Određivanje imidakloprida i njegovih metabolita u urinu ekstrakcijom na čvrstoj fazi i tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti

Mendelski, Monika

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka / Sveučilište u Rijeci**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:193:797479

Rights / Prava: Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 4.0 međunarodna

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Image not found or type unknown

Repository / Repozitorij:

Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository

zir.nsk.hr

UNIRI DIGITALNA KNJIŽNICA

Image not found or type unknown

SVEUČILIŠTE U RIJECI

ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU

Diplomski sveučilišni studij

Medicinska kemija

Monika Mendelski

Određivanje imidakloprida i njegovih metabolita u urinu ekstrakcijom na čvrstoj fazi i tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti

Diplomski rad

Rijeka, 2018. godine

SVEUČILIŠTE U RIJECI

ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU

Diplomski sveučilišni studij

Medicinska kemija

Monika Mendelski

Određivanje imidakloprida i njegovih metabolita u urinu ekstrakcijom na čvrstoj fazi i tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti

Diplomski rad

Rijeka, 2018. godine

Ovaj rad je izrađen u okviru projekta „Organska zagađivala u okolišu – markeri i biomarkeri toksičnosti, OPENTOX" financiranog sredstvima Hrvatske zaklade za znanost (IP-11-2013-8366) u Jedinici za biokemiju i organsku analitičku kemiju Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu pod vodstvom dr. sc. Gordane Mendaš Starčević i neposrednim vodstvom prof. dr. sc. Ane Lucić Vrdoljak.

Mentor rada: dr. sc. Gordana Mendaš Starčević
Komentor rada: prof. dr. Ana Lucić Vrdoljak

Diplomski rad obranjen je dana 28.09.2018.
pred povjerenstvom:

1. Izv. prof. dr. sc. Dean Marković

2. Prof. dr. sc. Jasminka Giacometti

3. Prof. dr. sc. Ana Lucić Vrdoljak

ZAHVALA

Veliku zahvalnost dugujem svojoj mentorici dr. sc. Gordani Mendaš Starčević na strpljenju, pomoći, vodstvu i izuzetnoj suradnji tijekom izrade rada. Također se zahvaljujem komentorici rada prof. dr. Ani Lucić Vrdoljak na ukazanoj prilici da diplomski rad izrađujem na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada. Zahvaljujem svima koji su svojim prijedlozima, savjetima i podrškom pridonijeli izradi ovog rada.

Ovim putem želim također zahvaliti i svim svojim prijateljima i kolegama što su svojim prisustvom uljepšali moje studentsko razdoblje.

Posebna zahvala ide mojim roditeljima koji su mi omogućili život i studiranje u drugom gradu. Hvala vam na bezuvjetnoj podršci koju ste mi pružili tijekom mog školovanja.

SAŽETAK

Pesticidi se koriste kao sredstva za zaštitu bilja i očuvanje zdravlja ljudi. Njihova nekontrolirana primjena uzrokovala je nakupljanje ostataka i razgradnih produkata u okolišu što negativno utječe na cijeli ekosustav i predstavlja zdravstveni rizik za ljude. Izloženost ljudi takvim tvarima prati se biološkim monitoringom. Biokemijski pokazatelji izloženosti pružaju informacije o vanjskoj / apsorbiranoj dozi, toksičnim učincima spoja te služe za procjenu rizika. Bitan preduvjet za to su pouzdani analitički postupci. Cilj rada bio je predložiti metodu za praćenje razina pesticida imidakloprida i njegovih metabolita, 6 – klornikotinske kiseline i imidakloprid ureje, u biološkom materijalu, urinu, tijekom dugotrajne izloženosti niskim dozama.

Ispitani su postupci akumuliranja tih spojeva iz uzoraka urina ekstrakcijom na čvrstoj fazi na sorbensima: poli(divinilbenzenu-co-N-vinilpirolidin) (Oasis HLB), stiren-divinilbenzenu (SDB-1) i stiren-divinilbenzenu u kombinaciji s oktadecilsilicijevim dioksidom (SDB/C_{18}). Priprava uzoraka optimirana je za konačnu analizu tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti uz UV detektor s nizom dioda.

Djelotvornosti akumuliranja imidakloprida i njegovih metabolita iz vode sa sorbensa Oasis HLB bile su u rasponu (98 – 104) %, na sorbensu SDB-1 (68 – 102) %, a na SDB/C_{18} (77 – 100) %. Akumuliranja spojeva iz urina na sorbensu Oasis HLB nije bilo moguće radi nemogućnosti uklanjanja interferirajućih sastojka iz matrice urina. Rezultati akumuliranja na SDB sorbensu ukazuju na njegovu nedovoljnu selektivnost.

Akumuliranje spojeva iz urina na stupcu (SDB/C_{18}), uz ispiranje sa 1 %-tnom smjesom metanola u deioniziranoj vodi i eluiranje 20 %-tnom smjesom diklormetana u acetonitrilu, pokazalo se kao najprikladniji postupak priprave uzorka za konačnu analizu tekućinskom kromatografijom. Djelotvornost ekstrakcije za imidakloprid i imidakloprid ureju je 95 % i 91 %, (R.S.D. 7 – 12 %). 6 – klornikotinsku kiselinu nije

moguće odrediti ekstrakcijom na SDB/C_{18} stupcu uz HPLC analizu. Osjetljivost određivanja za oba spoja bila je 20 ng/ml. Ekstrakcija imidakloprida i njegovog metabolita imidakloprid ureje iz urina na sorbensu SDB/C_{18} uz završnu HPLC – UV DAD analizu predložena je za primjenu pri procjeni izloženosti ljudi.

Ključne riječi: neonikotinoidi, imidakloprid, urin, ekstrakcija na čvrstoj fazi, HPLC

SUMMARY

Pesticides are used as a means to protect plants and preserve human health. Their uncontrolled use has caused the accumulation of residues and degradation products in the environment, which negatively affects the entire ecosystem and poses a health risk to humans. Human exposure to such substances is tracked by biological monitoring. Indicators of biochemical exposure provide information on the external/absorbed dose and the toxic effects of the compound and are used for risk assessments. The essential precondition for this are reliable analytical procedures. The aim of this thesis was to propose a method for monitoring pesticide levels of imidacloprid and its metabolites, 6-chloronicotinic acid and imidacloprid urea, in biological material, i.e. urine, during long-term exposure to low doses.

Procedures for accumulating these compounds from urine samples were studied using solid phase extraction on: poly(divinylbenzene-co-N-vinylpyrrolidone) (Oasis HLB), styrene-divinylbenzene (SDB-1) and octadecylsilic dioxide in combination with styrene-divinylbenzene (SDB/C_{18}). Sample preparation was optimized for final high-performance liquid chromatography with UV diode array detector analysis.

Extraction recoveries of imidacloprid and its metabolites from the Oasis HLB sorbent were within the range of (98 – 104) %, on SDB-1 (68 – 102) % and on SDB/C_{18} (77 – 100) %. Extraction of compounds from urine on Oasis HLB was not possible due to the inability to remove interfering polar matrices of urine. The results of extraction on SDB sorbent indicate its lack of selectivity.

The extraction of compounds from urine on column SDB/C_{18}, rinsing with a 1 % methanol in deionized water and eluting with a 20 % dichloromethane in acetonitrile, was shown to be the most suitable sample preparation procedure for final analysis using liquid chromatography. The

extraction efficiency for imidacloprid and imidacloprid urea was 95 % and 91 %, (R.S.D., 7 – 12 %). 6 – chloronicotinic acid cannot be determined by extraction on the SDB/C_{18} column coupled with HPLC analysis. The limit of detection for both compounds was 20 ng/ml. Extraction of imidacloprid and its metabolite imidacloprid urea from urine on SDB/C_{18} sorbent with final HPLC – UV DAD analysis is suggested for use in assessing human exposure to imidacloprid.

Key words: neonicotinoids, imidacloprid, urine, solid phase extraction, HPLC

Sadržaj

1. Uvod 1

1.1. Neonikotinoidi 3

1.1.1. Imidakloprid 4

1.2. Toksičnost imidakloprida i njegovih metabolita: 6 – klornikotinske kiseline i imidakloprid ureje 9

1.3. Detekcija i kvantifikacija neonikotinoidnih insekticida i njihovih metabolita 12

2. Cilj rada 16

3. Materijali i metode 17

3.1. Kemikalije 17

3.2. Instrumenti i pribor 18

3.3. Radni uvjeti tekućinskokromatografske analize 18

3.4. Priprema otopina 20

3.4.1. Priprema izvornih otopina 20

3.4.2. Priprema standardnih otopina 20

3.4.3. Priprema modelnih uzoraka urina 21

3.5. Akumuliranje imidakloprida, 6 – klornikotinske kiseline i imidakloprid ureje iz uzoraka vode i urina 22

3.5.1. Akumuliranje na stupcu poli(divinilbenzen-co-*N*-vinilpirolidona) Oasis HLB 22

3.5.2. Akumuliranje na stupcu stiren-divinilbenzena SDB 22

3.5.3. Akumuliranje na stupcu stiren-divinilbenzena/oktadecilsilicijevog dioksida SDB/C_{18} 23

4. Rezultati 24

4.1. Tekućinskokromatografsko određivanje imidakloprida, 6 – klornikotinske kiseline i imidakloprid ureje 24

4.2. Tekućinskokromatografsko određivanje imidakloprida, 6 – klornikotinske kiseline i imidakloprid ureje akumuliranih iz vode i urina ekstrakcijom na čvrstoj fazi..... 28

4.2.1. Određivanje imidakloprida, 6 – klornikotinske kiseline i imidakloprid ureje iz vode akumuliranjem na stupcu poli(divinilbenzen-co-*N*-vinilpirolidona) Oasis HLB 28

4.2.2. Određivanje imidakloprida, 6 – klornikotinske kiseline i imidakloprid ureje iz vode akumuliranjem na stupcu stiren-divinilbenzena SDB..... 30

4.2.3. Određivanje imidakloprida, 6 – klornikotinske kiseline i imidakloprid ureje akumuliranjem na stupcu stiren-divinilbenzena/oktadecilsilicijevog dioksida SDB/C_{18} 33

5. Rasprava..... 38

6. Zaključak 43

7. Literatura 45

8. Životopis 49

1. Uvod

Pesticidi su prirodne ili sintetske kemijske tvari koje se od davnina koriste u poljoprivredi kao sredstva za zaštitu bilja te u dezinsekciji radi očuvanja zdravlja ljudi. (1) Nekontrolirana i učestala primjena pesticida uzrokovala je prekomjerno nakupljanje ostataka pesticida i njihovih produkata razgradnje u hrani, vodi i tlu što predstavlja opasnost za ljudsko zdravlje i okoliš. Svi smo izloženi djelovanju pesticida putem okoliša, odnosno zagađene hrane, vode i zraka. Putevi unosa pesticida u organizam su kroz kožu (dermalno), hranom i vodom (ingestijom) te udisanjem tj. inhalacijom. Izloženost ljudi pesticidima u okolišu moguće je pratiti određivanjem masenih koncentracija/udjela pesticida u uzorcima iz okoliša, dok se stvarni unos pesticida u organizam ljudi prati biološkim monitoringom. (2) Dugotrajna izloženost niskim dozama putem onečišćenog okoliša i hrane povezana s nedovoljno poznatim utjecajem pesticida na ljudsko zdravlje dovela je do povećanog interesa za biološkim monitoringom. (3)

Biološki monitoring je definiran kao procjena izloženosti ljudi okolišnim kemikalijama određivanjem razina samih kemikalija, njihovih metabolita ili reakcijskih produkata u biološkom materijalu kao što su krv, urin ili tkivo. (2) Biokemijski pokazatelji izloženosti mogu pružiti informacije o vanjskoj dozi, apsorbiranoj dozi, toksičnim učincima pojedinog spoja te služe za procjenu rizika. Istraživanje biokemijskih pokazatelja izloženosti značajno pridonosi razumijevanju metabolizma i kinetike pesticida u organizmu te njihovih štetnih učinaka.

Posljednjih godina ulažu se veliki napori u postizanje održive uporabe pesticida kako bi se što više smanjio njihov štetni učinak na okoliš i zdravlje ljudi i životinja. Stoga su istraživanja novih spojeva s pesticidnim djelovanjem usmjerena na sintezu spojeva koji imaju minimalni toksični učinak na neciljane organizme, veliku selektivnost prema ciljanim vrstama

i niske doze primjene. Tako su neonikotinoidi sintetizirani kao alternativa konvencionalnim organofosfornim insekticidima. (1)

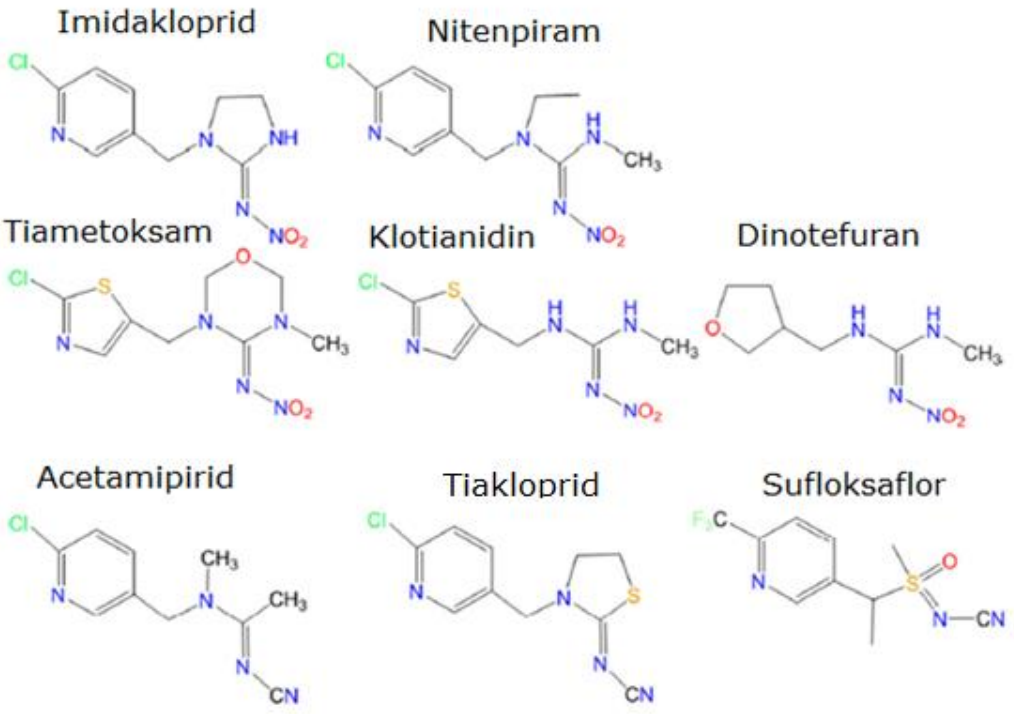
1.1. Neonikotinoidi

Od početka njihovog otkrića kasnih 1980-tih, neonikotinoidi su postali najrašireniji grupa insekticida u svijetu zbog njihove široke primjene u kućanstvima, poljoprivredi i komunalnoj higijeni.

