



The editor of the material:

Dunarea de Jos University of Galati, Romania
INPOLDE research center,
47 Domneasca St., Galati, Romania
Phone: +40 336 130109
Email: aene@ugal.ro
Website: <https://www.ugal.ro>

Joint Operational Programme Black Sea Basin 2014-2020
Dunarea de Jos University of Galati, Romania
September, 2021

Joint Operational Programme Black Sea Basin 2014-2020 is co-financed by the European Union through the European Neighbourhood Instrument and by the participating countries: Armenia, Bulgaria, Georgia, Greece, Republic of Moldova, Romania, Turkey and Ukraine. This publication was produced with the financial assistance of the European Union. Its contents are the sole responsibility of *Dunarea de Jos University of Galati* and do not necessarily reflect the views of the European Union.



Antoaneta Ene (Ed.), High-performance analytical techniques for the monitoring of toxicants in environment. Methodological guide



Common borders. Common solutions.

**High-performance analytical techniques for the monitoring of toxicants in environment.
Methodological guide**

**Tehnici analitice de înaltă performanță pentru monitorizarea substanțelor toxice din mediu.
Ghid metodologic**

BSB27-MONITOX

Editor
Antoaneta Ene



Casa Cărții de Știință





EUROPEAN UNION



Common borders. Common solutions.

High-performance analytical techniques for the monitoring of toxicants in environment. Methodological guide

Tehnici analitice de înaltă performanță pentru monitorizarea substanțelor toxice din mediu. Ghid metodologic

Editor

Antoaneta Ene

Casa Cărții de Știință
Cluj-Napoca, 2021

Editor address:

“Dunarea de Jos” University of Galati, Romania
INPOLDE Research Center, ReForm-UDJG Multidisciplinary Platform
47 Domnească Street, 800008, Galati, Romania
e-mail: aene@ugal.ro

Methodological guide was financially supported by:

**Project code BSB 27 - Joint Operational Programme
Black Sea Basin
2014-2020**

Copyright©2021. All rights are reserved

Descrierea CIP este disponibilă la Biblioteca Națională a României
ISBN: 978-606-17-1848-1

Casa Cărții de Știință
400129 Cluj-Napoca; B-dul Eroilor, nr. 6-8
Tel.: 0264-431920; www.casacartii.ro;
e-mail: editura@casacartii.ro

FOREWORD

The whole spectrum of environmental issues of our time can only be considered and solved based on both theoretical and applied scientific approach. The diversification of environmental problematics and the need for an efficient monitoring of a large palette of toxic substances (TOXs) at trace and ultra-trace levels have imposed the elaboration of several analysis methods characterized by a high sensibility, selectivity, reproducibility and precision.

The methodological guide is published in the frame of the project with code BSB27, *"Black Sea Basin interdisciplinary cooperation network for sustainable joint monitoring of environmental toxicants migration, improved evaluation of ecological state and human health impact of harmful substances, and public exposure prevention"* (acronym "MONITOX"), funded under the EU CBC Joint Operational Programme "Black Sea Basin 2014-2020", which has been implemented during 2018-2021 by "Dunarea de Jos" University of Galati, Romania (Leader Partner) in partnership with Institute of Zoology, Republic of Moldova, International Hellenic University (IHU), Greece, Institute of Geology and Seismology, Republic of Moldova (IGS), and "Danube Delta" National Institute for Research and Development, Tulcea, Romania.

The guide presents the main techniques applied for the monitoring of inorganic, organic and radioactive TOXs at the MONITOX network level, being part of a series of methodological guides to be edited under the above-mentioned project. It is based on an extensive personal experience of the authors, and the good international practices in studying the physico-chemical parameters of various environmental factors.

The monograph is divided into eight chapters and describes the theoretical principles, peculiarities, specific instrumentation and environmental applications of the most important analytical instrumental techniques used for determination of heavy metals, trace elements, persistent organic pollutants, pharmaceuticals, endocrine disruptors and radioisotopes in environmental compartments.

The editor and the authors thank this way Prof. dr. Thomas Spanos, project coordinator of partner institution 3 (IHU), for reviewing the work.

Prof.dr.habil. Antoaneta Ene - Editor

Galati, August 2021

CONTENTS

Chapter 1. Methods for monitoring of trace environmental toxicants in the Black Sea Basin.....	3
Antoaneta Ene	
Chapter 2. UV-VIS spectroscopic methods for environmental analysis	7
Liliana Teodorof, Adrian Burada, Cristina Despina, Seceleanu-Odor Daniela, Antoaneta Ene	
Chapter 3. Atomic absorption spectroscopy for metal analysis.....	21
Oleg Bogdevich, Elena Culighin, Antoaneta Ene	
Chapter 4. Inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-OES) for environmental analysis.....	37
Victor Ciornea, Elena Zubcov, Nina Bagrin, Petru Ciorbă, Antoaneta Ene, Natalia Zubcov	
Chapter 5. Inductively Coupled Plasma with Mass Spectrometry (ICP-MS) for environmental analysis.....	45
Liliana Teodorof, Adrian Burada, Cristina Despina, Antoaneta Ene, Seceleanu-Odor Daniela	
Chapter 6. Gas chromatography with mass detector (GC-MS) for environmental analysis.....	57
Victor Ciornea, Anastasia Ivanova, Elena Zubcov, Antoaneta Ene	
Chapter 7. High Resolution Mass Spectrometry-based methods for pharmaceuticals monitoring in water, soil and sediment.....	65
Carmen Lidia Chițescu, Antoaneta Ene	
Chapter 8. Nuclear spectrometry in environmental analysis.....	85
Antoaneta Ene	

Chapter 1. Methods for monitoring of trace environmental toxicants in the Black Sea Basin

Antoaneta Ene

INPOLDE interdisciplinary research network, Dunarea de Jos University of Galati, 47 Domneasca Street, 800008 Galati, Romania, aene@ugal.ro

1.1. Introduction

The migration of toxic chemicals (TOXs) with great impact on human health in the main aquatic ecosystems and protected areas from SE Romania, Republic of Moldova and Eastern Macedonia and Thrace, Greece, affects a large number of population of the Black Sea Basin (BSB) and a very important issue for inhabitants of the large basin is the identification of the sources of TOXs in their neighboring aquatic ecosystems and groundwater. There is a need for high-quality monitoring data for the BSB and the European Union as a whole, along with ecotoxicological data and a thorough study of risks of environmental effects of TOXs (Ene et al., 2017, 2021).

The main threat in the region is the immense deterioration perpetrated by human activities against the natural environment, which raises imperative concern for our collective survival. Pollution has no borders/does not stop at national borders. The in-depth study of processes occurring in large, interconnected river basins and evaluation of people exposure to TOXs can be accomplished only in partnership, in transnational networks, through cooperation based on knowledge, exchange of good practices and interdisciplinary research.

1.2. MONITOX strategy

The starting point of the project were the pressing issues signaled at European level, and the common challenges in the region jointly identified through analysing European legislation and Directives for environmental quality assessment, as well as the international

conventions regarding the toxic chemicals and wastes (Ene et al., 2017, 2020).

The **MONITOX international network strategy** of monitoring of six classes of toxic substances in seven interconnected environmental compartments (surface water, groundwater, sediments, soils, bedrock and biota) in the Black Sea Basin and border regions, along with eight types of connected investigations (geomorphological, geological/mineralogical, hydrogeological, physical, chemical, biological, microbiological, ecotoxicological), along with mapping of BSB pollution, modelling of environmental processes and risk assessment is presented in Figure 1.1. (Ene et al., 2021).

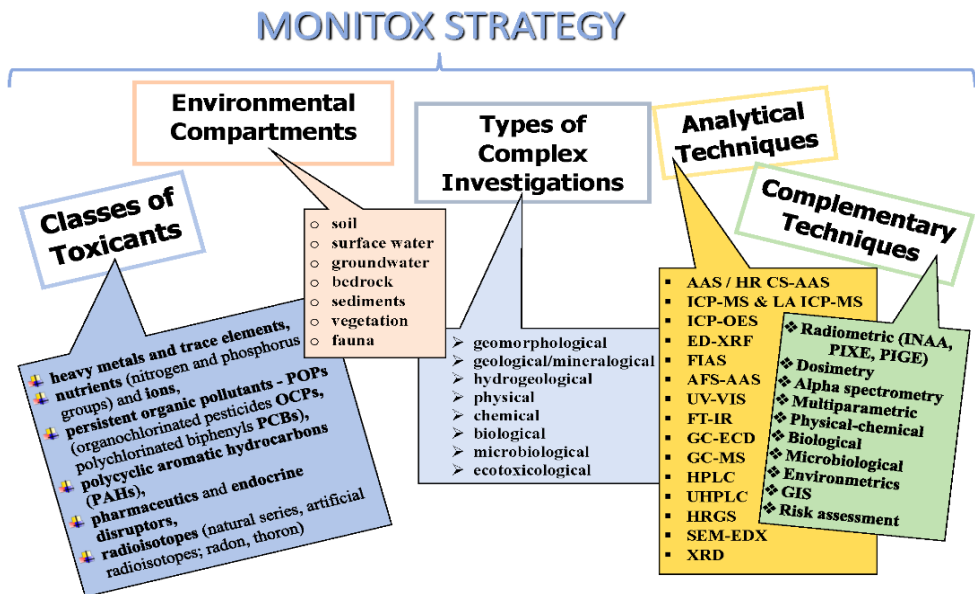


Figure 1.1. MONITOX international network investigation strategy (Ene et al., 2021)

One of the project goals are the integration of the chemical, radioactivity, biological and microbiological measurements, in order to establish the surface water quality classes for the first time based on an integrated ecotoxicological quality index, with important impact on human health (Ene et al., 2019a, 2020).

The analytical methods employed in partner institutions from Romania, Moldova, Greece and collaborating ones and used in complementarity for *elemental* and *isotopic* determination in sampled environmental materials (about 50 chemical elements), are the following (Ene et al., 2017, 2019a,b, 2021): atomic absorption spectrometry (AAS), including High Resolution Continuum Source (HR CS-AAS) technique; inductively-coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) and laser ablation (LA) ICP-MS; inductively-coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES); high resolution gamma-ray spectrometry (HRGS). Mercury is analyzed by flow injection for atomic spectrometry (FIAS) and a combination of fluorescence and absorption spectrometry (AFS-AAS). The accuracy and precision of the results are evaluated by measuring certified reference samples of similar matrix and organizing several intercomparison exercises between research laboratories (Ene & Pantelica, 2011; Ene, 2015).

