

Atrazin

Aldrin je triazinový herbicid, který brzdí fotosyntézu, je nejběžnějším herbicidem v půdách a ve vodách. Používá se na ničení plevelu v porostech kukuřice, chmelu, cukrové třtiny. Atrazin je mírně toxický pro savce, toxické účinky má na vodní rostliny a některé druhy řas. Od roku 2005 je atrazin v ČR zakázán díky kontaminaci vod. Atrazin ve větších dávkách působí nervosvalově – může způsobovat poruchy koordinace, motoriky a respirační úzkost. Způsobuje podráždění sliznic žaludku, zvracení, průjem a kožní dermatidy. Atrazin narušuje hormonální systém, může také narušovat reprodukci a vývoj nenarozených organismů. Negativně působí na půdní vývoj půdních organismů. V půdě může být atrazin absorbován na jílové minerály (Cruz-Guzman et al., 2004), amorfní oxidy železa a hliníku (Huang et al., 1984) a organickou hmotu (Godskesen et al., 2005). Hodnota pH ovlivňuje adsorpci (Tao a Tang, 2004). Se snižující se hodnotou pH se adsorpce atrazinu na jílové minerály zvyšuje, protože více atrazinových molekul je v protonované formě (Saint-Fort et al., 1988). Anorganická hmota a pH ovlivňují adsorpci atrazinu – obsah organické hmoty se zvyšuje s klesajícím pH (Saint-Fort et al., 1988). Nízká hodnota pH zvyšuje rychlost hydrolyzy triazinových herbicidů a hydroxylové deriváty ovlivňují adsorpci (Brouwer et al., 1990). Atrazinová adsorpce má vliv na chemickou a mikrobiální degradaci (McCormick et al., 1966).

Standardizované metody stanovení

ISO 14507:2005 Soil quality – Pretreatment of samples for determination of organic contaminants

Mezinárodní norma specifikuje 3 metody předúpravy vzorků půd v laboratoři před vlastním stanovením organických polutantů. Jsou zde uvedeny postupy s ohledem na chemických charakter stanovovaných látek: těkavé organické látky, polotěkavé organické látky – matrice obsahuje částice větší než 2 mm pa má heterogenní distribuci kontaminantu v matrici, stanovení stabilních organických látek, velikost půdních částic je < 2 mm a polutanty jsou homogenně rozšířeny v matrici. Organické látky, které jsou stabilní mohou být připraveny pro analýzu podle ISO 11464.

ISO 11264:2005 Soil quality – Determination of herbicides – Method using HPLC with UV-detection

Metoda zahrnuje stanovení triazinu a jeho metabolitů, je vhodná i pro stanovení atrazinu a simazinu.

U.S. EPA Method 1656 Gas chromatography of organo-halide pesticides

Metoda je určena pro stanovení organohalidových pesticidů a dalších vyjmenovaných látek ve vodách, kalech, sedimentech a půdách. V případě, že vzorek kalu obsahuje > 30 % sušiny, je připraven extrakt obsahující pouze 1 % sušiny. Vzorky půd jsou extrahovány acetonitrilem a methylen chloridem metodou 3350 (extrakce ultrazvukem) nebo superkritickou fluidní extrakcí (metoda 3562). Extrakt je zpětně extrahován 2% Na₂SO₄, aby se odstranily vodorozpustné interferující látky. Dále je přečištěn metodami 3610, 3620 a 3640. Identifikace polutantů se provádí porovnáním retenčních časů.

U.S. EPA Method 8141B Organophosphorus compounds by gas chromatography

Metoda popisuje stanovení organofosforových látek metodou plynové chromatografie. Je-li pro stanovení použit dusíko-fosforový detektor (NPD), je možné touto metodou stanovit i triazinové pesticidy, včetně Simazinu. NPD detektor je upravený plamenový ionizační detektor, který zvyšuje odezvy látek obsahujících dusíkové a fosforové atomy. Vzorky půd jsou extrahovány vhodnou extrakční metodou a rozpouštědly, např. směsí aceton:hexan (1:1) nebo dichlormethan:aceton (1:1) za

