Određivanje ostataka pesticida u hrani tekućinskom kromatografijom

Čatalinac, Martin

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:230555

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

MARTIN ČATALINAC
Student 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

Kemijski odsjek
Prirodoslovno-matematički fakultet
Sveučilište u Zagrebu

ODREĐIVANJE OSTATAKA PESTICIDA U HRANI TEKUĆINSKOM KROMATOGRAFIJOM

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za analitičku kemiju Kemijskog odsjeka PMF-a

Mentorica rada: Prof. dr. sc. NIVES GALIĆ

Zagreb, 2017.

Datum predaje prve verzije Završnog rada: 18. rujna 2017.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita: 21. rujna 2017.

Mentor rada: prof. dr. sc. Nives Galić Potpis:

Sadržaj

1. Sažetak **1**

2. Uvod **2**

3. Pesticidi **3**

3.1. Vrste pesticida 4

3.1.1. Insekticidi 4

3.1.1.1. Organoklorni pesticidi 4

3.1.1.2. Organofosfatni pesticidi 5

3.1.1.3. Karbamatni pesticidi 5

3.1.1.4. Piretotroidi 5

3.1.1.5. Neonikotonoidi 6

3.1.2. Rodenticidi 6

3.1.3. Heribicidi 6

3.1.4. Fungicidi 7

3.2. Opasnosti i rizici 7

4. Analitičke metode **8**

4.1. Ekstrakcija na čvrstoj fazi 8

4.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) 8

4.3. Spektrometrija masa 9

4.3.1. Elektroraspršenje 10

4.3.2. Analizatori masa 10

5. Uzorkovanje **11**

6. Priprema uzorka **11**

6.1. Multirezidualne metode 11

6.2. Ekstrakcija na čvrstoj fazi 12

7. Analiza **13**

8. Identifikacija **13**

9. Zaključak **13**

10. Literatura **15**

1. Sažetak

Pesticidi su spojevi koji se prvenstveno koriste za povećanje prinosa biljnih kultura tako da uništavaju ili sprečavaju razvitak štetočina. Pesticidi se dijele prema namijeni (ovisno o štetočini na koju djeluju) ili prema kemijskoj skupini kojoj pripadaju. Za analizu pesticida u hrani prvo je potrebno pravilno prikupiti uzorak te odabrati i/ili razraditi odgovarajuću metodu. Prikupljanje uzorka mora se provesti u odgovarajućem vremensku roku. Uzorak hrane se pohranjuje u propisani spremnik pri čemu treba paziti na stabilnost uzorka kao i na mogućnost eventualnog onečišćenja. Prije same analize uzorak se prvo usitnjava i homogenizira. Nakon toga se pročišćava, a analit, odnosno analiti ukoncentriravaju primjenom odgovarajućih metoda, npr. ekstrakcijom na čvrstoj fazi. Pripremljeni uzorak može se analizirati različitim instrumentalnim tehnikama, vrlo često spregnutim sustavom tekućinska kromatografija - tandemna spektrometrija masa (LC-MS/MS). Kao metoda ionizacije najčešće se koristi elektroraspršenje (ESI), a trostruki kvadrupol kao analizator masa.

2. Uvod

U pesticide se ubraja veliki broj spojeva različitih fizikalno-kemijskih svojstava. Zbog toga je za njihovo određivanje potrebno koristiti raznolike metode kako bi se postigla dovoljna učinkovitost i pouzdanost rezultata. Većina metoda bazirana je na kromatografskim tehnikama. Tako je razvojem suvremenih analitičkih metoda temeljenih na primjeni tekućinske i plinske kromatografije spregnute s tandemnom spektrometrijom masa (LC-MS/MS i GC-MS/MS), omogućeno u laboratorijima multirezidualnim metodama kvantitativno istovremeno odrediti i više stotina vrsta pesticida ovisno o kemijskoj skupini (karbamati, triazinski, organofosforni, organoklorni, nikotinski, piretoidni, sulfonilurea i dr.) i ovisno o njihovoj namjeni (herbicidi, algicidi, insekticidi, fungicidi, rodenticidi, antimikrobijalni, itd.) [1], [2].

Kratkotrajna izloženost pesticidima neće biti štetna dok dugotrajna izloženost može dovesti do raznih alergija, zloćudnih oboljenja te oštećenja vitalnih organa. Zbog toga je određivanje i stalna kontrola pesticida vrlo važna jer postoje mnoge razlike u pesticidima - po načinu djelovanja, kemijskoj strukturi, biotransformaciji, načinu eliminacije iz organizma te njihovoj toksičnosti. Mehanizam djelovanja pesticida nije do kraja razjašnjen što pokazuje činjenica da je u različitim zemljama drugačija propisana maksimalna razina ostataka pesticida. Zbog toga je potreban razvoj novih metoda koje će točnije kvantitativno odrediti sadržaj pesticida u uzorku hrane [3].

