

Synneva Christine Sårheim

# Sammenligning av ekstraksjonsmetoder av organofosfat-plantevernmidler i vann til bruk i kromatografisk analyse

Veilder: Rudolf Schmid

**Mai 2020**

**NTNU**

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet.

Fakultet for naturvitenskap

Institutt for kjemi

**Bacheloroppgave**

**2020**





Synneva Christine Sårheim

# Sammenligning av ekstraksjonsmetoder av organofosfat-plantevernmidler i vann til bruk i kromatografisk analyse

Veilder: Rudolf Schmid

Bacheloroppgave  
Mai 2020

**NTNU**

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet.  
Fakultet for naturvitenskap  
Institutt for kjemi

 **NTNU**  
Kunnskap for en bedre verden



## Table of Contents

<b>Mål</b> .....	<b>1</b>
<b>Introduksjon</b> .....	<b>1</b>
<b>Teori</b> .....	<b>2</b>
<b>Organofosfater</b> .....	<b>2</b>
<b>Kromatografiske metoder</b> .....	<b>4</b>
Gass-Kromatografi (GC) .....	4
Høytrykk væske kromatografi (HPLC).....	5
LOD og LOQ.....	5
<b>Ekstraksjonsmetoder</b> .....	<b>6</b>
Klassisk faststoff-væske ekstraksjon .....	6
Væske-væske-ekstraksjon.....	8
<b>QuEChERS-Ekstraksjonsmetode</b> .....	<b>9</b>
<b>Diskusjon</b> .....	<b>10</b>
<b>Rask (Quick)</b> .....	<b>11</b>
<b>Lett (Easy)</b> .....	<b>11</b>
<b>Billig (Cheap)</b> .....	<b>12</b>
<b>Effektiv (Effective)</b> .....	<b>13</b>
<b>Robust (Rugged)</b> .....	<b>13</b>
<b>Trygg (Safe)</b> .....	<b>14</b>
<b>Gjenvinning</b> .....	<b>15</b>
<b>Konklusjon</b> .....	<b>17</b>
<b>Referanser</b> .....	<b>19</b>

## Mål

Organofosfater er organiske stoffer som inneholder en ester med fosforsyre(2019). De er oftest brukt som plantevernmidler eller flammehemmere. Rester av organofosfater blir ofte avsatt i naturen, noe som fører til store forurensinger i miljøet.(Fontana et al., 2010)

Plantevernmidler er ofte laget for å drepe insekter, men reagerer ofte ikke selektivt. Dersom eksponert for høye konsentrasjoner, kan både andre dyr og mennesker bli påvirket. Hos mennesker kan kronisk utsettelse for organofosfat-plantevernmidler utvikle leverfeil, nyrefeil, hjertefeil, nervefeil, fosterskader og redusert fertilitet. (Pereska et al., 2019) Dersom inntatt i for store doser kan organofosfat-plantevernmidler føre til død. (WHO, 2008) Dette gjør at mengde organofosfat-plantevernmidler i blant annet drikkevann blir regulert av EU. Grensen er maks 0.1µg/L for hvert plantevernmiddel og maks på 0.5µg/L totalt, inklusivt ikke-organofosfat plantevernmidler.(Union, 1998)

Kromatografi har blitt brukt i en lengre periode for analyse av organofosfater. Kromatografien er egnet til slike analyser da den kan både brukes til kvalitativ og kvantitativ analyse, har detektorer som selektivt kan finne organofosfatene, og gir ofte gode resultater på analyse av plantevernmidler. Da det kun er tillatt små konsentrasjoner plantevernmidler i vann, er det viktig med analysemetoder som kan detektere og kvantifisere slike konsentrasjoner nøyaktig. Gode ekstraksjonsmetoder er essensielle i overvåkingen av organofosfater i vannmasser, da det er her man kan forsikre seg at hele prøven blir analysert. Dersom ekstraksjonsmetoden er dårlig, kan det forekomme at ikke all plantevernmiddel blir ekstrahert, noe som kan gjøre at man godkjenner vann som egentlig har for høy konsentrasjon plantevernmiddel.

## Introduksjon

Målet med oppgaven er å finne den optimale ekstraksjonsmetoden til bruk i kromatografisk analyse av organofosfater i vann. Her blir det tatt utgangspunkt i metodene brukt i dag. Disse blir sammenlignet for å finne ut om en av dem er optimal, eller om flere har forskjellige fordeler som kan være viktige i ulike situasjoner.

Det vil kun være fokus på ekstraksjonsmetoder til bruk i gass-kromatografi og væske-kromatografi. Dette primært fordi disse analysemetodene dominerer i slike analyser. Det vil ikke bli sett på ikke-kromatografiske analysemetoder. Oppsettet til kromatografen, temperatur-innstillinger, mobilfase, detektor osv, vil heller ikke bli diskutert. Primært fordi det ikke er plass, men også fordi dette vil være påvirket av hvilken forbindelse man ser på.



For eksempel vil organofosfatene variere i polaritet, og derfor vil det være forskjellige mobilfaser som passer best til forskjellige organofosfater i væske-kromatografi. Videre vil detektorene kunne påvirkes av andre forbindelser tilstede i prøven. Man fant blant annet ut at høy svovelkonsentrasjon i prøver gav dårlige resultat ved bruk av flamme-fotometrisk-detektor (FPD, flame photometric detector)(Lee and Wylie, 1991).

Vann er eneste kontaminerte objekt som blir fokusert på. Andre objekt som blir forurenset og analysert, som for eksempel matvarer, blir ikke tatt med i denne oppgaven.

Videre blir det kun fokusert på organofosfat-plantevernmidler, ikke plantevernmidler av andre typer og heller ikke organofosfat-flammehemmere. I det siste har det kommet polare, vannløselige organofosfater, som for eksempel omethoate. Disse vil oppføre seg annerledes enn upolare organofosfater. Derfor kreves andre ekstraksjonsmetoder (Geiß and Gebert, 2006). Heller ikke disse blir vurdert, og det blir fokusert på de kjente, relativt upolare forbindelsene.

Da det er veldig mange forskjellige typer organofosfater, var det vanskelig å finne flere forskjellige ekstraksjonsmetoder som analyserte de samme fosfatene. Da de fleste ekstraksjonsmetodene bruker polaritet og hydrofob-interaksjoner i ekstraksjonen vil ikke den spesifikke organofosfaten være utslagsgivende for hvorvidt ekstraksjonsmetoden fungerer, så lenge man bestemmer at man ikke ser på polare og vannløselige forbindelser.

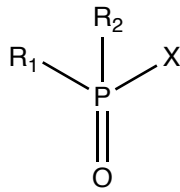
Videre vil det være forskjellige urenheter som skal ekstraheres vekk i de forskjellige prøvene. Da det ikke finnes noen som har brukt alle ekstraksjonsmetodene med samme vann, vil det kunne påvirke resultatene.