použití Soxhletovy extrakce (U.S. EPA Methods 3540, 3541), tlakové extrakce rozpouštědlem (U.S. EPA Method 3545), mikrovlnné extrakce (U.S. EPA Method 3546), extrakce ultrazvukem (U.S. EPA Method 3550). Extrakt může být přečištěn některým ze známých postupů sloupcové chromatografie na alumině, silikagelu, Florisilu (U.S. EPA Methods 3610, 3620, 3630) nebo gelovou permeační chromatografií (U.S. EPA Method 3640). Pro odstranění elementární síry lze použít metodu U.S. EPA Method 3660. Přečištěný extrakt je analyzován metodou GC/NPD. Na některých kolonách (např DB-5) může docházet ke koeluci Simazinu s Atrazinem. Pro confirmaci a stanovení lze použít také metodu plynové chromatografie s hmotnostní detekcí (GC/MS). Mez detekce pro chlorpyrifos a atrazin je 5 µg/kg sušiny.

U.S. EPA 1699 Stanovení atrazinu, chlorpyrifosu, dieldrinu, aldrinu, endrinu, endosíranu, 4,4'-DDT, 2,4'-DDE, 4,4'-DDE, 4,4'-DDD, o,p'-DDT, p,p'-DDT a jiných pesticidů

Tato metoda zahrnuje extrakci vzorku, extrakty jsou koncentrovány odpařením na rotační vakuové odparce nebo pomocí odpařovače Kuderna-Danish. Extrakty jsou poté ve vhodném rozpouštědle injektovány do HRGC/HRMS (objem 20 µl). Extrakty je nutné čistit – aminopropylenové a mikrosilikagelové kolony, popř. gelová permeační chromatografie. Pokud v extraktu jsou stanovovány organochlorované pesticidy je vhodné pro další čištění použít silikagel Florisil nebo oxid hlinitý. Bezprostředně před injektáží nabarvený interní standard je přidáván ke každému extraktu. Analyt je separován GC a detekován vysoce-rezoluční hmotnostní spektrometrií – monitoruje se m/z pro každou stanovovanou komponentu. Jednotlivé pesticidy jsou identifikovány srovnáním GC retenčního času a iontové abundance s korespondenčním retenčním časem autentického standardu a teoretickým nebo požadovaným poměrem m/z . Interference – činidla, sklo, chemikálie mohou být zdrojem interferencí – z hlediska jejich možné kontaminace. Mohou se projevovat interference látek, které jsou společně extrahovány s pesticidy – PCB, chlorované a bromované dibenzodioxiny a dibenzofurany, methoxybifenyly, bromované bifenylestery apod. Tyto látky musí být eliminovány čistícími procedurami. Detekční limity jsou závislé na úrovni interferencí spíše než na instrumentálních limitacích (stanovovány jsou metodou 40 CRF 136, appendix B).

Nestandardizované metody stanovení

Baranowska I., Barchánska H., Pyrsz A. (2005): Distribution of pesticides and heavy metals in trophic chain, Chemosphere 60, 1590-1599.

Stanovení atrazinu probíhá na HPC s UV detekcí na kolonách z nerezi (25 cm x 4,6 mm) naplněných C₁₈ ODS, s velikostí částic 5µm. Separace atrazinu je vykonávána isokratickou elucí při rychlosti toku 0,8 ml/min. Mobilní fáze obsahuje směs methanol:voda (1:1), absorbance je kontinuálně měřena v rozmezí 200-400 nm, s maximem při 224 nm. Detekční limit pro atrazin je 0,5 µg/g. Techniku separace a stanovení atrazinu lze využít i pro vzorky cereálií, travin, mléka, vajíček, ovoce.

Gong A., Ye C. (1998): Analysis of trace atrazine and simazine in environmental samples by liquid chromatography-fluorescence detection with pre-column derivatization reaction. Journal of Chromatography A 827, 57-63.