Danas su, osim imidakloprida, prvog neonikotinoidnog insekticida, koji je na tržištu od 1991. godine dostupni i tiakloprid, klotianidin, tiametoksam, acetamipirid, nitenpiram, dinotefuran i sulfoksaflor prikazani na Slici 1.

Za razliku od konvencionalnih insekticida, koji inhibirajući enzim kolinesterazu djeluju na živčani sustav kako štetnika tako i ostalih životinja i ljudi, neonikotinoidni insekticidi djeluju selektivno na centralni živčani sustav kukaca na način da se vežu na nikotinske acetilkolinske receptore. U usporedbi s kukcima, afinitet za vezanje na nikotinske receptore u sisavaca je puno slabiji.

Neonikotinoidi spadaju u grupu sistemskih insekticida jer zbog svojih svojstava brzo ulaze i dopiru u sve dijelove biljke. (4) Nazivaju se još i 'kloronikotinili' radi kloridne skupine koja povećava njihovo insekticidno djelovanje. (5)



Slika 1. Imena i molekularne strukture sistemskih insekticida neonikotinoida. (4)

1.1.1. Imidakloprid

Imidakloprid [1 - (6-kloro-3-piridilmetil) – N – nitroimidazolidin – 2 - ilidenamin] je insekticid širokog spektra djelovanja koji se koristi za zaštitu sjemena, tla i lišća te u komunalnoj higijeni. U Hrvatskoj se imidakloprid sve više koristi u maslinicima za suzbijanje zemljišnih štetnika. (6)

Čisti imidakloprid je bijeli prah s vrelištem na 144 °C te niskom hlapljivosti. Slabo je topljiv u vodi za razliku od organskih otapala. (7) Ne akumulira se u masnom tkivu i ne prenosi kroz moždanu barijeru. To svojstvo određeno je njegovim hidrofilnim karakterom koji pokazuje niska vrijednost koeficijenta raspodjele (P_{OW}) koja iznosi 0,57. Tvari s koeficijentom log P_{OW} > 3 (ili log K_{OW} > 3) imaju tendenciju nakupljanja u

masnom tkivu. Fizikalno-kemijska svojstva imidakloprida nalaze se u Tablici 1. (1) (8)

Tablica 1. Fizikalno kemijska svojstva imidakloprida

	Imidakloprid	
Molekulska formula	$C_9H_{10}ClN_5O_2$	
Molarna masa	255,7 g/mol	
Agregatno stanje, boja	Čvrsto (prah), bijela	
Vrelište	144 °C	
Koeficijent raspodjele n – oktanol/voda	P_{OW}=3,7 Log P_{OW} 0,57 na 21°C	
Konstanta disocijacije	Slabo bazičan Protoniran; u nevodenim otopinama jaka kiselina	
Topljivost u vodi	610 mg/l na 20°C	
Topljivost u organskim otapalima (na 20°C, g/l)	n-heksan	<0,1
	toluen	0,69
	2-propanol	2,3
	Etil-acetat	6,7
	Acetonitril	50
	Aceton	50
	Diklormetan	67
	Dimetilformamid	>200
	dimetilsulfoksid	>200
Gustoća	1,41 g/cm3 na 20°C	
Hidroliza	Stabilan u puferiskim otopinama pri pH 5 i pH 7, u mraku na 25°C. Razgrađuje se pri pH 9 s vremenom poluraspada od oko 1 godine.	
Fotokemijska razgradnja	Vrijeme poluraspada 57 min	

Imidakloprid je sintetski derivat nikotina i djeluje preko kože ili probavnog sustava kao agonist nikotinskih acetilkolinskih receptora (nAChR) na način da izaziva stimulaciju postsinaptičkih membrana receptora i time prijenos impulsa. Enzim acetilkolinesteraza (AChE) ga ne razgrađuje što uzrokuje dugotrajnu stimulaciju receptora i posljedično prestanak prijenosa živčanih impulsa, oštećenje živčanog sustava te smrt štetnika. (1) (5) (6) (8)

Selektivnost imidakloprida bazira se na razlikama u građi nAChR insekata i sisavaca. Kod sisavaca, nAChR se sastoje od pet podjedinica: dvije α i tri β podjedinice kod živčanih nAChR, te α1, β1, γ, δ i ε podjedinice kod mišićnih nAChR. Kod insekata, nAChR su isključivo neuronskog tipa. Afinitet vezanja imidakloprida za Drosophilu je više od 550 puta veći nego za α4β2 podjedinicu kod sisavaca, tj 900 puta je toksičniji za muhu nego za miša. Razlog tome je što dio nAChR kod insekata ima kationske amino kiseline koje ulaze u reakciju sa negativnom nitro grupom imidakloprida, dok sisavci imaju anionske acetilkolinske receptora. (4) (6)

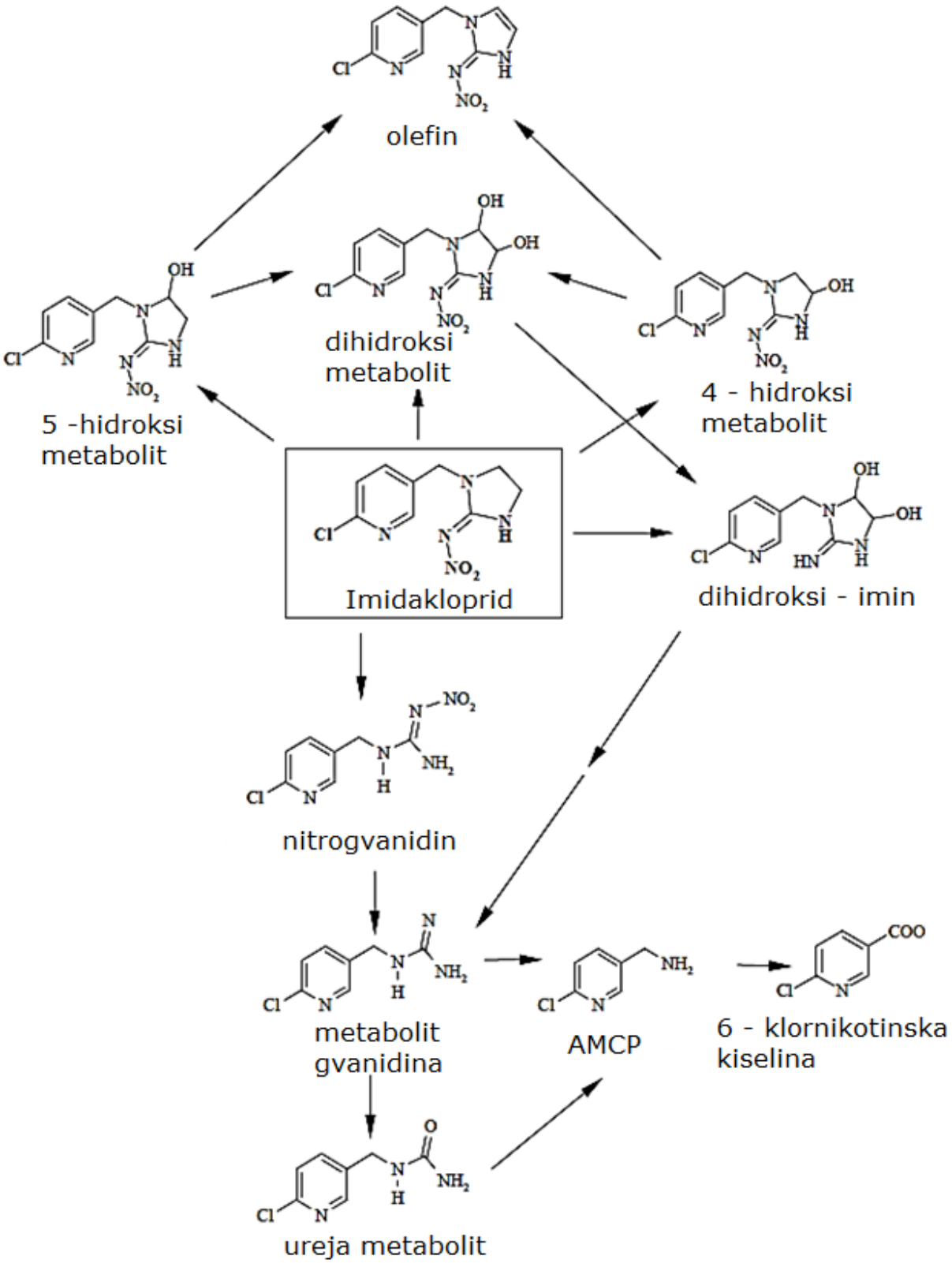
Nakon ulaska imidakloprida u organizam sisavaca, imidakloprid se u cijelosti apsorbira i distribuira u sve organe unutar jednog sata. Metabolizam se primarno odvija u jetri, te se kod sisavaca može svesti na dva glavna puta (Slika 2.).

Prvi metabolički put je oksidativno cijepanje do imidazolidina, koji se ne metabolizira dalje, i 6 – klornikotinske kiseline. Imidazolidni dio se izlučuje direktno putem urina, a nikotinski dio (6 – klornikotinska kiselina) se konjugira s glutationom do derivata merkapturne kiseline i metil – merkaptonikotinske kiseline i glicinom u hipurnu kiselinu koja se izlučuje urinom nepromijenjena ili kao ureja derivati koji nastaju u konjugaciji s gvanidinom.

Drugi put razgradnje je hidroksilacija imidazolidnog prstena nakon čega dolazi do eliminacije vode i nastanka nezasićenog metabolita.

Metabolički produkti drugog puta uključuju 5-hidroksi i olefin derivate. (1) (4) (5) (7) (8) (9) (10) (11)

Više od 90 % unesene doze izluči se iz organizma u roku od 24 sata, a izlučivanje završava nakon 48 sati (25 % fecesom, 75 % urinom) pri čemu se 5-hidroksi i olefin derivati izlučuju i fecesom i urinom, dok se 6 – klornikotinska kiselina i njeni konjugati izlučuju samo urinom. (8)



Slika 2. Metabolički put razgradnje imidakloprida kod sisavaca

Životni ciklus imidakloprida u okolišu se ponešto razlikuje od njegovog metabolizma kod sisavaca. Poluživot imidakloprida u tlu je do 124 dana gdje se razgrađuje u 6 – klornikotinsku kiselinu, imidakloprid ureju, olefin, gvanidin i nitro derivate. U vodi se imidakloprid razgrađuje hidrolizom i fotodegradacijom, a zajednički i najvažniji produkt razgradnje je imidakloprid ureja. Produkti metaboličke razgradnje kod biljaka uključuju urea derivate i 6 – klornikotinsku kiselinu. (4)

1.2. Toksičnost imidakloprida i njegovih metabolita: 6 – klornikotinske kiseline i imidakloprid ureje

Djelovanje toksičnih spojeva često se ispituje na štakorima, a rezultati tih ispitivanja služe i kao model ponašanja ispitivanih spojeva u organizmu sisavaca. Provedene su različite studije o karcinogenosti, genotoksičnosti i reproduktivnoj toksičnosti imidakloprida primjenjujući akutnu i kroničnu izloženost. (5)

Kronična oralna referentna doza (RfD) imidakloprida za ljude, tj doza kojoj ljudi mogu biti izloženi svaki dan do kraja života bez opasnosti po zdravlje, je 0,057 mg/kg t.t./dan prema studijima kronične toksičnosti i kancerogenosti na štakorima. Najviša doza koja ne uzrokuje štećenje (engl. *No Observable Adverse Effect Level*, NOAEL) je procijenjena na 5,7 mg/kg t.t./dan. (8)

Ispitivanja akutne toksičnosti na štakorima oralno tretiranim imidaklopridom pokazala su da je imidakloprid umjereno toksičan. Doza koja uzrokuje smrt u 50 % tretiranih životinja, letalna doza LD_{50}, u istraživanju koje su proveli Gervais et al procijenjena je na 450 mg/kg t.t. neovisno o spolu štakora. U istraživanju koje su proveli Broznić i Čedomila LD_{50} je bila 500 mg/kg t.t. za mužjake i 380 mg/kg t.t. za ženke. (6) (8) Simptomi kao što su tremor, poremećaji u hodanju i smanjena pokretljivost uočeni su 15 – 40 min nakon unosa imidakloprida, a unutar 8 do 24 sata

nakon tretmana dolazi do oporavka što je u skladu s podacima o metabolizmu imidakloprida. (5)

Kod akutne izloženosti dermalnim putem, imidakloprid je pokazao vrlo slabu toksičnost (LD_{50} > 5000 mg/kg t.t.), pri čemu nije došlo do iritacije kože. Toksičnost imidakloprida kod izloženosti putem dišnog sustava iznosi 5323 mg/m^3 za prašinu, dok je izuzetno toksičan u aerosolu, LC_{50} je 69 mg/m^3. (8) (9)

Kronična toksičnost ispitivana je na štakorima soja Wistar koji su primali imidakloprid putem hrane, 13 tjedana uzastopno u dozama od 14, 61 i 300 mg/kg t.t./dan (mužjaci) i 20, 83 i 422 mg/kg t.t./dan (ženke). Zabilježen je gubitak težine, oštećenje jetre i smanjenje funkcije zgrušavanja krvi i broja trombocita. NOAEL je procijenjena na 14 mg/kg t.t./dan. (5)

U novijoj studiji genotoksični utjecaj kronične izloženosti imidaklopridu, ispitivan je na zečevima tretiranim putem hrane dozama od 40 do 80 mg/kg t.t./dan, 4 uzastopna mjeseca. Akumuliranje imidakloprida i 6 – klornikotinske kiseline iz krvi, provedeno je ekstrakcijom tekuće – tekuće s diklormetanom a spojevi su analizirani tekućinskom kromatografijom uz spektrometar masa kao detektor. Parametri genotoksičnosti su ispitivani na limfocitima, a rezultati istraživanja potvrđuju genotoksični učinak imidakloprida. (12)

Ispitivanje toksičnosti na štakorima tretiranim imidaklopridom putem prašine aplicirane direktno u nos tijekom 4 tjedna u dozama od 5,5, 30,0 i 190,0 mg/m^3 uzrokovalo je gubitak težine, povećanu aktivnosti jetrenih enzima i produljenje vremena zgrušavanja krvi, dok je kod ženki uz sve navedeno došlo i do povećanje jetre i smanjenja broja trombocita. Na najnižoj koncentraciji nisu uočeni nikakvi efekti. (5) (8) (9)

Iako se smatralo da neonikotinoidi pokazuju malu toksičnost, postoji sve više studija koje pokazuju da neonikotinoidi djeluju toksično na imunosustav, reproduktivni i endokrini sustav neciljanih organizama. (13)

Zadnjih 15 godina intenzivno se istražuje utjecaj neonikotinoidnih pesticida na pčele (*Apis mellifera*) zbog drastičnog pada broja pčela u raznim dijelovima svijeta te izumiranja cijelih pčelinjih kolonija. (14) Imidakloprid se u pčelama metabolizira između ostalih i u 6 – klornikotinsku kiselinu i imidakloprid ureju za koje LD_{50} iznosi 3,7 - 40,9 te se smatraju visoko toksičnima za njih. (4) (8) (10)

Pčele i drugi insekti oprašivači izloženi su ostacima insekticida u peludu i nektaru. Mnogobrojne studije u kojima je određivana koncentracija imidakloprida u pčelama, peludi i medu ukazale su na štetnost imidakloprida po pčele i ostale kukce oprašivače. Smatra se da izloženost neonikotinoidnim insekticidima dovodi do poteškoća u komunikaciji i orijentaciji pčela, utječe na imuno sustav insekata te dovodi do skraćenja životnog vijeka pčela i na kraju do kolapsa pčelinjih zajednica. (15).

