



Ekstrakcija triazinskih herbicida u zavisnosti od karakteristika zemljišta

Milica Ćućuz^{a*}, Vojislava Bursić^a, Gorica Vuković^b, Vladimir Dapčević^a, Vladimir Ćirić^a, Tijana Zeremski^c, Rada Đurović-Pejčev^d

^aUniverzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Departman za fitomedicinu i zaštitu životne sredine, Novi Sad, Srbija

^bInstitut za javno zdravlje, Beograd, Srbija

^cInstitut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad, Srbija

^dInstitut za pesticide, Beograd, Srbija

*Autor za kontakt: cucuzm@yahoo.com

SAŽETAK

U radu je ispitano ponašanje herbicida iz hemijske grupe triazina u zavisnosti od različitih fizičkih i hemijskih karakteristika zemljišta. Sudbina i mobilnost pesticida, pa i triazina, u životnoj sredini primarno zavise od adsorpcije, zato što degradacija, metabolizam, mikrobiološka razgradnja i mobilnost uključuju samo slobodnu (neadsorbovanu) frakciju molekula ovih jedinjenja. Sorpciona interakcija pesticid-zemljište može uključiti mineralne ili organske komponente, a nekada i obe. Sorpcija pesticida je bazirana na dva fenomena: slabog hemijskog vezivanja i difuzije komponenti kroz strukturu zemljišta. Sorpcija pesticida za zemljište ne predstavlja samo kontaminaciju zemljišta već i vodenih sistema koji su u kontaktu sa takvim zemljištem, a u velikom stepenu određuje i intenzitet mobilnosti ovih jedinjenja u životnoj sredini. Slobodna (nesorbovana) frakcija molekula pesticida se može nesmetano kretati vodenom fazom, dok će se vezane komponente zadržavati u zavisnosti od sorpcionih osobina pesticida, fizičko-hemijskih karakteristika zemljišta, kao i osobina vodene faze. Spiranje pesticida u dublje slojeve zemljišta do podzemnih voda je kompleksan proces kontrolisan uslovima koji vladaju u zemljištu i životnoj sredini. Predmet istraživanja ovog rada je da se u okviru validacije multirezidualne metode određivanja ostataka herbicida i njihovih metabolita iz grupe triazina (atrazin, cianazin, heksazinon, tiodikarb, desetilatrazin i simazin) u zemljištu, metodom LC-MS/MS utvrdi prinos ekstrakcije ispitivanih analita u zavisnosti od fizičko-hemijskih karakteristika zemljišta.

KLJUČNE REČI

Triazinski herbicidi, zemljište, QuEChERS, LC-MS/MS; prinos ekstrakcije

Uvod

Upotreba herbicida u poljoprivredi je značajan faktor zaslužan za masovnu proizvodnju hrane. Niska degradabilnost pesticida, dovela je do njihovog prisustva u vodi, zemljištu i hrani. Hemijske karakteristike pesticida, poput niskog stepena rastvorljivosti u vodi, a visokog u mastima, stabilnost na foto-oksidaciju i nizak napon pare su glavni elementi koji određuju ne samo efikasnost već i persistentnost pesticida u životnoj sredini (Kim and Smith, 2001).

Herbicidi mogu da budu veoma perzistentni u životnoj sredini. Jedinjenja koja su stabilna i dugo se zadržavaju u nekom od delova sredine se postepeno izbacuju iz upotrebe ili im se ograničava doza primene. Upravo zbog toga, preparati na bazi triazina su u Evropskoj uniji (EU) od 2004. godine povučeni iz upotrebe.

Triazini pripadaju hemijskoj grupi herbicida koji inhibiraju Hill-ovu reakciju pri čemu se stvaraju žuti i nekrotični simptomi na biljkama, odnosno inhibiraju proces fotosinteze. Herbicidi koji ispoljavaju delovanje na fotosintezu u stvari deluju na inhibiciju transporta elektrona u svetlim reakcijama fotosinteze ili ispoljavaju delovanje na biosintezu fotosintetičkih pigmenata (Janjić, 2005).