Metodika stanovuje atrazin pomocí nového off-line spojení extrakce s před-kolonovou derivatizací a následnou fluorescenční detekcí v oblasti kapalinové chromatografie. Předkolonová derivatizační technika s následující LC-fluorescenční detekcí byla vyvinuta za účelem zlepšení stanovení atrazinu ve vzorcích půd. Derivatizační činidlo 4-(2-ftalimidyl)benzoylchlorid (PIB-Cl) je aplikován pro reakci atrazinu a simazinu za účelem jejich stanovení. Mezi základní rysy off-line spojení předkolonové derivatizace s fluorescenční detekcí patří: a.) zvýšení citlivosti analytu (atrazin a simazin nevykazují fluorescenční vlastnosti, ale po přidání PIB-Cl derivátů mají silné fluorescenční účinky), b.) detekční limity jsou na úrovni µg/g i pro vzorky půd a rostlin, c.) procedura nevyžaduje čištění a následné koncentrování vzorku, d.) použití off-line extrakce umožňuje zpracovat větší množství vzorků, pokud to vyžaduje nižší detekční limit. Za níže definovaných podmínek derivatizace může být ve vzorcích stanoven pouze atrazin a simazin, ostatní triaziny, které obsahují –NH skupiny mohou být detekovány,

pokud excitační a emisní vlnová délka je pro ně upravena. Před-kolonová derivatizační metoda s offline extrakcí je alternativou pro konvenční metodu GC/MS nebo pro metodu GC s dusíkovou-fosforovou detekcí (NPD).

Měření se uskutečňuje na HPLC s fluorescenčním detektorem (RF-510LC) a nerezovými kolonami (25 cm x 4,6 mm) naplněnými Dupont ODS s velikostí částic 10 μm . Excitační vlnová délka 312 nm, emisní vlnová délka 420 nm. Derivativa jsou eluována směsí ethanol-voda (73:27, v/v, pH=6) s rychlostí toku 0,8 ml/min. Půdní vzorky pro analýzu jsou upraveny mrazovým sušením, prosítovány na velikost zrn 120 μm . Derivatizační činidlo PIB-Cl je syntetizováno z o-ftalaldehydu a 4-aminobenzenové kyseliny podle metody Tsuruta et al., 1987.

100 g půdního vzorku a 100 ml methanolu se smíchá v Erlenmeyerově baňce. Směs se třepe 1,5 hod., při 270 rpm na třepačce. Půdní extrakt se poté odpaří za redukováného tlaku a přefiltruje se přes fritu (4G) s vrstvou anhydričkého síranu sodného ve slinuté skleněné filtrační koloně. 50 ml čerstvého methylnatého chloridu se použije pro promytí kolony. Extrakt se odpaří na 3 ml na rotační vakuové odparce při 35 $^{\circ}\text{C}$ ve vodní lázni. Koncentrovaný extrakt se usuší v mírném proudu dusíku, poté se rozředí na 5 ml benzenem. 4 ml extraktu se umístí do 25 ml baňky, přidá se 6 mg PIB-Cl a 1 g katalyzátoru. Směs se třepe 25 min. ve vodní lázni s teplotou 20 $^{\circ}\text{C}$, a poté se centrifuguje při 4 000 rpm. 5 μl se použije pro analýzu. Katalyzátor pro derivatizaci je směsí pevného NaOH-Na₂CO₃ (1:1). Maximální výtěžek při derivatizaci je dosažen, pokud molární poměr PIB-Cl k atrazinu a simazinu je větší než 3 a katalyzátor k poměru atrazin a simazin je větší než 3 800.

Separace derivátů je uskutečňována na ODS kolonách se směsí voda-methanol (73:27, v/v). Detekční limit pro atrazin je 1,2 ng/g a pro simazin 1,1 ng/g.

Gonçalves C., Carvalho J.J., Azenha M.A., Alpendurada M.F. (2006): Optimization of supercritical fluid extraction of pesticide residues in soil by means of central composite design and analysis by gas chromatography – tandem mass spectrometry, Journal of Chromatography A, 1110, 6-14.

