



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2013 00879**

(22) Data de depozit: **21.11.2013**

(41) Data publicării cererii:
29.05.2015 BOPI nr. **5/2015**

(71) Solicitant:
• ICDO-INOE 2000 INSTITUTUL DE
CERCETĂRI PENTRU INSTRUMENTAȚIE
ANALITICĂ CLUJ-NAPOCA, STR. DONATH
NR.67, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(72) Inventatori:
• MICLEAN MIRELA, STR.AVRAM IANCU
NR.158, BL.E, AP.5, FLOREȘTI, CJ, RO;
• SENILĂ LĂCRĂMIOARA, STR. BUCIUM
NR. 1, BL. B1, AP. 30, ET. 7,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• CADAR OANA-ALINA, STR.MIGDALULUI
NR.14, AP.20, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• ROMAN MARIUS, BD.MUNCII NR.87 A,
AP.52, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(54) **METODĂ DE DETERMINARE A CLORPIRIFOS ÎN PROBE DE
SEDIMENT PRIN EXTRAȚIE ULTRASONICĂ,
MICROEXTRAȚIE ÎN FAZĂ SOLIDĂ ÎN HEADSPACE ȘI GAZ
CROMATOGRAFIE CU DETECȚIE CU CAPTURĂ DE
ELECTRONI (USE-HS-SPME/GC-ECD)**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă analitică, rapidă și simplă, de determinare a cantității de insecticid clorpirifos din probele de sedimente, prin extracție cu ultrasunare, urmată de microextracție în fază solidă, în headspace și gaz cromatografie cu detector cu captură de electroni. Metoda conform invenției are la bază determinarea clorpirifosului în probe de sedimente, prin preextracția cu ultrasunare timp de 15...30 min, la o frecvență de 35 kHz și o putere de 320 W, urmată de microextracția în fază solidă, în headspace, la o temperatură de 40...90°C, cu o viteză de agitare cuprinsă în intervalul 700...1000 rot/min timp de 10...90 min, iar în final se realizează analiza prin gaz, cromatografie capilară cuplată cu detector cu captură de electroni.

Revendicări: 1
Figuri: 2

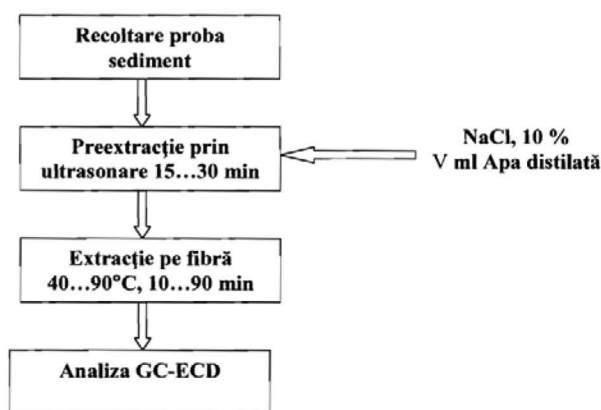


Fig. 1



Metodă de determinare a clorpirifos în probe de sediment prin extracție ultrasonică, microextracție în fază solidă în headspace și gaz cromatografie cu detecție cu captură de electroni (USE-HS-SPME/GC-ECD)

DESCRIERE

Invenția se referă la o metodă analitică rapidă, simplă și sensibilă de determinare a clorpirifos în probe de sedimente, prin extracție cu ultrasunare, urmată de microextracție în fază solidă în headspace și gaz cromatografie cu detector cu captură de electroni (USE-HS-SPME/GC-ECD).

Clorpirifos [O,O-dietil O-(3,5,6-tricloro-2-piridinil)-fosforotioat] este unul dintre cele mai utilizate pesticide organofosforice. Clorpirifos este un insecticid non-sistemic, care este eficient împotriva unei game largi de boli produse de insecte, ale unor plante de mare importanță economică (Fang et al., 2006). Reziduuri de clorpirifos au fost detectate în diferite sisteme ecologice. Cantități considerabile de clorpirifos fie se acumulează în sol, fie pătrund în cursurile de ape, după aplicare. Din păcate, mai puțin de 0,1% din cantitatea totală de pesticide atinge „ținta”, iar restul rămâne în mediu (Chishti et al., 2013). Aplicarea masivă a clorpirifosului a dus la contaminarea apei și solului, precum și la disruperea ciclurilor biogeochimice, ducând la punerea în pericol a echilibrului ecologic (Kulshrestha and Kumari, 2011). În plus, acest pesticid a provocat efecte toxice la specii ne-țintă, cum sunt: disrupere endocrină, anomalii la naștere, greutate corporală scăzută la naștere, disfuncții ale sistemului nervos, anormalități ale sistemului imun (Rauh et al., 2011), precum și cancer de vezică și anomalii cromozomiale (Lee et al., 2004).