Zbog toga je Europska komisija 2013. godine ograničila uporabu neonikotinoida imidakloprida, tiametoksama i klotianidina, a 30. svibnja 2018. uporaba ta tri neonikotinoida na otvorenim prostorima je zabranjena. (16) (17)

1.3. Detekcija i kvantifikacija neonikotinoidnih insekticida i njihovih metabolita

Kako bi se pratila i dokazala izloženost ljudi i životinja pojedinim pesticidima, izvornim spojevima i njihovim metabolitima, oni se određuju u biološkom materijalu, najčešće urinu jer predstavlja najmanje invazivnu metodu. Osim u urinu mogu se određivati u svim tjelesnim tekućinama, kosi, majčinom mlijeku ili tkivima.

Pesticidi i njihovi metaboliti u biološkom materijalu prisutni su u najčešće niskim koncentracijama, stoga je njihovo određivanje izuzetno zahtjevno. Biološki materijal predstavlja kompleksni medij iz kojeg treba izdvojiti spojeve različitih kiselo-bazičnih svojstva što zahtijeva složenu pripravu uzoraka te osjetljive i selektivne metode završne analize s granicama detekcije nižim od 0,1 µg/l. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography,* HPLC) i plinska kromatografija uz selektivne i osjetljive detektore kao što su UV DAD ili spektrometar masa najčešće su korištene za analizu pesticida u urinu. (3)

Biološke tekućine pa i urin složene su smjese spojeva što zahtijeva primjenu analitičkih postupaka koji se sastoje od ekstrakcije spojeva prikladnim otapalom ili akumuliranja na odgovarajućem sorbensu, čišćenja ekstrakta od interferirajućih spojeva prije završne kvalitativne i kvantitativne analize. Bez obzira na nisku koncentraciju proteina u urinu, neki postupci uključuju i korak precipitacije proteina iz urina. (18)

Metoda ekstrakcije organskim otapalom se koristi kao rutinska metoda, međutim često je vrlo dugotrajna i zahtijeva upotrebu velike količine organskih otapala koje treba upariti što može dovesti do razgradnje i gubitka analita.

Ekstrakcija na čvrstoj fazi omogućuje korištenje manjih volumena i uzoraka organskih otapala, a često uključuje i korak pročišćavanja uzorka što omogućuje dobivanje čišćeg ekstrakta i u konačnici manje interferencija

u kromatogramu. Ova tehnika se lako automatizira što omogućuje veću ponovljivost. Odabirom odgovarajućeg sorbensa moguće je ekstrahirati više komponenata različitih fizičko – kemijskih svojstva npr. nepolaran izvorni spoj i njegov polarni metabolit.

Osim ekstrakcije na čvrstoj fazi, razvijene su i tehnike mikroekstrakcije na čvrstoj fazi (19) i ekstrakcija miješalom (engl, *stir bar sorptive extraction,* SBSE). (20) Te metode u vrlo skupe, imaju problema s prijenosom uzorka i smanjenjem performansi tijekom vremena, pa se stoga za ekstrakciju pesticidnih spojeva iz urina i dalje najviše koristi ekstrakcija na čvrstoj fazi. (3)

Taira i suradnici (21) razvili su metodu za određivanje neonikotinoidnih metabolita u urinu koja je uključivala pripravu uzoraka ekstrakcijom na stupcu polimernog sorbensa (Plexa, 30mg, 40 μm, Varian, Palo Alto, CA, SAD). Stupac je nakon propuštanja uzorka urina ispran vodom kako bi se uklonile nečistoće iz matrice uzorka, a zatim su imidakloprid i njegovi metaboliti eluirani acetonitrilom. Tako pripravljeni ekstrakti analizirani su tekućinskom kromatografijom uz spektrometar masa s analizatorom vremena leta (LC/Q TOF-MS). U sva 3 analizirana uzorka urina ljudi kod kojih se sumnjalo na subakutnu izloženost neonikotinoidima detektirani su metaboliti imidakloprida: 5–hidroksi-imidakloprid, dihidroksi-imidakloprid i olefin.

Radi usporedbe djelotvornosti istovremenog akumuliranja više od 200 polarnih i nepolarnih pesticida iz urina, uključujući imidakloprid, Cazorla – Reyes i suradnici (3) ispitali su stupce oktadecilsilicijevog dioksida, C_{18} (500 mg, Waters, Milford, MA, USA) i poli(divinilbenzen-co-*N*-vinilpirolidona), Oasis HLB (500 mg, Waters, Milford, MA, SAD). Osim različitih sorbensa, usporedili su i djelotvornost metanola i diklormetana kao otapala za eluiranje spojeva. Najveća djelotvornost je postignuta na stupcu C_{18} uz eluiranje diklormetanom i to za ekstrakte analizirane plinskom kromatografijom u rasponu od 61 % do 120 %, te 60 % do 125 % za ekstrakte analizirane tekućinskom kromatografijom uz spektrometar masa

kao detektor. Djelotvornost akumuliranja imidakloprida je bila od 81 % do 101 % uz granicu detekcije od 0,087 µg/l.

Uroz i suradnici (22) su predložili metodu ekstrakcije 6 – klornikotinske kiseline iz urina koristeći polistiren-divinilbenzenski sorbens Amberlite XAD-4 (Supelco, Bellefonte, PA, SAD). Prije eluiranja, sorbens je ispran s vodom i heksanom, a 6 – klornikotinska kiselina eluirana je dietileterom. Ekstrakt je analiziran plinskom kromatografijom uz spektrometar masa kao detektor. Djelotvornost akumuliranja 6 – klornikotinske kiseline iz urina je bila između 97 % i 102 %. Promatrane koncentracije u urinu bile su u rasponu od 10 ng/ml do 100 ng/ml uz granicu detekcije od 16 pg/ml.

Osim iz urina, neonikotinoidi se mogu detektirati i iz drugih bioloških materijala kao što je krv. Stivaktakis i suradnici (12) su pratili utjecaj kronične izloženosti zečeva imidaklopridu te njegov genotoksični učinak. Razvili su analitičku metodu kojom je moguće istovremeno određivanje imidakloprida i njegovog glavnog metabolita 6 – klornikotinske kiseline u krvi koristeći ekstrakciju otapalom, diklormetanom, uz analizu ekstrakta tekućinskom kromatografijom sa spektrometrom masa kao detektorom. Djelotvornost akumuliranja bila je 88 % za imidakloprid te 89 % za 6 – klornikotinsku kiselinu pri koncentracijama u urinu od 0,5 µg/ml do 50 µg/ml.

Faud Al-Rimawi (23) razvio je metodu određivanja pesticida, među kojima i imidakloprida, iz vode. Korištena je ekstrakcija tekuće – tekuće s n – heksanom za ekstrakciju imidakloprida iz vode, masene koncentracije u rasponu od 50 ppb do 1000 ppb, za analizu HPLC-om uz UV kao detektor. Djelotvornost akumuliranja je bila u rasponu od 99 % do 101 % uz granicu detekcije 0,1 ng/ml.

Tuzimski i suradnici su usporedili djelotvornost akumuliranja pesticida iz vode ovisno o tipu sorbensa i eluensu. Ispitana su četiri sorbensa različite polarnosti – C_{18}/SDB-1, C_{18}, C_{18} Polar Plus i CN, a kao eluensi korišteni su metanol, acetonitril i tetrahidrofuran. U uzorke vode (500 µl) dodani su

pesticidi u koncentraciji od 10 μg/l koja je karakteristična za uzorke vode iz okoliša. Djelotvornost akumuliranja pesticida iz vode bila je najmanja uz eluiranje metanolom, neovisno o sorbensu, a najveća uz eluiranje tetrahidrofuranom na svim sorbensima osim CN. (24)

Akoijam i suradnici (25) razvili su i validirali metodu za određivanje imidakloprida i njegovih metabolita iz tla. Koristeći QuEChERS (engl. *Quick-Easy-Cheap-Effective-Rugged-Safe*) metodu i sorbens koji sadrži primarne i sekundarne amine (PSA sorbent) ekstrahirali su imidakloprid i njegove metabolite iz tla. Ekstrakti su analizirani HPLC-om uz detektor s nizom dioda, a djelotvornost akumuliranje je bila u rasponu od 81 % do 99 % uz granicu detekcije od 0.01 μg/g.

Koristeći HPLC uz UV kao detektor Baskaran i suradnici (26) su razvili metodu određivanja imidakloprida u vodi i tlu. Imidakloprid je iz vode akumuliran koristeći stupac oktadecilsilicijevog dioksida, C_{18} (Alltech Associates) uz ekstrakciju sa metanolom, te ekstrakcijom tekuće – tekuće s acetonitrilom. Djelotvornost akumuliranja imidakloprida ekstrakcijom na čvrstoj fazi je bila od 82 % do 95 % uz granicu detekcije od 0.1 mg/l te se pokazala učinkovitija od ekstrakcije acetonitrilom.

2. Cilj rada

Biokemijski pokazatelji izloženosti mogu pružiti informacije o vanjskoj dozi, apsorbiranoj dozi, toksičnim učincima pojedinog spoja te služe za procjenu rizika. Istraživanje biokemijskih pokazatelja izloženosti značajno pridonosi razumijevanju metabolizma i kinetike pesticida u organizmu te njihovih štetnih učinaka. Bitan preduvjet za to su pouzdani analitički postupci. U sklopu ovog istraživanja analitički postupci biti će razrađeni na biološkom materijalu laboratorijskih životinja (urin).

Cilj ovog rada bio je predložiti metodu koja će biti primijenjena za praćenje razina pesticida imidakloprida i njegovih metabolita, 6 – klornikotinske kiseline i imidakloprid ureje, u biološkom materijalu, urinu, tijekom dugotrajne izloženosti niskim dozama.

Tijekom istraživanja ispitani su i uspoređeni različiti postupci akumuliranja tih spojeva iz uzoraka urina ekstrakcijom na čvrstoj fazi i to na sorbensima: stiren-divinilbenzenu u kombinaciji sa oktadecilsilicijevim dioksidom (SDB/C_{18}), stiren-divinilbenzenu (SDB-1) i poli(divinilbenzenu-co-N-vinilpirolidin) (Oasis HLB).

Priprava uzoraka optimirana je za konačnu analizu tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) uz UV detektor s nizom dioda (engl. *Diode Array Detector*, UV DAD).

Uvjeti ekstrakcije i konačne kvalitativne i kvantitativne analize uz koje je moguće djelotvorno i osjetljivo odrediti izvorni spoj i njegove metabolite istraženi su i optimirani analizom modelnih uzoraka urina pripravljenih dodatkom analita urinu neizloženih laboratorijskih životinja (štakora).

3. Materijali i metode

3.1. Kemikalije

Pesticidni spojevi:

- Imidakloprid (N-[1-[(6-kloro-3-piridil)metil]-4,5-dihidroimidazol-2-il]nitramid);
- 6 – klornikotinska kiselina (6-kloropiridin-3-karboksilna kiselina)
- Imidakloprid ureja (N-[1-[(6-kloro-3-piridil)metil]-4,5-dihidroimidazol-2-il]nitramid);

svi čistoće 99 %, Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Njemačka.

Sorbensi:

- stupac stiren-divinilbenzena (3 ml, 200 mg), Bakerbond spe, SDB *Disposable Extraction Columns*, J.T. Baker, Deventer, Nizozemska;
- stupac poli(divinilbenzen-co-*N*-vinilpirolidona) (6 ml, 200 mg), Oasis HLB *Extraction Cartridges*, Waters Associates, Milford, MA, SAD;
- stupac stiren-divinilbenzena/oktadecilsilicijevog dioksida (6 ml, 100 mg SDB/250 mg C_{18}), Bakerbond spe, SDB/C_{18} polar+ *Disposable Extraction Columns*, J.T. Baker, Deventer, Nizozemska.

Otapala:

- acetonitril, čistoće za HPLC, J.T. Baker, Deventer, Nizozemska;
- metanol, čistoće za HPLC, J.T. Baker, Deventer, Nizozemska;
- diklormetan, za plinsku kromatografiju, SupraSolv, E. Merck, Darmstadt, Njemačka;
- etilacetat, za tekućinsku kromatografiju, LiChrosolv, E. Merck, Darmstadt, Njemačka;
- deionizirana voda pripravljena primjenom sustava Milli-Q za pročišćavanje vode, Millipore, Bedford, MA, SAD.

Ostalo:

- mravlja kiselina, 98-100%, p.a., Kemika, Zagreb.

3.2. Instrumenti i pribor

- tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti sastavljen od pumpe ProStar 230 SDM, UV detektora s nizom fotodioda (engl. *Diode-Array Detector,* UV-DAD) Prostar 330 i automatskog uzorkivača Autosampler 410, sve Varian, Walnut Creek, CA, SAD;
- kromatografska kolona Gemini C_{18} (250 mm x 4.6 mm) s predkolonom Gemini C_{18} (4 mm x 3 mm), obje veličine čestica 5 μm, Phenomenex, Torrance, CA, SAD;
- ultrazvučna kupelj, Elmasonic S 60, Elma, Singen, Njemačka;
- PTFE-filtri, veličina pora 0,2 μm, Acrodisc CR13, Waters Associates, Milford, MA, SAD;
- digitalni pH-metar, Mettler Toledo, Seven Multi ™, Schwerzenbach, Švicarska;
- analitička vaga, Mettler H20T, Greifenssee/Zürich, Švicarska;
- pipete, EPPENDORF ep T.I.P.S., Hamburg, Njemačka;
- mikroštrcaljke 50 i 100 μl, Hamilton, Reno, SAD.