## Teori

### Organofosfater

Organofosfater er organiske stoffer som inneholder en ester med fosforsyre(2019). De har tilhørt hovedklassen plantevernmidler siden 1940- tallet, og blir mye brukt i dag.(Costa, 2006)

Figur 1 viser hvordan den kjemiske strukturen til organofosfater er. R gruppene starter ofte med en oksygenbro, og X er forlatende gruppe.(Costa, 2006)



Figur 1: Generell struktur til organofosfater (kan være svovel koblet til dobbeltbindingen) X er forlatende gruppe. R gruppene er resterende grupper som ofte starter med en oksygenbro.

Organofosfater reagerer primært med acetylcholinesterase (AChE) i kroppen.

Acetylcholinesterase er et enzym med hovedoppgave å hydrolysere acetylkolin. Acetylkolin er en viktig neurotransmitter i perifere nevropatier. Organofosfatene deaktiverer acetylcholinesterase ved å danne en sterkere binding mellom fosforet og det aktive sete i enzymet, enn acetylcholinesterase hadde fått ved å reagere med karbonylgruppen til acetylkolin(Costa, 2006). Se tabell 1 for oversikt over reaksjonene. Dette gjør at acetylkolin ikke blir spaltet, noe som videre fører til en opphopning. Opphopningen kan fremkalle symptomer som blant annet svetting, muskel-rykninger og anstrengelsesutløst astma. Når døden inntreffer er dette mest sannsynlig på grunn av respirasjonssvikt. Acetylcholinesterase finnes i både mennesker, dyr og insekter, noe som gjør organofosfater lite selektive(Costa, 2006). Når organofosfatet folidol 600 ble testet på tilapiaer i ferskvann i Brasil kom det frem at ved eksponering av realistiske miljøkonsentrasjoner fremsto det en respirasjonsnedgang. Dette indikerer en gjelle-lesjon som mest sannsynlig kommer fra organofosfatet. Videre var det en høy andel fisk som fikk cholinesterase-hemning, noe som skadet nervesystemet til fisken. Til slutt viste blodprøver at plantevernmiddelet også kan være skadelig til vevet som utvikler blodceller (hematopoitisk vev) . (Barbieri and Ferreira, 2011)

Tabell 1: Oversikt over hvordan acetylcholinesterase reagerer både når organofosfater er tilstede og ikke.

	Reaksjon	Konsekvens
Normalt i kroppen	Acetylcholinesterase+acetylkolin. → Kolin (hydrolisert acetylkolin) + acetylcholinesterase	
Organofosfat til stede	Acetylkolinesterase+organofosfat → Acetylkolinesterase som ikke kan reagere videre.	Acetylkolin blir ikke hydrolisert, og mindre acetylkolinesterase å hydrolysere med

Plantevernmidler kan også indirekte være skadelig for blant annet akvatiske miljø. De kan blant annet forstyrre matnæringskjeden noe som kan resultere i tap og/eller skifte av arter. (Uddin et al., 2016) Videre kan plantevernmidlene endre habitatene til dyrene. Dette kan gjøre dem til lettere bytte. Til slutt er det noen plantevernmidler som endrer oppførselen til dyrene, blant annet ved å gjøre byttedyr mindre redd rovdyr. (Uddin et al., 2016)

### Kromatografiske metoder

Gas-kromatografi og høytrykk-væske-kromatografi er to av de vanligste analysemetodene for organofosfater i dag, og blir derfor presentert litt nærmere.

#### Gass-Kromatografi (GC)

Gass-kromatografi er en kromatografisk analysemetode hvor mobilfasen er en gass. Separasjon av analytter skjer grunnet forskjellig damptrykk og/eller forskjellig analytt-stasjonærfase-interaksjoner(Poole, 2003). Gass-kromatografi egner seg godt til organofosfat-analyser grunnet muligheten til å koble seg opp med flamme-fotometrisk-detektor (FPD, flame photometric detector), en spesifikk detektor for fosforforbindelser. Gass-kromatografen har også mulighet til å bli tilkoblet masse spektrometer (MS), som kan bli selektiv ved å lete etter spesifikke masser. Eksempel på oppsett for analyse av organofosfater er en 'vegg-belagt åpent rør' (WCOT, wall coated open tubular) silika kolonne, som da er upolar. Electron-ionisation (EI), er en mulig ioniseringsmetode til massespektrometer brukt

som detektor. Denne detektoren kan også bli innstilt på bestemt ion overvåking (SIM, selected ion monitoring).(Pinheiro et al., 2011)

### Høytrykk væske kromatografi (HPLC)

Høytrykk væske-kromatografi (HPLC) er en kromatografisk analysemetode hvor mobilfasen er en væske. Seperasjon skjer her i en kompleks prosess som involverer både mobilfase- og stasjonærfase-interaksjoner(Poole, 2003). Organofosfater har ofte forskjellig størrelse og polaritet, slik at det blir forskjellige interaksjoner med mobil- og stasjonær- fase. Derfor forventer man god seperasjon av de fleste organofosfater. Videre kan HPLC kobles opp til masse spektrometere med forskjellige ionsiseringsmetoder, som for eksempel ESI. Eksempel på oppsett for analyse av organofosfater kan være C18-kolonne, som er upolar. Mobilfase i dette eksempelet var maursyre og vann i forskjellige blandingsforhold, altså polar mobilfase. (Sinha et al., 2011) Her vil forskjellen i blandeforhold endre de forskjellige interaksjonsparametere, og derfor endre retensjonstiden til analyttene.

### LOD og LOQ

Detektorgrense (LOD, Limit of detection) og kvantifikasjonsgrense (LOQ, limit of quantification) er midler brukt i kromatografi for å kunne si hvorvidt et signal i kromatogrammet garantert er analytt og ikke bakgrunnsstøy (detektorgrense), og hvorvidt signalthøyden er bra nok til å kunne brukes i kvantitative analyser (kvantifikasjonsgrense). For å finne deteksjonsgrensen og kvantifikasjonsgrensen må man først finne signal-støy forhold (S/N, signal to noise ratio).

Ligningen for signal-støy forhold er vist i ligning 1. Her er H høyden på toppen. Der brukes som regel standardprøve med lavest konsentrasjon til å regne H. h er høyden på støyen (fra laveste dump til høyeste topp). Alt blir målt i cm på utskrevet versjon av resultatene på analysen.

$$(1) \quad \frac{S}{N} = \frac{H}{2h}$$

Deteksjonsgrensen og kvantifikasjonsgrensen er henholdsvis  $3 \cdot S/N$  og  $10 \cdot S/N$ .

## Ekstraksjonsmetoder

Ekstraksjonsmetoder er måter å få analytt(er) ut av en prøve, for å så kunne bli analysert. Den ideelle ekstraksjonsmetoden er rask, lett, billig, effektiv, robust, trygg og fjerner mest mulig uinteressant stoff. I dette avsnittet vises fem mulige ekstraksjonsmetoder av organofosfater i vann.

