

Metode ekstrakcije imazetapira iz zemljišta i prečišćavanje ekstrakcijom u čvrstoj fazi

Sanja Lazić, Vojislava Bursić i Slavica Vuković

*Poljoprivredni fakultet, Novi Sad, Srbija
(bursicv@polj.ns.ac.yu)*

REZIME

Ovim istraživanjem je obuhvaćeno iznalaženje optimalnih eksperimentalnih uslova za određivanje ostataka imazetapira u zemljištu, korišćenjem tečne hromatografije sa DAD detektorom i uz primenu C18 (Hypersil ODS, 5 µm, 2.0 x 250 mm) kolone, uz iznalaženje najpogodnijeg rastvarača za ekstrakciju i najpogodnije kolone za ekstrakciju u čvrstoj fazi (SPE) za prečišćavanje dobijenog ekstrakta. Pri prečišćavanju ekstrakta zemlje korišćene su aminokarbon, C18 i SDB-1 SPE kolone.

Na osnovu izvršene optimizacije hromatografske metode određivanja ostataka imazetapira u zemljištu utvrđeno je da je najpogodniji postupak metoda ekstrakcije rastvorom Na₂CO₃, prečišćavanjem preko SPE SDB-1 kolone i eluiranje mešavinom acetonitrila (ACN) i vode (75:25 v/v).

Ključne reči: Imazetapir; zemljište; ekstrakcija; ekstrakcija u čvrstoj fazi (SPE); prečišćavanje; optimizacija

UVOD

Imazetapir spada u hemijsku grupu imidazoliona. Hemijski naziv ovog jedinjenja je (RS)-5-etil-2-(4-izopropil-4-metil-5-okso-2-imidazolin-2-il)-nikotinska kiselina, a molekulska formula je C₁₅H₁₉N₃O₃. Uveden je u primenu krajem 80-ih godina kao selektivni herbicid. Koristi se za suzbijanje mnogih jednogodišnjih i višegodišnjih travnih i širokolisnih korova, u usevima soje i ostalih leguminoza. U prometu se nalazi kao tečni preparat u obliku koncentrovanog rastvora (Mitić, 2004).

Pokretljivost imazetapira kroz zemljište je mala i zavisi od mehaničkog sastava zemljišta. Na lakšim ze-

mljištima pokretljivost je veća (do 30 cm), dok je na težim glinovitim zemljištima manja i kreće se od 8 do 15 cm. Imazetapir se razlaže postepeno u dobro provetrenom zemljištu pod uticajem zemljišnih mikroorganizama. Poluvreme raspada u zemljištu je 36-327 dana, a poluvreme fotolitičke razgradnje 2.1 dan pri pH 7 (Šovljanski i Lazić, 2007). U neprovetrenim zemljištima vremenski period razgradnje se produžava.

Imajući u vidu veoma česte zahteve proizvođača za proveru ostataka imazetapira u zemljištu i veoma nizak prinos ekstrakcije, cilj ovog rada je bio da se izvrši optimizacija metode ekstrakcije, prečišćavanja i determinacije imazetapira u zemljištu.

Prema podacima dostupnim u literaturi, za ekstrakciju imazetapira iz zemljišta po metodi Novakova (1994) korišćen je 0.1 M Na₂CO₃, a ostaci su određeni tečnom hromatografijom. Dobijeni prinos ekstrakcije iznosio je 57.20-74.00%. Efikasnija ekstrakcija imazetapira iz zemljišta izvršena je metodama koje su predložili Lagana i sar. (1998) i Steven i sar. (1997). Ekstrakcija imazetapira iz zemljišta urađena je smešom metanola i amonijum-karbonata, a detekcija i kvantifikacija metodom tečne hromatografije i elektrosprej-masene spektrometrije.