Persistent organic pollutants (OCPs, PCBs) and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are quantified by using gas-chromatography (GC-MS, GC-ECD) and liquid chromatography (HPLC) techniques. Moreover, oil pollutants (total petroleum hydrocarbons) in marine environment are investigated by FT-IR (Ene, 2015).

Molecular spectroscopy (UV-VIS) is employed for nutrients and ions analysis in water samples, in connection with multiparametric and physical-chemical investigations (Ene, 2015).

An absolute novelty of investigations at maritime basin level is the adaptation and applying of Orbitrap UHPLC-MS for pharmaceuticals and endocrine disruptors analysis in (Danube, Black Sea) surface water.

A great attention has to be paid to the analysis of radioactive isotopes through nuclear spectrometric techniques (NS) (Ene & Pantelica, 2011) - high resolution gamma spectrometry (HRGS) and alpha spectrometry for gaseous radioisotopes of radon (^{222}Rn and ^{220}Rn) and their progenies.

In May 2019 governments have amended the Basel Convention to include plastic waste in a legally-binding framework which will make global trade in plastic waste more transparent & better regulated. Although microplastics were not included in the initially proposed list of MONITOX monitored contaminants, research was carried out in the

project on FT-IR identification of these polymeric materials in cosmetics, personal care and everyday use products (Ene et al., 2019a, 2020).

Due to the limited capacity of the guide, the next seven chapters put a special focus on the following instrumental techniques used for the accurate investigation of nutrients, trace elements, persistent organic pollutants, pharmaceuticals, endocrine disruptors and radioisotopes in various environmental compartments: UV-VIS, AAS, ICP-OES, ICP-MS, GC-MS, UHPLC-MS, NS.

1.3. Bibliography

- Ene A., Pantelica A., 2011, Tehnici analitice atomice și nucleare utilizate în monitorizarea mediului, Galati University Press, 100 pp.
- Ene A. (Ed.), 2015, Instrumental Techniques for Environmental Investigations: Methodological Guide = Tehnici Instrumentale pentru Investiții de Mediu: Ghid Metodologic, Ed. Tehnopress, Iasi, 2015, ISBN 978-606-687-233-1, 220 pp.
- Ene A., Zubcov E., Spanos T., Bogdevich O., Teodorof L., 2017, Application form no. 027, 1st Call JOP Black Sea Basin 2014-2020, May 2017.
- Ene A., Zubcov E., Spanos T., Bogdevich O., Teodorof L., 2019a, Interdisciplinary Cooperation for Ecological Monitoring in the Black Sea Basin, MONITOX International Symposium Deltas and Wetlands, September 15-17, 2019, Tulcea, Romania, p. 17-18.
- Ene A., Pantelică A., Stih C., Frontasyeva M., Bogdevich O., Culighin E. et al., 2019b, Development of analysis methodology using Proton Induced X-ray Emission (PIXE) as a complementary technique to determine trace elements in environmental matrices, Annals Dunarea de Jos Univ. Galati, Fasc. II. Math Phys Theor Mech 42(2) (2019) 117-125.
- Ene A., Zubcov E., Spanos T., Bogdevich O., Teodorof L., 2020, MONITOX international network for monitoring of toxicants in the Black Sea Basin, International Conference "Environmental Toxicants in Freshwater and Marine Ecosystems in the Black Sea Basin", September 8-11, 2020, Kavala, Greece, p.16.
- Ene A., Zubcov E., Spanos T., Bogdevich O., Teodorof L., 2021, MONITOX international network for monitoring of environmental toxicants and risk assessment in the Black Sea Basin: research and interdisciplinary cooperation dimensions, 10th International Conference of Zoologists, Chisinau, Republic of Moldova, 15-17 September 2021.

Chapter 2. UV-VIS spectroscopic methods for environmental analysis

Liliana Teodorof¹, Adrian Burada¹, Cristina Despina¹,
Seceleanu-Odor Daniela¹, Antoaneta Ene²

¹Danube Delta National Institute, 135 Babadag Street, Tulcea, Romania

²INPOLDE interdisciplinary research network, Dunarea de Jos
University of Galati, 111 Domneasca St., Galati, Romania

2.1. Introduction

Ultraviolet and visible absorption spectroscopy is based on the measurement of the attenuation of a beam of light after it passes through a sample. Absorption measurements can be at a single wavelength or multiple wavelengths.

2.2. Theoretical principles

2.2.1. Interaction between radiation and matter

As we know, light is a tiny part of the phenomenon we call electromagnetic radiation and has properties of waves, that consists of pulsating electric and magnetic fields (oscillating together and perpendicular to each other and to the propagation direction (Figure 2.1).

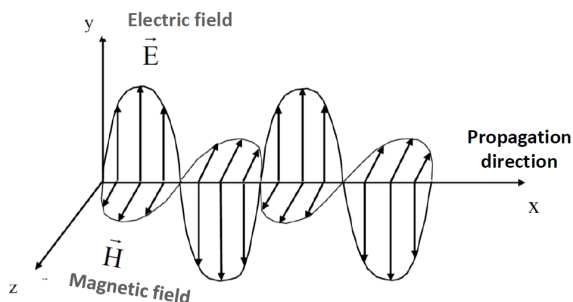


Figure 2.1. An electromagnetic wave composed by electric and magnetic fields

We can define the energy (E), expressed in Joule (J), associated with electromagnetic radiation, as the radiation frequency, expressed in Hertz ($1\text{Hz}=1\text{s}^{-1}$), multiplied by Planck's constant ($h=6.62 \cdot 10^{-34} \text{ J}\cdot\text{s}$).

The frequency of electromagnetic radiation is a measure of speed of light ($c=3 \cdot 10^8 \text{ m/s}$), divided by the wavelength (λ) expressed in meters.

The processes which can occur when the radiation interacts with samples are: reflection, scattering, absorbance, fluorescence, phosphorescence, photochemical reaction.

In general, the total energy (potential energy), is the sum of electronic energy, vibrational energy and rotational energy.

In Figure 2.2 is represented a spectrum composed by different components of light. In this spectrum, each colour is specific for a wavelength (red light for 660 nm, green light for 520 nm). In general, a spectrum represents the distribution of radiant energy, for 390 nm to 780 nm (De Caro, 2015).

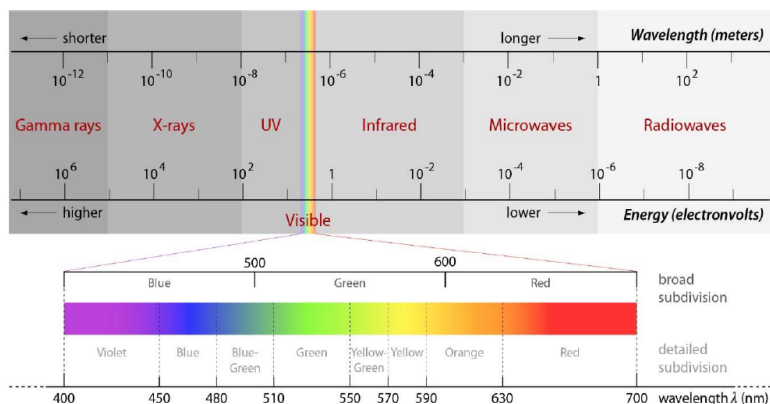


Figure 2.2. Electromagnetic spectrum with the spectral subdivision of the visible waveband (Verhoeven, 2017)

2.2.2. The Bouguer - Lambert - Beer Law

When a sample is exposed to light energy, that means a possible electronic transition within the molecule, a fraction of the light energy

will be absorbed by the molecule and the electrons will be promoted to the higher energy state orbital at a specific wavelength of light absorbed by molecule.

It is all known that when the light passes or is reflected from the sample, the amount of light absorbed is the difference between the incident radiation (I_0) and the transmitted radiation (I) (Figure 2.3). The amount of light absorbed, can be expressed in transmittance (T) and absorbance (A). In general, the absorbance values are in direct proportional with path length (linear dependence).

So, we can define the transmittance, as the intensity of transmitted radiation (I_t) divided by the intensity of incident radiation (I_0). The transmittance can be reported also as percentage, by multiplying with 100.

Thus,

$$T = \frac{I_t}{I_0} \text{ or } T(\%) = \frac{I_t}{I_0} \cdot 100 \quad (1)$$

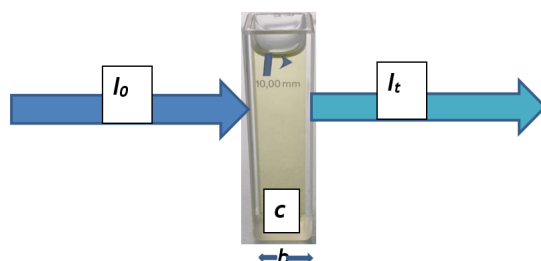


Figure 2.3. Schematic Illustration of light attenuation because of the absorption while passing through an absorbing medium

The absorbance, called also extinction, A , can be computed as minus decimal logarithm of transmittance:

$$A = E = -\lg T = -\lg \left(\frac{I_t}{I_0} \right) = \lg \left(\frac{I_0}{I_t} \right) \quad (2)$$

The relationship between the transmittance, T , and the radiation's pathlength, b , through a sample can be described by the Bouguer-Lambert law:

$$I_t(b) = I_0 \cdot e^{-\alpha(\lambda) \cdot b} \Leftrightarrow T = \frac{I_t(b)}{I_0} = e^{-\alpha(\lambda) \cdot b} \quad (3)$$

where I_0 is the intensity of the incident radiation, I_t is the intensity of the transmitted radiation, e is the base of the natural logarithm, $\alpha(\lambda)$ is the absorption coefficient, characterizing the substance and b is the pathlength (expressed in centimeters).

When we analyzed absorbing solutions, then Beer-Bouguer-Lambert law is used to express the absorption degree and the amount of light absorbed by a sample is proportional to the concentration of absorbing species within the sample:

$$A = \varepsilon * b * c \quad (4)$$

So, the absorbance is defined as a product of molar absorptivity (ε), pathlength (b , expressed in centimeters) and concentration (c , expressed in general in $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$).

Absorbance and transmittance are dimensionless sizes.

After defining the absorbance and transmittance, we can define an absorption spectrum which represents the dependence of the signal on the wavelength. The spectrum can be represented in several ways: $A = f(\lambda)$, $T = f(\lambda)$, $\log A = f(\lambda)$, $\varepsilon = f(\lambda)$, $\log \varepsilon = f(\lambda)$. The most used is the one that represents the dependence of the absorbance on the wavelength (Naşcu et al., 2006). Each chemical analyte has a characteristic absorption spectrum, with one or more absorption maximum at a certain wavelength (λ_{max}). The qualitative identification of a chemical analyte can be made according to the number of absorption maximum and the shape of the peaks, and the quantitative identification is given by the maximum peak height and the area framed by it (Naşcu et al., 2006).