### Klassisk faststoff-væske ekstraksjon

#### *Rørestav-ekstraksjon med veske-dispersjon*

Rørestav (stir bar sorptive) ekstraksjonsmetoder bruker spesiellagde rørestaver. Disse blir tilsatt løsningen for å absorbere ønsket analytt. Etterpå blir det brukt væske-desorpsjon til å friggi analytten fra rørestavene og kunne kjøre analysen. Rørestavene kan kjøpes ferdiglagde for å bruke i ekstraksjonen. (Margoum et al., 2013) Da de nyeste forsknings-artiklene lager rørestavene selv, har eksempelet også selvlagd rørestav.

Eksempel på bruk av rørestav-ekstraksjon av organofosfater; det ble laget selv-magnetiske nanokompositte monolitiske staver. Disse er laget av polyetersulfon, 'multi-walled-carbon-nanotubes' og  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  med vektratio 0,80: 0,10: 1,00. Disse stavene kan bli brukt for å ekstrahere organofosfater. Dette er fordi stavene har et polymerlag med karbon nanotubes som kan ekstrahere organofosfatene, primært ved hydrofob-interaksjoner.

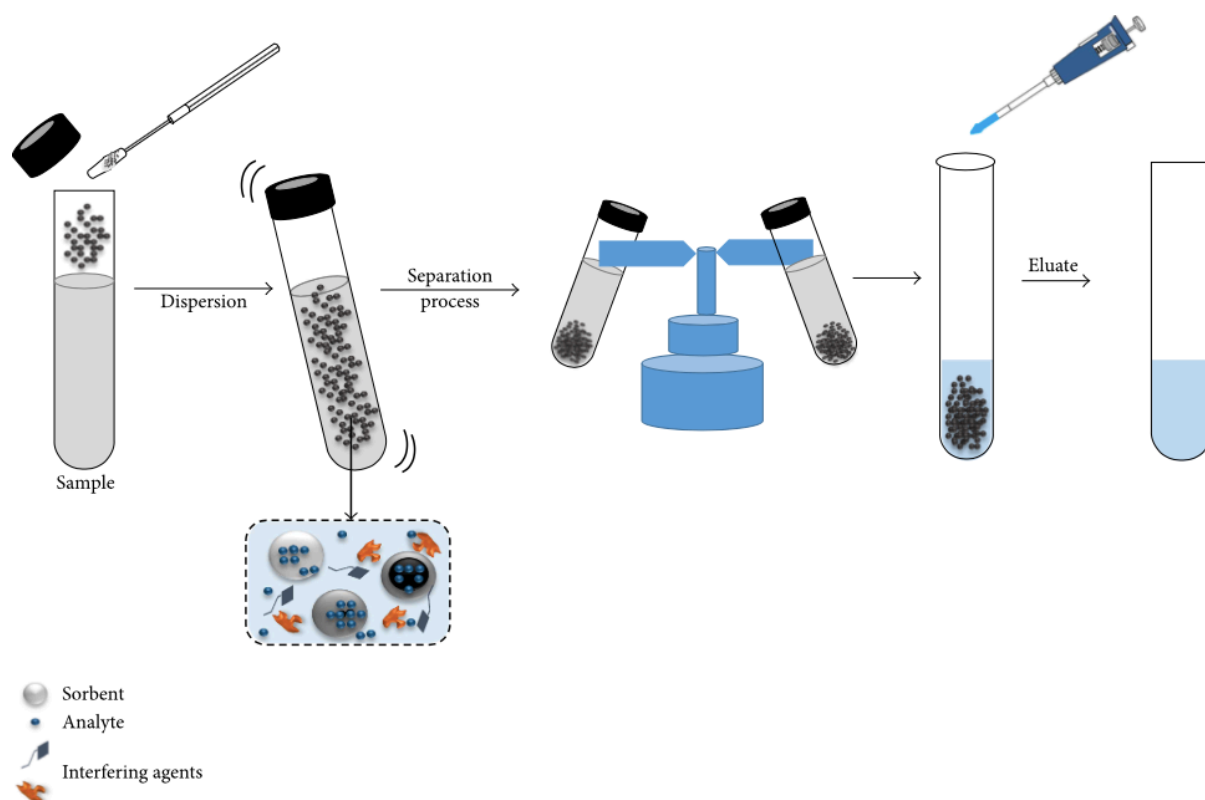
For optimale resultat ble staven lagt i vannprøven og rørt i 42 min på 600 psi sammen med 1,1% acetonitrill. Staven ble så vasket med finrenset vann og tørket med tørkepapir.

Det ble så gjennomført væske-desorpsjon ved å legge staven i acetonnitril og røre i 10 min på 700 psi. Analytten ble deretter overført til acetonitrillen og løsningen kan bli brukt til å gjennomføre HPLC analyse.(Gorji et al., 2019)

#### *Dispersjons-(mikro-)fast-fase-ekstraksjon*

Denne ekstraksjonsmetoden baserer seg på å tilsette et adsorpsjonsmiddel direkte i løsningen. Det oppstår så adsorpsjon som favoriserer kontakten mellom adsorpsjonsmiddelet og analytten. Løsningen blir deretter sentrifugert eller filtrert, hvor adsorpsjonsmiddelet og analytten blir skilt fra løsningen. (Gabriella Islas, 2017) Henviser til figur 1 for billedlig fremstilling av metoden.

For bruk til ekstraksjon av organofosfater har det blitt brukt ‘zink-basert metallorganisk rammeverk’ (zinc based metall organic framework) som adsorpsjons-middel. Den spesifikke ekstraksjonen skjer da fordi det dannes hydrogenbindings-kompleks mellom zink og fosforyl- og/eller tiofosforyl-gruppen. Etter å ha tilsatt adsorpsjonsmiddelet i prøvevannet ble prøven ultralydbehandlet i 30 s og deretter rørt i 5 min på 1000 psi for å få adsorpsjon. Videre ble prøven sentrifugert på 4000 psi i 5 min for å skille prøven med avfallet. Adsorpsjonsmiddelet ble så tilsatt acetonitrill, ultralydbehandlet og sentrifugert igjen for å fjerne løsningsmiddelet. Prøven ble så tørket med en nitrogen-strøm. Til slutt ble det tilsatt metanol før prøven ble injisert i gas-kromatografen. (Amiri et al., 2019)



Figur 1: Billedlig fremstilling av dispersjons fast-fase ekstraksjon. Figur hentet fra (Gabiella Islas, 2017)

### *Akselerert løsningsmiddel-ekstraksjon*

Under akselerert-løsningsmiddel-ekstraksjon blir en fast-fase prøve tilsatt en prøvebeholder. Prøvebeholderen blir så tilsatt en ekstraksjonsvæske, og påført høyt trykk og høy temperatur i korte tidsintervaller for å tvinge prøven over til ekstraksjonsvæsken. (Richter et al., 1996)

Denne metoden blir blant annet brukt i passiv prøvetakning i vann, som kan brukes til analyse av organofosfater. I 2014 ble det gjennomført forsøk med passiv-prøvetakning av organofosfater. Da startet man med SR-plater ('Silicon Rubber', silikongummi; altesil). Altesil er en type silikonpolymer. Silikoner ekstraherer organofosfater ved at det danner ulike interaksjoner med organofosfatene og derfor adsorberes fosfatene i materialet. Det avhenger av silikonet hvilke interaksjoner som kan forekomme. Hydrofob interaksjon med organofosfatene, da mange av organofosfatene er hydrofob selv, er veldig vanlige. Eventuelt kan anion bytter eller mixed interaksjoner være mulige som vist i en variant av dispersjon-fast-fase-opparbeidelse (se ovenfor). (Galán-Cano et al., 2013).

