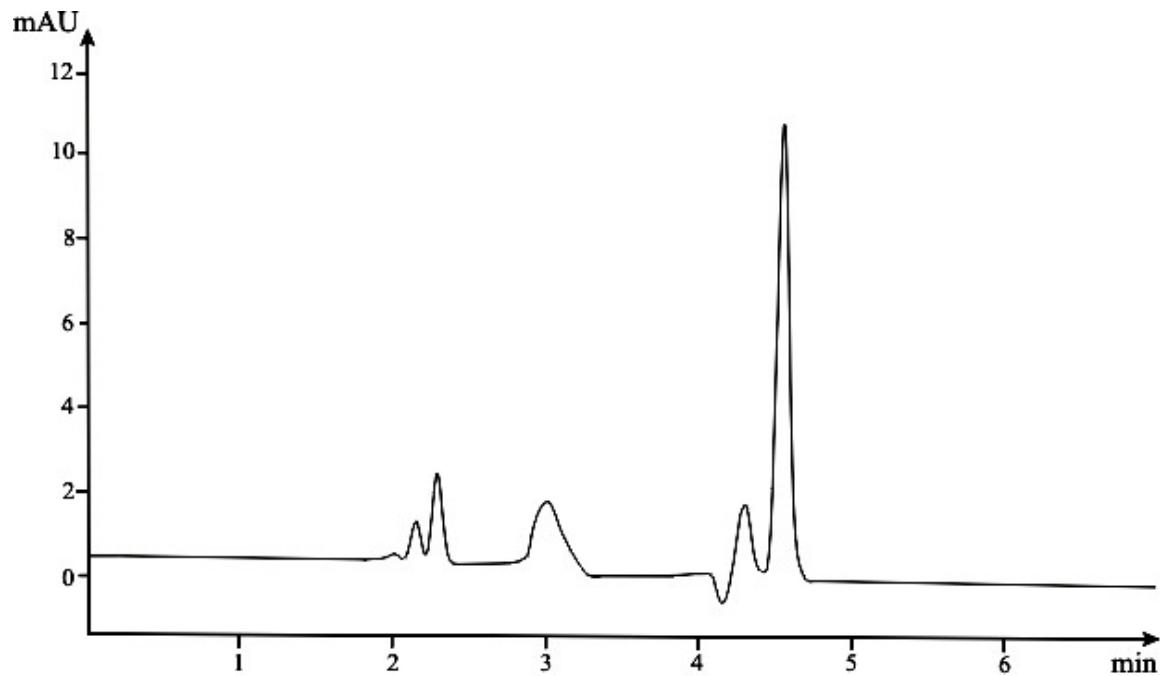
HPLC hromatogrami određivanja difenzokvata u uzorcima južnog voća prikazani su na slikama 61 i 62. Količina DFQ koja je određena u ispitivanim uzorcima u skladu je sa referentnom metodom.



Slika 60. HPLC hromatogram standardnog rastvora DFQ pri koncentraciji $3,20 \mu\text{g}/\text{cm}^3$. Kolona C₁₈ (Zorbax, 5 μm , 250 x 4,6 mm). Mobilna faza: ACN-voda (80:20, v/v) + H_3PO_4 ($\text{pH} = 3$). Detekcija 215 nm.



Slika 61. HPLC hromatogram blanko uzorka soka od pomorandže, pri koncentraciji DFQ $3,06 \mu\text{g}/\text{cm}^3$. Kolona C₁₈ (Zorbax, 5 μm , 250 x 4,6 mm). Mobilna faza: ACN-voda (80:20, v/v) + H_3PO_4 ($\text{pH} = 3$). Detekcija 215 nm.



Slika 62. HPLC hromatogram uzorka soka od pomorandže, pri koncentraciji DFQ 4,48 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$. Kolona C₁₈ (Zorbax, 5 μm , 250 x 4,6 mm). Mobilna faza: ACN-voda (80:20, v/v) + H_3PO_4 ($\text{pH} = 3$). Detekcija 215 nm.

Dobijeni hromatogrami standarda i uzoraka pokazuju poklapanje retencionih vremena za analiziranu komponentu - difenzokvat. U cilju kvantitativne analize, određena

je integrisana površina za dati pik i sa kalibracionog dijagrama za date vrednosti apsorbancije izračunate su koncentracije dimetoata u ispitivanim uzorcima.

Podaci o sadržaju DFQ u uzorcima južnog voća određeni kinetičkom i HPLC metodom dati su u tabelama 47, 48 i 49.

Tabela 47. Količina DFQ u uzorcima južnog voća

Uzorak	Blanko uzorak ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$)	Dodato DFQ ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$)	Očekivana koncentracija ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$)	Dobijeno kinetičkom metodom $\bar{x} \pm \text{SD}$ ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$)	Dobijeno HPLC metodom $\bar{x} \pm \text{SD}$ ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$)
Pomorandža	3,06	1,42	4,48	4,42±0,02	4,44±0,01
Limun	0,86	1,42	1,28	1,16±0,02	1,19±0,03
Mandarina	4,95	1,42	6,37	6,32±0,02	6,29±0,01

Poređenjem standardnih devijacija F - test i srednjih vrednosti, t - test, pri 95 %nom nivou poverenja i za dati broj stepena slobode, uočeno je da između kinetičke i referentne HPLC metode ne postoji velika razlika u preciznosti (tabela 50).

Tabela 48. Tačnost i reproduktivnost određivanja DFQ kinetičkom metodom u uzorcima južnog voća

Uzorak	Metoda kalibracione prave ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$)		RSD (%)	n	$\frac{\bar{x} - \mu}{\mu} \cdot 100$ (%)	Recovery (%)
	Očekivano ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$)	Nađeno ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$)				
Pomorandža	4,48	4,42±0,02	0,38	5	-1,34	98,66
Limun	1,28	1,16±0,02			-9,37	90,62
Mandarina	6,37	6,32±0,02			-0,78	99,20

Tabela 49. Tačnost i reproduktivnost određivanja DFQ HPLC metodom u uzorcima južnog voća

Uzorak	HPLC metoda ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$)		RSD (%)	n	$\frac{\bar{x} - \mu}{\mu} \cdot 100$ (%)	Recovery (%)
	Očekivano ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$)	Nadeno ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$)				
Pomorandža	4,48	4,44 \pm 0,01	0,74		-0,89	99,10
Limun	1,28	1,19 \pm 0,03	3,02	5	-7,03	93,00
Mandarina	6,37	6,29 \pm 0,01	0,25		-1,25	98,74

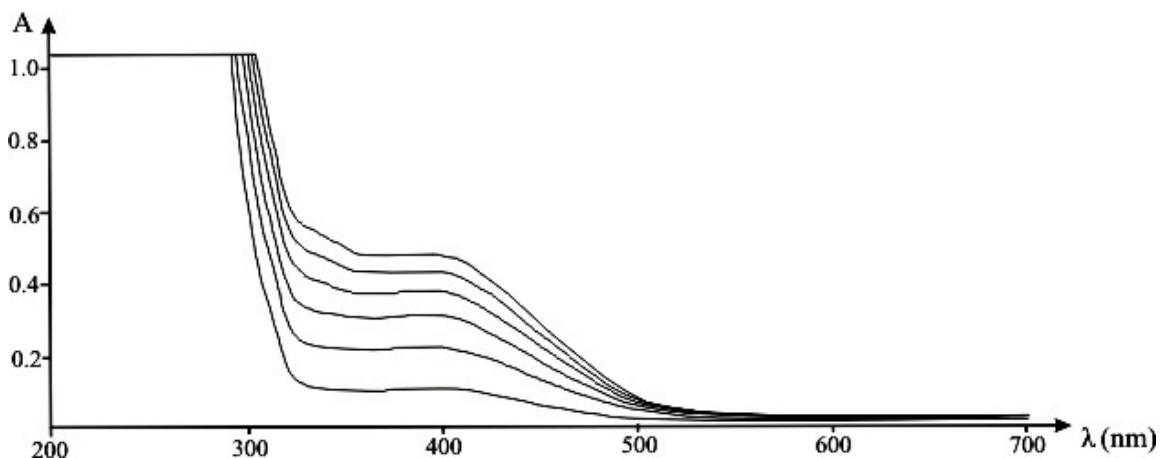
Tabela 50. t - i F - vrednosti dobijene primenom dve različite metode za određivanje DFQ u uzorcima južnog voća

Tip uzorka	Metoda kalibracione prave ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$)		HPLC metoda ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$)	t-test*	F-test*
	Očekivano ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$)	Nadeno $\bar{x} \pm SD$ ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$)			
Pomorandža	4,48	4,42	4,44	0,74	5,40
Limun	1,28	1,16	1,19	1,51	1,92
Mandarina	6,37	6,32	6,29	1,35	2,79

*Tablične F- ($v_1 = 4$, $v_2 = 4$) i t - vrednosti ($v = 8$) pri 95%-tnom nivou poverenja su 6,39 i 2,306.

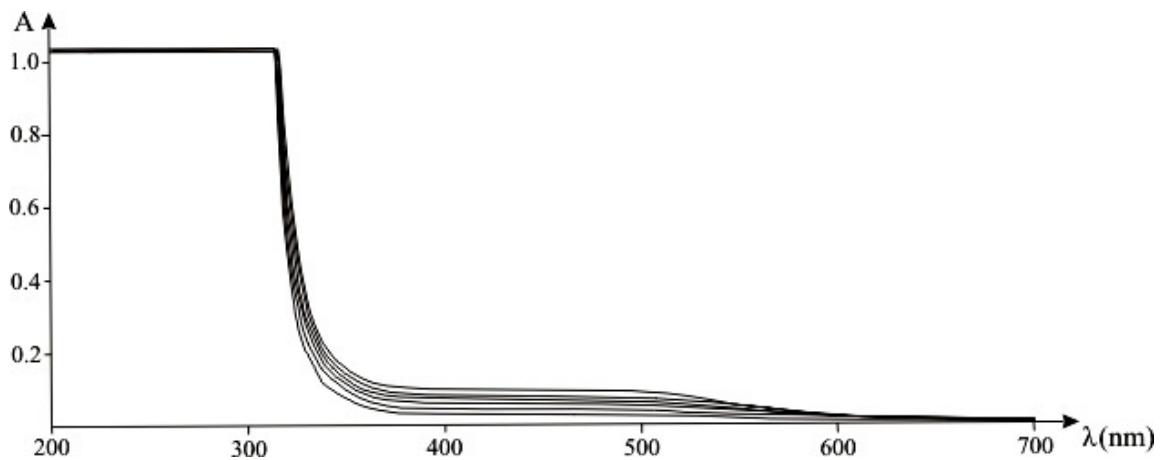
5.4. Kinetičko određivanje mikrokoličina dimetoata

Kinetičko-spektrofotometrijska metoda koja se zasniva na reakciji oksidacije sulfanilne kiseline kalijum-perjodatom katalizovana Fe^{3+} jonima u prisustvu aktivatora 1,10-fenantrolina iskorišćena je kao indikatorska reakcija za određivanje dimetoata. Pomenutu metodu su razradili Alexiev i Stoyanova (1988) za određivanje Fe^{3+} jona.



Slika 63. Apsorpcioni spektar tokom vremena od 6 minuta u sistemu: acetatni pufer pH = 4,70; $c(\text{KIO}_4) = 1,8 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$; $c(\text{SA}) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$; $c(\text{phen}) = 6 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$; $c(\text{Fe}^{3+}) = 6 \cdot 10^{-8} \text{ mol/dm}^3$; $t = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Kinetičko-spektrofotometrijska metoda za određivanje mikrogramskih količina dimetoata u rastvoru zasniva se na njegovom inhibitornom delovanju u reakciji oksidacije sulfanilne kiseline (SA) kalijum-perjodatom u acetatnom puferu u prisustvu Fe^{3+} jona i 1,10-fenantrolina.



Slika 64. Apsorpcioni spektar tokom vremena od 6 minuta u sistemu: acetatni pufer pH = 4,7; $c(\text{KIO}_4) = 1,8 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$; $c(\text{SA}) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$; $c(\text{phen}) = 6 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$; $c(\text{Fe}^{3+}) = 6 \cdot 10^{-8} \text{ mol/dm}^3$; $c(\text{Dimetoat}) = 22,48 \mu\text{g/cm}^3$; $t = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

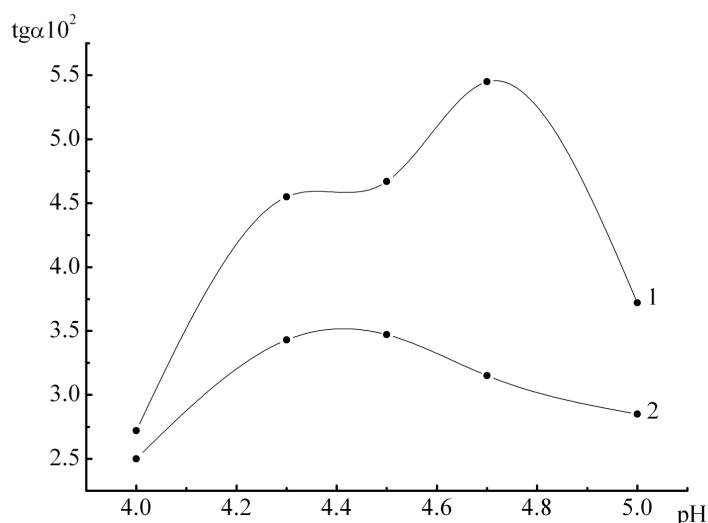
Spektrofotometrijskim praćenjem promene apsorbance sa vremenom u sistemu koji sadrži sulfanilnu kiselinu, kalijum-perjodat, acetatni pufer, Fe^{3+} jone i 1,10-fenantrolin, uočeno je linearno povećanje apsorbance tokom vremena na talasnoj dužini 368 nm (slika 63).

Dodatkom malih količina dimetoata, u sistemu dolazi do značajnog smanjenja brzine reakcije (slika 64).

Za obradu kinetičkih podataka primenjena je tangensna metoda, zbog linearne zavisnosti apsorbance u rastvoru tokom 5 - 6 minuta od početka odigravanja reakcije.

U cilju razrade što osetljivije metode za određivanje mikrogramskih količina dimetoata, bilo je potrebno odrediti optimalne uslove odigravanja reakcije. U tu svrhu praćena je promena brzine katalitičke i katalitičko-inhibitorne reakcije od koncentracije svakog reaktanta pojedinačno (H_3O^+ -jona, KIO_4 , SA, Fe^{3+} jona, 1,10-fenantrolina).

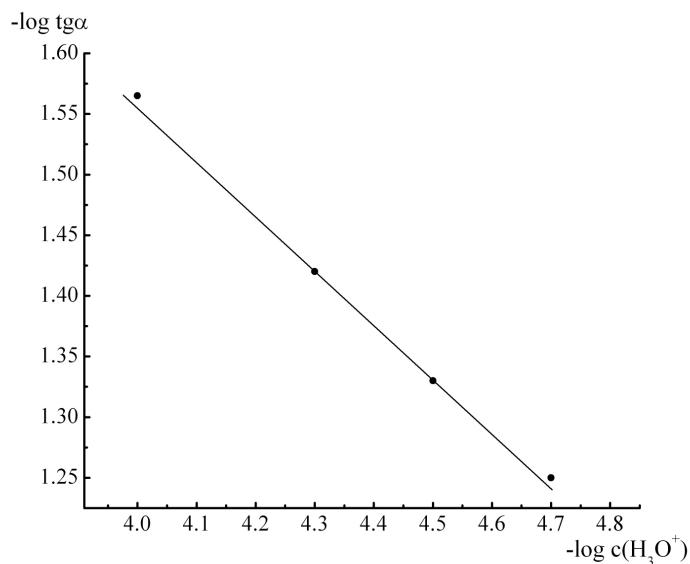
Grafička zavisnost $\text{tg}\alpha \cdot 10^2$ za katalitičku i katalitičko-inhibitornu reakciju od pH vrednosti acetatnog pufera data je na slici 65.



Slika 65. Zavisnost brzine katalitičke (1) i katalitičko-inhibitorne (2) reakcije od pH u sistemu: $c(\text{SA}) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$; $c(\text{KIO}_4) = 1,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$; $c(\text{Fe}^{3+}) = 6 \cdot 10^{-8} \text{ mol/dm}^3$; $c(\text{phen}) = 4 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$; $c(\text{Dimetoat}) = 22,48 \mu\text{g/cm}^3$; $t = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Sa slike 65 se vidi da je najveća razlika u brzini između katalitičke i katalitičko-inhibitorne reakcije pri pH vrednosti acetatnog pufera 4,7. Za dalji rad je odabrana pH vrednost pufera 4,7 i održavana konstantnom.

Sa slike 65 se vidi da su zavisnosti između brzine katalitičke i katalitičko-inhibitorne reakcije od pH složene.



Slika 66. Red katalitičke reakcije u odnosu na koncentraciju $[\text{H}_3\text{O}^+]$ jona u sistemu: $c(\text{SA}) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$; $c(\text{KIO}_4) = 1,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$; $c(\text{Fe}^{3+}) = 6 \cdot 10^{-8} \text{ mol/dm}^3$; $c(\text{phen}) = 4 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$; $c(\text{Dimetoat}) = 22,48 \mu\text{g/cm}^3$; $t = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Zato je u cilju određivanja reda reakcije u odnosu na koncentraciju $[\text{H}_3\text{O}^+]$ jona predstavljena zavisnost $-\log \text{tg}\alpha$ od $-\log [\text{H}_3\text{O}^+]$ i iz nagiba prave prema apscisi određen je red katalitičke reakcije -0,46 u intervalu pH od 4 do 4,7, dok je red katalitičko-inhibitorne reakcije 0,16 u intervalu pH od 4,5 do 5.

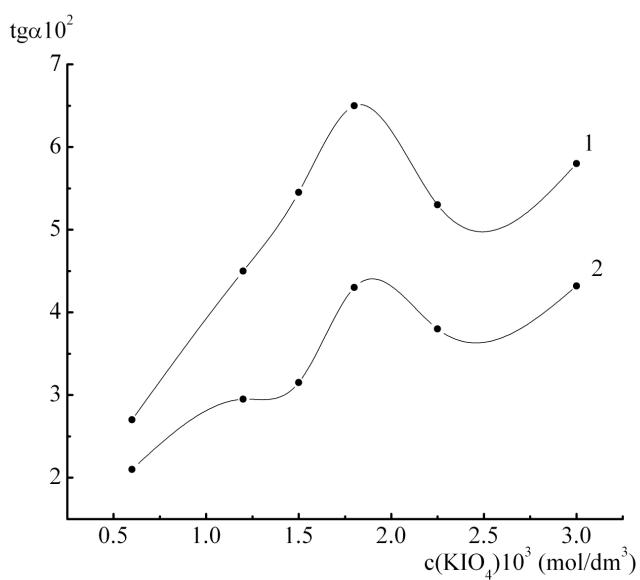
Zavisnost $-\log \text{tg}\alpha$ od $-\log [\text{H}_3\text{O}^+]$ za katalitičku reakciju je prikazana na slici 66.

U cilju određivanja optimalnih uslova odigravanja reakcije, ispitana je uticaj koncentracije KIO_4 na brzinu katalitičke i katalitičko-inhibitorne reakcije.

Grafička zavisnost $\text{tg}\alpha$ za katalitičku i katalitičko-inhibitornu reakciju od koncentracije KIO_4 data je na slici 67.

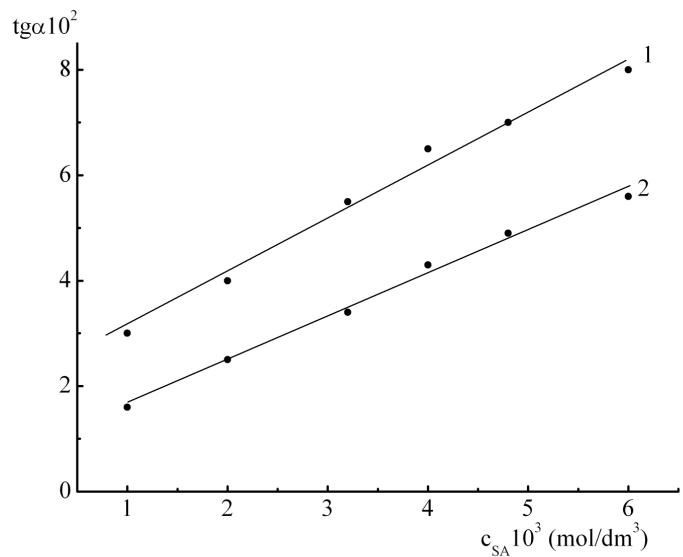
Na slici 67 vidi se da brzina katalitičke reakcije raste u intervalu KIO_4 od $0,6 \cdot 10^{-3}$ do $1,8 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$, zatim opada do koncentracije $2,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$ i opet raste. Katalitičko-inhibitorna reakcija se ponaša isto.

Za dalji rad je odabrana koncentracija kalijum-perjodata od $1,8 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$ i u daljem ispitivanju održavana konstantnom. Katalitička i katalitičko-inhibitorna reakcija su +1 reda u intervalu koncentracija KIO_4 od $0,6 \cdot 10^{-3}$ do $1,8 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$.



Slika 67. Zavisnost brzine katalitičke (1) i katalitičko-inhibitorne (2) reakcije od KIO_4 sistemu: $pH = 4,7$; $c(\text{SA}) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$; $c(\text{Fe}^{3+}) = 6 \cdot 10^{-8} \text{ mol/dm}^3$; $c(\text{phen}) = 4 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$; $c(\text{Dimetoat}) = 22,48 \mu\text{g/cm}^3$; $t = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Ispitivanjem uticaja koncentracije sulfanilne kiseline na brzinu katalitičke i katalitičko-inhibitorne reakcije vidi se da je maksimalna razlika u brzinama reakcija pri koncentraciji sulfanilne kiseline $4 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$, tako da je ova koncentracija odabrana kao optimalna i u daljem radu je održavana konstantnom. Ova zavisnost prikazana je na slici 68.

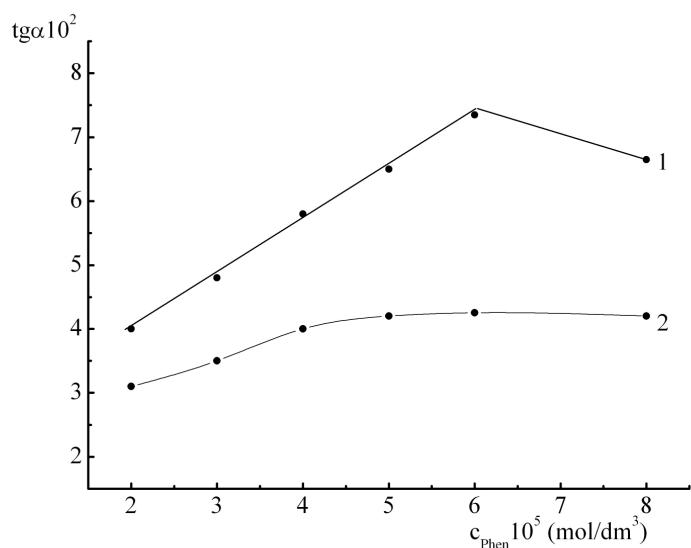


Slika 68. Zavisnost brzine katalitičke (1) i katalitičko-inhibitorne (2) reakcije od koncentracije SA u sistemu: $pH = 4,7$; $c(\text{KIO}_4) = 1,8 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$; $c(\text{Fe}^{3+}) = 6 \cdot 10^{-8} \text{ mol/dm}^3$; $c(\text{phen}) = 4 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$; $c(\text{Dimetoat}) = 22,48 \mu\text{g/cm}^3$; $t = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Sa slike 68 se vidi da su katalitička i katalitičko-inhibitorna reakcija +1 reda u celom ispitivanom intervalu koncentracija sulfanilne kiseline.

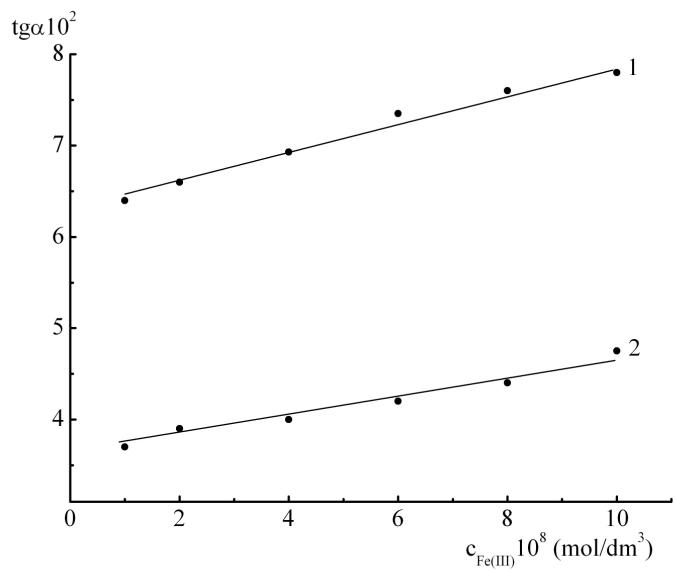
Ispitivanjem uticaja 1,10-fenantrolina na brzinu katalitičke i katalitičko-inhibitorne reakcije vidi se da je najveća razlika u brzinama pri koncentraciji fenantrolina od $6 \cdot 10^{-5}$ mol/dm³, tako da je ova koncentracija odabrana za dalje ispitivanje. Brzina katalitičke reakcije od koncentracije fenantrolina raste od $2 \cdot 10^{-5}$ do $6 \cdot 10^{-5}$ mol/dm³ tako da je u ovom intervalu red katalitičke reakcije +1, dok pri većim koncentracijama brzina reakcije opada te je red reakcije -1. Ova zavisnost je prikazana na slici 69.

Brzina katalitičko-inhibitorne reakcije raste veoma sporo u intervalu koncentracija fenantrolina od $2 \cdot 10^{-5}$ do $5 \cdot 10^{-5}$ mol/dm³, a pri većim koncentracijama fenantrolin nema uticaja na brzinu katalitičko-inhibitorne reakcije, te je red reakcije nulti.