To explain the qualitative determination, in Figure 2.4, is presented the absorption spectrum for nitrogen from nitrite from surface waters, for 5 concentrations, in the representation $A = f(\lambda)$, at the wavelength of 540 nm (Naşcu et al., 2006). The five values of the absorbance were represented according to the corresponding concentrations, thus obtaining the calibration curve, which passes through the origin and represents the application of the Beer-Bouguer-

Lambert law. According to this law, the amount of light absorbed by a sample is proportional to the concentration of absorbing species within the sample and therefore by extrapolating the calibration curve, knowing the absorbance of a sample we can determine the unknown concentration.

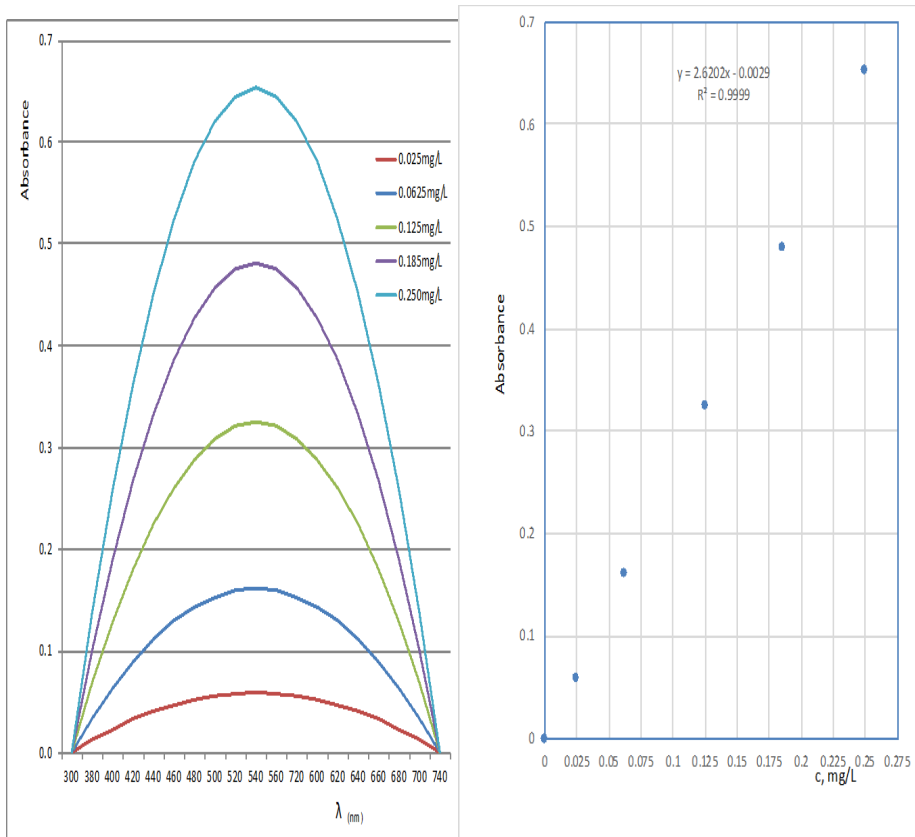


Figure 2.4. Family of absorption peaks (on the left) and the illustration of the Beer-Bouguer-Lambert law or calibration line (on the right) for nitrite nitrogen from surface water, at 540 nm

2.2.3. Deviations of the Beer-Lambert law

According to the Bouguer - Beer - Lambert Law ($A = \epsilon * b * c$), absorbance is in direct correlation with concentration (c), and the path length (b) for a specific sample. The relationship must be a straight line, that passing through the origin, with a y-intercept of zero and a slope of

ϵ *b. But, under different circumstances, this relationship is not linear, and we talk about deviations from the Bouguer - Lambert - Beer Lambert law (positive or negative, Figure 2.5), that can be classified into three categories (Mehta, 2012):

- **Real Deviations** which are fundamental deviations due to the limitations of the law itself.
- **Chemical Deviations** which are deviations observed when radiation-absorbing particles are coupled, dimensioned, or reacted with a solvent to produce products with a different absorption spectrum from the analyte.
- **Instrument Deviations:** which occur due to how absorbance measurements are made (using non-monochromatic radiation, stray radiation resulting from scattering or various reflections in the instrument, mismatched cells) (Harris, 2007, Mehta 2012).

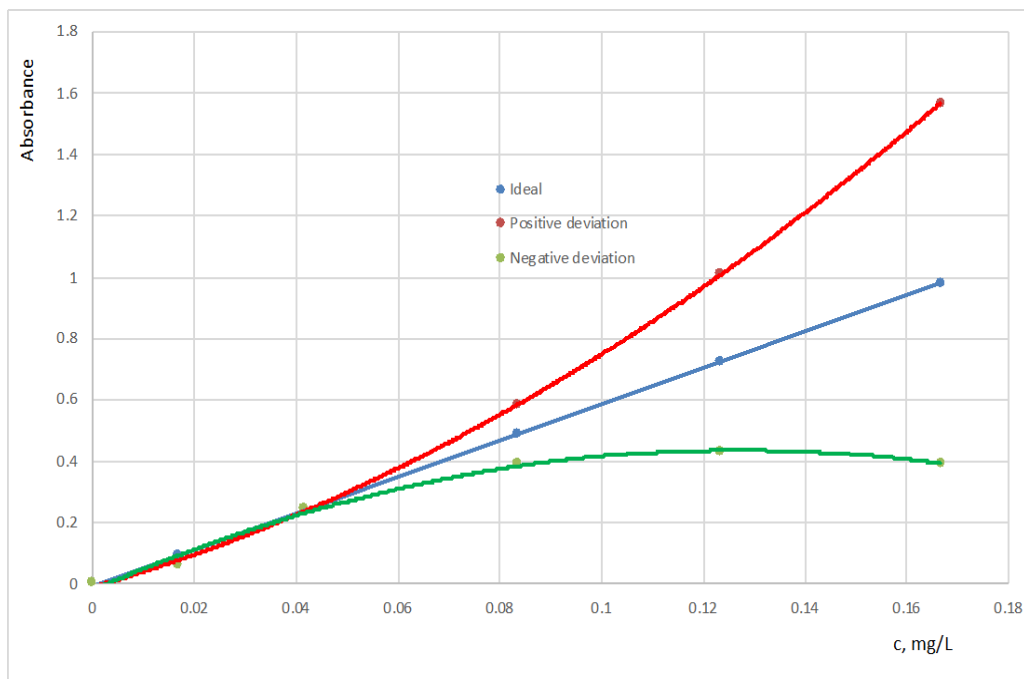


Figure 2.5. Calibration curves showing ideal form, positive and negative deviations from Bouguer Lambert Beer law

2.3. UV-VIS spectral instrumentation

The UV-Visible instruments used to measure absorption in the visible or ultraviolet region of the spectrum, consist of the following four components (De Caro, 2015):

- a) A suitable light source which consists of a lamp containing a gas (xenon) or a combination of two lamps, different lamps like tungsten/deuterium;
- b) A sample holder: for liquid samples there are used cuvettes, made of quartz (for UV/VIS), borosilicate glass (only for VIS), acrylic plastic (only for VIS) and for solid samples, these can of continuous radiation over the wavelengths of interest;
- c) A dispersion element necessary to distribute the light into different wavelengths (quartz prism, diffraction grating);
- d) A detector, such as a photomultiplier, a multichannel array, a charge-coupled device.

In environmental analysis, there were two types of instruments: single-beam and double-beam.

In a single-beam spectrophotometer, the monochromatic light beam passes directly through the sample solution held in the cuvette and then proceeds to the detector (Figure 2.6.a). A single-beam spectrophotometer is difficult to use because the reference and the sample must be placed alternately in the beam. For measurements at multiple wavelengths, the reference must be run at each wavelength. Absorbance can also not be measured as a function of time (e.g., in kinetic experiments) because both the source intensity and the detector response slowly drift (Kenkel, 2007).

In double-beam spectrophotometers, the light from the source, after passing through the monochromator, is divided into two separate beams: one for the sample solution and one for the blank or reference solution. The split of the original beam can be done in two ways and there are two types of double-beam instruments: a double-beam-in-space instrument, in which two beams are formed in space by a V-shape mirror called a beam splitter (Figure 2.6.b) and a double-beam-in-time instrument (Figure 2.6.c), in which the beam is alternately sent through reference and sample cells before striking a single photodetector. These

instruments are very useful for qualitative work in which the entire spectrum is required, and the measurement becomes independent from variations in the intensity and spectral composition of the light source (Skook et al, 2007).

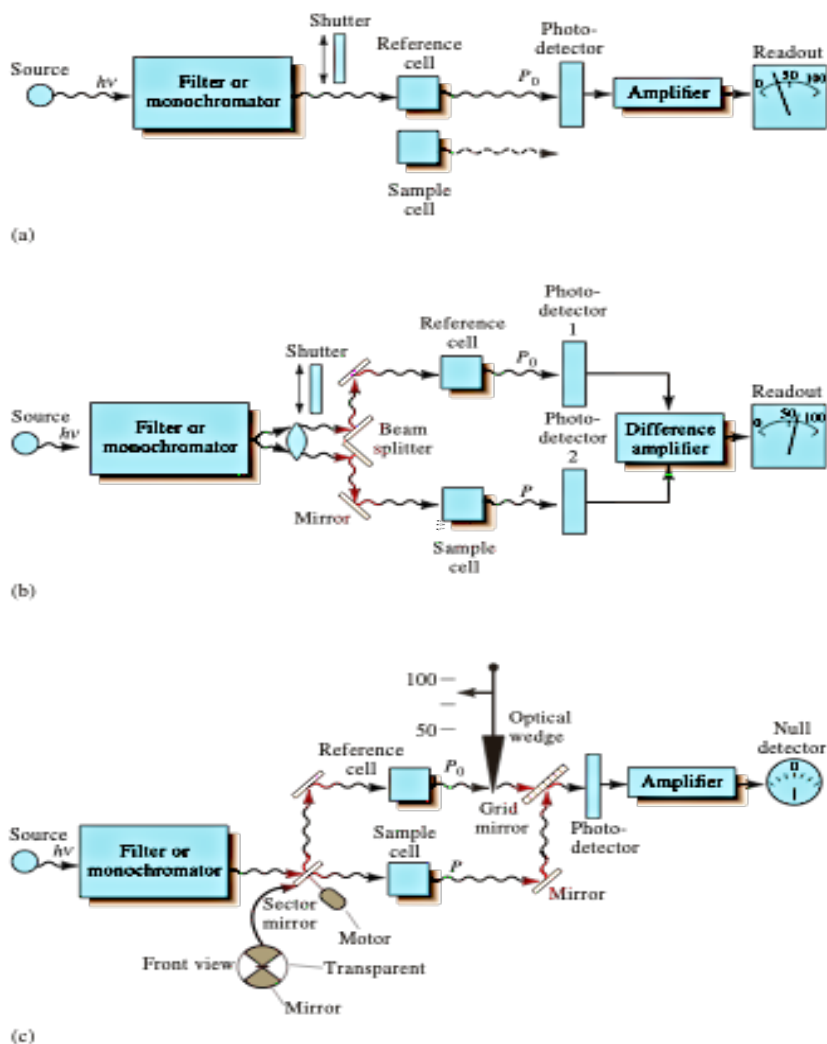


Figure 2.6. Instrumental designs for UV-Visible spectrophotometers (Skoog et al., 2007)

2.4. Uses of UV-VIS in analytical chemistry

2.4.1. Qualitative analysis

In analytical chemistry, the qualitative analysis is used to identify if the interest chemical analyte is pure and also did'nt undergo decomposition.

