



## Određivanje s-triazinskih herbicida u model sistemima i površinskim vodama gasnom i tečnom hromatografijom

Ljiljana Kostadinović<sup>1\*</sup>, Sava Pavkov<sup>2</sup>, Gordana Dozet<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Fakultet za biofarming Megatrend Univerziteta, Maršala Tita 39, 24300 Bačka Topola

<sup>2</sup>Institut za proučavanje lekovitog bilja "Dr Josif Pančić", Tadeuša Koščuška 1, 11000 Beograd

**Izvod:** Razvijen je metod za simultano određivanje rezidua s-triazinskih herbicida (simazina, atrazina, ametrina, prometrina i aziprotrina) u model-vodenim sistemima, kao i u realnim površinskim vodama, primenom kapilarne gasne hromatografije i tečne hromatografije pod visokim pritiskom. S-triazinski herbicidi iz uzoraka vode za gasnohromatografsko određivanje izolovani su smešom hloroform-metanol (1:1) uz prečišćavanje ekstrakata na stubu baznog  $Al_2O_3$ . Gasnohromatografsko određivanje izvršeno je na paralelno vezanim kapilarnim kolonama ULTRA I i ULTRA II uz specifičan NP-detektor. Tečnohromatografsko određivanje s-triazinskih herbicida u vodi izvršeno je na HPLC sistemu Perkin Elmer LC sa LC-75 spektrofotometrijskim detektorom na 225 nm. Primenjena je kolona TSK ODS-120A 5 m "LKB" uz mobilnu fazu metanol-voda (60:40). Sadržaj ukupnih s-triazinskih herbicida u uzorcima dunavske vode bio je  $3,54 \text{ g dm}^{-3}$ , što je ispod MDK za ovu grupu jedinjenja.

**Cljučne reči:** kapilarna gasna hromatografija (GC), s-triazinski herbicidi, tečna hromatografija pod visokim pritiskom (HPLC)

### Uvod

Visoka i ekonomična proizvodnja poljoprivrednih kultura zahteva njihovu kompletnu zaštitu, uključujući i uništavanje korova primenom herbicida. Međutim, intenzivna primena pesticida pored nesumnjive koristi, nosi sa sobom potencijalne opasnosti zagađivanja životne sredine uopšte, a posebno akvatičnih sistema.

Nedostatak vode zadovoljavajućeg kvaliteta postaje primaran problem na Zemlji, te je neophodno na vreme utvrditi stepen kontaminiranosti vodenih eko sistema. Čovek brine o proizvodnji pesticida i efikasnosti primene, ali nedovoljno o njihovoj toksičnosti, perzistentnosti, razgradnji i ponašanju njihovih degradacionih proizvoda, čiji period toksičnog delovanja može trajati i decenijama.

S obzirom na to da je Dunav tranzitna reka i da na svom potezu protiče kroz visoko-industrijalizovane zemlje kao i kroz poljoprivredne predele, može se očekivati relativno visok sadržaj rezidua herbicida u uzorcima dunavske vode. Ukoliko se ova voda (koja sadrži visok sadržaj herbicida) upotrebi za navodnjavanje, može dovesti do sušenja gajenih kultura (Čuvardić i sar. 2004, Pucarević i sar. 2002).

U vodu herbicidi dospevaju direktno i indirektno, odnosno tretiranjem vodenih površina ili spiranjem iz zemljišta preko podzemnih i površinskih voda, padavina, kao i aktivnošću čoveka i životinja. Treba napomenuti da većina herbicida podleže hidrolizi u vodenoj sredini. Brzina hidrolize zavisi od temperature kao i od pH sredine, mada razlaganju herbicida doprinose i mikroorganizmi. Najčešće se za suzbijanje korovskih biljaka primenjuju simetrični triazini (s-tria-