Našim istraživanjima je obuhvaćeno iznalaženje najpogodnijih rastvarača za ekstrakciju imazetapira iz zemljišta i najpogodnije SPE kolone za prečišćavanje dobijenog ekstrakta. Određivanje imazetapira izvršeno je metodom tečne hromatografije, uz primenu DAD detektora i C18 hromatografske kolone, pri čemu su neki eksperimentalni uslovi (mobilna faza, protok mobilne faze, temperatura kolone, talasna dužina DAD detektora) bili poznati od ranije (Cyanamid, 1988). Tokom istraživanja korišćeno je više rastvarača kao što su: acetonitril (ACN), destilovana voda, aceton, metanol, rastvor natrijum-karbonata i rastvor natrijum-hidroksida, kao i nekoliko SPE kolona: amino-karbon, C18 i SDB-1 (Lazić i sar., 2006). Najpogodniji rastvarač i SPE kolona određeni su na osnovu vrednosti prinosa ekstrakcije.

MATERIJAL I METODE

Korišćene hemikalije

0.1 M Na₂CO₃ (Alkaloid, Makedonija),
dejonizovana H₂O,
0.5 M NaOH (Zorka Pharma, Srbija),
Aceton (J.T. Baker, SAD),
KH₂PO₄ (Kemika, Hrvatska),
H₃PO₄ (Poch, Poljska),
Acetonitril (J.T. Baker, SAD),
6 N HCl (Poch, Poljska),
N HCl (Poch, Poljska),
metilen-hlorid (J.T. Baker, SAD),
metanol (J.T. Baker, SAD),
Analitički standard imazetapira (Riedel-Dehaën,
Nemačka).

Standardni rastvori

Korišćen je analitički standard imazetapira čistoće 99%. Količina od 10 mg analitičkog standarda imazetapira rastvorena je u 10 ml dejonizovane vode i 0.2 ml

ovog rastvora rastvoreno je u 10 ml smeše ACN:H₂O (75:25 v/v), pri čemu je dobijena koncentracija 0.02 mg/ml. Standard imazetapira koncentracije 0.02 mg/ml pripremljen je u cilju određivanja ponovljivosti merenja i zavisnosti površine pika od zapremine injektovanog rastvora. Za određivanje linearnost detektora, napravljani su standardni rastvori sledećih koncentracija: 1.0, 0.5 i 0.1 µg/ml.

Instrumentalna oprema

Tečni hromatograf (HPLC) Agilent 1100 Series sa DAD detektorom i Hypersil ODS (5 µm, 2.0 x 250 mm) kolonom.

Ekstrakcija

Postupak ekstrakcije je izvršen različitim rastvaračima: acetonitrilom, smešom vode i metanola, smešom vode i acetona, kao i smešom vode i acetona uz naknadni dodatak vode. Korišćene SPE kolone i različiti rastvarači upotrebljeni za eluiranje ekstrakta sa kolone prikazani su u tabeli 2.

Postupak ekstrakcije i prečišćavanja

Odmereno je šest porcija od 5 g zemlje i dodato 0.5, 0.2, 0.1 ml standardnog rastvora 1.0 mg/ml i 10.0, 5.0 i 1.0 ml standardnog rastvora 1.0 µg/ml, redom, a zatim je u svaki balon dodato 20 ml 0.1 M rastvora Na₂CO₃. Uzorci su stavljani na mešalicu 30 min., a potom centrifugirani na 3000 rpm u periodu od 10 min. Po dekantovanju i podešavanju pH na 1.8-2.0 sa 6 N rastvorom HCl, uzorci su filtrirani preko filter-papira u levak za odvajanje, a zatim je filter-papir ispran sa 5 ml 0.1 N rastvora HCl. Particioniranje je izvršeno sa 2 x 30 ml metilenhlorida uz mešanje u trajanju od 2 min.; nakon razdvajanja slojeva, organski rastvarač je ispušten u balon od 500 ml. Ekstrakt je uparen do suva, nakon čega mu je dodato 5 ml smeše ACN i H₂O (75:25 v/v).

Svi uzorci su prečišćeni na SPE SDB-1 kolonama tako što je upareni ekstrakt, kome je dodata smeša ACN i H₂O, propušten preko SDB-1 kolone i eluat je sakupljan u normalni sud od 10 ml i dopunjen do crte sa smešom ACN i H₂O. Pre prečišćavanja, kolone su kondicionirane sa 3 ml metanola i 3 ml H₂O.

Uzorci su analizirani metodom tečne hromatografije sa DAD detektorom i C18 kolonom uz mobilnu fazu (ACN : H₂O = 30:70 v/v, pH 2.1 (sa konc. H₃PO₄)).