Also, qualitative analysis uses the specificity of UV - VIS spectroscopy. Samples absorb light at one or more wavelengths, having maximum absorbance values. So, each sample has a characteristic and unique UV - VIS spectrum that can be used for its identification, by comparing the spectrum of the sample with spectra of known, pure compounds (De Caro, 2015).

2.4.2. Quantitative analysis

Based on the Lambert-Beer Law, the concentration of a compound in a solution can be determined quantitatively by UV/VIS spectroscopy. To perform that, a calibration line is first determined by measuring the absorption of several standard solutions of known concentration (De Caro, 2015). For example, in Figure 2.4, for nitrite nitrogen, is exemplified the calibration curve, using 5 standards of 0.025 mg/L, 0.0625 mg/L, 0.125 mg/L, 0.185 mg/L, 0.250 mg/L N-NO_2^- . Representing the absorption as a function of standard concentrations, we obtained a calibration curve, linear, through zero, with the $R^2 = 0.9999$ that represents a very good correlation between the absorbance and the standard concentrations. Using this calibration curve, it can be possible to evaluate the nitrite concentration from different surface water samples.

2.5. Applications of UV-VIS spectrophotometry in environmental analysis

UV - VIS spectrophotometry has many applications in environmental analysis, for all environmental factors, It is a very adaptable and versatile technique, for a lot of chemical analytes, for concentrations from ppm to ppb values. Such class of chemical analytes,

are the nutrients: ammonium nitrogen, nitrite nitrogen, nitrate nitrogen, total nitrogen, orthophosphate, total phosphorus, from surface waters, the important factors of surface waters eutrophication. Each nutrient, like other parameters, is analysed using ISO standards, at UV -VIS spectrophotometer Lambda 650 Perkin Elmer (Figure 2.7). We presented below the analysis principle for each selected indicator.

The **Ammonium nitrogen (N-NH_4^+)** concentration, N-NH_4^+ , expressed in mg/L was determined at 655 nm by measuring the absorption of the blue compound formed by the reaction of ammonium ion with salicylate and hypochlorite ions in the presence of sodium nitroprusside.

Nitrite nitrogen (N-NO_2^-) is determined through formation of reddish purple azo dye produced at pH 2.0 to 2.5 by coupling diazotized sulfanilamide with N-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride, at 540 nm.

The **nitrate nitrogen**, expressed as N-NO_3^- , was determined by spectrometric measurement of yellow compound absorbance formed by reaction of sulfosalicylic acid (formed by addition of sodium salicylate in the sample and sulfuric acid) with nitrate followed by treatment with alkaline solution, at 415 nm.

For **organic nitrogen**, the samples were digested with selenium. The samples were mineralization to form ammonium sulfate, from which ammonia is liberated. The next step is the conversion of nitrogen compounds responding to the test of ammonium sulfate by mineralization of the sample with sulfuric acid, containing a high concentration of potassium sulfate to raise the point of the mixture, in the presence of selenium which acts as a catalyst. The third step is the determination of ammonium ion in the digested solution by spectrometry on UVVIS Lambda 650 Perkin Elmer Spectrometer, at 655 nm. The calibration curve was made using the ammonium chloride, with high analytical purity.

The **ortho-phosphate (P-PO_4^{3-})** expressed as mg/L, was determined on filtrated sample through a 0.45 μm -pore - diameter to separate dissolved phosphorus from suspended forms of phosphorus.

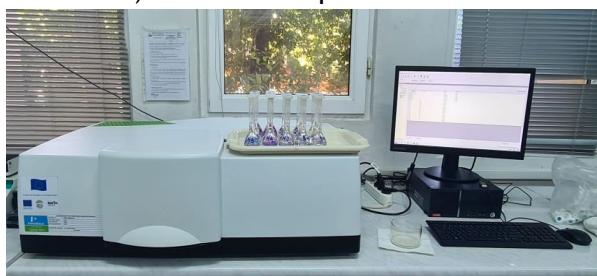
For **total phosphorus**, the samples were treated on unfiltered water.



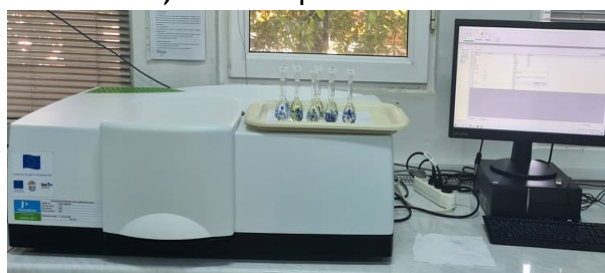
a) Phosphorus quantification



b) Ammonium quantification



c) Nitrites quantification



d). Nitrates quantification

Figure 2.7. Quantification of nutrients in the chemistry laboratory of DDNI Tulcea, at UV VIS Lambda 650 Perkin Elmer Spectrophotometer

For both phosphorus type, the method principle consists in the fact that ammonium molybdate and potassium antimony tartrate react in acid medium with orthophosphate to form a heteropoly acid - phosphomolybdic acid - that is reduced to intensely colored molybdenum blue by ascorbic acid. Then, it was measured the absorbance of this complex at 880 nm. The calibration curve was made using the potassium dihydrogen phosphate.

The selected nutrients were converted by wet-chemical treatment into colored compounds with high molar absorptivity (Hansen et al., 1999) that enabled low detection limits and low quantifications limits of each chemical indicator (Kuss et al., 2020). The parameters used for nutrients analysis for water samples are presented in Table 2.1.

Table 2.1. Detection, quantification, standard limits, analysis standards and certified reference materials for nutrients

	Ammonium nitrogen (N-NH ₄ ⁺)	Nitrite nitrogen (N-NO ₂ ⁻)	Nitrate nitrogen (N-NO ₃ ⁻)	Total nitrogen (TN)	Orthophosphate (P-PO ₄ ⁻³)	Total phosphorus (TP)
Detection limit [mg/L]	0.028	0.0007	0.006	0.03	0.002	0.003
Quantification limit [mg/L]	0.09	0.0024	0.021	0.011	0.01	0.01
Standard limit [mg/L]	0.8	0.03	3	7	0.2	0.4
Analysis standard	SR ISO 7150 - 1: 2001	SR EN 26777: 2002	SR ISO 7890 - 3: 2000.	SR EN ISO 11905- 1:2003	SR EN ISO 6878: 2005	SR EN ISO 6878: 2005
Certified Reference Materials (CRM)	NH ₄ Cl in H ₂ O 1000 mg/L NH ₄ ⁺ CertiPUR	NaNO ₂ in H ₂ O, 1000 mg/L NO ₂ ⁻ CertiPUR	NaNO ₃ in H ₂ O, 1000 mg/L NO ₃ ⁻ CertiPUR	NH ₄ Cl in H ₂ O 1000 mg/L NH ₄ ⁺ CertiPUR	KH ₂ PO ₄ in H ₂ O 1000 mg/L PO ₄ ⁻³ CertiPUR	KH ₂ PO ₄ in H ₂ O 1000 mg/L PO ₄ ⁻³ CertiPUR

2.6. Bibliography

- De Caro C.A., 2015. UV/VIS Spectrophotometry - Fundamentals and Applications, Mettler Toledo, Sonnenbergstrasse 74, CH-8603 Schwerzenbach, Switzerland, Analytical ME-30256131, Market Support Group AnaChem / RK, 52 p.
- Government of British Columbia. 1998. Guidelines for interpreting water quality data. Ministry of Env., Lands and Parks. Prep. for Resources Inventory Committee.
<http://ilmbwww.gov.bc.ca/risc/pubs/aquatic/interp/index.htm>
- Hansen H P, Koroleff F. 1999. Determination of nutrients. In Methods of seawater analysis, 3rd Edn, eds K Grasshoff, K Kremling, and M Ehrhardt (Weinheim: Wiley-VCH). 159-228. DOI: 10.1002/9783527613984.
- Harris D. C., 2007. Fundamentals of Spectrophotometry, in Quantitative Chemical Analysis, Seventh Edition ed., New York, W.H. Freeman and Company, 2007, 379 p.
- Kenkel J., 2003. Analytical Chemistry for Technicians Third Edition, CRC Press, LLC.
- Kuss J, Nausch G, Engelke C, Weber M, Lutterbeck H, Naumann M, Waniek JJ, Schulz-Bull DE., 2020. Changes of nutrient concentrations in the western Baltic Sea in the transition between inner coastal waters and the central basins: Time Series From 1995 to 2016 With Source Analysis. Front Earth Sci. 8(106). DOI: 103389/feart202000106.
- Mehta A., 2012. Ultraviolet-Visible (UV-Vis) Spectroscopy - Limitations and Deviations of Beer-Lambert Law, Analytical Chemistry, Notes, <https://pharmaxchange.info/2012/05/ultraviolet-visible-uv-vis-spectroscopy--limitations-and-deviations-of-beer-lambert-law/>, accessed on 10 May 2021).
- Naşcu H.I., Jantschi L., 2006. Chimie Analitică instrumentală, Academic Pres&Academic Direct, 317p.
- Skoog D.A., Holler J.F., Crouch, S.R., 2007. Principles of Instrumental Analysis, Thomson Brooks/Cole.
- SR ISO 7150 - 1: 2001- Water quality. Determination of ammonium. Part 1. Manual spectrometric method
- SR EN 26777: 2002 Determination of nitrite. Molecular absorption spectrometric method
- SR ISO 7890 - 3: 2000. Water quality. Determination of nitrate. Part 3. Spectrometric method using sulfosalicylic acid
- SR EN ISO 11905-1:2003 Water quality. Determination of Kjeldahl nitrogen. Method after mineralization with selenium

SR EN ISO 6878: 2005 Water quality. Determination of phosphorus. Ammonium molybdate spectrometric method

SR EN ISO 6878: 2005 Water quality. Determination of phosphorus. Ammonium molybdate spectrometric method

Verhoeven G.J., 2017. The reflection of two field - Electromagnetic radiation and its role in (aerial) imaging, AARGnews, 55, 12-18. DOI: 10.5281/zenodo.3534245.