\*autor za kontakt / corresponding author  
(ljkostadinovic@biofarming.edu.rs)

zini) koji se dele na: hlor-triazine, metoksi-triazine, metiltio-triazine i azido-triazine. Hlor-triazini su u vodi malo rastvorni, veoma su stabilni i poseduju dugotrajno rezidualno delovanje (Pucarević i sar. 2002). Metoksi-triazini su relativno dobro rastvorni u vodi, a pored toga su stabilni i poseduju dugotrajno rezidualno delovanje. Za razliku od prethodne dve grupe, metiltio-triazini imaju kratkotrajno delovanje (Pesticide Manual, 2006). Posle primene, usled dobre perzistentnosti, rezidui triazina se zadržavaju više meseci od tretiranja u površinskim vodama i zemljištu. Stoga je usavršavanje i razvoj metoda ekstrakcije i detekcije rezidua triazina u vodi neophodno za rešavanje različitih ekoloških problema (Trajkovska et al. 2001). Za određivanje s-triazinskih herbicida u vodi primenjuju se najrazličitije metode, čija preciznost i tačnost zavisi od pripreme uzoraka i efikasnosti instrumentalne tehnike. Analiza se najčešće vrši pomoću gasne hromatografije (GC) (Shen & Kee Lee 2003, Nagaraju & Huang 2007) i tačne hromatografije pod visokim pritiskom (Shang et al. 2004, Aprea et al. 2002, Leon-Gonzales et al. 2001). Ove hromatografske metode zahtevaju efikasnu ekstrakciju i prečišćavanje ekstrakata.

U većini objavljenih radova se za ekstrakciju triazina iz vode preporučuje hromatografija na koloni (Shang et al. 2004, Hideyuki et al. 2006, Qingxiang et al. 2006, Dopico et al. 2003), ali se primenjuje i tačno-tečna ekstrakcija sa smešom hlorbenzen-aceton (Nagaraju & Huang 2007).

U radu su prikazani rezultati tačno-hromatografskog i gasno-hromatografskog određivanja s-triazinskih herbicida (simazina, atrazina, prometrina, ametrina i aziprotrina) posle izdvajanja, razdvajanja i detekcije u uzorcima vode (model-sistemima i dunavskoj vodi).

## Materijal i metod rada

### 1. Hemikalije i rastvori

U radu su korišćeni analitički standardi s-triazinskih herbicida (simazina, atrazina, ametrina, prometrina i aziprotrina) sa sadržajem aktivne materije od 99 % (Supelco). Osnovni standardni rastvori odabranih s-triazin-

skih herbicida (koncentracije 1.000 ppm) pripremljeni su rastvaranjem po 10 mg ispitivanog triazinskog herbicida u 10 cm<sup>3</sup> metanola. Acetonitril (HPLC čistoće) bio je Sigma-Aldrich (Nemačka). Metanol i voda (za tačnu hromatografiju) bili su Merck (Nemačka). Sve ostale primenjene hemikalije bile su p. a. čistoće.

### 2. Priprema model sistema i uzoraka za analizu

Pri ispitivanju efikasnosti ekstrakcije s-triazina iz vode pripremljeno je šest model sistema s-triazina u vodi:

**Model sistem A:** pripremljen je dodavanjem 0,05 cm<sup>3</sup> standardnog rastvora simazina (koncentracije 0,1 mg cm<sup>-3</sup>) u 1 dm<sup>3</sup> destilovane vode, tako da je dobijen model sistem sa 0,005 mg dm<sup>-3</sup> simazina (što odgovara njegovoj MDK u vodi).

**Model sistemi B, C, D i E:** pripremljeni su na istovetan način kao i model sistem A, ali je model sistem B sadržavao 0,005 mg dm<sup>-3</sup> atrazina, model sistem C 0,005 mg dm<sup>-3</sup> ametrina; model sistem D 0,005 mg dm<sup>-3</sup> prometrina i model sistem D 0,005 mg dm<sup>-3</sup> aziprotrina.

**Model sistem F:** predstavlja smešu svih pet triazinskih herbicida u koncentraciji od 0,005 mg/dm<sup>3</sup>, a dobijen je dodavanjem svakog triazinskog herbicida ponaosob.

Za proveru efikasnosti ekstrakcije pripremljeni su i model sistemi A', B', C', D', E' i F') sa dvostruko većom koncentracijom herbicida, odnosno 0,01 mg herbicida dm<sup>-3</sup> destilovane vode. Zbog osobine triazinskih herbicida da podležu hidrolizi, model sistemi su držani u tamnim flašama i ekstrahovani se na dan pripreme, kao i 15, 30. i 45. dana od pripreme.