Vzorky půd jsou extrahovány pomocí superkritické extrakce. Superkritická extrakce poskytuje mnoho výhod – rychlost, jednoduchost, vysokou selektivitu a dobrou extrakční účinnost. Superkritická extrakce nevyžaduje čisticí proceduru, je vhodná pro teplotně labilní komponenty, jedná se o automatizovanou proceduru, která nevyžaduje přítomnost organických rozpouštědel, popř. ji minimalizuje. Půdní vzorky před analýzou jsou usušeny při 40 $^{\circ}\text{C}$, prosítovány (velikost zrn 500 μm) a udržovány při 4 $^{\circ}\text{C}$. Extrakce se uskutečňuje v Inscó SFE Systému (Inscó Europe, Hengoed, UK), který se skládá z superkritického kapalínového extraktoru SFX 220, z kontroléru SFX 200, dvou pump (model 260 D) a z omezovače teploty. Omezovač teploty je nastaven na 90 $^{\circ}\text{C}$, extrakční komora je tvořena nerezovou nádobkou o objemu 2,5 ml, která pojme 2,3 g vzorku s přídatkem anhydričkého síranu sodného. Experimentální podmínky extrakce – teplota omezovače, množství rozpouštědla, tlak, teplota, procento složení modifikátoru, extrakční čas a objem superkritické kapaliny jsou nastaveny na maximální operační účinnost. Extrakt se poté rozředí s 12 ml rozpouštědla a odpaří se do sucha v mírném proudu dusíku a rozpustí se v octanu ethylnatém. Pro analýzu se injektuje se 1 μl vzorku. Analýza se vykoná na plynovém chromatografu s teplotně programovaným injektorem, kapilárními kolonami (30 m x 0,25 mm, 0,25 μm tloušťka filmu) – ChromPack. Teplota injektoru je udržována na 250 $^{\circ}\text{C}$, jako nosný plyn a kolizní plyn (pro iontovou past) se používá helium s rychlostí toku 1 ml/min. Teplotní program pro analýzu je následující – počáteční teplota 80 $^{\circ}\text{C}$ (udržována 2 min.), rychlost zvyšování teploty 15 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$. až do dosažení 180 $^{\circ}\text{C}$ (zdržení 4 min.), poté rychlost růstu teploty 7 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$. do 220 $^{\circ}\text{C}$ (udržování 6 min.), nakonec rychlost zvyšování teploty 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ do 290 $^{\circ}\text{C}$ (zdržení 1 min.). Detekce pesticidů probíhá pomocí iontové pasti hmotnostního spektrometru (Saturn 2000) s elektronovou nárazovou ionizací a MS-MS fragmentací iontů. Axiální modulační amplituda napětí je 3,7 V pro optimální rozlišení a napětí elektronového násobiče je 1 800 V. Touto technikou lze kromě výše vyjmenovaných pesticidů stanovit i rezidua atrazinu, lindan, metolachlor, pendimethalin, endosíran, rezidua DDT, metalaxyl, quinafos, prokymidon, benalaxyl. Detekční limity

pro jednotlivé látky jsou následující: Atrazin je 0,5 µg/kg, alachlor 0,3 µg/kg, chlorpyrifos 0,1 µg/kg, endosíran 0,6 µg/kg, dieldrin 0,4 µg/kg.

Lesuer C., Gartner M., Mentler A., Fuerhacker M. (2008): Comparison of four methods for the analysis of 24 pesticides in soil samples with gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-ion trap-mass spectrometry, Talanta 75, 284-293.

Extrakce půdních vzorků se provádí pomocí DIN EN 12393. Tato technika umožňuje stavět v půdních vzorcích kromě výše vyjmenovaných pesticidů i methylchlorpyrifos, desethylatrazin, deltametrin, lindan, simazin, trifluralin, vinklozolin. GC-MS analýza je vykonávána na HP GC-MS modelu 6890 N, který je spojen s 5 973 N hmotnostním selektivním detektorem. Separace se provádí na HP 5 MS kolonách (30 m x 0,25 mm), s náplní silikagel, tloušťka filmu 0,25 µm. Jako nosný plyn se používá hélium, injektuje se 1 µl, teplota injektoru je 280 °C. GC operuje v následujícím teplotním programu: Počáteční teplota 70 °C, která se udržuje 2 min., rychlost zvyšování teploty 25 °C/min. až do 150 °C, poté následuje zvyšování teploty s krokem 3 °C/min. až do 200 °C, poté je rychlostní krok 8 °C/min. až do dosažení teploty 280 °C, která se udržuje 10 min., poté se teplota zvyšuje na 320 °C s rychlostí 15 °C/min. a udržuje se 2,47 min. Teplota rozhraní se udržuje na 320 °C, teplota iontového zdroje 250 °C, teplota kvadrupólu je 150 °C a hmotností spektra jsou získávána při energii 70 eV. Analýzy se uskutečňují v plném skenovacím SIM módu. Limit detekce pro atrazin je 5 ng/g, pro chlorfenvinfos 8,7 ng/g, chlorpyrifos 10 ng/g, dieldrin 35 ng/g.

