



UTILIZAREA DURABILĂ A PESTICIDELOR ȘI MONITORIZAREA REZIDUURILOR ACESTORA

Metode de laborator pentru analiza reziduurilor de
pesticide. Modul de instruire practică.



UNIVERSITY
OF AGRONOMIC SCIENCES
AND VETERINARY MEDICINE
OF BUCHAREST



ЛЕСОТЕХНИЧЕСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ

MATE



AUTORI

USAMV

Liliana BĂDULESCU
Violeta Alexandra ION
Oana - Crina BUJOR



UNIVERSITY
OF AGRONOMIC SCIENCES
AND VETERINARY MEDICINE
OF BUCHAREST

Traducere
Ioana - Cătălina NICOLAE

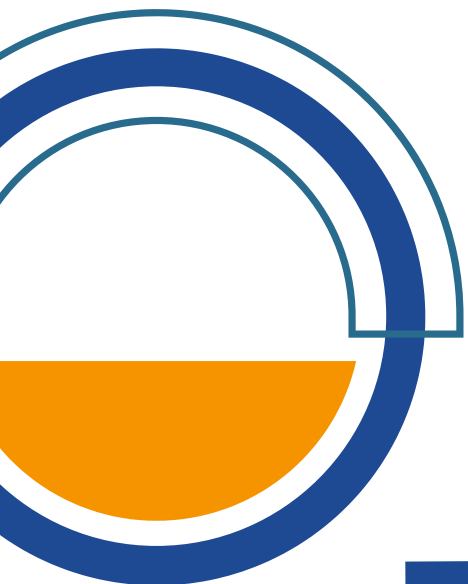
Editare
Oana VENAT
Alexandra CORNEA

UNI-MATE

Mária MÖRTL
Eszter TAKÁCS
Borbála GÉMES



Parteneriat strategic nr. 2020-1-RO01-KA203-080398



"Sprijinul acordat de Comisia Europeană pentru realizarea acestei publicații nu constituie o aprobare a conținutului, care reflectă doar punctul de vedere al autorilor, iar Agenția Națională și Comisia nu pot fi considerate responsabile pentru orice utilizare a informațiilor conținute în această publicație."



"Îmbunătățirea aptitudinilor practice ale specialiștilor în horticultură pentru a răspunde mai bine cerințelor din cadrul programului european Green Deal"



Cuprins

Metode de laborator pentru analiza reziduurilor de pesticide. Modul de formare practică	5
Introducere	5
Rezumat	8
Descriptori	9
Unitatea 1.1 Determinarea neonicotinoidelor prin HPLC-UV	10
Unitatea 1.2 Determinarea reziduurilor de pesticide din apă cu ajutorul GS-MS	16
Unitatea 1.3 Determinarea reziduurilor de pesticide din sol cu ajutorul GC-MS.....	21
Unitatea 1.4 Determinarea reziduurilor de pesticide din fructe și legume cu ajutorul GC-MS.....	26
Unitatea 1.5 Determinarea reziduurilor de glifosat prin metoda ELISA	32
Unitatea 1.6. Determinarea pesticidelor organoclorurate din îngrășăminte ecologice cu ajutorul GC-MS	37
Unitatea 1.7 Determinarea erbicidelor triazinice din îngrășăminte ecologice cu ajutorul HPLC-PDA	45
Unitatea 1.8 Determinarea dioxinelor și a furanilor în îngrășămintele ecologice cu ajutorul GC-MS/MS	52
Referințe video.....	58
Bibliografie.....	60

Metode de laborator pentru analiza reziduurilor de pesticide.

Modul de formare practică

INTRODUCERE

Studiile de monitorizare din domeniul reziduurilor de pesticide sunt esențiale pentru înțelegerea impactului acestor substanțe chimice asupra mediului și a sănătății umane. Aceste studii furnizează date esențiale privind nivelurile de poluanți în diverse medii și în matrice și au o mare contribuție la înțelegerea evoluției pesticidelor în mediul înconjurător, sprijinind inițiative precum Green Deal-ul european, care vizează un mediu înconjurător durabil și mai puțin poluat. Monitorizarea reziduurilor de pesticide prin intermediul unor

- • protocoale analitice fiabile nu este doar o activitate științifică,
- • ci și o componentă esențială a politicii și a sănătății umane și
- • de mediu, ceea ce subliniază nevoia de profesioniști și
- • cercetători calificați în acest domeniu. Combinația de cunoștințe teoretice și abilități practice în acest domeniu este indispensabilă pentru următoarea generație de oameni de știință și factorii de decizie politică din domeniul mediului.

Principalele componente cheie ale monitorizării reziduurilor de pesticide sunt:

Protocoale analitice

a. Prelevarea de probe: asigurați-vă că respectați protocoalele oficiale de reglementare pentru analiza reziduurilor de pesticide. O eșantionare insuficientă poate duce la o estimare nerealistă a concentrației de reziduuri de pesticide (supraestimare sau subestimare) din cauza eterogenității ridicate a eșantionului.



b. Pregătirea probelor: etapa inițială în analiza reziduurilor de pesticide. Aceasta implică extragerea pesticidelor din matricea probei, care poate fi sol, apă sau material vegetal, fructe sau legume. Această etapă este crucială pentru eliminarea interferențelor și concentrarea reziduurilor de pesticide.

c. Metode instrumentale: tehnici precum cromatografia în fază gazoasă (GC), cromatografia lichidă (LC) și altele, sunt utilizate în mod obișnuit. Aceste metode separă, identifică și cuantifică reziduurile de pesticide din probe.

d. Metode de detecție: deseori cuplate cu GC sau LC, metode precum spectrometria de masă (MS) asigură o detecție foarte sensibilă și specifică a pesticidelor.

Dezvoltare și optimizare

a. Adaptarea metodelor analitice la nevoile specifice este vitală. Aceasta implică ajustarea unor parametri precum tipurile de solvenți, condițiile de extracție și condițiile cromatografice pentru a spori eficiența și specificitatea.

Validarea metodei

a. Recuperarea: Măsoară eficiența extragerii analitului (reziduul de pesticid, care este identificat și măsurat) din matrice. O rată de recuperare ridicată indică faptul că metoda este eficientă în extragerea pesticidului din probă.

b. Limitele de detecție (LOD) și de cuantificare (LOQ): LOD se referă la cea mai mică cantitate de substanță care poate fi detectată, în timp ce LOQ este cea mai mică cantitate care poate fi măsurată cantitativ cu precizie.

c. Intervalul de liniaritate: Determină intervalul de concentrație în care metoda oferă un răspuns liniar.

d. Precizia: Evaluează repetabilitatea intrazilnică și interzilnică și reproductibilitatea metodei analitice.

Implicații educaționale

Este esențial să predăm studenților aceste protocoale analitice, în special la nivel de masterat și doctorat. Acestea le îmbunătățesc nu numai înțelegerea metodelor în sine, ci și a limitelor și aplicabilității acestora. Competențele practice de manipulare a acestor tehnici și de interpretare a rezultatelor sunt cruciale pentru viitorii cercetători și profesioniști în științele mediului.

Relevanța pentru Pactul Verde European

Programul european "Green Deal" (Pactul verde european) stabilește obiective ambițioase pentru reducerea poluării și tranziția către o economie durabilă. Înțelegerea și monitorizarea reziduurilor de pesticide din matricea alimentară reprezintă o parte esențială a acestei inițiative. Profesioniștii calificați care pot efectua și interpreta competent aceste analize sunt esențiali pentru atingerea acestor obiective. Cunoștințele dobândite în urma acestor studii alimentează procesul de elaborare a politicilor, contribuind la elaborarea de reglementări și practici care să se alinieze la obiectivele Green Deal.

Monitorizarea reziduurilor de pesticide prin intermediul unor protocoale analitice fiabile nu este doar un efort științific, ci și o componentă esențială a sănătății și politicii de mediu. Aceasta se aliniază îndeaproape cu inițiative mai largi, cum ar fi Green Deal european, subliniind nevoia de profesioniști și cercetători calificați în acest domeniu. Combinația de cunoștințe teoretice și abilități practice în acest domeniu este indispensabilă pentru următoarea generație de oameni de știință și factori de decizie politică în domeniul mediului.



Metode de laborator pentru analiza reziduurilor de pesticide.

Modul de formare practică

Rezumat

- •
- •
- •

Modulul de formare practică are ca scop transmiterea principiilor fundamentale și a experienței practice în analiza instrumentală a probelor de mediu și alimentare. Acest modul include lucrări practice de laborator și sesiuni interactive de întrebări și răspunsuri axate pe domenii-cheie, cum ar fi pregătirea și tratarea probelor, analiza probelor și prelucrarea datelor. Programul de studiu acoperă tehnici analitice avansate, concepute pentru a îmbunătăți abilitățile practice și cunoștințele de lucru ale studenților de la masterat și doctorat în acest domeniu.



Descriptori

...



La finalizarea modului, cursantul va fi competent în:

1. Înțelegerea etapelor implicate în protocolul analitic;
2. Înțelegerea procesului de lucru cu o metodă analitică;
3. Recunoașterea semnificației pregătirii protocolului analitic.

Competențe generale și transferabile

1	Configurarea unei stații de lucru pentru o anumită metodă analitică.
2	Operarea în laborator în mod autonom sau cu o supraveghere minimă atunci când este necesar
3	Colaborarea eficientă într-un mediu de echipă, cu îndrumare limitată, după cum este necesar
4	Să dea dovadă de abilități de laborator performante
5	Afișarea capacității de a înțelege rezultatele și de a interpreta datele obținute prin diverse metode analitice

Cunoștințe, înțelegere și competențe profesionale

1	Alegerea metodei analitice potrivite pentru detectarea ingredientelor active ale pesticidelor
2	Dobândirea de abilități practice de laborator prin diferite metode de caracterizare
3	Analiza și corelarea datelor obținute

Unitatea 1.1 Determinarea neonicotinoidelor cu ajutorul HPLC-UV

Mária Mörtl

1.1.1. Principiul metodei



Această metodă este adecvată pentru determinarea conținutului de neonicotinoide dintr-o probă de apă cu ajutorul HPLC echipat cu detector UV.

Exercițiul include calibrarea, determinarea recuperării din apă și optimizarea metodei HPLC-UV prin modificarea condițiilor cromatografice.



1.1.2. Echipamente și materiale

- ➡ HPLC echipat cu detector UV și injector automat;
- ➡ pipete automate;
- ➡ flacoane de 2 ml;
- ➡ balanță analitică, cu o precizie de $\pm 0,01$ mg;
- ➡ seringă de 1 ml;
- ➡ filtru de seringă PTFE cu pori de $0,45 \mu\text{m}$;
- ➡ tuburi de centrifugare de 15 ml;
- ➡ vortex;
- ➡ evaporator (modul de încălzire).



1.1.3. Pregătirea probelor

➡ *Calibrarea și determinarea neonicotinoidelor*

Se prepară o soluție stoc care conține diferite neonicotinoide (tiametoxam, clotianidin, tiacloprid, acetamiprid, imidacloprid) la un nivel de 1 mg/mL în metanol;

- ➡ Se prepară un amestec de solvenți, care are aceeași compoziție precum compoziția inițială a eluentului în metoda HPLC (tabelul 1.1.);
- ➡ Se prepară o soluție de lucru comună (5 ml) care conține 3 neonicotinoide la un nivel de 10 µg/mL și apoi soluțiile de calibrare care conțin fiecare neonicotinoid la un nivel de 50, 100, 200, 500 și 1000 ng/mL.
- ➡ Se diluează soluția stoc cu amestecul de solvenți eluenți (tabelul 1.1) și nu se uită să se omogenizeze probele;
- ➡ Se injectează 20 µL din fiecare probă și din necunoscută aplicând condițiile cromatografice prezentate în tabelul 1.1.