Cilj ovog rada je dati pregled metoda pripreme i analize uzoraka hrane u svrhu određivanja ostataka pesticida. Metode koje se koriste moraju biti dovoljno osjetljive i sa dovoljno širokim rasponom određivanja kako bi se omogućila analiza što više vrsta pesticida.

3. Pesticidi

Pesticidi su kemijska i mikrobiološka sredstva koja se koriste za zaštitu biljaka i životinja od korova, bolesti, štetnih insekata te drugih štetnih organizama. U ova sredstva također se ubrajaju regulatori rasta i biološki pripravci koji ne služe za ishranu biljke. U pesticidima se uz određenu količinu aktivne tvari nalaze i pomoćne tvari kao što je emulgator, otapalo, okvašivač i dr. Iako pesticide uglavnom vežemo uz sredstva za zaštitu bilja, pesticidi su također i veterinarski pripravci za zaštitu životinja od nametnika, te sredstva za sanitarnu higijenu koja se koriste za smanjivanje populacije nametnika i štetnih kukaca (npr. komarac) [4].

Prema definiciji FAO-a (engl. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*) pesticidi su tvari ili smjesa više tvari koje se koriste u svrhu prevencije napada, uništavanja ili suzbijanja bilo koje vrste štetočine (prijenosnici bolesti ljudi i životinja, nepoželjne biljke – korovi i životinje koje stvaraju gubitke u proizvodnji, obradi, skladištenju, prijevozu ili stavljanju hrane na tržište, poljoprivrednih proizvoda, drveta, drvnih prerađevina te hrane za životinje) i suzbijanja štetočina koje parazitiraju u ili na tijelu životinja. Prvi poznati pesticid je elementarni sumpor koji su koristili Sumerani prije 4500 godina u Mezopotamiji [5]. Do 15. stoljeća razne otrovne kemikalije bazirane na živi, olovu i arsenu bile su upotrebljavane za suzbijanje štetočina, a u 17. stoljeću razvijena je metoda ekstrakcije nikotin sulfata iz lišća duhana. U 19. stoljeću pojavili su se prvi sintetski pesticidi čime je započeo razvoj industrije pesticida. Važno otkriće bilo je insekticidno djelovanje sintetskog spoja DDT-a (dikloro-difenil-trikloretan) koji je prvi put sintetiziran 1874. godine, a njegovo djelovanje je otkrio 1939. švicarski kemičar Paul Hermann Müller. DDT se počeo masovno proizvoditi za vrijeme druge polovice Drugog svjetskog rata za kontrolu tifusa i malarije za civile i vojnike, a nakon rata se koristio kao insekticid u agrikulturi. U današnje doba istraživanje pesticida više nije usmjereno na traženje novih aktivnih tvari, već se više radi na podešavanju postojećih aktivnih tvari u smislu veću selektivnost, veće sigurnosti za zdravlje čovjeka i životinja, te manje zagađenje samog okoliša [6].

Pesticidi mogu biti organskog podrijetla kao što su derivati fenoksi-ugljične kiseline, organoklorirani i organofosforni spojevi, sintetički piretroidi, triazini, itd. ili anorganske tvari iz raznih biljaka, gljiva i bakterija. U sastavu pesticida najčešće se nalaze otrovni elementi kao što su npr. olovo, živa i arsen. Dužim izlaganjem neki od tih elemenata postaju kancerogeni.

Najčešći pesticidi su insekticidi (uništavanje štetnih insekata kao što su muhe i kornjaši), rodentcidi (uništavanje štetnih glodavaca), herbicidi (uništavanje štetnih korova) i fungicidi (uništavanje štetnih gljiva) [4].

3.1. Vrste pesticida

3.1.1. Insekticidi

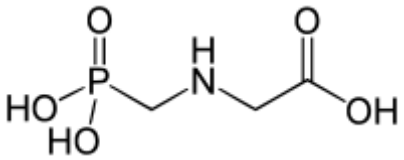
Insekticidi su skupina kemijskih sredstava koja se koristi za zaštitu usjeva od insekata i kontrolu populacije insekata prijenosnika bolesti. Prvi komercijalni insekticid je DDT koji se koristio za vrijeme Drugog svjetskog rata. Nakon DDT-a pojavili su se i jači insekticidi (lindan, dieldrin, karbamati, piretrodi). Insekticidi su dobro topljivi u mastima i tako lako dolaze u organizam gdje se dugo zadržavaju. Zbog toga je u agrikulturnim djelatnostima vrlo važno voditi brigu o toksičnosti insekticida, kako bi se smanjila ili čak uklonila mogućnost trovanja ljudi kontamiranim proizvodima.