Clorpirifos manifestă diferite grade de afinitate pentru solurile și sedimentele acvatice. Adsorbția tinde să reducă mobilitatea clorpirifos, dar adsorbția la materia organică dizolvată duce la creșterea mobilității acestuia. Adsorbția la sedimentele suspendate constituie principala cale de migrare a clorpirifos în apele de suprafață, ducând la un potențial pericol asupra organismelor acvatice (Gebremariam et al., 2012).

Pentru determinarea unor contaminanți, cum este clorpirifos, în probe de mediu sunt necesare metode analitice extrem de sensibile, deoarece acești compuși sunt prezenți în probe în concentrații extrem de reduse și datorită nivelurilor de detecție foarte scăzute impuse de legislație, aceste metode analitice implică

prepararea eficientă a probei, precum și detecția, identificarea și cuantificarea la nivel de urme și ultra-urme.

În străinătate există metode de bioremediere a solului poluat cu clorpirifos. Metoda descrisă de brevetul CN101966530 B/2012 se bazează pe tratarea solului cu *Bacillus Latersprorus* DSP, care are capabilitatea de a degrada clorpirofosul din sol. Metoda descrisă de brevetul CN102517234 A/2012 se bazează pe tratarea solului cu microorganisme noi, de tip *Klebsiella*. Aceste microorganisme sunt capabile să degradeze clorpirifosul din sol prin dezvoltarea unui inocul degradant care folosește o tehnologie microbială. De asemenea, invenția CN 201210589025/2012 descrie o metodă de determinare a clorpirofosului din reziduuri cu ajutorul imuno-senzorilor. Metoda descrisă de brevetul CN 200910078709/2009 se bazează pe degradarea clorpirofosului din sol prin iradiere de raze gama, la temperaturi și presiuni normale.

De asemenea, în străinătate există o metodă asemănătoare de determinare a unor pesticide, inclusiv clorpirifos, în probe de mere prin microextracție în fază solidă în headspace cuplată cu gaz cromatografie cu spectrometrie de masă (Abdulra'uf și Tan, 2013).

În țară, după informațiile noastre, nu s-a utilizat sau aplicat o metodă de determinare a clorpirofosului din sedimente.

Scopul prezentei invenții este elaborarea unei metode analitice de determinare rapidă, simplă și sensibilă a clorpirifos în probe de sedimente, prin extracție cu ultrasonare, urmată de microextracție în fază solidă în headspace și gaz cromatografie cu detector cu captură de electroni (USE-HS-SPME/GC-ECD).

Metoda propusă permite determinarea clorpirifos în probe de sedimente și constă în pre-extracția analitului din probe prin ultrasonare (USE), urmată de concentrarea și extracția analitului prin microextracția lor în fază solidă în headspace, separarea analitului pe coloană capilară nepolară, identificarea și cuantificarea lui prin gaz cromatografie cu detecție cu captură de electroni, pentru creșterea sensibilității metodei.

Metoda USE-HS-SPME/GC-ECD propusă este eficientă pentru determinarea clorpirifos în probe de sediment, la nivel de urme. Prin cuplarea tehnicilor de extracție USE și SPME se obține o tehnică mai eficientă, în comparație cu aplicarea celor două metode singure, scurtând timpul de preparare a probelor, crescând sensibilitatea metodei și eliminând volumele de solvenți organici utilizate.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este:

- Reduce timpul de extracție cu 90% față de metodele convenționale (extracția Soxhlet durează 10-16 ore).