3.3. Radni uvjeti tekućinskokromatografske analize

- pokretne faze: acetonitril (A) i 0,5% mravlje kiseline u vodi (B)
- način eluiranja: linearni gradijent
- protok pokretne faze: 1 ml/min
- volumen injektiranog uzorka: 100 μl
- radne valne duljine: 270 nm i 230 nm

vrijeme/min	sastav pokretne faze	
	φ/%	
	A	B
0 – 4	10	90
5 – 10	10 → 25	90 → 75
11 – 22	25 → 40	75 → 60
23 – 30	40 → 70	60 → 30

3.4. Priprema otopina

3.4.1. Priprema izvornih otopina

Izvorne otopine imidakloprida, 6 – klornikotinske kiseline i imidakloprid ureje pripravljene su otapanjem čistog spoja u acetonitrilu. Masene koncentracije spojeva u izvornim otopinama prikazane su u Tablici 2.

Tablica 2. Masene koncentracije spojeva u izvornim otopinama

Spoj	**Masena koncentracija mg/ml**
Imidakloprid	0,9563
6 – klornikotinska kiselina	0,8445
Imidakloprid ureja	0,6593

3.4.2. Priprema standardnih otopina

Standardna otopina smjese spojeva (Smjesa 0) pripravljena je pipetiranjem određenog volumena izvornih otopina i razrjeđivanjem s deioniziranom vodom. Standardne otopine spojeve za analizu tekućinskom kromatografijom (Standard 1 – 5) pripravljene su razrjeđivanjem određenog volumena Smjese 0 s deioniziranom vodom. Masene koncentracije spojeva u standardnim otopinama prikazane su u Tablici 3.

Tablica 3. Masene koncentracije spojeva u standardnim otopinama

Spoj	Smjesa 0 µg/ml	ST1 µg/ml	ST2 µg/ml	ST3 µg/ml	ST4 µg/ml	ST5 µg/ml
Imidakloprid	11,954	0,036	0,120	0,359	0,717	1,195
6 – klornikotinska kiselina	11,823	0,036	0,118	0,355	0,709	1,182
Imidakloprid ureja	11,867	0,036	0,119	0,356	0,712	1,187

3.4.3. Priprema modelnih uzoraka urina

Modelni uzorci urina poznatih masenih koncentracija imidakloprida i njegovih metabolita 6 – klornikotinske kiseline i imidakloprid ureje pripravljeni su dodatkom određenog volumena vodene otopine smjese tih spojeva (Smjesa 0) urinu netretiranih štakora (Tablica 4.). Smjesa 0 pripravljena je prema prethodno opisanom postupku (3.4.2.).

Tablica 4. Masene koncentracije spojeva u modelnim uzorcima urina

Spoj	Smjesa 0 µg/ml	Uzorak 1 µg/ml	Uzorak 2 µg/ml	Uzorak 3 µg/ml
Imidakloprid	11,954	0,996	5,977	11,954
6 – klornikotinska kiselina	11,823	0,985	5,911	11,823
Imidakloprid ureja	11,867	0,989	5,933	11,867

3.5. Akumuliranje imidakloprida, 6 – klornikotinske kiseline i imidakloprid ureje iz uzoraka vode i urina

3.5.1. Akumuliranje na stupcu poli(divinilbenzen-co-*N*-vinilpirolidona) Oasis HLB

Stupac Oasis HLB aktiviran je propuštanjem 5 ml metanola i 5 ml deionizirane vode. Nakon aktiviranja na stupac je direktno naneseno 100 µl smjese 0 ili 2 ml modelnog uzorka urina. Akumulirani spojevi eluirani su sa stupca s 10 ml metanola. Navedeni postupci provedeni su uz primjenu pozitivnog tlaka zraka uz protok 2 – 5 ml/min. Eluat je uparen do suha u struji dušika i otopljen u 1 ml 10 %-tne otopine acetonitrila u deioniziranoj vodi.

Slijepi uzorci napravljeni su istim postupkom kao i uzorci ali bez dodatka analita.

3.5.2. Akumuliranje na stupcu stiren-divinilbenzena SDB

Stupac SDB aktiviran je propuštanjem 10 ml acetonitrila i 10 ml deionizirane vode. Nakon aktiviranja na stupac je direktno naneseno 100 µl smjese 0 ili 2 ml modelnog uzorka urina koji je zatim ispran sa 10 ml 1 %-tne otopine metanola u deioniziranoj vodi. Akumulirani spojevi eluirani su sa stupca s 10 ml acetonitrila. Navedeni postupci provedeni su uz primjenu pozitivnog tlaka zraka uz protok 2 – 5 ml/min. Eluat je uparen do suha u struji dušika i otopljen u 1 ml 10 %-tne otopine acetonitrila u deioniziranoj vodi.

Slijepi uzorci napravljeni su istim postupkom kao i uzorci ali bez dodatka analita.

3.5.3. Akumuliranje na stupcu stiren-divinilbenzena/oktadecilsilicijevog dioksida SDB/C_{18}

Stupac SDB/C_{18} aktiviran je propuštanjem 5 ml diklormetana, 5 ml acetonitrila i 5 ml deionizirane vode. Nakon aktiviranja na stupac je direktno naneseno 100 µl Smjese 0 ili 2 ml modelnog uzorka urina koji je zatim ispran sa 10 ml 1 %-tne otopine metanola u deioniziranoj vodi. Akumulirani spojevi eluirani su sa stupca s 10 ml 20 %-tne otopine diklormetana u acetonitrilu. Navedeni postupci provedeni su uz primjenu pozitivnog tlaka zraka uz protok 2 – 5 ml/min. Eluat je uparen do suha u struji dušika i otopljen u 1 ml 10 %-tne otopine acetonitrila u deioniziranoj vodi.

Slijepi uzorci napravljeni su istim postupkom kao i uzorci ali bez dodatka analita.

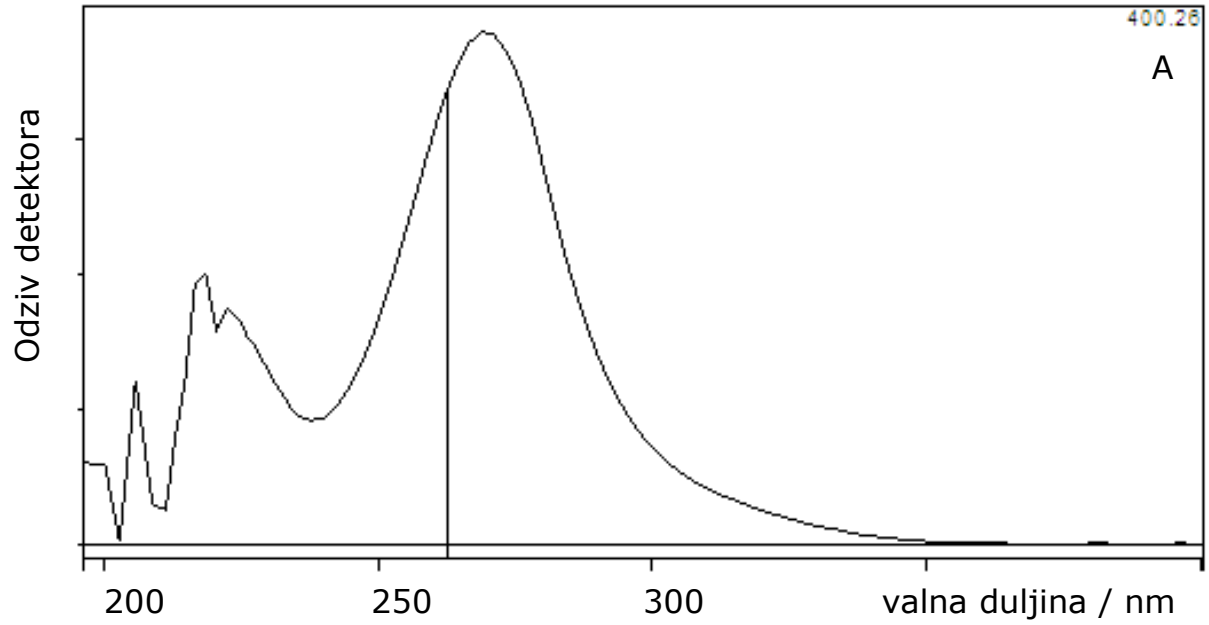
Ekstrakti urina za pripravu standardnih otopina za analizu tekućinskom kromatografijom pripravljene su na prethodno opisani način. Masene koncentracije spojeva u standardnim otopinama pripravljenim u ekstraktu urina odgovaraju onima pripravljenim u vodi i prikazane su u Tablici 3.

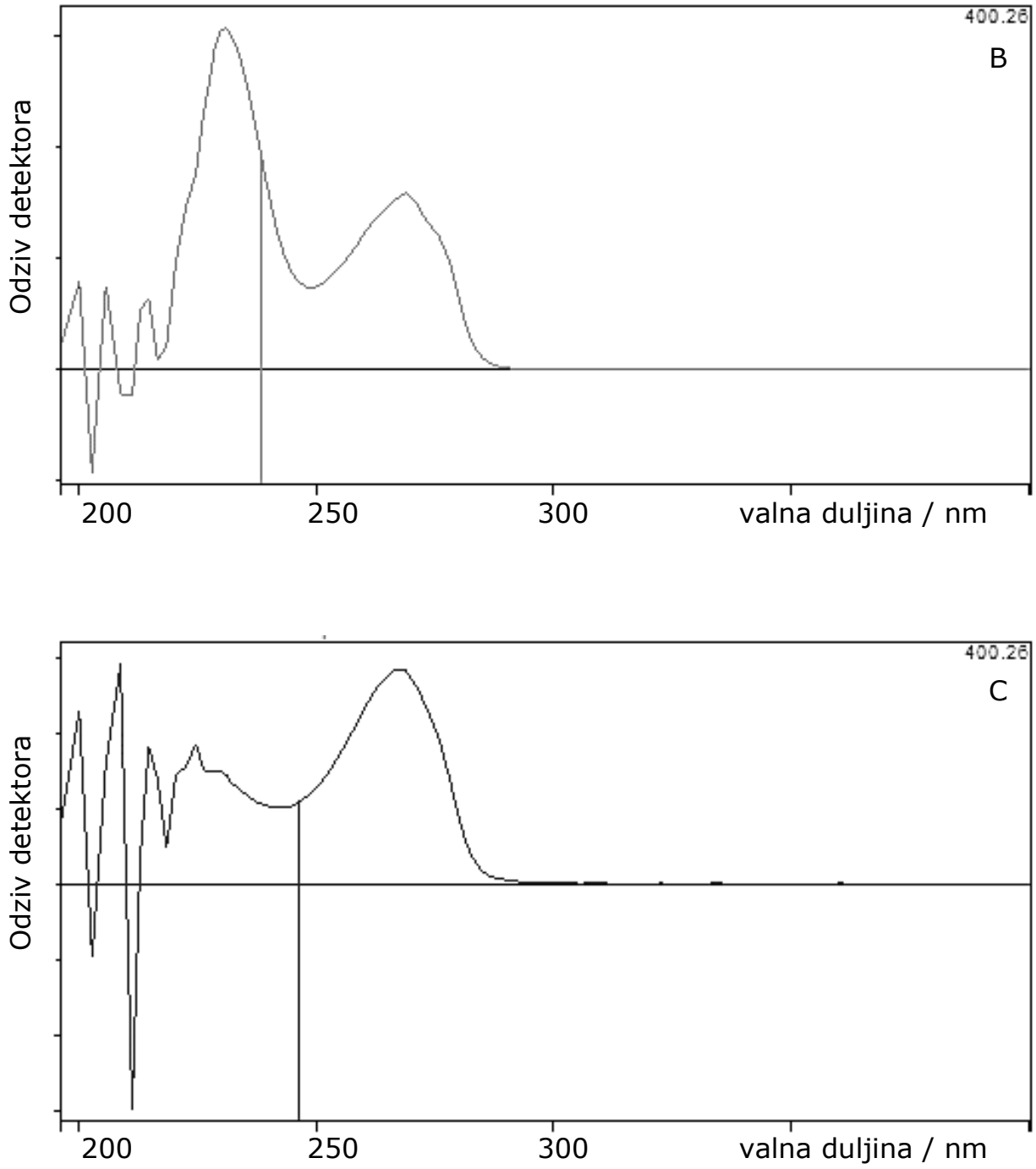
4. Rezultati

4.1. Tekućinskokromatografsko određivanje imidakloprida, 6 – klornikotinske kiseline i imidakloprid ureje

Razrada analitičkog postupka za određivanje imidakloprida, 6 – klornikotinske kiseline i imidakloprid ureje uključivala je optimiziranje uvjeta tekućinskokromatografske analize uz koje je moguće djelotvorno razdvojiti sve analizirane spojeve, određivanje linearnosti odziva detektora i granica detekcije pojedinih spojeva.

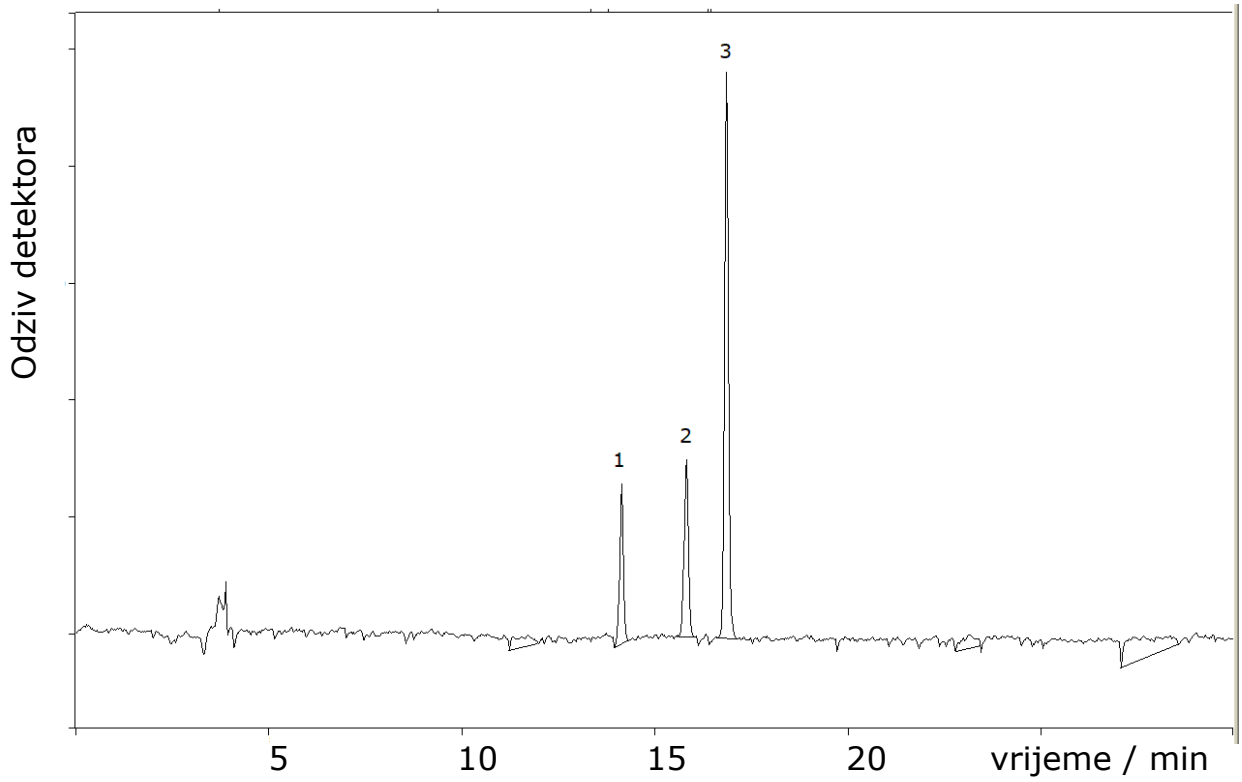
Snimanjem UV spektara imidakloprida i njegovih metabolita otopljenih u vodi odabrane su radne valne duljine apsorpcijskih maksimuma pogodne za njihovo određivanje: 270 nm kao apsorpcijski maksimum imidakloprida i imidakloprid ureje te 230 nm kao apsorpcijski maksimum 6 – klornikotinske kiseline. UV spektri analiziranih spojeva prikazani su na Slici 3.





