

Primjena ekstrakcijskih metoda za pesticide

Kovač, Jelena

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:236697>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-20**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijски odsjek

Jelena Kovač

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

PRIMJENA EKSTRAKCIJSKIH METODA ZA PESTICIDE

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za analitičku kemiju

Mentor rada: prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić

Zagreb, 2023.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

6. lipnja 2023.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

8. rujna 2023.

Mentor rada: prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić

Potpis:

Sadržaj

§ SAŽETAK.....	VII
§ 1. UVOD	1
§ 2. EKSTRAKCIJA PESTICIDA IZ UZORAKA	3
2.1. Pesticidi	3
2.2. Ekstrakcijske metode za određivanje pesticida	7
2.2.1. Ekstrakcija tekuće-tekuće	9
2.2.2. Disperzivna mikroekstrakcija tekuće-tekuće.....	12
2.2.3. Ekstrakcija na čvrstoj fazi	14
2.2.4. Mikroekstrakcija na čvrstoj fazi.....	17
2.2.5. Magnetska ekstrakcija na čvrstoj fazi	21
2.3. Zaključak	25
§ 3. LITERATURNI IZVORI.....	XXVI
§ 4. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA.....	XXIX

§ Sažetak

Pesticidi su tvari i smjese tvari koje se koriste za suzbijanje, iskorjenjivanje i sprečavanje pojave organizama koji se smatraju štetnima. Zbog svoje široke i česte, nažalost, nedovoljno kontrolirane primjene u poljoprivredi, šumarstvu, kućanstvima i industriji, neželjeni ostaci pesticida nalaze se u tlu, vodi i hrani. Suvremena proizvodnja prehrambenih proizvoda je gotovo u potpunosti ovisna o upotrebi pesticida. Porast zagađenja prehrambenih proizvoda ostacima pesticida doveo je do povećane potrebe za otkrivanjem načina za njihovo detektiranje, kvantificiranje i uklanjanje. Usprkos brojim regulativama i pravilima nepredviđeni događaji povezani s pesticidima i dalje su česti i zabrinjavajući zbog njihovog štetnog utjecaja na ljudski organizam. Određivanje koncentracije pesticida u realnim uzorcima kao što su primjerice voda, hrana i tlo sastoji se od pripreme uzorka, detekcije i kvantifikacije spojeva te obrade podataka. Ekstrakcija analita je dio pripreme uzorka te je jedan od prvih koraka u kemijskoj analizi. Cilj je odvojiti pesticide iz matrice uzorka kako bi se dobili što precizniji i točniji rezultati njihove analize. U ovome su radu opisane najčešće metode ekstrakcije pesticida iz različitih realnih uzoraka te je dan pregled njihovog utjecaja na ljude i okoliš.

§ 1. UVOD

Zbog sve veće potražnje za namirnicama biljnog porijekla i njihovim uzgojem, raste upotreba pesticida u svijetu, s ciljem očuvanja usjeva od nametnika. Pesticidi su tvari koje se koriste za suzbijanje nametnika na biljkama i životinjama najčešće u poljoprivredi, ali i u drugim područjima, kao što je javno zdravstvo, komunalna higijena i veterinarstvo. Jedni su od najopasnijih zagađivača zbog svoje različite topljivosti, mobilnosti i akumulacije u okolišu, čime dugoročno mogu utjecati na ljudski organizam. Ostaci pesticida nađeni su u mnogim uzorcima iz prirode, uključujući niske koncentracije nekih koji već duže vrijeme nisu u upotrebi. Najčešće zaostaju u vodenom okolišu i kompleksnijim matricama poput tla, pri niskim koncentracijama, ali iznimno dugo što otežava pripremu uzoraka za analizu, kojoj je jedan od ciljeva ne dodatno zagađiti okoliš. Zbog široke primjene pesticida mnoge su vrste nametnika, na koje bi pesticidi trebali djelovati, razvile toleranciju na njih. Pesticidi se razlikuju po kemijskoj strukturi, načinu djelovanja i eliminacije iz organizma, biotransformaciji te po toksičnosti. Njihovo se korištenje regulira brojnim zakonima i direktivama, ali su i dalje prisutne nesreće i trovanja. Osim toga, izlaganje pesticidima povezano je s brojem bolestima i poremećajima. Svake godine zabilježi se oko 385 milijuna slučajeva trovanja pesticidima diljem svijeta. Posebno su izloženi stanovnici u ruralnim područjima globalnog juga. U tim se područjima još proizvode i izvoze pesticidi koji su u Europi zabranjeni zbog ekoloških i zdravstvenih razloga.

Ostaci pesticida u hrani mogu biti štetni za zdravlje ljudi. Toksično djelovanje pesticida može dovesti do značajnih poremećaja u sustavima kao što su imunološki, krvožilni, živčani ili reproduktivni, gdje uzrokuju smanjenje reproduktivne sposobnosti i neplodnost, dok kod trudnica mogu povećati rizik za spontani pobačaj ili prijevremeni porod. Unatoč pokušajima da se propisi standardiziraju globalno, maksimalni dozvoljeni ostatak pesticida u hrani drugačiji je od države do države. ¹

Određivanje pesticida u uzorcima sastoji se od pripreme uzoraka, odnosno homogenizacije, ekstrakcije i pročišćavanja od matrice te odvajanja, detekcije, kvantifikacije i obrade podataka. Metode analize pesticida i njihovih ostataka najčešće uključuju vezane sustave kromatografskih metoda i spektrometrije masa kao što su primjerice tekućinska (engl.

Liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS) i plinska kromatografija sa spektrometrom masa kao detektorom (engl. *Gas chromatography-mass spectrometry*, GC-MS) te elektrokemijski i optički senzori te imunosenzori. Svaka od navedenih analitička metoda ima svoje prednosti i nedostatke, ali pominim odabirom cijelog analitičkog postupka, moguće je dobiti vrlo precizne i točne rezultate.

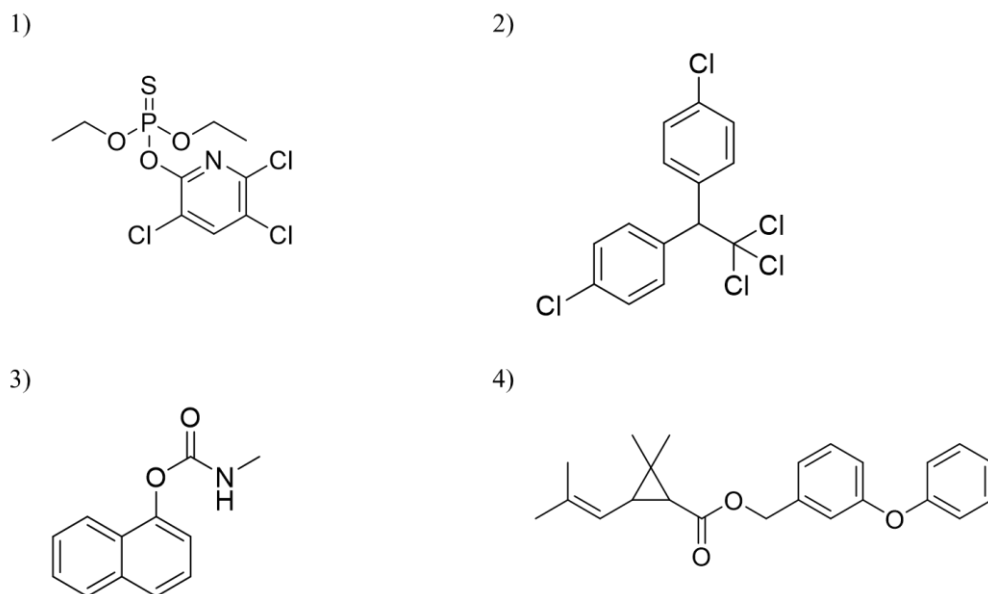
Prije instrumentne analize većinu realnih uzorka potrebno je prevesti u pogodan oblik za mjerenje pri čemu se koriste različite metode pripreme uzorka. Uzimajući u obzir očuvanje okoliša, razvijene su metode priprave uzorka u okviru „zelene kemije“ koje većinom ne koriste ili koriste iznimno malu količinu toksičnih otapala. Ekstrakcija je često prvi korak u postupku analize uzorka, a cilj je odvojiti što više analita, u ovom slučaju pesticida, od ostatka matrice koji se ne analizira i često otežava analizu. Brojni čimbenici utječu na odabir metode ekstrakcije, kao što su vrsta uzorka i analita, jednostavnost, točnost, preciznost i selektivnost metode, cijena i vrijeme analize, dostupnost instrumenata i ostalih materijala te utjecaj na okoliš.¹⁻⁴

§ 2. EKSTRAKCIJA PESTICIDA IZ UZORAKA

2.1. Pesticidi

Tvari i smjese tvari koje se koriste za suzbijanje, iskorjenjivanje i sprečavanje pojave organizama koji se smatraju štetnima obuhvaćene su pojmom „pesticidi”. Općenita definicija dana je u dokumentu Međunarodne organizacije Ujedinjenih naroda za poljodjelstvo i hranu (engl. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, FAO) pod nazivom *International Code of Conduct on the Distribution and Use of Pesticides*: „Pesticid je bilo koja tvar ili mješavina tvari namijenjena sprječavanju, uništavanju ili suzbijanju bilo kojeg štetnika, kao što su prenositelji bolesti u ljudi ili životinja, neželjene vrste biljaka ili životinja koje uzrokuju štetu tijekom proizvodnje, prerade, pohranjivanja, transporta ili trgovine hranom, poljodjelskim proizvodima, drvetom i drvnim proizvodima kao i stočnom hranom.“⁵

Prema mjestu primjene u pesticide se ubrajaju sredstva za zaštitu biljaka koja se koriste u poljoprivredi, hortikulturi, parkovima i vrtovima, ali i biocidni proizvodi koji se koriste za dezinfekciju ili zaštitu materijala. Pesticidima se često nazivaju sredstva za zaštitu bilja, iako je taj pojam širi te uključuje i veterinarske pripravke za suzbijanje nametnika na životinjama te sredstva za sanitarnu higijenu i sredstva opće uporabe koje služe suzbijanju nametnika na ljudima. Prema ciljnoj skupini djelovanja pesticidi su razvrstani u 11 skupina: akaricidi suzbijaju grinje, algicidi suzbijaju rast algi, avicidi odbijaju ptice od usjeva, baktericidi sprečavaju rast bakterija, fungicidi sprečavaju rast gljivica, herbicidi suzbijaju rast korova, insekticidi suzbijaju štetne kukce, moluscidi djeluju na puževe, nematocidi suzbijaju nematode, rodenticidi suzbijaju glodavce i virucidi koji sprečavaju virozu. Prema porijeklu pesticidi mogu biti neorganske tvari kao i tvari iz biljaka, bakterija i gljiva. Još jedan način podjele pesticida je prema njihovom sastavu, prema kojem se dijele na: organofosforne, organoklorone, karbamate i piretroide (slika 1).^{5,6}