Avantajele metodei:

- metoda de extracție USE permite extracția eficientă a clorpirifos din probe de sedimente, permite obținerea unor limite de detecție extrem de scăzute, este mai rapidă, mai ieftină și scade consumul de solvenți organici toxici comparativ cu metodele convenționale;
- metoda de extracție SPME este rapidă, simplă și nu utilizează solvenți organici și concentrează într-o singură etapă extracția și concentrarea analitului, iar prin imersarea fibrei în headspace (HS) se elimină coextracția altor compuși organici din matricea probei, așa cum s-ar putea produce în cazul extracțiilor convenționale (de exemplu, Soxhlet);
- separarea, identificarea, detecția și cuantificarea analitului se realizează prin GC-ECD pe coloană capilară nepolară, astfel încât metoda analitică propusă de determinare a clorpirifos în probe de sedimente este economică, rapidă și extrem de sensibilă.

Model de aplicare

În fig. 1 sunt prezentate etapele metodei analitice de determinare a clorpirifos în probe de sediment prin USE-HS-SPME/GC-ECD. După recoltare, proba de sediment se omogenizează și se supune preextracției prin ultrasonare, apoi microextracției în fază solidă în headspace. Pentru aceasta, se cântărește cu exactitate o masă m de sediment într-un flacon de sticlă de volum V cu capac de Al/PTFE, apoi se adaugă $m1$ g sare (NaCl) pentru facilitarea volatilizării analitului, $v1$ ml apă distilată și un agitator magnetic pentru omogenizarea amestecului, apoi flaconul se sigilează cu dop de Al cu septum de PTFE. Flaconul se introduce în baia de ultrasonare, menținând nivelul apei deasupra nivelului amestecului din flacon și proba se supune extracției ultrasonice timp de 15...30 min, la o frecvență și putere de 35 kHz și respectiv 320 W. După sonicare, se efectuează extracția HS-SPME, prin introducerea flaconului într-o baie de încălzire la 40...90°C, viteza de agitare se reglează la 700...1000 rot/min, apoi fibra SPME de tip poliacrilat (PA) 85 μ m se introduce în spațiul de deasupra probei (în headspace), iar extracția se efectuează timp de 10...90 min. Analog se prepară o probă blanc, a reactivilor.

Analiza gaz cromatografică a clorpirifos se efectuează prin injectarea fibrei PA în inletul gaz cromatografului, în modul „splitless”, menținut izoterm la 280°C, timpul de desorbție fiind de 5 minute. Coloana capilară nepolară recomandată este de tip DB-1, 30 m × 0,25 mm × 0,25 μm, iar gazul purtător He de înaltă puritate, cu un debit de 1 ml/min. Programul aplicat pentru temperatura coloanei în GC este următorul: temperatura inițială 80°C, menținută timp de 5 min, apoi temperatura se crește cu 10°C/min până la 280°C și se menține timp de 15 min. Temperatura detectorului este menținută la 300°C, iar a injectorului la 280°C. În figura 2 este prezentată o cromatogramă a unei probei de sediment analizată prin metoda USE-HS-SPME/GC-ECD

Parametrii de performanță ai metodei de determinare a clorpirifos în sedimente, prin USE-HS-SPME/GC-ECD sunt:

- Limitele de detecție (LD) și de cuantificare (LQ) s-au determinat experimental utilizând raportul semnal/zgomot multiplicat cu 3, respectiv 10. Astfel, LD = 0,35 μg/kg și LQ = 1,0 μg/kg. Deoarece analitul s-a concentrat pe fibră și a fost transferat rapid în coloana capilară s-au obținut limite de detecție foarte scăzute;
- Acuratețea metodei s-a determinat prin experimente de recuperare (R%) prin extracția clorpirifos din probe de sediment îmbogățite, preparate prin adăugarea de volume adecvate de soluție de lucru la 5 g de probă blank. Precizia, exprimată ca repetabilitate (%RSD) s-a determinat prin trei extracții succesive a clorpirifosului din probe blank îmbogățite. Astfel, valorile obținute pentru recuperare sunt: R = 84,2% și RSD = 12,6%.