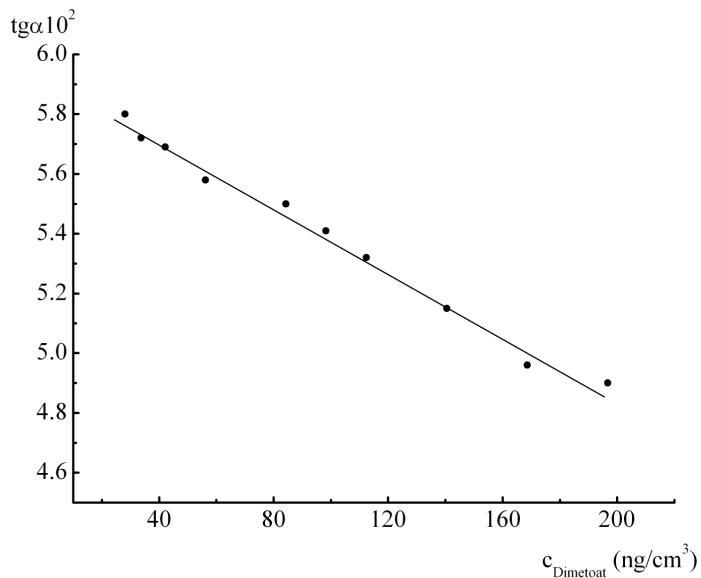
Slika 69. Zavisnost brzine katalitičke (1) i katalitičko-inhibitorne (2) reakcije od 1,10-fenantrolina u sistemu: pH = 4,7; c(KIO₄) = $1,8 \cdot 10^{-3}$ mol/dm³; c(SA) = $4 \cdot 10^{-3}$ mol/dm³; c(Fe³⁺) = $6 \cdot 10^{-8}$ mol/dm³; c(Dimetroat) = 22,48 µg/cm³; t = $25,0 \pm 0,1$ °C.

Na slici 70 prikazana je zavisnost brzine katalitičke i katalitičko-inhibitorne reakcije od koncentracije Fe³⁺ jona. Obe reakcije su +1 reda u celom ispitivanom intervalu koncentracija. Za dalji rad je odabrana koncentracija Fe³⁺ jona od $6 \cdot 10^{-8}$ mol/dm³.



Slika 70. Zavisnost brzine katalitičke (1) i katalitičko-inhibitorne (2) reakcije od Fe^{3+} jona u sistemu: $\text{pH} = 4,7$; $c(\text{KIO}_4) = 1,8 \cdot 10^{-3} \text{ mol}/\text{dm}^3$; $c(\text{SA}) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol}/\text{dm}^3$; $c(\text{phen}) = 6 \cdot 10^{-5} \text{ mol}/\text{dm}^3$; $c(\text{Dimetoat}) = 22,48 \mu\text{g}/\text{cm}^3$; $t = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

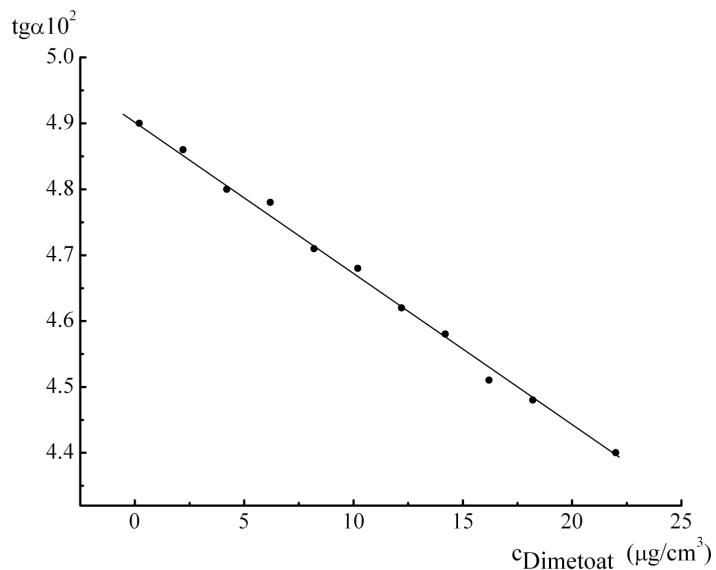
Pri optimalnim uslovima odigravanja reakcije : $\text{pH} = 4,7$; $c(\text{KIO}_4) = 1,8 \cdot 10^{-3} \text{ mol}/\text{dm}^3$; $c(\text{SA}) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol}/\text{dm}^3$; $c(\text{phen}) = 6 \cdot 10^{-5} \text{ mol}/\text{dm}^3$; $c(\text{Fe}^{3+}) = 6 \cdot 10^{-8} \text{ mol}/\text{dm}^3$; $t = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$, praćena je zavisnost brzine reakcije od koncentracije dimetoata.



Slika 71. Kalibraciona kriva za određivanje dimetoata u intervalu koncentracija 28,10 - 196,70 ng/cm^3 pri optimalnim uslovima određivanja: $\text{pH} = 4,7$; $c(\text{KIO}_4) = 1,8 \cdot 10^{-3} \text{ mol}/\text{dm}^3$; $c(\text{SA}) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol}/\text{dm}^3$; $c(\text{phen}) = 6 \cdot 10^{-5} \text{ mol}/\text{dm}^3$; $c(\text{Fe}^{3+}) = 6 \cdot 10^{-8} \text{ mol}/\text{dm}^3$; $t = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Na slici 71 je prikazana zavisnost brzine reakcije od koncentracije inhibitora u intervalu od 28,10 do 196,70 ng/cm³.

Pri istim uslovima određivanja konstruisana je kalibraciona kriva za određivanje dimetoata u intervalu koncentracija od 0,196 do 22,48 µg/cm³ (slika 72).



Slika 72. Kalibraciona kriva za određivanje dimetoata u intervalu koncentracija 0,196 - 22,48 µg/cm³ pri optimalnim uslovima određivanja: pH = 4,7; $c(\text{KIO}_4) = 1,8 \cdot 10^{-3}$ mol/dm³; $c(\text{SA}) = 4 \cdot 10^{-3}$ mol/dm³; $c(\text{phen}) = 6 \cdot 10^{-5}$ mol/dm³; $c(\text{Fe}^{3+}) = 6 \cdot 10^{-8}$ mol/dm³; $t = 25,0 \pm 0,1$ °C.

Jednačine kalibracione prave na temperaturi $25,0 \pm 0,1$ °C za ispitivani interval koncentracija dimetoata od 28,10 do 196,70 ng/cm³ i od 0,196 do 22,48 µg/cm³, mogu se prikazati sledećim jednačinama:

$$\text{tg}\alpha \cdot 10^2 = -0,00539 \cdot c_{\text{Dimetoat}} + 5,92 \quad r = -0,9951 \quad (62)$$

$$\text{tg}\alpha \cdot 10^2 = -0,02405 \cdot c_{\text{Dimetoat}} + 4,914 \quad r = -0,9958 \quad (63)$$

gde je:

c_{Dimetoat} - koncentracija dimetoata

$\text{tg}\alpha$ - nagib linearog dela kinetičke prave u koordinatnom sistemu A = f(t)

r - koeficijent korelacijske.

Na osnovu prikazanih zavisnosti između brzine katalitičke i katalitičko-inhibitorne reakcije oksidacije sulfanilne kiseline kalijum-perjodatom u acetatnom puferu u prisustvu Fe³⁺ jona i 1,10-fenantrolina, od koncentracije svakog reaktanta pojedinačno, postavljene su odgovarajuće kinetičke jednačine za oba procesa.

Kinetičke jednačine za katalitičku i katalitičko-inhibitornu reakciju su sledeće:

$$-\frac{dc}{dt} = k_1 \cdot c(H^+)^{-0,46} \cdot c(KIO_4) \cdot c(SA) \cdot c(Fe^{3+}) \cdot c(Phen) \quad (64)$$

$$-\frac{dc}{dt} = k_2 \cdot c(H^+)^{+0,16} \cdot c(KIO_4) \cdot c(SA) \cdot c(Fe^{3+}) \cdot c(Dimetoat)^{-1} \quad (65)$$

gde je :

dc/dt – promena koncentracije indikatorske supstance,

k_1 - uslovna konstanta brzine katalitičke reakcije,

k_2 - uslovna konstanta brzine katalitičko-inhibitorne reakcije.

Kinetička jednačina za katalitičku reakciju važi u intervalu pH od 4,3 do 4,7, u intervalu koncentracija KIO_4 od $0,6 \cdot 10^{-3}$ do $1,8 \cdot 10^{-3}$ mol/dm³, u intervalu koncentracija sulfanilne kiseline od $1 \cdot 10^{-3}$ do $6 \cdot 10^{-3}$ mol/dm³, u intervalu koncentracija fenantrolina od $2 \cdot 10^{-5}$ do $6 \cdot 10^{-5}$ mol/dm³ i u celom ispitivanom intervalu koncentracija Fe^{3+} jona.

Kinetička jednačina za katalitičko-inhibitornu reakciju važi u intervalu pH od 4,5 do 5, u intervalu koncentracija KIO_4 od $0,6 \cdot 10^{-3}$ do $1,8 \cdot 10^{-3}$ mol/dm³, u celom ispitivanom intervalu koncentracija sulfanilne kiseline, u intervalu koncentracija fenantrolina od $4 \cdot 10^{-5}$ do $8 \cdot 10^{-5}$ mol/dm³, u celom ispitivanom intervalu koncentracija Fe^{3+} i u intervalu koncentracija dimetoata od 28,10 do 196,70 ng/cm³ i 0,196 do 22,0 µg/cm³.

Analitički i statistički podaci za kalibracionu pravu, dobijeni metodom linearne regresije u kompjuterskom programu *Origin 6.1*, dati su u tabeli 51.

Tabela 51. Analitičke i statističke karakteristike kalibracione krive za određivanje dimetoata

Parametri	
Opseg linearnosti (ng/cm ³)	28,10 - 196,70 n=10
Opseg linearnosti (µg/cm ³)	0,196 - 22,48 n=11
Jednačina kalibracione prave	$tga \cdot 10^2 = -0,00539 \cdot c_{Dimetoat} + 5,92$ $tga \cdot 10^2 = -0,02405 \cdot c_{Dimetoat} + 4,914$
(Nagib \pm SD) $\cdot 10^2$	-0,00539 \pm 1,881 $\cdot 10^{-4}$
(Odsečak \pm SD) $\cdot 10^2$	5,92 \pm 0,02
Koeficijent korelacije, r	-0,9951 -0,9958
Varijansa ($S \cdot 10^{-2}$) ² (ng/cm ³) ²	$1,08 \cdot 10^{-7}$
Granica detekcije (ng/cm ³)	0,82
Granica određivanja (ng/cm ³)	3,85

Da bi se odredila tačnost i reproduktivnost određivanja dimetoata opisanom kinetičkom metodom, pojedinačno su izračunavani tga iz zavisnosti $A = f(t)$ za tri koncentracije inhibitora u pet ponavljanja. Korišćenjem kalibracione krive i statističkom obradom rezultata merena dobijeni su rezultati koji su prikazani u tabeli 52.

Tabela 52. Tačnost i reproduktivnost određivanja dimetoata

Odmereno (ng/cm ³)	Nadeno $\bar{x} \pm SD$ (ng/cm ³)	n	RSD (%)	G (%)	$\frac{\bar{x} - \mu}{\mu} \cdot 100$ (%)	Recovery (%)
28,10	27,13±0,01		4,85	6,00	3,44	96,54
98,30	96,20±0,02	5	2,27	2,82	2,33	97,86
196,70	193,80±0,01		1,20	1,26	1,46	98,52

Za ocenu selektivnosti metode ispitan je uticaj većeg broja stranih jona na brzinu reakcije, pri stalnoj koncentraciji dimetoata od 84,30 ng/cm³.

Tabela 53. Selektivnost određivanja dimetoata

Jonska vrsta	q	I, %
Li ⁺ , Na ⁺ , K ⁺ , Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Ba ²⁺ , F ⁻ , Cl ⁻ , SO ₄ ²⁻ , NO ₃ ⁻ , As ⁵⁺	10 ⁴	< 5
NH ₄ ⁺ , Zn ²⁺	10 ³	< 5
C ₂ O ₄ ²⁻ , Al ³⁺ , As ³⁺ , Mo ⁶⁺	10 ²	5 - 10
Ni ²⁺ , Hg ²⁺ , V ⁵⁺	10	< 5
Mn ²⁺ , SO ₄ ²⁻ , Sn ²⁺	1	5 - 10
Co ²⁺	0,1	5 - 10
Cu ²⁺	ometa u svim odnosima	

q - odnos koncentracije jona i dimetoata

$$I - \text{interferencijski koeficijent}, I = \frac{(c_{DIM}^o - c_{DIM})}{c_{DIM}^o}$$

c_{DIM}^o i c_{DIM} - koncentracija dimetoata bez i u prisustvu interferirajuće supstance (dobijena iz jednačine kalibracione prave)

Iz tabele 53 može se zaključiti da joni Cu²⁺ ometaju određivanje dimetoata pomenutom indikatorskom reakcijom u svim odnosima.

5.4.1. Primena kinetičke metode za određivanje dimetoata u uzorcima vode i mleka

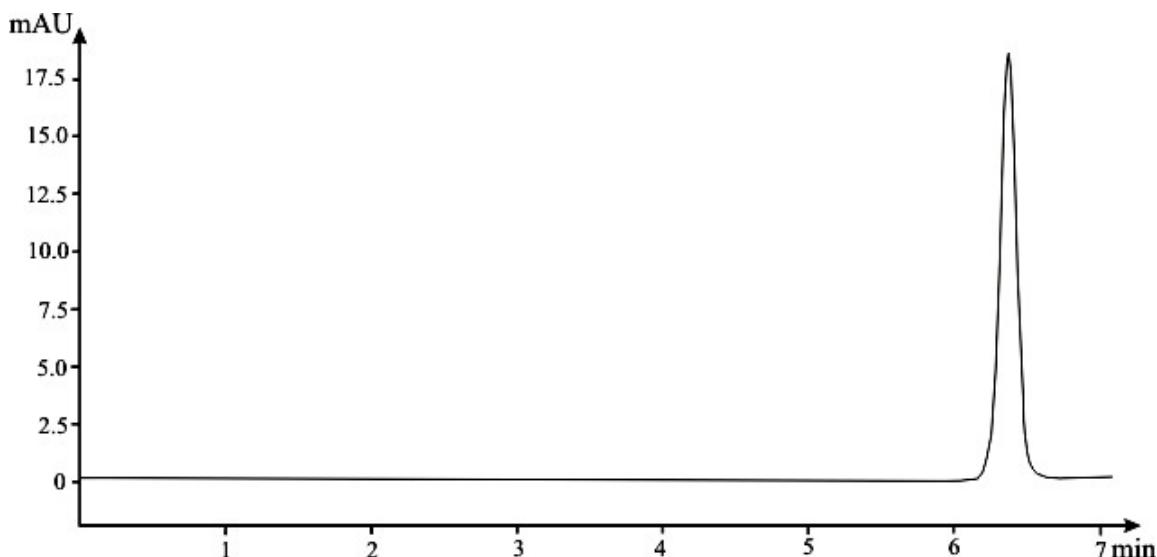
Na osnovu razrađene kinetičke metode za određivanje dimetoata, koja se bazira na njegovom inhibitornom dejstvu u reakciji oksidacije sulfanilne kiseline kalijum-perjodatom u acetatnom puferu pri pH 4,7 u prisustvu Fe^{3+} jona i 1,10-fenantrolina i konstruisanih kalibracionih krivih za određivanje dimetoata u intervalu koncentracija od 28,10 do 196,70 ng/cm³ i 0,196 do 22,48 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$, metoda je primenjena za određivanje sadržaja dimetoata u uzorcima vode i mleka.

Uzorci dimetoata su pripremani prema postupku koji su dali Luke i Doose (1983) opisanom u "Eksperimentalnom delu". Kao referenta metoda korišćena je HPLC analiza.

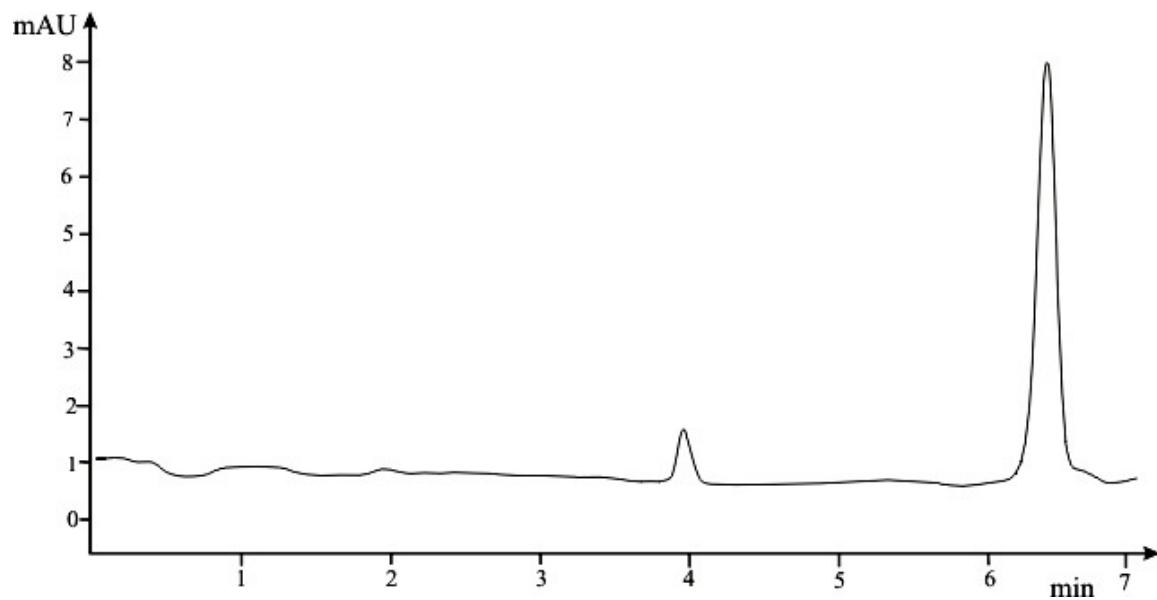
Snimanjem HPLC hromatograma vidi se karakterističan pik na talasnoj dužini od 210 nm i retencionom vremenu od 6,39 minuta za dimetoat.

HPLC hromatogram standardnog rastvora dimetoata prikazan je na slici 73. HPLC hromatogrami određivanja dimetoata u uzorcima vode i mleka prikazani su na slikama 74 i 75.

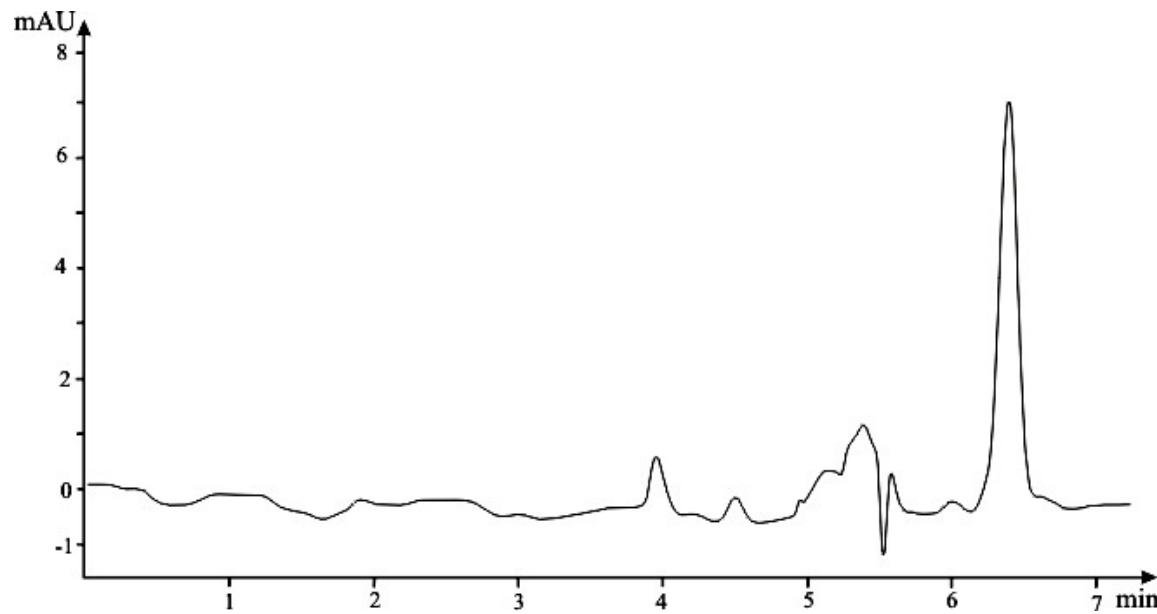
Dobijeni hromatogrami standarda i uzorka pokazuju poklapanje retencionih vremena za analiziranu komponentu - dimetoat. U cilju kvantitativne analize, određena je integrisana površina za dati pik i sa kalibracionog dijagrama za date vrednosti apsorbancije izračunate su koncentracije dimetoata u ispitivanim uzorcima.



Slika 73. HPLC hromatogram standardnog rastvora dimetoata, pri koncentraciji 80 ng/cm³. Kolona C₁₈ (Zorbax, 5 μm , 250 x 4,6 mm). Mobilna faza: ACN-voda (80:20, v/v). Detekcija 210 nm.



Slika 74. HPLC hromatogram uzorka vode pri koncentraciji dimetoata 35 ng/cm^3 . Kolona C₁₈ (Zorbax, 5 μm , 250 x 4,6 mm). Mobilna faza: ACN-voda (80:20, v/v). Detekcija 210 nm.



Slika 75. HPLC hromatogram uzorka mleka pri koncentraciji dimetoata 30 ng/cm^3 . Kolona C₁₈ (Zorbax, 5 μm , 250 x 4,6 mm). Mobilna faza: ACN-voda (80:20, v/v). Detekcija 210 nm.

Količina dimetoata koja je određena u ispitivanim uzorcima u skladu je sa referentnom HPLC metodom.

Podaci o sadržaju dimetoata u uzorcima vode i mleka određeni kinetičkom i HPLC metodom dati su u tabelama 54 i 55.

Tabela 54. Tačnost i reproduktivnost određivanja dimetoata u uzorcima voda

Metoda kalibracione prave (ng/cm ³)			HPLC metoda (ng/cm ³)	n	RSD (%)	Recovery (%)
Uzorak vode	Odmereno $\bar{x} \pm SD$	Nađeno $\bar{x} \pm SD$				
Rečna	35,0	30,10±0,01	31,00±0,01	5	3,33	86,00
Bunarska	48,0	38,20±0,02	38,58±0,02		3,48	79,50
Česmenska	55,0	46,98±0,01	48,60±0,02		4,00	85,41

Poređenjem standardnih devijacija F - test i srednjih vrednosti, t - test, pri 95 %-tnom nivou poverenja i za dati broj stepena slobode, uočeno je da između kinetičke i referentne HPLC metode ne postoji velika razlika u preciznosti.

Tabela 55. Tačnost i reproduktivnost određivanja dimetoata u uzorcima mleka

Metoda kalibracione prave (ng/cm ³)			HPLC metoda (ng/cm ³)	n	RSD (%)	Recovery (%)
Uzorak mleka	Odmereno $\bar{x} \pm SD$	Nađeno $\bar{x} \pm SD$				
Kravica	30,0	23,20±0,02	23,1±0,02	5	5,62	77,33
Dukat	45,0	35,30±0,02	36,70±0,01		6,00	78,40
Niško	55,0	44,20±0,01	45,00±0,01		3,84	80,30

Tabela 56. t- i F - vrednosti dobijene primenom dve različite metode za određivanje dimetoata u uzorcima voda

Metoda kalibracione prave (ng/cm ³)			HPLC metoda (ng/cm ³)	t-test	F-test
Uzorak vode	Odmereno $\bar{x} \pm SD$	Nadeno $\bar{x} \pm SD$			
Rečna	35,0	30,10±0,01	31,00±0,01	1,87	1,79
Bunarska	48,0	38,20±0,02	38,58±0,02	0,84	2,95
Česmenska	55,0	46,98±0,01	48,60±0,02	1,50	1,07

Tabela 57. t- i F - vrednosti dobijene primenom dve različite metode za određivanje dimetoata u uzorcima mleka

Metoda kalibracione prave (ng/cm ³)			HPLC metoda (ng/cm ³)	t-test*	F-test*
Uzorak mleka	Odmereno $\bar{x} \pm SD$	Nadeno $\bar{x} \pm SD$			
Kravica	30,0	23,20±0,02	23,10±0,02	1,35	2,42
Dukat	45,0	35,30±0,02	36,70±0,01	0,85	1,13
Niško	55,0	44,20±0,01	45,00±0,01	1,74	1,58

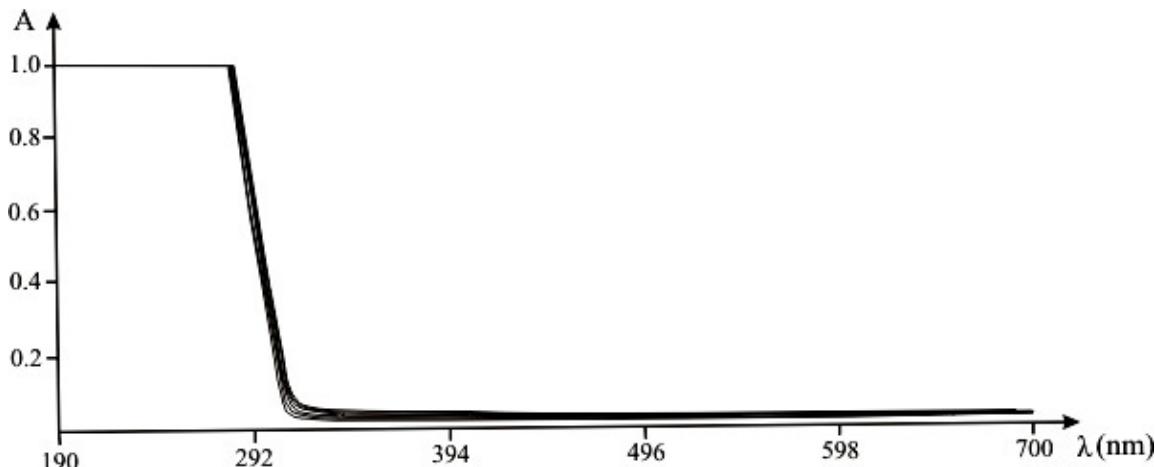
*Tablične F - ($v_1 = 4$ i $v_2 = 4$) i t - vrednosti ($v = 8$) pri 95 %-tnom nivou poverenja su 6,39 i 2,306, respektivno.