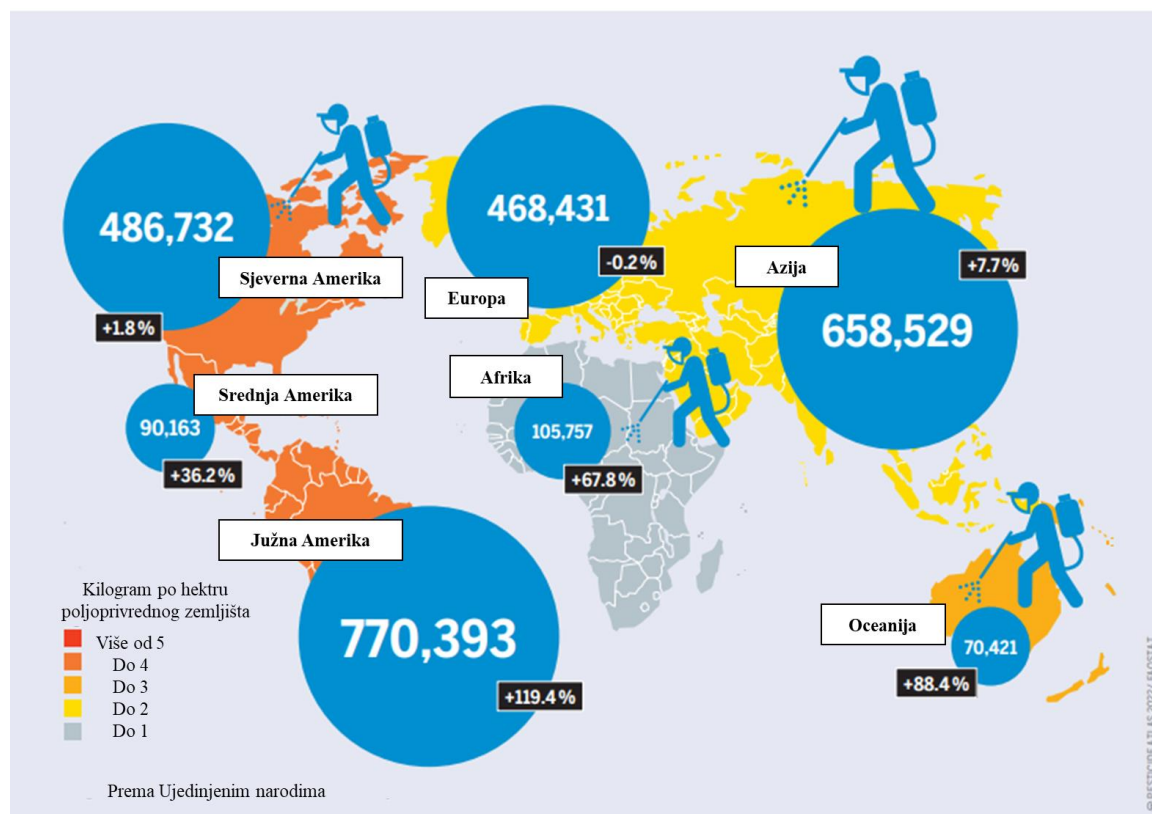
Slika 1. 1) organofosforni insekticid klorpirifos, 2) organoklorni insekticid DDT (diklorodifeniltrikloroetan), 3) karbamatni insekticid karbaril (1-naftilmetilkarbamat), 4) piretroidni insekticid D-fenotrin.

Strukture su nacrtane u programu *ChemDraw 19.0*.

Prema utjecaju pesticida na čovjeka, možemo ih razvrstati u skupine akutne otrovnosti i opasnosti na osnovu orijentacijske srednje LD_{50} vrijednosti pokusnih životinja izražene u mg tvari po kilogramu tjelesne mase životinje (najčešće štakora). Vrijednost LD_{50} definirana je s otrovnosti pesticida, načinu ulaska u organizam te fizikalnim svojstvima aktivne tvari pesticida. Na popisu Svjetske zdravstvene organizacije tvari su razvrstane u skupine od krajnje opasnih do sasvim neznatno opasnih te je dan poseban popis onih tvari koje pri normalnoj upotrebi nisu opasne u smislu njihove akutne otrovnosti. ⁷ Na temelju vrijednosti LD_{50} pokusnih životinja u Republici Hrvatskoj postoji Pravilnik o mjerilima za razvrstavanje otrova u skupine ovisno o vrsti rizika prisutnih kod uporabe. ⁸

Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije, upotreba pesticida se u posljednjih nekoliko godina znatno povećala u odnosu na 1990-e godine. Masa korištenih pesticida s obzirom na površinu poljoprivrednog zemljišta iznosila je 1,8 kg/ha u 2020., dok je 90-ih iznosila 1,2 kg/ha. Primijećeno je povećanje upotrebe herbicida te smanjenje upotrebe fungicida i insekticida. ⁹

Na slici 2 prikazano je znatno povećanje uporabe pesticida u cijelom svijetu, a osobito na američkom kontinentu, zatim australskom i azijskom. ¹



Slika 2. Svjetska upotreba pesticida, izražena u tonama po kontinentima u 2020. te promjena od 1999. u postocima. Preuzeto i prilagođeno iz ref. 1.

Na slici 2 vidi se znatno povećanje u 2020. u usporedbi s 1999. godinom (označeno u postocima, %), osobito u Južnoj Americi gdje je zabilježeno najveće povećanje od 119,4 %.¹

Prema procjenama Organizacije za prehranu i poljoprivredu, do 2050. bit će potrebno povećanje proizvodnje hrane za 70 %, kako bi se prehranilo svjetsko stanovništvo. Jedan od načina dovoljnog povećanja poljoprivredne proizvodnje je primjena pesticida za kontrolu nametnika. Prekomjerna uporaba, pogrešno rukovanje pesticidima i često loša zakonska regulativa uzrokuju onečišćenje okoliša, a nerijetko se događaju nenamjerna trovanja i smrtonosne nesreće. Zbog mogućih toksičnih učinaka pesticida na zdravlje ljudi i okoliš, u svijetu postoje strogi propisi za njihovu registraciju i uporabu, a posebice u razvijenim zemljama. Europska unija razvila je različite programe za sustavno preispitivanje novih aktivnih tvari i ocjene odobrene aktivne tvari. Kako je dostupno više informacija o njihovom ponašanju i učincima na okoliš, broj odobrenih spojeva značajno se smanjio. S obzirom na posljedice prekomjerne uporabe pesticida, ulažu se naponi kako bi se smanjila njihova uporaba bez negativnih učinaka na produktivnost i profitabilnost farmi. Novi uvidi o sudbini i ponašanju

pesticida i produkata njihovog raspada u različitim dijelovima okoliša potrebni su za procjenu potencijala rizika. Od 476 aktivnih tvari odobrenih u EU, samo 18 se smatra niskorizičnima.¹⁰

Pesticidi se u hrani pojavljuju u vrlo malim količinama, u obliku ostataka, a ukoliko je njihova uporaba nekontrolirana mogu izuzetno loše utjecati na zdravlje ljudi. Polazeći od toga da su biološka raznolikost i otporni ekosustavi ključni za održivi razvoj, a agroekološka načela važna za očuvanje biološke raznolikosti, autonomije hrane i zdravu prehranu, cilj zelenog plana i strategije „od polja do stola“ je smanjenje ukupne upotrebe kemijskih pesticida u EU-u do 2030. te rješavanje globalnih izazova u području klime i okoliša. Smjernice o analitičkoj kontroli kvalitete i postupcima validacije pri analizi ostataka pesticida u hrani i hrani za životinje (Dokument SANTE/11312/2021) objavljene su na internetskim stranicama Komisije.¹¹ Također, na internetskim stranicama Službenog lista Europske unije (Provedbena uredba Komisije (EU) 2022/741) dane su smjernice za osiguranje sukladnosti s maksimalnim razinama ostataka pesticida i ocjenu izloženosti potrošača ostacima pesticida u i na hrani biljnog i životinjskog podrijetla te postupci uzimanja uzoraka trebali bi biti u skladu s Direktivom Komisije 2002/63/EZ, koja sadržava metode i postupke uzimanja uzoraka koje je preporučila Komisija za Codex Alimentarius. Primjerice, dani su proizvodi biljnog podrijetla (neprerađeni proizvodi) koji se trebaju uzorkovati 2023., 2024. i 2025. godine kao što su naranče, mrkva, kivi, jabuke, grah, krumpir, djevičansko maslinovo ulje itd. Tablično su dane i kombinacije ostataka pesticida/proizvod koje se trebaju pratiti u/na proizvodima biljnog (prilog I dio C) i životinjskog podrijetla (prilog I dio D).^{12,13} Smjernice SANTE/2017/10632 proširene su u svibnju 2023. godine uz naglasak kako je upravo ekstrakcija ključan korak u analitičkom postupku za određivanje pesticida.^{14,15}

Upotreba pesticida, obrazovanje korisnika o rukovanju pesticidima, distribucija, prodaja i slične stavke su u Republici Hrvatskoj regulirane „Zakonom o održivoj upotrebi pesticida“.⁶ S obzirom na vrlo široku upotrebu pesticida u poljoprivredi, šumarstvu, kućanstvima i industriji, neželjeni se ostaci mogu pronaći u tlu, vodi i hrani. Maksimalna razina ostataka (MRO) pesticida u hrani regulirana je „Pravilnikom o maksimalnim razinama ostataka pesticida u i na hrani i hrani za životinje biljnog i životinjskog podrijetla“. Zbog učestalih izmjena vrijednosti MRO ili njihovih dopuna podložna je čestim promjenama. Ukoliko za neki pesticid i proizvod vrijednost MRO nije navedena, primjenjuje se zadana vrijednost MRO od 0,01 mg/kg. Primjerice, Kharbouche i sur. su u svome istraživanju uzoraka vode iz različitih izvora u Španjolskoj, utvrdili da je masena koncentracija pesticida 0,05 µg/L čime je došlo do

dopuna u preporukama. Nadalje, Bhandari i sur. proučavali su uzorke tla sa različitih lokacija i dubina u Nepal, a izmjereni udio pesticida je u rasponu od 1,0 do 251 mg/kg, ovisno o dubini uzorkovanja čime su dobivena nova saznanja o uzorkovanju pesticida.¹⁶⁻¹⁸

U svrhu razvoja metode GC-MS za određivanje 211 pesticida prisutnih u tragovima u jabukama optimizirana metoda validirana je prema smjernicama EU SANTE/11813/2017 i maksimalnim dopuštenim koncentracijama ostataka danim od Indijske uprave za sigurnost hrane i standarde (engl. *Food Safety and Standards Authority of India*) i Europske komisije od 0,01 mg/kg. Postignuta je visoka osjetljivost metode GC-MS s kvantifikacijskim granicama od LOQ = 0,001 mg/kg za 95 % istraživanih analita koja je pridonijela donošenju boljih smjernica za analizu pesticida.¹⁹

2.2. Ekstrakcijske metode za određivanje pesticida

Ekstrakcija je separacijska metoda za odvajanje i izolaciju tvari iz smjese. Glavno načelo ekstrakcije je razdioba tvari između dvije faze koje se međusobno ne miješaju, a analit mora biti što bolje topljiv u jednoj od tih faza. Glavno načelo ekstrakcije tekuće-tekuće (engl. *Liquid-liquid extraction*, LLE) je razdioba tvari između dva otapala koja se međusobno ne miješaju, a ekstrakcije na čvrstoj fazi (engl. *Solid phase extraction*, SPE) razdioba tvari između čvrste i tekuće ili plinovite faze. U svrhu što učinkovitije ekstrakcije razvijen je velik broj različitih tehnika, a svaka od njih ima svoje prednosti i nedostatke ovisno o sadržaju i koncentraciji analita i vrsti uzorka iz kojeg se odvaja. Primjerice, ekstrakcija tekuće-tekuće ograničena je odabirom otapala koja se ne smiju miješati i stvarati emulziju, a uporaba relativno velikih volumena otapala predstavlja problem pri zbrinjavanju otpada. Pri ekstrakciji na čvrstoj fazi koriste se diskovi, različite membrane, male kolone s različitim punilima i sl. Najjednostavnija tehnika je propuštanje vodene otopine uzorka kroz hidrofobni organski spoj nanesenom na praškastom silikagelu u koloni. Organske se molekule analita vežu na čvrstu fazu i kasnije ispiru otapalom kao što je primjerice metanol. Često korištena ekstrakcijska metoda za ostatke pesticida je ekstrakcija QuEChERS (engl. *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe*).^{2,3}

Prije ekstrakcije uzorak se mora osušiti i usitniti do finoga praha. Ukoliko uzorak sadrži hlapljive analite ili su opasni po zdravlje, uzorak se suši s anhidridom natrijeva sulfata ili dijatomejskom zemljom. Ekstrakti tla i otpada obično zahtijevaju dodatno pročišćavanje kako

bi se uklonili sastojci koji mogu uzrokovati sustavnu pogrešku određivanja, onečišćenje i oštećenje opreme te lošije kromatografsko razlučivanje. Ekstrakcija na čvrstoj fazi je najčešća metoda pročišćavanja uzorka.