Kod osetljivih biljaka u toksičnim dozama triazini izazivaju narušavanje procesa fotosinteze, degradaciju hloroplasta, slabljenje fotolize vode, umanjeња sadržaja ugljenih hidrata, inhibiciju disanja, aktivnost enzima, što dovodi do preovlađivanja hidrolitičkih procesa nad sintetičkim.

Glavni simptom toksičnog delovanja ovih herbicida je pojava žutila na listovima, prvo na rubovima, a zatim cele liske. Izazivaju u početku povećanje intenziteta disanja oštećenih biljaka, a kao posledica Hill-ove reakcije dolazi do sniženja intenziteta procesa fotosinteze i usvajanja CO₂ (Janjić, 2005). Triazinske herbicide biljka apsorbira korenovim sistemom što uslovljava njihovo korišćenje najčešće kao zemljišni herbicid pre klijanja i nicanja korova (Konstantinović, 2011).

Najpoznatiji herbicid iz grupe triazina je atrazin koji se veoma dugo koristio kao pre emergentni (pre em) i post emergentni (post em) herbicid za suzbijanje travnih i širokolisnih korova u usevima kukuruza, pirinča, pšenice i sirka. Upotreba velike količine atrazina je dovela do pojave njegova dva degradaciona proizvoda, desetilatrazina (DEA) i deisopropilatrazina (DIA) u zemljištu i u prirodnim izvorima vode. Atrazin, DEA i DIA imaju slične biološke aktivnosti i ispoljavaju toksične efekte predstavljajući tako rizik po žive organizme. DEA i DIA se veoma čvrsto vezuju za zemljište i samim tim predstavljaju još veću opasnost po životnu sredinu (Amadori et al, 2016).

Sudbina i mobilnost pesticida u životnoj sredini primarno zavise od adsorpcije, zato što degradacija, metabolizam, mikrobiološka razgradnja i mobilnost zavise samo od nerastvornih molekulskih frakcija. Sorpciona interakcija pesticid-zemljište može uključiti mineralne ili organske komponente, a nekada i obe (Đurović i sar., 2012). Intenzitet sorpcije molekula pesticida za zemljište u velikom stepenu utiče na mobilnost ovih jedinjenja u životnoj sredini, odnosno na veličinu kontaminacije kako zemljišta tako i vodenih sistema koji su kontaktu sa takvim zemljištem. Slobodne tj. nesorbovane frakcije molekula pesticida se pri tome mogu dalje slobodno kretati zajedno sa vodenom fazom, dok će se vezane zadržavati kraće ili duže vreme u zemljištu, što zavisi od niza faktora (fizičko-hemijskih osobina pesticida i zemljišta, geografskih i klimatskih faktora, itd.).

Spiranje pesticida u dublje slojeve zemljišta do podzemnih voda je kompleksan proces kontrolisan uslovima koji vladaju u zemljištu i životnoj sredini. Spiranje je izraženije za slabo vezane i perzistentne pesticide (Bogesan et al., 2015).

U analizi prinosa ekstrakcije, korišćena je tečna hromatografija sa tandem masenom spektrometrijom koja svojom selektivnošću i osetljivošću omogućava identifikaciju i kvantifikaciju velikog broja pesticida, prisutnih u matriksu u veoma niskim koncentracijama (Vuković i sar., 2016). Predmet istraživanja je da se u okviru validacije multirezidualne metode određivanja ostataka triazinskih herbicida poput atrazina, cianazina, heksazinona, tiodikarba, desetilatrazina i simazina u zemljištu, tečnom hromatografijom sa tandem masenom spektrometrijom (LC-MS/MS), utvrdi prinos ekstrakcije ispitivanih analita u zavisnosti od fizičko-hemijskih karakteristika različitih zemljišta.

Materijal i metod

Prvi deo ispitivanja je podrazumevao obogaćivanje uzoraka zemljišta ispitivanim pesticidima uz njihovu QuEChERS ekstrakciju. Određivanje pronosa ekstrakcije ispitivanih analita u dobijenim ekstraktima su postavljeni su hromatografskim razdvajanjem na LC-MS/MS.