Platene ble først skylt med vann og etterpå pre-ekstrahert i soxlet med etylacetat i 100 timer. Dette ble gjort for å få vekk urenheter. Disse platene ble så plassert i et vassdrag i 2 uker. Tilbake på laboratoriet ble platene børstet for å få vekk biofilm og andre levende organismer. Deretter ble prøvene i SR-platen ekstrahert ved bruk av akselerert løsningsmiddel-ekstraksjon. Her ble de tilsatt metanol på 120°C som fikk stå i ti minutt, før metanolen ble samlet. Dette ble gjentatt fem ganger. Løsningen ble så dampet inn på rotasjonsfordamper til 0,5 mL, og til slutt tørket med nitrogen-strøm. (Moschet et al., 2014)

### *Væske-væske-ekstraksjon*

#### *Dispersjons-væske-væske-mikroekstraksjon*

Denne analysemetoden baserer seg på fordeling av analytter mellom vandig fase og et organisk løsningsmiddel. Her blir prøven tilsatt et ekstraksjonsmiddel og et dispergeringsmiddel for å danne emulsjon. I denne emulsjonen blir analytten overført fra vannfasen til ekstraksjonsmiddelet. Etterpå blir prøven sentrifugert for å få faseskille. Den utskilte delen av prøven blir så tatt ut med en sprøyte og injisert i en kromatograf. (Chen et al., 2009)

Eksempel for bruk i analyse av organofosfater; Det ble utviklet en metode hvor man ikke trengte dispergeringsmiddelet. En vortex ble heller brukt for å mikse løsningen; Vannprøven ble tilsatt små mengder toulen, som upolart løsningsmiddel. Da majoriteten av organofosfater er upolare eller delvis upolare, vil majoriteten av organofosfatene gå over i løsningsmiddelet. Løsningen ble så vortexet 3 ganger i 60 sekund på 2000 psi, med 5 sekund manuell risting mellom hvert intervall. Prøven ble deretter sentrifugert på 4000 psi i 5 min, noe som dannet et toulenlag over vannlaget. Toulenen ble tatt opp med en sprøyte og injisert i kromatografen. (Zacharis et al., 2012)

#### *Enslig-dråpe-mikroekstraksjon (SDME, single drop microextraction)*

Denne ekstraksjonsmetoden baserer seg på fordeling av analytter mellom en mikrodråpe av organisk løsningsmiddel og en vandig fase. (de Souza Pinheiro and de Andrade, 2009) Dette gjøres ved å bruke en mikrosprøyte med organisk løsningsmiddel slik at en dråpe løsningsmiddel får kontakt med vannet som inneholder analytten, samtidig som dråpen henger i sprøyten. Etter en stund blir den organiske dråpen sugd tilbake i sprøyten igjen og injisert i kromatografen.

Et eksempel på bruk av denne ekstraksjonsmetoden i analyse av organofosfater; En mikrosprøyte ble fylt med ekstraksjons-løsningsmiddel. Det er ikke spesifisert i artikkelen hvilken ekstraksjons-løsningsmiddel som ble brukt, men trolig var det toulen. Ekstraksjons-løsningsmiddelet var uansett mest sannsynlig upolart for å kunne trekke til seg upolart organofosfat. Nålen ble senket i vannet med analytten, og sprøyten blir brukt til å danne en dråpe. Dråpen ble stående i vannet i 30 min mens vannet roterte på 300 psi. Til slutt ble dråpen trukket tilbake i sprøyten, sprøyten fjernet fra vannet og dråpen injisert i kromatografen. (Pinheiro et al., 2011)

#### QuEChERS-Ekstraksjonsmetode

QuEChERS; 'Rask, lett, billig, effektiv, robust og trygg' (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe) ble introdusert i 2003 til bruk i analyse av plantevernmidler i mat. Forkortelsen står for kravene som må oppfylles for den perfekte prøvepreparasjonen. Dette betyr at prøvepreparasjonen skal være rask å gjennomføre; så lett at man ikke trenger masse forkunnskap og trening for å gjennomføre; ikke bruker kostbare apparat og/eller kjemikalier, og heller ikke bruker store mengder; at den gir gode prøver; at metoden ikke kan være



skadelig hverken for menneskene som gjennomfører den, eller for miljøet; og at resultatene ikke er følsomme for mindre endringer i utførelse. (Anastassiades et al., 2003).

## Diskusjon

I organofosfat-analyser er det høytrykk-væske-kromatografi og gass-kromatografi som fremstår som de mest brukte kromatografiteknikkene. Sannsynligvis fordi det er de to vanligste typene kromatografisystemer, og de fleste har tilgjengelig. Siden organofosfater som regel er relativt upolare, men varierer i polaritet, og har varierende damptrykk innenfor området gass kromatografen kan bruke til analyse, fungerer majoriteten av organofosfatene bra til kriteriene for analyse med disse kromatografene.

QuEChERS-stikkordene skal senere brukes til å sammenligne de forskjellige ekstraksjonsmetodene. Dersom analysemetoden ikke oppfyller kravene, vil ikke en god ekstraksjonsmetode ha stor effekt på kvaliteten på analysen.

Her blir det fokusert på metoden generelt, og ikke på spesifikke maskiner og oppsett.

Med tanke på hastighet er selve analysen i kromatograf-instrumentet kjappe. Faktorer rundt kromatografen, blant annet prøvepreparasjon, ekstraksjonsmetode, og å sette opp instrumentet, kan derimot kreve litt tid. Uansett er kromatografen regnet som en av de hurtigere instrumentell-analysemetodene.

Gass-kromatografi og høytrykk-væske-kromatografi er relativt enkle å operere i seg selv. Det kan derimot kreves en del forkunnskap å velge riktig oppsett som for eksempel kolonne, mobilfase i LC, og detektor. Dersom man må endre parameterne underveis i analysen, vil dette også kreve litt kunnskap. Analysen av dataene vil også kunne kreve litt forkunnskap, avhengig av hvordan resultatene ser ut. Dette gjør at kromatografen noen ganger er vanskelig i bruk. Selve maskinen kan derimot opereres etter noen timer opplæring. Kromatografen er effektiv da den både er rask, og operatør ikke trenger være tilstede gjennom hele analysen. Kromatografen kan være relativt billig i forhold til andre analyseinstrument, og de fleste analyselaboratorier har også ofte kromatografi-instrumenter fra før, da den kan brukes til mange forskjellige analyser. Kromatografen er også trygg og blir sjeldent ødelagt, selv om kolonner bør byttes ut med ujevne mellomrom.