Poznavanje učinka pesticida u okolišu važno je kako bi tretiranje usjeva bilo sigurno za okoliš. Potrebne su primjerene metode za procjenu ciljanih spojeva u tretiranoj zemlji i usjevima. Za određivanje pojedinih pesticida kao što je primjerice triazinski herbicid metribuzin, postoje različiti analitički postupci. Toksičan je pri niskim koncentracijama, a koristi se za suzbijanje korova pri uzgoju rajčica, krumpira, soje i drugih. U Direktivi 540/2011 metribuzin je naveden kao kandidat za zamjenu, no nedavno je Europska komisija produžila rok odobrenja za ovu aktivnu tvar.²⁰ Tri glavna metabolita metribuzina u okolišu su diketo metribuzin (M-DK), desamino metribuzin (M-DA) i desamino diketo metribuzin (M-DADK). Ovi metaboliti dobro su topljivi u vodi, visoko do vrlo visoko pokretni u tlu i nisko do umjereno postojani u tlu. Budući da se metribuzin koristi već mnogo godina, prijavljene su različite metode za analizu ostataka metribuzina zajedno s drugim pesticidima. Međutim, analiza metabolita metribuzina nije bila uključena. Za odvajanje metribuzina zajedno s njegovim metabolitima u uzorcima tla primijenjene su različite ekstrakcijske tehnike kao što je ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (engl. *Ultrasound-assisted extraction*, UAE), ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (engl. *Microwave-assisted extraction*, MAE) ili tekućinska ekstrakcija pod tlakom (engl. *Pressurized liquid extraction*, PLE). Od navedenih, najčešća je učinkovita ekološki prihvatljiva tehnika UAE jer omogućuje smanjenje volumena otapala potrebnog u koraku ekstrakcije i skraćuje vrijeme ekstrakcije koje se koristi u klasičnim postupcima ekstrakcije. Osim toga, prednost UAE u odnosu na druge moderne tehnike ekstrakcije je niža cijena opreme i jednostavnost korištenja. Analiza metribuzina i metabolita provodi se tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (engl. *High-performance liquid chromatography*, HPLC) s detekcijom UV i DAD (engl. *Diode array detector*), micelarnom elektrokinetičkom kromatografijom ili, u novije vrijeme, vezanim sustavom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i tandemne spektrometrije masa (engl. *Liquid Chromatography with tandem mass spectrometry*, LC-MS/MS). Nasuprot tome, zbog složenog sastava biljaka, raznolikosti vrsta i drugih čimbenika, analitičke metode za metribuzin i njegove metabolite u biljkama su rijetke. U izvješću o ocjeni za obnovu metribuzina dogovoreno je da se uključi praćenje metabolita metribuzina u biljnim matricama. Stoga je razvijen manji broj analitičkih metoda za analizu ovih spojeva u uzorcima šećerne trske, krumpiru, šparogama,

rajčicama, narančama i sjemenkama (suhi grah i soja) pomoću LC-MS/MS. Do sada je analiza metribuzina i njegovih metabolita uglavnom bila postignuta tekućinskom kromatografijom uz korištenje spektrometrije masa ili detekcije UV. Glavna prednost detekcije MS u odnosu na UV detekciju je ta što MS kao detektor omogućuje istovremenu kvantifikaciju i potvrdu identiteta otkrivenih spojeva.²¹

2.2.1. Ekstrakcija tekuće-tekuće

Ekstrakcija tekuće-tekuće koristi se za odvajanje tvari na temelju njihove topljivosti u otapalima koja se ne miješaju i ne reagiraju. Najčešće su to voda i organsko otapalo kao što su: aceton, etil-acetat, diklormetan i sl. Izbor otapala je izuzetno važan za učinkovito odjeljivanje analita pri čemu treba obratiti pozornost na polarnost, stabilnost, čistoću i vrelište otapala te njegovu inertnost kako otapalo ne bi reagiralo s drugim otapalom ili analitom. Učinkovitost ekstrakcije može se poboljšati i promjenom pH i ionske jakosti vodenog sloja. Pri ekstrakciji tvari organskim otapalom iz vodenog medija, dio vode ekstrahira zajedno s analitom te ga je potrebno osušiti. Organski sloj suši se sredstvima za sušenje koja ne reagiraju s otapalom ni s otopljenom tvari, a najčešće se koriste anorganske tvari. Prednost ekstrakcije tekuće-tekuće je jednostavnost i učinkovitost, a nedostatak dugotrajna izvedba te veliki volumeni, često, toksičnih otapala.^{22,23}

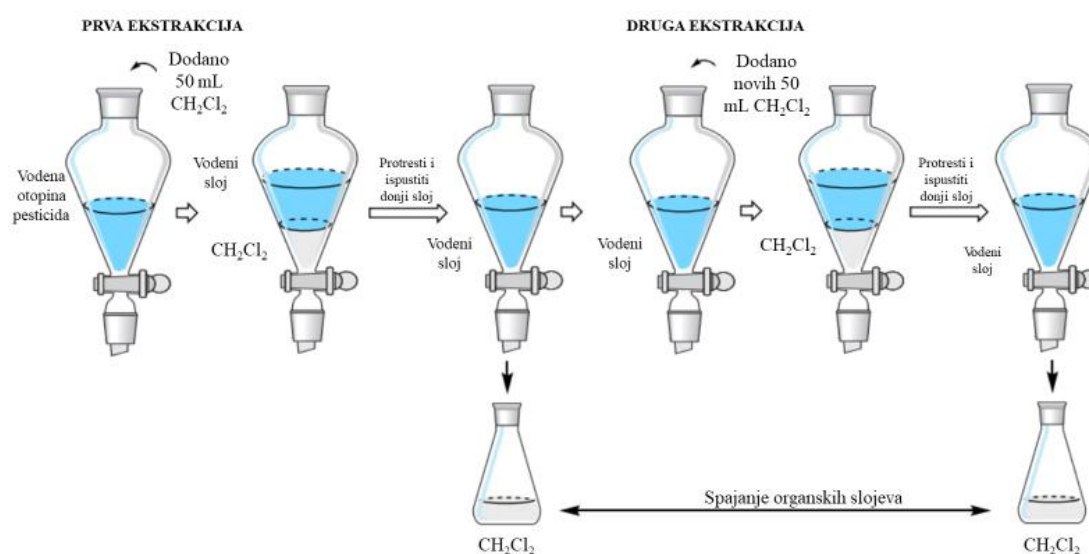
Za ostatke pesticida iz usjeva u svrhu metaboličkih studija dane su preporuke:

- ekstrakcija smjesom acetonitril/voda (1/1, v/v), obično se koristi za europsku standardnu metodu EN 15662:2008 i AOAC metodu 207.01 (QuEChERS metoda)²⁴
- ekstrakcija smjesom aceton/voda (2/1, v/v), za nemasne usjeve ili ekstrakcija acetonitrilom/acetonom prema modulu E7 koji se obično koristi za europsku standardnu metodu EN 12393:2013 (DFG S19 metoda)²⁵
- ekstrakcija smjesom metanol/voda (2/1, v/v) koja se obično koristi za europsku standardnu metodu EN 15637:2008 (ChemElut metoda)²⁶
- ekstrakcija etil-acetatom, obično se koristi za europsku standardnu metodu EN 12393:2013 (SweEt metoda)^{25,27}

Za određivanje 159 pesticida u uzorku riže optimiziran je analitički postupak koji uključuje ekstrakciju tekuće-tekuće i plinsku kromatografiju s tandemnom spektrometrijom

masa (engl. *Gas Chromatography with tandem mass spectrometry*, GC-MS/MS). Prije određivanja metodom GC-MS/MS provedena je ekstrakcija QuEChERS pesticida iz riže acetonitilom. Uzorak riže je homogeniziran na veličinu čestica od 200 – 500 μm , a zatim je uzorku (5 g) dodano otapalo i vodena otopina octene kiseline (1 %). Validirana metoda primjenjiva je za određivanje pesticida u riži s preciznošću od <20 % te granicama kvatifikacije 0,01 mg/kg što je u skladu sa smjernicama SANTE i Europske komisije.²⁸

Barrionuevo i Lanças uspoređivali su učinkovitost ekstrakcije tekuće-tekuće (LLE) u odnosu na ekstrakciju na čvrstoj fazi (SPE) i mikroekstrakciju na čvrstoj fazi (engl. *Solid-phase microextraction*, SPME) za pesticide prisutne u realnim uzorcima. U svrhu usporedbe metode odjeljivanja pesticida pripremljene su četiri modelne vodene otopine različitih pesticida: bifentrina, permetrina, cipermetrina i deltametrina. Pripremljeni uzorci otopina koje sadrže pesticide ekstrahirane su šest puta sa 50 mL diklometana u lijevku za odijeljivanje, svaki put, uz miješanje 2 minute te odvajanje faza (slika 3).



Slika 3. Postupak za prve dvije ekstrakcije tekuće-tekuće koje su proveli Barrionuevo i Lanças. Preuzeto i prilagođeno iz ref. 29.

Za ekstrakciju na čvrstoj fazi korištena je kolona sa florisilom te mikrokolona za ekstrakciju. Ekstrakti su zatim osušeni natrijevim sulfatom, otopljeni u diklormetanu, upareni na rotacijskom uparivaču te analizirani metodom plinske kromatografije uz detekciju detektorom s hvatanjem elektrona (engl. *Gas chromatography-electron capture detection*, GC-EDC). Usporedba metoda pokazala je kako LLE koristi 10 puta više toksičnog otapala, nego SPE, ali

bez značajnije razlike u vremenu potrebnom za odvajanje analita. Obje metode mogu se koristiti za učinkovito odvajanje pesticida uz preporuku za korištenje metode SPME jer zahtjeva najmanje otapala (tablica 1).³⁰

Tablica 1. Usporedba potrebnog volumena otapala i vremena trajanja ekstrakcije LLE, SPE i SPME, za ekstrakcije koje su proveli Barrionuevo i Lanças. Preuzeto i prilagođeno iz ref. 30.