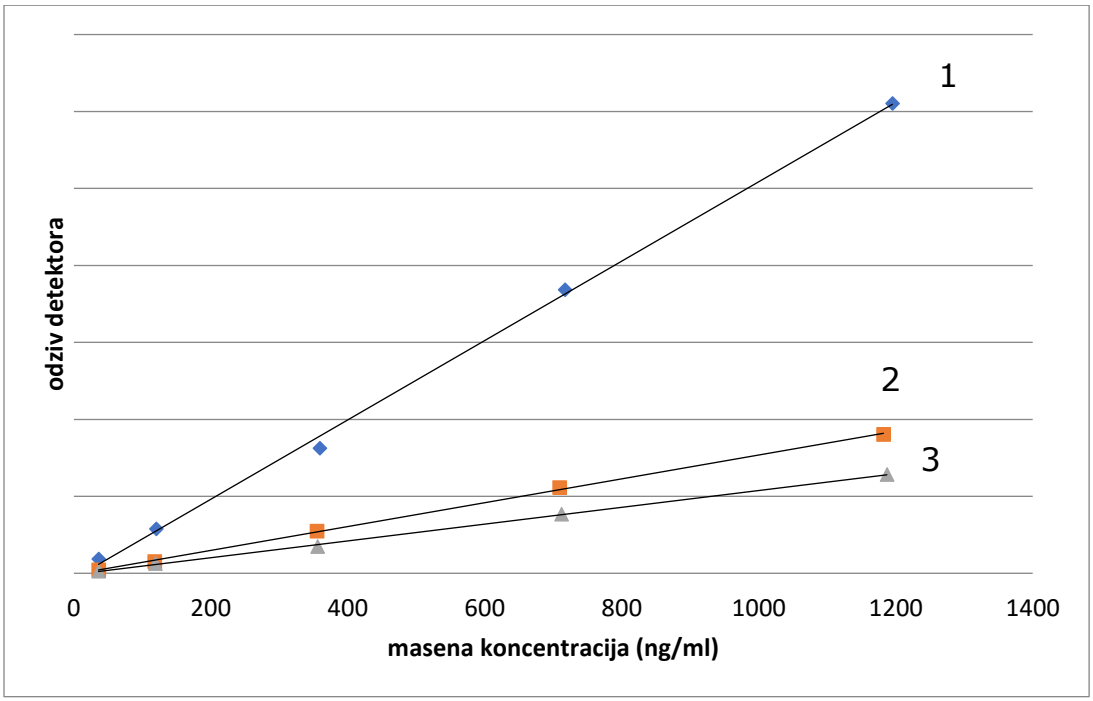
Slika 3. UV spektri A) imidakloprida (λmax = 269,49 nm), B) 6 – klornikotinske kiseline (λmax = 231,48 nm) i C) imidakloprid ureje (λmax = 267,51 nm)

Primjenom gradijentnog eluiranja s acetonitrilom i 0,5 %-tnom otopinom mravlje kiseline u vodi na koloni Gemini C_{18} postignuto je dobro razdvajanje svih promatranih spojeva. Kromatogram standardne smjese u vodi u rasponu koncentracija od 0,709 µg/ml do 0,717 µg/ml, pri valnoj duljini od 270 nm, prikazan je na Slici 4.



Slika 4. HPLC – UV DAD kromatogram standardne smjese: 1) imidakloprid ureje, 2) 6 – klornikotinske kiseline i 3) imidakloprida u deioniziranoj vodi pri 270 nm; masene koncentracije spojeva su od 0,709 µg/ml do 0,717 µg/ml.

Linearnost odziva detektora određena je analizom standardnih smjesa imidakloprida, 6 – klornikotinske kiseline i imidakloprid ureje u vodi uz uvjete opisane u poglavlju 3.2.1. Regresijska analiza kromatografskih podataka ukazuje na linearnost odziva detektora u rasponu masenih koncentracija pojedinih spojeva od 0,036 µg/ml do 1,195 µg/ml uz koeficijente korelacije veće od 0,99 (Slika 5.).



Slika 5. Baždarni pravci ovisnosti odziva detektora o masenoj koncentraciji 1) imidakloprida, 2) 6 – klornikotinske kiseline i 3) imidakloprid ureje u deioniziranoj vodi.

Granice detekcije analiziranih spojeva određene su analizom standardnih otopina u vodi temeljem omjera visine pika analiziranog spoja i šuma osnovne linije 3:1 i bile su 10 ng/ml, dok su za analizu standarda u urinu iznosile 20 ng/ml.

4.2. Tekućinskokromatografsko određivanje imidakloprida, 6 – klornikotinske kiseline i imidakloprid ureje akumuliranih iz vode i urina ekstrakcijom na čvrstoj fazi

4.2.1. Određivanje imidakloprida, 6 – klornikotinske kiseline i imidakloprid ureje iz vode akumuliranjem na stupcu poli(divinilbenzen-co-*N*-vinilpirolidona) Oasis HLB

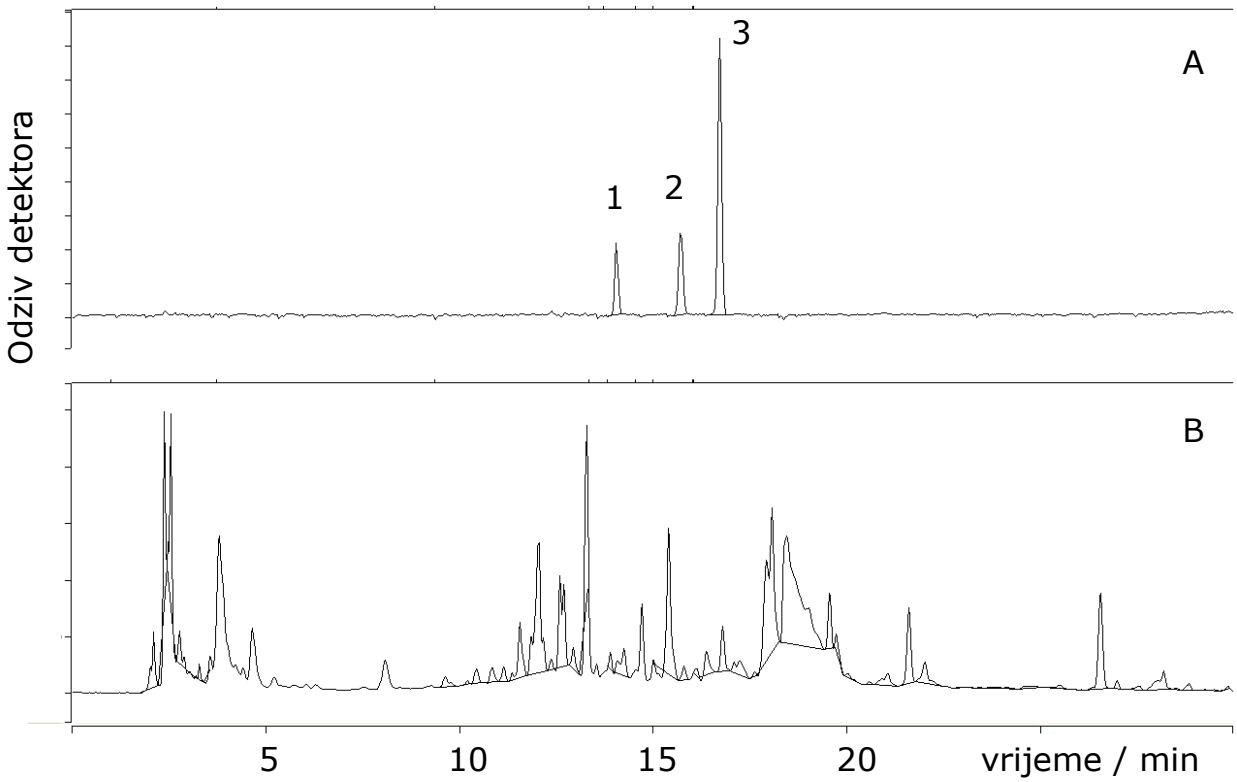
Sposobnost sorbensa Oasis HLB za djelotvornim akumuliranjem imidakloprida i njegovih metabolita ispitana je propuštanjem 100 µl Smjese 0 kroz prethodno aktiviran stupac uz eluiranje s 10 ml metanola. Dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 5.

Tablica 5. Djelotvornost akumuliranja imidakloprida, 6 – klornikotinske kiseline i imidakloprid ureje iz Smjese 0 na stupcu Oasis HLB.

Spoj	Masena koncentracija µg/ml	Djelotvornost akumuliranja[a] % (N)
Imidakloprid	1,1954	104 ± 3 (5)
6 – klornikotinska kiselina	1,1823	101 ± 5 (5)
Imidakloprid ureja	1,1867	98 ± 4 (5)

[a]aritmetička sredina i standardna devijacija; broj analiziranih uzoraka (N)

Isti postupak primijenjen je za ekstrakciju imidakloprida i njegovih metabolita iz 2 ml modelog uzorka urina u kojem je masena koncentracija navedenih spojeva bila 1,1823 µg/ml do 1,1954 µg/ml (Tablica 4.). Tekućinskokromatografskom analizom ekstrakta urina dobiven je kromatogram prikazan na Slici 6.

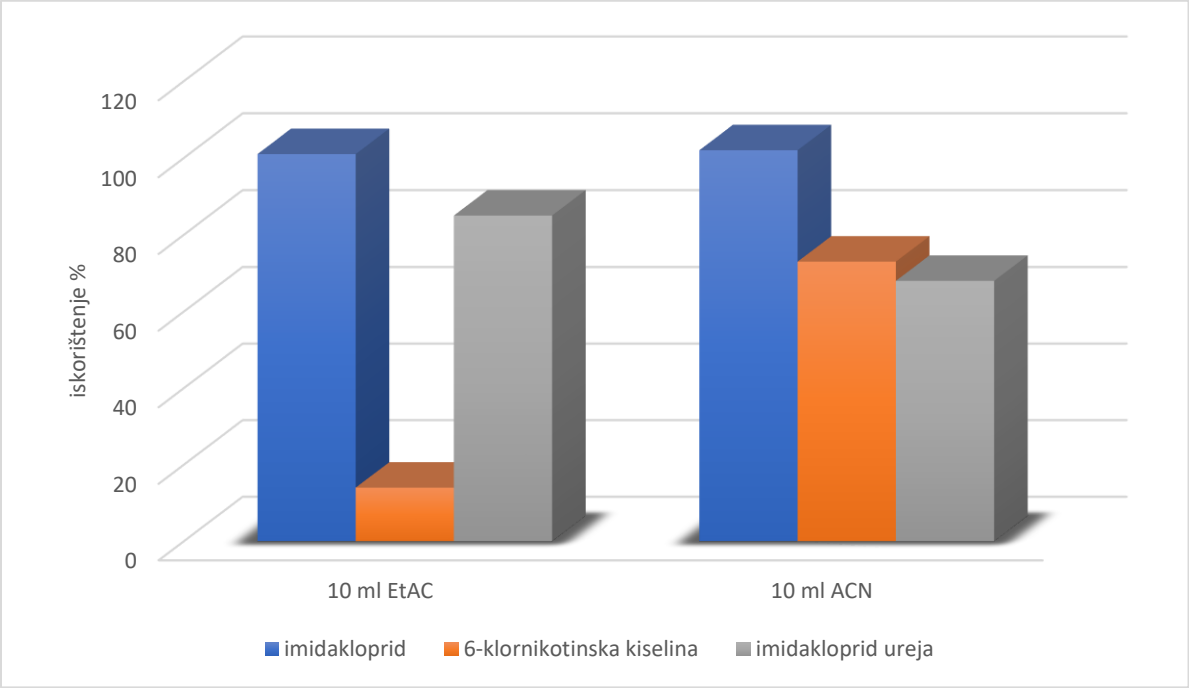


Slika 6. HPLC – UV DAD kromatogram smjese: 1) imidakloprid ureje, 2) 6 - klornikotinske kiseline i 3) imidakloprida pri 270 nm; akumuliranih na stupcu Oasis HLB: A) iz standardne smjese u vodi; B) 2 ml ekstrakta urina. Masene koncentracije spojeva su od 1,182 μg/ml do 1,195 μg/ml.

4.2.2. Određivanje imidakloprida, 6 – klornikotinske kiseline i imidakloprid ureje iz vode akumuliranjem na stupcu stiren-divinilbenzena SDB

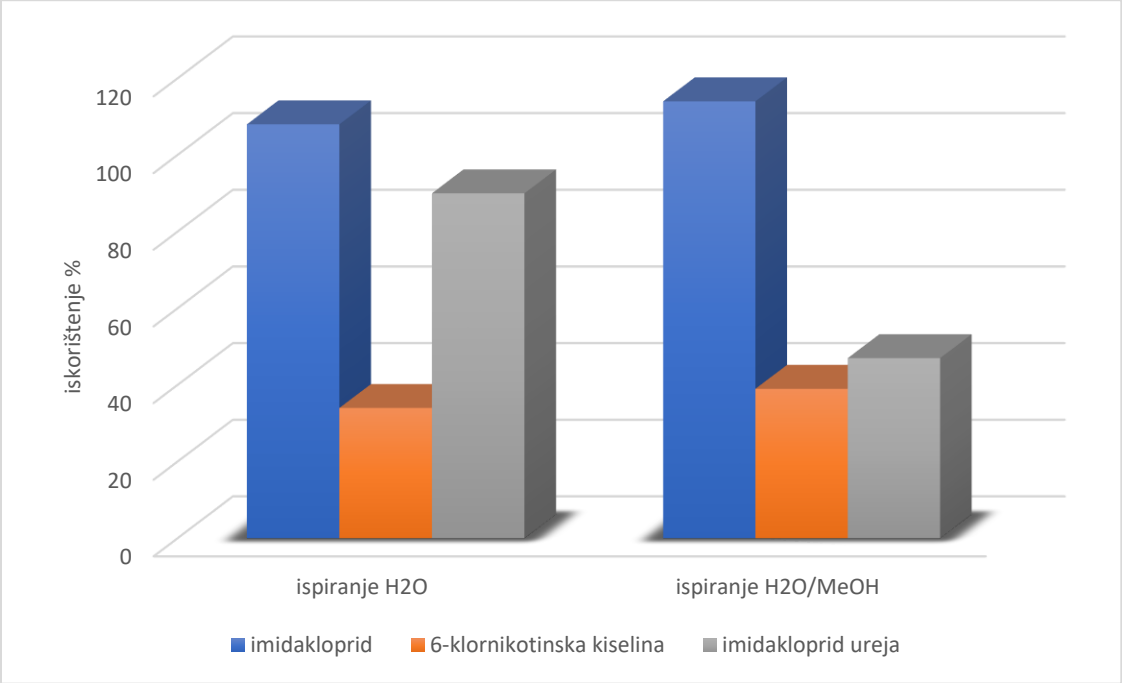
Prikladnost SDB sorbensa za djelotvorno akumuliranje imidakloprida i njegovih metabolita ispitana je direktnim nanošenjem 100 µl Smjese 0 na prethodno aktivirani stupac.