Chapter 3. Atomic absorption spectroscopy for metal analysis

Oleg Bogdevich^{1,2}, Elena Culighin^{1,2}, Antoaneta Ene²

¹Institute of Geology and Seismology, Chisinau, Republic of Moldova

²INPOLDE interdisciplinary research network, Dunarea de Jos University of Galati, 47 Domneasca Street, 800008 Galati, Romania, aene@ugal.ro

3.1. Introduction

Atomic Absorption Spectrometry (AAS) is used for the analysis of most metals in different environmental samples as well as inductively coupled plasma-atomic emission spectroscopy (ICP). There are three AAS technologies for the sensitive analysis of metals in water, soil, sediments, and biological objects (according to the list of methods from Annex 1): a) flame atomic absorption; (b) graphite furnace atomic absorption (flameless); cold vapor and hydride generation (Se, As, Hg).

All instruments of atomic spectrometry used in the MONITOX network are capable of measuring both atomic absorption (AAS) and atomic emission (AES). The excited state of elements can be produced by high temperature flame or electrothermal activation. In atomic absorption the function of the flame is to convert the sample aerosol into vapor which can then absorb light from the primary light source (hollow cathode lamp or electrodeless discharge lamp). There are five basic components of AAS instruments:

1. The light source that emits the spectrum of the element of interest as Hollow Cathode Lamps (one or multielement) and Electrodeless Discharge Lamps;
2. An “absorption cell” in which atoms of the sample are produced (flame, graphite furnace, FIAS or FIMS cell);
3. A monochromator for light dispersion;
4. A detector, which measures the light intensity and amplifies the signal;
5. A display that shows the reading signals after it has been processed by the instrument electronics.

3.2. Flame technology

The two oxidant/fuel combinations used in AAS flame technology air-acetylene and nitrous oxide - acetylene. Air - acetylene is a preferred flame for the determination of approximately 35 elements by AAS technology. The temperature of this flame is about 2300 °C. The flow of air and acetylene is regulated for the obtaining of the optimal atomization. The nitrous oxide - acetylene flame has a maximum temperature 2900 °C.

The quantitative measurements in AAS are based on Beer's Law, which states that concentration is proportional to absorbance ($C=kA$). This relationship between absorbance and concentration for most elements is nonlinear particularly at high concentrations. The usual practice is to use a calibration curve in the linear range for the metal analysis. The top of the linear range for most elements is between 0.20 - 0.30 absorbance units. But most modern instruments have ability to calibrate and make calculation for most elements for the nonlinear range too

In the case of the exceeding of the linear range the following procedure for the calibration standard selection should be made:

1. Three standards are prepared. First is on the top of the linear range. Second - should be in three times more that first standard, and third standard in six time more of the first standard (1:3:6 rule);
2. Set up AAS instrument in the calibration mode, make autozero and measure three standards. If third standard has value more than 10% of the expected concentration, we should use minimum three standard calibration.

The important parameter in AAS technique is a characteristic concentration (Char. Conc.) which defined as the concentration of the element (mg/L) required to produce a signal of 1% absorption (0.0044 absorbance units). The information about this parameter allows the operator to predict the absorbance range for the known concentration of analyzed element. The characteristic concentration can be determined in the linear working range by the absorbance reading of the known concentration of the element using following equation:

$$\text{Char. Conc} = (\text{Conc. of Std} \times 0.0044) / \text{Measured Abs.} \quad (1)$$

Characteristic Concentration Check Value is the concentration of element that will produce a signal of approximately 0.2 absorbance units under optimum conditions. This parameter is used for the optimization of the instrument parameters (Table 3.1).

Table 3.1. Standard Conditions and Characteristic Concentration Checks for AAS method (Analytical Methods,2000)

Element	Wave-length	Slit, nm	Flame gases ¹	Char. Conc. Check ² . mg/l
Al	309.3	0.7	N-Ac	50.0
As	193.7	0.7	A-Ac	45.0
Ca	422.7	0.7	A-Ac	4.0
Cd	228.8	0.7	A-Ac	1.5
Co	240.7	0.2	A-Ac	7.0
Cr	357.9	0.7	A-Ac	4.0
Cu	324.8	0.7	A-Ac	4.0
Fe	248.3	0.2	A-Ac	5.0
Hg	253.7	0.7	A-Ac	200.0
K	766.5	0.7	A-Ac	2.0
La	550.0	0.2	N-Ac	2500.0
Mg	285.2	0.7	A-Ac	0.3
Mn	279.5	0.2	A-Ac	2.5
Mo	313.3	0.7	N-Ac	30.0
Na	589.0	0.2	A-Ac	0.5
Ni	232.0	0.2	A-Ac	7.0
Pb	283.3	0.7	A-Ac	20.0
Sb	217.6	0.2	A-Ac	25.0
Se	196.0	0.7	A-Ac	30.0
Si	251.6	0.2	N-Ac	100.0
Sn	286.3	0.7	N-Ac	150.0
Sr	460.7	0.4	N-Ac	5.0
V	318.4	0.7	N-Ac	90.0
W	255.1	0.2	N-Ac	450.0
Zn	213.9	0.7	A-Ac	1.0

¹ A-Ac - air - acetylene, N-Ac Nitrous Oxide - Acetylene

² Metal concentration in mg/l in aqueous solution which will give a reading of approximately 0.2 absorbance units.

The Limit of Detection (LOD) is a concentration of the element which can produce a value of the signal in three time more that baseline signal noise. This parameter can be determined by using of two standard solutions. One has a concentration approximately in 5 time more that expected LOD. Second standard solution is prepared with the twice concentration more of the first standard. All standards are reading in the optimal instrument conditions ten or more times by the following sequence: blank - first standard - blank - second standard. The mean and standard deviation are calculated after this measurement for every standard concentration extracting a blank value. The obtained mean values should be in the statistical limits to prepared concentrations. LOD is calculated by following equation:

$$DL = (\text{Stand. Conc.} \times 3 \text{ Stand. Dev.}) / \text{Mean} \quad (2)$$

The calculation is made independently for each standard concentration and LOD is an average of the two results. LOD (mg/g) for Method in flame technique is determined by the following way:

$$\text{LOD (mg/l)} \times \text{Volume (liters)} \times 1000 \text{ sample weight (grams)}.$$

Limit of Quantification (LOQ) is the lowest concentration of analyte in a sample which can be quantitatively determined with suitable precision and accuracy. It is determined using standard with the concentration in 5 times more than LOD. Inject the LOQ concentration standard 6 times and calculate the % RSD. The acceptance criteria is not more than 15 %.

LOQ (mg/g) for flame technique is calculated by the following:

$$\text{LOQ (mg/L)} \times \text{Vol.in liters} \times 1000 \text{ Sample weight in grams}.$$

AAS technique is used for liquid and solid samples. In the case of solid sample, the transformation of it into solution is required. The sample preparation procedure is needed previous the analysis of the specific matrixes: water, wastewater, soil, sediments, plants, biological objects. The preparation procedures are described in the respective normative documents (ISO, ASTM, EPA etc.).

Natural water samples usually need to be filtered through a 0.45 micron membrane filter and acid added to pH 2 -3 (conc. HNO₃ or HCl). Soil samples are usually converted to solution by the acid digestion. The most important methods used for soil and sediment are open digestion in vessels and closed digestion by the microwave oven. The waste

sample must be pre-ashed in a muffle furnace. Every type of objects has a specific procedure for the preparation in AAS technique.

AAS technique has a different interference which can influence to the results: chemical, ionization, matrix, emission, spectral, and background absorption.

The chemical interference depends on the present in the solution stable compounds which can produce an absorption light reducing. This interference can be reduced by the high temperature of analysis or the addition of the realizing agent. The example of this solution is Lanthanum addition to the solution by the Calcium analysis.

The ionization interference can be reduced by the addition of easy ionized element to the solution. The alkali metals are good for the using in this case (K, Na, Rb, Cs).

The matrix interference can occur which the physical characteristics of samples and calibration standards are different. The example of this impact can be a high salts or acids present in samples. Two solutions are possible in this situation. One is to prepare samples, standard solutions, and blanks in the same reagents. Other is to use a method of the standard addition. In this method aliquots of a standard are added to portions of the sample, thereby allowing any interferent present in the sample to also affect the standard similarly. The illustration of additional method is presented in Figure 3.1. (Analytical Methods, 2000).

The plot of measured absorbance versus the concentration of added standard is parallel to water standards in the case of no matrix interference. If some material is present in the sample that causes a matrix interference, the number of ground state atoms producing atomic absorption will be affected, as will the absorbance from the analyte in the unspiked sample. If there is any substance in the sample that causes matrix interference, the slope of the straight line will differ from samples without matrix influence.

This method can be used with the understanding that it does not compensate for other types of interference or other types of spectral interference and, as a rule, does not compensate for chemical or ionization-type interference.

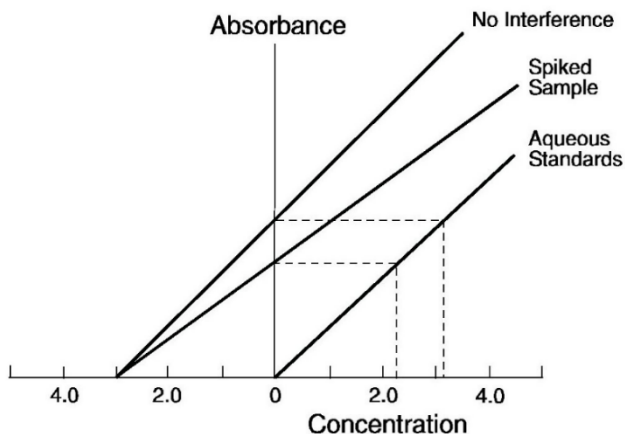


Figure 3.1. Method of standard addition

This method is an indirect determination and will not be as accurate as direct determination of concentration from a calibration curve. It is always best to eliminate the interference by choosing the correct analytical conditions or, if possible, chemical treatment of the sample. The standard addition method should always be viewed as a last resort and not a method of choice.