Tabelul 1.1. Condiții cromatografice pentru determinarea izocratică a neonicotinoidelor

Coloana	C18, 150mm × 4.6mm i.d., 5 µm
Compoziția eluentului izocratic	75% A (90% apă:10% MeOH) + 25% B (acetonitril) SAU 65% A + 35% metanol
Lungime de undă	λ = 269 and 252 nm
Timp de execuție	10 min
Temperatura coloane	40 °C
Injectie	partial loop fill, 20 µL
Debit	1 mL/min

Evaluarea recuperării neonicotinoidelor din apă

- ➡ Se adaugă cantități cunoscute (200 ng) de neonicotinoide la 10 ml de probă de apă (spiking) în patru tuburi de centrifugare de 15 ml.
- ➡ Se extrag probele cu doi dintre cei șase solvenți de extracție diferiți din tabelul 1.2.
- ➡ Agitați-le bine manual și apoi timp de 30 de secunde cu un vortex.
- ➡ Efectuați extracția fie o dată, fie de două ori, când cele două extracte sunt combinate.
- ➡ Se îndepărtează cât mai mult posibil din solventul organic cu ajutorul unei seringi.
- ➡ Se evaporă solventul până la uscare cu ajutorul unui curent de azot într-o hotă de laborator și se dizolvă reziduul în 1 ml de amestec de solvenți, care are aceeași compoziție precum compoziția inițială a eluentului în metoda HPLC.
- ➡ Se filtrează extractul cu ajutorul unui filtru de seringă PTFE cu pori de 0,45 μm .
- ➡ Deoarece concentrația inițială în apă a fost de 20 ng/mL, teoretic, în timpul preparării probei a avut loc o creștere de zece ori (100% recuperare), astfel încât nivelul corespunzător al extractului este egal cu 200 ng/mL.
- ➡ Pregătiți această soluție ca referință sau folosiți valoarea măsurată din calibrare.

Tabelul 1.2. Compoziția solventilor utilizați pentru extracția neonicotinoidelor

	Solvent	Volum (mL)	Co-solvent	Volum (mL)	Solvent
1	hexan	1.5	acetonă	0.5	1
2	hexan	1.5	acetonitril	0.5	2
3	hexan	2.0	-	0	3
4	dichlorometan	1.5	acetonă	0.5	4
5	dichlorometan	1.5	acetonitril	0.5	5
6	dichlorometan	2.0	-	0	6

Optimizarea metodei

În această parte a exercițiului de laborator se utilizează una dintre soluțiile preparate (de exemplu, 200 ng/mL), iar parametrii inițiali sunt indicați în tabelul 1.1. Aceștia sunt apoi modificați după cum urmează.

1.1.4. Pregătirea probelor

Calibrarea și determinarea neonicotinoidelor

Analiza se face prin metoda prezentată în tabelul 1.1. Se verifică integrarea vârfurilor și se determină ariile vârfurilor pentru toate nivelurile de calibrare și pentru proba necunoscută. Centralizați rezultatele într-un tabel și calculați concentrația probei necunoscute.

Determinarea recuperării neonicotinoidelor din apă

Analiza se face prin metoda HPLC prezentată în tabelul 1.1. Se verifică integrarea vârfurilor și se determină suprafețele vârfurilor mai intense (lungimea de undă) pentru cele 4 probe extrase (2 amestecuri de solvenți și 1 sau două extracții), precum și pentru proba de referință. Centralizați rezultatele într-un tabel.

Optimizarea metodei

Inițial, se utilizează parametrii din tabelul 1.1. și se înregistrează cromatograma.

- Modificați parametrii, injectați aceeași soluție și înregistrați din nou cromatograma.
- Modificați raportul modifierului organic în compoziția inițială a eluentului cu $\pm 10\%$.
- Se modifică temperatura coloanei cu $\pm 5^\circ\text{C}$;
- Modificați debitul cu $\pm 0,1$ ml/min;
- Modificați lungimile de undă cu ± 20 nm;
- Rezumați într-un tabel timpii de retenție pentru fiecare compus și condiții.

Notă: în unele cazuri este necesară echilibrarea sistemului, de exemplu, dacă se modifică compoziția eluentului. Luați în considerare, de asemenea, faptul că în cromatografia lichidă în fază inversă, scăderea raportului modifierului organic în eluent duce la creșterea timpilor de retenție pentru componentele mai puțin polare, ceea ce poate crește și timpul de cromatografie.

- Încercați să găsiți o metodă cu gradient pentru neonicotinoidele vizate.

1.1.5. Evaluarea

Calibrarea și determinarea neonicotinoidelor

Se trasează suprafețele vârfurilor în funcție de concentrația pentru fiecare component pentru fiecare component și, pe baza acestei curbe de calibrare, se calculează nivelurile din probele necunoscute. Calculați, de asemenea, rapoartele vârfurilor înregistrate la două lungimi de undă diferite. Acesta ar trebui să fie constant, dacă nu există niciun component co-eluabil în probă.

Determinarea recuperării neonicotinoidelor din apă

Se compară intensitățile măsurate (suprafețele vârfurilor) cu cele ale soluției de referință și se calculează recuperările pentru 4 proceduri (2 amestecuri de solvenți și 1 sau 2 extracții) pentru fiecare component. Recuperarea (rec%) se exprimă după cum este dată de ecuația:

unde:

$$rec\% = \frac{A_{extr,i}}{A_{ref,i}} \cdot 100\%$$

rec% – recuperarea

$A_{extr,i}$ – zona de vârf din proba extrasă pentru componenta i

$A_{ref,i}$ – zona de vârf în proba de referință pentru componenta i

Optimizarea metodei

Comparați efectul diferiților parametri asupra timpilor de retenție ai neonicotinoidelor și luați în considerare, de asemenea, lățimile și/sau suprafețele vârfurilor din cromatogramă. Centralizați observațiile și alegeți o metodă optimă.

Unitatea 1.2 Determinarea reziduurilor de pesticide din apă cu ajutorul GC-MS

Mária Mörtl

1.2.1. Principiul metodei

...

Ingredientele active ale pesticidelor sunt prezente în diferite probe de mediu, de exemplu în apa de suprafață. Analiza multireziduală a pesticidelor moderat volatile se realizează cu ajutorul GC-MS. Probele de apă sunt pregătite prin extracție în fază solidă (SPE), în timp ce probele de sol sunt pregătite prin extracție lichidă.



1.2.2. Echipamente și materiale

- ➡ Cartușele SPE, cartușul Restek CarboPrep-90 (500 mg/6 ml)
- ➡ Aparat de extracție SPE (a se vedea figura 1.1.);
- ➡ flacoane Erlenmeyer;
- ➡ pipete automate;
- ➡ flacoane de 4 și 2 ml;
- ➡ tuburi pentru colectarea fracțiilor;
- ➡ standarde de pesticide (de exemplu, dimetenamid, trifluralin, acetoclor, clomazonă, teflutrin, terbutilazină, clorpirifos, metolaclor, propiconazol, penconazol, pendimetalin etc.).
- ➡ Agent de sililare BSTFA pentru derivatizare;
- ➡ Instrument GC-MS;



cartuș SPE

conexiunea către vaccum

proba de apă

Figura 1.1. Aparat de extracție SPE



1.2.3. Pregătirea probelor

Metoda multi-reziduu pentru determinarea ingredientelor active ale pesticidelor din apă

Pregătiți 1 L (sau 200 ml) de probă de apă de suprafață sau subterană cu extracție în fază solidă (SPE) în conformitate cu procedura prezentată în figura 1.2. În cazul în care apa conține multe particule în suspensie, filtrați proba printr-o hârtie. Condiționați cartușul înainte de pregătirea probei, apoi încărcați proba și utilizați vidul pentru a crește debitul. Îndepărtarea sărurilor și a altor interferențe polare se realizează prin spălare, apoi se usucă cartușul folosind vidul și se eluzionează componentele. Componentele neutre și bazice sunt eluate lent (fără vid) în prima fracție cu 1 ml de metanol, urmat de 6 ml de CH_2Cl_2 /metanol (8:2). Componentii acizi sunt colectați separat într-o a doua fracție printr-o eluție ulterioară cu un amestec de soluții bazice care conține

1L probă de apă	
	Filtrare, omogenizare Condiționare (5 mL CH_2Cl_2 /metanol 8:2, apoi 15 mL acid ascorbic conc. 10g/L), 5 mL/min, nu se usucă!
Încărcarea probei de apă (debit 10-15 ml/min)	
	Spălare: 7 ml de apă distilată, 1 mL metanol/apă distilată (1:1), uscare (20 min!)
Eluarea ingredientelor 1. Frațiune (componente neutre și bazice) 1 ml metanol, 6 ml CH_2Cl_2 /metanol (8:2), lent	
	vaporizare până la uscare, se trece la izo-octan
Eluarea ingredientelor 2. Frațiune (componente acide) 6 ml de CH_2Cl_2 /metanol (6:4) conținând 0,9 g/L (0,016 mol/dm ³) KOH	
	Evaporarea până la uscare, trecerea la izo-octan, derivare
Măsurarea GC-MS	

Figura 1.2. Pregătirea probelor de apă.

mai mult metanol (CH_2Cl_2 /metanol =6:4). Acești compuși (de exemplu, erbicidele pe bază de acid clorofenoxidic) sunt derivatizați prin utilizarea unui agent de derivatizare. Scopul derivatizării este de a crește volatilitatea, care este o condiție prealabilă în GC. Se îndepărtează solventul cu ajutorul unui curent de azot și apoi se dizolvă reziduul uscat în 1 ml de solvent adecvat pentru măsurători GC (de exemplu, izo-octan).

Dacă doriți să păstrați cele 3 ordine de mărime în concentrație și s-au preparat doar 200 ml de probă de apă, atunci rezolvați reziduul uscat doar în 200 μL și utilizați o inserție în flacon. Pentru a doua fracție uscată se adaugă reactivul de derivatizare (de exemplu, 50 μL BSTFA + 10 μL acid trifluoroacetic) și se încălzește la 60°C timp de o jumătate de oră. Rețineți că agenții de derivatizare, precum și derivații ai siliciului sunt sensibili la umiditate, prin urmare, aplicați reactivul în exces și închideți flaconul pentru a păstra stabilitatea față de hidroliză.

1.2.4. Analiza probei

Setați metoda GC-MS optimizată pentru analiza multi-reziduu și injectați 1 μL din proba preparată în instrumentul GC-MS. Dacă intrarea GC permite volume de injecție mai mari, atunci se pot injecta 5 μL sau chiar mai mult. Metoda GC-MS optimizată poate varia de la un laborator la altul. În tabelul 1.3 este prezentat un exemplu pentru parametri.

Tabelul 1.3. Condiții cromatografice pentru analiza multi-reziduu prin GC-MS

Coloana	Coloana capilară HP-5MS ultra-inertă HP-5MS (30m x 0,25mm x 0,25 μm grosime a filmului)
Program de temperatură a cuptorului	staționar la 70°C timp de 0,5 min, încălzire de la 70°C la 100 °C la 60 °C / min, încălzire de la 100°C la 240°C la 10°C / min, staționar la 240 °C timp de 11 min
Gaz purtător	Helium (6,0) cu un debit de 1,0 ml / min.
Injecție	volum 5 μL , divizare de la 1,5 min, raport de divizare 40
Temperatura de injecție	staționar la 60°C timp de 0,5 min, încălzire de la 60°C la 260°C la 200°C / min, menținută timp de 5 min, răcire la 60°C la 200°C / min, menținută timp de 18 min.
Spectrometru de masă	Energia de ionizare 70 eV, pe intervalul de masă 60-350 m/z la 2 scanări/s. Întârziere cu solvent 7,5 min. Linie de transfer MS și sursă de ioni 280°C și, respectiv, 230°C.