	LLE	SPE	SPME
Volumen uzorka / mL	500	500	5
Volumen otapala / mL	301	30	0
Vrijeme trajanja ekstrakcije / h	2:27 ± 0:32	2:18 ± 0:12	0:10

Za bolju učinkovitost ekstrakcije često se postupak ekstrakcije tekuće-tekuće provodi pri povišenoj temperaturi i tlaku čime se ubrzava i sam postupak ekstrakcije. Takva ubrzana ekstrakcija (engl. *Accelerated solvent extraction*) uspješno je primijenjena za određivanje ostataka pesticida 3 amfenikola, 8 makrolida, 18 sulfonamida, 4 nitroimidazola, 15 insekticida i 22 fungicida u perju peradi. Optimiziranje izbora ekstrakcijskog otapala provedeno je metanolom, acetonitrilom i etil-acetatom, pri čemu je uporabom metanola uz dodatak adsorbensa dobivena najbolja učinkovitost ekstrakcije uz detekcijske granice 0,2 – 3,0 µg kg⁻¹ i kvantifikacijske granice 0,5–8,3 µg kg⁻¹.³¹

Za određivanje pesticida u kakau optimizirana je ekstrakcija tekuće-tekuće prije kvantifikacije analita metodom GC-EDC. Masti iz kakao praha trebaju se ukloniti, s obzirom na to da mogu utjecati na signale analita u kromatogramu i onemogućiti njihovu analizu. Isto tako, otežavaju ekstrakciju analita u organsku fazu, čime snižavaju učinkovitost metode. Za hidrolizu masti dodane su otopine KOH ili NaOH te HCl pri čemu su najbolji rezultati postignuti dodatkom KOH dok je dodatkom HCl hidroliza bila djelomična.³²

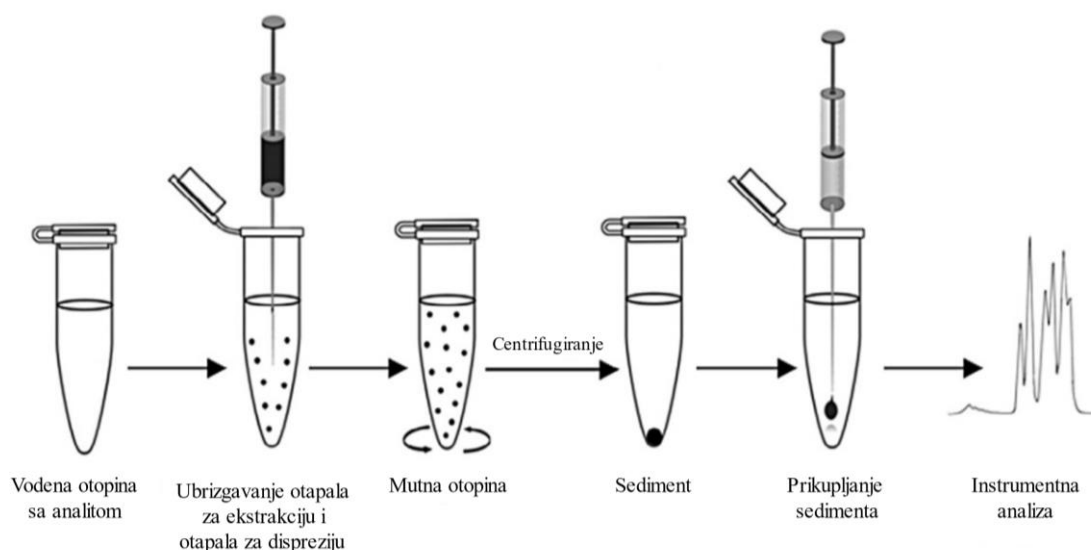
Metoda „AOAC 2007.01” QuEChERS za određivanje ostataka pesticida u mlijeku je optimizirana i validirana prema smjernicama SANTE/11813/2017 i SANTE/12682/2019.^{11,33} Ostaci pesticida ekstrahirani su iz mlijeka acetonitrilom uz dodatak 1 % octene kiseline te su nakon centrifugiranja i filtriranja određeni tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti (engl. *Ultra high performance liquid chromatography*, UHPLC-LTQ/Orbitrap MS) spregnute sa spektrometrom masa koji se sastoji od linearne ionske stupice i Orbitrapa.³⁴

Sličan analitički postupak korišten je i za određivanje pesticida u kupusu pri čemu je za pročišćavanje uzorka korištena ekstrakcija QuEChERS. Nakon ekstrakcije smjesom vode i

acetonitrila (1:2 v/v), uz dodatak $MgSO_4$ i $NaCl$, centrifugiranja i filtriranja, pesticidi su određeni u ekstraktu metodom tekućinske kromatografije ultradjelotvornosti spregnutom sa spektrometrijom masa (engl. *Ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry*, UPLC-MS/MS/MS). Tri neonikotinoidna i jedan karbamatni pesticid detektirani su u šest dehidriranih, smrznutih uzoraka kupusa. Među njima, najčešće detektirani bili su: tiakloprid i propamokarb, a imidakloprid i acetamiprid detektirani su u samo jednom uzorku kupusa.³⁵

2.2.2. Disperzivna mikroekstrakcija tekuće-tekuće

Disperzivna mikroekstrakcija tekuće-tekuće (engl. *Dispersive liquid-liquid microextraction*, DLLME) razvijena je kao poboljšanje tehnike LLE. Metodu su razvili Rezaee i sur. 2006. godine i primijenili za određivanje organskih spojeva, uključujući i neke pesticide u vodi. Korišten je sustav s tri otapala u kojem je mala količina otapala za ekstrakciju i otapala za disperziju naglo ubrizgana u vodenu otopinu uzorka koja sadrži analit. Nakon miješanja smjese nastala je mutna otopina sa sitnim kapljicama ekstrakcijskog otapala u kojima se nalazi analit. Centrifugiranjem nastaje talog koji se sa dna mikroinjekcijom prenese u plinski kromatograf te detektira plameno-ionizacijskim detektorom (engl. *Gas chromatography-flame ionisation detector*, GC-FID) (slika 3).

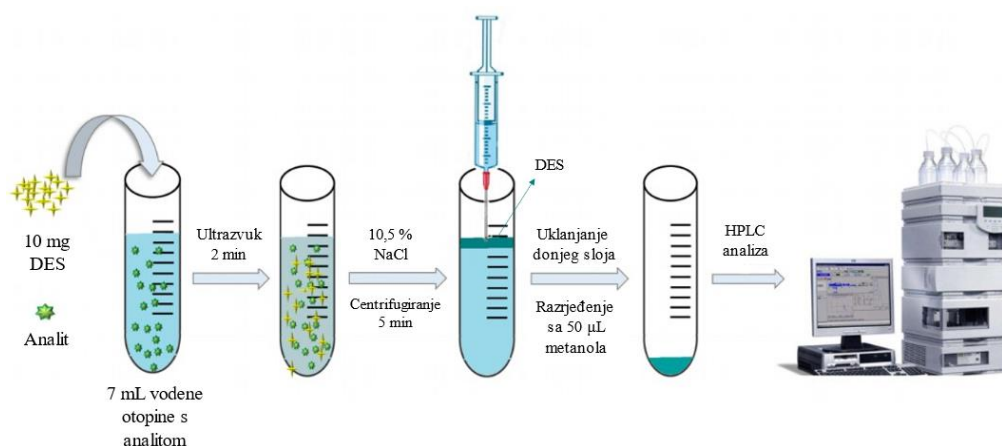


Slika 3. Postupak metode DLLME koju su razvili Rezaee i sur.
Preuzeto i prilagođeno iz ref. 36.

Utvrđeno je da učinkovitost ekstrakcije ovisi o vrsti i volumenu ekstrakcijskog otapala odnosno otapala za disperziju te volumenu uzorka. Otapalo za ekstrakciju se ne smije miješati s vodom, mora stvarati male kapljice u vodenoj otopini te imati veći afinitet prema analitu. Često se kao ekstrakcijska otapala koriste ugljikov tetraklorid, ugljikov disulfid te tetrakloretilen. Otapala za disperziju pomažu otapalu za ekstrakciju da se što bolje raspodijeli u vodenoj otopini, a najčešće se koriste aceton, metanol i acetonitril. Vrijeme ekstrakcije je vrlo kratko, nekoliko sekundi, a učinkovitost ekstrakcije izračunata je prema jednadžbi (1) iznosila je 60,3 – 111,3 %, uz detekcijske granice 0,007 – 0,030 µg/L.^{36,37}

$$ER = \frac{c(\text{analita u DES}) \cdot V(\text{DES faza})}{c(\text{analita u početnom uzorku}) \cdot V(\text{uzorka})} \cdot 100 \% \quad (1)$$

Liu i sur. proveli su ekstrakciju pesticida iz čaja i voćnih sokova koristeći metodu UA-DES-DLLME uz niskotemperaturna eutektička otapala (DES) i primjenu ultrazvuka (UA). Eutektička otapala su „zelena otapala“ razvijena kako bi se što više smanjila potreba za organskim otapalima. Svojstva su im slična ionskim tekućinama: nezapaljivost, niski tlak para, niska razina toksičnosti, mogućnost recikliranja, stabilnost te mogućnost otapanja velikog broja anorganskih i organskih spojeva. U uzorcima su analizirani insekticidi, derivati benzoil-uree (BU). Ekstrakcija je provedena na četiri vrste uzoraka: zelenom i oolong čaju te soku od grejpa i limuna. U teflonske epruvete dodan je uzorak čaja ili soka, DES te je izložen ultrazvuku radi bolje disperzije DES-a u male kapljice u otopini. Nakon centrifugiranja, faza DES suspendirana je u gornjem sloju, dok je donja faza uklonjena injekcijom. Postupak je shematski prikazan na slici 4.³⁸



Slika 4. Prikaz UA-DES-DLLME postupka koji su koristili Liu i sur.

Preuzeto i prilagođeno iz ref. 38.

Faza DES analizirana je metodom HPLC i na temelju rezultata izračunata je učinkovitost ekstrakcije (Tablica 2).³⁸

Tablica 2. Učinkovitost ekstrakcije za uzorke čaja i soka za insekticidne derivate BU, preuzeto i prilagođeno iz ref. 38.