3.1.1.1. Organoklorni pesticidi

Najpoznatija skupina insekticida su organoklorni pesticidi. U ovu skupinu spadaju DDT, aldrin, endrin, klordan, heptaklor, endosulfan itd. Većina organoklornih pesticida su jako dobro topljivi u mastima i dosta stabilni. Zbog toga lako dolazi do njihovog nakupljanja u masnom tkivu čovjeka i životinja (u tlu se zadržava i do 30 godina, a u masnom tkivu i do 10 godina) i zbog toga je upotreba većine takvih pesticida zabranjena. Organoklorni pesticidi su neurotoksini koji djeluju na periferni živčani sustav tako da sprječavaju zatvaranje kanala za natrij na aksonima što dovodi do „curenja“ natrija kroz membranu, stvarajući negativan potencijal koji destabilizira stanicu i uzrokuje hiperaktivnost stanice. Također, DDE (dikloro-difenil-dikloroetilen) koji je metabolit DDT-a, je jaki antagonist androgenskih receptora koji uzrokuje feminizaciju mužjaka životinja za vrijeme sazrijevanja. Neki od pesticida imaju i kancerogeno djelovanje (DDT, dieldrin, klordan). U ovoj skupini postoje i manje toksični, biološki razgradivi spojevi kao što su lindan i endosulfan, i njihova primjena je dozvoljena [4, 7].

3.1.1.2. Organofosfatni pesticidi

Skupina pesticida koja se danas najviše koristi su organofosfatni insekticidi. Organofosfati djeluju na enzim acetilkolinesterazu, bez kojega živci ne mogu normalno funkcionirati, tako da ga ireverzibilno deaktivira. Organofosfati se lako razgrađuju hidrolizom stoga se neće zadržavati duže vrijeme u zemlji i u organizmima. Iako se ne zadržavaju dugo, vrlo su otrovni. Nakon izlaganja organofostantim pesticidima dolazi do akutnih oboljenja pri kojem se smanjuje djelovanja funkcija mozga i glavobolja. Najpoznatiji takav pesticid je malation koji se koristi za suzbijanje komaraca i vinskih mušica. Malation je otrovan jedino u jako velikim dozama i brzo izlazi iz organizma (3 do 5 dana) te se stoga smatra dosta sigurnim[4].



Slika 1. Glifosat – najviše korišteni pesticid u SAD-u.

3.1.1.3. Karbamatni pesticidi

Karbamatni pesticidi slično djeluju kao organofosfatni pesticidi, ali razlika je u tome što karbamati reverzibilno deaktiviraju enzim acetilkolinesterazu. Jedan od najtoksičnijih takvih pesticida je karbofuran. Karbofuran je vrlo učinkovit u suzbijanju raznih insekata ali je i zato vrlo opasan. Životinje koje progutaju jedno zrno karbofurana najvjerojatnije će uginuti. Najčešće nastradaju ptice koje zamijene zrna karbofurana za sjemenke[4].

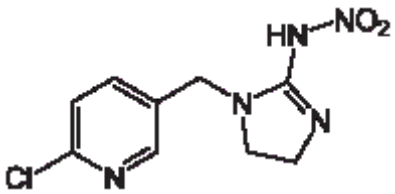
3.1.1.4. Piretotroidi

Piretroidi djeluju na živčane stanice tako da sprečavaju zatvaranje kanala za natrij. Kanal ostaje otvoren što dovodi do trajne depolarizacije membrane aksona koja uzrokuje paralizu organizma. Najpoznatiji takvi pesticidi su aletrini. To su sintetski insekticidi koji se nalaze u

komercijalnim insekticidima za kućanstvo. Aletrini su vrlo učinkoviti za ubijanje insekata ali su gotovo netoksični za ljude i životinje[4].

3.1.1.5. Neonikotonoidi

Neonikotonidi djeluju na centralni živčani sustav tako da sprečavaju prijenos impulsa preko acetokolina što vodi do paralize i smrti. Ova vrsta insekticida je vrlo toksična za kukce, dok je gotovo bezopasna za sisavce. Iako jako koristan, nekoliko zemalja je zabranila ovaj tip insekticida jer uništava staništa pčela. U ovu skupinu spada imidakloprid koji je najrašireniji insekticid na svijetu[4].



Slika 2. Imidakloprid

3.1.2. Rodenticidi

Rodenticidi su kemijska sredstva koja se koriste za suzbijanje glodavaca. Najčešće tipovi kemijskih spojeva rodenticida su: antikoagulanti (sprečavaju nastajanje faktora za zgrušavanje krvi) i metalni fosfidi (stvaranje vrlo otrovnog fosfina reakcijom s želučanom kiselinom). Iako su vrlo otrovni i učinkoviti za suzbijanje glodavaca, njihova upotreba treba biti kontrolirana jer su također otrovni za sve toplokrvne životinje i čovjeka [4].