Priprema uzorka

U okviru rada su korišćeni uzorci dva tipa zemljišta različitih fizičko-hemijskih karakteristika (Tabela 1) u kojima nije detektovano prisutvo ostataka pesticida (blank uzorci). U cilju postavljanja validacionih parametara, blank uzorci su obogaćeni određenom količinom ispitivanih pesticida.

Tabela 1

Karakteristike zemljišta

Table 1

Soil characteristics

Uzorak	pH (H ₂ O)	CaCO ₃ (%)	Humus (%)	Krupan pesak 2-0,2 mm (%)	Sitan pesak 0,2-0,02mm (%)	Prah 0,02- 0,002mm (%)	Glina < 0,002 mm (%)
1.	8,71	30,66	0,11	1,58	91,7	3,4	3,32
2.	8,16	7,45	3,76	10,25	22,45	25,03	42,27

Uzorci su uzeti sa različitih lokaliteta. Uzorak jedan je sa lokaliteta Sonta, dok je drugi uzorak sa lokaliteta Srbobran.

Hemikalije i aparatura

Analitički standardi svih ispitivanih pesticida su proizvodi dr. Ehrenstorfer-a. Osnovni i radni rastvori su pripremani rastvaranjem pesticida u acetonitrilu (HPLC čistoće, J.T. Baker) (Tabela 2).

Tabela 2

Priprema osnovnih rastvora pesticida

Table 2

Preparation of pesticide standard solutions

Pesticid	Čistoća (%)	Odvaga (g)	V (mL)	C (mg/mL)
Desetilatrazin	96,0	25,10	25	1,046
Cianazin	97,9	23,98	25	0,980
Simazin	99,0	24,99	25	1,010
Heksazinon	98,9	23,91	25	0,967
Tiodikarb	98,7	24,19	25	0,981
Atrazin	99,5	24,55	25	0,987

Radni rastvor mešavine pesticida masene koncentracije 10 µg/mL, dobijen je mešanjem odgovarajućih zapremina osnovnih rastvora.

Kao interni standard (IS) korišćeni su karbofuran-D3, atrazin-D5 i izoproturon-D6 (97.0% čistoće, dr Ehrenstorfer), masene koncentracije 10 µg/mL.

Za hromatografsko određivanje korišćena je LC-MS/MS tehnika. Uslovi LC-MS/MS hromatografskog razdvajanja su prikazani u tabeli 3.

Tabela 3

Uslovi hromatografskog razdvajanja

Table 3

Conditions of chromatographic separation

Instrument	Agilent 6410B QQQ
Kolona	XBridge C18, 150 x 3,0 mm, 3,5 µm, Waters
Jonski izvor	Multimod, MMI
Tip jonizacije	+ESI
Drying gas flow/ Drying gas temp.	5 ml/min /325 °C
Vaporizer temp./ Nebulizer gas	220 °C/40 psi
Opseg merenja masa	m/z 70-2000
Napon kapilare	2000 V
Autosampler	h-ALS-SL+, model G1367D
Zapremina injektovanja uzoraka	Vinj=10 µL
Tip injektovanja/ Binarna pupma	sa ispiranjem/ BinPump-SL, model G1312B
Odnos mobilnih faza: V/V	50/50
Protok	0,5 mL/min,
Mobilna faza:	A: 0,1% HCOOHuMeOH; B: 0,1% HCOOH u vodi
Odnos mobilne faze	A:B=70:30
Termostat i temperatura kolone	Column-SI, Model G1316B, 40 °C

Validacioni parametri

Validacioni parametri su postavljeni u skladu sa SANTE/11945/2015.

Prinos ekstrakcije je proveren za nivoe obogaćenja od 1,0 i 10,0 µg/mL. U 10 g kontrolnog uzorka dodato je 100 µL internog standarda i 100 (10) µL radnog rastvora masene koncentracije 10 µg/mL, kako bi krajnja koncentracija pesticida u obogaćenom uzorku bila 10,0 (1,0) µg/mL.

Linearnost

Provera opsega linearnosti izvedena je za masene koncentracije od 0,2; 0,1; 0,05 i 0,02 µg/mL. U upareni ekstrakt (1 mL) dodato je po 100 µL internog standarda (IS), a u zavisnosti od krajnje željene koncentracije dodat je radni rastvor u zapremini od 200, 100, 50 i 20 µL i do 1000 µL, te je dopunjeno mobilnom fazom.