For å bruke QuEChERS adjektivene til å sammenligne ekstraksjonsmetodene blir eksemplene nevnt i teori-kapittelet brukt som utgangspunkt for resten av oppgaven. Det vises til tabell 3 for rangering av metodene med de forskjellige kriteriene.

### Rask (Quick)

Dispersjons-væske-væske-ekstraksjon brukte 15 minutter på hele analysen. For de resterende ekstraksjonsmetodene var tiden til selve ekstraksjonen veldig lik, der alle bruker 45 min til en time. Dersom man tar med tiden brukt på å lage fastfase-ekstraksjonsmidlene øker rørestav-ekstraksjon og dispersjons-fastfase-ekstraksjon med dager. Her vil det derimot være mulig å lage ekstraksjonsmidler for mange analyser når man først er i gang, og det ser ut som produktene kan lagres. Videre tar de så lang tid å lage fordi de skal ligge i ulike væsker i timer for å bli dannet, noe som gjør at selv om det tar tid vil det ikke kreve mye tid av operatøren utover preparasjon. Dersom ekstraksjonsstoffene kjøpes ferdig, hadde en spart den tiden. Akselerert løsningsmiddel-ekstraksjon brukte lang tid på den passive prøvetakningen (måned) da denne metoden finner langtids-gjennomsnitts belastning, mens de andre metodene finner lokale øyeblikks-bilder av organofosfatene. Den bruker videre litt tid på preparasjon av platene både før de blir utplassert og etter at de er hentet inn igjen. Dette er derimot en del av prøvetakningen, og ikke selve ekstraksjonsmetoden. På den andre siden er fastfase-platene en del av ekstraksjonsmetoden, noe som gjør at den normalt vil ta lengre tid enn enlig dråpe mikro ekstraksjon og dispersjons-væske-væske ekstraksjon, uavhengig av prøvetakning.

### Lett (Easy)

Alle metodene fremstår som relativt enkle å gjennomføre. Rørestav-ekstraksjon skiller seg ut, da staven kun må plasseres i vannet for å gjennomføre ekstraksjonen. Dersom man i tillegg skal lage rørestaven, blir ting litt mer komplisert. Med dispersjons-væske-væske-ekstraksjon må man kunne bruke sentrifuger og vortekser som vanligvis er ganske enkle å operere. I dispersjons-fastfase-ekstraksjon er det mest sannsynlig primært fremstillingen av zeolitten, og spesialutstyr (autoklav), som tar opp kompleksiteten. Akselerert-fastfase-ekstraksjon fremstår som en enkel metoden å utføre når bruk av instrumentet beherskes, noe som kan ta litt tid. Enlig-dråpe-mikroekstraksjon virker som den metoden som trenger mest teknikk. Det er viktig å få dannet en dråpe som er stor nok til å få absorbert analytten, samtidig som den må være stabil gjennom 30 minutter med røring.

### Billig (Cheap)

Prisen på ekstraksjonsmetodene er vanskelige å sammenligne, da det er mange forskjellige parametere som må avveies. For eksempel koster instrumentet i akselerert-fastfase-ekstraksjon mye mer enn alt utstyret til fastfase-mikroekstraksjon. Instrumentet er derimot ikke bruk og kast, slik som majoriteten av utstyret i fastfase-mikroekstraksjon er. Videre vil tid være penger, da lønninger må tas i betraktning. Dette gjør at en kombinasjon av tid og materialbruk vil være avgjørende i dette punktet. Her vil det også spille inn om andre oppgaver kan gjøres i mellomtiden. Da tidsbruk allerede er dekket i Rask, blir det her fokusert på materialbruk.

Enslig-dråpe-mikro-ekstraksjon bruker kun 1  $\mu$ l løsningsmiddel, magnetrører og mikrosprøyte. Da blir denne ekstraksjonsmetoden klart billigst. Dispersjons-væske-væske-ekstraksjon bruker minimalt med løsningsmiddel (40  $\mu$ L toulén), og utstyr som vorteks-risteapparater og sentrifuge, som er litt dyrere, men vanlig laboratorieutstyr, i tillegg til mikrosprøyten som også blir brukt i enslig dråpe mikroekstraksjon. Vorteksristeapparatet er derimot en nyvinning av metoden. Der det skal vanligvis brukes et dispersjonsmiddel. Med dispersjonsmiddel blir det derimot ofte brukt hjelpeinstrument, som sentrifuge eller vorteks i tillegg for å få emulsjon. (Leong et al., 2014). Metoden kan gjøres uten hjelpeinstrument, noe som trolig gjør den billigere. Uansett blir den sannsynligvis ikke billigere enn enslig dråpe ekstraksjon.

For faststoff-væske-ekstraksjonene vil det primært være tilsatsen av faststoffet som gjør dem dyrere enn væske-væske ekstraksjonsmetodene, da det fremdeles skal brukes løsningsmiddel for å få ekstrahert materiale separert fra fastfasen. Rørestav-ekstraksjon har fordelen at den kun trenger selve staven for å ekstrahere fra vannet, og acetonitril for å ekstrahere fra staven. Her vil fremstillingen av rørestavene brukt i dette eksempelet gjøre selve metoden relativt dyr. Selve metoden kan derimot mest sannsynlig kunne utføres med billigere og ferdiglaget materiale. Dispersjon-fast-fase-ekstraksjon bruker egenprodusert faststoff i forsøket. Videre trengs utstyret, både sonifikator og nitrogenstrøm, som ikke er uvanlig å ha på laboratoriet fra før. Acetonitril og sentrifuge ble også brukt, slik som i rørestav-ekstraksjonen. I akselerert løsningsmiddel-ekstraksjon ble SR-plater brukt som ekstraksjonsmiddel. Disse 'silicon rubber'-platene er nok det billigste fastfase-ekstraksjonsmiddelet av disse tre dersom man ser per analyse. Men utover det må det også brukes spesialinstrument til selve

ekstraksjonsmetoden, noe som gjør metoden betydelig dyrere. Her vil prisen for én analyse synke for hver gang den blir brukt.

### Effektiv (Effective)

Effektivitet kan beskrive mange forskjellige parametere til metoden. Effektivitet er ofte en kombinasjon av ressurser brukt og tid, dette er allerede dekket under Rask (hastighet) og Billig (pris). Effektivitet kan også vise til hvor kvantitativ effektiv metoden er til å ekstrahere analytten, dette blir dekket under Gjenvinning, og Robust.