1.2.5. Evaluarea

- Se compară spectrele de masă înregistrate pentru vârfurile mai mari ale cromatogramei cu spectrele de masă din baza de date (de exemplu, NIST), utilizând funcția corespunzătoare a programului informatic.
- Utilizați funcția de evaluare a software-ului și încercați să găsiți moleculele țintă, care sunt înregistrate în metoda multi-reziduu optimizată.
- În cazul în care există curbe de calibrare pentru moleculele țintă, calculați și concentrația. Este de remarcat faptul că recuperarea nu este probabil determinată pentru fiecare compus țintă.

Unitatea 1.3 Determinarea reziduurilor de pesticide din sol cu ajutorul GC-MS

Mária Mörtl

1.3.1. Principiul metodei

...

Ingredientele active ale pesticidelor sunt prezente în diferite probe de mediu, de exemplu în apa de suprafață. Analiza multireziduală a pesticidelor moderat volatile se realizează cu ajutorul GC-MS. Probele de apă sunt pregătite prin extracție în fază solidă (SPE), în timp ce probele de sol sunt extrase prin extracție lichidă.



1.3.2. Echipamente și materiale

- ➡ Cartușe SPE, cartuș Restek CarboPrep-90 (500 mg/6 ml)
- ➡ Aparat de extracție SPE (figura 1.1.);
- ➡ flacoane Erlenmeyer;
- ➡ pipete automate;
- ➡ flacoane de 4 și 2 ml;
- ➡ tuburi pentru colectarea fracțiilor;
- ➡ standarde de pesticide (de exemplu, dimetenamid, trifluralin, acetoclor, clomazonă, teflutrin, terbutilazină, clorpirifos, metolaclor, propiconazol, penconazol, pendimetalin etc.);
- ➡ agent BSTFA pentru derivatizare;
- ➡ Instrument GC-MS.



1.3.3. Pregătirea probelor

Metoda multi-reziduu pentru determinarea ingredientelor active ale pesticidelor din sol

Se extrag 10 g de probă de sol uscată la aer cu ajutorul unui amestec de hexan-acetonă (1:1), conform procedurii prezentate în figura 1.3. Extracția se realizează prin agitare manuală, urmată de o agitare cu ultrasunete, apoi soluția se centrifughează pentru a separa fazele. Se îndepărtează 10 ml de supernatant, iar solventul se evaporă până la uscăciune cu ajutorul unui curent de azot în hota de laborator. Reziduul uscat se dizolvă din nou în solventul adecvat pentru măsurătorile GC (de exemplu, izo-octan).

10 g de probă de sol într-un tub Falcon	
	+ 15 mL hexan-acetonă 1:1
Agitare (5 min)	
20 min agitare cu ultrasunete	
Centrifugare la 4°C, 5000 rpm/min timp de 10 min.	
Se îndepărtează 10 ml de extract (decantare)	
Evaporare până la uscăciune cu ajutorul unui curent de azot	
Se dizolvă în 1 ml de izo-octan, măsurare GC-MS	

Figura 1.3. Pregătirea probelor de sol.

1.3.4. Analizarea probei

Aplicați metoda elaborată pentru analiza multi-reziduu prin GC-MS. Condițiile cromatografice ale metodei de analiză multi-reziduu sunt aceleași ca în unitatea 1.2. Parametrii detaliați sunt prezentați în tabelul 1.3.

Se injectează 1 μL (sau mai mult, de exemplu, 5 μL) de probă. Se injectează, de asemenea, soluția de alcani normali folosind aceleași condiții. Identificați vârfurile pe baza bazei de date NIST sau utilizând biblioteca proprie. Determinarea indicelui de retenție se bazează pe timpii de retenție înregistrați pentru seria de n-alcane. Indicii de retenție (măsurați și/sau calculați) sunt, de asemenea, indicați de baza de date NIST

(<https://webbook.nist.gov/chemistry/>).

Se iau în considerare numai acei indici care au fost determinați pe aceeași fază staționară.

1.3.5. Evaluarea

Determinarea reziduurilor din probe

Identificați ingredientele active ale pesticidelor care au poluat proba de sol. Identificarea reziduurilor de pesticide se bazează pe spectrele de masă, iar timpii de retenție trebuie să fie în concordanță cu cei măsurați anterior cu soluții standard analitice și înregistrați în metodă. Calcularea nivelurilor din probă pentru fiecare component se poate efectua pe baza curbelor de calibrare, dacă sunt disponibile. Presupunând o recuperare de 100 %, se determină nivelurile din proba originală dacă sunt disponibile etalonări pentru ingredientul activ de pesticide găsit în probă.

Determinarea indicilor de retenție

Reprezentați grafic timpii de retenție ai alcanilor normali în funcție de numărul de atomi de carbon. Este liniară?

Indicii alcanilor normali sunt, prin definiție, de o sută de ori mai mari decât numărul lor de atomi de carbon. În cazul izotermic, indicele de retenție (indicele Kováts, RI) se exprimă după cum este dat de ecuația:

$$RI_i = 100 \left(n + \frac{\log(t_i - t_0) - \log(t_n - t_0)}{\log(t_{n+1} - t_0) - \log(t_n - t_0)} \right) \text{ unde:}$$

- t_0 timp mort
- t_i timpul de retenției al necunoscutei
- t_n timpul de retenție al n-alcanului care se eluează înaintea necunoscutei
- n numărul de atomi de carbon din n-alcanul care se eluează înaintea necunoscutei
- t_{n+1} timpul de retenție al n-alcanilor care se eluează după necunoscut, numărul de atomi de carbon este $n+1$

În cazul temperaturii programate, dacă temperatura este crescută liniar, atunci indicele este calculat prin următoarea ecuație (van den Dool és Kratz):

$$RI_i = 100 \left(n + \frac{t_i - t_n}{t_{n+1} - t_n} \right)$$

Calculați indicele de retenție pentru compușii identificați de baza de date a spectrului de masă și comparați valorile calculate cu datele din literatura de specialitate. Indicii sunt valabili până la

faza staționară corespunzătoare și sunt doar puțin influențați de condițiile cromatografice (temperatura cuptorului). Prin urmare, acestea sunt indicate în anumite baze de date (de exemplu, NIST) și confirmă identificarea compusului.

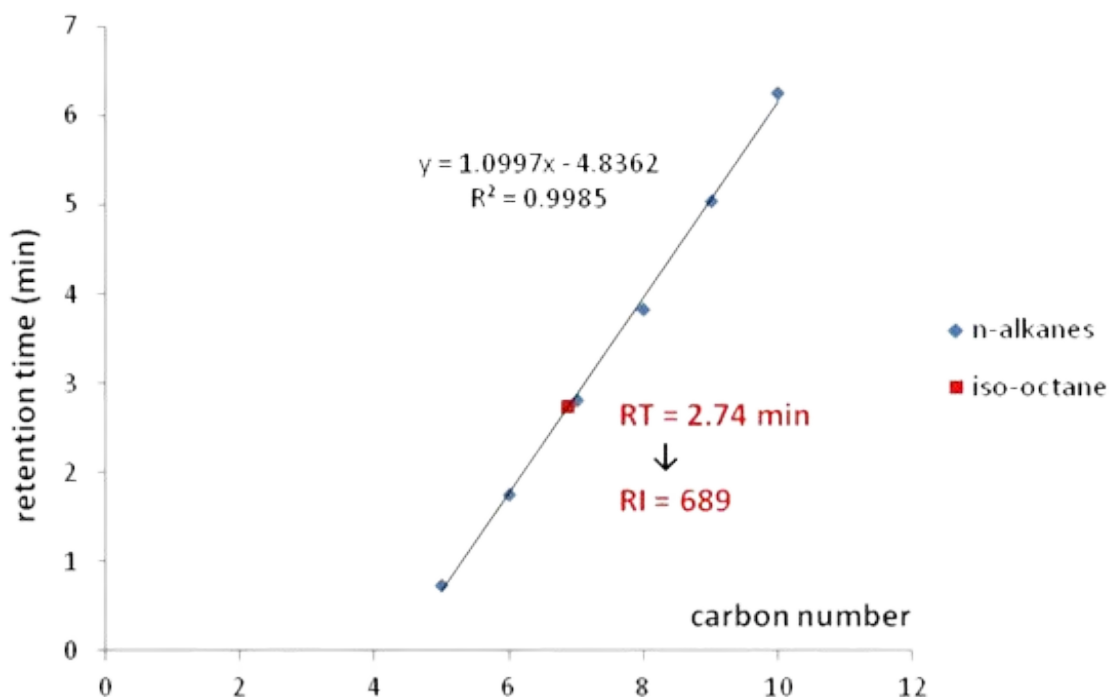


Figura 1.4. Determinarea indicelui de retenție (RI) pentru izo-octan. Ecuația a fost determinată pe baza timpilor de retenție ai alcanilor normali. Rețineți că indicele este de o sută de ori mai mare decât numărul de carbon.

Unitatea 1.4 Determinarea reziduurilor de pesticide din fructe și legume cu ajutorul GC-MS

Mária Mörtl

1.4.1. Principiul metodei

• • • •
• • • •

Extracția ingredientelor active ale pesticidelor din fructe și legume se realizează prin metoda QuEChERS, iar determinarea acestora se bazează pe măsurarea GC-MS. QuEChERS este un acronim pentru Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe (rapid, ușor, ieftin, eficient, robust și sigur) și acoperă o varietate de tehnici de pregătire și curățare a probelor pentru analiza reziduurilor multiple de pesticide în matrici agricole. Sunt publicate numeroase varietăți, care sunt optimizate pentru prepararea matricelor de mediu (de exemplu, sol, frunze de plante etc.) și pentru alți compuși țintă (de exemplu, micotoxine), precum și pentru alți compuși țintă (de exemplu, micotoxine). Datorită acestei variabilități, este mai bine să ne referim la aceste proceduri ca metode bazate pe QuEChERS. Mai întâi, într-o etapă de sărare, reziduurile de pesticide sunt extrase cu acetonitril. Apoi se efectuează curățarea extractului. Se aplică trei tipuri diferite de sorbenți în mod dispersiv (dSPE) pentru eliminarea interferențelor matricei. Amina secundară primară (PSA) este utilizată pentru eliminarea zaharurilor și a acizilor grași, a acizilor organici, a lipidelor și a unor pigmenți. Atunci când PSA se utilizează în combinație cu faza C18 pe bază de silice, se elimină lipidele suplimentare (compuși grași cu lanț lung), steroli și alte substanțe nepolare

interferențele pot fi eliminate. Negrul de fum grafitizat (GCB) este mai puțin utilizat, deoarece este un sorbent puternic pentru îndepărtarea pigmentilor, polifenolilor și a altor compuși polari, dar pot fi îndepărtate și unele dintre pesticidele plane (aromatice polare).



1.4.2. Echipamente și materiale

- ➡ Tuburi Falcon de 50 ml și 15 ml;
- ➡ faze dSPE (de exemplu, PSA, GCB și/sau C18);
- ➡ NaCl și MgSO₄;
- ➡ pipete automate;
- ➡ flacoane de 4 și 2 ml;
- ➡ filtru cu seringă (pori de 0,45 sau 0,22 μm);
- ➡ standarde de pesticide (de exemplu, dimetenamid, trifluralin, acetoclor, clomazonă, teflutrin, terbutilazină, clorpirifos, metolaclor, propiconazol, penconazol, pendimetalin etc.).
- ➡ izo-octan sau alt solvent organic;
- ➡ instrument GC-MS;



1.4.3. Pregătirea probelor

Se cântăresc 10 g de probă alimentară omogenizată într-un tub de centrifugă de 50 ml și se adaugă 10 ml de acetonitril. Aplicați una dintre metodele QuEChERS (Fig. 1.5.). Notă: în cazul în care proba nu are un conținut ridicat de apă (de exemplu, cereale), trebuie utilizate cantități mai mici de probă măcinată și trebuie completată greutatea până la 10 g cu apă (hidratant).