Emission interference occurs at high analyte concentrations for high-emission elements if the signal falls within the spectral bandwidth used.

Spectral interference can occur when the absorption wavelength of another element presents in the sample falls within the passband of the absorption line of the component of interest. In this case, the determination results will be erroneously high. When multi-element lamps are used, there may be a combination of elements that creates the possibility of spectral interference. The slit width commonly used in single element lamps can be large enough to allow the absorption wavelength of another element present in a multi element lamp to pass. This can be avoided by using a smaller slit or by choosing a different wavelength.

Background absorption interference can occur for two reasons: scattering of light by particles in a flame and absorption of light by undissociated molecular forms of the matrix. The most common way to compensate of the background absorption is to use a background

corrector that uses a continuous source (UV deuterium arc lamp or tungsten iodide lamp for visible wavelengths). Background correction achieves simultaneous compensation at the same wavelength used for atomic absorption measurements. In this system, light from a primary source and a continuous source alternately passes through the flame. The target element effectively absorbs light only from the primary source, while background absorption affects both beams equally. Therefore, when the ratio of the two beams is measured electronically, the background absorption effect is eliminated, and a true atomic absorption signal is obtained.

Standard Operation Procedure for AAS technique includes several steps (ALACC Guide, 2007; EURACHEM, 1995; ISO 11843-2:2000; ISO 8466-1:1990) for the method validation: linear interval; working interval; LOD; LOQ; correlation coefficient for the calibration line; repeatability; reproducibility. The example of AAS method validation results is presented in the Table 3.2.

Table 3.2 The example of the metrological parameters for flame AAS technique

Element	Cu	Mn	Zn	Ni	Pb	Mg	Ca	Cd	Cr
Wavelength	324,7	279,5	213,8	232,0	283,3	285,2	422,7	228,8	357,9
Calibration	Nonlinear Through Zero								
Working range (mg/l)	0.05-30.0	0.2-30.0	0.05-12.0	0.1-60.0	5.0-150.0	0.9-5.0	3.0-50.0	0.1-10,0	0.5-20.0
Maximal conc. for linear range (mg/l)	6.0	5.0	2.0	10.0	20.0	0.5	5.0	5,0	8.0
LOD (mg/l)	0.1	0.1	0.08	0.4	2.0	0.02	0.15	1.0	0.36
LOQ (mg/l)	0.4	0.47	0.26	1.2	6.8	0.07	0.5	3.4	1.19
Correlation Coef.	0.9998	0.9998	0.9995	0.9996	0.9996	0.9994	0.9997	0.9983	0.9994
Repeatability:									
Mean value	0.154	0.138	2.0	0.46	4.9	0.097	0.5	0.46	1.95
StDev. (n=9)	0.002	0.008	0.036	0.025	0.11	0.004	0.004	0.018	0.011
RStDev, %	1.3	5.72	1.961	5.51	2.26	4.17	0.602	3.82	0.6
Reproducibility:									
Mean value	0.159	0.134	2.0	0.44	5,174	0.094	1.0	0,445	1.99
StDev. (n=9)	0.013	0.014	0.070	0.031	0.546	0.005	0.15	0.02	0.058
RStDev, %	8.31	10.39	3.67	7.2	10.55	4.74	13.52	4.46	2.92
Relative uncertainty, U_x/X	0.0194	0.0194	0.0194	0.0194	0.0194	0.0194	0.0194	0.0194	0.0194

3.3. Electrothermal atomization

THGA (Transverse Heated Graphite Atomizer) Graphite Furnace technique provides standardless analyses in varied and complex matrices within about 10-20% accuracy. The conditions that control the remaining variability are the atomization temperature and spectroscopic variables such as spectral slit width and lamp current. Other conditions of THGA technique are background correction (preferably Zeeman correction), rapid furnace heating (near 2000°C), L'vov platform and pyrolytically coated graphite tube, gas stop during atomization, utilization of matrix modifiers.

The analysis of each element should optimize the furnace program which usually includes the following steps:

- **Drying** - the sample is vaporized at this step.
- **Pyrolysis** - remove matrix components as many as possible, matrix modifiers are used to stabilize the analyte or remove matrix impact.
- **Atomization** - sample is atomized to form ground state atoms in the path of the radiation beam.
- **Clean-out** - a high temperature clean-out step after the atomization.

The optimization of the signal and least noise should be made at the start of analysis according to the user guide of the instrument. The checking of the instrument conditions should be made at the start of the analysis (see Table 3.3). The recommended conditions are presented in User Guide to every AAS instruments.

Table 3.3. Example of the furnace program for the instrument checking

Step	Temperature, °C	Ramp Time, sec.	Hold time, sec.	Gas Flow (ml/min)
Dry 1	110	1	20	250
Dry 2	130	5	30	250
Pyrolysis	For element*	10	20	250
Atomize	For element	0	5	0
Clean out	2400	1	2	250

*Information from standard conditions for the analyzed element.

The element solution for the instrument checking is made in 0.2 % HNO₃. The volume of 20 µl is recommended for the analysis of the element solution which should produce optimal integrated absorbance value between 0.1 - 0.3 abs. units. Values much higher are not appropriate for the measuring characteristic mass values.

The calculation of the characteristic mass (m₀) is made by the following equation:

$$m_0 = (\text{volume, } \mu\text{l}) * (\text{Concentration } \mu\text{g/l}) * 0.0044 / (\text{sample Abs}) - (\text{blank Abs.})$$

The characteristic mass should be within 20 % of the value from Recommended Conditions for analyzed element.

Table 3.4. The example of the metrological parameters for THGA technique

Element	Cu	Mn	Ni	Pb	Cd	Cr	Se	As	
Wavelength	324,7	279,5	232,0	283,3	228,8	357.9	196.0	193.7	
Pyrolysis temperature	1200	1300	1100	850	500	1500	1300	1200	
Atomization temperature	2000	1900	2300	1600	1500	2300	1900	2000	
Calibration	Nonlinear Through Zero								
Working range (µg/l)	1.0-50.0	1.0-50.0	1.0-50.0	1.0-50.0	0.2-10.0	1.0-50.0	5.0-300.0	2.0-50.0	
Maximal conc. for linear range (µg/l)	20.0	20.0	50.0	50.0	2.0	20.0	50.0	100.0	
LOD (µg/l)	1.68	0.73	3.05	2.0	0.03	0.86	1.53	1.3	
LOQ (µg/l)	5.60	2.43	10.16	6.8	0.15	2.86	5.09	4.26	
Correlation Coef.	0.9981	0.9996	0.9992	0.9996	1.000	0.9997	0.9998	0.9991	
Repeatability:									
Mean value	2.046	4.54	19.71	19.18	0.2	10.0	20.0	20.0	
StDev. (n=9)	0.0534	0.055	1.02	0.25	0.014	0.299	0.34	1.49	
RStDev, %	2.61	1.21	3.83	1.29	6.99	1.17	1.71	7.18	
Reproducibility:									
Mean value	1.03	4.582	19.5	19.89	0.2	10.0	20.0	20.0	
StDev. (n=9)	0.0695	0.154	0.75	0.84	0.033	0.78	1.54	4.18	
RStDev, %	6.74	3.35	5.6	4.24	17.52	7.78	7.68	20.01	
Relative uncertainty, U _x /X	0.032	0.0194	0.0194	0.0194	0.036	0.025	0.033	0.0285	

The utilization of the matrix modifier improves the analysis by THGA system. Matrix modifier makes the thermal pyrolysis more predictable and reproducible for different matrices. This addition converts the analyte to one common species and eliminates a problem with two peaks. Modifier permits more effective pyrolysis by the analyte stabilization or permits higher temperature pyrolysis. The most frequently matrix modifiers are palladium and magnesium nitrate. Other modifiers can be ammonium phosphate and lanthanum salts.

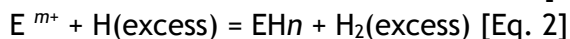
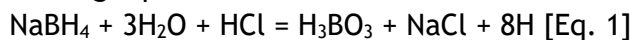
In most cases STPF technique, integrated absorbance and matrix modifier eliminates potential problems from interference. However, when the recovery is less than 100% the technique of standard addition can be used.

The validation of the THGA methodology showed the following results for several metals in water samples (Table 3.4).

All needed conditions for the element analysis are presented in recommended condition for THGA technique.

3.4. Hydride Generation Technique

Hydride generation techniques are used routinely for the determination of As and Se in environmental samples. Advantages include high sensitivity, simplicity, and relative freedom from interferences. The hydride technique involves the reaction of acidified aqueous samples with a reducing agent, such as sodium borohydride. The sodium borohydride/acid reduction generates hydrides as shown in the following equations:



where E = analyte of interest and m may or may not equal n

This reaction generates a volatile hydride in FIAS (Flow Injection Analytical System) which is transported to a quartz cell by means of an argon carrier gas. In the quartz cell, the hydrides are converted to gaseous metal atoms (Figure 3.2).

The FIAS optimization parameters are presented in the operational guides for the respective instruments. Possible interferences, which may potentially occur with FIAS, are generally associated with sample or

standard preparation or gas or liquid flow through the system. FIAS has a following function in this technique: suck up (aspirate) liquid sample at a controlled rate; mix liquid sample with sodium borohydride and HCl; create a volatile hydride of the analyte metalloid from that reaction; flow that gaseous hydride into the optical cell. The hydride form of metalloids is converted to the metal form of metals in a quartz cell at a given temperature.