Limit detekcije (LOD) i limit kvantifikacije (LOQ) su zadate na osnovu regulative i eksperimentalnim putem potvrđene, obogaćivanjem kontrolnog uzorka smešom standarda tako da krajnja masena koncentracija bude 0,005 mg/kg. Softverskim putem je izračunat odnos signal/šum u dobijenim hromatogramima za LOQ, a matematičkim putem su izračunate LOD vrednosti.

Ekstrakcija pesticida

Ekstrakcija pesticida iz obogaćenih uzoraka izvedena je upotrebom modifikovane QuEChERS metode. U 10 g zemljišta dodato je 15 mL vode i 20 mL acetonitrila. Nakon ručnog mućkanja u trajanju od 1 min, dodate su puferske soli (MgSO₄, NaCl, C₆H₆Na₂O₇ x1.5 H₂O, C₆H₅Na₃O₇ x5.5 H₂O). Ponovo je ručno mućkano (jedan minut) te je potom centrifugirano 5 min na 4000 obr/min. U 6 mL alikvota je dodat primarno-sekundarni amin (PSA), MgSO₄ i C₁₈, te je ponovljen postupak ručnog mućkanja i centrifugiranja 5 min na 4000 obrt/min. Dobijeni ekstrakt je profiltriran kroz najlonski filter od 45 µm i analiziran pomoću LC-MS/MS.

Rezultati i diskusija

Pre nego što se pristupi kvalitativnoj analizi ili kvantifikaciji pesticida, neophodno je postaviti akvizicione parametre masenog spektrometra - odrediti reakcije za praćenje jona (MRM) i naći energiju kolizije (CE) pri kojoj će odgovor ispitivanog pesticida biti najveći za date uslove (Tabela 4).

Tabela4

MRM prelazi sa retencionim vremenima ispitivanih herbicida

Table 4

MRM transitions with the retention times of the tested herbicides

Pesticid	Struktura	M (g/mol)		Prekursor jon m/z	Produkt jon m/z	Frag (V)	CE (V)	Rt (min)
Desetilatrazin		137,50	q	188 188	146 104	70 70	20 30	10,86
Cianazin		240,70	Q	241 241	214 104	70 70	15 15	15,72
Simazin		201,66	q	202 202	132 96	70 70	18 25	16,59
Heksazinon		252,31	q	253 253	171 71	70 70	20 20	17,44
Tiodokarb		354,50	Q	355,1 355,1	108 88	80 80	10 15	20,87
Atrazin		215,68	Q	216 216	174 96	70 70	20 20	21,08

Nakon obogaćivanja uzoraka smešom ispitivanih pesticida, uz dobijanje krajnjih masenih koncentracija od 1,0 i 10,0 µg/mL, određeni su prosečni prinosi ekstrakcije ovih koncentracija u tri ponavljanja. U tabeli 5 dati su prinosi ekstrakcije za svaki ispitivan pesticid kao i relativne standardne devijacije (RSD, %).

Ujedno, dobijene vrednosti RSD (%) predstavljaju preciznost date metode.

Tabela5

Prosečni prinosi ekstrakcije ispitivanih pesticida

Table 5

Average recoveries of investigated pesticides

Uzorci zemljišta	Prinosi ekstrakcije ± RSD (%)			
	1	RSD	2	RSD
Pesticid				
Atrazin	84,9	6,01	82,3	9,91
Cianazin	72,4	4,42	70,3	6,98
Desetilatrazin	95,4	2,46	91,6	5,79
Heksazinon	73,4	3,66	71,9	8,63
Simazin	71,9	11,51	70,9	11,43
Tiodikarb	91,8	4,55	89,9	8,69

Ukoliko se uporede prinos i ekstrakcije dobijeni za sve pesticide i oba zemljišta uključena u ispitivanje, lako se zapaža da su za sva jedinjenja vrednosti dobijene za zemljište 2 (lokalitet Srbobran) nešto niže. Ukoliko se u obzir uzmu sadržaji glavnih apsorbujućih komponenti (organska materija i glina) oba zemljišta (Tabela 1), može se zaključiti da zemljište 2 koje karakteriše veći sadržaj ovih komponenti jače vezuje sve ispitivane pesticide.