Se agită bine proba, apoi se adaugă sărurile (MgSO_4 și NaCl) și se agită din nou proba. Se lasă proba timp de 10 minute și se repetă agitarea pentru a obține pesticide de extracție eficiente în această etapă de adăugare de sare. Deoarece unele dintre ingredientele active ale pesticidelor sunt sensibile la pH, se poate aplica, de asemenea, un tampon (acetat sau citrat). În unele cazuri, în soluție se adaugă și un standard intern (ISTD) pentru a îmbunătăți precizia și acuratețea, pentru a corecta variabilitatea metodei sau pentru a elimina efectul de matrice care apare în urma extracției în fază solidă persivă (dSPE), recomandată pentru matricea alimentară aleasă. Urmați sfatul supervisorului dumneavoastră și aplicați una dintre procedurile recomandate enumerate în tabelul 1.4. De exemplu, pentru boabe sau cereale, în ghid sunt indicate 150 mg MgSO_4 și 50 mg PSA pe ml de extract. În schimb, pentru probele foarte pigmentate (de exemplu, căpșuni, roșii) trebuie aplicate 25 mg MgSO_4 PSA și 2,5 mg GCB pentru aceeași cantitate de extract și sare. În plus față de 150 mg MgSO_4 și 50 mg PSA, se aplică 50 mg de fază C18 cu capătul final pentru curățarea matricelor cu conținut ridicat de lipide (de exemplu, carne, pește, nuci).

Se centrifughează proba pentru a separa fazele și se transferă o parte alicotă din supernatant într-un tub mai mic. Se adaugă sarea de magneziu și fazele la extract. În loc de 1 ml, se poate extrage și mai mult supernatant (de exemplu, 6 ml) și se poate folosi în procesul de curățare dSPE pentru a mări volumul probei.



Se agită, se centrifughează și se transferă o parte din supernatant într-un tub mai mic. Înainte de GC, se îndepărtează solventul cu ajutorul unui curent de azot. Rezolvați reziduul uscat în solventul adecvat pentru măsurătorile GC (de exemplu, izo-octan). Înainte de măsurătorile LC, reziduul uscat trebuie dizolvat în eluentul inițial și filtrat printr-un filtru cu seringă cu pori de 0,45 sau 0,22 μm .

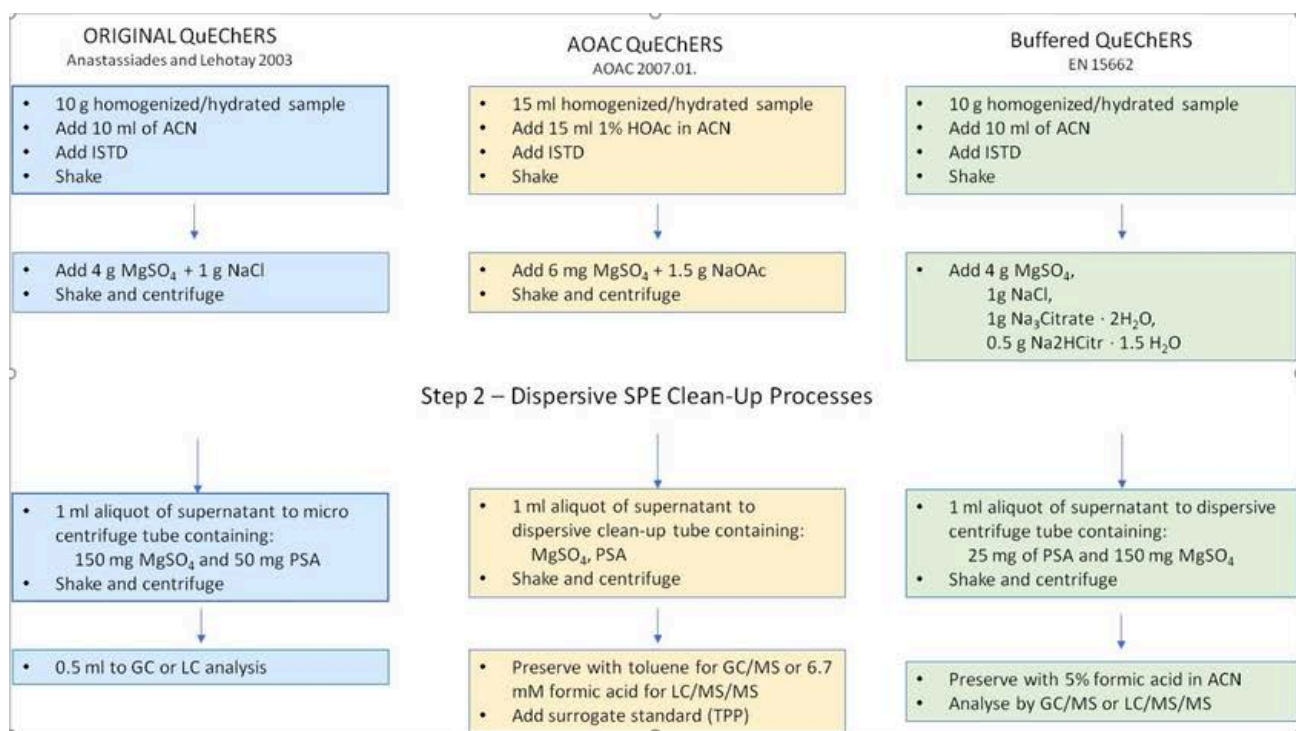


Figura 1.5. Procedurile QuEChERS originale și oficiale

Tabelul 1.4. Curățarea SPE dispersivă recomandată pentru diferite matrici în procedura QuEChERS

	Matrice tipică	Exemplu	curățarea dSPE
1	fructe ușor pigmentate	cartof	900 mg MgSO_4 , 150 mg PSA
2	fructe pigmentate	tomate, căpșune	900 mg MgSO_4 , 150 mg PSA, 15 mg GCB
3	fructe pigmentate cu lipide	avocado	900 mg MgSO_4 , 300 mg PSA, 45 mg GCB, 300 mg C18
4	Produse grase	pește, carne, nuci	900 mg MgSO_4 , 300 mg PSA, 300 mg C18
5	Vin		900 mg MgSO_4 , 300 mg PSA, 150 mg GCB
6	Ulei de măsline		900 mg MgSO_4 , 300 mg PSA
7	Cereale		900 mg MgSO_4 , 300 mg PSA, (50 mg C18)
8	pentru ingrediente acide		900 mg MgSO_4 , 300 mg C18

1.4.4. Analiza probei

Aplicați metoda elaborată pentru analiza multi-reziduu prin GC-MS. Condițiile cromatografice ale metodei de analiză multi-reziduu sunt aceleași ca în unitatea 1.2. Parametrii detaliați sunt prezentați în tabelul 1.3.

Se injectează 1 μL de probă și se execută metoda cromatografică. Identificați vârfurile pe baza bazei de date NIST sau utilizând biblioteca proprie. Dacă este disponibilă și soluția de alcani normali, injectați-o și pe aceasta folosind aceleași condiții. Se indică, de asemenea, indicele de retenție (măsurat și/sau calculat).

de baza de date NIST (<https://webbook.nist.gov/chemistry/>). Luați în considerare numai acei indici care au fost determinați pe aceeași fază staționară.

1.4.5. Evaluarea

Determinarea reziduurilor din probe

Identificați ingredientele active ale pesticidelor care au poluat eșantionul. Identificarea reziduurilor de pesticide se bazează pe spectrele de masă, iar timpii de retenție trebuie să fie în concordanță cu cei mășurați anterior cu soluții standard analitice și înregistrați în metodă. Calcularea nivelurilor din probă pentru fiecare component se poate efectua pe baza curbelor de calibrare, dacă sunt disponibile. Presupunând o recuperare de 100 %, se determină nivelurile din proba originală dacă sunt disponibile etalonări pentru ingredientul activ de pesticide găsit în probă.

Determinarea indicilor de retenție

Verificați, de asemenea, indicele de retenție și comparați valorile calculate cu datele din literatura de specialitate. Reprezentați grafic timpii de retenție în funcție de numărul de atomi de carbon. Indicele de retenție (indicele Kováts) (RI) se exprimă conform ecuației din unitatea 1.3.

Unitatea 1.5 Determinarea reziduurilor de glifosat prin metoda ELISA

Borbála Gémes,
Eszter Takács

⋮
⋮
⋮

1.5.1. Principiul metodei

Testele imunoenzimatică (ELISA) utilizează anticorpi specifici pentru a recunoaște glifosatul, compus țintă în probă. Ca ELISA competitiv, anticorpii specifici sunt capabili să se lege de glifosatul din probă sau de conjugatul glifosat-analog acoperit pe microplăcuță. Creșterea concentrației probei reduce semnalul detectabil. Cuantificarea este posibilă prin compararea rezultatelor cu o curbă de calibrare în 7 puncte. Etapele principale ale unui ELISA competitiv sunt descrise în cele ce urmează (pe baza kitului Abraxis Glyphosate Plate, Abraxis LLC, Warminster, PA).

Precauții:

- ⚠ Toți reactivii și plăcile se păstrează la 2 - 8°C. Lăsați-le să ajungă la temperatura camerei înainte de testare!
- ⚠ Evitați formarea de spumă în timpul vortexării.



1.5.2. Materiale

Formatul microplăcilor cu 96 de godeuri permite măsurarea a 25 de probe în paralel cu 7 puncte pentru curba de calibrare.

Elemente esențiale pentru efectuarea testului:

- ➡ Kit de testare cantitativă ELISA;
- ➡ pipete cu un singur canal, capabile să livreze 50, 100, 150, 250 μ l și 1 ml;
- ➡ pipete cu 8 canale, capabile să livreze 50 - 300 μ l.
- parafilm;
- ➡ tuburi de testare pentru derivatizare;
- ➡ flacoane de sticlă pentru prepararea soluțiilor de analiză;
- ➡ apă distilată sau deionizată;
- ➡ vortex;
- ➡ cititor de microplăci;
- ➡ pentru probe de plante și animale aveți nevoie și de: tuburi Eppendorf, mortare și pisăloage, balanță analitică, centrifugă.



1.5.3. Pregătirea probei

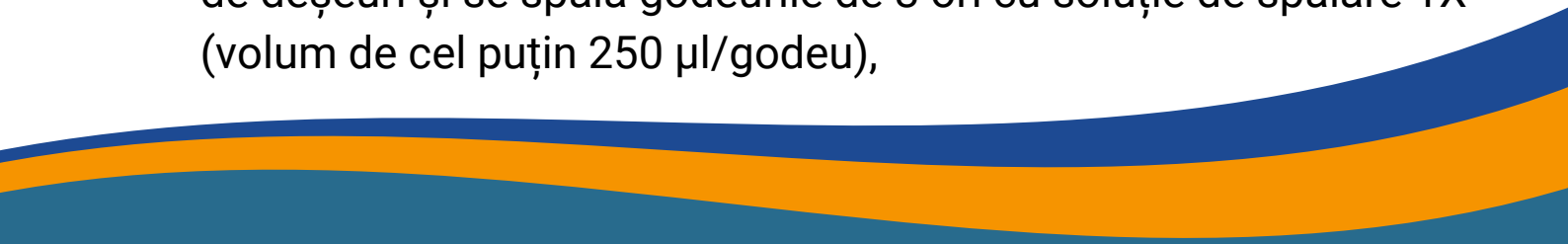
Conform producătorului, ELISA este adecvată pentru determinarea glifosatului în probele de apă de suprafață fără diluarea probelor. Acesta poate fi aplicat, de asemenea, în probele de plante/animale, însă în acest caz se recomandă o diluție minimă de 1:10 a extractului de probă. Aplicați în acest caz calibrarea bazată pe matrice (obțineți curba de calibrare în extractul probei de control. Înainte de a pregăti curba de calibrare, se diluează extractul de control cu aceeași rată de diluție ca și pentru probe).