Til slutt kan effektivitet vurdere hvor effektiv metoden er til å skille prøven og urenheter, hvor god den er til å ikke få med urenheter fra prøven. Dette kan måles ved deteksjongrensen (LOD) og kvantifikasjonsgrensen (LOQ). Da både deteksjongrensen og kvantifikasjonsgrensen er signal/støy koeffisienten multiplisert med en konstant, blir bare deteksjongrensen fokusert på fremover. Deteksjongrenser påvirkes mye av kromatograf brukt, oppsettet på kromatografen, og detektoren. Da alle ekstraksjonsmetodene bruker ulik kromatograf, oppsett og detektor, blir det mange andre faktorer som også har påvirket deteksjongrensen. En ren prøve vil derimot vanligvis gi lavere deteksjongrenser enn en uren prøve, deteksjongrensene blir derfor presentert. Deteksjongrensene til de forskjellige ekstraksjonsmetodene er vist i tabell 2. I akselerert løsningssekstraksjon var deteksjongrensen oppgitt i ng/cm<sup>2</sup> SR-plate, noe som ikke er sammenlignbart med de andre målingene. Akselerert løsningssekstraksjon blir derfor ikke vurdert på dette punktet. De andre ekstraksjonsmetodene hadde derimot forskjellige konsentrasjoner med base i g/L, og ble derfor konvertert til ng/L for sammenligning. Dispersjon-væske-væske ekstraksjon hadde lavest deteksjongrense med 2-11 ng/L. Dispersjon fast-fase ekstraksjon hadde 30-210 ng/L, enslig-dråpe-mikroekstraksjon hadde 50-375 ng/L, mens rørestavekstraksjon hadde høyest deteksjongrense med 70-890 ng/L.

### Robust (Rugged)

Robustheten til metoden omhandler hvor sensitiv resultatene av ekstraksjonen er med små forskjeller i betingelser til metoden. Her må det nevnes at robustheten også kan omhandle større forskjeller mellom analyser som endring av pH i vannet, temperatur i vannet eller forskjellige produsenter på utstyr. Dette har ikke blitt testet i de fleste av eksemplene som blir tatt utgangspunkt i, og derfor vanskelig å presentere her.

Til en viss grad kan kanskje utslag ved tilfeldige feil gi antydning om robusthet. For å se utslaget på tilfeldige feil kan man se på relativt standardavvik til de forskjellige ekstraksjonsmetodene.

Viser til tabell 2 for standardavvik. Det største standardavviket er hos enslig-dråpe-mikroekstraksjon med 14,35%. Enslig-dråpe-mikroekstraksjon har også det høyeste standardavviket i gjennomsnitt. Dispersjon-fastfase-ekstraksjon har den nest-høyeste standardavviket på 9% og har også et litt høyere snittstandardavvik enn akselerert-fastfase-ekstraksjon. Dispersjon væske-væske ekstraksjon har den laveste verdien på 2%, men har et høyere snittstandardavvik enn rørestavekstraksjon. Rørestavekstraksjon blir derfor vurdert best her. Her må det nevnes at det er forskjell mellom ekstraksjonsmetodene på hvor mange ganger analysen er kjørt (n-verdien er forskjellig), og at det sammenlignes tall fra ulike publikasjoner.

### Trygg (Safe)

Med tanke på trygghet har alle metodene kjemikalier som må behandles forsiktig. I akselerert fastfaseekstraksjon skjer majoriteten av behandling av kjemikalier i instrumentet, bortsett fra når det blir overført til rotasjonsfordamperen. Det blir også kun brukt metanol som kjemikalie, noe som må behandles i avtrekkskap, men ellers er ganske trygt. (Global-Safety-Management, 2015). Kombinasjonen av dette gjør akselerert fastfaseekstraksjon til den tryggeste ekstraksjonsmetoden. Både enslig dråpe-væske-ekstraksjon og dispersjon-væske-væske ekstraksjon bruker kun toulen som kjemikalie, noe som er relativt trygt (Global-Safety-Datanet, 2015). Begge trenger også svært små mengder kjemikalie. Med rørestavekstraksjon er både jernoksid(Valdiglesias et al., 2016) og polyetersulfon(American-Polymer-Standards-Corperation, 2018) relativt trygge, men multi-vegg-karbon-nanorør kan utløse respirasjonsproblemer(CNT, 2010), noe som gjør at utgangsmaterialet til staven bør bli laget i avtrekkskap. Videre brukes også acetonnitril som utgjør en helserisiko (LabChem, 2016) . Dispersjon-fastfase-ekstraksjon bruker en zeolitt som kan være farlig dersom inhalert eller påført hud(ACS-Material-LLC, 2017). I tillegg bruker denne metoden også acetonnitril og metanol som krever både hansker og avtrekkskap.

## Gjenvinning

Den siste parameteren er gjenvinning. Dette er ikke en del av QuEChERS-adjektivene, men er en viktig parameter for analyser. Her henvises til tabell 2 for høyeste, laveste og nærmest 100% utbytte til de forskjellige ekstraksjonsmetodene. Dispersjon-fast-fase ekstraksjon kom best ut, med både høy nøyaktighet og presisjon. Rørestav kom som en god nummer to, enslig-dråpe som nummer tre, dispersjon væske-væske fire og til sist akselerert fastfase ekstraksjon. Dersom man ser på resultater i analyse av samme organofosfat ser vi at det speiler resultatet over ganske godt. Eneste avvik er når dispersjon væske-væske ekstraksjon gir bedre resultat enn rørestav i måling av diazion. Analysene er gjort på forskjellige laboratorier, og derfor har nok noen metoder blitt gjennomført mer nøyaktig enn andre. Videre er det analysert forskjellige organofosfater og forskjellig antall organofosfater. Da det er lite sannsynlig at forskerne har valgt å analysere organofosfater med antatt dårlige resultater, vil resultatene i rangeringen være relativt sikre. Fordi ekstraksjonsmetodene med flest antall organofosfater analysert, var også de beste med tanke på prosentresultat. Til slutt har metodene målt forskjellige konsentrasjoner organofosfat i analysen, ekstremer er luket ut når det er analysert med forskjellige konsentrasjoner, men noen eksperimenter ble bare kjørt med en konsentrasjon. Da det blir målt prosent gjenvunnet skal ikke konsentrasjonen ha mye å si, kanskje med unntak av når veldig lave konsentrasjoner blir målt, fordi det ofte gir større prosent feil enn høyere, mer lettmålte. Dette er fordi lave konsentrasjoner har høyere prosentutslag for små feil.

Den største overraskelsen i resultatanalysen er nok akselerert-fast-fase-ekstraksjon som ikke gjorde det bra. Akselerert-fast-fase-ekstraksjon er den eneste ekstraksjonsmetoden som bruker instrument spesiallaget for ekstraksjonen, noe som gjør at man forventer høyere presisjon og bedre resultat. Det som kan ha skjedd er at SR platene ikke er de mest optimale til bruk i slike analyser, og derfor har resultatet blitt dårligere. Platene er derimot en del av ekstraksjonsmetoden, så resultatet blir stående, selv om metoden muligens kunne blitt forbedret ved å gjøre relativt enkle grep.