Zemljište deluje kao jedna vrsta „filtera“ pružajući dovoljno vremena za biološke ili hemijske degradacije triazinskih herbicida i drugih organskih zagađivača pre nego što stignu do podzemnih voda. Raširena upotreba i relativno visoke količine primenjivanih triazinskih herbicida u poljoprivredi (između 1,7 kg/ha i 2,8 kg/ha) (Jablanovski i sar., 2008), a naročito atrazina, sledećih fizičko-hemijskih karakteristika: rastvorljivost u vodi 33 mg/L, koeficijent sorpcije zemljišta (K_{oc}) 100 mL/g i biološki poluraspad od 75 dana, čine ovaj herbicid potencijalno pokretljivim. U poređenju sa atrazinom, DEA ima znatno veću rastvorljivost u vodi 3,2 mg/L. Upravo zbog ovih fizičko-hemijskih karakteristika, triazinski herbicidi i njihovi degradacioni produkti predstavljaju veliku opasnost po zagađenje životne sredine i podzemnih voda. Pored ovih problema, mogu da stvaraju probleme u funkciji endokrinog sistema živih organizama. Zbog svega navedenog, ovi problemi su pokrenuli Nemačku vladu da zabrani upotrebu atrazina i DEA 1991. godine i čak deset godina nakon zabrane, nađeni su ostaci ovih herbicida u podzemnim vodama. Evropska Unija je zabranila njihovu upotrebu 2004. godine, dok je u Srbiji ova zabrana nastupila na snagu 01.01.2008. godine. Vrsta i sastav zemljišta su ključni faktori koji su odgovorni za apsorpciju triazinskih herbicida i njihovu dalju sudbinu u zemljištu (Amadori et al., 2016).

Uticaj osobina zemljišta nije samo izražen na ponašanje pesticida. Naime, Salvia et al. (2013) su prikazali uticaj jedanaest tipova zemljišta, prikupljenih sa teritorije Francuske na prinos ekstrakcije farmaceutskih komponenti i steroida. Studija je demonstrirala da glina i sadržaj organske materije imaju uticaj na prinos ekstrakcije. Naime, što su viši ovi parametri, dobija se niži prinos ekstrakcije obuhvaćenih analita. Ovo se može objasniti jakom vezom između analita i gline, odnosno, organske materije čime se otežava njihova ekstrakcija.

Zaključci

Na osnovu LC-MS/MS hromatografske analize dva tipa zemljišta različitih fizičko-hemijskih karakteristika, uz ekstrakciju pesticida QuEChERS tehnikom i kvantifikaciju na osnovu internih standarda atrazina-D5, izoproturona-D6 i karbofurana-D3, može se zaključiti:

Sadržaj organske materije je uticao na prinos ekstrakcije. Dobijena zavisnost ukazuje da se sa povećanjem sadržaja organske materije (humus), smanjuje prinos ekstrakcije ispitivanih pesticida.

Preciznost metode, izražena preko RSD (%) je bila u skladu sa dokumentom SANTE/11945/2015, i kod oba tipa zemljišta je bila niža od definisanih 20%.

Aktivna materija desetilatrazin se razlikuje od ostalih aktivnih materija hemijske grupe triazina kao herbicid sa najvišom srednjom vrednošću prinosa ekstrakcije za oba tipa ispitivanih uzoraka zemljišta.

Simazin i cianazin su herbicidi sa najnižom srednjom vrednošću prinosa ekstrakcije za oba tipa ispitivanih uzoraka zemljišta.

Sa povećanjem sadržaja gline u zemljištu, smanjuje se prinos ekstrakcije ispitivanih pesticida, što otvara novo polje budućih istraživanja.

Zahvalnica

Autori se zahvaljuju Ministarstvu nauke i tehnološkog razvoja, Republike Srbije, na finansijskoj podršci u okviru projekata III43005, TR31072 i TR31043.