Određivanje s-triazinskih herbicida izvršeno je i u realnim uzorcima dunavske vode koja je uzorkovana na lokalitetu plaže "Štrand" u Novom Sadu. Uzorci su uzeti u zapremini od 0,5 dm<sup>3</sup> za određivanje koncentracije s-triazinskih herbicida i to sa površine i dubine od 1 m i sakupljeni u staklene flaše od 5 dm<sup>3</sup>.

### 3. Ekstrakcija s-triazina iz uzoraka vode

U levak za odvajanje od 500 cm<sup>3</sup> odmereno je 200 cm<sup>3</sup> uzorka vode i dodavanjem 0,1 M rastvora natrijum hidroksida pH je

podešen na 8,5 do 9. Ekstrakcija je urađena tri puta sa po 20 cm<sup>3</sup> smeše hloroform-metanol (1:1) uz mućkanje oko 15 minuta, pri čemu se za lakše izdvajanje slojeva doda oko 2 g natrijum hlorida. Po izdvajanju slojeva, organska faza sa ekstrahovanim s-triazinima se suši propuštanjem kroz levak sa anhidrovanim natrijum sulfatom i sakuplja u balon sa okruglim dnom. Postupak se ponavlja tri puta, a ovako dobijene organske faze sakupljaju se u balonu sa okruglim dnom i upare skoro do suva u struji azota uz zagrevanje na 50 °C. Ostatak se rastvori u 1 cm<sup>3</sup> metanola. Prečišćavanje ovako dobijenih ekstrakata za tečno i gasno hromatografsko određivanje izvršeno je na koloni Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> aktiviteta V po Brokmanu; s-triazini su eluirani sa 80 cm<sup>3</sup> hloroforma, a potom sa 125 cm<sup>3</sup> smeše hloroform-etiletar (95:5) uz kontinualan tok eluiranja. Ukupni eluat je sakupljen u balon sa okruglim dnom i uparen u struji azota uz zagrevanje na vodenom kupatilu (50 °C) skoro do suva. Ostatak je rastvoren u 1 cm<sup>3</sup> i primenjen za određivanje sadržaja s-triazinskih herbicida tečnom i gasnom hromatografijom.

#### 4. Parametri gasnobromatografskog određivanja

Rezidue s-triazinskih herbicida određene su na gasnom hromatografu "Perkin Elmer" model "Sigma IB" uz specifičan azot-fosforni detektor (NP-detektor). Razdvajanje ispitivanih s-triazina izvršeno je na paralelno vezanim kapilarnim kolonama ULTRA I i ULTRA II ("Packard"). Eksperimentalni parametri instrumenta pri određivanju s-triazina bili su: t<sub>i</sub>=260 °C; t<sub>k</sub>=205 °C; t<sub>d</sub>=275 °C; protok azota: 40 cm<sup>3</sup>/min; uzorci zapremine 2 l injicirani su direktno.

#### 5. Parametri tečnobromatografskog određivanja

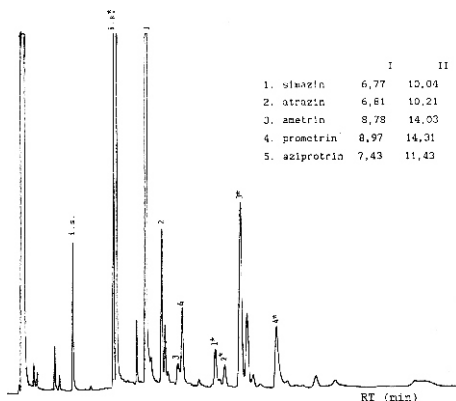
Ispitivanja su izvršena na HPLC sistemu Perkin Elmer LC sa LC-75 spektrofotometrijskim detektorom. Primenjena je kolona sa oktadecil silanom na TSK-gelu: TSK ODS-120A 5 m "LKB" uz mobilnu fazu metanol-voda (60:40). Ostali uslovi tečnobromatografskog određivanja s-triazinskih herbicida bili su:

petlja 20 l; protok 1,5 cm<sup>3</sup> min<sup>-1</sup>; talasna dužina 225 nm.