Kroz prethodno aktivirani stupac SDB propušteno je 100 µl Smjese 0. Spojevi su sa sorbensa eluirani s 10 ml acetonitrila ili s 10 ml etilacetata. Slijedeći rezultate prikazane na Slici 7., spojevi akumulirani propuštanjem modelnog uzorka urina eluirani su s 10 ml acetonitrila.



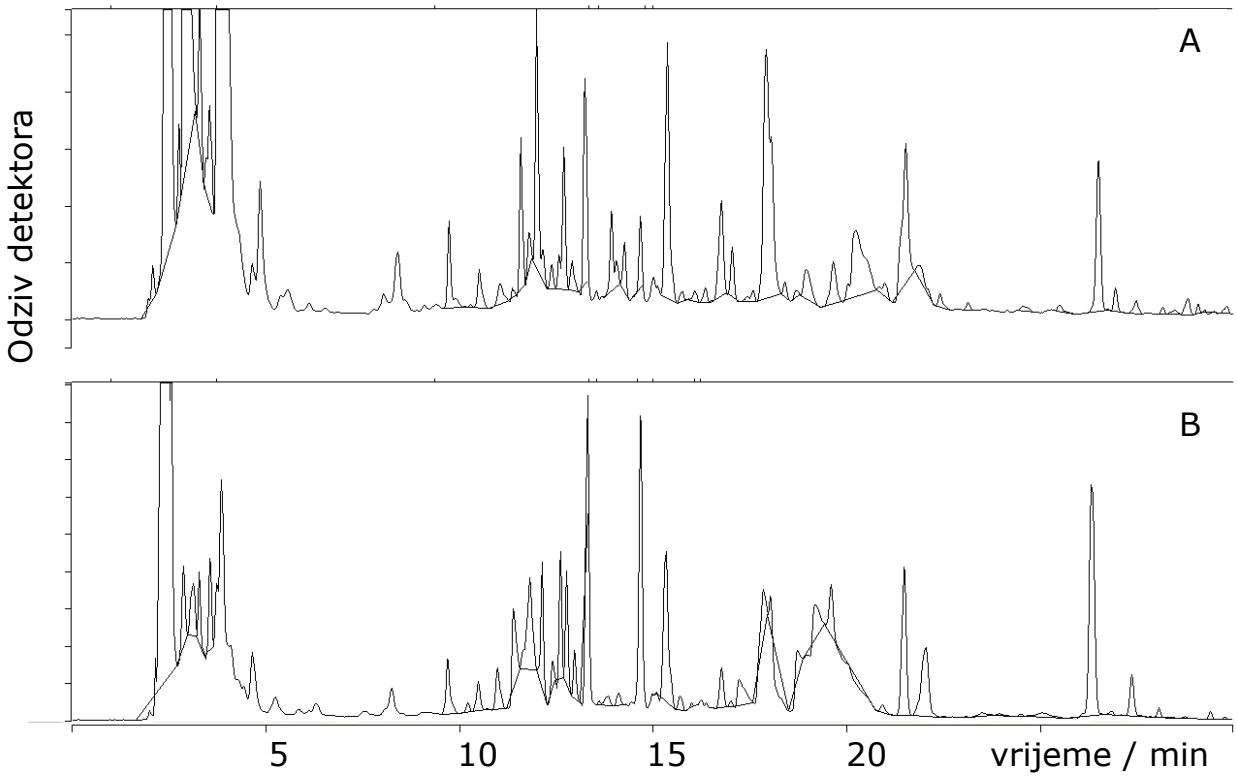
Slika 7. Utjecaj eluensa etilacetata (EtAc) i acetonitrila (ACN) na djelotvornost ekstrakcije imidakloprida i metabolita iz vode na sorbensu SDB. Masena koncentracija pojedinih spojeva u vodi: imidakloprid 1,1954 µg/ml; 6 – klornikotinska kiselina 1,1823 µg/ml; imidakloprid ureja 1,1867 µg/ml.

Da bi se uklonili interferirajući sastojci iz urina koji otežavaju kromatografsko određivanje, istražena je i mogućnost ispiranja stupca vodom ili smjesom metanola i vode prije eluiranja analita. Preliminarna ispitivanja provedena su propuštanjem 100 µl Smjese 0 kroz sorbens koji je zatim ispran s 10 ml deionizirane vode ili 10 ml 1 %-tne otopine metanola u deioniziranoj vodi. Dobiveni rezultati prikazani su na Slici 8.



Slika 8. Ovisnost djelotvornosti ekstrakcije imidakloprida i njegovih metabolita iz vode o postupku ispiranja sorbensa SDB sa deioniziranom vodom (H_2O) i 1 %-tnom otopinom metanola u deioniziranoj vodi (H_2O/MeOH) prije eluiranja analita acetonitrilom.

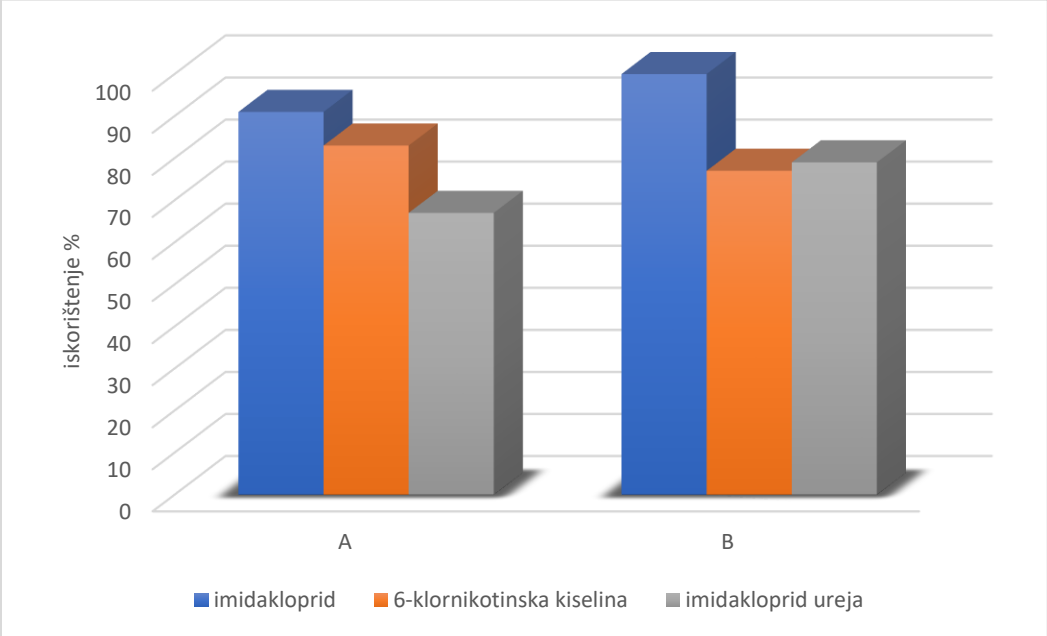
Isti postupak ispiranja sorbensa primijenjen je pri ekstrakciji imidakloprida i njegovih metabolita iz modelnih uzoraka urina. Kromatogrami tako pripravljenih ekstrakata prikazani su na Slici 9.



Slika 9. HPLC – UV DAD kromatogram imidakloprida, 6 – klornikotinske kiseline i imidakloprid ureje pri 270 nm, akumuliranih na stupcu SDB iz 2 ml urina uz ispiranje sorbensa prije eluiranja acetonitrilom s: A) 10 ml deionizirane vode; B) 10 ml smjese metanol/voda. Masene koncentracije spojeva su od 1,182 μg/ml do 1,195 μg/ml.

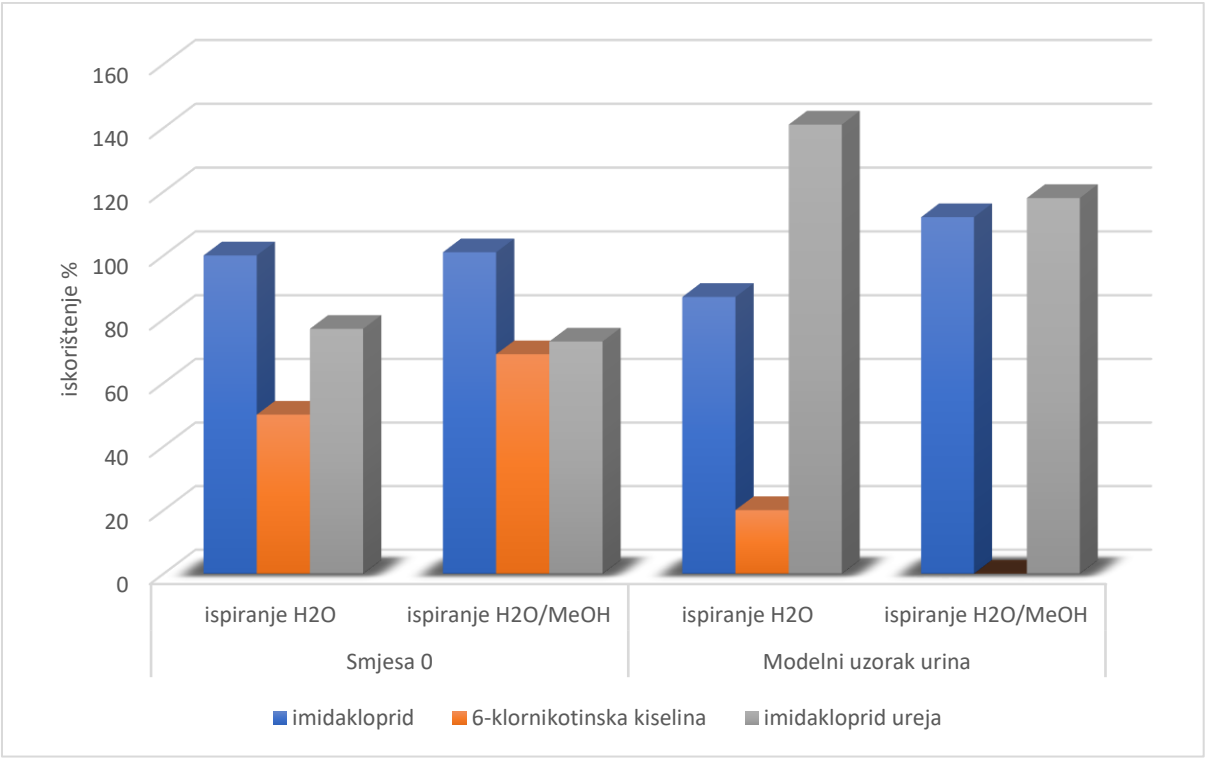
4.2.3. Određivanje imidakloprida, 6 – klornikotinske kiseline i imidakloprid ureje akumuliranjem na stupcu stiren-divinilbenzena/oktadecilsilicijevog dioksida SDB/C_{18}

Preliminarna ispitivanja djelotvornosti akumuliranja imidakloprida i njegovih metabolita na sorbensu SDB/C_{18} provedena su propuštanjem 100 µl Smjese 0 kroz prethodno aktivirani stupac. Uspoređena je djelotvornost ispiranje analita sa sorbensa uz eluense acetonitril i etilacetat (Slika 10.).



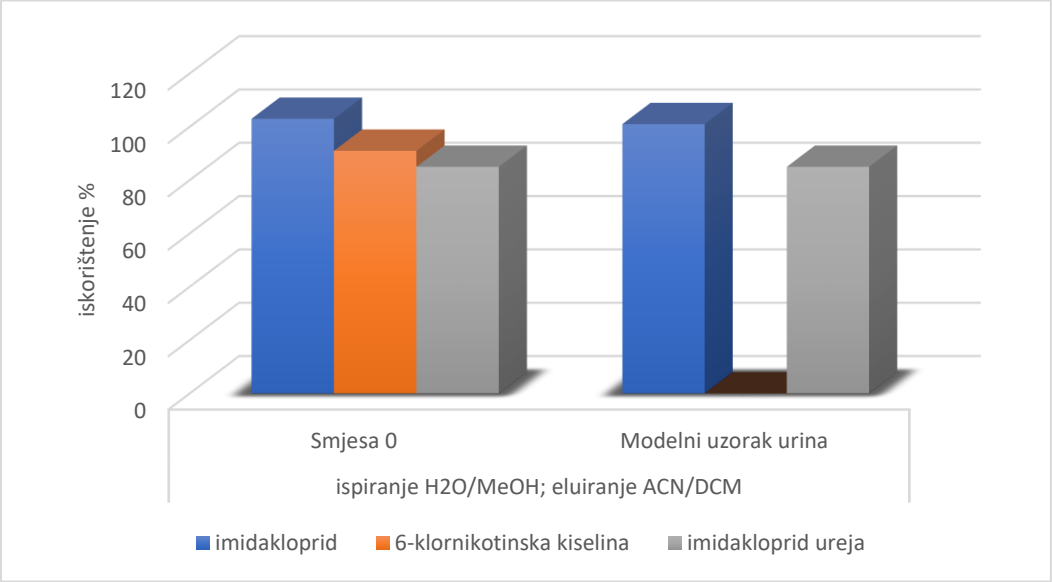
Slika 10. Utjecaj eluensa: A) 10 ml acetonitrila i 5 ml etilacetata i B) 10 ml etilacetata i 10 ml acetonitrila na djelotvornost ekstrakcije imidakloprida i metabolita iz vode na sorbensu SDB/C_{18}; Masena koncentracija pojedinih spojeva u vodi: imidakloprid 1,1954 µg/ml; 6 – klornikotinska kiselina 1,1823 µg/ml; imidakloprid ureja 1,1867 µg/ml.