Literatura

- Børgesen C.D., Fomsgaard I.S., Plauborg F., Schelde K., Henrik N. (2015): Fate of pesticides in agricultural soils. DCA report No. 062. Aarhus University, Department of Agroecology, Blichers Allé 20 DK-8830 Tjele. p9.
- Đurović R., Đorđević T., Bursić V. (2012): Effect of organic matter and clay content in the soil on triazine and organophosphorus pesticides adsorption processes, Annual MGPR Meeting 2012 and International conference on food and health safety: Moving towards a sustainable agriculture, Belgrade, Serbia 11-12 October, Book of abstracts, 69.
- Jablonowski, N.D., Koepfchen, S., Hofmann, D., Schaeffer, A., Burael, P. (2008): Spatial distribution and characterization of long-term aged 14 C-labeled atrazine residues in soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 9548–9554.
- Janjić V. (2005): Fitofarmacija, Društvo za zaštitu bilja Srbije, Beograd.
- Kim J., Smith A. (2001): Distribution of organochlorine pesticides in soils from South Korea, *Chemosphere* 43, 137-140.
- Konstantinović B. (2011): Osnovi herbologije i herbicidi. Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet.
- Maristela F. Amadori, Marcio B. Rodrigues, Caio C. Rebouças, Patricio G. Peralta-Zamora, M. T. Grassi, G. Abate. (2016): Behavior of Atrazine and Its Degradation Products Desethylatrazine and Deisopropylatrazine in Oxisol Samples, *Water, Air & Soil Pollution*, 227, 380. doi:10.1007/s11270-016-3078-6
- Salvia M.V., Cren-Olive C., Vukiet E. (2013): Statistical evaluation of the influence of soil properties on recoveries and matrix effects during the analysis of pharmaceutical compounds and steroids by quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1315, 53-60.
- SANTE/11945/2015, Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed.
- Vuković G., Bursić V., Agarski M., Zeremski T., Đurović-Pejčev R. (2016). Polar pesticide analyses: Validation of glyphosate determination in soil by LC-MS/MS, 22nd International Symposium on Analytical and Environmental Problems, October 10, Szeged, Hungary, Proceedings, 323-326.

Triazine herbicides extraction depending on the soil characteristics

Milica Ćućuz^{a*}, Vojislava Bursić^a, Gorica Vuković^b, Vladimir Dapčević^a, Vladimir Ćirić^a,
Tijana Zeremski^c, Rada Đurović-Pejčev^d

^aUniversity of Novi Sad, Faculty of Agriculture, Novi Sad, Serbia

^bInstitute for public health, Belgrade, Serbia

^cInstitute of Field and Vegetable Crops, Novi Sad, Serbia

^dInstitute of Pesticides and Environmental Protection, Zemun, Serbia

*Corresponding author: cucuzm@yahoo.com

ABSTRACT

The work investigates the behavior of herbicides from the chemical groups of triazine according to different physical and chemical characteristics of the soil. The fate and mobility of pesticides, including triazine, in the environment primarily depend on the adsorption because the degradation, metabolism, microbial degradation and mobility comprise only the free (non-adsorbed) fraction of molecules of these compounds. The pesticide-soil sorption interaction may comprise either mineral or organic components or sometimes both. The sorption of pesticides is based on two phenomena: weak chemical bonding and diffusion of the components through the soil structures. The sorption of pesticides in soil does not refer only to the contamination of soil but also of water systems which are in contact with such soils and to a great extent determine the intensity of mobility of these compounds in the environment. The free fraction of pesticide molecules can float through the aqueous phase while the bonded components will remain depending on the sorption properties of pesticides, physic-chemical characteristics of the soil as well as on the characteristics of the aqueous phase. The leakage of pesticides into the deeper layers of soil to groundwater is a complex process controlled by the conditions prevailing in the soil and in the environment. Therefore, the subject of this research work is to determine the extraction yields of the studied analytes depending on the physic-chemical soil properties within the validation of multi-residual method for the determination of the residues of herbicides and their metabolites from the triazine group in soil by LC-MS/MS.

KEY WORDS

Triazine herbicides, soil, QuEChERS, LC-MS/MS; recovery

Primljen: 28.11.2016.

Prihvaćen: 21.12.2016.