Maleki N., Absalan G., Safari A., Farjami E.(2007): Ultra trace adsorptive stripping voltammetric Determination of atrazine in soil and water using mercury film electrode, Analytica Chimica Acta 581, 37-41.

Elektroanalytické metody (Maleki et al., 2007) jsou známé svou minimální spotřebou organických rozpouštědel a minimálním ošetřením vzorku před analýzou. Protonace atrazinu v kyselém roztoku a iontově párové interakce mezi komplexy rtuti-thiokyanátu na povrchu MFE a protonovaný atrazin způsobují velmi silnou adsorpci na povrchu MFE. Adsorbované komponenty mohou být stanoveny adsorpční stripovací voltametří v přímém voltametričtém módu, který nabízí dobrý signál vzhledem k pozadí, a tím i větší citlivost.

Adsorpční stripovací voltametričtý měření je uskutečňováno použitím počítačově řízeného analyzátoru AUTOLAB typ II (ECO CHEME, Nizozemí), vybaveného softwarem Methrom VA STAND 663 a GPES 4.9. Tři elektrodová konfigurace se skládá z filmu rtuti (MPE) nanášeného na skleněný uhlíkový disk (GC, rozměr 3 mm) – pracující elektroda, platinová tyčinková elektroda a nasycená kalomelová elektroda (SCE) – referenční elektroda. Všechna měření se provádí za pokojové teploty. Kombinovaná skleněná elektroda je propojena s pH metrem (Metzhrom 691 pH metr). Před analýzou se GC elektroda vyleští pomocí oxidu hlinitého (velikost zrn 0,3 µm), povrch se poté omyje deionizovanou vodou a vyčistí v ultrazvukové lázni, 60 s poté se provede před-ošetření multicyklickým voltametričtým skenováním (50x) mezi -0,8 a +0,8 při 0,1 V/s tlumivém roztoku NH₄OH-HCl (koncentrace 1M NH₄OAc, 0,5M HC, pH = 3,41). Vytvoření rtuťového filmu se uskuteční následovně: 20 ml pufru o pH = 3,4 (0,01M NH₄OAc-HCl) se napipetuje do voltametričtější cely (komůrky), která obsahuje 5 mM roztok thiokyanátu a 30 µM rtuti (II). Zapne se míchání a kyslík se odstraní pomocí dusíku. Depozice rtuti na GC elektrodě se uskuteční během 240 s při potenciálu – 1,2 V. Po vytvoření rtuťového filmu na povrchu skleněné elektrody, se adsorpce atrazinu uskuteční během 10 min. mícháním v roztoku. Míchání se zastaví po 10 s rovnováze. Potenciál se skenuje užitím vlnového módu, frekvence 10 Hz, amplituda pulsu 25 mV, potenciál 20 mV, rozmezí napětí -0,3 až -0,8 V. 5 g upraveného vzorku půd (vysušeného, homogenizovaného) se smíchá s 15 ml dichlormethanu a směs se třepe 15 min. Organická fáze se separuje a transferuje se dělicí nádobky. Atrazin se zpětně separuje 20 ml 0,1M HCl. Při determinaci atrazinu ve vzorcích půd, může docházet k interferencím, které jsou nejčastěji způsobovány produkty degradace atrazinu – 2-hydroxyatrazin (vzniká chemickou degradací), deisopropylatrazin, deisopropylatrazin a didealkylatrazin (poslední tři komponenty jsou produktem biologického odbourávání atrazinu v půdách). Deethylatrazin a deisopropylatrazin jsou elektroaktivní a jejich potenciály jsou blízko k atrazinu. Z tohoto důvodu po

extrakci atrazinu ve vzorcích půd je množství atrazinu a jeho elektroaktivních degradačních produktů detekováno jako jeden signál. Detekční limit pro atrazin v této technice se pohybuje okolo 0,024 µg/l.

Richter P., Sepúlveda B., Oliva R., Calderón K., Seguel R. (2003): Screening and determination of pesticides in soil using continuous subcritical water extraction and gas chromatography-mass spectrometry, Journal of Chromatography A, 994, 169-177.