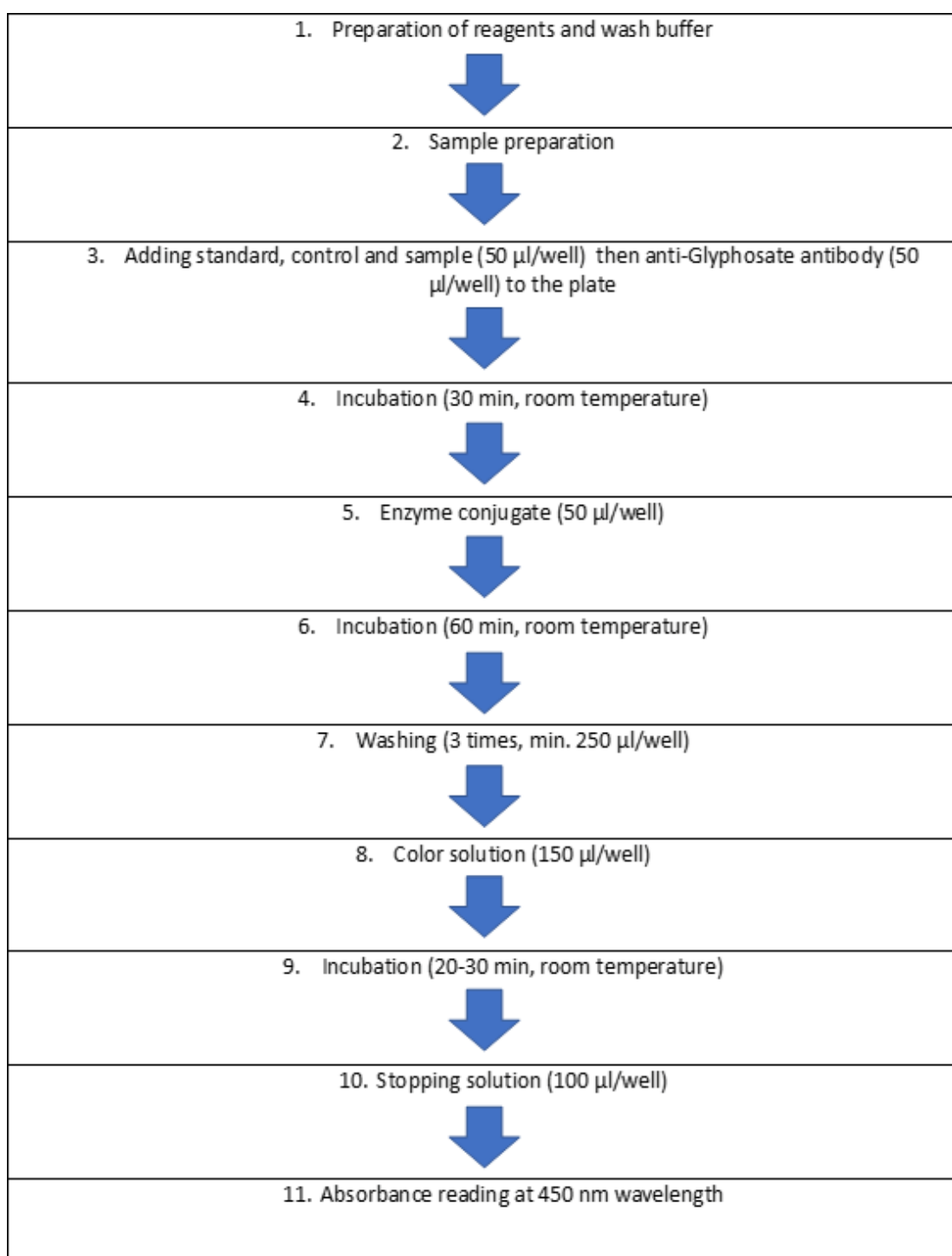
Pentru țesuturile de plante/animale, se adaugă 40 mg de probă și 1 ml de tampon de analiză într-un mortar și se omogenizează cu ajutorul unui pisălog. Se pune întregul extract într-un tub Eppendorf și se centrifughează timp de 10 minute, la 12000 rpm și la temperatura camerei. Extractul din proba de control este supranaturalul.

1. se diluează reactivul de derivatizare cu 3,5 ml de diluant pentru reactiv de derivatizare.
2. se adaugă 1 ml de tampon de analiză la 250 μ l de standarde, control și probe
3. se amestecă în vortex
4. adăugați 100 μ l de reactiv de derivatizare diluat în fiecare tub și amestecați în vortex până când devine omogen,
5. se incubează la temperatura camerei timp de 10 minute.

1.5.4. Procedura de analiză a probei/procedură de analiză

- a. se adaugă 50 μ l de standard derivat, martor sau eșantion (se recomandă utilizarea de triplicat),
 - b. se adaugă 50 μ l de soluție de anticorp anti-Gglicosat în fiecare gode,
 - c. se acoperă placa cu parafilm, se amestecă conținutul și se incubează la temperatura camerei timp de 30 de minute,
 - d. se adaugă 50 μ l de soluție de conjugat enzimatic în fiecare gode,
 - e. se acoperă placa cu parafilm, se amestecă conținutul și se incubează la temperatura camerei timp de 60 de minute,
 - f. se agită energic întregul conținut al godeurilor într-un recipient de deșuri și se spală godeurile de 3 ori cu soluție de spălare 1X (volum de cel puțin 250 μ l/godeu),
- 

- g. se adaugă 150 μl de soluție colorantă în fiecare gode și se incubează timp de 20-30 de minute,
- h. se adaugă 100 μl de soluție de oprire în fiecare gode,
- i. se citește absorbția la 450 nm în termen de 15 minute după etapa h.



Alte posibilități:



Pe lângă acest exemplu, există și alte kituri ELISA disponibile pe piață. Toate acestea se bazează pe reacția anticorp-antigen specifică, dar sunt posibile diferențe minore, de exemplu în ceea ce privește concentrațiile soluțiilor sau procesul. Urmați întotdeauna ghidul producătorului!

1.5.5. Evaluarea

Determinați conținutul de glifosat din probele dumneavoastră pe baza curbei de calibrare.



Unitatea 1.6 Determinarea pesticidelor organoclorurate în îngrășămintele ecologice utilizând GC-MS

Violeta Alexandra Ion,
Oana-Crina Bujor

...

1.6.1. Principiul metodei

Scopul acestei proceduri este de a determina cantitativ reziduurile de pesticide organoclorurate (OCP) din inputurile utilizate în agricultura ecologică (îngrășăminte) prin analiza GC-MS. Metoda se aplică pentru determinarea cantitativă a reziduurilor de pesticide organoclorurate (α -HCH, β -HCH, γ -HCH, δ -HCH, Heptaclor, Aldrin, Heptaclor epoxid, Ensodulfan I, 4,4'-DDE, Dieldrin, Endrin, Endosulfan II, Endrin aldehide, 4,4'-DDD, Endosulfan sulfat, 4,4'-DDT, Metoxiclor, PCB 18, PCB 105, PCB 118, PCB 126, PCB 169) din produsele utilizate ca inputuri în agricultura ecologică. Limita de detecție (LOD) pentru aceste pesticide organoclorurate este: DDT < 0,05 mg/kg de substanță uscată, DDE < 0,05 mg/kg de substanță uscată, DDD < 0,05 mg/kg de substanță uscată, α -HCH < 0,002 mg/kg de substanță uscată, β -HCH < 0,001 mg/kg de substanță uscată, γ -HCH < 0,001 mg/kg de substanță uscată, δ -HCH < 0,001 mg/kg de substanță uscată, total pesticide organoclorurate: < 0,2 mg/kg de substanță uscată, total bifenili policlorurați < 0,01 mg/kg de substanță uscată (MS),



1.6.2. Echipament și reactivi

Reactivi

- Apă ultrapură, clasa 1 (rezistivitate MilliQ de $18 \text{ M}\Omega \times \text{cm}$ la 25°C și COT de 3 ppb);
- Hexan, $\geq 97\%$, grade GC;
- Acetonă, $\geq 99,5 \%$, p.a.;
- Eter de petrol cu un punct de fierbere între 40 și 60°C ;
- Acetat de etil;
- Sulfat de sodiu anhidru $\geq 99\%$, p.a.;
- Clorură de sodiu $\geq 99,8 \%$, p.a..

Condiționarea sulfatului de sodiu anhidru: se usucă timp de 6 ore la 550°C în cuptor, se răcește la aproximativ 200°C și apoi la temperatura camerei într-un desicator care conține material absorbant de umiditate.

Soluție stoc de pesticid (SS) cu o concentrație de $1000 \mu\text{g/mL}$. Se cântărește individual, cu o precizie de $0,1 \text{ mg}$, o cantitate de standard de referință pentru a obține soluții de $1000 \mu\text{g/mL}$ în hexan. La cântărire, se ia în considerare puritatea substanțelor etalon. Aceste soluții sunt stabile timp de 6 luni dacă sunt păstrate la 4°C la întuneric.

Soluția intermediară de pesticid (S1) concentrație $20 \mu\text{g/mL}$. Se pipetează individual $200 \mu\text{L}$ din soluția stoc de $1000 \mu\text{g/mL}$ (SS) într-un balon volumetric de 10 ml . Se completează până la volum cu hexan. Aceste soluții sunt stabile timp de 6 luni dacă sunt păstrate la 4°C la întuneric.



Soluție de lucru pentru pesticide (SL) cu o concentrație de 200 ng/mL. Se pipetează în amestec 10 μL de soluție intermediară (S1) cu o concentrație de 10 $\mu\text{g/mL}$ într-un balon cotat de 10 ml. Se completează până la volum cu hexan. Această soluție este stabilă timp de o lună dacă este păstrată la 4°C la întuneric.

Se pipetează fiecare standard de calibrare pe domeniul 10-150 ng/mL.

Materiale necesare

- 
- ➡ Baloane volumetrice de 5 ml, 10 ml;
 - ➡ pahare Erlenmeyer;
 - ➡ pâlnii de separare cu o capacitate de 500 ml, 1000 ml;
 - ➡ eprubete gradate cu o capacitate de 10 ml și dopuri PTFE;
 - ➡ cartușe SPE din silice și oxid de aluminiu;
 - ➡ Baloane cu fund rotund de 100 ml;
 - ➡ Cilindru gradat de 10 ml;
 - ➡ Hârtie de filtru cu porozitate medie;
 - ➡ Micropipetă de 10 - 100 μL ;
 - ➡ Micropipetă 100 - 1000 μL ;
 - ➡ Filtre cu seringă;
 - ➡ Vortex;
 - ➡ Evaporator rotativ;
 - ➡ Moară de laborator;
 - ➡ Combină frigorifică;
- 

- Balanță analitică;
- Sistem GC-MS;
- Coloană cromatografică HP - UI 5MS, lungime 30 m, diametru intern 0,250 mm, film de 0,25 μm .