	Učinkovitost ekstrakcije / %			
	zeleni čaj	oolong čaj	sok od grejpa	sok od limuna
Diflubenzuron	81,83	83,98	76,87	85,09
Triflumuron	95,02	100,5	90,84	101,1
Heksaflumuron	80,55	95,43	84,91	82,70
Flufenoksuron	94,91	81,01	93,29	82,75
Klorfluazuron	86,34	86,10	87,85	90,34

S obzirom na visoku učinkovitost ekstrakcija (76,87 – 101,1 %) i granicu detekcije 0,30 – 0,60 µg/L, metoda UA-DES-DLLME pokazala se kao dodatno poboljšanje metode DLLME jer je ekološki prihvatljivija.³⁸

Metoda DLLM može se koristiti i za određivanje piretroidnih pesticida u žitu i kloramfenikola u medu. Nakon ekstrakcije pesticida uz dodatak laurinske i klorovodične kiseline, za kiseli ekstrakt tekućinskom kromatografijom ultra visoke djelotvornosti uz detektor UV (engl. *Ultra-high performance liquid chromatographic (UHPLC) method coupled with an ultraviolet detector (UV)*, UHPLC-UV) postignute su detekcijske granice 5 – 20 ng/g.^{39,40}

2.2.3. Ekstrakcija na čvrstoj fazi

Ekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *Solid-phase extraction*, SPE) dobra je alternativa metodi LLE jer je jednostavna i koristi manje otapala, kao što je pokazano u potpoglavlju 2.2.1. Ekstrakcija tekuće-tekuće, tablica 1. Metoda SPE najčešće se izvodi provođenjem vodene otopine uzorka kroz čvrsti sorbens u koloni, analit se adsorbira na sorbens, zatim eluira prikladnim organskim otapalom. Prije ekstrakcije, potrebno je uzorak homogenizirati, često filtrirati, centrifugirati i/ili sonificirati. Metoda se primjenjuje za velik broj različitih analita u prehrambenim uzorcima poput primjerice vode, sokova, vina, mlijeka itd. Jedan od najvažnijih čimbenika u metodi SPE je odabir sorbensa, a najčešće je to slikagel C18 ili kopolimer stiren/divinilbenzen, a još se koriste i polimeri s molekulskim otiskom (engl. *Molecular imprinted polymers*, MIP),

metaloorganske mreže (engl. *metal-organic frameworks*, MOF), ugljikove nanocjevčice (engl. *carbon nanotubes*, CNT), imunosorbensi te grafen.^{2,23,41}



Slika 5. Aparatura za SPE. Preuzeto iz ref. 42.

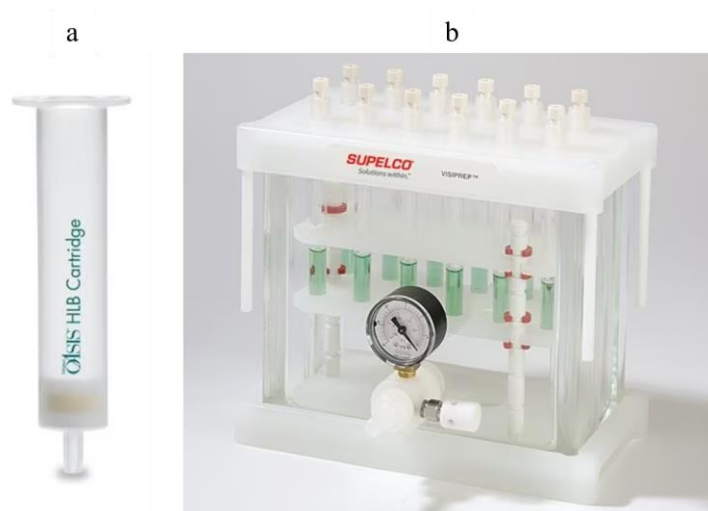
Kapsi i sur. koristili su metodu SPE za ekstrakciju ostataka pesticida u okolišnim vodama, prije analize metodom GC-MS i LC-MS. Uzorci vode iz grčke rijeke Louros prvo su profiltrirani, a zatim ekstrahirani na čvrstoj fazi C18 u diskovima (slika 6).



Slika 6. C18 diskovi korišteni za SPE. Preuzeto iz ref. 43.

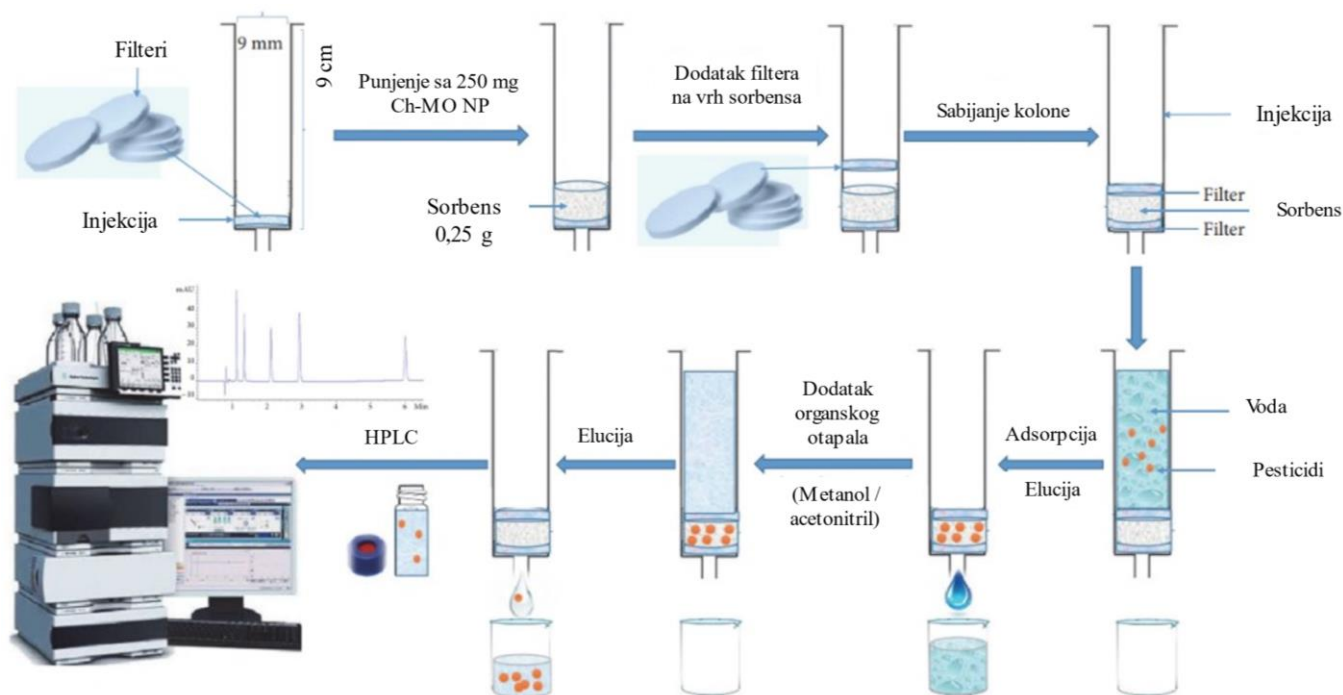
Analit je ispran sa sorbensa, osušen sa Na_2SO_4 te su ostaci pesticida u okolišnim vodama određeni kromatografskim metodama (GC-MS i LC-MS), a postignute su detekcijske granice 0,005 - 0,024 $\mu\text{g/L}$.⁴⁴

Economou i sur. odredili su 46 pesticida u uzorcima vina koristeći metode SPE i LC-MS/MS. Korištene su kolone s kopolimerom (slika 7, a) i vakuumskim razdjeljivačem s više ventilskih ogranaka koji može obrađivati 12 uzoraka istovremeno (slika 7, b) uz učinkovitost ekstrakcije od 70 – 110 %. Etil-acetat, metanol te osobito acetonitril pokazali su se kao najbolja otapala za ispiranje većine ciljanih analita sa sorbensa.⁴⁵



Slika 7. Korištene kolone s punilom (a) i vakuumski razdjeljivač (b). Preuzeto iz ref. 46,47.

Za ekstrakciju 7 različitih pesticida iz vode Badawy i sur. razvili su punilo za SPE kolonu u kojoj su čvrsta faza nanočestice hitozana i bakrovog(II) ili cinkova(II) oksida. Shema postupaka SPE prikazan je na slici 8.⁴⁸

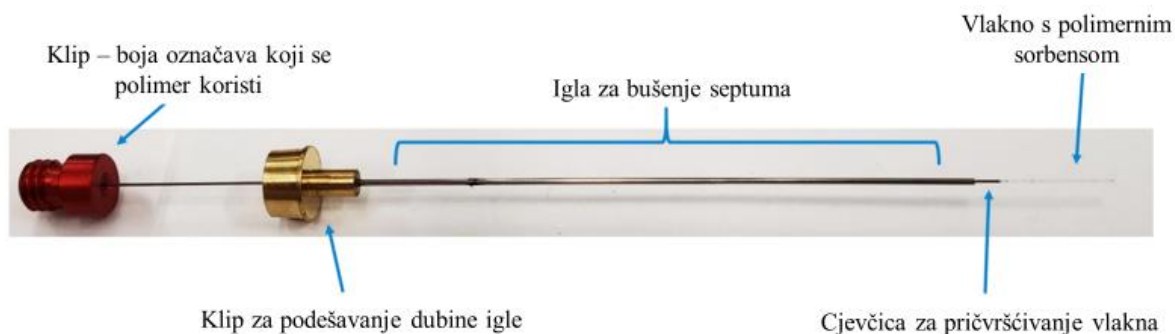


Slika 8. Postupak SPE pesticida iz vode koji su koristili Badawy i sur. Preuzeto i prilagođeno iz ref. 48.

Učinkovitost ekstrakcije je nešto veća u slučaju nanočestica hitozana i bakrovog(II) oksida, u usporedbi s nanočestica hitozana i cinkova(II) oksida, a u oba slučaja dobivena je veća učinkovitost nego pri ekstrakciji na silikagelu C18. Sorbensi od nanočestica hitozana i metalnih oksida pokazali su se vrlo selektivnima i ekološki prihvatljivijima te jeftinijima od klasičnih sorbensa SPE. ⁴⁸

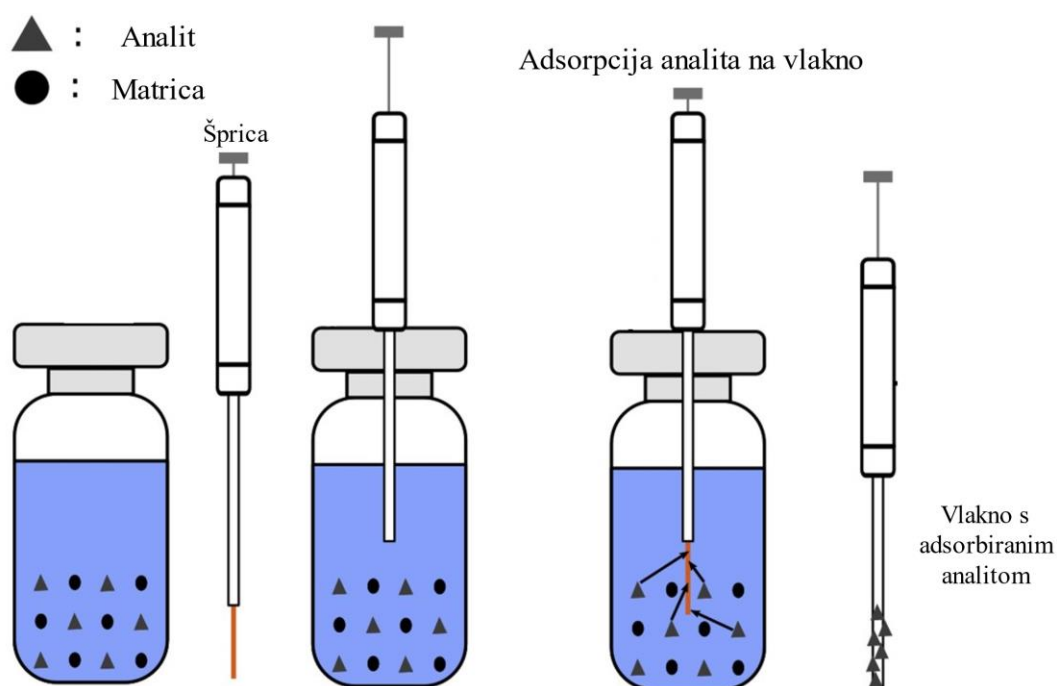
2.2.4. Mikroekstrakcija na čvrstoj fazi

Mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *Solid phase microextraction*, SPME) jednostavna je i brza metoda u kojoj se koristi vrlo malo otapala te se lako povezuje s kromatografskim metodama (GC i HPLC). Može se i lako automatizirati, što pridonosi učinkovitosti i preciznosti metode. Od svog razvitka 1989. godine, ima široku primjenu analizi uzoraka iz okoliša, hrane, u biologiji, medicini, toksikologiji i forenzičkoj medicini. Uređaj koji se koristi za SPME je modificirana šprica koja se sastoji od nosača, igle i kvarcnog vlakna presvučenog polimerom (slika 8).