Vzorek půdy je před extrakcí usušen na vzduchu, prosítován na velikost zrn 2 mm a homogenizován. Uchováván je v tmavých láhvích, nejlépe při 4 °C. 300 mg půdního vzorku se umístí do extrakční komůrky umístěné uvnitř hliníkové komory – pece, která je spojena s tepelným zařízením umístěným na horní části komory (je elektronicky kontrolována termočlánkem, dokud není dosažena teplota 270 °C). Poté je voda pumpována systémem k extrahování analytu z půdy při rychlosti toku 2 ml/min po dobu 25 nebo 90 min. Po superkritické extrakci jsou pesticidy ve vodné fázi transferovány pro uskutečnění extrakce kapalina-kapalina s 5 ml dichlorethanu před analýzou GC/MS. Obsahy jednotlivých pesticidů jsou vyhodnoceny na základě interní kalibrace za použití standardů.

Schewens R., Maidl F.X. and Fishbeck G. (1993): Trace determination of weathered atrazine and terbuthylazine and their degradation products in soil by high-performance liquid chromatography-diode-array detection, Journal of Chromatography A 641, 89-93.

50 g vzorku se extrahuje s 250 ml acetonu, methanolu a směsí methanol-voda (8:2) v horkém extraktoru po dobu 2 hod., pak se objem půdního extraktu redukuje na 2 ml, při 40 °C ve vodní lázni za sníženého tlaku (odparka). Vzorky po extrakci se čistí, a to kolonou naplněnou směsí sulfonové kyseliny se silikagelem (kationtově-výměnný typ kolony). Extrakt se dávkuje do kolony prostřednictvím 3 ml tuby vakuovým zařízením. Před čištěním se kolona aktivuje 4 ml 0,12M kyseliny chlorovodíkové v methanolu při rychlosti toku 0,8 ml/min., poté následuje přídavek 3 ml methanolu a 3 ml acetonu. Poté se vzorek (3 ml) vlije do kolony a eluuje se 2,5 ml roztoku chlorid draselný-nasycený methanol, přidává se 200 µl methanolického alikvotu amoniaku (0,1M) pro neutralizaci acidity. Na konci se methanol odstraní odpařením na vakuové rotační odparce při 40 °C a rezidua se rozpustí v 1 ml směsi acetonitril-voda (1:9) pro analýzu na RP-HPLC. Čištění se může provést i alternativně za pomoci gelové permeační chromatografie, a to tak že vzorek po extrakci se odpaří na objem 0,1 ml a rozředí se směsí octan ethylnatý:cyklohexan (1:1) na objem 5 ml. Výsledný roztok se poté čistí na gelové koloně (Bio-Beads SX-3, velikost gelu 200 – 400 mesh), dávkuje se (3 ml) prostřednictvím dávkovací smyčky Rheodyne ventilu.

Stanovení atrazinu se provádí na HPLC s UV detekcí, s injektáží 100 µl vzorku. Determinace atrazinu se odehrává při vlnové délce 220 nm. Kolony, které jsou používány jsou Hypersil kolony (250 x 4 mm, 5 µm).

Vega Belmonte A., Frenich Garrido A., Vidal Martínek J.L. (2005): Monitoring of pesticides in agricultural water and soil samples from Andalusia by liquid chromatography coupled to mass spectrometry, Analytica Chimica Acta 538, 117-127.

Půda (30 g) je extrahována sonifikací se 40 ml směsí methanol:voda (4:1, v/v) po dobu 20 min. Vzorky se filtrují přes 0,45 µm nylonový filtr, pak se vzorek odpaří na vakuové rotační odparce. Odparek se rozpustí v 50 ml destilované vody. Stanovení pesticidů probíhá pomocí LC-MS s elektrosprejovou ionizací (ESI) v pozitivním módu. Separace se uskutečňuje na C18 kolonách, jako mobilní fáze se používá methanol a 0,01% kyselina octová s rychlostí toku 0,2 ml/min. v gradientovém módu. Kvantifikace probíhá v SIM módu (selektivní iontový monitoring). Vzorky jsou po extrakci koncentrovány pevnou-fázovou extrakcí (SPE). Detekční limity pro atrazin a diuron jsou 0,5 µg/kg.