### Rezultati i diskusija

Za pouzdaniju identifikaciju i kvantitativno određivanje s-triazinskih herbicida u uzorcima dunavske vode, sprovedeno je gasnohromatografsko određivanje na dve kapilarne kolone različitih stacionarnih faza, što predstavlja našu modifikaciju i doprinos gasnohromatografskom određivanju triazina. Od svakog uzorka vršena su tri paralelna merenja. Retenciona vremena za određivanje s-triazinskih herbicida prikazana su u tabeli 1, a dobijena su iz hromatograma standardne smeše ispitivanih s-triazinskih herbicida koji je nastao postepenim unošenjem jednog po jednog ispitivanog jedinjenja u standardnu smešu.

Pri ispitivanju linearnosti za formiranje kalibracione krive napravljena je serija standardnih koncentracija od 2 ppb, 4 ppb i 10 ppb. Na osnovu kalibracionih kriva dobijene su r<sup>2</sup> vrednosti u granicama od 0,9828 do 0,9988 što ukazuje na njihovu linearnost i mogućnost da se u ovoj oblasti svi ispitivani herbicidi mogu kvantifikovati pomoću kalibracionih kriva.



Sl. 1. Hromatogram ekstrakta s-triazina iz uzoraka dunavske vode dobijen gasnom bromatografijom  
Fig. 1. Chromatogram of s-triazine extract from Danube water samples obtained by gas chromatography

Na slici 1 prikazan je hromatogram s-triazina iz uzorka dunavske vode, a u tabeli 1, pored retencionih vremena, prikazani su

rezultati određivanja sadržaja s-triazina u model sistemima i uzorcima dunavske vode dobijeni gasnom hromatografijom.

Tab. 1. Rezultati gasnobromatografskog određivanja sadržaja s-triazina u model sistemima i uzorcima dunavske vode

Tab. 1. Results of gas chromatographic determination of s-triazines content in model systems and Danube water samples

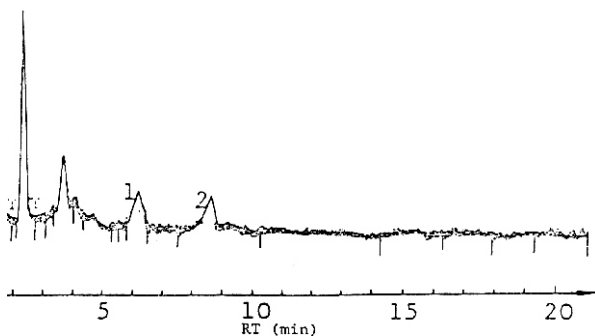
Jedinjenje Compound	Retenciono vreme Retention time (min)		MODEL SISTEM MODEL SYSTEM		Efikasnost ekstrakcije Efficacy of extraction % SD	Sadržaj u dunavskoj vodi Content in Danube water ( g dm <sup>-3</sup> ) SD		Donja granica detekcije Lower limit of detection ( g dm <sup>-3</sup> )
	Kolona Column I	Kolona Column II	Dodato Added ( g dm <sup>-3</sup> )	Ekstrahovano Extracted ( g dm <sup>-3</sup> )				
Simazin Simazine	6,77	10,04	5,00	4,51	90,3 1,4	1,50 0,2	0,08	
Atrazin Atrazine	6,81	10,21	5,00	4,43	88,5 1,6	1,40 0,3	0,09	
Ametrin Ametrine	8,78	14,03	5,00	4,62	92,4 2,3	0,64 0,05	0,11	
Prometrin Promethrine	8,97	14,31	5,00	4,67	93,3 1,5	1,10 0,1	0,13	
Aziprotrin Azyprotbrine	7,43	11,43	5,00	4,79	95,7 2,1	N.D.	0,17	

N.D. - nije detektovano / not detected

U hromatogramima uzoraka dunavske vode u potpunosti su izostali hromatografski pikovi aziprotrina, usled čega nisu izračunavane njihove koncentracije u uzorcima dunavske vode.

Prilikom ispitivanja triazina HPLC metodom primenjena je kolona TSK ODS-120A 5 m "LKB" uz mobilnu fazu: metanol - voda

(60:40). Na slici 2 prikazan je hromatogram uzoraka dunavske vode dobijen tečnom hromatografijom pod visokim pritiskom. Izračunavanjem iz odnosa površina hromatografskih pikova, injicirane zapremine i koncentracije u standardnoj smeši, dobijeni su rezultati za sadržaj rezidua u ispitivanim uzorcima dunavske vode koji su prikazani u tabeli 2.