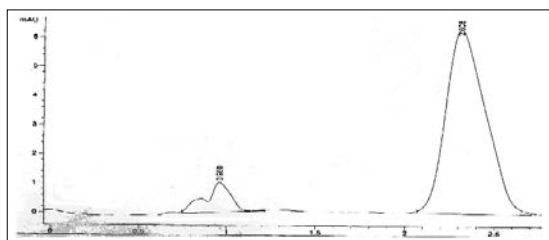
Temperatura kolone je bila 25°C, talasna dužina DAD detektora 254 nm a protok mobilne faze od 0.71 ml/min. Pri ovim uslovima retenciono vreme imazetapira iznosilo je 2.303 minuta, i hromatogram je prikazan na slici 1.

REZULTATI

Linearnost detektora određena je u opsegu koncentracija 0.05 -1.0 µg/ml, a zavisnost površine pika od koncentracije standardnog rastvora prikazana je na slici 2. Regresioni koeficijent pravolinijske zavisnosti iznosio je 0.9741.

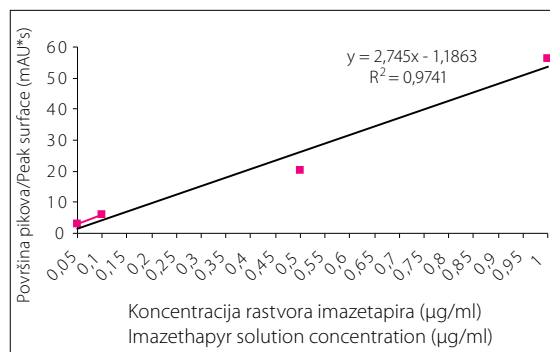
Ponovljivost merenja određena je hromatografskom analizom standardnog rastvora imazetapira koncentracije 0.02 mg/ml u deset ponavljanja, pri čemu je injektovana zapremina standarda bila 1.0 µl. Vrednosti standardne devijacije i koeficijenta varijacije za seriju ponovljenih merenja prikazani su u tabeli 1.

Injektiranjem različitih zapremina (3.0, 4.0 i 5.0 µl) standardnog rastvora koncentracije 0.02 mg/ml dobijena je linearna zavisnost površine pika od injektovane



Slika 1. Hromatogram imazetapira iz natrijum-karbonatnog ekstrakta zemlje prečišćenog preko SPE SDB-1 kolone

Figure 1. Chromatogram of Na₂CO₃ soil extract of imazethapyr cleaning up on SPE SDB-1 cartridge



Slika 2. Linearnost detektora

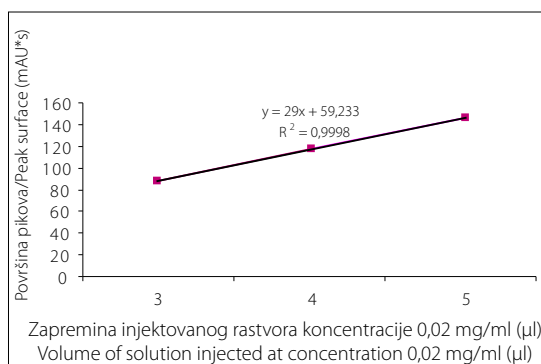
Figure 2. Detector linearity

Tabela 1. Određivanje ponovljivosti merenja
Table 1. Determination of replicated measurement

Koncentracija standarda Standard concentration	Površina pika Peak surface	Retenciono vreme Retention time (min)
0.02 mg/ml	311.3	2.303
	311.3	2.318
	311.89	2.313
	312.3	2.291
	312.7	2.303
	313.37	2.295
	314.65	2.315
	314.34	2.304
	314.7	2.293
	314.5	2.294
Srednja vrednost Mean (x*)	313.12	2.303
Standardna devijacija Standard deviation (σ)	1.31	0.0093
Koeficijent varijacije Coefficient of variation (KV %)	0.42	0.4

zapremine sa regresionim koeficijentom 0.9998, koja je prikazana na slici 3.