1.6.3. Pregătirea probelor

Probele ar trebui să fie pretratate cât mai curând posibil. Păstrați probele într-un loc întunecat, la o temperatură mai mică de 10 °C, dacă este posibil într-un frigider. Pentru testarea OCP și PCB, timpul de depozitare a probelor nu trebuie să depășească 7 zile. Eșantioanele sunt omogenizate dacă sunt neomogene, pentru a obține un eșantion reprezentativ.

Înainte de tratarea probelor, se efectuează determinarea unei probe de control în conformitate cu protocolul de lucru, utilizând aceleași cantități de reactivi ca la extracția, purificarea și analiza unei probe de îngrășământ. Valorile obținute în urma analizei probelor martor trebuie să fie mai mici decât limita de detecție pentru analiții de interes.

a) Extracția probelor solide

Se cântăresc $20 \pm 0,1$ g de probă într-un pahar Erlenmeyer. Se adaugă 50 ml de acetonă la proba de analizat și se agită energic timp de 15 minute cu ajutorul unui agitator la 200 rpm. Se adaugă apoi 50 ml de eter de petrol și se agită timp de 15 minute. Se repetă extracția cu 50 ml de eter de petrol. Se colectează extractele într-o pâlnie de separare de 500 ml și se elimină acetona prin spălare de două ori cu 400 ml de apă.



Se usucă extractul pe sulfat de sodiu, se spală de trei ori cu 10 ml de eter de petrol și se adaugă aceste spălări la extract.

b) Probe cu umiditate ridicată

Se cântăresc $20 \pm 0,1$ g de probe și se pun într-un pahar Erlenmeyer. Se adaugă 50 ml de acetonă la proba de analiză și se agită energic timp de 15 minute la 200 rpm, cu ajutorul unui agitator. Se adaugă apoi 50 ml de eter de petrol și se agită timp de 15 minute. Se repetă extracția cu 50 ml de eter de petrol. În cazul în care conținutul de apă al probei este mai mare de 25 %, se mărește cantitatea de acetonă. Raportul acetonă:apă trebuie să fie de cel puțin 9:1. Raportul acetonă:eter de petrol trebuie menținut constant la 1:2.

Se colectează extractele într-o pâlnie de separare de 1 L și se spală de două ori cu 400 ml de apă pentru a elimina acetona. Se usucă extractul pe sulfat de sodiu anhidru și se transferă extractul uscat în concentrator. Sulfatul de sodiu se spală de trei ori cu 10 ml de eter de petrol și se adaugă aceste spălări la extract. Se concentrează extractul la aproximativ 1 ml pe un evaporator rotativ.

NOTĂ - Temperaturile prea ridicate și un debit mare de azot pot cauza pierderea PCB-urilor și OCP-urilor foarte volatile.



Purificarea extractului



Cu o pipetă, se transferă extractul în SPE cu silicagel sau florisil; se spală de două ori eprubeta gradată cu 1 ml de eter de petrol și se transferă porțiunile de spălare în coloană cu aceeași pipetă imediat ce nivelul lichidului ajunge la partea superioară a umpluturii coloanei. Se eluează cu aproximativ 20 ml de eter de petrol.

Se împarte eluatul în două părți egale și se păstrează o parte pentru o eventuală analiză a extractului diluat. Cealaltă parte a eluatului se concentrează cu un curent slab de azot, fără a se mai încălzi, până la un volum de aproximativ 1 ml.

Prezența sulfului în extractele nepolare de PCB sau OCP poate cauza interferențe în cromatogramă. În cazul în care se suspectează prezența sulfului elementar, acesta se elimină după cum urmează:

Se adaugă 2 ml de reactiv de sulfit TBA la 1 ml de extract concentrat și se agită timp de 1 minut.

Apoi, se adaugă 10 ml de apă și se agită din nou timp de 1 minut.

- Se separă faza organică de apă cu ajutorul unei pipete Pasteur și se adaugă câteva cristale de sulfat de sodiu anhidru pentru a elimina orice urmă de apă rămasă.



Atenție: evaporarea completă a solventului nu este permisă atunci când se utilizează rotoevaporatorul, deoarece dizolvarea pesticidelor este foarte dificilă.

1.6.4. Analizarea probelor

Se injectează 1 μL din soluțiile standard și de probă. Dacă este necesar, se face o diluție a probei. Se identifică vârfurile fiecărui pesticid pe baza timpilor de retenție și a spectrelor de masă. În cazul în care rezultatele calculate pe baza etalonului de lucru indică niveluri de reziduuri de pesticide egale sau mai mari de 50 % din LMR (limita maximă de reziduuri) corespunzătoare, se utilizează o soluție etalon de calibrare pe matricea specifică tipului de probă, preparată prin adăugarea la extractul martor a unor cantități corespunzătoare soluțiilor intermediare ale pesticidelor identificate în soluția de probă, astfel încât dimensiunile vârfurilor acestei soluții etalon de referință să se încadreze în limitele de $\pm 25\%$. Concentrația este calculată automat de software-ul de prelucrare a datelor (concentrația este raportată în ng/mL).

Parametrii metodei sunt:

Injector: volumul probei 1 μL , pulsă fără divizare, temperatura 225 $^{\circ}\text{C}$.

- Cuptorul coloanei GC.

Rampă ($^{\circ}\text{C}/\text{min.}$)	Temperatură ($^{\circ}\text{C}$)	Izotermă (min.)
0	90	1
12	160	5
3	250	1
10	280	3

- Temperatura liniei de transfer: 280 °C.
- Gaz purtător: He cu un debit de 1 ml/min. perature: 280 °C.
- Carrier gas: He with a flow rate of 1 mL/min.

Parametrii MS

- Sursa de ionizare: EI, 230 °C.
- Întârziere cu solvent 15 min.

Rezultate

Concentrația unui analit "x" în proba analizată se calculează luând în considerare concentrația analitului "x" determinată în extractul de probă, prin referire la curba de calibrare a analitului respectiv, care a fost trasată anterior

$$C_p = \frac{C_{ex} \times V_{ex}}{m_p \times S_u} \times R / 1000$$

unde:

C_p – concentrația analitului "x" în proba analizată, (mg/kg substanță uscată)

C_{ex} – concentrația aceluiași analit "x" în extractul probei analizate, (ng/mL);

V_{ex} – volumul de extract obținut în etapa de prelucrare a probei, (ml);

m_p – masa eșantionului prelevat pentru extracție, (g)

S_u – conținutul de substanță uscată al eșantionului, (%);

R – valoarea de recuperare.

Unitatea 1.7. Determinarea erbicidelor triazinice în îngrășăminte ecologice utilizând HPLC-PDA

Violeta Alexandra Ion,
Oana-Crina Bujor

1.7.1. Principiul metodei

...

Metoda se aplică pentru determinarea cantitativă a reziduurilor de erbicide triazinice (Atrazină, Ametrin, Hexazinon, Simazină, Simetrin, Propazină, Prometrin, Terbutilazină) din inputurile utilizate în agricultura ecologică (îngrășăminte) prin UPLC-PDA. Limita minimă de detecție pentru aceste reziduuri de erbicide triazinice este de aproximativ 1 mg/kg de substanță uscată, în funcție de compus.



1.7.2. Echipamente și reactivi

Reagents

- ➡ Apă ultrapură de gradul 1 (MilliQ cu o rezistivitate de 18 MΩ × cm la 25 °C și COT de 3 ppb), CAS: 7732-18-5;
- ➡ Acetonă ≥ 99,5%, p.a., CAS: 67-64-1;
- ➡ Clorură de sodiu ≥ 99,8 %, p.a., CAS: 7647-14-5;
- ➡ Eter de petrol cu punct de fierbere între 40 și 60°C, CAS: 64742-49-0;
- ➡ Acetat de etil > 99%, CAS: 141-78-6;
- ➡ Sulfat de sodiu anhidru ≥ 99%, p.a., CAS: 7757-82-6;
- ➡ Acetonitril pentru HPLC, 99,9%, CAS: 75-05-8;

Condiționarea sulfatului de sodiu anhidru: se usucă timp de 6 ore la 550 °C în cuptor, se răcește la aproximativ 200 °C și apoi se menține la temperatura camerei într-un desicator care conține material absorbant de umiditate.

Soluție stoc de pesticid (SS) cu o concentrație de 1000 µg/mL. Se cântărește individual, cu o precizie de 0,1 mg, o cantitate de standard de referință pentru a obține soluții de 1000 µg/mL în metanol. La cântărire, se ia în considerare puritatea substanțelor etalon. Aceste soluții sunt stabile timp de 6 luni dacă sunt păstrate la 4°C la întuneric.

! Atenție! Simazina este solubilă numai în acetonă!

Soluția intermediară de pesticid (S1) concentrație 100 µg/mL. Se pipetează 2 ml din soluția de Hexazinonă (SS) de 1.000 µg/mL și 1 ml din soluția de 1.000 µg/mL (SS) a celorlalte erbicide într-un pahar de 10 ml. Se completează până la volum cu metanol. Aceste soluții sunt stabile timp de 3 luni dacă sunt păstrate la 4°C, la întuneric.

! Atenție! Fiecare soluție stoc de erbicid este supusă la ultrasunete înainte de preparare pentru a asigura o redisoluție completă!

Soluție de lucru pentru pesticid (SL) cu o concentrație de 10 µg/mL. Se pipetează 1 ml de soluție intermediară (S1) de concentrație 100 µg/mL în BC de 10 ml. Se completează până la volum cu metanol. Această soluție este stabilă timp de 1 lună dacă este păstrată la 4°C la întuneric.

Se pipetează fiecare standard de calibrare pe curba de calibrare (0,2 - 20 µg/mL) pentru Hexazinonă și (0,1 - 10 µg/mL) pentru celelalte erbicide.

Materiale necesare

- 
- ➔ Baloane volumetrice de 5 ml, 10 ml;
 - ➔ pahare Erlenmeyer de 100 ml;
 - ➔ baloane cu fundul rotund în formă de pară;
 - ➔ cartușe de silice SPE;
 - ➔ cilindri gradati de 10 ml, 25 ml, 50 ml, 500 ml;
 - ➔ Micropipetă de 10 - 100 μ L;
 - ➔ Micropipetă 100 - 1 000 μ L;
 - ➔ Filtre cu seringă de 0,45 μ m;
 - ➔ Flacoane pentru autosampler;
 - ➔ Vortex;
 - ➔ Frigider;
 - ➔ Sistem Rotavapor;
 - ➔ Sistem SPE;
 - ➔ Agitator orbital;
 - ➔ Balanță analitică;
 - ➔ Sistem UPLC cuplat cu detector PDA;
 - ➔ Coloană cromatografică C18, 4,6 x 100 mm, 5 μ m.
- 

1.7.3. Prepararea soluțiilor

Se determină conținutul de apă și de substanță uscată al unui eșantion de testare în conformitate cu procedurile standard de determinare a umidității. La masa eșantionului se adaugă o cantitate specifică de apă calculată conform ecuației 1 (fiecare eșantion preparat va avea o masă de apă de 100 g).

$$m_w = 100 - \frac{m_s \times w_w}{100}$$

unde:

m_w - masa de apă adăugată, exprimată în g;

m_s - masa probei, exprimată în g;

w_w - fracția masică de apă, exprimată în %..

Notă: Este important ca adaosul de apă să aibă un raport fix (apă:acetonă:eter de petrol/acetat de etil de 1:2:1,5). În aceste condiții, faza organică va reprezenta nivelul superior.