Kako bi se uklonili interferirajući sastojci iz matrice urina koji otežavaju kromatografsko određivanje analita, ispitana je mogućnost ispiranja stupca vodom ili smjesom metanola i vode prije eluiranja analita. Preliminarna ispitivanja provedena su propuštanjem 100 µl Smjese 0 kroz sorbens koji je zatim ispran s 10 ml deionizirane vode ili 10 ml 1 %-tne otopine metanola u deioniziranoj vodi. Isti postupak ispiranja i eluiranja analita proveden je na modelnim uzorcima urina, a dobiveni rezultati prikazani su na Slici 11.



Slika 11. Ovisnost djelotvornosti ekstrakcije imidakloprida i metabolita iz vode i urina o postupku ispiranja sorbensa SDB/C_{18} sa deioniziranom vodom (H2O) ili 1 %-tnom otopinom metanola u deioniziranoj vodi (H2O/MeOH) prije eluiranja analita etilacetatom i acetonitrilom.

Ispitano je eluiranje analita s 20 %-tnom otopinom diklormetana u acetonitrilu nakon ispiranja sa 1 %-tnom otopinom metanola u deioniziranoj vodi i to na uzorku vode (100 µl Smjese 0) i modelnom uzorku urina. Dobiveni rezultati prikazani su na Slici 12.



Slika 12. Utjecaj eluensa 20 %-tne otopine diklormetana u acetonitrilu (ACN/DCM) nakon ispiranja sa 1 %-tnom otopinom metanola u deioniziranoj vodi (H_2O/MeOH) na djelotvornost ekstrakcije imidakloprida i metabolita iz vode i urina na sorbensu SDB/C_{18}; Masena koncentracija pojedinih spojeva u vodi i urinu: imidakloprid 1,1954 µg/ml; 6 – klornikotinska kiselina 1,1823 µg/ml; imidakloprid ureja 1,1867 µg/ml.

Kako bismo ispitali utjecaj matrice uzorka na odziv UV DAD detektora, pripravljene su standardne smjese imidakloprida, 6 – klornikotinske kiseline i imidakloprid ureje u ekstraktu urina. Tako dobiveni kalibracijski pravci uspoređeni su s kalibracijskim pravcima dobivenim analizom standardnih smjesa imidakloprida, 6 – klornikotinske kiseline i imidakloprid ureje u vodi. Regresijskom analizom dobivene su jednadžbe pravca te koeficijenti korelacije prikazani u Tablici 6.

Tablica 6. Jednadžbe pravca i koeficijenti korelacije dobiveni kromatografskom analizom standardnih smjesa i modelnih uzoraka urina.

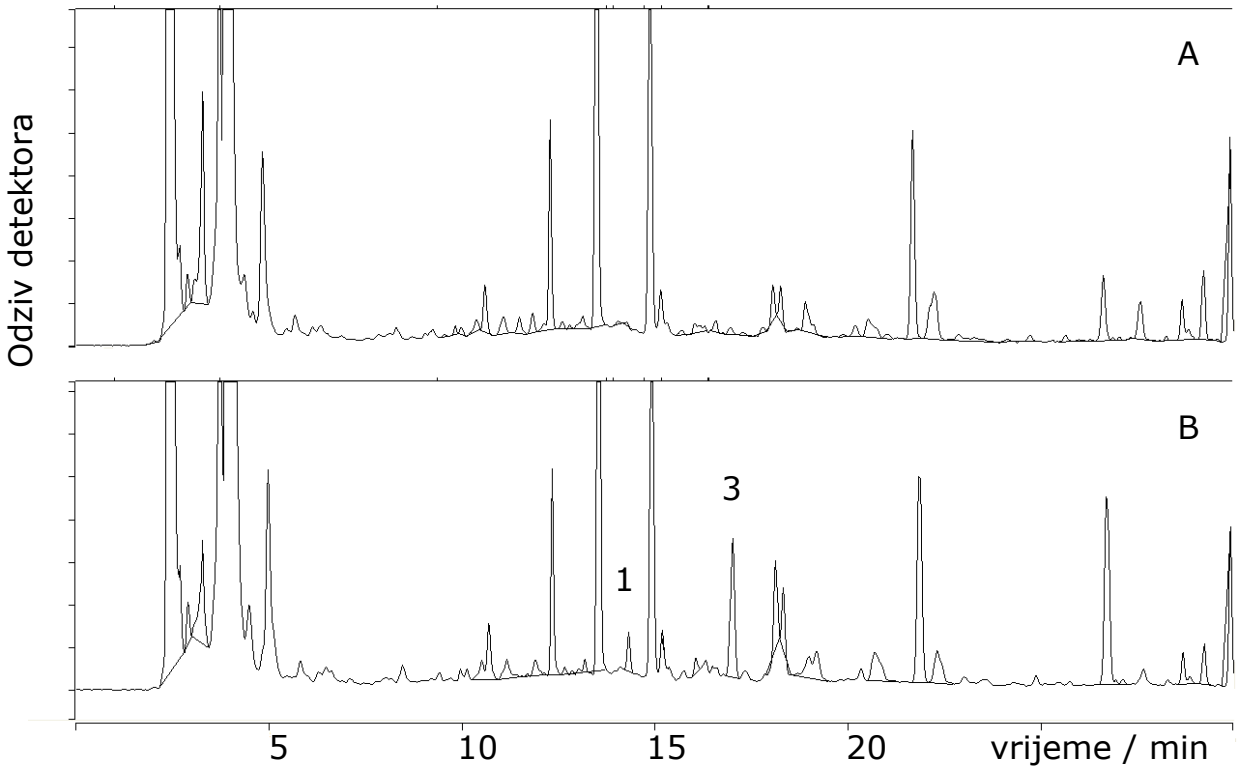
Spoj	Standardne smjese			Modelni uzorci urina		
	R^2	nagib	odsječak na osi y	R^2	nagib	odsječak na osi y
Imidakloprid	0,9986	2578,3	34580	0,9999	2443,3	155074
6 – klornikotinska kiselina	0,9994	774,67	6362,4	0,9984	797,35	14503
Imidakloprid ureja	0,9992	545,81	8199,3	0,9934	519,19	1350,3

Opisani postupak primijenjen je za pripremu modelnih uzoraka urina, a djelotvornost akumuliranja prikazana je u Tablici 7. Dobiveni kromatogram modelnog uzorka urina prikazan je na Slici 13.

Tablica 7. Djelotvornost akumuliranja imidakloprida, 6 – klornikotinske kiseline i imidakloprid ureje eluiranjem sa 20 %-tnom otopinom diklormetana u acetonitrilu iz modelnih uzoraka urina na sorbensu SDB/C_{18}.

SPOJ	Masena koncentracija µg/ml	Djelotvornost akumuliranja % ± SD (N)
Imidakloprid	0,996 – 11,954	95 ± 7 (15)
6 – klornikotinska kiselina	0,985 – 11,823	int[a] (15)
Imidakloprid ureja	0,989 – 11,867	91 ± 12 (13)

Standardna devijacija (SD); broj analiziranih uzoraka (N); [a]interferencije



Slika 13. HPLC – UV DAD kromatogram 1) imidakloprid ureje i 3) imidakloprida pri 270 nm, akumuliranih na stupcu SDB/C_{18} iz: A) slijepe probe u urinu, B) 2 ml ekstrakta urina. Masene koncentracije spojeva su od 1,182 μg/ml do 1,195 μg/ml.

5. Rasprava

Za određivanje polarnih spojeva kao što su imidakloprid i njegovi metaboliti 6 – klornikotinska kiselina i imidakloprid ureja uobičajeno se koristi tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti uz UV detektor ili uz detekciju spektrometrom masa. (3) (21) (23) (27) To su spojevi s visokom molarnom apsorpcijom u UV – Vis području, a njihov apsorpcijski maksimum je 270 nm za imidakloprid i imidakloprid ureju, te 230 nm za 6 – klornikotinsku kiselinu. Primjenom detektora s nizom dioda povećava se osjetljivost i selektivnost uz mogućnost uspoređivanja spektra realnog uzorka sa signalima iz baze, što pruža konkretnije informacije o kvalitativnom sastavu i omogućuje uklanjanje lažno pozitivnih rezultata. (28) Slijedeći literaturne navode, za određivanje imidakloprida, 6 – klornikotinske kiseline i imidakloprid ureje iz urina odabrana je metoda tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti uz detekciju UV DAD-om.

Snimanjem UV spektara spojeva odabrane su dvije radne valne duljine apsorpcijskih maksimuma pogodne za njihovo određivanje: 270 nm za imidakloprid i imidakloprid ureju te 230 nm za 6 – klornikotinsku kiselinu (Slika 3.). Uz primjenu linearnog gradijenta s mobilnim fazama acetonitrilom i 0,5 %-tnom otopinom mravlje kiseline u vodi na koloni Gemini C_{18} dobiveno je razdvajanje svih promatranih spojeva (Slika 4.).

Regresijskom analizom kromatografskih podataka standardnih smjesa imidakloprida, 6 – klornikotinske kiseline i imidakloprid ureje u vodi dokazan je linearan odziv detektora u ispitivanom koncentracijskom području uz koeficijente korelacije veće od 0,99 (Slika 5.).

Uzimajući u obzir složenost matrice urina i različite polarnosti promatranih spojeva, optimizirana je metoda ekstrakcije na čvrstoj fazi. Za odabir najprikladnijeg sorbensa i otapala za eluiranje korištena je smjesa poznatih masenih koncentracija imidakloprida, 6 – klornikotinske kiseline i imidakloprid ureje pripravljena u vodi i urinu. (3)

Stupac poli(divinilbenzen-co-*N*-vinilpirolidon) Oasis HLB je kopolimer lipofilnog divinilbenzena i hidrofilnog N-vinilpirilodina, za kojeg vrijedi standardno pravilo nanošenja 1 ml uzorka, ispiranje sa 5 %-tnim metanolom a zatim eluiranje s metanolom. (29) Prateći literaturu, ispitana je prikladnost sorbensa Oasis HLB za akumuliranje imidakloprida, 6 – klornikotinske kiseline i imidakloprid ureje iz vode, uz eluiranje sa metanolom, a rezultati akumuliranja spojeva su bili gotovo kvantitativni uz djelotvornosti akumuliranja veće od 98 % (Tablica 5.). Koristeći isti postupak, ispitana je djelotvornost akumuliranja spojeva iz modelnog uzorka urina, a dobiveni kromatogrami (Slika 6.) pokazuju interferirajuće spojeve iz matrice urina u vremenu zadržavanja analita te njihova identifikacija nije bila moguća. Dobiveni rezultati su sukladni istraživanju Carloza-Reyesa i suradnika (3) koji su ispitivali akumuliranje više od stotinu pesticida, između ostalih i neonikotionida, iz urina te pokazali da Oasis HLB nije pogodan za ispitivanje manje polarnih pesticida.

Sorbens stiren-divinilbenzena SDB je anionski organski polimer koji zbog svoje aromatičnosti ima visoki stupanj umreženja što povećava njegovu specifičnu površinu i samim time je pogodniji za akumuliranje polarnijih spojeva. Spojevi se sa sorbensa obično eluiraju acetonitrilom koji može biti zamijenjen metanolom ili acetonom. (30) Utjecaj eluensa na djelotvornost akumuliranja spojeva ispitana je uz eluiranje etilacetatom i acetonitrilom. Visoka djelotvornost akumuliranja iz vode, od 68 % za imidakloprid ureju do 102 % za imidakloprid, postignuta je eluiranjem acetonitrilom (Slika 7.). Uzimajući u obzir kompleksnost matrice urina, te prateći literaturne navode (21) (22) (31) ispitano je ispiranje stupca vodom ili smjesom metanola i vode prije eluiranja acetonitrilom, kako bi se uklonili interferirajući sastojci iz urina koji otežavaju kromatografsko određivanje. Preliminarna ispitivanja provedena su propuštanjem Smjese 0 kroz SDB sorbens koji je potom ispran deioniziranom vodom ili 1 %-tnom otopinom metanola u deioniziranoj vodi prije eluiranja acetonitrilom (Slika 8.). Međutim, isti postupak proveden s modelnim uzorkom urina rezultirao je kromatogrami

prikazanim na Slici 9. iz kojih je vidljivo da kvantitativno određivanje imidakloprida i njegovih metabolita u modelnom uzorku urina nije moguće zbog preklapanja pikova analiziranih spojeva s pikovima interferirajućih sastojka iz matrice urina zbog čega je djelotvornost akumuliranja bila od 132 % do 162 %. Takvi rezultati ukazuju na nedovoljnu selektivnost SDB sorbensa stoga je ispitano akumuliranje na stupcu koji se sastoji od stiren-divinilbenzena i oktadecilsilicijevog dioksida, odnosno SDB/C_{18} sorbensa.

Preliminarna ispitivanja djelotvornosti akumuliranja imidakloprida, 6 – klornikotinske kiseline i imidakloprid ureje provedena su na modelnom uzorku vode. Uz eluiranje etilacetatom postignuta je djelotvornost akumuliranja za navedene spojeve veća od 79 % (Slika 10.). Obzirom na velik broj interferirajućih spojeva iz urina, ispitano je ispiranje stupca, nakon propuštanja uzorka a prije eluiranja, deioniziranom vodom ili 1 %-tnom otopinom metanola u deioniziranoj vodi. Isti postupak je primijenjen za akumuliranje imidakloprida i njegovih metabolita iz vode i urina. Rezultati analize (Slika 11.) ukazuju na ovisnost djelotvornosti ekstrakcije imidakloprida, 6 – klornikotinske kiseline i imidakloprid ureje iz modelnih uzoraka urina o koraku ispiranja. Ispiranjem s 1 %-tnom otopinom metanola u deioniziranoj vodi uklonilo je interferirajuće sastojke matrice bez utjecaja na djelotvornost akumuliranja imidakloprida i imidakloprid ureje koja je bila gotovo kvantitativna, međutim u oba je slučaja došlo do potpunog ispiranja 6 – klornikotinske kiseline. Na temelju takvih rezultata, može se zaključiti da je ispiranje sorbensa radi uklanjanja interferirajućih sastojaka iz matrice urina nužan korak prije kromatografskog određivanja iako ispiranje sorbensa dovodi i do ispiranja 6 – klornikotinske kiseline.