5.5. Kinetičko određivanje mikrokoličina bromfenoksima

Kinetičko-spektrofotometrijska metoda za određivanje bromfenoksima zasniva se na njegovom inhibitornom delovanju u reakciji oksidacije sulfanilne kiseline vodonik peroksidom u prisustvu Cu^{2+} jona.

Na slici 51 (poglavlje 5.3.) prikazan je apsorpcioni spektar tokom vremena od 6 minuta u sistemu koji sadrži sulfanilnu kiselinu (SA), vodonik-peroksid, Cu^{2+} jone i fosfatni pufer. Spektrofotometrijskim praćenjem promene apsorbance u funkciji od vremena u pomenutom sistemu, uočava se linearno povećanje apsorbance tokom vremena na talasnoj dužini od 370 nm.

Na slici 76 vidi se da u prisustvu mikrokoličina bromfenoksima (BrFX), u ovom sistemu dolazi do znatnog smanjenja brzine reakcije. Inhibitorni uticaj BrFX je iskorišćen za njegovo određivanje u reakciji oksidacije sulfanilne kiseline vodonik peroksidom u prisustvu Cu^{2+} jona.



Slika 76. Apsorpcioni spektar tokom vremena od 6 minuta u sistemu: fosfatni pufer : pH = 7,9; $c(\text{H}_2\text{O}_2) = 0,2 \text{ mol/dm}^3$; $c(\text{SA}) = 6 \cdot 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$; $c(\text{Cu}^{2+}) = 4 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$ $c(\text{BrFX}) = 13,86 \mu\text{g/cm}^3$; $t = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

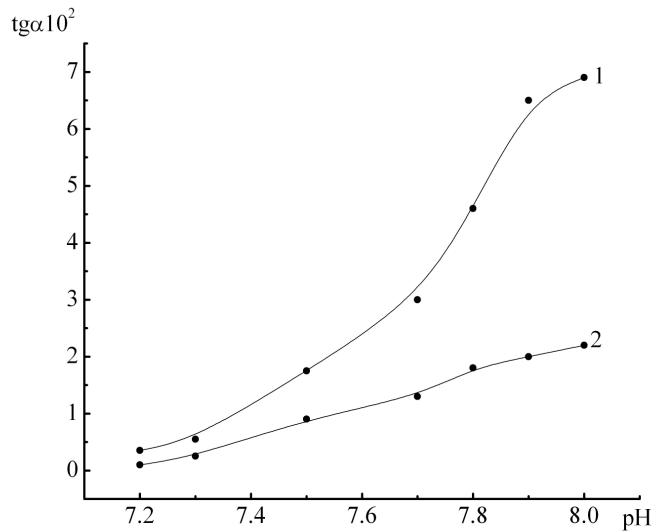
Za obradu kinetičkih podataka primenjena je tangensna metoda, zbog linearne zavisnosti apsorbance u rastvoru tokom 5-6 minuta od početka odigravanja reakcije.

U cilju razrade što osjetljivije metode za određivanje mikrogramskih količina BrFX, bilo je potrebno odrediti optimalne uslove odigravanja reakcije. U tu svrhu praćena je promena brzine katalitičke i katalitičko-inhibitorne reakcije od koncentracije svakog reaktanta pojedinačno (H_3O^+ -jona, H_2O_2 , SA, Cu^{2+}).

Grafička zavisnost tga za katalitičku i katalitičko-inhibitornu reakciju od pH vrednosti fosfatnog pufera data je na slici 77.

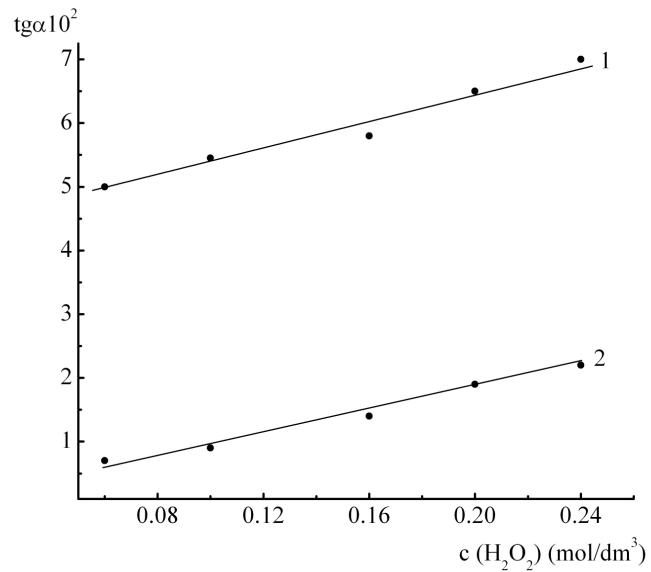
Zavisnost brzine katalitičke i katalitičko-inhibitorne reakcije ispitivana je u intervalu pH vrednosti od 7,2 do 8. Sa povećanjem pH vrednosti fosfatnog pufera brzina katalitičke i katalitičko-inhibitorne reakcije rastu. Za optimalnu pH vrednost odabранo je

pH 7,9. Sa slike 77 se vidi da je zavisnost brzine katalitičke i katalitičko-inhibitorne reakcije linearna u celom ispitivanom intervalu pH, pa je red katalitičke reakcije u odnosu na koncentraciju $[H_3O^+]$ jona -1,1 a katalitičko-inhibitorne reakcije -1.



Slika 77. Zavisnost brzine katalitičke (1) i katalitičko-inhibitorne (2) reakcije od pH u sistemu: $c(SA) = 6 \cdot 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$; $c(H_2O_2) = 0,2 \text{ mol/dm}^3$; $c(Cu^{2+}) = 4 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$; $c(BrFX) = 13,86 \mu\text{g/cm}^3$; $t = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

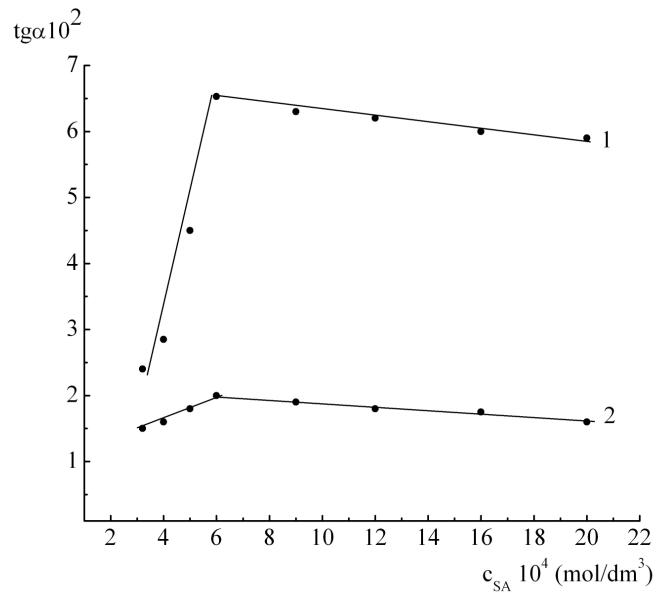
Zavisnost brzine katalitičke i katalitičko-inhibitorne reakcije od koncentracije H_2O_2 ispitivana je u intervalu koncentracija od 0,06 do 0,24 mol/dm³ (slika 78).

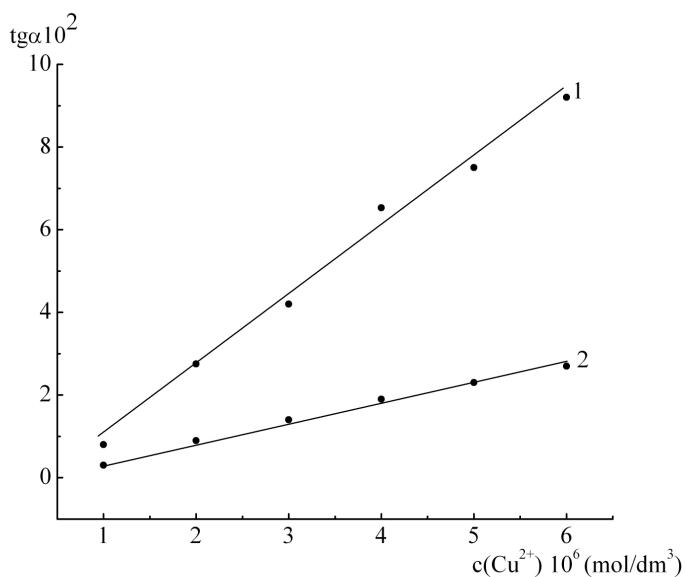


Slika 78. Zavisnost brzine katalitičke (1) i katalitičko-inhibitorne reakcije (2) od koncentracije H_2O_2 u sistemu: $pH = 7,9$, $c(SA) = 6 \cdot 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$ i $c(Cu^{2+}) = 4 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$, $c(BrFX) = 13,86 \mu\text{g/cm}^3$; $t = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Brzine obe reakcije linearno rastu u celom ispitivanom intervalu koncentracija, tako da su reakcije + 1 reda. Najveća razlika u brzini između katalitičke i katalitičko-inhibitorne reakcije zapaža se pri koncentraciji H_2O_2 od $0,2 \text{ mol/dm}^3$, tako da je ova koncentracija odabrana za optimalnu i u daljem radu održavana konstantnom.

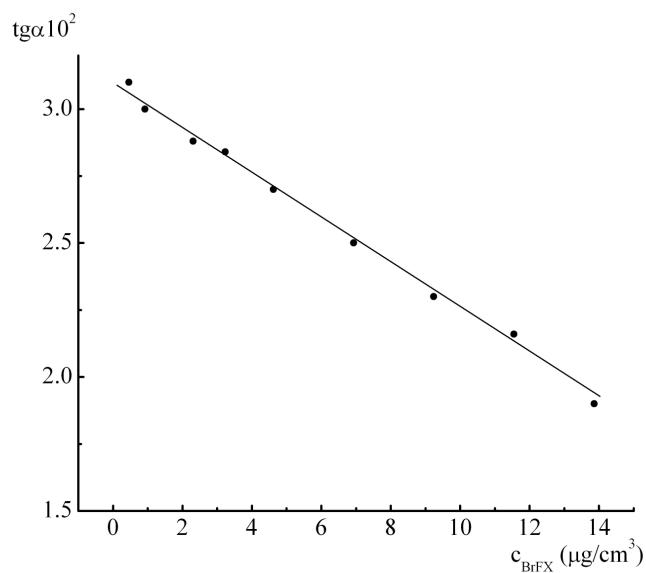
Uticaj koncentracije sulfanilne kiseline na brzinu katalitičke i katalitičko-inhibitorne reakcije ispitana je tako što su pH i koncentracije ostalih komponenata u sistemu održavane konstantnim, a koncentracija SA je menjana u opsegu od $3,2 \cdot 10^{-4}$ do $20 \cdot 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$. Ova zavisnost je prikazana na slici 79.





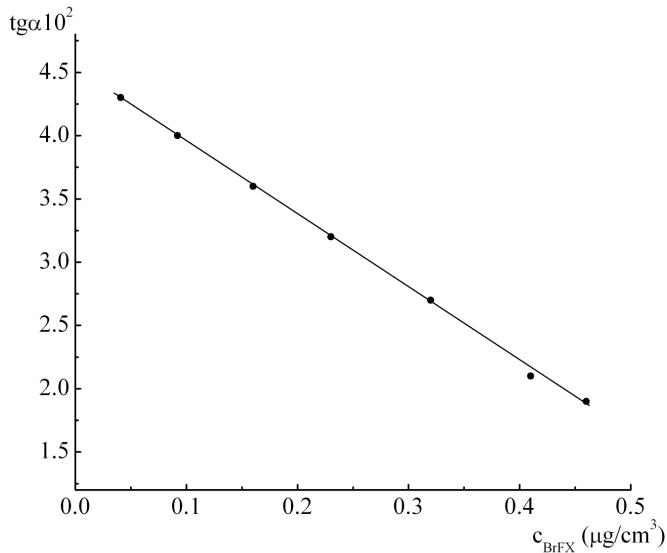
Slika 80. Zavisnost brzine katalitičke (1) i katalitičko-inhibitorne reakcije (2) od koncentracije Cu^{2+} jona u sistemu : $\text{pH} = 7,9$; $c(\text{SA}) = 6 \cdot 10^{-4} \text{ mol}/\text{dm}^3$; $c(\text{H}_2\text{O}_2) = 0,2 \text{ mol}/\text{dm}^3$; $c(\text{BrFX}) = 13,86 \mu\text{g}/\text{cm}^3$; $t = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Pri optimalnim uslovima odigravanja reakcije $\text{pH} = 7,9$, $c(\text{SA}) = 6 \cdot 10^{-4} \text{ mol}/\text{dm}^3$, $c(\text{H}_2\text{O}_2) = 0,2 \text{ mol}/\text{dm}^3$, $c(\text{Cu}^{2+}) = 4 \cdot 10^{-6} \text{ mol}/\text{dm}^3$, $t = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$, praćen je uticaj BrFX na brzinu reakcije.



Slika 81. Kalibraciona kriva za određivanje BrFX u intervalu koncentracija od 0,46 do $13,86 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ pri optimalnim uslovima određivanja: $\text{pH} = 7,9$; $c(\text{SA}) = 6 \cdot 10^{-4} \text{ mol}/\text{dm}^3$; $c(\text{H}_2\text{O}_2) = 0,2 \text{ mol}/\text{dm}^3$; $c(\text{Cu}^{2+}) = 4 \cdot 10^{-6} \text{ mol}/\text{dm}^3$; $t = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Dobijena kalibraciona prava je linearna u intervalu koncentracije BrFX od 0,46 do 13,86 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ i od 0,041 do 0,46 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$, i može poslužiti za određivanje bromfenoksima u rastvoru (slike 81 i 82).



Slika 82. Zavisnost brzine reakcije od koncentracije BrFX u intervalu koncentracija 0,041 - 0,46 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ pri optimalnim uslovima određivanja: $pH = 7,9$; $c(\text{SA}) = 6 \cdot 10^{-4}$ mol/dm 3 ; $c(\text{H}_2\text{O}_2) = 0,2$ mol/dm 3 ; $c(\text{Cu}^{2+}) = 4 \cdot 10^{-6}$ mol/dm 3 ; $t = 25,0 \pm 0,1$ °C.

Kalibraciona prava za određivanje bromfenoksima na temperaturi 25 °C u intervalu koncentracija BrFX 0,46 - 13,86 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ može se izraziti sledećom jednačinom:

$$\text{tg}\alpha \cdot 10^2 = -0,0852 \cdot c_{\text{BrFX}} + 3,10 \quad r = -0,9979 \quad (66)$$

dok se kalibraciona prava u intervalu koncentracija BrFX od 0,041 - 0,46 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ može se izraziti jednačinom:

$$\text{tg}\alpha \cdot 10^2 = -5,83 \cdot c_{\text{BrFX}} + 4,534 \quad r = -0,9995 \quad (67)$$

gde je:

c_{BrFX} - koncentracija bromfenoksima izražena u $\mu\text{g}/\text{cm}^3$

$\text{tg}\alpha$ - nagib linearnog dela kinetičke krive u koordinatnom sistemu $A = f(t)$

r - koeficijent korelacije.

Na osnovu prethodno utvrđenih zavisnosti između koncentracije svakog pojedinačnog učesnika reakcije i brzine reakcije, kao i reda reakcije, postavljene su kinetičke jednačine za katalitičku i katalitičko-inhibitornu reakciju.

Kinetička jednačina za katalitičku reakciju, prikazana jednačinom (68), važi pri uslovima: pH od 7,5 do 7,9; c(H₂O₂) od 0,06 do 0,24 mol/dm³; c(SA) od 3,2 do 6·10⁻⁴ mol/dm³; c(Cu²⁺) od 1·10⁻⁶ do 6·10⁻⁶ mol/dm³.

$$-\frac{dc}{dt} = k_1 \cdot c(H^+)^{-1,1} \cdot c(H_2O_2) \cdot c(SA) \cdot c(Cu^{2+}) \quad (68)$$

Kinetička jednačina za katalitičko-inhibitornu reakciju, prikazana jednačinom (69), važi pri sledećim uslovima: pH od 7,3 do 7,9; c(H₂O₂) od 0,06 do 0,24 mol/dm³; c(SA) od 3,2 do 6·10⁻⁴ mol/dm³; c(Cu²⁺) od 1·10⁻⁶ do 6·10⁻⁶ i koncentraciji BrFX od 0,041 do 0,46 µg/cm³ i od 0,46 do 13,86 µg/cm³.

$$-\frac{dc}{dt} = k_2 \cdot c(H^+)^{-1} \cdot c(H_2O_2) \cdot c(SA) \cdot c(Cu^{2+}) \cdot c(BrFX)^{-1} \quad (69)$$

gde su k₁ i k₂ konstante brzina katalitičke i katalitičko-inhibitorne reakcije.

Analitički i statistički podaci za kalibracionu pravu, dobijeni metodom linearne regresije u kompjuterskom programu *Origin 6.1*, dati su u tabeli 58.

Tabela 58. Analitičke i statističke karakteristike kalibracione prave za određivanje BrFX

Parametri	
Opseg linearnosti (µg/cm ³)	0,46 - 13,86 n = 9 0,041 - 0,46 n = 7
Jednačina kalibracione prave	tga · 10 ² = - 0,0852 · c _{BrFX} + 3,10 tga · 10 ² = - 5,83 · c _{BrFX} + 4,534
(Nagib ± SD) · 10 ²	- 0,0852 ± 0,00204
(Odsečak ± SD) · 10 ²	3,10 ± 0,0151
Koeficijent korelacije, r	- 0,9979 - 0,9995
Varijansa (S · 10 ²) ² (µg/cm ³) ²	9,6 · 10 ⁻⁷
Granica detekcije (µg/cm ³)	0,0077
Granica određivanja (µg/cm ³)	0,025

Tačnost i reproduktivnost metode određeni su za 3 koncentracije BrFX sa kalibracione prave, pri čemu je izvedeno pet merenja za svaku koncentraciju. Statističkom obradom podataka dobijeni su rezultati koji su sumirani u tabeli 59.

Kao što se može videti, relativna greška se kreće od 1,34 do 1,4 % za interval koncentracija BrFX od 0,041 do 0,46 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$.

Tabela 59. Tačnost i reproduktivnost određivanja BrFX

Odmereno ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$)	Nađeno $\bar{x} \pm \text{SD}$ ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$)	n	RSD (%)	G (%)	$\frac{\bar{x} - \mu}{\mu} \cdot 100$ (%)	Recovery (%)
0,041	0,037 \pm 0,001		3,0	1,34	9,75	90,24
0,24	0,23 \pm 0,01	5	5,32	2,37	4,16	95,83
0,46	0,45 \pm 0,01		2,85	1,4	2,22	97,82

*Objašnjenje veličina i odgovarajući izrazi prikazani su u poglavlju 5.1.

U cilju ocene selektivnosti metode ispitana je uticaj većeg broja stranih jona na brzinu katalitičko-inhibitorne reakcije na temperaturi $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ pri stalnoj koncentraciji BrFX $1,80 \mu\text{g}/\text{cm}^3$.

Tabela 60. Selektivnost određivanja BrFX

Jonska vrsta	q	I, %
Li^+ , Na^+ , K^+ , NH_4^+ , NO_3^- , F^- , Cl^- , SO_3^{2-} , SO_4^{2-}	10^3	< 5
CH_3COO^- , Zn^{2+} , Ca^{2+}	10^2	< 5
Ba^{2+} , Mg^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} , W^{6+} , Mo^{6+} , Sn^{2+} , As^{3+}	10	5 - 10
V^{5+} , Al^{3+} , Cd^{2+}	1	5 - 10
Fe^{2+} , Fe^{3+}	0,1	< 5
Co^{2+} , Pb^{2+}	ometaju	

q - odnos koncentracije jona i bromfenoksima

$$I - \text{interferencijski koeficijent}, I = \frac{(c_{BrFX}^o - c_{BrFX})}{c_{BrFX}^o}$$

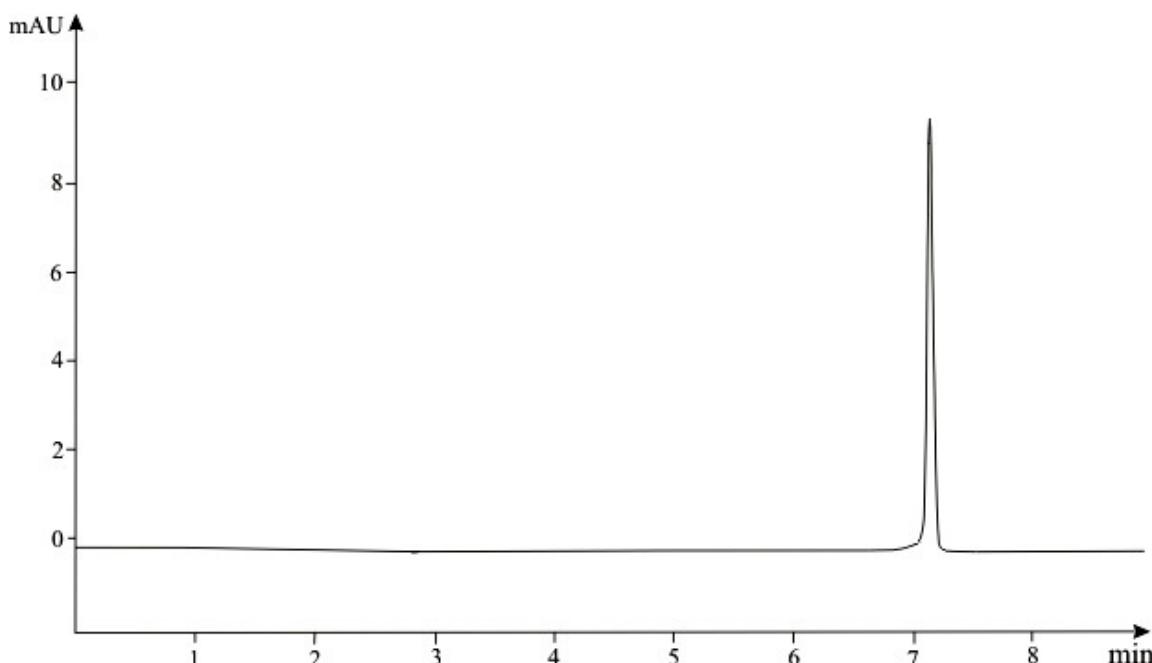
c_{BrFX}^o i c_{BrFX} - koncentracija bromfenoksima bez i u prisustvu interferirajuće supstance (dobijena iz jednačine kalibracione prave)

Iz tabele 60 može se videti da je selektivnost metode zadovoljavajuća, jer samo joni Co^{2+} i Pb^{2+} ometaju određivanje bromfenoksima pomenutom reakcijom, dok ostali ispitivani joni ne utiču na tačnost određivanja.

5.5.1. Primena kinetičke metode za određivanje bromfenoksima u sokovima

Na osnovu razrađene kinetičke metode za određivanje herbicida bromfenoksima, koja se bazira na njegovom inhibitornom dejstvu u reakciji oksidacije sulfanilne kiseline vodonik peroksidom u fosfatnom puferu pri pH 7,9 u prisustvu Cu^{2+} jona i konstruisanih kalibracionih krivih u intervalu koncentracija od 0,041 do 0,46 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ i 0,46 do 13,86 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$, metoda je primenjena za određivanje sadržaja bromfenoksima u sokovima.

Uzorci su pripremani prema postupku koji je opisan u "Eksperimentalnom delu". Kao referenta metoda korišćena je HPLC analiza.



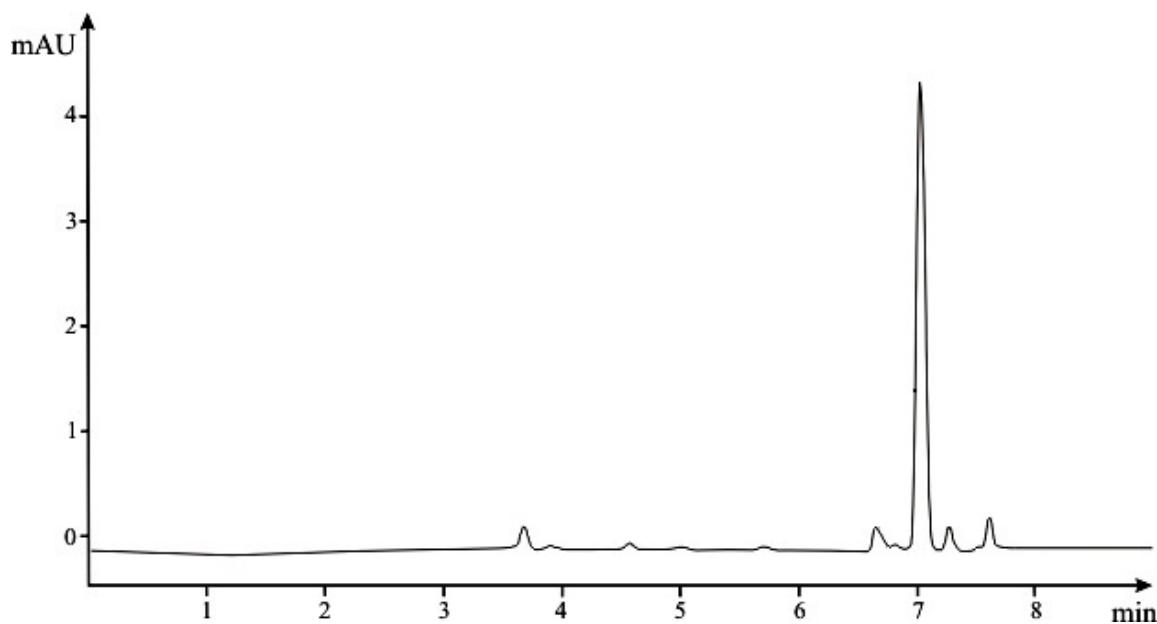
Slika 83. HPLC hromatogram standardnog rastvora pri koncentraciji BrFX 7,30 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$. Kolona C₁₈ (Zorbax, 5 μm , 250 x 4,6 mm). Mobilna faza: ACN-voda (67:33, v/v) + H_3PO_4 (0,5 %). Detekcija 210 nm.