3.1.3. Heribicidi

Herbicidi su kemijska sredstva koja se koriste za zaštitu usjeva od štetnih biljaka, tj. korova. Glavna upotreba je u poljoprivrednoj proizvodnji. Iako su vrlo toksični, a neki čak i kancerogeni, najveći dio pesticida se uništava u obradi i pripremi hrane (pečenje, kuhanje itd.). Najznačajniji herbicidi su ariloksifenoksipropionati (npr. haloksifop), triazini (npr. atrazin i cijanazin), supstituirane uree (npr. linuron i diuron), difenil eteri (kancerogeni laktofen), tiadiazoli (npr. flutiacet metil), triazoli (npr. amitrol) i izoksazoli (npr. izoksaflutol)[4].

3.1.4. Fungicidi

Fungicidi su kemijska sredstva koja se koriste za suzbijanje plijesni i gljivica na gotovim proizvodima i sirovinama radi sprečavanja kvarenja. Široko se primjenjuju u znatnim količinama što predstavlja veliki problem jer su jako toksični, a neki čak i kancerogeni. Jedan takav fungicid je etilentiourea (ETU) koji je zabranjen zbog kancerogenog utjecaja. U fungicide također spadaju i živini spojevi koji sadrže metil-živu, a koristili su se u zaštiti sjemena prije nego što su bili zabranjeni. Najviše korišteni fungicidi su dikarboksimidi, etilenbisditiokarbamati, ditiokarbamati (endokrini disruptori), organometalni fungicidi (npr. trifenilkositar), supstituirani benzeni (npr. klortalonil) i ftalimidi (npr. kaptan)[4].

3.2. Opasnosti i rizici

U hrani tretiranoj pesticidima se čak i nakon obrade nalazi ostaci pesticida. Većina pesticida u hranu dospijeva preko direktnog tretiranja biljaka sa pesticidima, a mali dio dolazi iz vodotoka rijeka i podzemnih voda prethodno zagađenih pesticidima. U meso domaćih životinja pesticidi mogu dospjeti preko hrane kojom se te životinje hrane. Pesticidi se šire na druge površine vodenim putevima. Ispiranjem poljoprivrednih površina dolaze do površinskih i podzemnih voda. Dio pesticida koji se sporo razgrađuju, koji su hlapivi li dobro topljivi u mastima mogu se prenijeti daleko od mjesta primjene. Pesticidi su u velikim količina vrlo opasni, stoga je potrebna kontrola vrste i količine pesticida da bi se osigurala sigurnost i kvaliteta namirnica. Preko hranidbenog lanca pesticidi dospijevaju u životinje koje se koriste za prehranu, te je zbog toga kontrola pesticida potrebna za namirnice kako biljnog, tako i životinjskog podrijetla. Veliki dio pesticida se gubi tijekom obrade hrane. Voće i povrće ima zaštitnu koru na kojoj se većina pesticida zadržava stoga je pranje, ljuštenje i guljenje vrlo učinkovito. Za meso i ribu vrlo je učinkovita termička obrada [8].

Upotreba pesticida uzrokuje zagađenje okoliša i vode. Zbog toga su doneseni strogi propisi o primjeni pesticida i dozvoljenim koncentracijama pesticida u vodi. Tako je prema direktivi 98/83 Europske komisije dozvoljena koncentracija pojedinih pesticida u vodi u iznosu od 0,1 μg/L, a ukupna koncentracija svih pesticida u uzorku vode 0,5 μg/L [9]. Kako bi se mogle odrediti tako niske koncentracije pesticida u uzorcima razvijene su vrlo osjetljive analitičke metode.

4. Analitičke metode

4.1. Ekstrakcija na čvrstoj fazi

Ekstrakcija na čvrstoj fazi (SPE) je metoda kojom se kemijski spojevi otopljeni ili suspendirani u tekućoj smjesi mogu razdvojiti na temelju različitih fizikalnih i/ili kemijskih svojstava. Ova metoda je veliko poboljšanje s obzirom na ekstrakciju u samo tekućoj fazi. Dolazi do potpunog razdvajanja faza, trošenja i odlaganja znatno manjih količina organskog otapala, puno je jeftinija i brža metoda jer može biti automatizirana, dok je kod ekstrakcije tekuće-tekuće potrebno većinu ekstrakcije napraviti ručno. Glavna primjena SPE metode je pročišćavanje, koncentriranje i izolacija uzoraka za analizu. SPE koristi različiti afinitet otopljenih tvari prema dvije faze – tekuća i kruta. Otopljena tvar ili suspenzija putuje kroz kolonu tekućom ili mobilnom fazom. Otopljena tvar veže se na krutu fazu, koja se još zove stacionarna faza. Do vezanja otopljene tvari na stacionarnu fazu dolazi zbog većeg afiniteta otopljene tvari prema stacionarnoj fazi. Za stacionarnu fazu je važno da se analit ili nečistoće vežu brzo i reverzibilno, te da se mogu lako eluirati. Ako se željeni analit veže na stacionarnu fazu potreban je dodatni korak u kojem se kolana ispire odgovarajućim eluensom. SPE metode za razdvajanje koriste razlike u naboju, pH-vrijednosti ili polarnosti, te naravno kombinacije navedenog. Jedna od naprednijih metoda je mikroekstrakcija na krutoj fazi (SPME) u kojoj se kao stacionarna faza koristi silikonsko vlakno sa slojem inertnog polimera. Zbog toga je omogućena izravna ekstrakcija analita iz otopine [10].