Najpogodniji metod pripreme uzorka, dobijen je određivanjem vrednosti prinosa ekstrakcije na uzorcima zemljišta koji nisu bili tretirani proučavanim pesticidom (kontrolni uzorci). U uzorke je dodat po 1 ml standardnog radnog rastvora koncentracije od 0.01 do 1.0 µg/ml. Ove analize ponovljene su tri puta. Prosečan prinos ekstrakcije za tri ponavljanja, ovih koncentracija, kretao se u intervalu od 72.00 do 90.30 %. Prosečan



Slika 3. Linearna zavisnost zapremine injektovanog standardnog rastvora i površine pika

Figure 3. Linear correlation between the volume of the injected standard solution and the peak surface

Tabela 2. Prosečni prinosi ekstrakcije (%) u zavisnosti od rastvarača za ekstrakciju, eluiranje i SPE kolona
Table 2. Average recovery value (%) depending on solvents for the extraction, elution, and SPE cartridges

Rastvarači za ekstrakciju Extraction solvent	SPE kolona SPE cartridge	Rastvarači za eluiranje sa kolone Elution solvent	Prinosi ekstrakcije Extraction (%)
ACN	C 18	MeCl ₂ /MeOH (80:20 v/v)	23.00
	C 18	MeCl ₂	53.00
voda/aceton (50:50 v/v) + 500 ml vode water/acetone (50:50 v/v) + 500 ml water	amino-carbon	MeOH/ACN (50:50 v/v)	0
	C 18	MeOH/ACN	0
voda/aceton (50:50 v/v) water/acetone (50:50 v/v)	C 18	MeOH/ACN (50:50 v/v)	68.00
	SDB-1	MeOH/ACN	9.68
voda/metanol (50:50 v/v) water/methanol (50:50 v/v)	amino-carbon	MeCl ₂ /MeOH (80:20 v/v)	0
	C 18	MeCl ₂ /MeOH	5.00
Na ₂ CO ₃	SDB-1	ACN/voda (75:25 v/v)	85.00
NaOH	SDB-1	ACN/voda (75:25 v/v)	70.00

prinos ekstrakcije za 18 određivanja iznosio je 83.72%. Vrednosti su varirale u zavisnosti od rastvarača korišćenih za ekstrakciju, primenjenih SPE kolona, kao i rastvarača primenjenih za eluiranje ekstrakta sa kolona. Prosečni prinosi ekstrakcije u zavisnosti od rastvarača za ekstrakciju, eluiranje i vrste SPE kolone prikazani su u tabeli 2.

DISKUSIJA

Razmatranjem vrednosti prosečnog prinosa ekstrakcije prikazanih u tabeli 3 može se zaključiti da je najveća vrednost (85.0%) dobijena za postupak ekstrakcije rastvorom Na₂CO₃, prečišćavanje preko SPE SDB-1 kolone i eluiranje mešavinom ACN : voda (75:25 v/v). Vrednosti prinosa ekstrakcije za koncentracije 0.1, 0.5 i 1.0 µg/ml iznosile su 90.3, 79.0 i 84.03%, dok su za koncentracije 0.05, 0.02 i 0.01 µg/ml ove vrednosti bile 72.0, 87.2 i 89.8%. Visoka vrednost prosečnog prinosa ekstrakcije dobijena je za metodu ekstrakcije rastvorom NaOH, prečišćavanjem preko SPE SDB-1 kolone i eluiranjem mešavinom ACN i vode (75:25 v/v). Prinosi ekstrakcije u ovom slučaju su iznosili 57.0, 78.8 i 49.0, 66.0, 65.0 i 79.0% za koncentracije 0.05, 0.02 i 0.01 mg/ml i 0.1, 0.5 i 1.0 µg/ml, respektivno. Vrednost prosečnog prinosa ekstrakcije od 68% u u slučaju ekstrakcije smešom voda/acetone, prečišćavanja na C18 SPE koloni i eluiranja smešom metanol : ACN = 50:50 v/v takođe je ukazala na zadovoljavajuću efikasnost ekstrakcije. Svi ostali primenjeni postupci se, zbog niske vred-