Cazorla – Reyes i suradnici (3), Stivaktakis i suradnici (12) te Tuzimski (31) ekstrahirali su imidakloprid i njegove metabolite iz urina diklormetanom pri čemu su postigli djelotvornost akumuliranja veću od 73 %. Vodeći se takvim navodima, ispitana je djelotvornost ekstrakcije na stupcu SDB/C_{18} uz eluiranje sa smjesom diklormetana i acetonitrila i ispiranje sorbensa prije eluiranja s 1 %-tnom smjesom metanola u

deioniziranoj vodi. Dobiveni rezultati (Slika 12.) pokazuju gotovo kvantitativno iskorištenje pri akumuliranju spojeva iz vode. Kromatogram modelnog uzorka urina pokazuje manje interferirajućih spojeve iz matrice uz kvantitativno iskorištenje za imidakloprid, odnosno 85 % za imidakloprid ureju. Diklormetan se pokazao kao selektivniji eluens kojim je postignuto djelotvorno akumuliranje analita uz manje interferirajućih sastojaka iz matrice uzorka.

Utjecaj matrice uzorka na odziv UV DAD detektora ispitan je HPLC – UV DAD analizom standardnih smjesa imidakloprida, 6 – klornikotinske kiseline i imidakloprid ureje pripravljenih u ekstraktu urinu i standardnih smjesa navedenih spojeva pripravljenih u vodi. Regresijskom analizom kromatografskih podataka dobivene su jednadžbe pravca te koeficijenti korelacije za standarde u vodi i ekstraktu urina (Tablica 6.). Vrijednosti koeficijenata korelacije bile su veće od 0,99. Nagibi pravaca nisu se značajno razlikovali.

Točnost i preciznost opisanog postupka određena je analizom modelnih uzoraka urina u određenom rasponu koncentracija (Tablica 4.). Točnost metode izražena je preko postotka djelotvornosti akumuliranja svakog od spojeva, a preciznost metode određuje standardna devijacija. U idealnim uvjetima, srednja vrijednost bi trebala biti unutar 100 ± 5 % pri svakoj koncentraciji za svaki analizirani spoj. (23) Djelotvornost akumuliranja navedenog postupka pokazala se višom od 90 % za imidakloprid i imidakloprid ureju, te je iz tog razloga navedeni postupak predložen za analizu realnih uzoraka.

Opisani postupak se može koristiti za detekciju imidakloprida u urinu izloženih osoba ili za praćenje učinaka koje izaziva izloženost koristeći se modelnim pokusima na laboratorijskim životinjama.

Daljnja ispitivanja navedenog postupka mogu biti usmjerena na postupke čišćenja uzoraka preko drugog sorbensa ili pronalaženju selektivnog načina akumuliranja 6 – klornikotinske kiseline. Jedna od

mogućnosti je i primjena spektrometra masa kao detektora što bi omogućilo nedvojbenu identifikaciju svih ispitivanih spojeva, uspješno određivanje 6 – klornikotinske kiseline bez obzira na interferirajuće spojeve matrice uzorka kao i detekcije drugih metabolita koji mogu biti pokazatelj izloženosti imidaklopridu.

6. Zaključak

Tekućinskokromatografskom analizom vodene otopine smjese imidakloprida, 6 – klornikotinske kiseline i imidakloprid ureje na koloni Gemini C_{18}, uz gradijentno eluiranje acetonitrilom i 0,5 %-tnom otopinom mravlje kiseline u deioniziranoj vodi i UV detektor s nizom dioda, dobiveno je vrlo dobro razdvajanje promatranih analita. Snimanjem UV spektara dobiveni su apsorpcijski maksimumi na kojem su analizirani spojevi: 270 nm za imidakloprid i imidakloprid ureju, te 230 nm za 6 – klornikotinsku kiselinu. Granica detekcija imidakloprida i njegovih metabolita u deioniziranoj vodi bila je 10 ng/ml.

Djelotvornost akumuliranja imidakloprida, 6 – klornikotinske kiseline i imidakloprid ureje iz vode ispitana je ekstrakcijom na stupcima poli(divinilbenzen-co-*N*-vinilpirolidona) Oasis HLB, stiren-divinilbenzena SDB i stiren-divinilbenzena/oktadecilsilicijevog dioksida SDB/C_{18}. Svi ispitivani sorbensi bili su prikladni za akumuliranje imidakloprida i njegovih metabolita iz vode: djelotvornosti akumuliranja na sorbensu Oasis HLB bile su u rasponu od 98 % do 104 %, na sorbensu SDB od 68 % do 102 %, a na SDB/C_{18} od 77 % do 100 %.

Iste postupke nije bilo moguće primijeniti za akumuliranje imidakloprida, 6 – klornikotinske kiseline i imidakloprid ureje iz modelnih uzoraka urina. Interferirajućih sastojci iz urina otežavaju ili onemogućuju, unatoč djelotvornom akumuliranju, kromatografsko određivanje. Pokazalo se da priprava uzoraka urina zahtijeva uvođenje dodatnog koraka pročišćavanja uzorka. Interferirajuće sastojke matrice pokušalo se ukloniti ispiranjem stupca sorbensa nakon propuštanja uzorka i to vodom ili smjesom metanola i vode. Interferirajuće sastojke iz urina nije bilo moguće isprati s Oasis HLB sorbensa. Ispiranjem SDB sorbensa samo su djelomično uklonjeni interferirajući spojevi, a djelotvornosti akumuliranja od 132 % do 162 % za pojedini analit ukazuju na nedovoljnu selektivnost sorbensa.

Sorbens SDB/C_{18} pokazao se najprikladnijim za akumuliranje imidakloprida, 6 – klornikotinske kiseline i imidakloprid ureje iz urina uz iskorištenje od 95 % za imidakloprid i 91 % za imidakloprid ureju. Spojevi su sa sorbensa eluirani smjesom diklormetana i acetonitrila, a prije eluiranja interferirajući sastojci matrice isprani su s 1 %-tnom smjesom metanola u deioniziranoj vodi. Određivanje 6 – klornikotinske kiseline nije bilo moguće bez obzira na sorbens ili postupak priprave.

Ekstrakcija imidakloprida i imidakloprid ureje iz urina na sorbensu SDB/C_{18} uz završnu HPLC – UV DAD analizu prikladna je metoda za praćenje izloženosti imidaklopridu.

7. Literatura

1. Broznić, Dalibor i Milin, Čedomila. Imidakloprid - "čuvar" maslinika. *medicina.* 2009, Svez. 45, 2, str. 119-126.

2. Needham, Larry L., Calafat, Antonia M. i Barr, Dana B. Uses and issues of biomonitoring. *International Journal of Hygiene and Environmental Health.* 2007, 210, str. 229-238.

3. Cazorla-Reyes, Rocio, i dr. Single solid phase extraction method for the simultaneous analysis of polar and non-polar pesticides in urine samples by gas chromatography and ultra high pressure liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Talanta.* 2011, 85, str. 183-196.

4. Simon-Delso, N., i dr. Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *Environmental science and pollution research international.* 2015, 22, str. 5-34.

5. Sheets, Larry P. Imidacloprid: A Neonicotinoid Insecticide. [aut. knjige] Robert Krieger, i dr. *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology.* 3. SAD : Academic Press, 2010, 95, str. 2055-2063.

6. *Neonikotinoidi - Agonisti nikotinskih acetilkolinskih receptora.* Broznić, Dalibor i Čedomila, Milin. [ur.] Andrija Lesar. Rijeka : Komora sanitarnih inženjera i tehničara, 2008. Zbornik radova Stručnog seminara "Kontrola štetnika - Pest Control". str. 2-9.

7. Banasiak, Ursula. *Imidacloprid (206).* Federal Biological Research Centre for Agriculture and Forestry (BBA). Kleinmachnow, Germany : an.

8. Gervais, J.A., i dr. Imidacloprid Technical Fact Sheet. *National Pesticide Information Centre.* [Mrežno] Oregon State University Extension Services, 2010. http://npic.orst.edu/factsheets/archive/imidacloprid.html.

9. Thyssen, J. i Machemer, L. Imidacloprid: Toxycology and Metabolism. [aut. knjige] I. Yamamoto i J.E. Casida. *Nicotinoid Insecticides and the*

Nicotinic Acetylcholine Receptor. Tokyo : Springer-Verlag, 1999, str. 213-222.

10. *In vivo distribution and metabolisation of C-imidacloprid in different compartments of Apis mellifera L.* Suchail, Severine, i dr. 60, 2004, Pest Management Science, str. 1056-1062.

11. Solecki, Roland. Pesticide residues in food 2001 Toxicological evaluations Imidacloprid. *International Programme on Chemical Safety.* [Mrežno] 2001. http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/2001pr07.htm#2.1.2.

12. Stivaktakis, Polychronis D., i dr. Long-term exposure of rabbits to imidacloprid as quantified in blood induces genotoxic effect. *Chemosphere.* 2016, 149, str. 108-113.

13. Wang, Xu, i dr. Mechanism of Neonicotinoid Toxicity: Impact on Oxidative Stress and Metabolism. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology.* 2018, 58, str. 471-507.

14. Blacquiere, Tjeerd, i dr. Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology.* 2012, 21, str. 973–992.

15. Chauzat, Marie-Pierre, i dr. An assessment of honeybee colony matrices, Apis mellifera (Hymenoptera: Apidae) to monitor pesticide presence in continental France. *Environmental Toxicology and Chemistry.* 2011, Svez. 1, 30, str. 103-111.

16. European Commission. Neonicotinoids. *European Commission.* [Mrežno] 2018. https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/approval_active_substances/approval_renewal/neonicotinoids_en.

17. *Zakonodavstvo.* Europska unija. L132, 2018, Službeni list Europske unije.

18. Pozzebon, Joseane M., Vilegas, Wagner i Jardim, Isabel C.S.F. Determination of herbicides and a metabolite in human urine by liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A.* 2003, 987, str. 375-380.

19. Vilchez, J.L., i dr. Determination of fipronil by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A.* 2001, 919, str. 215-221.

20. Perez-Carrera, E, i dr. Simultaneous determination of pesticides, polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in seawater and interstitial marine water samples, using stir bar sorptive extraction-thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A.* 2007, 1170, str. 82-90.

21. Taira, Kumiko, Fujioka, Kazutoshi i Aoyama, Yoshiko. Qualitative Profiling and Quantification of Neonicotinoid Metabolites in Human Urine by Liquid Chromatography Coupled with Mass Spectrometry. *PLoS ONE.* 2013, Svez. 8, 11.

22. *Monitoring of 6-chloronicotinic acid in human urine by gas chromatography-tandem mass spectrometry as indicator of exposure to the pesticide imidacloprid.* Uroz, F.J., i dr. 126, 2001, Analyst, str. 1355-1358.

23. Al-Rimawi, Faud. A HPLC-UV Method for Determination of Three Pesticides in Water. *International Journal of Advances Chemistry.* 2016, Svez. 2, 1.

24. Tuzimski, Tomasz. Analysis of Pesticides by HPLC-UV, HPLC-DAD (HPLC-PDA), and Other Detection Methods. [aut. knjige] Thomasz Tuzimski i Joseph Sherma. *High Performance Liquid Chromatography in Pesticide Residue Analysis.* s.l. : CRC Press, 2015, str. 325-346.

25. *Development and Validation of a Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe Method for the Determination of Imidacloprid and its Metabolites*

in Soil. Akoijam, Romila, Singh, Balwinder i Mandal, Kousik. 2014, Journal of Chromatographic Science, str. 1-6.

26. *Determination od the insecticide imidacloprid in water and soil using high-performance liquid chromatography.* Baskaran, Sundaram, Kookana, Rai S. i Naidu, Ravendra. 787, 1997, Journal of Chromatography A, str. 271-275.

27. Žabar, Romina, i dr. Photolytic and photocatalytic degradation of 6-chloronicotinic acid. *Chemosphere.* 2011, 85, str. 861-868.

28. Garrido Frenich, A., i dr. Determination of imidacloprid and its metabolite 6-chloronicotinic acid in greenhouse air by high-performance liquid chromatography with diode-array detection. *Journal of Chromatography A.* 2000, 869, str. 497-504.

29. *Solid-phase extraction: method development, sorbents and coupling with liquid chromatography.* Hennion, Marie-Claire. 856, 1999, str. 3-54.

30. Cooke, Michael, Poole, Colin F. i Wilson, Ian D. *Encyclopedia of Separation Science.* s.l. : Academic Press, 2000. str. 4135-4141.

31. Tuzimski, Tomasz. Application of SPE-HPLC-DAD and SPE-TLC-DAD to the determination of pesticides in real water samples. *Journal of Separation Science.* 2008, 31, str. 3537-3542.

32. *Neonicotinoids in the Canadian aquatic environment: A literature review on current use products with focus on fate, exposure, and biological effects.* Anderson, J.C., Dubetz, C. i Palace, V.P. 505, 2015, Science of the Total Environment, str. 409-422.

8. Životopis

Osobni podaci	
Ime / Prezime	**Monika Mendelski**
Adresa	Slavonska 70, Zadubravlje 35211 Trnjani
Telefonski broj(evi)	Broj fiksnog telefona: 035/225-077 Broj mobilnog telefona: 0917285871
E-mail	smendelski@gmail.com
Državljanstvo	Hrvatsko
Datum i mjesto rođenja	21.12.1992. Slavonski Brod
Spol	Ženski

Radno iskustvo	05/2018 - danas PrimeVigilance Zagreb d.o.o. Oreškovićeva 20A, 10020 Zagreb - PV Associate 04 – 07/2015 Opća bolnica "Dr. Josip Benčević"; Odjel za patologiju i citologiju Andrije Štampara 42, 35000 Slavonski Brod
Obrazovanje i osposobljavanje	2015 – danas Sveučilište u Rijeci, Odjel za biotehnologiju Diplomski sveučilišni studij Medicinska kemija 2011 – 2015 Sveučilište u Rijeci, Odjel za biotehnologiju Preddiplomski studij Biotehnologije i istraživanja lijekova 2008 – 2011 Gimnazija Matija Mesić, Slavonski Brod

Praksa

06 – 08/2017
Baylor College of Medicine
Department of Molecular and Cellular Biology, Laboratory of Dr. Jeffrey M. Rosen, Ph.D.
One Baylor Plaza, Houston, TX 77030, SAD

06/2014
JADRAN-GALENSKI LABORATORIJ d.d., Rijeka
Odjel za istraživanje i razvoj

Osobne vještine i kompetencije

Materinski jezik **Hrvatski**

Drugi jezik(ci)

Samoprocjena	**Razumijevanje**		**Govor**		**Pisanje**
Europska razina (*)	Slušanje	Čitanje	Govorna interakcija	Govorna produkcija	
Engleski jezik	C2	C2	C1	C1	C2
Njemački jezik	A1	A1	A1	A1	A1

(*) Zajednički europski referentni okvir za jezike

Društvene vještine i kompetencije

Komunikativnost, timski duh, organiziranost, kreativnost

Organizacijske vještine i kompetencije

Odlične komunikacijske i prezentacijske vještine stečene obrazovanjem, spremnost na timski rad, smisao za organizaciju

Računalne vještine i kompetencije

Vrlo dobro poznajem rad na računalu,
te alate Microsoft Office™ (Word™, Excel™ i PowerPoint™)

Vozačka dozvola

AM, B