4.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti je najviše korištena kromatografska tehnika. Za razliku od standardne tekućinske kromatografije, HPLC koristi pumpe koje pod velikim pritiskom dovode otapalo (pokretnu fazu) kroz kolonu napunjenu nepokretnom fazom. Zbog toga je moguće koristiti punila s puno manjom veličinom čestica nego u klasičnoj tekućinskoj kromatografiji čime se povećava dodirna površina, a time se znatno povećava učinkovitost kromatografskog odijeljivanja. Također je povećana brzina ekstrakcije jer više nije potrebno dugo čekati da otopina prođe kroz kolonu. Još jedno poboljšanje u odnosu na klasičnu kromatografiju je mogućnost korištenja vrlo osjetljivih metoda detekcije.

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti može se podijeliti na tekućinsku kromatografiju s normalnim i sa obrnutim fazama. HPLC sa normalnom fazom je u principu ista kao standardna tekućinska kromatografija u kojoj je nepokretna faza polarnija od pokretne. Kolona je ispunjena česticama npr. silikagela koji je stacionarna faza, a kao mobilna faza koristi se nepolarno otapalo (npr. heksan). Zbog interakcije sa silikagelom polarni spojevi u smjesi će se duže zadržavati u koloni nego nepolarni koji će brzo prolaziti. HPLC sa obrnutom fazom koristi nepolarnu stacionarnu fazu i polarnu mobilnu fazu. Stacionarna faza je u ovom slučaju silikagel koji je modificiran vezanjem dugolančanih ugljikovodika (C4–C18) na površinu gela. Mobilna faza je polarno otapalo kao što je voda ili smjesa vode i alkohola ili acetonitrila. Na koloni polarni spojevi će brzo prolaziti, a nepolarni će se zadržavati zbog van der Waals-ovih interakcija sa ugljikovodicima [11].

4.3. Spektrometrija masa

Spektrometrija masa je jedna od najvažnijih analitičkih tehnika. Bazirana je na analizi molekula prema omjeru masa i naboja (*m/z*). Tijekom procesa ionizacije molekule prelaze u molekulske ione koji se mogu fragmentiraju na druge ione-fragmente. Kao rezultat analize dobiva se spektar masa koji predstavlja ovisnost relativnog intenziteta iona o njihovom omjeru mase i naboja. Spektroskopija masa se primjenjuje za određivanje strukture molekula, elementnog sastava uzoraka, omjera izotopa u uzorku, te kvantitativno i kvalitativno određivanje sastava smjese [23,24]. Uređaj koji se koristi zove se spektrometar masa. Sastoji se od ionskog izvora u kojem se ioniziraju molekule, analizatora masa koji razdvaja ione na temelju omjera mase i naboja, detektora i sustava za obradu podataka (računalo). Poznate ionizacijske tehnike su: ionizacija elektronima (engl. EI - *Electron Impact*), kemijska ionizacija (engl. CI - *Chemical Ionization*), ionizacija brzim elektronima (engl. FAB - *Fast Atom Bombardment*), matricom potpomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem (engl. MALDI - *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*) i elektroraspršenje (engl. ESI – *Elektrospray Ionization*) [11].

4.3.1. Elektroraspršenje

Ionizacija elektroraspršenjem je jedna od najčešće korišteni metoda ionizacije. Ionizacija se odvija neposredno iz otopine što omogućava analizu spojeva velikog raspona masa. Proces se odvija pri povišenoj temperaturi, iznad 100 °C i u struji internog dušika. Ionizacija može biti pozitivna i negativna, što ovisi o naponu na elektrodi i kapilari. Otopina s analitom se uvodi u metalnu cijev (kapilaru) na koju se primjenjuje visoki napon zbog čega dolazi do stvaranja pozitivnog i negativnog naboja u otopini. Ako je kapilara spojena na pozitivni kraj izvora, kationi će putovati prema katodi te se nakupljati na površini tekućine. Na vrhu igle stvara se aerosol od kapljica otapala. Jako nabijene kapi prolaze kroz struju dušika što dovodi do isparavanja otapala i smanjivanja kapljica. Kada se kapljice dovoljno smanje dolazi do dijeljenja kapljica zbog velikih odbojnih sila. Proces traje sve dok ne ostane jedna ionizirana molekula u kapljici otapala [12].