Extracția probelor și distribuția lichid/lichid

Se cântărește un eșantion de 5,0 g pentru analiză pe o balanță tehnică (cu o precizie de 0,1 g) într-un pahar Erlenmeyer de 100 ml. Se adaugă x grame de apă și 20 ml de acetonă. Închideți paharul Erlenmeyer cu un dop de sticlă corespunzător și agitați timp de 5 ore cu ajutorul unui agitator mecanic. În timpul agitării se va observa amestecul celor două faze. Se adaugă apoi 3 g de clorură de sodiu și 15 mL de eter de petrol/acetat de etil. Se agită din nou timp de 15 minute.

Concentrarea și dizolvarea probelor

Se transferă 14 ml de fază organică pe sulfat de sodiu anhidru, poziționat într-o pâlnie de filtrare, cu o pipetă Pasteur într-un balon în formă de pară de 50 ml, apoi se concentrează pe o baie de apă la maximum 40 °C sub vid, cu ajutorul rotavaporului. Se adaugă 2 ml de acetonitril înainte ca proba să ajungă la uscăciune. Eterul de petrol se evaporă în continuare sub un curent de azot, fără a-l aduce la uscăciune, lăsând doar



acetonitril conținând extractul de interes. Se amestecă în vortex tubul cu extract de acetonitril. Se adaugă încă 2 ml de acetonitril în tubul de centrifugare, se vortexează și se transferă peste extractul original din tubul de sticlă.

Se ajustează volumul extractului în acetonitril la 1 ml și se adaugă încă 1 ml de apă ultrapură. Se amestecă în vârtej, apoi se filtrează proba cu o seringă de unică folosință la care este atașat un filtru cu porozitate de 0,45 μm. Filtratul se colectează într-un flacon pentru autosampler. Extractul se injectează apoi și se supune analizei UPLC-PDA.

Notă: Această metodă poate fi utilizată și pentru extragerea altor compuși, cum ar fi bifenilii policlorurați (PCB) sau hidrocarburile aromatice policiclice (HAP) din îngrășăminte.

Notă: Eșantioanele de îngrășăminte cu o concentrație mare de materie organică pot prezenta interferențe de vârf. Dacă este necesar, extractele vor fi purificate cu ajutorul unor adsorbanti (silicagel sau florisil).

1.7.4. Analiza probelor

Pentru analiza cromatografică a pesticidelor, se va utiliza sistemul cromatografic UHPLC cu detector PDA. Ținând cont de specificațiile pentru coloana cromatografică analitică și faza mobilă din standardul SR ISO 15662:2009, se vor utiliza următoarele condiții de lucru:

- Volum de injecție: 10 μL
- 

- Temperatura autosamplerului: 10 °C;
- Temperatura cuptorului pentru coloană: 30 °C;
- FMA1: Apă;
- FMB1: Acetonitril;
- Debit: 1 ml/min;
- Scanarea spectrului în intervalul: 210 - 320 nm;
- Lungimi de undă de scanare: 220 nm, 245 nm.
- Gradient:

Timp	A1 %	B1 %
Initial	85	15
5	85	15
25	40	60
30	85	15
33	85	15

Rezultate

Concentrația unui analit "x" în proba analizată se calculează luând în considerare concentrația analitului "x" determinată în extractul de probă, prin referire la curba de calibrare a analitului respectiv, care a fost trasată anterior.

$$C_p = \frac{C_{ex} \times V_{ex}}{m_p \times S_u} \times R$$

unde:

C_p – concentrația analitului x în proba analizată, (mg/kg de substanță uscată);



C_{ex} – concentrația aceluiași analit x în extractul probei analizate, (ng/mL);

V_{ex} – volumul de extract obținut în etapa de prelucrare a probei, (ml);

m_p – masa eșantionului prelevat pentru extracție, (g);

S_u – conținutul de substanță uscată al eșantionului, (%);

R – valoarea de recuperare.



Unitatea 1.8. Determinarea dioxinelor și a furanilor în îngrășăminte ecologice cu ajutorul GC-MS/MS

Violeta Alexandra Ion,
Oana-Crina Bujor

1.8.1. Principiile metodei

...

Scopul acestei proceduri este determinarea cantitativă a dioxinelor (PCDD) și a furanilor (PCDF) în inputurile utilizate în agricultura ecologică (îngrășăminte) prin GC-MS/MS.

Metoda se aplică pentru determinarea cantitativă a reziduurilor de dioxine și furani (2,3,7,8-TeCDF; 2,3,7,8-TeCDD; 1,2,3,7,8-PeCDF; 2,3,4,7,8-PeCDF; 1,2,3,7,8-PeCDD; 1,2,3,7,8-PeCDD; 1,2,3,4,7,8-HxCDF; 1,2,3,6,7,8-HxCDF; 2,3,4,6,7,8-HxCDF; 1,2,3,4,7,8-HxCDD; 1,2,3,6,7,8-HxCDD; 1,2,3,7,8,9-HxCDD; 1,2,3,7,8,9-HxCDF; 1,2,3,4,6,7,8,8-HpCDF; 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD; 1,2,3,4,7,8,9-HpCDF; OCDD și OCDF) din inputurile agricole, utilizând GC-MS QQQ. Limita minimă de determinare a cantității de dioxine (PCDD) este de 0,0001 mg/kg de substanță uscată. Limita minimă de determinare a cantității totale de furani (PCDF) este de 0,0001 mg/kg materie uscată.



1.8.2. Echipamente și reactivi

Reactivi

- ➡ Toluen, pentru GC, CAS: 108-88-3;
- ➡ n-Nonan, > 99 %, CAS: 111-84-2;

➡ Hexan $\geq 97\%$, HPLC, CAS: 60-29-7;

➡ Sulfat de sodiu anhidru, $\geq 99\%$, p.a., CAS: 7757-82-6.

Condiționarea sulfatului de sodiu anhidru: se usucă timp de 6 ore la $550\text{ }^{\circ}\text{C}$ în cuptor, se răcește la aproximativ $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ și apoi se menține la temperatura camerei într-un desicator care conține material absorbant de umiditate.

Soluție stoc de pesticid (SS) cu o concentrație de $1000\text{ }\mu\text{g/mL}$. Se cântărește individual, cu o precizie de $0,1\text{ mg}$, o cantitate de standard de referință pentru a obține soluții de $1000\text{ }\mu\text{g/mL}$ în metanol. La cântărire, se ia în considerare puritatea substanțelor etalon. Aceste soluții sunt stabile timp de 6 luni dacă sunt păstrate la 4°C la întuneric.

Se amestecă 25 de analiți în n-nonan, concentrații diferite (ex: <https://www.lgcstandards.com/IT/en/Modified-Method-8280-Calibration-Solutions-CC5-/p/CIL-EDF-4095-5#multianalytetable>).

Soluții standard de dioxine și furani

Soluție stoc (SS) amestec de 25 de analiți în n-nonan, la diferite concentrații. Se recomandă achiziționarea de soluții gata preparate pentru a minimiza riscurile pentru sănătate (a se vedea fișa cu date de securitate a analitului). Se fac diluții la soluția stoc pentru a se ajunge la 5 puncte de concentrație, cea mai mare fiind soluția stoc.

Materialle necesare

➡ Baloane volumetrice de 5 ml, 10 ml;

➡ Pahare Erlenmeyer;

➡ Pâlnii de separare cu o capacitate de 500 ml, 1 000 ml;

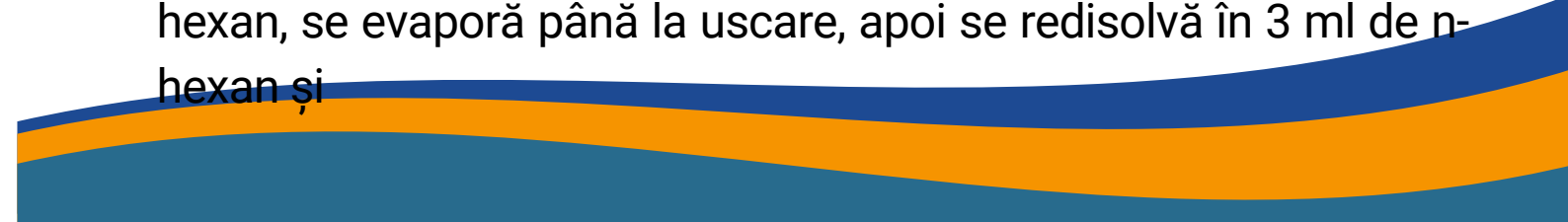
➡ Eprubete gradate cu o capacitate de 10 mL și PTFE

dopuri;

- 
- ➡ cartușe SPE din silice și oxid de aluminiu;
 - ➡ Baloane cu fund rotund de 100 ml;
 - ➡ Cilindru gradat de 10 ml;
 - ➡ hârtie de filtru cu porozitate medie;
 - ➡ Micropipetă 10 - 100 μL ;
 - ➡ Micropipetă 100 - 1.000 μL ;
 - ➡ Filtre cu seringă;
 - ➡ Vortex;
 - ➡ Evaporator rotativ;
 - ➡ Moară de laborator;
 - ➡ Combină frigorifică;
 - ➡ Balanță analitică;
 - ➡ Sistem GC MS/MS;
 - ➡ Coloană cromatografică HP-UI 5MS, lungime 30 m, diametru in. 0,250 mm, peliculă de 0,25 μm .

1.8.3. Pregătirea probelor

10 g de sol sunt îmbogățiți cu standarde interne (SI) care conțin compuși marcați cu ^{13}C (EPA 1613 LCS) ca surogat. Extracția se realizează cu ajutorul unui sistem ASE cu setările instrumentului după cum urmează: 170°C, 1500 psi, spălare la 70% vol., 2 cicluri statice de 6 minute și toluen ca solvent de extracție. Alimentele sunt evaporate cu ajutorul unui evaporator rotativ, solventul este înlocuit cu n-hexan, iar probele sunt transferate printr-o coloană de gel de silice multistrat preechilibrată cu 25 ml de n-hexan. După eluția cu 100 ml de n-hexan, se evaporă până la uscare, apoi se redissolvă în 3 ml de n-hexan și





transferul printr-o coloană SPE care conține carbon activat pentru a separa PCDD/Fs. Coloana SPE cu carbon activ a fost pre-spălată cu 50 ml de amestec DCM-hexan (1:1, v/v) pentru a separa materialul care interferează, iar extractul a fost eluat cu 100 ml de toluen. Extractul eluat a fost evaporat până la uscare cu azot, redisolvat în 25 μL de nonan și s-a adăugat un standard intern cu o concentrație finală de 100 ng/mL. Probele sunt apoi injectate în GC-MS/MS.

1.8.4. Analiza probelor

Se injectează 3 μL din soluțiile standard și de probă. Dacă este necesar, se face o diluție a probei. Se identifică vârfurile fiecărui analit pe baza timpilor de retenție și a spectrului de masă.

În cazul în care rezultatele calculate pe baza etalonului de lucru indică niveluri de reziduuri de contaminanți egale sau mai mari de 50 % din limita maximă de reziduuri (LMR) corespunzătoare, se prepară o soluție etalon de calibrare a matricei specifică tipului de eșantion, prin adăugarea la extractul alb a unor cantități de soluții intermediare corespunzătoare de pesticide identificate în soluția de eșantion, astfel încât dimensiunile vârfurilor acestei soluții etalon de referință să se încadreze în limitele de $\pm 25\%$.

Concentrația este calculată automat de software-ul de prelucrare a datelor (concentrația este raportată în ng/mL).

Parametrii metodei sunt:

Injector: volumul probei 3 μL , divizare 5:1, temp. 250°C;

- temperatura liniei de transfer: 280°C;

- Gaz purtător: He cu un debit de 1 ml/min.;
- Parametrii MS QQQ;
- Sursă de ionizare: EI, 230°C;
- Întârziere solvent 8 min;
- GC Cuptor pentru coloană:

Rampă (°C/min.)	Temperatură (°C)	Izotermă (min.)
0	120	5
25	250	10
2	260	5
2	285	0
10	320	5

Results

Concentrația unui analit x în proba analizată se calculează ținând seama de concentrația analitului x determinată în extractul de probă, prin raportare la curba de calibrare a analitului respectiv, care a fost trasată anterior.