Sl. 2. Hromatogram ekstrakta s-triazina iz uzorka dunavske vode dobijen tečnom bromatografijom pod visokim pritiskom (1-simazin, 2-atrazin)

Fig. 2. Chromatogram of s-triazine extract from Danube water samples obtained by high performance liquid chromatography (1-simazine, 2-atrazine)

U uzorcima dunavske vode su hromatografski pikovi ametrina, prometrina i aziprotrina bili ispod donje granice detekcije prime-

njene HPLC metode, usled čega nisu izračunavane njihove koncentracije u uzorku.

Tab. 2. Rezultati tečnobromatografskog određivanja sadržaja s-triazina u model sistemima i uzorcima dunavske vode

Tab. 2. Results of liquid chromatographic determination of s-triazines content in model systems and Danube water samples

Jedinjenje <i>Compound</i>	Retenciono vreme <i>Retention time (min)</i>	MODEL SISTEM <i>MODEL SYSTEM</i>		Efikasnost ekstrakcije <i>Efficacy of extraction % SD</i>	Sadržaj u dunavskoj vodi <i>Content in Danube water ( g dm<sup>-3</sup>) SD</i>	Donja granica detekcije <i>Lower limit of detection ( g dm<sup>-3</sup>)</i>
		Dodato <i>Added ( g dm<sup>-3</sup>)</i>	Ekstrahovano <i>Extracted ( g dm<sup>-3</sup>)</i>			
Simazin <i>Simazine</i>	6,15	5,00	4,43	88,6 1,4	1,07 0,06	0,30
Atrazin <i>Atrazine</i>	8,52	5,00	4,18	83,5 2,1	1,02 0,03	0,26
Ametrin <i>Ametrine</i>	14,14	5,00	4,51	90,1 3,2	N.D.	0,32
Prometrin <i>Prometrine</i>	20,90	5,00	4,59	91,7 3,3	N.D.	0,60
Aziprotrin <i>Azyprotrine</i>	16,31	5,00	4,76	95,2 2,8	N.D.	0,28

N.D. - nije detektovano / not detected

### Zaključak

Upoređivanjem rezultata određivanja sadržaja s-triazinskih herbicida u uzorcima dunavske vode dobijenih primenom kapilarne gasne hromatografije (Tab. 1) sa rezultatima određivanja primenom tečne hromatografije pod visokim pritiskom (Tab. 2) dobija se dobro slaganje rezultata što se tiče hlortriazina (simazin i atrazin). Izvesna odstupanja su primećena u slučaju određivanja metiltio-triazina (ametrin i prometrin) čiji su hromatografski pikovi izostali u hromatogramima dobijenim HPLC metodom, što se objašnjava manjom osetljivošću detektora i složenijim matriksom.

Primenom opisanih metoda uočen je najveći sadržaj simazina i atrazina, što je i razumljivo obzirom na njihovu široku upotrebu, kao i veću stabilnost hlortriazina u vodi u odnosu na druge grupe triazinskih herbicida.

Vredno je istaći da su određene koncentracije s-triazina u uzorcima dunavske vode u intervalu dozvoljenih koncentracija za triazine, shodno postojećem Pravilniku (Sl. list SRJ, 1998). Tako hlortriazini (simazin i atrazin) čiji je sadržaj najveći, imaju koncentraciju koja je od 3 do 3,5 puta manja od MDK

(maksimalno dozvoljene koncentracije). Sadržaj metiltio-triazina je najmanji, odnosno 4,5 do 8 puta je manji od MDK za ove triazinske herbicide u vodi.

Praćenje sadržaja s-triazinskih herbicida u dinamičnim vodenim eko-sistemima od primarnog je značaja za utvrđivanje kontaminiranosti konkretnih akvatičnih sistema, kao što je na primer Dunav, zbog visokih biokonzentracionih faktora, perzistentnosti i niske degradabilnosti ovih jedinjenja, odnosno potencijalne bioakumulacije u flori i fauni vodenog eko-sistema, kao i procesa biomagnifikacije.