Slika 8. Dijelovi šprice koja se koristi za SPME. Preuzeto i prilagođeno iz ref. 49.

Analit iz uzorka, odnosno matrice, adsorbira se na čvrstu fazu – polimer s aktivnim slojem nanesen na vlakno u šprici, pomoću kojeg se ekstrakt prenese u uređaje za daljnju analizu npr. plinski kromatograf. SPME se dijeli na direktnu SPME (engl. *Direct immersion-solid phase microextraction*, DI-SPME) kada je vlakno uronjeno u tekući uzorak (slika 9) te indirektnu tzv. *Headspace* SPME (engl. *Headspace-solid phase microextraction*, HS-SPME) kada je vlakno iznad tekućeg ili krutog hlapljivog uzorka često izloženog povišenoj temperaturi.^{23,41}



Slika 9. Postupak DI-SPME. Preuzeto i prilagođeno iz ref. 50.

Prednost HS-SPME je što učinkovito smanjuje potencijalne interferencije u kompleksnim matricama, a uspješno ekstrahira i ostatke pesticida prisutne u niskim koncentracijama. Vrsta vlakna, odnosno polimernog sorbensa, jedan je od ključnih čimbenika koji utječe na selektivnost i osjetljivost SPME. Polimeri koji se najčešće koriste su: polidimetilsiloksan (PDMS), akrilatni polimer (PA), divinilbenzen (DVB), *Carbowax* (CW) tj. polietilenske glikolne smole te njihove različite smjese. Najčešći način desorpcije analita sa vlakna je povišenjem temperature u injektoru GC-a, zato što u potpunosti isključuje upotrebu otapala. U slučaju kada se koriste otapala, najčešće metanol i acetonitril, obično slijedi LC analiza pesticida. Desorpcija potpomognuta protokom mobilne faze je dinamička i primjenjiva u slučaju kada analit nije prečvrsto adsorbiran na vlakno. Statička desorpcija potpomognuta je miješanjem u mobilnoj fazi neko vrijeme, a koristi se kada je analit snažno adsorbiran na čvrstu fazu.^{23,41}

Boussahel i sur. koristili su analitički postupak s DI-SPME i GC-ECD za određivanje organoklornih pesticida u vodi. Kao sorbens korišteno je vlakno sa nanesenim PDMS-om, a adsorpcija analita potpomognuta je ultrazvukom pri optimalnoj temperaturi od 50 °C u termostatiranoj ultrazvučnoj kupelji (slika 10).

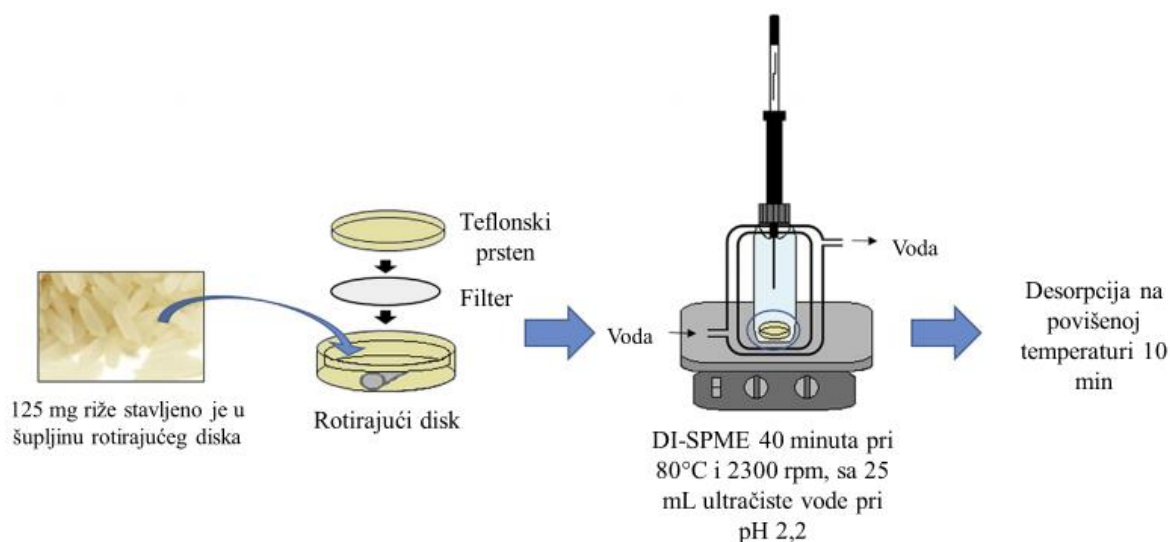


Slika 10. Ultrazvučna kupelj, preuzeto iz ref. 51.

Desorpcija je provedena povišenjem temperature i analit je analiziran pomoću GC. Optimalno vrijeme desorpcije je 2 minute, a vrijeme adsorpcije 20 minuta, što je kraće od prethodno

objavljenih literaturnih podataka za ekstrakciju pesticida metodom SPME što ukazuje da ultrazvuk i povišena temperatura pridonose bržoj adsorpciji analita.⁵²

Omena i sur. određivali su pesticide u riži s ciljem razvijanja nove, ekološki prihvatljivije metode bez organskih otapala. Ekstrahirani su polarni pesticidi metodom SPME i određeni GC-MS. Kao što je prikazano na slici 11, uzorak riže stavljen je u šupljinu diska koji je u potpunosti zatvoren.⁵³



Slika 11. Postupak DI-SPME sa rotirajućim diskom koji su koristili Omena i sur. za ekstrakciju pesticida iz riže. Preuzeto i prilagođeno iz ref. 53.

Disk je stavljen u bočicu sa 25 mL ultračiste vode pri pH = 2,2 koja je protresena i stavljena u termostatiranu posudu s magnetskom miješalicom. SPME vlakno sa nanesenim polimerima DVB/CW/PDMS uronjeno je u bočicu za uzorak i postupkom DI-SPME je nakon 40 minuta provedena adsorpcija analita te desorpcija pri povišenoj temperaturi. Korištenjem DI-SPME s rotirajućim diskom i analiza polarnih pesticida metodom GC-MS omogućila je učinkovitu ekstrakciju u pesticida u jednom koraku, bez korištenja organskih otapala.⁵³

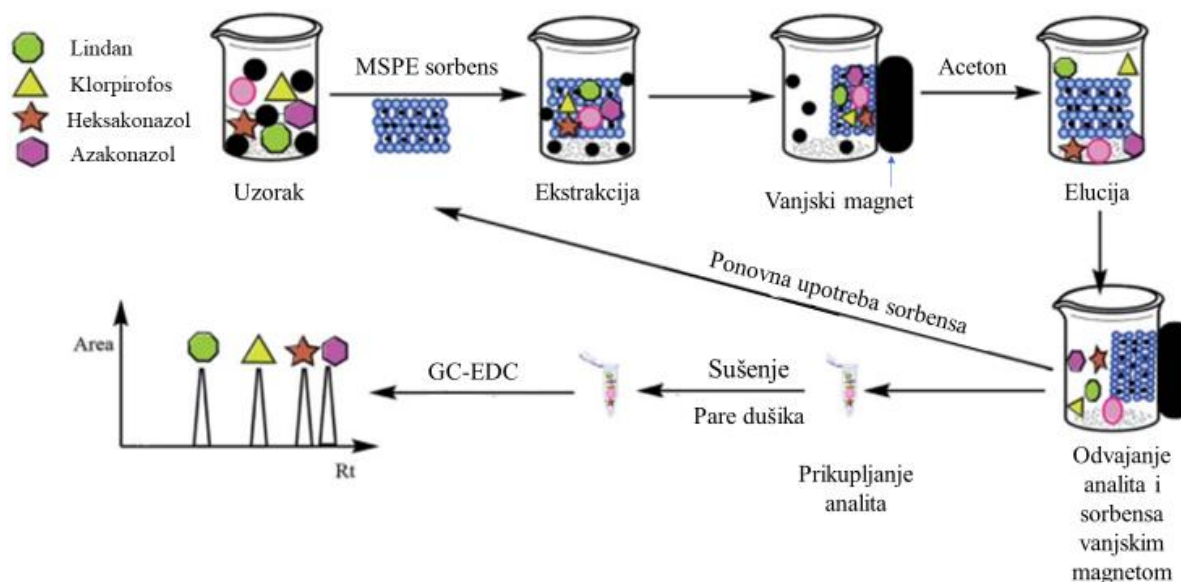
Valenzuela i sur. su proveli ekstrakciju pesticida iz okolišnih voda metodom SPME koristeći ugljikove nanomaterijale (engl. *Carbon nanomaterials*, CNM). Fulereni, nanocjevčice te grafen su ugljikovi nanomaterijali, koji imaju veći potencijal za detekciju i uklanjanje onečišćenja iz vode od ostalih sorbensa. U okviru ovog istraživanja dizajnirana je nova SPME šprica s metalnom šipkom obloženom CNM-om kojeg su prethodno sintetizirali. Nakon ekstrakcije i analize GC-MS pokazalo se kako su CNM odlični sorbensi za učinkovitu ekstrakciju i kvantifikaciju svih 24 istraživanih pesticida, sa detekcijskim granicama

0,46 – 5,9 ng/g. Zbog velike poroznosti ugljikovi nanomaterijali imaju veliku površinu za adsorpciju čime je postupak znatno brži. Otporni su na visoke temperature i mogu se ponovo koristiti. Primjerice, isto vlakno može se upotrijebiti za 300 ekstrakcija, dok većina ostalih komercijalno dostupnih vlakana može iskoristiti za oko 100 ekstrakcija.⁵⁴