4.3.2. Analizatori masa

Spektrometri masa omogućavaju analizu iona u vremenu i prostoru. Najčešće korišteni analizatori su kvadrupolni maseni analizatori koji koriste oscilirajuća električna polja da bi selektivno stabilizirali ili destabiliralizirali ione. Ioni se razdvajaju na temelju različitih omjera mase i naboja. Kvadrupolni analizator masa sastoji se od četiri cilindrične elektrode, koje su uparene i paralelne. Na elektrode se primjenjuju istosmjerna i izmjenična struja što dovodi do stvaranja kvadrupolnog polja s radio frekvencijom (RF) između elektroda. Ioni čiji omjer mase i naboja nije u skladu sa podešenim poljem sudaraju se sa elektrodama pri čemu gube naboj, ili se izbacuju izvan polja, odnosno pod utjecajem vakuuma iz analizatora masa. Zbog toga samo ioni koji imaju stabilnu putanju prolaze kroz kvadrupol i dolaze do detektora. Za postizanje boljih rezultata koristie se višestruki kvadrupolni analizatori od kojih je najčešći trostruki kvadrupolni analizator (QqQ). Glavni princip rada je isti kao i kod jednostrukog kvadrupola. Prvi i treći kvadrupoli imaju funkciju masenih filtera dok je srednji kvadrupol kolizijska ćelija koja je spojena samo na izmjenični napon. Ioni analita koji prođu kroz prvi kvadrupol dolaze do srednjeg kvadrupola u kojem se fragmentiraju pri interakciji s kolizijskim plinom (obično argon ili dušik). Produkti fragmentacije se analiziraju u trećem kvadrupolu [13].

5. Uzorkovanje

Uzorkovanje hrane je prvi korak u analizi hrane koja može biti provedena u svrhu provjere sigurnosti hrane, u smislu da hrana ne sadrži štetne tvari, ili da sadrži samo određene štetne tvari ili aditive u dozvoljenim koncentracijama. Analiza hrane se primarno provodi od strane lokalnih vlasti, odnosno akreditiranih laboratorija. Da bi počela analiza, potrebno je izabrati mali dio od cjelokupne količine hrane za analizu. Dio koji se izabere mora biti predstavljati cjelokupni proizvod koji se analizira, a takav uzorak se zove reprezentativni uzorak. Prilikom uzorkovanja potrebno je paziti da ne bi došlo do oštećenja ili kontaminacije uzorka. Svaki uzorak je zbog toga potrebno staviti u čistu, inertnu, neprozirnu plastičnu vrećicu što sprečava gubitak vlage, te štiti od oštećenja i kontaminacije. Također, uzorak se mora dostaviti u laboratorij u roku od 24 sata od uzorkovanja i tijekom prijevoza mora biti ohlađen. U slučaju da nije moguće dostaviti uzorak na vrijeme, potrebno je uzorak duboko zamrznuti u istom roku [14].

Pri uzimanju uzoraka iz polja potrebno je odabrati reprezentativnu površinu za to polje, što također ovisi o veličini polja i za veća polja će tako biti više serija uzoraka. Uzorci se uzimaju u obrascu u obliku slova „W" ili „X" preko polja. Biljke se režu na razini zemlje, a uzorak mora sadržavati najmanje 10 biljaka s minimalnom masom od 1 kg. Zemlja i oštećeni listovi se moraju ukloniti a pranje nije dozvoljeno jer se tako može smanjiti količina nitrata. Za uljarice, kavu i začine minimalna masa uzorka je 0,5 kg. Prije analize uzorak je potrebno homogenizirati usitnjavanjem. Iz dobivene kaše se uzima jedan ili više uzoraka [15].

6. Priprema uzorka

6.1. Multirezidualne metode

Analiza tragova pesticida u uzorcima hrane znatno se razvila u zadnjih 50 godina. S razvojem novih tehnologija pokazalo se da najefikasnije analize koriste multirezidualne metode (MRM). Prva značajna multirezidualna metoda je bila Millsova metoda, razvijena 1960. od strane kemičara P.A. Mills koji je bio zaposlen u američkoj Agencija za hranu i lijekove, FDA. Ova metoda pogodna je za određivanje organoklornih i drugih nepolarnih pesticida koji su se u to doba jako koristili. Millsovom metodom, pesticidi se iz nemasne hrane ekstrahiraju u acetonitril (MeCN). Ova metoda zbog toga nije bila pogodna za analizu relativno polarnih