Tabell 2: Prosent gjenvunnet produkt, standardavik og deteksjonsgrense for forskjellige ekstraksjonsmetoder i analyse av forskjellige organofosfater.

Analytt	Dispersjons- fast fase- ekstraksjon (%)	Dispersjons- væske-væske- ekstraksjon (%)	Rørestav- ekstraksjon (%)	Akkselerert fast fase- ekstraksjon (%)	Enslig- dråpe-mikro- ekstraksjon (%)
Høyeste prosent målt	99,5	124	104,5	139	106,8
Laveste prosent målt	94,5	68	82,6	66	76,2
Nærmeste 100% målt	99,5	100	100,2	103	99,4
Diazion (dårligst resultat - best resultat) 'standardavvik'	96,1-99,4 '5,5-7,5'	95-100 '2-7'	82,6-90,2 '4,2'	-	-
Permethin 'Standardavvik'	-	-	-	76 '5'	99,4 '14'
Ethion (dårligst resultat - best resultat) 'standardavvik'	-	-	92,5-98,2 '2,7'	-	106,8 '7'
Chlorophysios (dårligst resultat - best resultat) 'standardavvik'	-	112-95 '2-7'	90,6-100,2 '5,1'	66 '8'	-
Phosalone (dårligst resultat- best resultat) 'standardavvik'	95,5-99,0 '7,6-9,0'	-	89-96 '5,5'	-	-
Detektorgrense (LOD) (ng/L)	30-210	2-11	70-890	3-60 (ng/cm <sup>2</sup> SR-plate)	50-375

Hvilken ekstraksjonsmetode som er best, avhenger av hvor mye man legger vekt på de forskjellige kriteriene. Dersom alle blir vektlagt likt vil dispersjon-væske-væske komme ut best, og dispersjon-fast-fase sist. Dette vil gjøre at ekstraksjonsmetoden med nest dårligst gjenvunnet materialet blir ansett som den beste, noe som ikke er ideelt. Derfor vil den beste ekstraksjonsmetoden avhenge av hva man trenger, og hvilke resurser man har fra før av. Dersom man har tilgjengelig akselerert-løsnings-ekstraksjon vil den mest sannsynlig bli brukt da instrumentet er kjøpt inn til det formålet. Bruker man i tillegg andre plater, kanskje ekstraksjonsstoffet fra dispersjon fast fase ekstraksjon, har ekstraksjonsmetoden potensiale. Er det viktigste å ha en kjapp metode uten mye utstyr virker enslig-dråpe-mikroekstraksjon veldig bra. Skal man ha en lett, robust metode med god gjenvinning virker rørestavekstraksjon som det beste valget. Dersom det var viktig å ha best mulig resultat er dispersjon fast-fase ekstraksjon best i denne oppgaven.

Tabell 3: Rangering av de forskjellige ekstraksjonsmetodene med QuEChERS etter vurdering av forfatteren 1=best, 5=dårligst.

	Enslig-dråpe-mikro-ekstraksjon	Dispersjons-væske-væske-ekstraksjon	Akselerert fastfase-ekstraksjon	Rørestav-ekstraksjon	Dispersjons-fastfase-ekstraksjon
Rask	2	1	3	4	4
Lett	5	2	4	1	3
Billig	1	2	4	4	3
effektiv	3	1	-	4	2
Robust	5	2	3	1	4
Trygg	2	2	1	4	5
Gjenvinning	3	4	5	2	1
Snittresultat	3,0	2,0	3,3	2,9	3,1

## Konklusjon

Denne oppgaven har sett på kromatografisk analyse av organofosfater, og forskjellige måter å ekstrahere dem fra vannprøver. Fokuset har vært på nyere ekstraksjonsmetoder; enslig-dråpe-mikroekstraksjon, dispersjons-væske-væske-ekstraksjon, dispersjons-fast-væske-ekstraksjon, rørestavekstraksjon og akselerert fastfase-ekstraksjon. Målet med oppgaven var å sammenligne disse fem ekstraksjonsmetodene for å finne ut hvilken som var optimal i ekstrahering for sporanalyser av organofosfater fra vannprøver. Konklusjonen på denne oppgaven blir at det ikke finnes en optimal metode, da alle kan brukes til forskjellige formål.

Enslig-dråpe-mikroekstraksjon har det billigste oppsettet, ok resultater og er relativt trygg. Utfordringen med ekstraksjonsmetoden er primært at dråpen er skjør, kan være vanskelig å lage og metoden hadde lavest presisjon.

Dispersjon-væske-væske-ekstraksjon er rangert best når sammenlignet med QuEChERS-adjektivene i denne oppgaven. Metoden er både rask, billig og robust. Det negative med denne ekstraksjonsmetoden er primært at gjenvinningsprosenten avvek mye både over og under 100%.

Dispersjons-fastfase-væske-ekstraksjon gav mest konsise utbytte nær 100% av disse metodene. Den negative siden med metoden er at zeolittene som blir brukt må lages selv på



uoganisk synteselab, noe mange rene analyselaboratorier ikke har. Dette kan trekke opp prisen en del, noe som kan bli dyrt med tanke på at zeolitten allerede er dyre å fremstille.

Rørestavekstraksjon hadde gode resultater, og lite standardavvik. Staven er derimot laget av dyre materialer og den kan være tidkrevende å lage.

Akselerert fast-fase-ekstraksjon bruker eget instrument for ekstraksjonen, og er den tryggeste ekstraksjonsmetoden. Ulempen er at den hadde dårlig utbytte i metodikken den her ble testet med, og spesial-instrumentet gjør denne ekstraksjonsmetoden til mye dyrere enn de andre ekstraksjonsmetodene. Prøvetakningen til metoden brukt i denne oppgaven er også veldig lang.

## Referanser

2019. *Organofosfater* [Online]. UIO. Available: <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/o/organofosfater.html> [Accessed 29.01 2020].
- ACS-MATERIAL-LLC. 2017. *safety data sheet zeolite imidazolate framework 8* [Online]. Available: <https://www.acsmaterial.com/pub/media/catalog/product/s/d/sds-zeolite-imidazolate-framework-8-zif-8.pdf> [Accessed 04.04 2020].
- AMERICAN-POLYMER-STANDARDS-CORPERATION. 2018. *Polysylfone safety data sheet* [Online]. Available: <http://www.ampolymer.com/SDSPDF/PolysulfoneSDS.pdf> [Accessed 04.04 2020].
- AMIRI, A., TAYEBEE, R., ABDAR, A. & NARENJI SANI, F. 2019. Synthesis of a zinc-based metal-organic framework with histamine as an organic linker for the dispersive solid-phase extraction of organophosphorus pesticides in water and fruit juice samples. *Journal of Chromatography A*, 1597, 39-45.
- ANASTASSIADES, M., LEHOTAY, S., ŠTAJNBAHER, D. & SCHENCK, F. 2003. 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, 412-31.
- BARBIERI, E. & FERREIRA, L. A. A. 2011. Effects of the organophosphate pesticide Folidol 600® on the freshwater fish, Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 99, 209-214.
- CHEN, H., CHEN, H., YING, J., HUANG, J. & LIAO, L. 2009. Dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography as an efficient and sensitive technique for simultaneous determination of chloramphenicol and thiamphenicol in honey. *Analytica Chimica Acta*, 632, 80-85.
- CNT. 2010. *Material safety datasheet, multi walled carbon nanotubes* [Online]. Available:

<https://www.nwmissouri.edu/naturalsciences/sds/m/Multiwall%20Carbon%20Nanotubes.pdf> [Accessed 04.04 2020].