2.2.5. Magnetska ekstrakcija na čvrstoj fazi

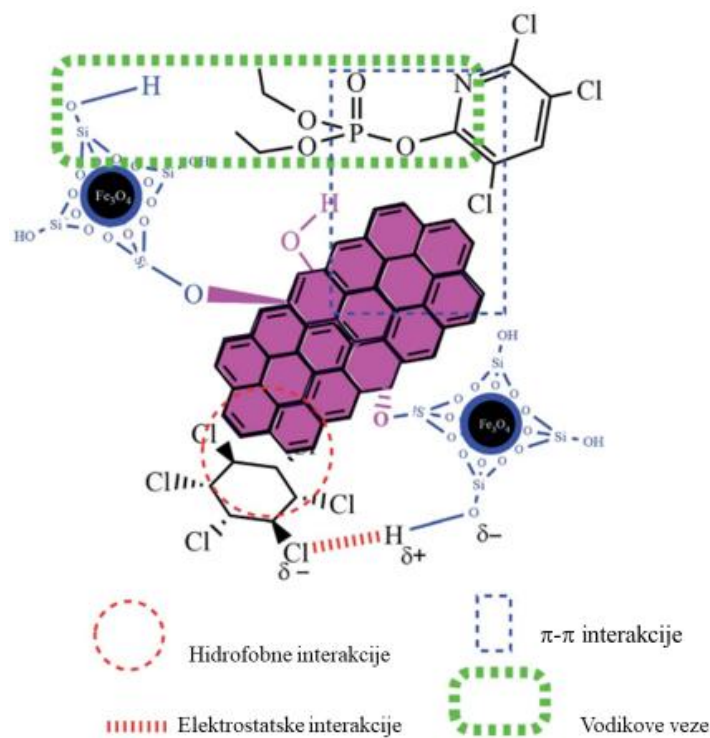
Magnetska ekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *Magnetic solid-phase extraction*, MSPE) temelji se na adsorpciji ciljanog analita na magnetični sorbens najčešće magnetske nanočestice koje imaju veliku specifičnu površinu pa se analit puno brže veže na sorbens. Ova jednostavna, brza metoda ne zahtijeva veliki volumen otapala za ekstrakciju analita. Adsorbirani analit lako se razdvaja od sorbensa primjenom vanjskog magnetskog polja te se sorbens može ponovo upotrijebiti. Učinkovitost MSPE je poboljšana time što nema punjenja kolone i mogućnosti zastoja protoka kao primjerice u SPE.²³

Nodeh i sur. sintetizirali su magnetske nanočestice na osnovi grafena, presvučene silicijem $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2\text{-G}$ i primijenili ga za MSPE organoklornih pesticida iz okolišnih voda. Shema postupaka MSPE prikazan na je slici 12.



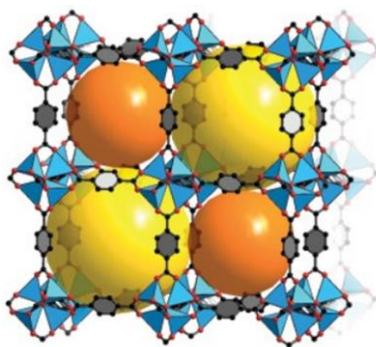
Slika 12. Postupak MSPE sa sorbensom $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2\text{-G}$ za ekstrakciju organoklornih pesticida iz okolišnih voda. Preuzeto i prilagođeno iz ref. 55.

Pri ovom postupku veliku ulogu imaju međumolekulske sile. Grafen, osim što ima strukturu saća i veliki adsorpcijski kapacitet, benzenski prsteni od kojih je sastavljen bogati su π - π interakcijama, što ga čini pogodnim sorbentom za pesticide sa benzenskom jezgrom u strukturi: klorpirofos, heksakonazol i azakonazol. SiO_2 je jeftin, ekološki prihvatljiv i jako disperzivan u tekućini zbog svojih OH-skupina. Lindan je pokazao nešto veći afinitet za vezanje na sorbens, što je objašnjeno nastajanjem vodikovih veza (slika 13). Postupkom MSPE sa novo pripremljenim sorbentom $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2\text{-G}$ moguća je bolja apsorpcija analita (13,04 – 18,69 mg/g) uz detekcijske granice 0,12 – 0,28 pg/mL.⁵⁵



Slika 13. Interakcije pri adsorpciji organoklorinih pesticida na sorbensu pri MSPE.
Preuzeto i prilagođeno iz ref. 55.

Osim nanočestica, često se kao sorbens za MSPE koriste i metaloorganske mreže. Metaloorganske mreže vrsta su kristalnih spojeva koji se sastoje od više istih ili različitih kationa prijelaznih metala ili klastera metala povezanih kovalentnim vezama s di-, tri-, te polidentatnim organskim ligandima pri čemu mogu tvoriti jedno-, dvo- ili trodimenzionalne strukture, tj. mreže. Ma i sur. (2018.) su za ekstrakciju heterocikličkih pesticida i njihovih ostataka u uzorcima vode koristili MOF-5 (slika 14) kao sorbens, čiji je sastav $\text{Zn}_4\text{O}(\text{C}_8\text{H}_4\text{O}_4)_3 \cdot \text{C}_3\text{H}_7\text{NO}$.⁵⁶

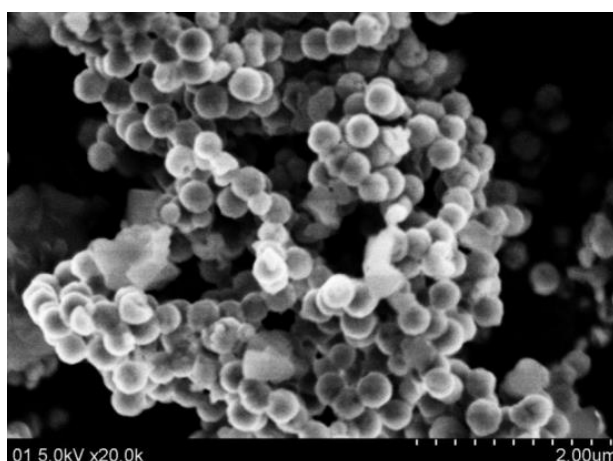


Slika 14. Struktura MOF-5: žute sfere = veće šupljine, narančaste sfere = manje šupljine, crno = C atomi, crveno = O atomi i plavi poliedri = Zn.

Preuzeto iz ref. 57.

Pokazalo se kako zbog hidrofilnosti i male stabilnosti u vodi nisu svi sorbensi MOF prikladni za ekstrakciju heterocikličkih pesticida iz vodenih uzoraka. Sorbens MOF-5 sa Zn-jezgrom ekološki je prihvatljiviji u usporedbi s MIL-101 sa Cr-jezgrom, zbog toksičnosti pojedinih ionskih vrsta kroma. Odabirom optimalnih ekstrakcijskih uvjeta (7 mg MOF-5, pH = 6,0, 12 minuta ekstrakcije, 6 minuta desorpcije, vodena otopina 10 % NaCl i 60 mL uzorka), dobivena je iznimno niska detekcijska granica (0,4 – 0,11 g/L).⁵⁶

U prethodnim istraživanjima Ma i sur. (2016.) koristili su smjesu nanočestica MSPE i Fe₃O₄/SiO₂-MIL-101 (slika 15) metaloorganske mreže za detekciju heterocikličkih pesticida u uzorcima vode.⁵⁸



Slika 15. Slika Fe₃O₄@SiO₂-MIL-101 dobivena pretražnim elektronskim mikroskopom (SEM). Preuzeto iz ref. 58.

Odabrani su optimalni ekstrakcijski uvjeti: 0,4 mg MIL-101, pH=5,0 i vrijeme ekstrakcije 20 minuta. Dobivene su detekcijske granice od 0,3 – 1,5 $\mu\text{g L}^{-1}$.⁵⁸ Ma i sur. usporedili su detekcijske granice dobivene 2016. godine korištenjem metaloorganske mreže MIL-101 s rezultatima dobivenim 2018. korištenjem metaloorganske mreže MOF-5 te s još nekim sorbensima i metodama detekcije. Pokazalo se kako ekstrakcija na čvrstoj fazi s ugljikovim višestjenčanim nanočesticama (engl. *Multi-walled carbon nanotubes-solid phase extraction*, MWCNT-SPE) ima najnižu granicu detekcije (tablica 5).^{56,58}

Tablica 5. Granica detekcije za heterocikličke pesticide koje su dobili Ma i sur. 2016. i 2018. koristeći MSPE uspoređene s rezultatima drugih metoda ekstrakcije. Preuzeto i prilagođeno iz ref. 56.

Heterociklički pesticidi	Metode ekstrakcije	Metode detekcije	Granica detekcije / $\mu\text{g L}^{-1}$
Ametrin, atrazin, diuron, fipronil	C18-SPE	HPLC-DAD	20 – 50
Fipronil, klorfenapir, fenpiroksimat, flusilazol	MWCNT-SPE	HPLC-DAD	0,008 – 0,019
Klofentezin, klorfenapir	IL-MSPE	HPLC-DAD	0,4 – 0,5
Fipronil, klorfenapir, fenpiroksimat, flusilazol Ma i sur. (2016.)	$\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2\text{-MIL-101-MSPE}$	HPLC-DAD	0,3 – 1,5
Karbendazim, triadimefon, klorfenapir, fenpiroksimat Ma i sur. (2018.)	MOF-5-MSPE	HPLC-DAD/FLD	0,4 – 0,11

Prednost MWCNT-SPE u usporedbi sa SPE je kraće vrijeme ekstrakcije koje je 30 minuta u usporedbi s otprilike prosječnih 4 sata kod SPE. Metode MSPE koje kao sorbens koriste metaloorganske mreže brze su, jeftine, jednostavne, osjetljive te, ukoliko jezgre mreže nisu toksični metali, ekološki prihvatljive.^{56,58}

2.3. Zaključak

Pesticidi su tvari različitog kemijskog sastava koje se koriste s namjenom da suzbiju ili unište nametnike, štetočine i korove. Zbog sve šire i nedovoljno kontrolirane upotrebe ostaci pesticida nalaze se sve češće u hranidbenom lancu, a ako su prisutni u koncentracijama iznad propisane dopuštene vrijednosti, mogu imati posljedice na ljudsko zdravlje. Stoga je povećana potreba za pronalaženjem načina za njihovo detektiranje, kvantificiranje, uklanjanje ili smanjivanje do dopuštene vrijednosti u različitim realnim uzorcima. Mogu se pronaći u vodama, duboko u tlu hrani i piću, a razlikuju se po svojoj topljivosti, pokretljivosti i postojanosti u okolišu. Za njihovu se ekstrakciju mogu primijeniti brojne metode, a odabir ovisi o više čimbenika. Opremljenost laboratorija je jedan od glavnih, a za njime slijede novčana sredstva, utrošak vremena i reagensa, vrsta uzorka, sadržaj analita te zadana preciznost metode. Uz sve to, treba uzeti u obzir i ekološku prihvatljivost metode. Pesticidi sami po sebi jesu veliki zagađivači okoliša te treba težiti tomu da metode njihove ekstrakcije ne naprave dodatnu štetu. Idealna bi metoda trebala biti točna, selektivna, jeftina, brza i osjetljiva. Nedostatak klasične ekstrakcije tekuće-tekuće je velika količina toksičnih otapala koja se koristi uz često nedovoljno niske detekcijske granice. Razvijene su brojne moderne ekstrakcijske metode koje uklanjaju nedostatke klasičnih metoda, prije svega smanjen je volumen ili potpuno uklonjeno otapalo, postignuta je bolja osjetljivost i preciznost te pojednostavljen i ubrzan postupak ekstrakcije pesticida iz različitih realnih uzoraka prije instrumentne analize.