Snimanjem HPLC hromatograma vidi se karakterističan pik na talasnoj dužini od 207 nm i retencionom vremenu od 7,1 minuta za BrFX.

HPLC hromatogrami standardnog rastvora bromfenoksima i uzorka soka od višnje prikazani su na slikama 83 i 84. Dobijeni hromatogrami standarda i uzorka pokazuju poklapanje retencionih vremena za analiziranu komponentu - BrFX. U cilju kvantitativne analize, određena je integrisana površina za dati pik i sa kalibracionog dijagrama za date vrednosti apsorbancije izračunate su koncentracije bromfenoksima u ispitivanim uzorcima.

Količina bromfenoksima koja je određena u ispitivanim uzorcima u skladu je sa referentnom HPLC metodom.

Podaci o sadržaju bromfenoksima u uzorcima sokova određeni kinetičkom i HPLC metodom dati su u tabeli 61.



Slika 84. HPLC hromatogram uzorka soka od višnje pri koncentraciji BrFX $3,60 \mu\text{g}/\text{cm}^3$. Kolona C₁₈ (Zorbax, 5 μm , 250 x 4,6 mm). Mobilna faza: ACN-voda (67:33, v/v) + H_3PO_4 (0,5 %). Detekcija 207 nm.

Tabela 61. Tačnost i reproduktivnost određivanja BrFX u uzorcima sokova

Tip uzorka	Metoda kalibracione prave ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$)		n	HPLC metoda ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$)	RSD (%)	Recovery
	Odmereno	Nađeno $\bar{x} \pm \text{SD}$				
Jabuka	1,80	1,59±0,01	5	1,60	0,62	88,33
Višnja	3,60	3,38±0,03		3,43	1,05	95,20
Narandža	2,21	2,16±0,02		2,17	1,20	97,00
Borovnica	2,77	2,57±0,01		2,61	0,77	92,0
Jabuka	0,18	0,17±0,01		0,176	8,31	94,00

Tabela 62. t - i F - vrednosti dobijene primenom dve različite metode za određivanje BrFX u uzorcima sokova

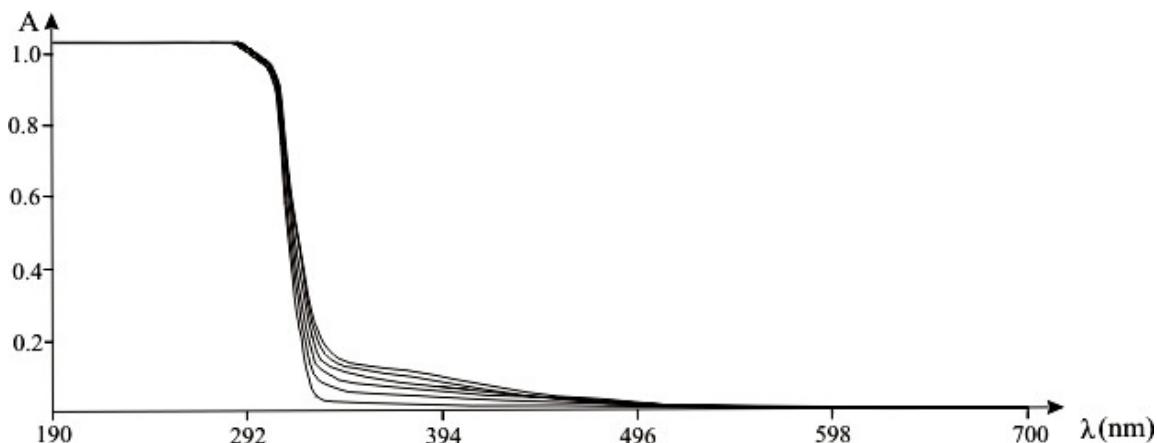
Metoda kalibracione prave ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$)			HPLC metoda ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$)	t-test*	F-test*
Tip uzorka	Odmereno $\bar{x} \pm \text{SD}$	Nadeno $\bar{x} \pm \text{SD}$			
Jabuka	1,80	1,59 \pm 0,01	1,60	1,58	1,48
Višnja	3,60	3,38 \pm 0,03	3,43	2,15	1,75
Narandža	2,21	2,16 \pm 0,02	2,17	0,56	1,08
Borovnica	2,77	2,57 \pm 0,01	2,61	2,26	1,11
Jabuka	0,18	0,17 \pm 0,01	0,176	0,77	1,78

*Tablične F - ($v_1 = 4$, $v_2 = 4$) i t - vrednosti ($v = 8$) pri 95 %-tnom nivou poverenja su 6,39 i 2,306, respektivno.

Poređenjem standardnih devijacija F - test i srednjih vrednosti, t - test, pri 95 %-tnom nivou poverenja i za dati broj stepena slobode, uočeno je da između kinetičke i referentne HPLC metode ne postoji velika razlika u preciznosti.

5.6. Kinetičko određivanje mikrokoličina ancimidola

Herbicid ancimidol određivan je na bazi njegovog inhibitornog uticaja u indikatorskoj reakciji oksidacije sulfanilne kiseline vodonik-peroksidom u fosfatnom puferu i u prisustvu Cu^{2+} jona.



Slika 85. Apsorpcioni spektar tokom vremena od 6 minuta usistemu: fosfatni pufer $pH = 7,9$; $c(H_2O_2) = 0,2 \text{ mol}/dm^3$; $c(SA) = 6 \cdot 10^{-4} \text{ mol}/dm^3$; $c(Cu^{2+}) = 4 \cdot 10^{-6} \text{ mol}/dm^3$; $c(Ancimidol) = 17,20 \mu\text{g}/cm^3$; $t = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

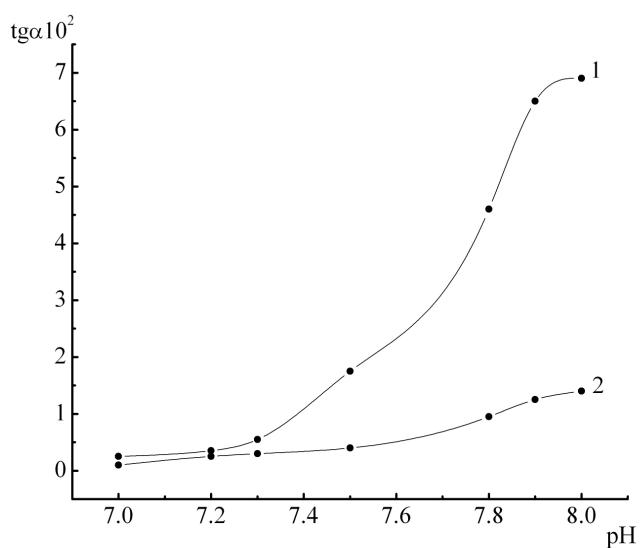
Spektrofotometrijskim praćenjem promene apsorbance u funkciji od vremena u pomenutom sistemu uočava se linearno povećanje apsorbance tokom vremena na talasnoj dužini od 370 nm. Ova zavisnost prikazana je na slici 51 (poglavlje 5.3.).

Na slici 85 vidi se da u prisustvu mikrokoličina ancimidola, u ovom sistemu dolazi do znatnog smanjenja brzine reakcije. Inhibitorni uticaj ancimidola je iskorišćen za njegovo određivanje u reakciji oksidacije sulfanilne kiseline vodonik peroksidom u prisustvu Cu^{2+} jona.

U cilju razrade što osetljivije metode za određivanje ancimidola u rastvoru, treba odrediti optimalne uslove odigravanja reakcije tj. ispitati zavisnost katalitičke i katalitičko-inhibitorne reakcije od koncentracije svakog reaktanta pojedinačno (H_3O^+ - jona, vodonik peroksida, Cu^{2+} jona, sulfanilne kiseline).

Ispitan je uticaj pH vrednosti fosfatnog pufera na brzinu katalitičke i katalitičko-inhibitorne reakcije.

Grafička zavisnost tga za katalitičku i katalitičko-inhibitornu reakciju od pH vrednosti fosfatnog pufera prikazana je na slici 86.



Slika 86. Zavisnost brzine katalitičke (1) i katalitičko-inhibitorne reakcije (2) od pH u sistemu: $c(\text{H}_2\text{O}_2) = 0,2 \text{ mol/dm}^3$; $c(\text{SA}) = 6 \cdot 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$; $c(\text{Cu}^{2+}) = 4 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$; $c(\text{Ancimidol}) = 17,20 \mu\text{g/cm}^3$; $t = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

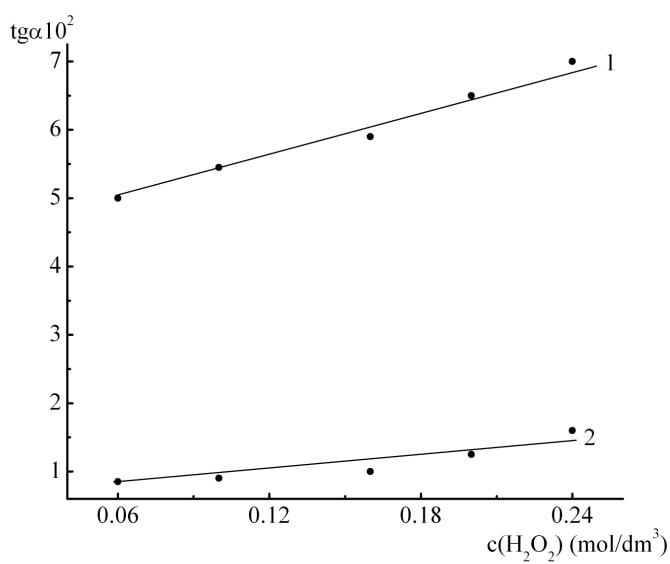
Zavisnost brzine katalitičke i katalitičko-inhibitorne reakcije ispitivana je u intervalu pH od 7 do 8.

Sa povećanjem pH vrednosti fosfatnog pufera brzina katalitičke i katalitičko-inhibitorne reakcije rastu. Za optimalnu pH vrednost odabrana pH 7,9.

Sa slike 86 se vidi da je zavisnost brzine katalitičke i katalitičko-inhibitorne reakcije linearne u celom ispitivanom intervalu pH. Red katalitičke reakcije od koncentracije $[\text{H}_3\text{O}^+]$ jona je -1,1, dok je katalitičko-inhibitorna reakcija je -1 reda.

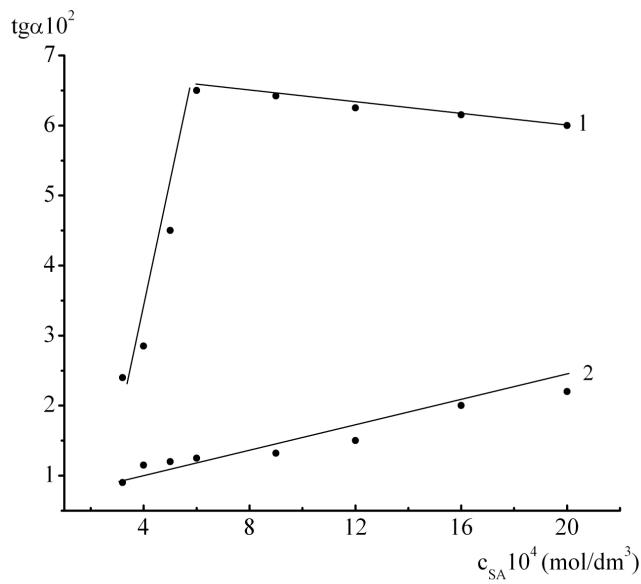
Zavisnost brzine katalitičke i katalitičko-inhibitorne reakcije od koncentracije H_2O_2 ispitivana je u intervalu koncentracija vodonik-peroksida od 0,06 do 0,24 mol/dm³. Ova zavisnost prikazana je na slici 87.

Brzine obe reakcije linearno rastu u celom ispitivanom intervalu koncentracija, tako da su reakcije + 1 reda. Najveća razlika u brzini između katalitičke i katalitičko-inhibitorne reakcije uočava se pri koncentraciji H_2O_2 od 0,2 mol/dm³, tako da je ova koncentracija odabrana za optimalnu i u daljem ispitivanju održavana konstantnom.



Slika 87. Zavisnost brzine katalitičke (1) i katalitičko-inhibitorne reakcije (2) od koncentracije H_2O_2 u sistemu: $pH = 7,9$; $c(SA) = 6 \cdot 10^{-4}$ mol/dm³; $c(Cu^{2+}) = 4 \cdot 10^{-6}$ mol/dm³; $c(Ancimidol) = 17,20 \mu g/cm^3$; $t = 25,0 \pm 0,1$ °C.

Uticaj koncentracije sulfanilne kiseline na brzinu katalitičke i katalitičko-inhibitorne reakcije prikazan je na slici 88.



Slika 88. Zavisnost brzine katalitičke (1) i katalitičko-inhibitorne reakcije (2) od koncentracije sulfanilne kiseline u sistemu: $pH = 7,9$; $c(H_2O_2) = 0,2$ mol/dm³; $c(Cu^{2+}) = 4 \cdot 10^{-6}$ mol/dm³; $c(Ancimidol) = 17,20 \mu g/cm^3$; $t = 25,0 \pm 0,1$ °C.

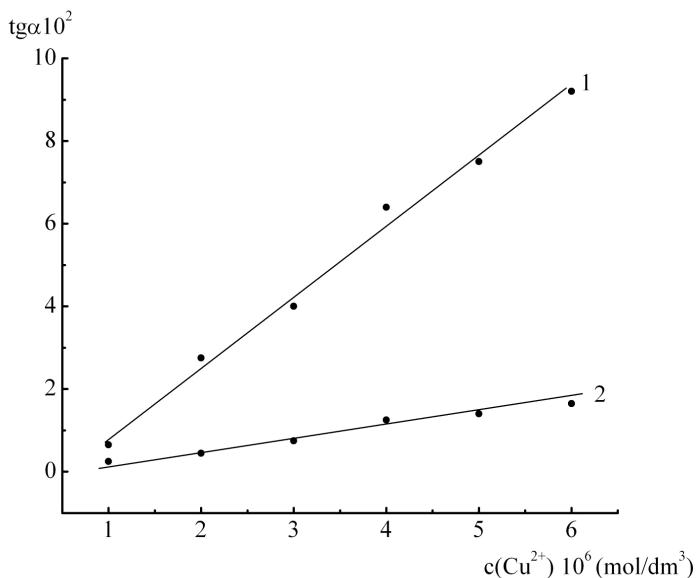
Uticaj koncentracije sulfanilne kiseline na brzinu katalitičke i katalitičko-inhibitorne reakcije ispitana je tako što su pH i koncentracije ostalih komponenata u sistemu održavane konstantnim, a koncentracija sulfanilne kiselina je menjana u opsegu od $3,2 \cdot 10^{-4}$ do $20 \cdot 10^{-4}$ mol/dm³.

Sa slike 88 se vidi da pri povećanju koncentracije sulfanilne kiseline brzina katalitičko-inhibitorne reakcije raste u celom ispitivanom intervalu koncentracija. Katalitičko-inhibitorna reakcija je +1 reda, dok je katalitička reakcija +1 reda u intervalu koncentracija SA od $3,2 \cdot 10^{-4}$ do $6 \cdot 10^{-4}$ mol/dm³, a pri većim koncentracijama je -1 reda.

Brzina katalitičke reakcije od koncentracije SA raste u intervalu koncentracija od $3,2 \cdot 10^{-4}$ do $6 \cdot 10^{-4}$ mol/dm³, dok pri većim koncentracijama opada.

S obzirom na to da je maksimalna razlika u brzini između katalitičke i katalitičko-inhibitorne reakcije pri koncentraciji SA $6 \cdot 10^{-4}$ mol/dm³, ova je koncentracija odabrana za dalji rad i u daljem ispitivanju održavana konstantnom.

Zavisnost brzine katalitičke i katalitičko-inhibitorne reakcije od koncentracije Cu²⁺ jona prikazana je na slici 89.

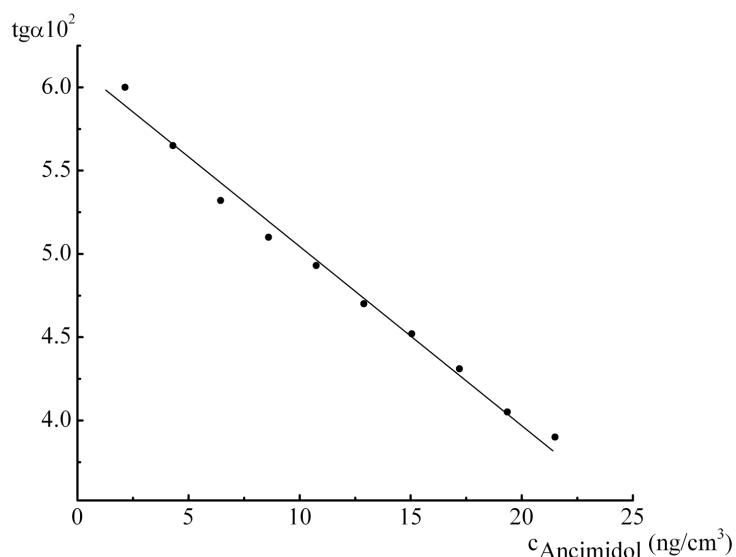


Slika 89. Zavisnost brzine katalitičke (1) i katalitičko-inhibitorne reakcije (2) od koncentracije Cu²⁺ jona u sistemu: pH = 7,9; c(SA) = $6 \cdot 10^{-4}$ mol/dm³; c(H₂O₂) = 0,2 mol/dm³; c(Ancimidol) = 17,20 µg/cm³; t = 25,0 ± 0,1 °C.

Ispitivanjem uticaja Cu²⁺ jona na brzinu katalitičke i katalitičko-inhibitorne reakcije vidi se da obe reakcije linearno rastu sa povećanjem koncentracije Cu²⁺ jona. Obe reakcije su +1 reda. Kao optimalna koncentracija Cu²⁺ jona izabrana je $4 \cdot 10^{-6}$ mol/dm³.

Pri optimalnim uslovima odigravanja reakcije: $pH = 7,9$; $c(SA) = 6 \cdot 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$; $c(H_2O_2) = 0,2 \text{ mol/dm}^3$; $c(Cu^{2+}) = 4 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$; $t = 25,0 \pm 0,1^\circ C$, praćen je uticaj ancimidola na brzinu reakcije.

Dobijena kalibraciona prava je linearna u dva intervala koncentracije ancimidola i to: 2,15 - 21,50 ng/cm³ (slika 90) i u intervalu 0,0215 - 17,20 µg/cm³ (slika 91).



Slika 90. Kalibraciona kriva za određivanje ancimidola u intervalu koncentracija 2,15-21,50 ng/cm³ pri optimalnim uslovima određivanja: $pH = 7,9$; $c(SA) = 6 \cdot 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$; $c(H_2O_2) = 0,2 \text{ mol/dm}^3$; $c(Cu^{2+}) = 4 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$; $t = 25,0 \pm 0,1^\circ C$.

Jednačina kalibracione prave, za interval koncentracija ancimidola od 2,15 do 21,50 ng/cm³ i na temperaturi $25,0 \pm 0,1^\circ C$, dobijena metodom najmanjih kvadrata može se prikazati jednačinom:

$$tg\alpha \cdot 10^2 = -0,1046 \cdot c_{Ancimidol} + 6,085 \quad r = -0,9949 \quad (70)$$

Kalibraciona kriva za interval koncentracija ancimidola od 0,0215 do 17,20 µg/cm³ može prikazati jednačinom:

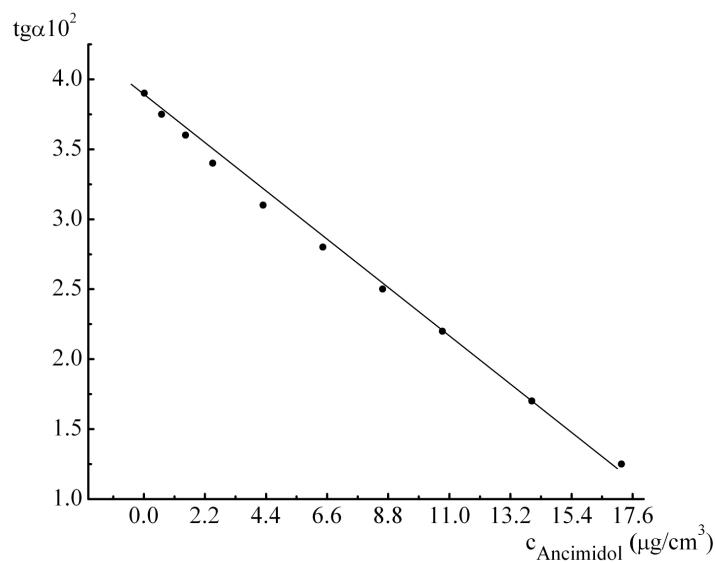
$$tg\alpha \cdot 10^2 = -0,151 \cdot c_{Ancimidol} + 3,81 \quad r = -0,9987 \quad (71)$$

gde je:

$c_{Ancimidol}$ - koncentracija ancimidola

$tg\alpha$ - nagib linearne krive u koordinatnom sistemu $A = f(t)$

r - koeficijent korelacije.



Slika 91. Kalibraciona kriva za određivanje ancimidola u intervalu koncentracija 0,0215-17,20 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ pri optimalnim uslovima određivanja: $\text{pH} = 7,9$; $c(\text{SA}) = 6 \cdot 10^{-4} \text{ mol}/\text{dm}^3$; $c(\text{H}_2\text{O}_2) = 0,2 \text{ mol}/\text{dm}^3$; $c(\text{Cu}^{2+}) = 4 \cdot 10^{-6} \text{ mol}/\text{dm}^3$; $t = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Na osnovu prethodno utvrđenih zavisnosti između koncentracije svakog pojedinačnog učesnika reakcije i brzine reakcije, kao i reda reakcije, postavljene su kinetičke jednačine za oba procesa.

Kinetička jednačina za katalitičku reakciju pri uslovima: pH 7,3-7,9, $c(\text{H}_2\text{O}_2)$ od 0,06 do 0,24 mol/dm³, $c(\text{SA})$ od 3,2 do $6 \cdot 10^{-4}$ mol/dm³, $c(\text{Cu}^{2+})$ od $1 \cdot 10^{-6}$ do $6 \cdot 10^{-6}$ mol/dm³ ima sledeći oblik :

$$-\frac{dc}{dt} = k_1 \cdot c(\text{H}^+)^{-1,1} \cdot c(\text{H}_2\text{O}_2) \cdot c(\text{SA}) \cdot c(\text{Cu}^{2+}) \quad (72)$$

Kinetička jednačina za katalitičko-inhibitornu reakciju pri uslovima: pH od 7 - 8, $c(\text{H}_2\text{O}_2)$ od 0,06 do 0,24 mol/dm³, $c(\text{SA})$ od 3,2 do $20 \cdot 10^{-4}$ mol/dm³, $c(\text{Cu}^{2+})$ od $1 \cdot 10^{-6}$ do $6 \cdot 10^{-6}$ mol/dm³ i $c(\text{Ancimidol})$ od 2,15 do 21,50 ng/cm³ i od 0,0215 do 17,20 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ ima sledeći oblik:

$$-\frac{dc}{dt} = k_2 \cdot c(\text{H}^+)^{-1} \cdot c(\text{H}_2\text{O}_2) \cdot c(\text{SA}) \cdot c(\text{Cu}^{2+}) \cdot c(\text{Ancimidol})^{-1} \quad (73)$$

gde su k_1 i k_2 konstante brzine katalitičke i katalitičko-inhibitorne reakcije.

Analitički i statistički podaci za kalibracionu pravu, dobijeni metodom linearne regresije u kompjuterskom programu *Origin 6.1*, dati su u tabeli 63.

Tabela 63. Analitičke i statističke karakteristike kalibracione prave za određivanje ancimidola

Parametri	
Opseg linearnosti (ng/cm ³)	2,15 - 21,5 0 n = 10
Opseg linearnosti (µg/cm ³)	0,0215 - 17,20 n = 10
Jednačina kalibracione prave	$tga \cdot 10^2 = -0,1046 \cdot c_{Ancimidol} + 6,085$ $tga \cdot 10^2 = -0,1510 \cdot c_{Ancimidol} + 3,81$
(Nagib ± SD) · 10 ²	-0,1046 ± 0,0037
(Odsečak ± SD) · 10 ²	6,085 ± 0,049
Koeficijent korelacije, r	-0,9949 -0,9987
Varijansa ($S \cdot 10^2$) ² (ng/cm ³) ²	$5,3 \cdot 10^{-7}$
Granica detekcije (ng/cm ³)	0,20
Granica određivanja (ng/cm ³)	1,60

Tačnost i reproduktivnost metode određeni su za 3 koncentracije ancimidola sa kalibracione prave, pri čemu je izvedeno pet merenja za svaku koncentraciju. Statističkom obradom podataka dobijeni su rezultati koji su sumirani u tabeli 64.

Kao što se može videti, relativna greška se kreće od 6,65 do 0,3 % za interval koncentracija ancimidola od 2,15 do 21,50 ng/cm³.