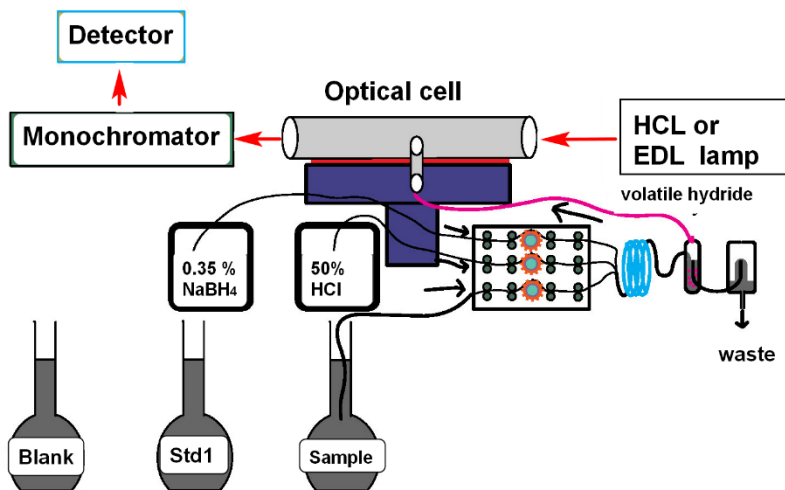


Figure 3.2. Scheme of FIAS for hydride analysis

The oxidation state is important for the metalloid analysis in THGS system. Se analysis requires the Se (IV) oxidation state (selenite). Therefore, all selenium in Se calibration standards and samples must be in the Se (IV) form for analysis. This can be accomplished by oxidizing all Se in the sample to selenate using a strong oxidizer such as nitric acid or hydrogen peroxide (decomposing the excess oxidant) and then reducing the contained selenate to selenite with boiling HCl.

The important is to control of the working conditions of FIAS for the producing of good quality analysis: connection tubes, peristatic pumps, flow rates, argon flow. Low sensitivity results if there is a problem in generating the hydride, transporting the hydride. to the

quartz cell or atomization of the hydride. Reagents must be freshly prepared (on the day of analysis) and of high purity.

The standard conditions for FIAS are established in the FIAS control window of the instrument. Every analyte has specific standard conditions. The following procedures are required: aligning the quartz cell; optimizing FIAS fluid system; adjusting carrier and reductant flow; adjusting the gas/liquid separator outflow; optimizing carrier gas flow.

The procedure of the signal optimization is made for the better analysis performing. The determination of the Characteristic Mass is made for the checking of the instrument conditions too. All procedures are made in the FIAS control window.

3.5. Bibliography

ALACC Guide 2007 “How to meet ISO 17025 requirements for method verification”.

Analytical Methods. Atomic Absorption Spectrometry. Perkin Elmer Inc. 2000. <https://chemistrydocs.com/analytical-methods-for-atomic-absorption-spectroscopy-by-perkin-elmer-corporation/>

EURACHEM. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. LGC, 1995. ISBN 0-948926-08-2.

ISO 11843-2:2000 Capability of detection – Part 2: Methodology in the linear calibration case

ISO 8466-1:1990 Water quality - Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics - Part 1: Statistical evaluation of the linear calibration function.

List of Atomic Absorption Spectrophotometry methods: Water

Procedure element.	Code of ND	Name of ND (reference method)
1	2	3
Sampling	ISO 5667-2006 (SM ISO 5667:2010)	Water quality -- Sampling
Sampling	EPA Method 1669	Sampling Ambient Water for Trace Metals at EPA Water Quality Criteria Levels
Digestion	ISO 15587:2002 (SM SR EN ISO 15587:2012)	Water quality -- Digestion for the determination of selected elements in water: Part 1: Aqua regia digestion; Part 2: Nitric acid digestion
Digestion	EPA Method 3015A	Microwave assisted acid digestion of aqueous samples and extracts
Ca, Mg	SMV ISO 7980:2009 (SM SR EN ISO 7890:2012)	Calitatea apei. Determinarea conținutului de calciu și magneziu. Metoda prin spectrometrie de absorbție atomică
Se, As, Mn, Fe, Cd, Cu, Ni, Pb, Cr, Zn, Al	SM GOST R 51309:2006,	Apă potabilă. Determinarea conținutului de elemente prin metode de spectrometrie atomică (Seleniu, Arsen, Mangan, Fier, Cadmiu, Cupru, Nichel, Plumb, Crom, Zinc, Aluminiu)
Co, Ni, Cu, Zn, Cd, Pb	SM SR ISO 8288:2006	Calitatea apei. Determinarea conținutului de cobalt, nichel, cupru, zinc, cadmiu și plumb. Metoda prin spectrometrie de absorbție atomică în flacără
Ca, Mg	ISO 7980:1986 (SM SR EN ISO 7980:2012)	Water quality -- Determination of calcium and magnesium -- Atomic absorption spectrometric method
Co, Ni, Cu, Zn, Cd, Pb	ISO 8288:1986 (SM SR ISO 8288:2006)	Water quality -- Determination of cobalt, nickel, copper, zinc, cadmium and lead -- Flame atomic absorption spectrometric methods
Cd	ISO 5961:1994 (SM SR EN ISO 5961:2012)	Water quality -- Determination of cadmium by atomic absorption spectrometry
Cr	ISO 9174:1998 (SMV ISO 9174:2009)	Water quality -- Determination of chromium - Atomic absorption spectrometric methods
Cr	ISO 18412:2005 (SM SR EN ISO 18412:2012)	Water quality -- Determination of chromium(VI) -- Photometric method for weakly contaminated water
Na, K	ISO 9964-1993 (SM ISO 9964:2013)	Water quality -- Determination of sodium and potassium; Part 1: Determination of sodium by atomic absorption spectrometry; Part 2: Determination of potassium by atomic absorption spectrometry; Part 3: Determination of sodium and potassium by flame emission spectrometry
Se	ISO 9965:1993	Water quality -- Determination of selenium -- Atomic absorption spectrometric method (hydride technique)
Al	ISO 12020:1997 (SM SR EN ISO 12020:2012)	Water quality -- Determination of aluminium -- Atomic absorption spectrometric methods
Hg	ISO 12846:2012 (EN ISO 12846:2012)	Water quality -- Determination of mercury -- Method using atomic absorption spectrometry (AAS) with and without enrichment
Trace elements	ISO 15586:2011	Water quality -- Determination of trace elements using atomic absorption spectrometry with graphite furnace
As, Cd, Cr, Cu, Pb, Ni, Se	EPA Method 0200.12	Determination of Trace Elements in Marine Waters by Stabilized Temperature Graphite Furnace Atomic Absorption

List of Atomic Absorption Spectrophotometry methods: Water

Procedure element.	Code of ND	Name of ND (reference method)
1	2	3
Al	EPA Method 0202.1, 0202.2	Aluminum (Atomic Absorption, Direct Aspiration, AA, Furnace Technique)
As	EPA Methods 0206.2, 0206.3 EPA Methods 7060A 7061A	Arsenic (AA, Furnace Technique) Arsenic (AA, Gaseous-Hydride) Arsenic (atomic absorption, furnace technique) Arsenic (atomic absorption, gaseous hydride)
V	EPA Methods 0286.1 0286.2	Vanadium (AA, Direct Aspiration) Vanadium (AA, Furnace Technique)
Zn	EPA Methods 0289.1 0289.2	Zinc (AA, Direct Aspiration) Zinc (AA, Furnace Technique)
Cr	EPA Methods 0218.1, 0218.2, 0218.3, 0218.4,	Chromium (AA, Direct Aspiration), Chromium (AA, Furnace Technique), Chromium (AA, Chelation Extraction), Chromium, Hexavalent (AA, Chelation Extraction)
Co	EPA Methods 0219.1, 0219.2	Cobalt (AA, Direct Aspiration) Cobalt (AA, Furnace Technique)
Cu	EPA Methods 0220.1, 0220.2	Copper (AA, Direct Aspiration) Copper (AA, Furnace Technique)
Fe	EPA Methods 0236.1, 0236.2	Iron (AA, Direct Aspiration) Iron (AA, Furnace Technique)
Mg	EPA Methods 0242.1, 0242.2	Magnesium (AA, Direct Aspiration) Magnesium - AA, flame technique
Mn	EPA Methods 0243.1, 0243.2	Manganese (AA, Direct Aspiration) Manganese (AA, Furnace Technique)
Ni	EPA Methods 0249.1 0249.2	Nickel (AA, Direct Aspiration) Nickel (AA, Furnace Technique)
Cd	EPA Methods 0213.1, 0213.2	Cadmium (AA, Direct Aspiration) Cadmium (AA, Furnace Technique)
Ca	EPA Method 0215.1, 0215.2	Calcium (AA, Direct Aspiration) Calcium (Titrimetric, EDTA)
Pb	EPA Methods 0239.1 0239.2 7420	Lead (AA, Direct Aspiration) Lead (AA, Furnace Technique) Lead (Atomic absorption, direct aspiration)
Se	EPA Method 0270.2, 7740 7741A 7742	Selenium (AA, Furnace Technique) Selenium (Atomic absorption, furnace technique) Selenium (atomic absorption, gaseous hydride) Selenium (atomic absorption, borohydride reduction)
K	EPA Method 0258.1	Potassium (AA, Direct Aspiration)
Cd, Pb	EPA Method 1637	Determination of Trace Elements in Ambient Waters by Off-Line Chelation Pre-concentration and Stabilized Temperature Graphite Furnace Atomic Absorption
Sb, Cd, Ni, Se, Cr, Zn	EPA Method 1639	Determination of Trace Elements in Ambient Waters by Stabilized Temperature Graphite Furnace Atomic Absorption
Trace elements	EPA Method 7010	Graphite furnace atomic absorption spectroscopy
Trace elements	EPA Method 7000B	Flame atomic absorption spectroscopy

List of Atomic Absorption Spectrophotometry methods: Soil, Sediments, Waste.