§ 3. LITERATURNI IZVORI

1. *Pesticide Atlas: Facts and Figures about Toxic Chemicals in Agriculture 2022 2nd Edition*, 2022.
2. A. Samsidar, S. Siddiquee, S.M. Shaarani, *Trends Food Sci. Technol.* **71** (2018) 188–201.
3. D.A. Skoog, D.M. West, F.J. Holler, S.R. Crouch, *Fundamentals of Analytical Chemistry*, 9th ed., 2014, str. 852 – 857.
4. Thermo Fisher Scientific, Pesticide Residues Analysis for Commercial Food Testing Laboratories Compendium, 2020.
5. The International Code of Conduct on Pesticide Management, World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 2014.
6. D. Želježić, P. Perković, *Sigurnost* **53** (2011) 141–150.
7. International Program on Chemical Safety, Inter-Organization Programme for the Sound Management of Chemicals, World Health Organization, WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification 2009., World Health Organization, 2010.
8. Pravilnik o mjerilima za razvrstavanje otrova u skupine, Ministarstvo zdravstva, 1999.
9. Pesticides Use, Pesticides Trade and Pesticides Indicators - Global, Regional and Country Trends, 1990 - 2020. FAOSTAT Analytical Briefs, No. 46, Rome, 2022.
10. B. Albero, M.D. Fernández, C. García-Gómez, R.A. Pérez, *Separations* **9** (2022).
11. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32023R0731> (datum pristupa: 13. srpnja 2023.)
12. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32022R0741> (datum pristupa: 13. srpnja 2023.)
13. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/?uri=CELEX%3A32002L0063> (datum pristupa: 13. srpnja 2023.)
14. T. Pihlström, A.R. Fernández-Alba, C. Ferrer Amate, M. Erecius Poulsen, R. Lippold, L. Carrasco Cabrera, P. Pelosi, A. Valverde, H. Mol, M. Jezussek, O. Malato, R. Štěpán, Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed SANTE 11312/2021, 2021.
15. T. Pihlström NFA, S.R. Amadeo Fernández-Alba, M. Gamón, M. Erecius Poulsen, R. Lippold, A. de Kok, P. Gros, C. Ferrer Amate, A. Valverde, H. Mol, M. Jezussek, O. Malato, Analytical Quality Control And Method Validation Procedures For Pesticide Residues Analysis In Food And Feed, SANTE/12682/2019, 2019.
16. G. Jurak, I. Sabljak, *Glas. bilj. zašt.* **20** (2020).
17. L. Kharbouche, M.D. Gil García, A. Lozano, H. Hamaizi, M.M. Galera, *Talanta* **199** (2019) 612–619.
18. G. Bhandari, K. Atreya, P.T.J. Scheepers, V. Geissen, *Chemosphere* **253** (2020).

-
19. T. Fisher Scientific, Pesticide Residues Analysis for Commercial Food Testing Laboratories Compendium, 2020.
 20. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/?uri=CELEX:32011R0540> (datum pristupa: 13. srpnja 2023.)
 21. B. Albero, M.D. Fernández, C. García-Gómez, R.A. Pérez, *Separations* **9** (2022).
 22. M.N. Vasilescu, A.V. Medvedovici, *Encyclopedia of Analytical Science (Second Edition)*, 2005., str. 243 – 255.
 23. M. Nasiri, H. Ahmadzadeh, A. Amiri, *Trends Analyt. Chem.* **123** (2020).
 24. EN 15662:2008: Foods of Plant Origin - Determination of Pesticide Residues Using GC-MS and/or LC-MS/(MS) Following Acetonitrile Extraction/Partitioning and Cleanup by Dispersive SPE – QuEChERS-Method, 2008.
 25. EN 12393:2013: Foods of Plant Origin - Multiresidue Methods for the Determination of Pesticide Residues by GC or LC-MS/MS, 2013.
 26. EN 15637:2008: Foods of Plant Origin - Determination of Pesticide Residues Using LCMS/MS Following Methanol Extraction and Cleanup Using Diatomaceous Earth, British Standards Institution, 2008.
 27. T. Pihlström, G. Blomkvist, P. Friman, U. Pagard, B.G. Österdahl, *Anal. Bioanal. Chem.* **389** (2007) 1773–1789.
 28. Technical Guideline on the Evaluation of Extraction Efficiency of Residue Analytical Methods, European Commission Directorate-General for Health and Food Safety, 2023.
 29. <https://chem.libretexts.org> (datum pristupa 20. svibnja 2023.)
 30. W.R. Barrionuevo, F.M. Lanças, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **69** (2002) 123–128.
 31. H. Wu, M. Zhou, J. Xu, J. Wang, J. Tong, N. Sun, M. Qian, *Anal. Methods* **14** (2022) 250–258.
 32. A. Mardani, M. Torbati, M.A. Farajzadeh, A. Mohebbi, M.R.A. Mogaddam, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* (2020) 1–14.
 33. T. Pihlström, A.R. Fernández-Alba, M. Gamón, M. Erecius Poulsen, R. Lippold, A. de Kok, P. Gros, C. Ferrer Amate, A. Valverde, H. Mol, M. Jezussek, O. Malato, Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticides Residues Analysis in Food and Feed SANTE/11813/2017, European Commission Directorate-General for Health and Food Safety, 2017.
 34. O. Koloka, V. Boti, T. Albanis, I. Konstantinou, *Separations* **10** (2023).
 35. B. Yang, S. Wang, W. Ma, G. Li, M. Tu, Z. Ma, Q. Zhang, H. Li, X. Li, *Foods* **12** (2023).
 36. W. Ahmad, A.A. Al-Sibaai, A.S. Bashammakh, H. Alwael, M.S. El-Shahawi, *Trends Analyt. Chem.* **72** (2015) 181–192.
 37. M. Rezaee, Y. Assadi, M.R. Milani Hosseini, E. Aghaee, F. Ahmadi, S. Berijani, *J. Chromatogr. A.* **1116** (2006) 1–9.
 38. X. Liu, M. Chen, Z. Meng, H. Qian, S. Zhang, R. Lu, H. Gao, W. Zhou, *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **1140** (2020).

-
39. H. Cao, Z. Chen, Y. Kong, Z. Wei, T. Ye, M. Yuan, J. Yu, X. Wu, L. Hao, F. Yin, F. Xu, *Anal. Lett.* **56** (2023) 1646–1659.
 40. H. Shaaban, *RSC Adv.* **13** (2023) 5058–5069.
 41. Y. Picó, M. Fernández, M.J. Ruiz, G. Font, *J. Biochem. Biophys. Methods* **70** (2007) 117–131.
 42. Merck, Solid Phase Extraction Products, 2018.
 43. <https://www.coleparmer.in> (datum pristupa 29. svibnja 2023.)
 44. M. Kapsi, C. Tsoutsi, T. Albanis, *MethodsX* **7** (2020).
 45. A. Economou, H. Botitsi, S. Antoniou, D. Tsipi, *J. Chromatogr. A.* **1216** (2009) 5856–5867.
 46. <https://www.waters.com> (datum pristupa 30. svibnja 2023.)
 47. <https://www.sigmaaldrich.com> (datum pristupa 30. svibnja 2023.)
 48. M.E.I. Badawy, M.A.M. El-Nouby, A.E.S.M. Marei, *Int. J. Anal. Chem.* **2018** (2018).
 49. <https://www.labicom.cz> (datum pristupa 1. lipnja 2023.)
 50. <https://ars.els-cdn.com> (datum pristupa 1. lipnja 2023.)
 51. <https://www.geminibv.com> (datum pristupa 3. lipnja 2023.)
 52. R. Boussahel, S. Bouland, K.M. Moussaoui, M. Baudu, A. Montiel, Determination of Chlorinated Pesticides in Water by SPME/GC, 2002.
 53. E. Omena, A.L. Oenning, J. Merib, P. Richter, M. Rosero-Moreano, E. Carasek, *Anal. Chim. Acta.* **1069** (2019) 57–65.
 54. E.F. Valenzuela, F.G.F. de Paula, A.P.C. Teixeira, H.C. Menezes, Z.L. Cardeal, *Talanta* **217** (2020).
 55. H.R. Nodeh, W.A. Wan Ibrahim, M.A. Kamboh, M.M. Sanagi, *RSC Adv.* **5** (2015) 76424–76434.
 56. J. Ma, G. Wu, S. Li, W. Tan, X. Wang, J. Li, L. Chen, *J. Chromatogr. A.* **1553** (2018) 57–66.
 57. A. Schoedel, O.M. Yaghi, *Macrocyclic and Supramolecular Chemistry: How Izatt–Christensen Award Winners Shaped the Field*, 2016.
 58. J. Ma, Z. Yao, L. Hou, W. Lu, Q. Yang, J. Li, L. Chen, *Talanta* **161** (2016) 686–692.

§ 4. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

CNM – ugljikovi nanomaterijali (engl. *Carbon nanomaterials*)

CNT – ugljikove nanocjevčice (engl. *Carbon nanotubes*)

CW – *Carbowax*

BU – derivati benzoil-uree

DAD – detektor s nizom dioda (engl. *Diode array detector*)

DVB – divinilbenzen

DDT – diklorodifeniltrikloroetan

DES – niskotemperaturna eutektička otapala (engl. *Deep eutectic solvents*)

DI-SPME – direktna mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *Direct immersion-solid phase microextraction*)

DLLME – disperzivna mikroekstrakcija tekuće-tekuće (engl. *Dispersive liquid-liquid microextraction*)

ECD – detektor s hvatanjem elektrona (engl. *Electron capture detector*)

ER – iskorištenje ekstrakcije (engl. *Extraction recovery*)

FID – plameno-ionizacijski detektor (engl. *Flame ionisation detector*)

FLD – fluorescencijski detektor (engl. *Fluorescence detector*)

G – grafen

GC – plinska kromatografija (engl. *Gas chromatography*)

HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High-performance liquid chromatography*)

HS-SPME – indirektna mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *Headspace – solid phase microextraction*)

IL – ionska tekućina (engl. *Ionic liquid*)

LC – tekućinska kromatografija (engl. *Liquid chromatography*)

LLE – ekstrakcija tekuće-tekuće (engl. *Liquid-liquid extraction*)

LOD – detekcijske granice (engl. *Limit of detection*)

LOQ – kvantifikacijske granice (engl. *Limit of quantification*)

MAE – ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (engl. *Microwave-assisted extraction*)

MIP – polimeri s molekulskim otiskom (engl. *Molecular imprinted polymers*)

M-DA – desamino metribuzin

M-DADK – desamino diketo metribuzin
M-DK – diketo metribuzin
MOF – metaloorganske mreže (engl. *Metal-organic frameworks*)
MRO – maksimalna razina ostataka
MS – spektrometrija masa (engl. *Mass spectrometry*)
MSPE – magnetska ekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *Magnetic solid-phase extraction*)
MWCNT – višestjenčane ugljikove nanocjevčice (engl. *Multi-walled carbon nanotubes*)
PA – akrilatni polimer
PDMS – polidimetilsiloksan
PLE – tekućinska ekstrakcija pod tlakom (engl. *Pressurized liquid extraction*)
QuEChERS – brza, jednostavna, povoljna, efektivna, hrapava i sigurna (engl. *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe*)
SEM – pretražni elektronski mikroskop (engl. *Scanning electron microscope*)
SPE – ekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *Solid-phase extraction*)
SPME – mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *Solid-phase micro-extraction*)
UA – potpomognuto ultrazvukom (engl. *Ultrasound-assisted*)
UPLC – tekućinska kromatografija ultra (visoke) djelotvornosti (engl. *Ultra performance liquid chromatography*)
UHPLC – tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti (engl. *Ultra high performance liquid chromatography*)
UV – ultraljubičasto (engl. *Ultraviolet*)