pesticida kao što su neki organofosforni pesticidi. Zbog toga je bilo potrebno razviti metode koje će moći analizirati smjese koje nisu ekstrahirane u Millsovoj metodi. Metode koje su se razvile su bile modificirane Millsove metode. Umjesto acetonitrila koristi se aceton što omogućava ekstrakciju većeg broja pesticida. U fazi odjeljivanja i dalje se koristi nepolarno otapalo (diklormetan ili diklormetal – petrolej eter) da bi se uklonila voda. Također, natrijev klorid (NaCl) se dodaje u vodenu fazu što još dalje pospješava efikasnost metode. Prva takva metoda je bila Beckerova u kojoj se NaCl direktno dodavao u početni ekstrakt, ali to je bilo samo djelomično učinkovito. U Lukeovoj i Spechtovoj metodi kruti NaCl se dodavao naknadno što je dovodilo za zasićenja vodene faze sa NaCl, zbog čega je došlo do većeg iskorištenja samog procesa. Zbog očuvanja okoliša i zdravlja razvile su se metode koje koriste alternativna neklorirana otapala. Spechtova metoda koristi mješavinu cikloheksana i etil acetata (1 : 1). Lukeova metoda zaobilazi fazu odvajanja tako da dodaje kombinaciju fruktoze, $MgSO_4$ i NaCl u početni ekstrakt što dovodi do razdvajanja acetona i vode bez upotrebe nepolarnog otapala. Još jedan od češće korištenih otapala za ekstrakciju je etil acetat (EtAc). EtAc ima prednost jer se samo djelomično ne miješa sa vodom, zbog čega nije potreban dodatak nepolarnih otapala. Polarniji pesticidi će se slabije odvajati u EtAc stoga je potrebno dodati velike količine Na_2SO_4 [16].

6.2. Ekstrakcija na čvrstoj fazi

Zbog potrebe automatizacije i smanjivanje potrošnje otapala počela se koristiti metoda ekstrakcije na čvrstoj fazi (SPE). Vodene otopine s uzorkom se provode kroz kolonu u kojoj se pesticidi vežu na čvrstu fazu. Pesticidi se zatim eluiraju sa kolone odgovarajućim organskim otapalom. Prije primjene SPE metode uzorak mora biti čist i homogeniziran. U otopinama se često nalaze nepotrebne tvari kao soli, lipidi, proteini i nepotrebni ugljikohidrati zbog čega je potrebno ovu metodu prilagoditi. Koriste se selektivne krute faze, kao što su imunosorbensi ili posebni polimeri sa šupljinama (engl. MIP – *Molecularly Imprinted Polymer*). Kao otapala se koriste ista otapala kao i u multirezidualnim metodama, a najčešća su etil acetat, acetonitril i aceton. Svrha ove metode u analizi pesticida je primarno ekstrakcija i koncentriranje uzorka prije daljnje analize [17].

7. Analiza

Ekstrahirani uzorak potrebno je dalje analizirati i za analizu pesticida primarno se koristi HPLC metoda sa obrnutim fazama, što znači da je pokretna faza polarna, a stacionarna faza nepolarna. Kao stacionarna faza koristi se nepolarni silica gel oktadecilsilan (C_{18}). Za eluiranje koristi se gradijentno ispiranje sa odgovarajućom smjesom otapala (najčešće se koriste acetonitril, metanol i voda u različitim omjerima). Za razliku od izokratnog ispiranja gdje se tijekom cijelog kromatografskog procesa koristi otapalo iste jačine, kod gradijentnog ispiranja sastav mobilne faze se linearno mijenja. Prednost korištenja gradijentnog ispiranja je postizanje optimalnih uvjeta smanjenjem polarnosti mobilne faze, što za posljedicu ima poboljšano ispiranje hidrofobnih tvari vezanih na stacionarnoj fazi. Eluiranje se može poboljšati dodatkom organske kiseline (octena ili mravlja kiselina), amonijevih soli (amonijev format ili amonijev acetat), ili kombinacijom navedenih, u mobilnu fazu [18].

8. Identifikacija

Radi ubrzanja, automatizacije i povećanja efikasnosti analize, tekućinska kromatografija se spreže sa spektrometrijom masa (LC-MS/MS). Ovakav vezani sustav omogućava ne samo kvalitativne, već i kvantitativne analize. Kromatografskim metodama će se odvajati sastojci smjese, a spektrometrijom masa će se identificirati pojedini sastojci smjese. Prijenos odijeljenih sastojaka smjese iz kromatografa u ionski izvor spektrometra masa omogućen je posebnim međuspojem. Posebno sučelje je potrebno jer maseni analizatori obično rade pod vakuumom, dok se kromatografsko odjeljivanje odvija pri povišenom tlaku. Najčešća metoda ionizacije je elektroraspršenje (ESI) koji ima dva načina rada, pozitivni i negativni, pri čemu nastaju protonirani, odnosno deprotonirani molekulski ioni. U analizi pesticida se koriste oba načina rada, ali puno češće pozitivni jer pokriva veći broj pesticida. Plinska kromatografija se također može koristiti, ali se koristi u manjoj mjeri jer nije primjenjiva na sve pesticide [18].