Tabela 64. Tačnost i reproduktivnost određivanja ancimidola

Odmereno (ng/cm ³)	Nađeno $\bar{x} \pm SD$ (ng/cm ³)	n	RSD (%)	G (%)	$\frac{\bar{x} - \mu}{\mu} \cdot 100$ (%)	Recovery (%)
2,15	2,05±0,01		6,65	7,28	4,65	95,35
10,75	10,34±0,02	5	1,50	2,20	3,81	96,20
21,50	21,30±0,06		0,30	1,18	-1,00	99,00

Za ocenu selektivnosti određivanja ancimidola predloženom metodom испитан је утицај већег броја страних јона на брзину хемијске реакције. Реакционој смеши pojedinačно су додавани раствори страних јона при концентрацији ancimidola 129,0 ng/cm³. При томе је

menjana njihova koncentracija u odnosu na koncentraciju ancimidola, sve dok nije nađena ona koncentracija koja ne ometa njegovo određivanje u rastvoru (tabela 65).

Tabela 65. Selektivnost određivanja ancimidola

Jonska vrsta	q	I, %
Na ⁺ , NH ₄ ⁺ , F ⁻ , Cl ⁻ , NO ₃ ⁻ , SO ₃ ²⁻	10 ⁴	< 5
Li ⁺ , K ⁺ , SO ₄ ²⁻ , Ba ²⁺ , J ⁻	10 ⁴	5 - 10
CH ₃ COO ⁻ , Zn ²⁺ , Fe ³⁺ , Fe ²⁺ , Cd ²⁺ , As ³⁺ , Ni ²⁺ , Hg ²⁺	1	< 5
Mn ²⁺	0,1	< 5
Pb ²⁺ , Sn ⁴⁺	0,01	5 - 10
Co ²⁺	1	ubrzava

q - odnos koncentracije jona i ancimidola

$$I = \frac{(c^o_{Ancimidol} - c_{Ancimidol})}{c^o_{Ancimidol}}$$

$c^o_{Ancimidol}$ i $c_{Ancimidol}$ - koncentracija ancimidola bez i u prisustvu interferirajuće supstance (dobijena iz jednačine kalibracione prave)

Co²⁺ ometa određivanje ancimidola pri odnosu 1:1 jer deluje kao katalizator u istoj indikatorskoj reakciji.

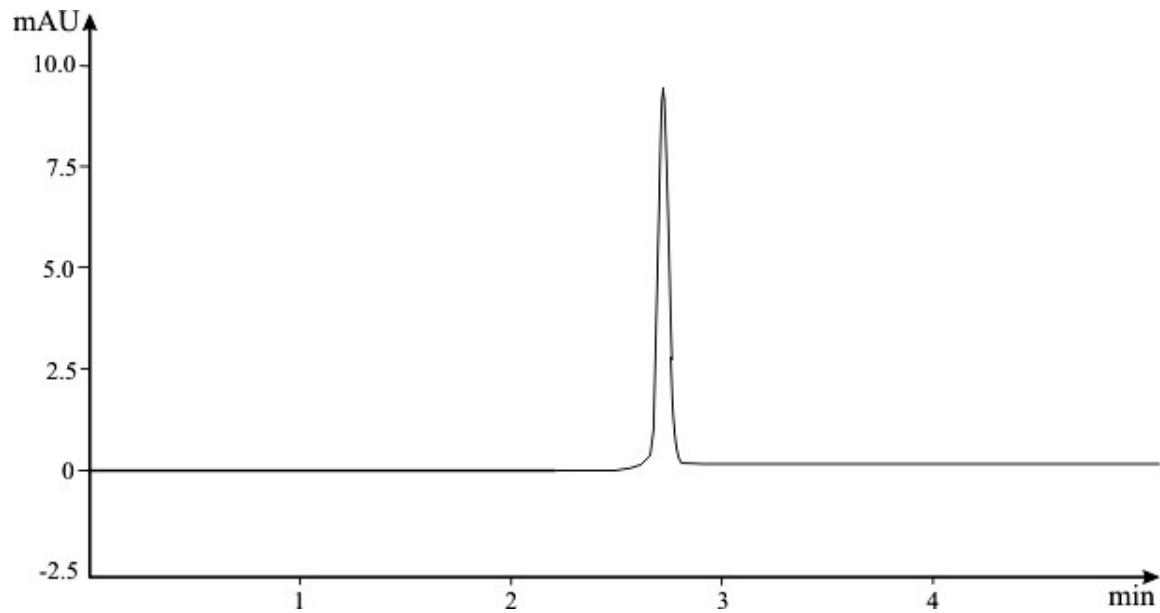
5.6.1. Primena kinetičke metode za određivanje ancimidola u uzorcima vode i zemljišta

Na osnovu razrađene kinetičke metode za određivanje ancimidola, koja se bazira na njegovom inhibitornom efektu u reakciji oksidacije sulfanilne kiseline vodonik peroksidom u fosfatnom puferu u prisustvu Cu²⁺ jona i konstruisanih kalibracionih pravih za određivanje ancimidola u intervalu koncentracije 2,15 - 21,50 ng/cm³ i 0,0215 - 17,20 µg/cm³, metoda je primenjena za određivanje sadržaja ancimidola u uzorcima vode i zemljišta.

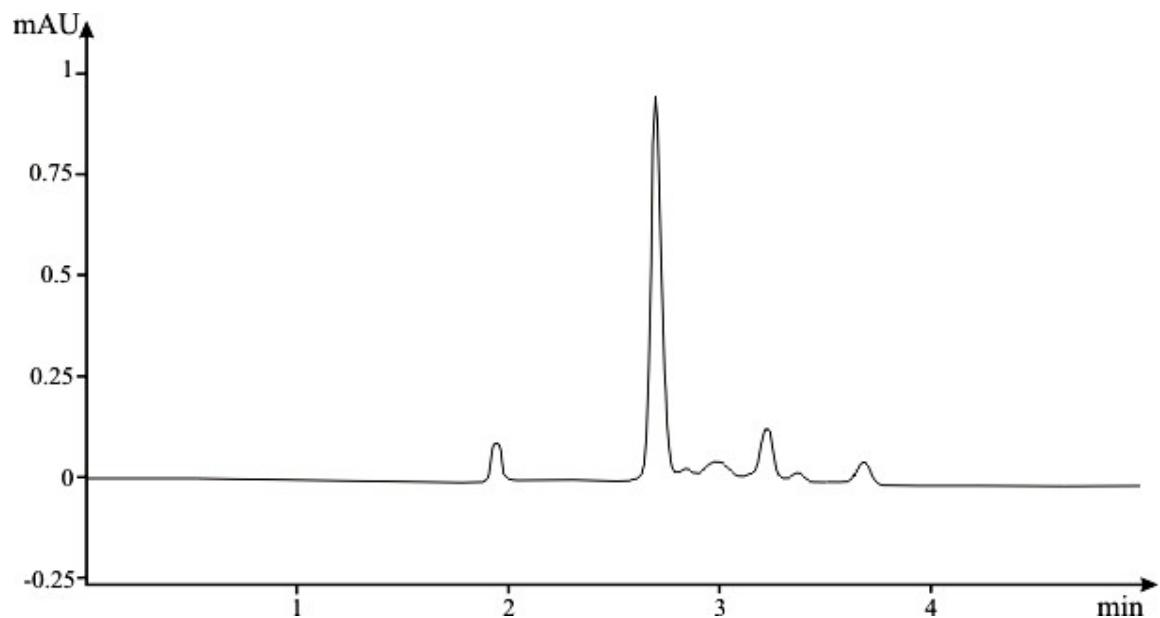
Uzorci zemljišta i vode pripremani su prema postupku koji je opisan u "Eksperimentalnom delu". Kao referentna metoda za potvrdu rezultata kinetičke metode korišćena je HPLC analiza.

Snimanjem HPLC hromatograma vidi se karakterističan pik na talasnoj dužini od 232,8 nm i retencionom vremenu od 2,77 minuta za ancimidol. HPLC hromatogram standardnog rastvora ancimidola prikazan je na slici 92.

HPLC hromatogrami određivanja ancimidola u uzorcima vode i zemljišta prikazani su na slikama 93 i 94.

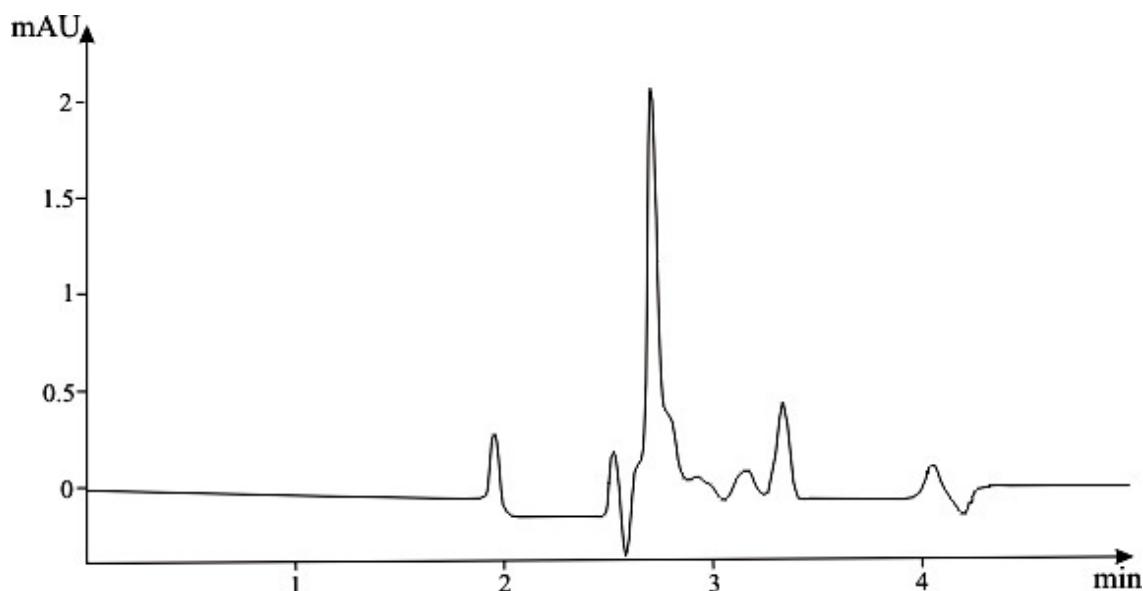


Slika 92. HPLC hromatogram standardnog rastvora pri koncentraciji ancimidola 100 ng/cm^3 . Kolona C₁₈ (Zorbax, $5 \mu\text{m}$, $250 \times 4,6 \text{ mm}$). Mobilna faza: ACN-voda (4:1, v/v). Detekcija 232,8 nm.



Slika 93. HPLC hromatogram uzorka vode pri koncentraciji ancimidola 10 ng/cm^3 . Kolona C₁₈ (Zorbax, $5 \mu\text{m}$, $250 \times 4,6 \text{ mm}$). Mobilna faza: ACN-voda (4:1, v/v). Detekcija 232,8 nm.

Dobijeni hromatogrami standarda i uzorka pokazuju poklapanje retencionog vremena za analiziranu aktivnu komponentu - ancimidol. U cilju kvantitativne analize određena je integrisana površina za dati pik i sa kalibracionog dijagrama za date vrednosti absorbancije izračunate su koncentracije ancimidola u ispitivanim uzorcima.



Slika 94. HPLC hromatogram uzorka zemljišta pri koncentraciji ancimidola 20 ng/cm^3 . Kolona C_{18} (Zorbax, $5 \mu\text{m}$, $250 \times 4,6 \text{ mm}$). Mobilna faza: ACN-voda (4:1, v/v). Detekcija $232,8 \text{ nm}$.

Rezultati određivanja ancimidola u uzorcima vode i zemljišta su prikazani tabelama 66 i 67.

Tabela 66. Tačnost i reproduktivnost određivanja ancimidola u uzorcima voda

Tip uzorka	Metoda kalibracione prave (ng/cm^3)		n	HPLC metoda (ng/cm^3)	RSD (%)	Recovery
	Odmereno	Nađeno $\bar{x} \pm \text{SD}$				
Bunarska voda	10	$9,58 \pm 0,09$	5	$9,76 \pm 0,08$	3,20	95,00
Rečna voda	8,0	$8,27 \pm 0,06$		$8,15 \pm 0,04$	2,49	101,3

Tabela 67. Tačnost i reproduktivnost određivanja ancimidola u uzorcima zemljišta

Tip uzorka	Metoda kalibracione prave (ng/cm ³)		n	HPLC metoda (ng/cm ³)	RSD (%)	Recovery
	Odmereno	Nađeno $\bar{x} \pm SD$				
Moravsko zemljište	20	17,29 ± 0,05	5	17,34 ± 0,07	5,6	86,15
Nišavsko zemljište	18	16,15 ± 0,03		16,23 ± 0,01	6,4	89,70

Količina ancimidola koja je određena u ispitivanim uzorcima u skladu je sa referentnom metodom. Poređenjem standardnih devijacija F - test i srednjih vrednosti t - test, pri 95 %-tnom nivou poverenja i za dati broj stepena slobode, uočeno je da između kinetičke i referentne HPLC metode ne postoji velika razlika u preciznosti, $t_{exp} < t_{tab}$ i $F_{exp} < F_{tab}$ (tabele 68 i 69).

Tabela 68. t - i F - vrednosti dobijene primenom dve različite metode za određivanje ancimidola u uzorcima voda

Tip uzorka	Metoda kalibracione prave (ng/cm ³)		HPLC metoda (ng/cm ³)	t-test*	F-test*
	Odmereno	Nađeno $\bar{x} \pm SD$			
Bunarska voda	10	9,58 ± 0,09	9,76 ± 0,08	1,12	2,76
Rečna voda	8,0	8,27 ± 0,06	8,15 ± 0,04	2,19	3,40

*Tablične F - ($v_1 = 4$, $v_2 = 4$) i t - vrednosti ($v = 8$) pri 95 %-tnom nivou poverenja su 6,39 i 2,306, respektivno.

Tabela 69. t - i F - vrednosti dobijene primenom dve različite metode za određivanje ancimidola u uzorcima zemljišta

Tip uzorka	Metoda kalibracione prave (ng/cm^3)		HPLC metoda (ng/cm^3)	t -test*	F -test*
	Odmereno	Nađeno $\bar{x} \pm \text{SD}$			
Moravsko zemljište	20	$17,29 \pm 0,05$	$17,34 \pm 0,07$	2,28	4,79
Nišavsko zemljište	18	$16,15 \pm 0,03$	$16,23 \pm 0,01$	2,12	2,10

*Tablične F - ($v_1 = 4$, $v_2 = 4$) i t - vrednosti ($v = 8$) pri 95 %-tnom nivou poverenja su 6,39 i 2,306, respektivno.

6. EKSPERIMENTALNI DEO

6.1. Eksperimentalni postupak

6.1.1. Aparati

Prilikom razrade kinetičkih metoda za određivanje pomenutih pesticida korišćena je sledeća oprema:

1. Perkin-elmer lambda 15 UV/VIS spektrofotometar sa protočnim kivetama dužine optičkog puta 10 cm;
2. HPLC sistem 1200 Agilent Technologies; analitička kolona C₁₈ (Zorbax, 5 µm, 250 x 4,6 mm);
3. Za termostatiranje rastvora u mernoj kiveti spektrofotometra korišćen je univerzalni termostat -tip 10;
4. Analitička vaga Mettler Toledo je korišćena za odmeravanje čvrste supstance;
5. Za merenje pH rastvora korišćen je Hanna instruments pH-metar. Puferi pH = 7±0,01 i pH = 4±0,01 (Sigma) su korišćeni za kalibraciju pH-metra;
6. Za uparavanje uzorka korišćen je rotacioni vakuum uparivač Büchi R 200/205 sa vodenim kupatilom B-499.
7. Solid-phase ekstrakcija uzorka vršena je na aparatu J. T. Baker SPE-12 sa vakuum pumpom;
8. Demineralizovana voda je dobijana korišćenjem MickroMed high purity water system, TKA Wasseraufbereitungssysteme GmbH;
9. Rastvori su pipetirani varijabilnim automatskim pipetama Lab Mate⁺;
10. Vreme odigravanja reakcije mereno je hronometrom.

6.1.2. Reagensi

Za pripremanje rastvora korišćena je demineralizovana voda specifične provodljivosti 0,05 µS cm⁻¹.

Radni rastvori pripremani su neposredno pre početka rada. Sudovi koji su korišćeni za rad prani su rastvorom HCl (1:1) i nakon toga su ispirani destilovanom i dejonizovanom vodom. U eksperimentalnom postupku korišćeni su sledeći reagensi:

Sulfanilna kiselina, $4 \cdot 10^{-2}$ mol/dm³

Radni rastvor pripreman je odmeravanjem određene mase sulfanilne kiseline, p.a. „Merck“ i rastvaranjem u demineralizovanoj vodi.

Vodonik-peroksid, 2 mol/dm³

Rastvor je pripreman odmeravanjem određene zapremine H₂O₂, p.a. „Merck“ i rastvaranjem u demineralizovanoj vodi.

Kalijum-perjodat, $1,5 \cdot 10^{-2}$ mol/dm³

Rastvor je pripreman odmeravanjem određene količine KJO₄, p.a. „Merck“ i rastvaranjem u demineralizovanoj vodi.

Fosfatni pufer

Puferi su pripremani odmeravanjem određene zapremine rastvora Na₂HPO₄ (0,067 mol/dm³) i dopunjavani su rastvorom KH₂PO₄ (0,067 mol/dm³) do zapremine od 100 cm³ (Lurie, 1989).

Acetatni pufer

Puferi su pripremani odmeravanjem određene zapremine rastvora CH₃COOH (1 mol/dm³) i dopunjavani su rastvorom NaOH (1 mol/dm³) do zapremine od 100 cm³ (Lurie, 1989).

Bakar(II)-hlorid-dihidrat, $1 \cdot 10^{-3}$ mol/dm³

Radni rastvor je pripreman rastvaranjem određene količine CuCl₂·2H₂O, čistoće p.a. „Merck“, u demineralizovanoj vodi.

Gvožđe(III)-hlorid, $1 \cdot 10^{-3}$ mol/dm³

Radni rastvor FeCl₃ pripreman je odmeravanjem tačne mase soli i rastvaranjem u hlorovodoničnoj kiselini (0,1 mol/dm³) i dopunjavan je demineralizovanom vodom.

1,10-fenantrolin, $1 \cdot 10^{-3}$ mol/dm³

Radni rastvor je pripreman rastvaranjem određene količine 1,10-fenantrolina, čistoće p.a. „Merck“, u demineralizovanoj vodi.

Diflubenzuron, Bromacil, Difenzokvat-metil sulfat, Dimetoat, Bromfenoksim, Ancimidol, $1 \cdot 10^{-3}$ mol/dm³

Radni rastvori pomenutih pesticida, proizvođača „Dr Ehrenstorfer“ (Nemačka), pripremani su rastvaranjem tačno odmerene mase čiste supstance (99,8 %) u metanolu i

dopunjavani su demineralizovanom vodom. Rastvori su čuvani u frižideru (4 - 8 °C), zaštićeni Al-folijom.

6.1.3. Spektrofotometrijski postupak za praćenje brzine indikatorske reakcije

Pesticidi diflubenzuron, bromacil, difenzokvat, bromfenoksim i ancimidol određivani su na osnovu njihovog inhibitornog efekta u reakciji oksidacije sulfanilne kiseline vodonik-peroksidom u fosfatnom puferu u prisustvu Cu(II) jona.

Određivanje dimetota bazirano na njegovom inhibitornom delovanju u reakciji oksidacije sulfanilne kiseline kalijum-perjodatom u acetatnom puferu u prisustvu Fe(III) jona i 1,10-fenantrolina.

Određene zapremine radnih rastvora odmeravane su u četvorokraki sud sledećim redosledom: u prvi krak je odmeravan fosfatni/acetatni pufer, u drugi krak sulfanilna kiselina, u treći vodonik peroksid/kalijum-perjodat, u četvrti krak odmeravan je rastvor Cu(II)/Fe(III) i 1,10-fenantrolina i vodom je dopunjavan do zapremine 10 cm³, za katalitičku reakciju.

Za katalitičko-inhibitornu reakciju odmeravani su isti reaktanti kao u katalitičkoj reakciji i u četvrti krak odmeravan je određeni pesticid i vodom je dopunjavan do zapremine 10 cm³. Nakon toga su reaktanti u četvorokrakoj posudi termostatirani na temperaturi od 25 °C, a zatim su pomešani uz istovremeno uključivanje štoperice. Ovim rastvorom je punjena radna kiveta spektrofotometra i sa merenjem brzine reakcije počinjalo se nakon jednog minuta, od trenutka mešanja. Izborom „time drive“ metode aparat beleži vrednosti apsorbance na svakih 30 sekundi tokom prvih 6 minuta, odnosno crta kinetičku krivu A = f(t).

Na taj način se umesto veličine $\frac{\partial c}{\partial t}$ određuje njoj proporcionalna veličina $\frac{\partial A}{\partial t}$ koja je jednaka brzini reakcije:

$$\frac{\partial A}{\partial t} = \varepsilon \cdot l \cdot \frac{\partial c}{\partial t} = \operatorname{tg} \alpha$$

$\frac{\partial c}$ - promena koncentracije indikatorske supstance

ε - molarni koeficijent apsorpcije (dm³mol⁻¹cm⁻¹)

l - debljina apsorpcionog sloja (cm)

$\operatorname{tg} \alpha$ - tangens ugla kinetičke krive u koordinatnom sistemu A = f(t) ili logA = f(t).

Za obradu rezultata merenja primenjena je tangensna metoda, zbog linearne zavisnosti apsorbance rastvora u toku 5 - 6 minuta od početka odigravanja reakcije.

Sva merenja vršena su na talasnoj dužini od 370 nm/368 nm i temperaturi od 25 ± 0,1°C.

6.1.4. Priprema uzorka za analizu

Priprema pečuraka za određivanje diflubenzurona

Uzorku od 50 g pečuraka se doda određena količina DFB i ostavi da stoji nekoliko minuta. Uzorci se zatim homogenizuju sa 100 cm³ acetona u laboratorijskom blenderu, filtriraju se pod vakuumom u erlenmajer. Filtrat se prebacuje u balone za ekstrakciju i ekstrahuje sa 100 cm³ rastvora cikloheksan - dihlormetan (1:1, v/v). Organski sloj se dekantuje i prenosi u levak za kvantitativno ceđenje (plava traka, Whatman No.42) kroz anhidrovani natrijum sulfat da se pokupi sva voda, a vodeni sloj se opet rekstrahuje sa dihlormetanom.

Ekstrahovani deo se uparava skoro do suva na rotacionom vakuum uparivaču na temperaturi od 30°C. Upareni ostatak se rastvara u mobilnoj fazi, metanol - voda (80:20, v/v), dopunjava do 10 cm³ i koristi za HPLC određivanje. Zapremina injektovanog uzorka bila je 10 µL, a brzina proticanja mobilne faze 1 cm³/min. Detekcija je vršena na 254 nm.

Za kinetičko određivanje se deo ovog rastvora uparava do suva, suvi ostatak se rastvara u malo metanola i dopunjava dejonizovanom vodom do 10 cm³. Zatim se od pripremljenog rastvora odpipetiraju odgovarajuće zapremine da bi se doble koncentracije diflubenzurona navedene u tabeli 35. Nakon odgovarajuće pripreme uzorka pečuraka za analizu, količina DFB određena je metodom kalibracione krive.

Priprema uzorka vode i zemljišta za određivanje bromacila

Priprema uzorka zemljišta

Odmeri se 100 g zemljišta za analizu. Uzorci zemljišta za određivanje bromacila pripremani su dodavanjem tačno određene količine standardnog rastvora bromacila. Uzorku zemljišta se zatim dodaje 30 cm³ metanola i vode. Ostavi se da stoji par sati. Zatim se rastvor dekantuje i centrifugira 3 puta po 10 minuta na 3000 obrtaja. Tako pripremljen rastvor se propušta kroz NaCl da se pokupi sva vlaga, onda se rastvor propušta kroz kolonu za solid-phase ekstrakciju (kertridž Chromabond® HR-P, 3 cm³/200 mg), koji je prvo kondicioniran sa jednom zapreminom kolone metanola i jednom zapreminom dejonizovane vode.

Uzorak se sa kolone eluira tri puta sa 1 cm³ rastvora metanol - aceton (3:2, v/v). Tako pripremljen uzorak se zatim uparava na rotacionom vakuum uparivaču na 35 °C skoro do suva i suvi ostatak se rastvara u mobilnoj fazi ACN - voda (40:60, v/v), dopunjava do 10 cm³ i koristi za HPLC određivanje.

Zapremina injektovanog uzorka bila je 20 µL, a brzina proticanja mobilne faze 1 cm³/min. Detekcija je vršena na 280 nm.

Za kinetičku metodu je uzorak nakon uparavanja do suva, rastvoren u malo metanola i dopunjen redestilovanom vodom do 10 cm³.

Priprema uzorka vode

U 100 cm^3 vode dodavana je tačno određena količina bromacila i uzorci su ostavljeni da stoje 1 dan. Uzorci vode su zatim propuštani kroz kolonu za solid-phase ekstrakciju i eluiranu su rastvorom Metanol - Aceton (3:2, v:v).

Tako pripremljen uzorak je uparavan na rotacionom vakuum uparivaču na $35\text{ }^\circ\text{C}$ skoro do suva i suvi ostatak je rastvoren u mobilnoj fazi ACN - voda (40:60, v/v), dopunjen je do 10 cm^3 . Ovaj rastvor je korišćen za HPLC metodu.

Za kinetičku metodu je uzorak nakon uparavanja do suva, rastvoren u malo metanola i dopunjen dejonizovanom vodom do 10 cm^3 .

Priprema uzorka vode i mleka za određivanje dimetota

Priprema uzorka vode

U radu su korišćeni uzorci česmense, bunarske i rečne vode. Uzorci vode uzorkovani su u maju 2008.

U 100 cm^3 vode dodata je tačno određena količine standardnog rastvora dimetoata i taj uzorak je ostavljen da odstoji jedan dan.

Kolone Chromabond® HR-P C₁₈ kertridž (sorbent mass 200 mg Macherey-Nagel (Nemačka) korišćene su za solid-phase ekstrakciju dimetoata iz uzorka vode.