- Abdulra'uf, L. B., Tan, G. H., 2013. Multivariate study of parameters in the determination of pesticide residues in apple by headspace solid phase microextraction coupled to gas chromatography–mass spectrometry using experimental factorial design, *Food Chemistry*, 141, 4344–4348.
- Chishti, Z., Hussain, S., Arshad, K. R., Khalid, A., Arshad, M., 2013. Microbial degradation of chlorpyrifos in liquid media and soil, *J. Environ. Manag.*, 114, 372-380.
- Fang, H., Yu, Y.L., Wang, X., Shan, M., Wu, X.M., Yu, J.Q., 2006. Dissipation of chlorpyrifos in pakchoi-vegetated soil in a greenhouse, *J. Environ. Sci.*, 18, 60-764.
- Gebremariam, S. Y., Beutel, M. W., Yonge, D. R., Flury, M., Harsh. J. B., 2012. Adsorption and desorption of chlorpyrifos to soils and sediments, *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 215, 123-75.
- Kulshrestha, G., Kumari, A., 2011. Fungal degradation of chlorpyrifos by *Acremonium sp.* strain (GFRC-1) isolated from a laboratory-enriched red agricultural, *Biol. Fertil. Soils*, 47, 219-225.
- Lee, W. J., Blair, A., Hoppin, J. A., Lubin, J. H., Rusiecki, J. A., Sandler, D. P., Dosemeci, M., Alavanja, M. C., 2004. Cancer incidence among pesticide applicators exposed to chlorpyrifos in the agricultural health study, *J. Nat. Cancer Inst.*, 96, 1781-1791.
- Rauh, V., Arunajadai, S., Horton, M., Perera, F., Hoepner, L., Barr, D.B., Whyatt, R., 2011. 7-Year neuro developmental scores and prenatal exposure to chlorpyrifos, a common agricultural pesticide, *Environ. Health Perspect.*, 119, 1196-1201.

REVENDICARE

Metodă analitică de determinare a clorpirofos în probe de sedimente, prin extracție cu ultrasonare, urmată de microextracție în fază solidă în headspace și gaz cromatografie cu detector cu captură de electroni **caracterizată prin aceea că** are la bază determinarea clorpirifos în probe de sedimente prin preextracția prin ultrasonare (timp de 15...30 min, la o frecvență de 35 kHz și putere de 320 W), urmată de microextracția în fază solidă în headspace (temperatura de 40...90°C, viteza de agitare de 700...1000 rot/min, timp de 10...90 min), în final analiza prin gaz cromatografie capilară cuplată cu detector cu captură de electroni (GC-ECD).

DESENE

Figura 1. Etapele metodei analitice de determinare a clorpirofos în probe de sediment prin USE-HS-SPME/GC-ECD

Figura 2. Cromatograma probei de sediment analizată prin metoda USE-HS-SPME/GC-ECD

Figura 1. Etapele metodei analitice de determinare a clorpirofos în probe de sediment prin USE-HS-SPME/GC-ECD

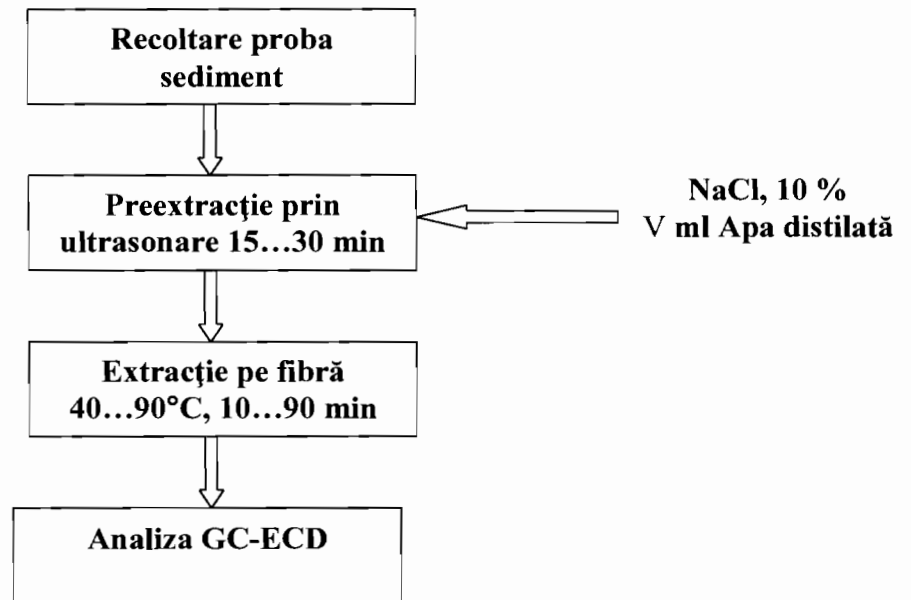


Figura 2. Cromatograma probei de sediment analizată prin metoda
USE-HS-SPME/GC-ECD