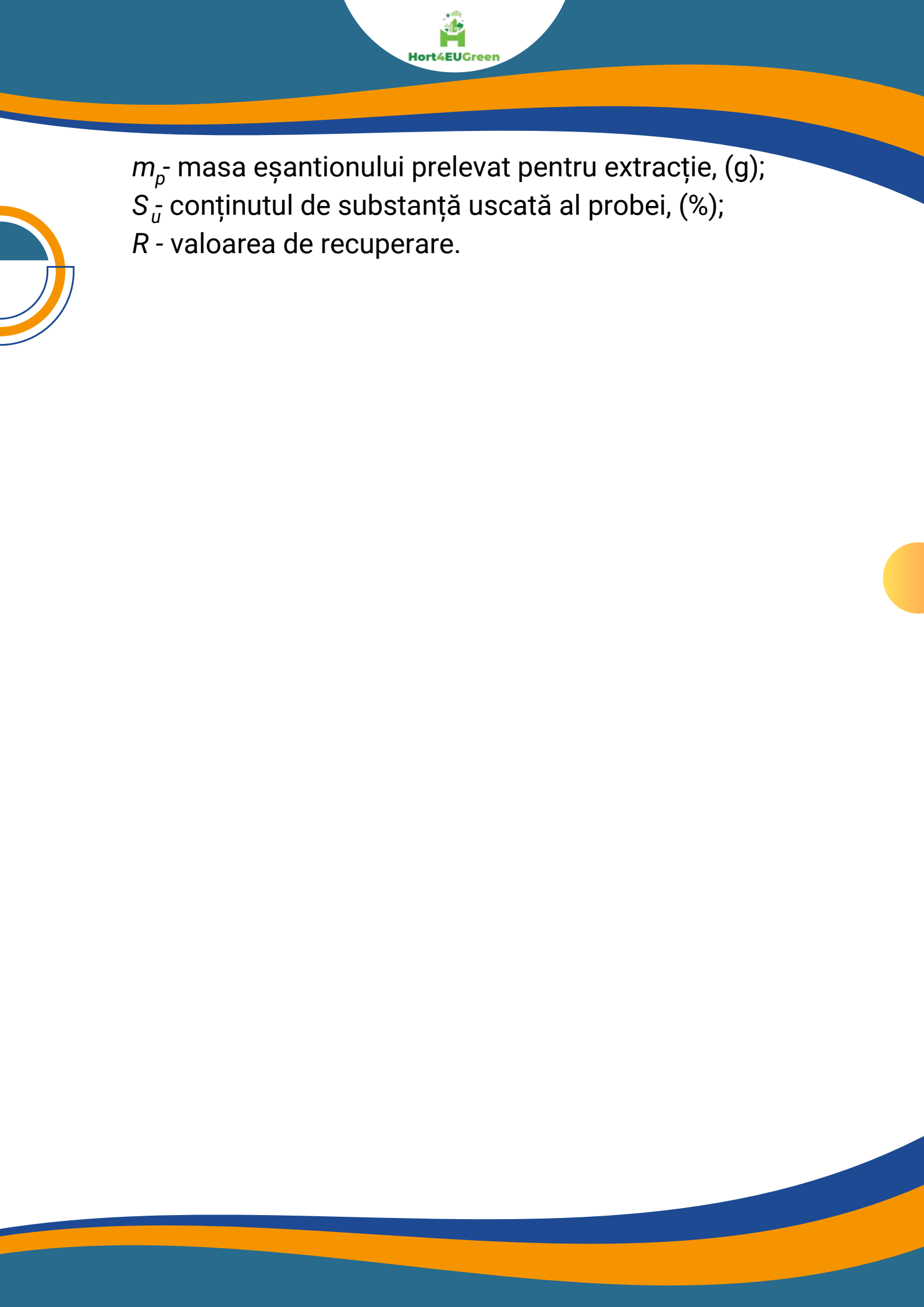
$$C_p = \frac{C_{ex} \times V_{ex}}{m_p \times S_u} \times R / 1000$$

unde:

C_p - concentrația analitului x în proba analizată, (mg/kg substanță uscată);

C_{ex} - concentrația aceluiași analit x în extractul din proba analizată, (ng/mL);

V_{ex} - volumul extractului obținut în etapa de prelucrare a probei, (mL);



m_p - masa eșantionului prelevat pentru extracție, (g);
 $S_{\bar{u}}$ conținutul de substanță uscată al probei, (%);
 R - valoarea de recuperare.



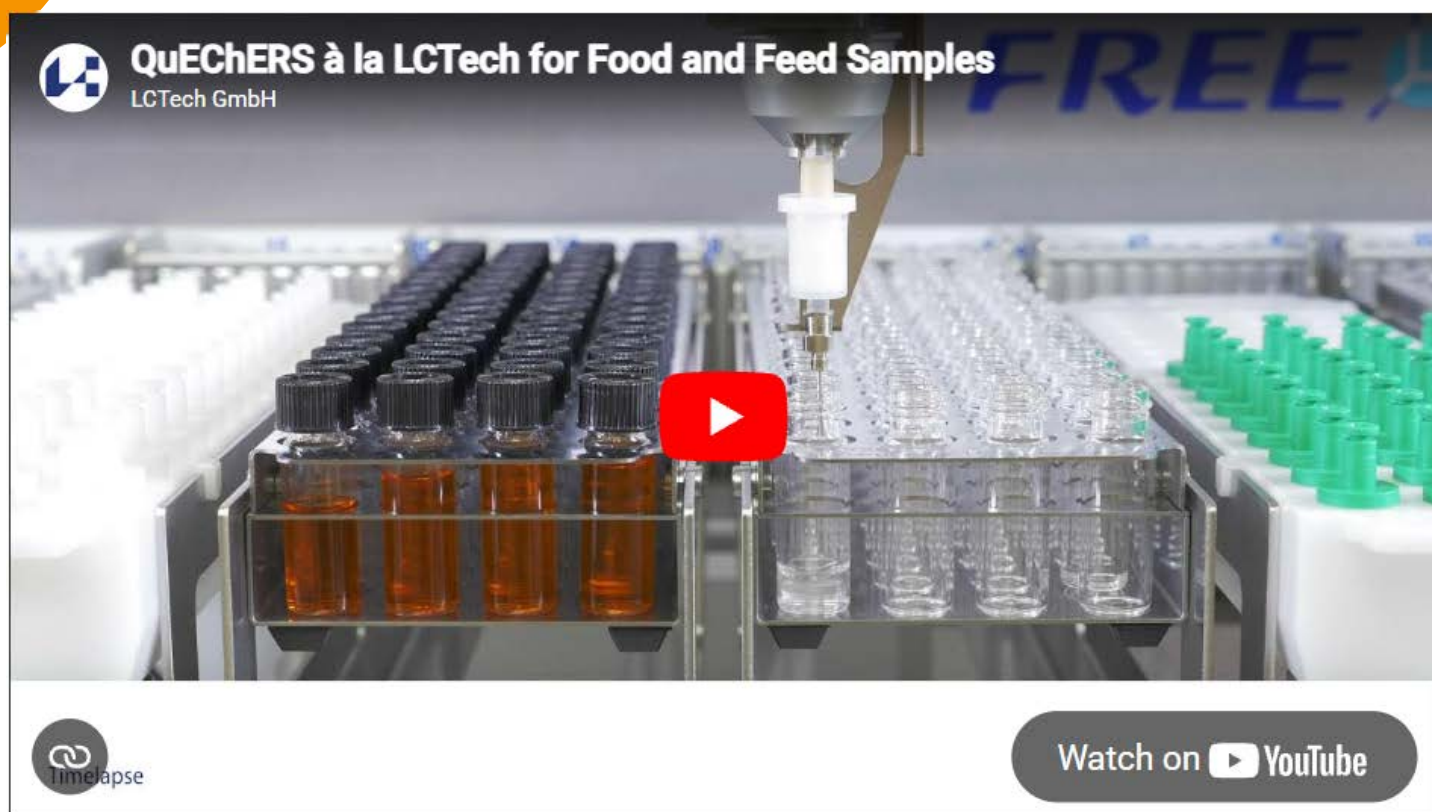
REFERINȚE

- Anastassiades, M., Lehotay, S.J., Stajnbaher, D. & Schenck, F.J., (2003). Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. J. AOAC Int., 86: 412. (doi: 10.1093/jaoac/86.2.412)
- Majzik-Solymos, E., Visi, É., Károly, G., Beke-Berczi, B. & Győrfi, L. (2001). Comparison of extraction methods to monitor pesticide residues in surface water. J. Chromatogr. A, 39: 325-331. (doi: 10.1093/chromsci/39.8.325)
- Mörthl, M., Kereki, O., Darvas, B., Klátyik, Sz., Vehovszky, Á., Győri, J. & Székács, A. (2016). Study on Soil Mobility of Two Neonicotinoid Insecticides. J. Chem., 2016: Article ID 4546584. (doi: 10.1155/2016/4546584; accessed on 24 February 2023)
- Mörthl, M., Klátyik, S., Molnár, H., Tömösközi-Farkas, R., Adányi, N. & Székács, A. (2018). The effect of intensive chemical plant protection on the quality of spice paprika. J. Food Compos. Anal., 67: 141–148. (doi: 10.1016/j.jfca.2017.12.033; accessed on 24 February 2023)
- Székács, A., Mörthl, M. & Darvas, B. (2015). Monitoring Pesticide Residues in Surface and Ground Water in Hungary: Surveys in 1990–2015. J. Chem., 2015: Article ID 717948. (doi: 10.1155/2015/717948; accessed on 24 February 2023)
- UCT LLC 2019. QuEChERS booklet. Bristol, PA, USA: UCT LLC, pp. 1-22. (www.unitedchem.com/wp-content/uploads/2016/03/QuEChERS-Booklet.pdf; accessed on 24 February 2023)
- Madjar, R. M., Bădulescu, L., Ion, V.A., Moț, A., Dobrin, A., Constantin, C. G., Bujor-Nenița, O.C., Barbu, A., Scăețeanu, G., Cioroianu, T.M., Sîrbu, C.E., Grigore, A. E., Mărin, N., Stănescu, A-M, Mihalache, D. & Ianuc, M. (2022). Ghid de bune practici privind metodele de analiză a nutrienților și contaminanților din inputuri utilizate în agricultura ecologică, EDITURA EX TERRA AURUM, București
- Kwon, Y.S., Choi, S-G., Lee, S-M., Kim, J-H. & Seo, J-S., (2019). Gas Chromatography–Triple Quadrupole Mass Spectrometry Analysis of Dioxins in Soil, Acta Chromatographica 31(3), 235-240.
- EPA Method 1613 Tetra-through Octa-Chlorinated Dioxins and Furans by Isotope Dilution HRGC/HRMS.
- Kishida, M., Maekawa, T. & Bandow, H., (2010). Effect of extraction temperature on pressurized liquid extraction of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, polychlorinated dibenzofurans, and dioxin-like polychlorinated biphenyls from a sediment sample using polar and non-polar solvents, Analytica Chimica Acta 659, 186-193.





Sursa aici



Sursa aici

Remain In Touch



UNIVERSITY
OF AGRONOMIC SCIENCES
AND VETERINARY MEDICINE
OF BUCHAREST

☎ 021 318 2266

🌐 <https://hortgreen.com/>

📍 Address: Bulevardul Mărăști 59, București 011464