Kolone su prvo kondicionirane sa 10 cm^3 ACN i 2 cm^3 vode.

Svaki uzorak je propuštan kroz kolonu Chromabond HR-P C₁₈. Nakon toga uzorci su eluirani sa 5 cm^3 ACN (5 %) a zatim sa 5 cm^3 ACN - voda (80%).

Uzorak je uparavan na rotacionom vakuum uparivaču na $40\text{ }^\circ\text{C}$ skoro do suva i suvi ostatak je rastvoren u 25 cm^3 mobilne faze ACN - voda (80:20, v/v). Ovaj rastvor je korišćen za HPLC određivanje dimetoata.

Zapremina injektovanog uzorka bila je $50\text{ }\mu\text{L}$, a brzina proticanja mobilne faze $0,4\text{ cm}^3/\text{min}$. Detekcija je vršena na 210 nm .

Za kinetičku metodu je uzorak nakon uparavanja do suva, rastvoren u malo metanola i dopunjen dejonizovanom vodom do 25 cm^3 .

Priprema uzorka mleka

U 50 cm^3 mleka dodata je odredena količina standardnog rastvora dimetoata i tako pripremljen uzorak je stajao 1 dan. Uzorci su zatim ekstrahovani sa 70 cm^3 65 %-nog rastvora aceton-voda i mućkani su u balonima za ekstrakciju 10 minuta. Ekstraktu je dodato 50 cm^3 65% rastvora acetona; NaCl je dodat u filtrat i mućkan je dva puta sa DCM, a zatim su ekstrakti filtrirani kroz Na_2SO_4 da se pokupi sva vlaga.

Chromabond® HR-P kertridž za Solid-Phase Ekstrakciju su kondicionirani sa 10 cm^3 ACN i 2 cm^3 vode; uzorak je propuštan kroz kolonu i eluiran sa 5 cm^3 5% ACN. Zatim je eluiranje vršeno sa 5 cm^3 80% rastvorom ACN- H_2O i uparavan je skoro do suva na rotacionom vakuum uparivaču (na 30°C and 300 mbar). Suvi ostatak je rastvoren u 25 cm^3 mobilne faze ACN - voda (80:20, v/v). Ovaj rastvor je korišćen za HPLC određivanje dimetoata.

Za kinetičku metodu je deo ovog rastvora uparen do suva, rastvoren u malo metanola i dopunjena dejonizovanom vodom do 25 cm^3 .

Priprema uzorka južnog voća za određivanje difenzokvat-metil sulfata

Za određivanje DFQ u uzorcima južnog voća primenjena je metoda standardnog dodatka.

S obzirom na to da je u literaturi nađen podatak da se difenzokvat koristi za prskanje južnog voća, pripremani su blanko uzorci i uzorci u kojima je dodata poznata koncentracija pesticida.

Ceđen sok podeljen je u tri dela, prvi deo je blanko proba, dok je u drugi i treći deo je dodata tačno određena količina DFQ.

Rastvori soka su propuštani kroz kolonu za solid-phase ekstrakciju u kertridže tipa Chromabond® CN ($3\text{ cm}^3/500\text{ mg}$) koja je pre upotrebe kondicionirana.

Kondicioniranje kolone vršeno je sa 3 cm^3 metanola ($1\text{ cm}^3/\text{min}$) i ispirana je sa 5 cm^3 dejonizovane vode.

Nakon propuštanja uzorka kolona je ispirana sa 3 cm^3 redestilovane vode, a zatim je eluirana tri puta sa 1 cm^3 $1,5\text{ mol/dm}^3$ HCl.

Uzorak je uparavan do suva i rastvoren u mobilnoj fazi ACN - voda (80:20, v/v). Ovako pripremljen uzorak je korišćen za snimanje hromatograma HPLC metodom.

Zapremina injektovanog uzorka bila je $10\text{ }\mu\text{L}$, a brzina proticanja mobilne faze $0,5\text{ cm}^3/\text{min}$. Detekcija je vršena na 215 nm .

Priprema uzorka za kinetičku metodu je ista, s tim što je nakon uparavanja do suva uzorak rastvoren u malo metanola i dopunjen dejonizovanom vodom do određene zapremine (25 cm³).

Priprema uzorka sokova za određivanje bromfenoksima

Uzorci za određivanje bromfenoksima pripremani su dodavanjem tačno određene količine standardnog rastvora u 100 cm³ soka i stajali su par sati. Uzorak je dobro izmešan, zatim je propušten kroz kolonu HR-P C₁₈ (3 cm³/200 mg) za solid-phase ekstrakciju, koja je prethodno kondicionirana.

Kondicioniranje kolone vršeno je sa 10 cm³ ACN i 2 cm³ vode.

Nakon propuštanja uzorka kroz kolonu, vršeno je ispiranje dva puta sa 5 cm³ ACN. Nakon eluiranja uzorka sa kolone, 10 cm³ uzorka je uparen do suva (t = 40 °C) na rotacionom vakuum uparivaču.

Suvi ostatak je za kinetičku metodu rastvoren u malo metanola i dopunjen redestilovanim vodom do 25 cm³.

Za HPLC određivanja, suvi ostatak je rastvoren u mobilnoj fazi (ACN-H₂O, 80:20, v/v + H₃PO₄ 0,5%). Od ovog rastvora otpipetirana je odgovarajuća zapremina da bi se dobila odgovarajuća koncentracija bromfenoksima prikazana u tabeli 61.

Zapremina injektovanog uzorka bila je 10 µL, a brzina proticanja mobilne faze 1 cm³/min. Detekcija je vršena na 207 nm.

Priprema uzorka vode i zemljišta za određivanje ancimidola

Priprema uzorka rečne i bunarske vode

Za određivanje ancimidola u rečnoj i bunarskoj vodi postupak se sastoji u sledećem: odmerena je tačno poznata količina ancimidola i rastvorena u 100 cm³ vode (bunarske i rečne).

Uzorak je dobro izmešan i propušten kroz kolonu Chromabond SA (3 cm³/500 mg) za solid-phase ekstrakciju, koja je prethodno kondicionirana.

Kondicioniranje kolone vršeno je sa 5 cm³ CH₃COOH (1 %) i 2 cm³ CH₃COOH.

Nakon propuštanja uzorka kroz kolonu, vršeno je eluiranje sa 1 cm³ ACN i 5 cm³ redestilovane vode i opet sa 2 cm³ ACN.

Nakon eluiranja, 5 cm^3 uzorka za kinetičku metodu je upareno do suva na rotacionom vakuum uparivaču. Sivi ostatak je za kinetičku metodu rastvoren u 50 cm^3 20% metanola.

Za HPLC metodu uzeto je 5 cm^3 uzorka i upareno do suva na rotacionom vakuum uparivaču na temperaturi od 40°C i rastvoren je u 50 cm^3 mobilne faze ACN-voda (4:1, v/v). Od ovog rastvora otpipetirana je odgovarajuća zapremina da bi se dobila odgovarajuća koncentracija ancimidola prikazana u tabeli 66.

Zapremina injektovanog uzorka bila je $10 \mu\text{L}$, a brzina proticanja mobilne faze $1 \text{ cm}^3/\text{min}$. Detekcija je vršena na $232,8 \text{ nm}$.

Priprema uzorka zemljišta

Za određivanje ancimidola u zemljištu uzorkovani su uzorci sa različitih lokaliteta (zemljište kraj reke Morave i zemljište kraj reke Nišave).

Uzorku zemljišta (50 g) dodata je tačno poznata količina ancimidola. Zemljište je zatim rastvoren i homogenizovano u 99 cm^3 ACN - voda (9:1, v/v) i mučkano 5 min. Uzorak je filtriran kroz filter papir za kvantitativno cedenje (Watman No. 45). Prvih 5 cm^3 se odbacuje a ostatak rastvora se koristi za dalju analizu.

Nakon kondicioniranja kolone za SPE uzorak je propuštan kroz kolonu. Nakon eluiranja sa kolone, uzeto je 5 cm^3 uzorka za kinetičku i 5 cm^3 za HPLC metodu. Obe zapremine su uparene do suva na rotacionom vakuum uparivaču pa je sivi ostatak rastvoren u 20 % rastvoru metanola - za kinetičku metodu, a za HPLC metodu je rastvoren u mobilnoj fazi ACN-voda (4:1, v/v). Od ovog rastvora je otpipetirana odgovarajuća zapremina da bi se dobila koncentracija acimidola prikazana u tabeli 67.

7. ZAKLJUČAK

Razrađene su kinetičko-spektrofotometrijske metode za kvantitativno određivanje pesticida diflubenzurona, bromacila, difenzokvata-metilsulfata, dimetoata, bromfenoksima i ancimidola.

Kinetičko-spektrofotometrijska metoda za određivanje diflubenzurona (DFB) zasniva se na njegovom inhibitornom dejstvu u reakciji oksidacije sulfanilne kiseline vodonik-peroksidom u fosfatnom puferu u prisustvu Cu^{2+} jona. Ispitivanjem uticaja svakog reaktanta pojedinačno na brzinu katalitičke i katalitičko-inhibitorne reakcije određeni su optimalni uslovi odigravanja reakcije. Pri optimalnim uslovima odigravanja reakcije: $\text{pH}=7,8$; $c(\text{H}_2\text{O}_2) = 0,2 \text{ mol/dm}^3$; $c(\text{SA}) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$; $c(\text{Cu}^{2+}) = 8 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$; $t = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$, praćena je zavisnost brzine reakcije od koncentracije DFB. Konstruisana je kalibraciona kriva za određivanje DFB u dva intervala koncentracije: od 0,31 do 3,10 $\mu\text{g/cm}^3$ i od 3,10 do 31,0 $\mu\text{g/cm}^3$. Granica detekcije iznosi 0,095, a granica određivanja 0,29 $\mu\text{g/cm}^3$. Određena je tačnost i reproduktivnost metode za određivanje DFB. Relativna greška se kreće od 6,23 do 2,25 % za interval koncentracije DFB od 0,31 do 3,10 $\mu\text{g/cm}^3$. Ispitana je selektivnost metode i zaključeno je da samo joni Co^{2+} ometaju određivanje DFB pomenutom metodom. Metoda je primenjena za određivanje DFB u uzorcima pečuraka i recovery metode kreće se oko 96 %, dok je RSD od 1,23 do 2,57 %. HPLC metoda je korišćena kao referentna metoda.

Kinetičko-spektrofotometrijska metoda za određivanje bromacila zasniva se na njegovom inhibitornom dejstvu u reakciji oksidacije sulfanilne kiseline vodonik-peroksidom u fosfatnom puferu u prisustvu Cu^{2+} jona. Ispitivanjem uticaja svakog reaktanta pojedinačno na brzinu katalitičke i katalitičko-inhibitorne reakcije određeni su optimalni uslovi odigravanja reakcije: $\text{pH} = 7,9$; $c(\text{H}_2\text{O}_2) = 0,2 \text{ mol/dm}^3$; $c(\text{SA}) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$; $c(\text{Cu}^{2+}) = 6 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$; $t = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Pri optimalnim uslovima odigravanja reakcije praćena je zavisnost brzine reakcije od koncentracije bromacila. Konstruisana je kalibraciona kriva za određivanje bromacila u intervalu koncentracija od 2,70 do 3,10 $\mu\text{g/cm}^3$. Izračunata je granica detekcije i granica određivanja i one iznose 0,55 $\mu\text{g/cm}^3$ i 1,86 $\mu\text{g/cm}^3$. Određena je tačnost i reproduktivnost metode za određivanje bromacila. Relativna greška metode se kreće od 4,06 do 0,40 % za interval koncentracije bromacila od 2,70 do 16,20 $\mu\text{g/cm}^3$. Ispitana je selektivnost metode i zaključeno je da samo joni Co^{2+} ometaju određivanje bromacila pomenutom metodom. Metoda je primenjena za određivanje bromacila u uzorcima vode i zemljišta. Za pripremu uzorka vode i zemljišta korišćena je solid - phase ekstrakcija, a kao uporedna metoda za potvrdu rezultata kinetičke metode korišćena je HPLC analiza. Recovery za uzorke vode i zemljišta primenom kinetičke metode je oko 95 %, a RSD je od 0,46 do 1,87 %.

Kinetičko-spektrofotometrijska metoda za određivanje difenzokvat-metilsulfata (DFQ) zasniva se na njegovom inhibitornom dejstvu u reakciji oksidacije sulfanilne kiseline vodonik-peroksidom u fosfatnom puferu u prisustvu Cu^{2+} jona. Ispitivanjem uticaja svakog reaktanta pojedinačno na brzinu katalitičke i katalitičko-inhibitorne reakcije određeni su optimalni uslovi odigravanja reakcije: $\text{pH} = 7,9$; $c(\text{H}_2\text{O}_2) = 0,2 \text{ mol/dm}^3$; $c(\text{SA}) = 6 \cdot 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$; $c(\text{Cu}^{2+}) = 4 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$; $t = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Pri optimalnim uslovima odigravanja reakcije praćena je zavisnost brzine reakcije od koncentracije DFQ. Konstruisana je kalibraciona kriva za određivanje DFQ u dva koncentraciona intervala: od 0,36 do 1,80 $\mu\text{g/cm}^3$ i od 1,80 do 7,20 $\mu\text{g/cm}^3$. Granica detekcije određivanja DFQ

pomenutom metodom iznosi $0,0552 \mu\text{g}/\text{cm}^3$, a granica određivanja je $0,184 \mu\text{g}/\text{cm}^3$. Relativna greška metode se kreće od 3,61 do 1,0 % za interval koncentracije DFQ od 0,36 do $1,80 \mu\text{g}/\text{cm}^3$. Ispitana je selektivnost metode i zaključeno je da samo joni Co^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+} , Sn^{2+} ometaju određivanje DFQ pomenutom metodom pri koncentracijama 10 puta manjim u odnosu na koncentraciju DFQ. Metoda je primenjena za određivanje DFQ u južnom voću. Za pripremu uzoraka voća korišćena je solid - phase ekstrakcija, a kao uporedna metoda za potvrdu rezultata kinetičke metode korišćena je HPLC analiza. Recovery za uzorke voća primenom kinetičke metode kreće se od 90,62 do 99,20 %, a RSD je od 0,38 do 2,28 %.

Kinetičko-spektrofotometrijska metoda za određivanje dimetoata zasniva se na njegovom inhibitornom dejstvu u reakciji oksidacije sulfanilne kiseline kalijum-perjodatom u acetatnom puferu u prisustvu Fe^{3+} jona i 1,10-fenantrolina. Ispitivanjem uticaja svakog reaktanta pojedinačno na brzinu katalitičke i katalitičko-inhibitorne reakcije određeni su optimalni uslovi odigravanja reakcije: $\text{pH} = 4,7$; $c(\text{KIO}_4) = 1,8 \cdot 10^{-3} \text{ mol}/\text{dm}^3$; $c(\text{SA}) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol}/\text{dm}^3$; $c(\text{Fe}^{3+}) = 6 \cdot 10^{-8} \text{ mol}/\text{dm}^3$; $c(\text{phen}) = 6 \cdot 10^{-5} \text{ mol}/\text{dm}^3$; $t = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Pri optimalnim uslovima odigravanja reakcije praćena je zavisnost brzine reakcije od koncentracije dimetoata. Konstruisana je kalibraciona kriva za određivanje dimetoata u dva intervala koncentracija: od 28,10 do 196,70 ng/cm^3 i od 0,196 do 22,48 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$. Izračunata je granica detekcije i granica određivanja i iznose 0,82 i 3,85 ng/cm^3 . Relativna greška metode se kreće od 1,26 do 6,0 % za interval koncentracije dimetoata od 196,70 do 28,10 ng/cm^3 . Ispitana je selektivnost metode i zaključeno je da samo Cu^{2+} joni ometaju određivanje dimetoata pomenutom metodom. Metoda je primenjena za određivanje dimetoata u uzorcima vode i mleka. Za pripremu uzoraka vode i mleka korišćena je solid - phase ekstrakcija, a kao uporedna metoda za potvrdu rezultata kinetičke metode korišćena je HPLC analiza. Recovery za uzorke vode je 79,50 - 86,0 %, a za uzorke mleka je 77,30 - 80,30 % primenom kinetičke metode. RSD je do 4,0 % za uzorke vode, a do 6,0 % za uzorke mleka.

Kinetičko-spektrofotometrijska metoda za određivanje bromfenoksima (BrFX) zasniva se na njegovom inhibitornom dejstvu u reakciji oksidacije sulfanilne kiseline vodonik-peroksidom u fosfatnom puferu u prisustvu Cu^{2+} jona. Ispitivanjem uticaja svakog reaktanta pojedinačno na brzinu katalitičke i katalitičko-inhibitorne reakcije određeni su optimalni uslovi odigravanja reakcije: $\text{pH} = 7,9$; $c(\text{H}_2\text{O}_2) = 0,2 \text{ mol}/\text{dm}^3$; $c(\text{SA}) = 6 \cdot 10^{-4} \text{ mol}/\text{dm}^3$; $c(\text{Cu}^{2+}) = 4 \cdot 10^{-6} \text{ mol}/\text{dm}^3$; $t = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Pri optimalnim uslovima odigravanja reakcije praćena je zavisnost brzine reakcije od koncentracije BrFX. Konstruisana je kalibraciona kriva za određivanje BrFX u dva koncentraciona intervala: od 0,46 do 13,86 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ i od 0,041 do 0,46 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$. Granica detekcije određivanja BrFX pomenutom metodom iznosi $0,0077 \mu\text{g}/\text{cm}^3$, a granica određivanja je $0,025 \mu\text{g}/\text{cm}^3$. Relativna greška metode se kreće od 1,34 do 2,37 % za interval koncentracije BrFX od 0,041 do 0,46 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$. Ispitana je selektivnost metode i zaključeno je da samo joni Co^{2+} i Pb^{2+} ometaju određivanje BrFX pomenutom metodom. Metoda je primenjena za određivanje BrFX u sokovima. Za pripremu uzoraka sokova korišćena je solid - phase ekstrakcija, a kao uporedna metoda za potvrdu rezultata kinetičke metode korišćena je HPLC analiza. Recovery za uzorke sokova primenom kinetičke metode kreće se od 88,33 do 97,00 %, a RSD je od 0,62 do 8,31 %.

Kinetičko-spektrofotometrijska metoda za određivanje ancimidola zasniva se na njegovom inhibitornom dejstvu u reakciji oksidacije sulfanilne kiseline vodonik-peroksidom u fosfatnom puferu u prisustvu Cu²⁺ jona. Ispitivanjem uticaja svakog reaktanta pojedinačno na brzinu katalitičke i katalitičko-inhibitorne reakcije određeni su optimalni uslovi odigravanja reakcije: pH = 7,9; c(H₂O₂) = 0,2 mol/dm³; c(SA) = 6·10⁻⁴ mol/dm³; c(Cu²⁺) = 4·10⁻⁶ mol/dm³; t = 25,0 ± 0,1°C. Pri optimalnim uslovima odigravanja reakcije praćena je zavisnost brzine reakcije od koncentracije ancimidola. Konstruisana je kalibraciona kriva za određivanje ancimidola u dva koncentraciona intervala: od 2,15 do 21,50 ng/cm³ i od 0,0215 do 17,20 µg/cm³. Granica detekcije određivanja ancimidola pomenutom metodom iznosi 0,2 ng/cm³, a granica određivanja je 1,6 ng/cm³. Relativna greška metode se kreće od 6,65 do 0,30 % za interval koncentracije ancimidola od 2,15 do 21,50 ng/cm³. Ispitana je selektivnost metode i zaključeno je da samo joni Co²⁺ ometaju određivanje ancimidola pomenutom metodom. Metoda je primenjena za određivanje ancimidola u uzorcima vode i zemljišta. Za pripremu uzorka korišćena je solid - phase ekstrakcija, a kao uporedna metoda za potvrdu rezultata kinetičke metode korišćena je HPLC analiza. Recovery za uzorke vode i zemljišta primenom kinetičke metode je od 86,15 do 101,30 %, a RSD je od 2,49 do 6,40 %.

8. SUMMARY

Kinetic-spectrophotometric methods were developed for the determination of pesticides: diflubenzuron, bromacile, difenzoquate-methylsulphate, dimethoate, bromofenoxim and ancymidol.

The kinetic-spectrophotometric method for diflubenzuron (DFB) determination is based on its inhibited effect in the oxidation reaction of sulphanile acid with hydrogen-peroxide in phosphate buffer in the presence of Cu^{2+} ions. Having examined the influence of all reactants on the rate of catalyzed and inhibited reaction, the optimal conditions for DFB determination were found. In the optimum condition of reaction: $\text{pH} = 7,8$; $c(\text{H}_2\text{O}_2) = 0,2 \text{ mol/dm}^3$; $c(\text{SA}) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$; $c(\text{Cu}^{2+}) = 8 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$; $t = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$, the DFB concentration on the reaction rate was examined. The kinetic curves were constructed in two intervals of concentration: from 0,31 to 3,10 $\mu\text{g/cm}^3$ and from 3,10 to 31,0 $\mu\text{g/cm}^3$. The least squares equation for the calibration graphs and correlation coefficients, r for the determination of DFB in the concentration range mentioned above, in the optimal reaction conditions, were calculated. Limit determination was 0,095 $\mu\text{g/cm}^3$, limit detection was 0,29 $\mu\text{g/cm}^3$. Accuracy and precision for DFB determination were calculated. The relative error was 6,23 to 2,25 % for the interval of concentration 0,31-3,10 $\mu\text{g/cm}^3$. To assess the selectivity of the method, the interference due to several cations and anions was studied in detail. It may be seen that Co^{2+} to DFB interfere with reaction. The method was applied for DFB determination in mushrooms with recovery of about 96 %, RSD was 1,23 - 2,57 %. The HPLC analysis was used to verify results of kinetic method.

The kinetic-spectrophotometric method for bromacil determination is based on its inhibited effect in the oxidation reaction of sulphanile acid with hydrogen-peroxide in phosphate buffer in presence of Cu^{2+} ions. The influence of all reactants on reaction rate of catalyzed and inhibited reaction has been studied and the optimal conditions for bromacil determination were found. In the optimum condition of reaction: $\text{pH} = 7,9$; $c(\text{H}_2\text{O}_2) = 0,2 \text{ mol/dm}^3$; $c(\text{SA}) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$; $c(\text{Cu}^{2+}) = 6 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$; $t = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$, the bromacil concentration on the reaction rate was examined. The kinetic curve was constructed in interval concentration from 2,70 to 16,20 $\mu\text{g/cm}^3$. Limit determination was 0,55 $\mu\text{g/cm}^3$, limit detection was 1,86 $\mu\text{g/cm}^3$. Accuracy and precision for bromacil determination were calculated. The relative error was from 4,06 to 0,40 % for the interval of concentration 2,70 - 16,20 $\mu\text{g/cm}^3$. To assess the selectivity of the method, the interference due to several cations and anions was studied in detail. It may be seen that Co^{2+} to bromacil interfere with reaction. Method was applied for bromacil determination in water and soil samples. Solid-phase extraction was used for samples preparation. Recovery was about 95 %, RSD was 0,46 - 1,87 %. The HPLC analysis was used to verify results of kinetic method.

The kinetic-spectrophotometric method for difenzoquat-methyl sulfate (DFQ) determination is based on its inhibited effect in reaction of oxidation sulphanile acid with hydrogen-peroxide in phosphate buffer in presence of Cu^{2+} ions. Having examined the influence of all reactants on the rate of catalyzed and inhibited reaction, the optimal conditions for DFQ determination were found. In the optimum condition of reaction: $\text{pH} = 7,9$; $c(\text{H}_2\text{O}_2) = 0,2 \text{ mol/dm}^3$; $c(\text{SA}) = 6 \cdot 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$; $c(\text{Cu}^{2+}) = 4 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$; $t = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$, the DFQ concentration on reaction rate was examined. The kinetic curves were constructed in interval concentration from 0,36 to 1,80 $\mu\text{g/cm}^3$ and from 1,80 to 7,20 $\mu\text{g/cm}^3$. Limit determination was 0,552 $\mu\text{g/cm}^3$, limit detection was 0,184 $\mu\text{g/cm}^3$. The relative error was

from 3,61 to 1,0 % for the interval of concentration 0,36 - 1,80 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$. To asses the selectivity of the method, the interference due to several cations and anions was studied in detail. It may be seen that Co^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+} , Sn^{2+} to DFQ interfere with reaction, when their concentration 10-times lower than concentration DFQ. Method was applied for DFQ determination in citrus. Solid-phase extraction was used for sample preparation. Recovery for kinetic method was from 90,62 to 99,20 %, and RSD was 0,38 - 2,28 %. The HPLC analysis was used to verify results of kinetic method.

The kinetic-spectrophotometric method for dimethoate determination is based on its inhibited effect in oxidation reaction of sulphanile acid with potassium-periodate in acetate buffer in presence of Fe^{3+} ions and 1,10-phenanthroline. Having examined the influence of all reactants on the rate of catalyzed and inhibited reaction, the optimal conditions for dimethoate determination were found. In the optimum condition of reaction: $\text{pH} = 4,7$; $c(\text{KIO}_4) = 1,8 \cdot 10^{-3} \text{ mol}/\text{dm}^3$; $c(\text{SA}) = 4,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol}/\text{dm}^3$; $c(\text{o-phenanthroline}) = 6,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol}/\text{dm}^3$; $c(\text{Fe}^{3+}) = 6,0 \cdot 10^{-8} \text{ mol}/\text{dm}^3$; $t = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$, the dimethoate concentration on reaction rate were examined. The kinetic curves were constructed in interval concentration from 28,10 to 196,70 ng/cm^3 and from 0,196 to 22,48 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$. Limit determination was 0,82 ng/cm^3 , limit detection was 3,85 ng/cm^3 . Accuracy and precision for dimethoate determination were calculated. The relative error was from 1,26 to 6,0 % for the interval of concentration 196,70 - 28,10 ng/cm^3 . To asses the selectivity of the method, the interference due to several cations and anions was studied in detail. It may be seen that Cu^{2+} to dimethoate interfere with reaction. Method was applied for dimethoate determination in water and milk. Liquid-liquid extraction and solid-phase extraction (SPE) was used for dimethoate extraction from milk and water samples. Recovery for water samples was 79,50 - 86,0 %, and for milk samples was 77,30 - 80,30 %. RSD is up to 4,0 % for the water samples, and 6,0 % for the milk samples. The HPLC analysis was used to verify results of kinetic method.