nosti prinosa ekstrakcije, ne mogu preporučiti za određivanje ostataka imazetapira u zemljištu. Prema podacima dostupnim u literaturi, za ekstrakciju imazetapira iz zemljišta po metodi Novakova (1994) korišćen je 0.1 M Na₂CO₃, a ostaci su određeni tečnom hromatografijom. Dobijeni prinos ekstrakcije iznosio je 57.2-74.00%. Efikasnija ekstrakcija imazetapira iz zemljišta izvršena je metodama koje su predložili Lagana i sar. (1998), sa rasponom prinosa ekstrakcije od 87.00 do 95.00% uz kombinovanu SCE (soil column extraction) i SPE ekstrakciju, a ekstrakti su kasnije analizirani LC/ES-MS hromatografijom. Pace i sar. (1999) su dobili prosečan prinos ekstrakcije imazetapira iz zemljišta od 78%, koristeći SFE-CO₂ sa 4.6:1 acetonitril: sirćetna kiselina.

Linearnost detektora u koncentracionom opsegu 0.05-1.0 µg/ml potvrđena je regresionim koeficijentom od 0.9741. Preciznost primenjene hromatografske analize potvrđena je vrednostima koeficijenta varijacije za seriju ponovljenih merenja (tabela 2).

Visoka vrednost koeficijenta regresije linearne zavisnosti površine pika od zapremine standardnog rastvora ukazuje na preciznost injektiranja i stabilnost detektora.

Koncentracija od 0.02 µg/ml se može smatrati kao limit detekcije, pošto niže koncentracije ne dozvoljavaju odgovarajuću definiciju spektra. Koncentracije niže od ovog limita ne mogu biti kvantifikovane. Ovaj nivo je dovoljno nizak za posmatranje ostataka imazetapira u zemljištu.

LITERATURA

Lagana, A., Fago, G., Marino, A., Simultaneous determination of imidazolinone herbicides from soil and natural matters using soil column extraction and off-line solid-phase extraction followed by liquid chromatography with UV detection or liquid chromatography / Electrospray Mass Spectroscopy, *Anal. Chem.*, 90 (1), 121 – 130, 1998.

Lazić, S., Vuković, S., Bursić, V.: Optimizacija metode za određivanje imazetapira u zemljištu. VIII Savetovanje o zaštiti bilja, Zbornik rezimea, 56-57, Zlatibor, 2006.

Mitić, N., Pesticidi u poljoprivredi i šumarstvu u Jugoslaviji 2004., Društvo za zaštitu bilja Srbije, Beograd, 2004.

Novakova, O., Determination of imazethapyr and imazapyr residues in soil by coupled – column liquid chromatography, *Chromatographia*, 1994, 39 (1), 62 – 66.

Steven J. Stout, Adnian R. Dacunlia, Maximilian M. Safarpour, Simplified determination of imidazolinone

herbicide in soil at parts – per – billion level by liquid chromatography / electrospray ionization Tandem mass Spectrometry, AOAC International Publications, Journal of AOAC International, 1997.

Tondreau, R., Guzman B., Determination of CL263,499 residues in soil by HPLC, Approved by J.E. Boyd, American Cyanamid Company, Agricultural Research Division, Chemical Development, Princeton, New Jersey 08540, Cyanamid M-1719.03, 05-16-88.

Šovljanski Radmila, Lazić Sanja, Osnovi fitofarmacije, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, 2007.

Pace, P.F., Senseman, S.A., Ketchersid, M.L., Cralle, H.T., Supercritical fluid extraction and solid-phase extraction of AC 263.222 and imazethapyr from three Texas soils, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, Springer-Verlag New York, 37, 4, 440-444, 1999.

Methods of Imazethapyr Extraction from Soil and Cleaning up by Solid Phase Extraction

SUMMARY

The aim of this work was to optimize the determination methods of imazethapyr residues in soil using HPLC with DAD and C 18 (Hypersil ODS, 5 µm, 2.0 x 250 mm) columns and to find the most appropriate solvent for imazethapyr extraction as well as the most suitable SPE cartridges for extract purification. For soil extract purification we decided to use SPE Amino/Carbon, C 18 and SDB-1 cartridges.

On the basis of the performed chromatography method for optimising imazethapyr determination in soil it was found that the most appropriate method for determining imazethapyr residues in soil is the extraction method with Na₂CO₃ solution, followed by cleaning up on SPE SDB-1 cartridge and elution with ACN and water.

Keywords: Imazethapyr; Soil; Extraction; Solid phase extraction (SPE); Optimisation