- COSTA, L. G. 2006. Current issues in organophosphate toxicology. *Clinica Chimica Acta*, 366, 1-13.
- DE SOUZA PINHEIRO, A. & DE ANDRADE, J. B. 2009. Development, validation and application of a SDME/GC-FID methodology for the multiresidue determination of organophosphate and pyrethroid pesticides in water. *Talanta*, 79, 1354-1359.
- FONTANA, A. R., CAMARGO, A. B. & ALTAMIRANO, J. C. 2010. Coacervative microextraction ultrasound-assisted back-extraction technique for determination of organophosphates pesticides in honey samples by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217, 6334-6341.
- GABRIELLA ISLAS, I. S. I., PRISCILIANO HERNANDEZ, JOSE M. MIRANDA, ALBERTO CEPEDA 2017. Dispersive Solid Phase Extraction for the Analysis of Veterinary Drugs Applied to Food Samples: A Review. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2017, 16.
- GALÁN-CANO, F., LUCENA, R., CÁRDENAS, S. & VALCÁRCEL, M. 2013. Dispersive micro-solid phase extraction with ionic liquid-modified silica for the determination of organophosphate pesticides in water by ultra performance liquid chromatography. *Microchemical Journal*, 106, 311-317.
- GEIS, S. & GEBERT, S. 2006. Extraction of highly polar organophosphorus pesticides from water. *Acta hydrochimica et hydrobiologica*, 34, 464-473.
- GLOBAL-SAFETY-DATANET. 2015. *Safety data sheet toluene* [Online]. Available: [https://beta-static.fishersci.com/content/dam/fishersci/en\\_US/documents/programs/education/regulatory-documents/sds/chemicals/chemicals-t/S25611.pdf](https://beta-static.fishersci.com/content/dam/fishersci/en_US/documents/programs/education/regulatory-documents/sds/chemicals/chemicals-t/S25611.pdf) [Accessed 04.04 2020].
- GLOBAL-SAFETY-MANAGEMENT. 2015. *Safety data sheet metanol* [Online]. Available: [https://beta-static.fishersci.com/content/dam/fishersci/en\\_US/documents/programs/education/regulatory-](https://beta-static.fishersci.com/content/dam/fishersci/en_US/documents/programs/education/regulatory-)

- [documents/sds/chemicals/chemicals-m/S25426A.pdf](#) [Accessed 04.04 2020].
- GORJI, S., BIPARVA, P., BAHRAM, M. & NEMATZADEH, G. 2019. Stir bar sorptive extraction kit for determination of pesticides in water samples with chemometric data processing. *Microchemical Journal*, 148, 313-321.
- LABCHEM. 2016. *Acetonitrile safety data sheet* [Online]. Available: <http://www.labchem.com/tools/msds/msds/LC10460.pdf> [Accessed 04.04 2020].
- LEE, S. M. & WYLIE, P. L. 1991. Comparison of the atomic emission detector to other element-selective detectors for the gas chromatographic analysis of pesticide residues. *Journal of agricultural and food chemistry*, 39, 2192-2199.
- LEONG, M.-I., FUH, M.-R. & HUANG, S.-D. 2014. Beyond dispersive liquid–liquid microextraction. *Journal of Chromatography A*, 1335, 2-14.
- MARGOUM, C., GUILLEMAIN, C., YANG, X. & COQUERY, M. 2013. Stir bar sorptive extraction coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of pesticides in water samples: Method validation and measurement uncertainty. *Talanta*, 116, 1-7.
- MOSCHET, C., VERMEIRSEN, E. L. M., SEIZ, R., PFEFFERLI, H. & HOLLENDER, J. 2014. Picogram per liter detections of pyrethroids and organophosphates in surface waters using passive sampling. *Water Research*, 66, 411-422.
- PERESKA, Z., CHAPAROSKA, D., BEKAROVSKI, N., JURUKOV, I., SIMONOVSKA, N. & BABULOVSKA, A. 2019. Pulmonary thrombosis in acute organophosphate poisoning—Case report and literature overview of prothrombotic preconditioning in organophosphate toxicity. *Toxicology Reports*, 6, 550-555.
- PINHEIRO, A. D. S., DA ROCHA, G. O. & DE ANDRADE, J. B. 2011. A SDME/GC–MS methodology for determination of organophosphate and pyrethroid pesticides in water. *Microchemical Journal*, 99, 303-308.

- POOLE, C. F. 2003. *The essence of Chromatography*, The Netherlands, Elsevier.
- RICHTER, B. E., JONES, B. A., EZZELL, J. L., PORTER, N. L., AVDALOVIC, N. & POHL, C. 1996. Accelerated Solvent Extraction: A Technique for Sample Preparation. *Analytical Chemistry*, 68, 1033-1039.
- SINHA, S. N., VASUDEV, K., RAO, M. V. V. & ODETOKUN, M. 2011. Quantification of organophosphate insecticides in drinking water in urban areas using lyophilization and high-performance liquid chromatography–electrospray ionization-mass spectrometry techniques. *International Journal of Mass Spectrometry*, 300, 12-20.
- UDDIN, M. H., SHAHJAHAN, M., RUHUL AMIN, A. K. M., HAQUE, M. M., ISLAM, M. A. & AZIM, M. E. 2016. Impacts of organophosphate pesticide, sumithion on water quality and benthic invertebrates in aquaculture ponds. *Aquaculture Reports*, 3, 88-92.
- UNION, C. O. T. E. 1998. COUNCIL DIRECTIVE 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption. *In*: UNION, E. (ed.).
- VALDIGLESIAS, V., FERNÁNDEZ-BERTÓLEZ, N., KILIÇ, G., COSTA, C., COSTA, S., FRAGA, S., BESSA, M. J., PÁ SARO, E., TEIXEIRA, J. P. & LAFFON, B. 2016. Are iron oxide nanoparticles safe? Current knowledge and future perspectives. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 38, 53-63.
- WHO 2008. Clinical management of acute pesticide intoxication: prevention of suicidal behaviours. 1 ed.: WHO.
- ZACHARIS, C. K., CHRISTOPHORIDIS, C. & FYTIANOS, K. 2012. Vortex-assisted liquid–liquid microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry for the determination of organophosphate pesticides in environmental water samples and wines. *Journal of Separation Science*, 35, 2422-2429.