9. Zaključak

U ovom radu opisane su metode koje se koriste za uzorkovanje i analizu pesticida u hrani. Zbog štetnog djelovanja pesticida na okoliš i zdravlje čovjeka potrebne su osjetljive, selektivne i robusne analitičke metode za otkrivanje proizvoda s nedozvoljenom

koncentracijom pesticida. Prije same analize potrebno je proizvod pravilno uzorkavati i pripremiti za samu analizu. Kod pripreme uzoraka najbolja metoda se pokazala multirezidualna metoda, a u manjoj mjeri se koristi i ekstrakcija na čvrstoj fazi. Za razdvajanje komponenti u analizi pesticida najefikasnija metoda je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti koja je spregnuta s tandemom spektrometrija masa. Pesticidi znatno povećavaju prinose biljnih proizvoda i zbog toga će se uvijek razvijati novi pesticidi, a kao posljedicu toga razvit će se nove, ili poboljšavati stare, metode za efikasnije otkrivanje pesticida.

10. Literatura

[1] http://byjus.com/chemistry/pesticides/ pregledano 20.08.2017

[2] https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/types-pesticide-ingredients pregledano 20.08.2017.

[3] M. Sanborn, K.J. Kerr, L.H. Sanin , D.C. Cole, K.L. Bassil, C. Vakil, Non-cancer health effects of pesticides: systematic review and implications for family doctors, *Can. Fam. Physician*. **53** (2007) 1712–1720.

[4] http://westnile.ca.gov/special/category_a/?page=Chapter2.htm pregledano 21.08.2017.

[5] G.V. Rao, O.P. Rupela, V.R. Rao, Y.W. Reddy, Role of biopesticides in crop protection: present status and future prospects, *Indian J. Plant Protect*. **35** (2007) 1–9.

[6] https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/ddt-brief-history-and-status

[7] M. Krstevska-Konstantinova, C. Charlier, M. Craen, M. Du Caju, C. Heinrichs, C. de Beaufort, G. Plomteux, J.P. Bourguignon, Sexual preocity after immigration from developing countries to Belgium: evidence of previous exposure to otganochlorine pesticides, *Hum. Reprod*. **16** (2001) 1020–1026.

[8] U. Bajwa, K.S. Sandhu, Effect of handling and processing on pesticide residues in food, *J. Food Sci. and Technol*. **51** (2014) 201–220.

[9] http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:1998:330:0032:0054:EN:PDF pregledano 22.08.2017. Official Journal of the European Communities, COUNCIL DIRECTIVE 98/83/EC, 1998

[10] D. A. Skoog, D. M. West, J. F. Holler, S. R. Crouch, *Fundamentals of Analytical Chemistry* 9th ed, Thomson-Brooks / Cole, Belmont, 2013, 856-857

[11] D.A. Skoog, D.M. West, J.F. Holler, S. R. Crouch, *Fundamentals of Analytical Chemistry* 9th ed, Thomson-Brooks / Cole, Belmont, 2013, 913–921.

[12] C.S. Ho, C.W.K. Lam, M.H.M. Chan, R.C.K. Cheung, L.K. Law, L.C.W. Lit, K.F. Ng, M.W.M Suen, H.L. Tai, Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications, *Clin. Biochem. Rev*. **24** (2003) 3–12.

[13] D.A. Skoog, D.M. West, J.F. Holler, S.R. Crouch, *Fundamentals of Analytical Chemistry* 9th ed, Thomson-Brooks / Cole, Belmont, 2013, str. 814–818.

[14] http://agsci.psu.edu/aasl/plant-analysis/plant-tissue-total-analysis/instructions-for-taking-samples-for-plant-analysis pregledano 24.08.2017.

[15] C.S. Lin, G. Poushinsky, M. Meunn, An examination of five sampling methods under random and clustered disease distributions using simulation. *Can. J. Plant Sci*. **59** (1979) 121–130.

[16] S.J. Lehotay, M. Anastassiades, Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and "Dispersive Solid-Phase Extraction" for the Determination of Pesticide Residues in Produce, Journal of AOAC INTERNATIONAL, **86** (2003) 412–431.

[17] D. Štajnbaher, L. Župančić-Kralj, Multiresidue method for determination of 90 pesticides in fresh fruits and vegetables using solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chrom. A* **1015** (2003) 185–198.

[18] Y. Pico, C. Blasco, G. Font, Environmental and food applicationsof LC–tandem mass spectrometry in pesticide-residue analysis: an overview, Labaratorij za hranu i toksikologiju, Farmaceutski fakultet, Valencija, 2003.