The kinetic-spectrophotometric method for bromfenoxim (BrFX) determination is based on its inhibited effect in the oxidation reaction of sulphanile acid with hydrogen-peroxide in phosphate buffer in the presence of Cu^{2+} ions. Having examined the influence of all reactants on the rate of catalyzed and inhibited reaction, the optimal conditions for BrFX determination were found. In the optimum condition of reaction: $\text{pH} = 7,9$; $c(\text{H}_2\text{O}_2) = 0,2 \text{ mol}/\text{dm}^3$; $c(\text{SA}) = 6 \cdot 10^{-4} \text{ mol}/\text{dm}^3$; $c(\text{Cu}^{2+}) = 4 \cdot 10^{-6} \text{ mol}/\text{dm}^3$; $t = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$, the BrFX concentration on the reaction rate was examined. The kinetic curves were constructed in interval concentration from 0,46 to 13,86 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ and from 0,041 to 0,46 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$. Limit determination was 0,0077 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$, limit detection was 0,025 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$. Accuracy and precision for dimethoate determination were calculated. The relative error was from 1,34 do 2,37 % for the interval of concentration BrFX from 0,041 to 0,46 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$. To asses the selectivity of the method, the interference due to several cations and anions was studied in detail. It may be seen that Co^{2+} i Pb^{2+} to BrFX interfere with reaction. Method was applied for BrFX determination in fruit juice. Solid - phase extraction was used for the sample preparation. Recovery for samples was 88,33 - 97,00 %, and RSD was 0,62 - 8,31 %. The HPLC analysis was used to verify results of kinetic method.

The kinetic-spectrophotometric method for ancymidol determination is based on its inhibited effect in the oxidation reaction of sulphanile acid with hydrogen-peroxide in

phosphate buffer in the presence of Cu^{2+} ions. Having examined the influence of all reactants on the rate of katalyzed and inhibited reaction, the optimal conditions for BrFX determination were found. In the optimum condition of reaction: $\text{pH} = 7,9$; $c(\text{H}_2\text{O}_2) = 0,2 \text{ mol/dm}^3$; $c(\text{SA}) = 6 \cdot 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$; $c(\text{Cu}^{2+}) = 4 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$; $t = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$, the ancymidol concentration on the reaction rate was examined. The kinetic curves were constructed in interval concentration from 2,15 do 21,50 ng/cm^3 and from 0,0215 to 17,20 $\mu\text{g/cm}^3$. Limit determination was 0,2 ng/cm^3 , limit detection was 1,6 ng/cm^3 . The relative error was from 6,65 to 0,30 % for the interval concentration of ancymidol from 2,15 to 21,50 ng/cm^3 . To asses the selectivity of the method, the interference due to several cations and anions was studied in detail. It may be seen that Co^{2+} to ancymidol interfere with reaction. The method was applied for ancimydol determination in water vand soil samples. Solid - phase ekstraktion was used for sample preparation. The HPLC analysis was used to verify results of kinetic method. Recovery was 86,15 - 101,30 %, and RSD was 2,49 - 6,40 %.

9. LITERATURA

Alexiev A. A., Bontchev P. R., Gantcheva S., A new catalytic reaction for determination of nanogram amounts of copper, *Microchim. Acta*, 1976, II, 487-495.

Alexiev A. A., Stoyanova A. M., A new katalytic reaction for the determination of nanomolar concentrations of iron (III), *Anal. Lett.*, 1988, 21, 1515-1532.

Aleksandrov V. N., *Otrovljajušćije veščestva, Himija*, Moskva, 1996.

Adamović V., Primena pesticida u proizvodnji i potrošnji sirovina za ishranu, *Hrana i ishrana*, 1967, 8, 4-6.

Alavi G., Sanda M., Loo B., Green R. E., Ray C., Movement of bromacil in a Hawaii soil under pineapple cultivation – a field study, *Chemosphere*, 2008, 72, 45-52.

Ashton F., Crafts A. S., *Mode of Action of herbicides*, John Willey and Sons, New York, 1981.

Audus L. J., *Herbicides. Physiology, Biochemistry, Ecology*, Vol I II, Academic Press, London, New York, San Francisco, 1976.

Ahmad I., On-line trace enrichment of difenzoquat in water and its determination by HPLC, *J. Environ. Sci. Health B*, 1983, 18, 207-219.

Awadh N. A. A., Lemme D., Jira Th., Attef O., Al-rahwi K., Determination of pesticide residues in khat leaves by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography, *Afr. J. Trad. CAM*, 2006, 3, 1-10.

Ariffin M. M., Anderson R. A., LC/MS/MS analysis of quaternary ammonium drugs and herbicides in whole blood, *J. Chromatogr. B*, 2006, 842, 91-97.

Avery H. E., *Basic Reaction Kinetics and mechanisms*, Macmillan, London, 1974.

Barnes K. A, Startin J. R., Thorpe. S. A., Reynolds S. L., Fussell R. J., Determination of the pesticide diflubenzuron in mushrooms by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry, *J. Chrom. A*, 1995, 712, 85-93.

Babić S., Petrović M., Kaštelan-Macan M., Ultrasonic solvent extraction of pesticides from soil, *J. Chrom. A*, 1998, 823, 3-9.

Barnaby F., Towards environmental warfare, *New Scientist*, 1976, 69 (981), 6-8.

Baltussen E., Cramers C. A., Sandra P. J. F., Sorptive sample preparation-a review, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2002, 373, 3-22.

Baltussen E., Sandra P., David F., Cramers C., Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: theory and principles, *J. Microcolumn Sep.*, 1999, 11, 737-747.

Benfenati E., Terreni M., Rovida C., Stella G., Analysis of bromofenoxim by supercritical fluid chromatography and comparasion with an HPLC method, *Toxicological and Environmental Chemistry*, 1995, 47, 119-128.

Blumberg L. M., Klee M. S, Method Translation and Retention Time Locking in Partition GC, *Anal. Chem.*, 1998, 70, 3828-3835.

Bončev P. R., *Kompleksobrazovane i katalitična aktivnost*, Nauka i izkustvo, Sofia, 1972.

Bode B. H., Zeeck A., UV mutagenesis and enzyme inhibitors as tools to elucidate the late biosynthesis of the spirobisnaphthalenes, *Phytochemistry*, 2000, 55, 311-316.

Bojović B., The effects of temperature, length of storage and plant growth regulators on germination of wheat (*triticum aestivum L.*) and triticale seeds, *Biotechnol. & Biotechnol. Eq.*, 2010, 24, 1849-1853.

Brewer R., *Principles of Ecology*, W. B. Saunders Company, Philadelphia, London et Toronto 1979.

Barnes K. A., Fussell R. J., Startin J. R., Thorpe S. A., Reynolds S. L., Determination of pesticide diflubenzuron and clofentezine in plums, strawberries and blackcurrant-based fruit drinks by high performance liquid chromatographic/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrometry*, 2005, 9, 1441-1445.

Balinova A., Multiresidue determination of pesticides in plants by high-performance liquid chromatography following gel permeation chromatographic clean-up, *J. Chrom. A*, 1998, 823, 11-16.

Bulatov M. I., Kalinkin I. P., *Praktičeskoe rukovodstvo po fotokolorimetričeskim i spektrofotometričeskim metodam analiza*, Himija, Moskva, 1972.

Baranova A., *Himija i mikrobiologija vodi*, Visšaja škola, Moskva, 1983.

Baranowska I., Pieszko C., Derivative spectrophotometry in the analysis of mixtures of phenols and herbicides, *Analyst*, 2000, 125, 2335-2338.

Baranowska I., Pieszko C., Derivative spectrophotometry in the analysis of bromacil and metoxuron in the presence of simazine or propazine and hexazinone, *Anal. Letters*, 2002, 25, 473-486.

Boyd-Boland A. A., Pawliszyn J. B., Solid-phase microextraction of nitrogen-containing herbicides, *J. Chromatogr. A*, 1995, 704, 163-172.

Boyd-Boland A. A., Magdić S., Pawliszyn J. B., Simultaneous determination of 60 pesticides in water using solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry, *Analyst*, 1996, 121, 929-938.

Castro R., Moyano E., Galceran M. T., On-line ion-pair solid-phase extraction-liquid chromatography-mass spectrometry for the analysis of quaternary ammonium herbicides, *J. Chromatogr. A*, 2000, 869, 441-449.

Castro R., Moyano E., Galceran M. T., Ion-pair liquid chromatography-atmospheric pressure ionization mass spectrometry for the determination of quaternary ammonium herbicides, *J. Chromatogr. A*, 1999, 830, 145-154.

Castro R., Moyano E., Galceran M. T., Determination of quaternary ammonium pesticides by liquid-chromatography-electrospray tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 2001, 914, 111-121.

Clanton C., Black Jr., *Weed Physiology, Vol. II. Herbicide Physiology*, Ed. S. Duke, CRS Press Inc., 1985, 1 – 36.

Crnjajeva E. L., Jakovleva A. H., *Gidrohimija*, SPAV, Leningrad, 1988.

Clayton G. D., Clayton F. E., Patt's *industrial hygiene and toxicology*, third ed., Vol 2: Toxicology, Wiley and sons, New York, 1981.

Chand T., Lembi C. A., Gas chromatographic determination of flurprimidol in a submersed aquatic plant (*Myriophyllum spicatum*), soil and water, *J. Plant Growth Regul.*, 1991, 10, 73-78.

Chu X. G., Hu X. Z., Yao H. Y., Determination of 266 pesticide residues in apple juice matrix solid-phase dispersion and gas chromatography-mass selective detection, *J. Chromatogr. A*, 2005, 1063, 201-210.

Cunha S. C., Fernandes J. O., Alves A., Oliveira M. B. P. P., Fast low-pressure gas chromatography-mass spectrometry method for the determination of multiple pesticides in grapes, musts and wines, *J. Chromatogr. A*, 2009, 1216, 119-126.

Corbett J. R., Wright K., Baillie A. C., *The Biochemical Mode of Action of Pesticides*, 2nd ed., Academic Press, London, 1984.

Čobanov D., Kocev N., *Hromatografija*, Nauka i izkustvo, Sofija, 1971.

De Koning S., Lach G., Linkerhägner M., Löcher R., Tablack H. P., Brinkman A. U., Trace-level determination of pesticides in food using difficult matrix introduction-gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry, *J. Chrom. A*, 2003, 1008, 247-252.

Dugo G., Di Bella G., La Torre L., Saitta M., Rapid GC-FPD determination of organophosphorus pesticide residues in Sicilian and Apulian olive oil, *Food Control*, 2005, 16, 435-438.

Du D., Chen S., Cai J., Tao Y., Tu H., Zhang A., Recognition of dimethoate carried by bi-layer electrodeposition of silver nanoparticles and imprinted poly-o-phenylenediamine, *Electrochim. Acta*, 2008, 53, 6589-6595.

Díaz T. G., Guiberteau A., López Soto M. D., Ortiz J. M., Determination of dimethoate in olive oil by adsorptive stripping square-wave voltammetry, *Electroanalysis*, 2006, 18, 695-702.

Díez C., Traag W. A., Zommer P., Marinero P., Atienza J., Comparison of an acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” method with classical multi-residue methods for the extraction of herbicide residues in barley samples, *J. Chromatogr. A*, 2006, 1131, 11-23.

Dondur V., *Hemisjska kinetika*, Fakultet za fizičku hemiju, Beograd, 1992.

Das J. V., Ramachandran K. N., Gupta V. K., Extractive spectrophotometric determination of dimethoate with molybdate and methylene blue by flotation-dissolution method, *Analyst*, 1994, 119, 1387-1390.

Ding H., Xie W., Zhou Z., Li B., Jiang Q., Determination of 11 benzoylurea insecticides residues in vegetable by LC-MS/MS, *J. Instrum. Analysis*, 2009, 8, 23-24.

Dommarco R., Santilo A., Fornarelli L., Rubbiani M., Simultaneous quantitative determination of thirteen urea pesticides at sub-ppb levels on a Zorbax SB-C₁₈ column, *J. Chrom. A*, 1998, 825, 200-204.

Erney D. R., Determination of organophosphorus pesticides in whole/chocolate/skim-milk and infant formula using solid-phase extraction with capillary gas chromatography/flame photometric detection, *J. High Resolution Chromatogr.*, 2005, 18, 59-62.

Eisert R., Levsen K., Wuensch G., Analysis of polar thermally labile pesticides using different solid-phase extraction (SPE) materials with GC and HPLC techniques, *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 1995, 58, 103-120.

Erofeev A. J., Tulipov V. A., *Kinetika homogenoga kataliza*, Nauka i Tehnika, Minsk, 1977.

FAO/WHO, Pesticide residues in food – 1981. Evaluations: The monographs. Rome, Food and Agriculture Organisation of the United nations (FAO Plant Production and Protection Paper 42).

Felbeck Jr. G.T., Structural chemistry of soil humic substances, *Adv. Agron.*, 1956, 17, 327-368.

Fan Y., Huang S., Yu X., Gu X., Qiu Y., Chen S., Fang K., Chen J., Determination of diflubenzuron and triflumuron residues in greasy wool by accelerated solvent extraction technique and high performance liquid chromatography, *Se Pu*, 2009, 27, 463-466.

Faller C., Meyer A., Henze G., Voltammetric determination of Ioxynil and 2-methyl-3-nitroaniline using C₁₈ modified carbon paste electrodes, *Fresen. J. Anal. Chem.*, 1996, 356, 761-765.

Flanagan R. J., Ruprah M., HPLC measurement of chlorophenoxy herbicides, bromoxynil, and ioxynil, in biological specimens to aid diagnosis of acute poisoning, *Clin. Chem.*, 1989, 35, 1342-1347.

García-Reyes J. F., Gilbert-López B., Molina-Díaz A., Fernández-Alba A. R., Determination of Pesticide Residues in Fruit-based Soft drinks, *Anal. Chem.*, 2008, 80, 8966-8974.

Galceran M. T., Carneiro C. M., Diez M., Puignon L., Separation of quaternary ammonium herbicides by capillary electrophoresis with indirect UV detection, *J. Chromatogr. A*, 1997, 782, 289-295.

Goldberg M. V., *Vzaimovsjaz zagrazenij vodi i prirodnoj sredi*, Gidrometeoizd, Leningrad, 1987.

Gallardo E., Barroso M., Margalho C., Cruz A., Vieira D. N., López-Rivadulla M., Solid-phase microextraction for gas chromatographic/mass spectrometric analysis of dimethoate in human biological samples, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2006, 20, 865-869.

Gil García M. D., Martínez-Galera M., Valvedere R. S., New method for the photo-chemiluminometric determination of benzoylurea insecticides based on acetonitrile chemiluminescence, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2007, 387, 1973-1981.

Guidelines for the Sustainable Application of Agrochemicals. Version 1.1 CD-ROM, Palmerston North, Hort Research, 2000.

Gil García M. D., Martínez-Galera M., Martínez D. B., Gallego J. G., Determination of benzoylureas in ground water samples by fully automated on-line pre-concentration and liquid chromatography-fluorescence detection, *J. Chrom. A*, 2006, 1103, 271-277.

Guillet V., Fave C., Mountury M., Microwave/SPME method to quantify pesticide residues in tomato fruits, *J. Environ. Sci. Health B*, 2009, 44, 415-422.

Guldberg C.M. and Waage P., Concerning Chemical Affinity, *Erdmann's Journal für Practische Chemie*, 1879, 127, 69-114.

Hammes G., *Principles of Chemical Kinetics*, Academic Press Inc., New York, 1960.

Hauptmann S., Graefe J., Remane H., *Lehrbuch der organischen Chemie*, VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig, 1977.

Hernandez F., Beltran J., Lopez F. J., Gaspar J. V., Use of Solid-Phase Microextraction for the Quantitative determination of herbicides in soil and water samples, *Anal. Chem.*, 2000, 72, 2313-2322.

Hongmei H., Liqin W., H. Zhang, Jiahong Z., Lei X, Multiresidue determination of benzoylurea insecticides in vegetable matrices, *Chinese J. Anal. Chem.*, 2006, 10, 4-5.

Huang Z., Zhang Y., Wang L., Ding L., Wang M., Yan H., Li Y., Zhu S., Simultaneous determination of 103 pesticide residues in tea samples by LC-MS/MS., *J. Sep. Sci.*, 2009, 32, 1294-1301.

Huang G., Ouyand J., Baeyens R. G. W., Yang Y., Tao C., *Anal. Chim. Acta*, 2002, 474, 21-29.

Hartmann C., Smeyers-Verbeke J., Penninckx W., Heyden Y. V., Vankeerberghen P., Massart D. L., Reappraisal of hypothesis testing for method validation: Detection of systematic error by comparing the means of two methods or of two laboratories, *Anal. Chem.*, 1995, 67, 4491-4499.

Hopper M. L, McMahon B., Griffitt K. R., Cline K., Fleming-Jones M. E., Kendall D. C., Analysis of fatty and nonfat foods for chlorophenoxy alkyl acids and pentachlorphenol, *J. AOAC Int.*, 1992, 75, 707-713.

Ishaaya J., Acher K. R. S., Effect of diflubenzuron on growth and carbohydrate hydrolases of *Tribolium castaneum*, *Phytoparasitica*, 1977, 5, 149-158.

Ibáñez M., Picó Y., Mañez J., Improving the solid-phase extraction of “quat” pesticides from water samples Removal of interferences, *J. Chromatogr. A*, 1998, 823, 137-146.

Igov R. P., Jaredić M. D., Pecev T. G., Kinetic determination of ultramicro amounts of copper, *Talanta*, 1980, 27, 361-364.

Janjić V., *Fitofarmacija*, Vizartis, Društvo za zaštitu bilja Srbije, Beograd-Banja Luka, 2005.

Janjić V., *Mehanizam delovanja pesticida*, Akademija nauka i umetnosti Republike Srpske, Banja Luka, 2009.

Jović R., Primena hemijskih sredstava u diverzijama, *Vojni Glasnik*, 1978, 62, 6-10.

Jacimirskii K. B., *Kinetičeskie metodi analiza*, Himija, Moskva, 1967.

Jacimirskii K. B., Tihonova L. P., *Kataliz v analitičeskoj himii*, Nauka, Moskva, 1970.

Karlhuber B. A., Hormann W. D., Ramsteiner K. A., Pesticide residue analysis by mass fragmentography, *Anal. Chem.*, 1975, 47, 2450-2452.

Karakčiev N. I., *Voennaja toksikologija i zaštita ot jadrenogo i himičeskogo oružja*, Medicina, Taškent, 1988.

Kolojanova-Simeonova F., *Pesticidi, toksičeskoe dejstvije i profilaktika*, Medicina, Moskva, 1980.

Kaihara A., Yoshii K., Tsumura Y., Nakamura Y., Ishimitsu S., Tonagai Y., Multiresidue analysis of pesticides in fresh fruits and vegetables by supercritical fluid extraction and HPLC, *J. Health Sci.*, 2000, 46, 336-342.

Khan M. A. Q., *Pesticides in aquatic environments*, Plenum Press, New York, 1977.

Khan B. A., Farid A., Asi M. R., Shad H., Badshah A. K., Determination of residues of trichlorfon and dimethoate on guava using HPLC, *Food Chem.*, 2009, 114, 286-288.

Krutz L. J., Sanseman S. A., Sciumbato A. S., Solid-phase microextraction for herbicide determination in environmental samples, *J. Chromatogr. A*, 2003, 999, 103-121.

Kumazawa T., Suzuki O., Separation methods for amino group-possessing pesticides in biological samples, *J. Chromatogr. B*, 2000, 747, 241-254.

Laidler K. J., *Chemical Kinetics*, 2nd Ed., McGraw-Hill, New York, 1965.

Lai X. H., Bai Z. W., Ng C. S., Ching C. B., Preparation and enantioseparation characteristics of two chiral stationary phases based on mono(6^A-azido-6^A-deoxy)-perphenylcarbamoylated α - and γ -cyclodextrin, *Chirality*, 2004, 16, 592-597.

Li Y., George J. E., McCarty C. L., Online in situ analysis of selected semi-volatile organic compounds in water by automated microscale solid-phase extraction with large-volume injection/gas chromatography/mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 2007, 1176, 223-230.

Lal A., Tan G., Chai M., Multiresidue analysis of pesticides in fruits and vegetables using solid-phase extraction and gas chromatographic methods, *Anal. Sci.*, 2008, 24, 231-236.

Luke, M. A., Doose, G. M., A modification of the Luke multiresidue procedure for low moisture, nonfatty products, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 1983, 30, 110-116.

Lucier G. W., *Metabolism of dimethoate in bean plants in relation to its mode of application*, Department of Entomology University of Maryland, College Park, 1967.

Lurie Ju. Ju., *Spravočnik po analitičeskoj himii*, Himia, Moskva, 1989.

Laidler K. J., *Chemical Kinetics*, Harper & Row, New York, 1987.

Marković D., Cakić S., Nikolić G., *Hromatografija Teorijske osnove sa praktikumom*, Tehnološki fakultet Leskovac & Studentski – informativno izdavački centar Niš, Leskovac - Niš, 1997.

Meljnikov N. N., Basakov A. J., Kortkova O. A., *Pesticidi i okružajuća sreda*, Himija, Moskva, 1977.

Meljnikov N. N., Novožilov K. V., Pilova T. N., *Himičeskie sredstva zaštiti rastenij (pesticidi) – Spravočnik*, Himija, Moskva, 1980.

Mokranjac M., *Toksikološka hemija*, Naučna knjiga, Beograd, 1973.

Meljnikov N. N., *Himija i tehnologija pesticidov*, Himia, Moskva, 1974.

Milošević M., Vitorović S., *Osnovi toksikologije sa elementima ekotoksikologije*, Naučna knjiga, Beograd, 1992.

Miliadis G. E., Tsiropoulos N. G., Aplada-Sarlis P.G., High-performance liquid chromatographic determination of benzoylurea insecticides residues in grapes and wine using liquid and solid-phase extraction, *J. Chrom A*, 1999, 835, 113-120.

Martinez-Galera M., Lopez-Lopez T., Gil-García M. D., Martínez-Vidal J. L., Vázquez P. P., Determination of benzoylureas in tomato by high-performance liquid chromatography using continuous on-line post-elution photoirradiation with fluorescence detection, *J. Chrom. A*, 2001, 918, 79-85.

Martinez-Galera M., Gil-García M. D., Valverde R. S., Determination of photoirradiated high polar benzoylureas in tomato by HPLC with luminol chemiluminescence detection, *Talanta*, 2008, 76, 815-823.

Martínez D. B., Martínez-Galera M., Vázquez P. P., Gil-García M. D., Simple and Rapid Determination of Benzoylphenylurea Pesticides in River Water and Vegetables by LC-ESI-MS, *Chromatographia*, 2007, 66, 533-538.

Metivier J., Viana A. M., Determination of microgram quantities of stevioside from leaves of Stevia rebaudiana Bert. By two-dimensional thin layer chromatography, *J. Exp. Bot.*, 1979, 30, 805-810.

Mirić O. M., Šobajić S. S., *Zdravstvena ispravnost namirnica*, Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Beograd, 2002.

Muderawan I. W., Ong T. T., Ng C. S., Urea bonded cyclodextrin derivates onto silica for chiral HPLC, *J. Sep. Sci.*, 2006, 29, 1849-1871.

Mensah J. K., Lundanes E., Greibrokk T., Holen B., Determination of diflubenzuron in apples by gas chromatography, *J. Chrom. A*, 1997, 765, 85-90.

Maki S. L., Delgado M., Adelberg J. W., Time course study of ancymidol formicropagation of hosta in a liquid culture system, *Hort Science*, 2005, 40, 764-766.

Mark H., Rechnitz G., *Kinetics in analytical chemistry*, Interscience Publishers, New York, 1968.

Marín J. M., Garcia-Lor E., Sancho J. V., López F. J., Hernández F., Application of ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry to the determination of multi-class pesticides in environmental and wastewater samples: Study of matrix effects, *J. Chromatogr. A*, 2009, 1216, 1410-1420.

Moyano E., Games D. E., Galceran M. T., Determination of quaternary ammonium herbicides by capillary electrophoresis/mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 1996, 10, 1379-1385.

Montesano M. A., Olsson A. O., Kuklenyik P., Needham L. L., Bradman A. S. A., Barr D. B., Method for determination of acephate, methamidophos, omethoate, dimethoate, ethylenethiourea and propylenethiourea in human urine using high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry, *J. Exp. Sci. Environ. Epidemiol.*, 2007, 17, 321-330.

Marković A. D., Đarmati A. Š., Gržetić A. I., Veselinović S. D., *Fizičkohemijski osnovi zaštite životne sredine Izvori zagadživanja posledice i zaštita*, Knjiga II, Univerzitet u Beogradu, Beograd, 1996.

Müller H., Otto M., Werner G., *Katalytische methoden in der spuren analyse*, Geest & Portig, Leipzig, 1980.

Nguyen T. D., Han E. M., Seo M. S., Kim S. R., Yun M. Y., Lee D. M., Lee G. H., A multi-residue method for the determination of 203 pesticides in rice paddies using gas chromatography/mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta*, 2008, 619, 67-74.

Nestorovska-Krsteska A., Mirčeska M., Aaron J. J., Zdravkovski Z., Determination of dimethoate, 2,4-dichlorophenoxy acetic acid, mecoprop and linuron pesticides in environmental waters in Republic of Macedonia by high performance liquid chromatography, *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 2008, 27, 25-33.

Nejmanová J., Cvačka J., Hrdý I., Kuldová J., Mertelík J., Muck Jr. A., Nešněrová P., Svatoš A., Residues of diflubenzuron on horse chestnut (*Aesculus hippocastanum*) leaves and their efficacy against the horse chestnut leafminer, *Chameraria ohridella*, *Pest. Manag. Sci.*, 2006, 62, 274-278.