### Literatura

- Aprèa C, Colosio C, Mammone T, Minoia C, Maroni M (2002): Biological monitoring of pesticide exposure: a review of analytical methods. *J. of chromatogr. Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 769: 191-219
- Čuvarđić M, Hadžić V, Sekulić P, Kastori R, Belić M, Govedarica M, Nešić Lj, Pucarević M, Vasin J (2004): Kontrola kvaliteta poljoprivrednog zemljišta i vode za navodnjavanje. *Zbornik radova Naučnog instituta za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad* 40: 109-115
- Dopico M S, Gonzales M V, Castro J M, Gonzales E S, Perez J, Rodriguez M T, Calleja T A, Vilarno J M (2003): Determination of chlorotriazines, methylthiotriazines and one methoxytriazines by SPE-LC-UV in water samples, *Talanta* 59: 561-569

- Hideyuki K, Satoshi K, Tohru S, Kiyohisa O (2000): Determination of atrazine and simazine in water samples by high-performance liquid chromatography after preconcentration with heat-treated diatomaceous earth. *J. of Chromatography A* 869: 463-469
- Leon-Gonzales M E, Perez-Arribas L V, Polo Diez L M, Panis C., San Andres M P (2001): Determination of triazine herbicides by capillary liquid chromatography with on-column focusing and temperature gradient. *Analytica Chimica Acta* 445: 29-34
- Nagaraju D, Huang S D (2007): Determination of triazine herbicides in aqueous samples by dispersive liquid-liquid microextraction with gas chromatography-ion trap mass spectrometry. *J. of Chromatogr. A* 1161: 89-97
- Pravilnik o higijenskoj ispravnosti vode za piće (Sl. List SRJ 42/98 i 44/99)
- Pucarević M, Marjanović N, Šovljanski R, Lazić S (2002): Atrazine in groundwater of Vojvodina province. *Water Research* 36: 5120-5126
- Pesticide Manual (2006), 14th edition, edited by Clive Tomlin
- Qingxiang Z, Junping X, Weidong W, Guoguang L, Qizeng S, Jianhong W (2006): Determination of atrazine and simazine in environmental water samples using multiwalled carbon nanotubes as the adsorbents for preconcentration prior to high performance liquid chromatography with diode array detector. *Analytica Chimica Acta* 577: 214-219
- Shang-Da Huang, Hsin-Huang, Yu-Hsiang (2004): Analysis of triazine in water samples by solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography. *Talanta* 64: 887-893
- Shen G, Kee Lee H (2003): Determination of triazines in soil by microwave-assisted extraction followed by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. of Chromatogr. A* 985: 167-174
- Trajkoviška V, Petrovska-Jovanović S, Cvetkovski M (2001): Development and optimization of a method for the determination of simazine, atrazine and propazine using solid-phase extraction and HPLC/GC. *J. Serb. Chem. Soc.* 66: 199-204

## Analysis of s-triazine herbicides in model systems and samples of groundwater by gas and liquid chromatography

Ljiljana Kostadinović<sup>1</sup>, Sava Pavkov<sup>2</sup>, Gordana Dozet<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Biofarming, Megatrend University, Maršala Tita 39, 24300 Bačka Topola

<sup>2</sup>Institute for Medicinal Plants Research "Dr Josif Pančić", Tadeuša Koščuška 1, 11000 Belgrade

**Summary:** In this paper, residues of s-triazine herbicides (Simazine, Atrazine, Amethrine, Promethrine and Azyprothrine) have been determined in samples of model systems and real groundwater samples by gas-chromatography and high performance liquid chromatography. S-triazine herbicides were isolated from water samples by chloroform-methanol mixture (1:1), followed by purification of extract on the Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> column. Gas-chromatographic determination the residues of s-triazines is performed on parallel capilar columns ULTRA I and ULTRA II, using specific NP detector. Liquid-chromatographic determination the s-triazines was performed on the column TSK ODS-120 A 5 m "LKB", using the mobile phase methanol-water (60:40). Total concentration of s-triazines in samples of Danube water was 3.54 g dm<sup>-3</sup>.

**Key words:** capillary gas-chromatography (GC), high performance liquid chromatography, s-triazine herbicides

Primljeno / Received: 03.11.2009.

Prihvaćeno / Accepted: 12.11.2009.