Nguyen T. D., Lee M. H., Lee G. H., Rapid determination of 95 pesticides in soybean oil using liquid-liquid extraction followed by centrifugation, freezing and dispersive solid phase extraction as cleanup steps and gas chromatography with mass spectrometric detection, *Microchem. J.*, 2010, 95, 113-119.

Nguyen T. D., Yun Y. M., Lee G. H., A multiresidue method for the determination of 118 pesticides in vegetable juice by gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Agric. Food Chem.*, 2009, 57, 10095-10101.

Nikolelis D. P. and Hadjioannou T. P., Kinetic microdetermination of copper in urine, thiosulfate, nitrilotriacetic acid, and ethyleneglycolbis (2-aminoethyl-ether)-NNN'N'-tetraacetic acid, *Microchim. Acta*, 1977, 67, 125-138.

Núñez O., Kim J. B., Moyano E., Galceran M. T., Terabe S., Analysis of the herbicides paraquat, diquat and difenoquat in drinking water by micellar electrokinetic chromatography using sweeping and cation selective exhaustive injection, *J. Chromatogr. A*, 2002, 961, 65-75.

Núñez O., Moyano E., Galceran M. T., Capillary electrophoresis-mas spectrometry for the analysis of quaternary ammonium herbicides, *J. Chromatogr. A*, 2002, 974, 243-255.

Núñez O., Moyano E., Galceran M. T., Solid-phase extraction and sample stacking-capillary electrophoresis for the determination of quaternary ammonium herbicides in drinking water, *J. Chromatogr. A*, 946, 2002, 275-282.

Núñez O., Moyano E., Galceran M. T., Time-of-flight high resolution versus triple quadrupole tandem mass spectrometry for the analysis of quaternary ammonium herbicides in drinking water, *Anal. Chim. Acta*, 2004, 525, 183-190.

Núñez O., Moyano E., Galceran M. T., High mass accuracy in-source collision-induced dissociation tandem mass spectrometry and multi-step mass spectrometry as complementary tools for fragmentation studies of quaternary ammonium herbicides, *J. Mass Spectrom.*, 2004, 39, 873-883.

Núñez O., Moyano E., Puignou L., Galceran M. T., Sample stacking with matrix removal for the determination of paraquat, diquat and difenoquat in water by capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, 2001, 912, 353-361.

Occupation Health Services Inc. *MSD for Bromacil*, Secaucus, USA, OHC Inc., 1991

Phull M., Nigam P. C., Kinetic determination of microamounts of some sulphur-containing ligands, *Talanta*, 1983, 401-404.

Preventin Pesticides and Toxic Substances, United States environmental Protection Agency, EPA-7-F-95-027, 1995.

Pang F. G., Fan C. L., Liu Y. M., Cao Y. Z., Zhang J. J., Fu B. L., Li X. M., Li Z. Y., Wu Y. P., Multi-residue method for the determination of 450 pesticide residues in honey, fruit juice and wine by double-cartridge solid-phase extraction/gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Food Addit. Contam.*, 2006, 23, 777-810.

Paget G., Barnes J. M., *Toxicity tests Pharmacometrica*, Academic press, New York, 1964.
Pantel S., Weisz H., Some new applications of the biamperostat catalytic-kinetic determination of copper, peroxidase, glucose oxidase, thyroxine and 5-chloro-7-iodo-8-hydroxyquinoline, *Anal. Chim. Acta*, 1977, 89, 47-54.

Pesticide information profile: *Bromacil*, Cornell University, USA, PMEP, 2001.

Pinto J. S. S., Lancas F. M., Design, construction and evaluation of a sample pressurized solvent extraction system, *J. Braz. Chem. Soc.*, 2009, 20, 913-917.

Perret D., Gentili A., Marchese S., Sergi M., D'Ascenzo G., Validation of a method for the determination of multiclass pesticide residues in fruit juices by liquid chromatography/tandem mass spectrometry after extraction by matrix solid-phase dispersion, *J. AOAC Int.*, 2002, 85, 724-730.

Poon Y. F., Muderawan I. W., Ng S. C., Synthesis and application of mono-2^A-azido-2^A-deoxyphenylcarbamoylated β -cyclodextrin and mono-2^A-azido-2^A-deoxyperacetylated β -cyclodextrin as chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, 2006, 1101, 185-197.

Pappas C. J., Kyriakidis N. V., A comparison of dimethoate degradation in lemons and mandarins on the trees with two GC systems, *Food Chem.*, 2003, 80, 23-28.

Perez-Bendito D., Silva M., *Kinetics Methods in Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons, 1988.

Polling M., *Reaction Kinetics*, Oxford Chemistry Sears, Oxford, 1975.

Pawliszyn J., *Solid-Phase Microextraction, Theory and applications*, Wiley-VCH, New York, USA, 1997.

Queiroz S. C. N., Lazou K., Sandra P., Jardim I. C. S. F., Determination of pesticides in water by liquid chromatography-(electrospray ionization)-mass spectrometry (LC-ESI-MS), *Pesticidas: R. Ecotoxicol. E Meio Ambiente*, Curitiba, 2004, 14, 53-60.

Ren H., Yang Y., Lin J., Qi Y., Zhang Y., Synthesis and characterization of 5-bromo-3-sec-butyl-6-methyluracil, *Front. Chem. China*, 2008, 3, 152-156.

Santos R. L., Cordeiro P. J., Vieira E. M., Analysis of diflubenzuron in tilapia filet by HPLC-DAD, *J. Chrom. Sci.*, 2009, 47, 785-788.

Sannino A., Bandini M., Determination of seven benzoylphenylurea insecticides in processed fruit and vegetables using high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrometry*, 2005, 19, 2729-2733.

Sandra P., Tienpont B., Vercammen J., Tredoux A., Sandra T., David F., Stir bar sorptive extraction applied to the determination of dicarboximide fungicides in wine, *J. Chromatogr. A.*, 2001, 928, 117-126.

Scott W. S., *Water, Air and Soil Pollution*, Interscience, New York, 1976.

Soldatović D. R., *Toksikologija Pesticida sa analitikom*, Privredni pregled, Beograd, 1980.

Soltani N., Besson M. T., Delachambre J., Effect of diflubenzuron on the pupal-adult development of *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera, Tenebrionidae): growth and cell density and DNA synthesis, *Pest. Biochem. Physiol.*, 1984, 21, 256-264.

Senseman S. A., Mueller T. C., Riley M. B., Wauchope R. D., Clegg C., Young R. W., Southwick L. M., Moye H. A., Dumas J. A., Mersie W., Mattice J. D., Leidy R. B., Interlaboratory comparison of extraction efficiency of pesticides from surface and laboratory water using solid phase extraction disks, *J. Agric. Food Chem.*, 2003, 51, 3748-3752.

Sanchez M. E., Rabanal B., Otero M., Martin-Villacorta J., Solid-phase extraction for the determination of dimethoate in environmental water and soil samples by micellar electrokinetic capillary chromatography (MEKC), *J. Liquid Chrom. Realat. Tech.*, 2003, 26, 545-557.

Sancho J. V., Hidalgo C., Hernández F., Direct determination of bromacil and diuron residues in environmental water samples by coupled-column chromatography and large-volume injection, *J. Chromatogr. A*, 1997, 761, 322-326.

Schmalko M. E., Ramallo L. A., Ferreira D., Berlingheri R. D., Dimethoate degradation in plants and during processing of yerba maté leaves, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 2002, 45, 419-422.

Salm P., Taylor P. J., Roberts D., De Silva J., Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the simultaneous quantitative determination of the organophosphorus pesticides dimethoate, fenthion, diazinon and chlorpyrifos in human blood, *J. Chromatogr. B*, 2009, 877, 568-574.

Sorano-García M., Avellaneda C. R., Rodríguez J. G. A., Crystal structure of α -cyclopropyl-4-metoxy- α -(pyrimidin-5-yl)benzyl alcohol (Ancymidol), *Anal. Sci.*, 2004, 20, 131-132.

Sancho J. V., Pozo O. J., Hernández F., Liquid chromatography and tandem mass spectrometry: a powerful approach for the sensitive and rapid multiclass determination of pesticides and transformation products in water, *Analyst*, 2004, 129, 38-44.

Singh B., Dogra T. D., Rapid method for the determination of some organophosphorus insecticides in a small amount of serum in emergency and occupational toxicology cases, *Indian J. Occup. Environ. Med.*, 2009, 13, 84-87.

Siltanen H, Mutanen R., Formation of derivates of chlorphenoxy acids and some other herbicides, *Chromatographia*, 1985, 20, 685-688.

Soldatović R. D. I saradnici, *Toksikologija pesticida sa analitikom*, Privredni pregled, Beograd, 1980.

Swaroop A. L., Rao S. P, Krishnaiah L., Chiranjeevi P., Spectrofluorimetric determination of dimethoate residues in environmental samples, *Proceedings of the Third International Conference on Environment and Health*, Chennai, India, 15-17 December, 2003, 570-576.

Skoog D. A., West D. M., Holler F. J., *Fundamentals of Analytical Chemistry*, Saunders College Publishing, Philadelphia, 1996.

Turin H. J., Bowman R. S., A solid-phase extraction based soil extraction method for pesticides of varying polarity, *J Environ. Qual.*, 1993, 22, 332-334.

Toxnet 1975-1986, National Library of medicine's toxicology de network. Hazardous Substances data Blank (HSDB). Public Healt Service. National Institute of Health, US. Department of Health and Human Services, Bethesda, MD-NLM.

Tadashi T., Tetsuya Y., Moritoshi S., Determination of difenoquat in cereals by GC/MS, *J. Food Hyg. Soc. Jap.*, 1998, 39, 431-435.

USEPA 1996. EPA RED FACT: *Bromacil: Prevention, pesticides and toxic substances*, EPA-738-F-96-013.

US EPA 2008. *Technical overview of ecological risk assessment Aquatic Life Benchmark Table* (online) http://www.epa.gov/oppefed1/ecorisk_ders/aquatic_life_benchmark.htm

Valenzuela A. I., Picó Y., Font G., Liquidchromatography/atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometric analysis of benzoylurea insecticides in citrus fruits, *Rapid Commun. Mass Spectrometry*, 2000, 14, 572-577.

Vázquez P. P., Mughari A. R., Martínez-Galera M., Solid-phase microextraction for the determination of benzoylureas in orange juice using liquid chromatography combined with post-column photochemically induced fluorimetry derivatization and fluorescence detection, *J. Sep. Sci.*, 2008, 31, 56-63.

Vasilikiotis G. S. ,Papadopoulos C., Themelis D. G., Sofoniou M. C., Indirect kinetic microdetermination of oxalate, citrate, and fluoride ions, *Microchem. J.*, 1983, 28, 431-436.

Vročinskij K. K., Teltičenko M. M., *Gidrobiologičeskaja migracija pesticidov*, IMN, Moskva, 1980.

Vročinski K. K., *Gidrobiologičeskaja migracija pesticidov*, MGU, Moskva, 1980.

Vardapetyan G. R., Kirakosyan A. B., Oganesyan A. A., Penesyan A. R., Alfermann A. V., The elicitor-induced biosynthesis of lignans in callus cultures of *Linum austriacum* L., *Biotechnology in Russia*, 2002, 3, 26-29.

Wolfe, N. L., Mingeigrin, U., Miller, G. C. *Abiotic transformations in water, sediments, and soil. In Pesticides in the Soil Environment: Processes, Impacts, and Modeling* (ed. H. H. Cheng), pp. 103 – 68. Madison, WI: Soil Science Society of America 1990.

Wang H., Zhao J., Chen Z., He P., Fang Y., Simultaneous determination of diflubenzuron and triflumuron residues in greasy wool using high performance liquid chromatography, *Se Pu*, 2008, 26, 740-743.

Wang J., Yang S. P., Yan F. Y., Liu Y., Li M., Song Y. H., Zhan Y. B., Chen H. W., Rapid determination of dimethoate in nanoliter of juice using surface desorption atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry, *Chin. J. Anal. Chem.*, 2010, 38, 453-457.

Wang Y., Zong F., Analysis of herbicide-difenoquat by reversed-phase performance liquid chromatography (RP-HPLC), *Chin. J. Chrom.*, 1999, 17, 83-84.

Wong J. W., Webster M. G., Halverson C. A., Hengel M. J., Ngim K. K., Ebeler S. E., Multiresidue pesticide analysis in wines by solid-phase extraction and capillary gas chromatography-mass spectrometric detection with selective ion monitoring, *J. Agric. Food Chem.*, 2003, 51, 1148-1161.

Yang G., Xu Q. X., Shen C. M., Wang W., Xu L., Chen N. G., Fu F., Determination of organophosphorus pesticides by capillary electrophoresis-inductively coupled plasma mass spectrometry with collective sample-introduction technique, *Electrophoresis*, 2009, 30, 1718-1723.

Zhu Y., Yanagihara K., Guo F., Li Q. X., Pressurized fluid extraction for quantitative recovery of chloroacetanilide and nitrogen heterocyclic herbicides in soil, *J. Agric. Food Chem.*, 2000, 48, 4097-4102.

Zhu Y., Li X.Q., Movement of bromacil and hexazinone in soils of Hawaiian pineapple fields, *Chemosphere*, 2002, 49, 669-674.

Zhou J., Liu R., Song G., Zhang M., Determination of benzoylurea insecticides residues in grape juice drink by direct single-drop microextraction-high performance liquid chromatography, *Sci. Tech. Food Ind.*, 2009, 8, 87-88.

Zhou J., Liu R., Song G., Zhang M., Determination of two kinds of pesticide residues in peach juice drink by floated organic drop microextraction-high performance liquid chromatography, *Sci. Tech. Food Ind.*, 2009, 7, 95-96.

Živanović Valentina, *Određivanje tragova aktivnih materija nekih pesticida kinetičkim metodama analize*, Doktorska teza, PMF-Niš, 2002.

10. BIOGRAFIJA SA BIBLIOGRAFIJOM



Emilija T. Pecev-Marinković rođena je 10.12.1975.god. u Nišu. Osnovnu i srednju školu završila je u Nišu. Školske 1994/95. godine upisala se na studije na Filozofskom fakultet u Nišu, na Grupi za hemiju, i diplomirala na istom 27.12.2000. god. Diplomski rad odbranila je ocenom 10 i time stekla pravo na diplomu o visokoj stručnoj spremi i stručni naziv diplomirani hemičar opšte hemije.

Školske 2000/01. god. upisala se na poslediplomske studije na Filozofskom fakultetu u Nišu, na Odseku za hemiju, na smeru za Analitičku hemiju.

2001. god. Izabrana je za asistenta-pripravnika na Katedri za Analitičku i Fizičku hemiju, na predmetima: Fizička hemija II, na Odseku za hemiju i Hemiju, na Odseku za fiziku. Godine 2005. izabrana je za asistenta na istim predmetima na Katedri za Analitičku i Fizičku hemiju.

Nakon položenih ispita odbranila je magistarski rad, iz oblasti fizičke i analitičke hemije, pod nazivom „Primena prehrambene boje Ponceau 4R kao indikatorske supstance u kvantitativnoj hemijskoj analizi“ 13.11.2004. god. na Prirodno-matematičkom fakultetu u Nišu.

Učešće na projektima:

„Razvoj novih i poboljšanje postojećih analitičkih metoda za praćenje kvaliteta industrijskih proizvoda i životne sredine“ koji je finansiran od strane Ministarstva za Nauku i Tehnologiju Republike Srbije, u periodu od 2001. do 2005. godine.

„Razvoj i primena metoda za prećenje kvaliteta industrijskih proizvoda i životne sredine“, finansiran od Ministarstva za nauku i Tehnologiju Republike Srbije u periodu od 2005. do 2010. godine.

Objavljeni i saopšteni radovi kandidata koji čine deo doktorske disertacije

1. Z. M. Grahovac, S. S. Mitić, **E. T. Pecev**, A. N. Pavlović, Determination of insecticide diflubenzuron in mushrooms by kinetic method and high-performance liquid chromatographic method, *Journal of Environmental Science and Health Part B*, 2010, 45, 783-789.
2. **E. T. Pecev**, Z. M. Grahovac, S. S. Mitić, R. M. Simonović, A. N. Pavlović, Determination of herbicide bromacil in water and soil samples by kinetic-spectrophotometric method and HPLC method, *Oxidation Communications*, 2010, 33, 593-606.
3. Zora M. Grahovac, Snežana S. Mitić, **Emilija T. Pecev**, Aleksandra N. Pavlović, Development of new kinetic-spectrophotometric method for determination insecticide dimethoate in milk and water, *J. Chin. Chem. Soc.*, 2010, 57, 1027-1034.
4. Z. M. Grahovac, S. S. Mitić, T. G. Pecev, **E. T. Pecev**, New kinetic method for determination herbicide difenoquat-methylsulphate, Phisical Chemistry, 9th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, September 24-26, Belgrade, Proceedings, Volume I, 139-141, 2008.
5. Zora M. Grahovac, Snežana S. Mitić, Todor G. Pecev, **Emilija T. Pecev**, Development of new kinetic-spectrophotometric method for diflubenzuron determination, 1st Symposium of Chemistry and Environment, June 12-15, Budva, Montenegro, Book of abstracts, 170, 2007.
6. Zora Grahovac, Snežana Mitić, Todor Pecev, **Emilija Pecev**, Determination of insecticide dimethoate by kinetic method, XX Congress of Chemists and Tehnologysts of Macedonia, September 17-20, Ohrid, Republic of Macedonia, Book of abstracts, 86, 2008.
7. Zora M. Grahovac, Snežana S. Mitić, Todor G. Pecev, **Emilija T. Pecev**, Determination of herbicide Bromacil by kinetic method, 5. Simpozijum Hemija i zaštita životne sredine, 27-30. Maj, Tara, Book of abstracts, 50-51, 2008.
8. Zora Grahovac, Snežana Mitić, **Emilija Pecev**, Danijela Kostić, Determination of insecticide diflubenzuron in mushrooms, 1st International Congress „Engineering, Materials and Management in the Processing Industry“, October 14-16, Jahorina, Republic of Srpska, Book of abstracts, 165, 2009.
9. **E. T. Pecev**, Z. M. Grahovac, S. S. Mitić, A. N. Pavlović, Determination of herbicide bromacil in water and soil samples, Twelfth annual conference „YUCOMAT 2010“, September 6-10, Herceg Novi, Montenegro, Book of abstracts, 88, 2010.

10. Zora M. Grahovac, Snežana S. Mitić, **Emilija T. Pecev**, Aleksandra N. Pavlović, Određivanje insekticida dimetoata u vodi i mleku kinetičkom metodom i HPLC metodom, IX Savetovanje Hemičara i Tehnologa Republike Srpske, Banja Luka, 12-13 Novembar, Zbornik izvoda radova, 92, 2010.

Objavljeni i saopšteni rezultati kandidata koji nisu deo doktorske disertacije

Radovi objavljeni u istaknutim časopisima međunarodnog značaja M₂₂ = 5

1. S. S. Mitić, G. Ž. Miletić, A. N. Pavlović, S. B. Tošić, **E. T. Pecev**, Determination of Diclofenac Sodium in Commercial Pharmaceutical Formulations and Human Control Serum Using a Kinetic-Spectrophotometric Method, *Chem. Pharm. Bull.*, 2007, 55(10), 1423-1426.

Radovi objavljeni u časopisima međunarodnog značaja M₂₃ = 3

1. Z. M. Grahovac, S. S. Mitić, **E. T. Pecev**, Kinetic determination of ultramicro amounts of Cu(II) ions in solution, *J. Serb. Chem. Soc.*, 68(3), 219-226, 2003.
2. S. S. Mitić, G. Ž. Miletić, S. M. Miletić, D. A. Kostić, **E. T. Pecev**, Kinetic determination of quercetin, *Bulgarian Chemistry and Industry*, 73, No 1, 25-27, 2002.
3. Z. M. Grahovac and **E. T. Pecev**, Kinetic determination of traces of Mn(II) ion in solution, *Oxidation Communications*, 28, No 2, 424-432, 2005.
4. Zora M. Grahovac, Snežana S. Mitić, **Emilija T. Pecev**, Snežana B. Tošić, Kinetic Spectrophotometric determination of Co(II) ion by the oxidation of Ponceau 4R by hydrogen peroxide, *J. Serb. Chem. Soc.*, 71(2), 189-196, 2006.
5. Aleksandar R. Igov, Ranko M. Simonović, Todor G. Pecev, **Emilija T. Pecev**, Kinetic determination of nanogram amounts of Mo(VI) in solution, *J. Chin. Chem. Soc.*, 53, 591-595, 2006.
6. Zora M. Grahovac, Snežana S. Mitić, Todor G. Pecev, **Emilija T. Pecev** and Aleksandra N. Pavlović, Kinetic Spectrophotometric determination of Ascorbic acid in pharmaceutical samples by oxidation of Ponceau 4R by hydrogen peroxide, *J. Chin. Chem. Soc.*, 55, 137-142, 2008.
7. Aleksandar R. Igov, Ranko M. Simonović, Todor G. Pecev, **Emilija T. Pecev**, Development of new kinetic spectrophotometric method for determination of Mn(II) in natural waters, *Chemia Analityczna*, 54, 247-256, 2009.

Radovi saopšteni na skupovima međunarodnog značaja štampani u celini
M₃₃ = 1

1. Z. M. Grahovac, S. S. Mitić, **E. T. Pecev**, Development of Kinetic Method for Determination micro amounts of Cu(II) ions in solution, Phisical Chemistry, 6th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, September 26-28, Belgrade, Proceedings, Volume I, 222-224, 2002.
2. Z. M. Grahovac, S. S. Mitić, **E. T. Pecev**, Influence of Co(II) as the catalyst on kinetics characteristics of Ponceau 4R oxidation by hydrogen peroxide, Phisical Chemistry, 7th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, September 21-23, Belgrade, Proceedings, Volume I, 243-245, 2004.

Radovi saopšteni na skupovima međunarodnog značaja štampani u izvodu M₃₄ = 0,5

1. Z. M .Grahovac, T.G. Pecev, **E T. Pecev**, Development of new kinetic method for determination of ultramicro amounts of Mn(II) ion in presence of 2,2'-dypyridile, II Regional Symposium, Chemistry and Enviroment, June 18-22, Kruševac, Proceedings, 69-70, 2003.
2. Z. M. Grahovac, T. G. Pecev, **E. T. Pecev**, Application of the new kinetic method for Mn(II) traces determination in samples of alloy, II Regional Symposium, Chemistry and Enviroment, June 18-22, Kruševac, Proceedings, 71-72, 2003.
3. Vladimir R. Igov, Ranko M. Simonović, Aleksandar R. Igov, **Emilija T. Pecev**, kinetic determination of nanogram amounts of phosphate, II Regional Symposium, Chemistry and Enviroment, June 18-22, Kruševac, Proceedings, 147-148, 2003.
4. Zora M. Grahovac, Snežana S. Mitić, **Emilija T. Pecev**, Kinetic determination of traces of ascorbic acid, XVIII Congress of Chemists and Tehnologists of Macedonia, September 23-25, Ohrid, Republic of Macedonia, Book of abstracts, 213, 2004.
5. Zora M. Grahovac, Snežana S. Mitić, **Emilija T. Pecev**, Kinetic determination of traces of Co(II) ion, XVIII Congress of Chemists and Tehnologists of Macedonia, September 23-25, Ohrid, Republic of Macedonia Book of abstracts, 214, (2004).
6. R. M. Simonović, **E. T. Pecev**, R. J. Micić, B. B. Petrović, Kinetic determination of traces of V(V) in solution, Eighth Yugoslav Materials Research Society Conference „YUCOMAT 2006”, September 4-8, Herceg Novi, The book of Abstracts, 119, Montenegro, 2006.

7. **E. T. Pecev**, B. B. Petrović, R. M. Simonović, R. J. Micić, Kinetic-spectrophotometric determination of traces of W(VI) in solution, Eighth Yugoslav Materials Research Society Conference „YUCOMAT 2006”, September 4-8, Herceg Novi, The book of Abstracts, 118, Montenegro, 2006.
8. **Emilija T. Pecev**, Zora M. Grahovac, Todor G. Pecev, Ranko M. Simonović, Kinetic determination of molybdenum (VI), 5th International Conference of the South-East European Chemical Societies & The XIX Congress of the Chemists and Tehnologists of Macedonia, September 10-14, Ohrid, Republic of Macedonia, Book of Abstracts, Volume 1, 79, 2006.
9. Ranko M. Simonović, Todor G. Pecev, **Emilija T. Pecev**, Aleksandar R. Igov, Kinetic determination of nanogram amounts of manganese(II) in solution, 5th International Conference of the South-East European Chemical Societies & The XIX Congress of the Chemists and Tehnologists of Macedonia, September 10-14, Ohrid, Republic of Macedonia, Book of Abstracts, Volume 1, 86, 2006.
10. Zora M. Grahovac, Snežana S. Mitić, Todor G. Pecev, **Emilija T. Pecev**, Development of new kinetic-spectrophotometric method for diflubenzuron determination, 1st Symposium of Chemistry and Environment, June 12-15, Budva, Montenegro, Book of abstracts, 170, 2007.

Radovi saopšteni na skupovima nacionalnog značaja štampani u celini $M_{63} = 0,5$

1. Jovanović Stankov V., Mitić V., Jovanović O., **Pecev E.**, Jovanović B., Petrović I., Uklanjanje organskih materija iz otpadnih voda nastalih bojenjem vune metal-kompleksnim bojama, Stanje i perspektive istraživanja i razvoja u hemijskoj i mašinskoj industriji, Oktobar 22-24, Kruševac, Proceedings, Volume 2, 89-93, 2001.

Odbranjena magistarska teza $M_{72} = 3$

Emilija T. Pecev, “Primena prehrambene boje ponceau 4R kao indikatorske supstance u kvantitativnoj hemijskoj analizi” Univerzitet u Nišu, Prirodno-matematički fakultet, 2004.