Procedure element.	Code of ND	Name of ND (reference method)
1	2	3
Sampling	ISO/CD 18400-101	Soil quality. Sampling -
Sampling	ISO 10381:2002 (SM SR ISO 10381:2006)	Soil quality. Sampling
Storage	ISO 18512:2007	Soil quality -- Guidance on long and short term storage of soil samples
Pretreatment of samples	ISO 11464:2006 (GOST R ISO 11464-2011)	Soil quality -- Pretreatment of samples for physico-chemical analysis
Sample preparation	ISO 23909:2008	Soil quality. Preparation of laboratory samples from large samples
Extraction of trace elements	ISO 11466:1995 (SM SR ISO 11466:2012)	Soil quality -- Extraction of trace elements soluble in aqua regia
Extraction of trace elements	ISO 12914:2012	Soil quality. Microwave-assisted extraction of the aqua regia soluble fraction for the determination of elements
Extraction	ISO 14870:2001 (SM SR ISO 14870:2012)	Soil quality -- Extraction of trace elements by buffered DTPA solution
Extraction	ISO/FDIS 17586	Soil quality. Extraction of trace elements using dilute nitric acid
Extraction	ISO 19730:2008	Soil quality -- Extraction of trace elements from soil using ammonium nitrate solution
Digestion	ISO 16729:2013	Soil quality. Digestion of nitric acid soluble fractions of elements
Digestion	EPA Method 3050B	Acid digestion of sediments, sludges and soils
Digestion	EPA Method 3051	Microwave assisted acid digestion of sediments, sludge, soils and oils
Digestion	EPA Method 3052	Microwave assisted acid digestion of siliceous and organically based matrices
Digestion	EPA Method 3031	Acid digestion of oils for metals analysis by atomic absorption or ICP spectrometry
Dissolution	ISO 14869-1:2001 (SM SR ISO 14869:2012); ISO 14869-2:2002 (SM SR ISO 14869:2012) ISO/CD 14869-3	Soil quality. Dissolution for the determination of total element content. Part 1: Dissolution with hydrofluoric and perchloric acids; Part 2: Dissolution by alkaline fusion; Part 3: Dissolution with hydrofluoric, hydrochloric and nitric acids using pressurized microwave technique
Dissolution	EPA Method 3040A	Dissolution procedure for oils, greases or waxes
Cr (VI)	EPA Method 3060A	Alkaline digestion for hexavalent chromium
Screening methods	ISO 12404:2011	Soil quality. Guidance on the selection and application of screening methods
Cd, Cr, Co, Cu, Pb, Mn, Ni, Zn	ISO 11047:1998 (SM SR ISO 11047:2006)	Soil quality. Determination of cadmium, chromium, cobalt, copper, lead, manganese, nickel and zinc -- Flame and electrothermal atomic absorption spectrometric methods
Trace elements	ISO/TS 17073: 2013	Soil quality. Determination of trace elements in aqua regia and nitric acid digests. Graphite furnace atomic absorption spectrometry method (GFAAS)
As, Sb, Se	ISO 20280:2007	Soil quality -- Determination of arsenic, antimony and selenium in aqua regia soil extracts with electrothermal or hydride-generation atomic absorption spectrometry

List of Atomic Absorption Spectrophotometry methods: Raw materials and foodstuff

Procedure element, 1	Code of ND 2	Name of ND (reference method) 3
Pb, Cd, Cr, Mo	SM SR EN 14083:2006	Produse alimentare. Determinarea microelementelor. Determinare Plumb, Cadmiu, Crom și Molibden prin spectrometrie de absorbție atomică cu cuptor de grafit (CVAAS) după digestia sub presiune
Pb, Cd, Zn, Cu, Fe	SM SR EN 14084:2006	Produse alimentare. Determinarea microelementelor. Determinare Plumb, Cadmiu, Zinc, Cupru și Fier prin spectrometrie de absorbție atomică (SAA) după digestie cu microunde
Cd, Pb, Zn, Cu, Fe	GOST 30178-96	Сырье и продукты пище вые. Атомно-абсорбционный метод определения токсичных элементов
Hg	SM SR EN 13806:2006	Produse alimentare. Determinarea microelementelor. Determinarea mercurului prin spectrometrie de absorbție cu vapori reci(CVAAS) dupr digestia sub presiune

Chapter 4. Inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-OES) for environmental analysis

Victor Ciornea¹, Elena Zubcov^{1,2}, Nina Bagrin¹, Petru Ciorbă¹,
Antoaneta Ene², Natalia Zubcov¹

¹*Institute of Zoology, Chisinau, Republic of Moldova*

²*INPOLDE interdisciplinary research network, Dunarea de Jos
University of Galati, 111 Domneasca St., Galati, Romania*

4.1. Introduction

The migration capacity of ecotoxicants as well as the forms of migration are conditioned by their properties, as well as by the values of some quantities such as pH, degree of oxidation, presence of radicals and complexing agents, suspended substances, etc.

Atomic emission spectrometry is based on the phenomenon of desorption (emission) of light energy. The principle of the method is to heat at high temperatures to atomize and excite the resulting atoms. Returning to the ground state, the atoms emit radiation characteristic of the element. The concentration of atoms in the sample is proportional to the intensity of the emitted radiation. The emission spectrum of the atoms of an element is the result of the transition (return) of electrons from higher energy levels (excited state) to lower levels (ground state). The example of the hydrogen atom with energy levels and some transitions that give rise to emission spectral lines is shown in Figure 4.1.

Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy, also called inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES), is an analytical technique used to detect chemical elements. It is a type of emission spectroscopy that uses inductively coupled plasma to produce excited atoms and ions that emit electromagnetic radiation at the characteristic wavelengths of a particular element (Alfassi, 1994; Filenko, 1988). Plasma is a high temperature source (about 6000 and 10,000 K), so it is maintained by inductive coupling to cooled electrical coils. Due to its high temperature, plasma is the best way to vaporize and excite atoms in atomic emission spectrometry.

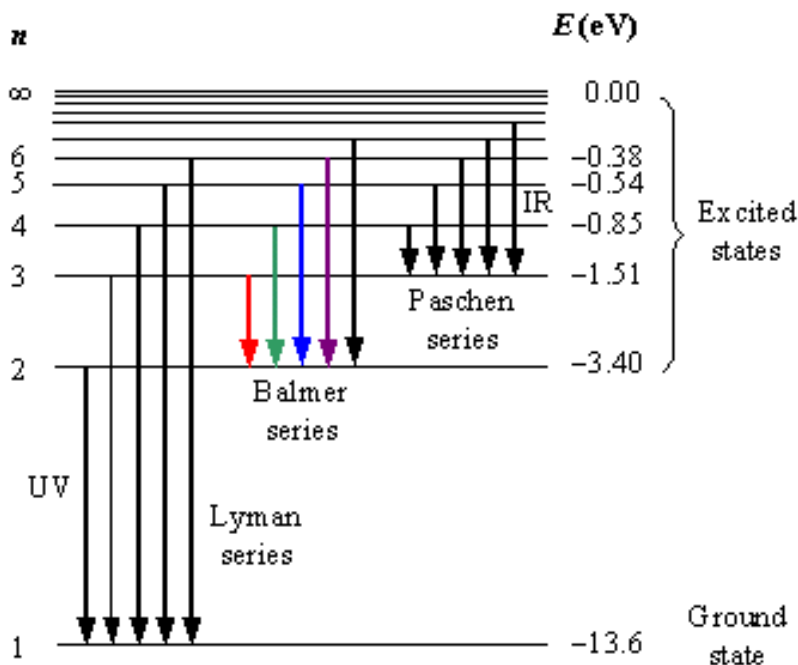


Figure 4.1. Example of the hydrogen atom with energy levels and some transitions that give rise to emission spectral lines. The characteristic transitions in the Lyman series emit radiation in the UV band, those in the Balmer series in the visible band and those in the Paschen series in the IR band.

4.2. Methodology

The Hydrobiology and Ecotoxicology Laboratory of the Institute of Zoology has several high-performance, modern equipment and methods for analyzing environmental quality indices (surface and groundwater, sludges, hydrobionts, etc.), which allows the determination of a wide range of indicators, especially for the determination of ecotoxicants, such as traces of chemical elements, persistent organic pollutants, but also macro- and microcomponents, trace elements, by using standardized and validated methods (ASTM D1976 20, BS EN ISO 11885:2009, SM SP EN ISO 15587-2:2012, SP EN ISO 11885:2009).

The Thermo Scientific iCAP 6200 Duo spectrometer, manufacturer Thermo Fisher Scientific, shown in Figure 4.2, belongs to the category of ICP-OES spectrometers. It is a tool designed for simultaneous multi-element quantization on liquid samples, with several functions pre-installed, so users no longer need to optimize pump speed, plasma power and inert gas flow, which makes it much easier for the operator. The Duo Plasma Viewer allows axial and radial reading of spectral information, which requires considerable sensitivity and detection limit for toxic elements, and the EMT torch (accessible matrix tolerance) simplifies the handling of samples with difficult matrices.



Figure 4.2. Thermo Scientific iCAP 6200 Duo atomic emission spectrometer.

ITEVA software allows the user to select template-methods. In this way the requirement for the development of methods is avoided and time is saved. In the end, it is up to the user to choose: the element (or elements), the line (or lines) in the spectrum, more or less sensitive, as the case may be, the number of standard solutions to be analyzed, the unit of measurement and the reading of the radiation emitted by plasma, radial, axial or duo (mixt).

An image of a multi-element analysis method and the calibration curve for one of the elements to be analyzed is shown in Figure 4.3. The left side of the image shows the number of elements analyzed and the wavelengths selected from the spectrum of each element. In total, the method lists 30 elements: Al, As, B, Ba, Be, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, Sb, Se, Sr, Tl, V and Zn. The Sc solution serves as internal standard, and the spectral lines at 188,060, 227,318, 361,384 and 391,181 nm serve as a reference point for the four groups of elements.

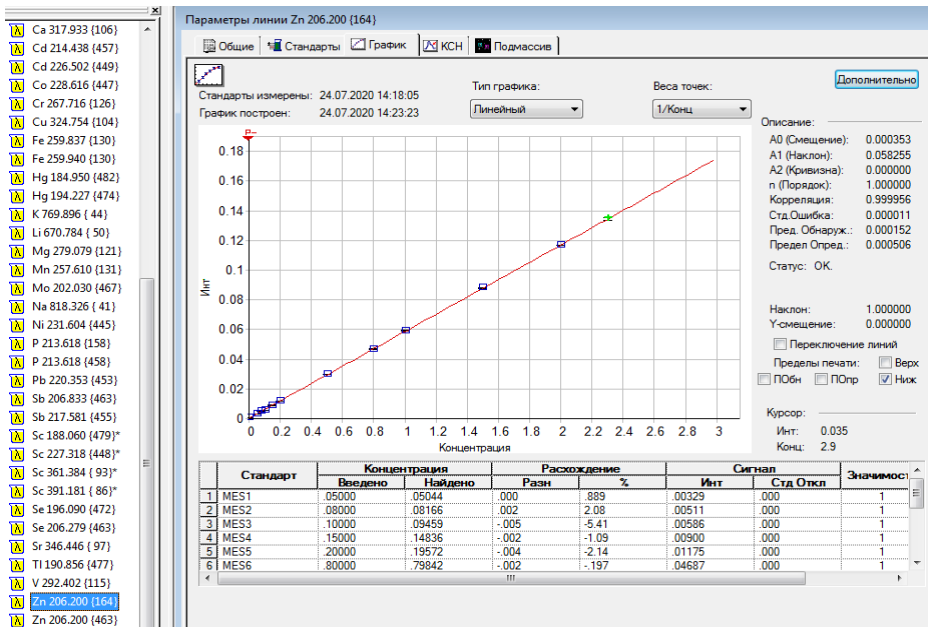


Figure 4.3. Sequence of the multi-element analysis method in the *ITEVA* software (Russian version) and the calibration curve of an element.

For zinc (example here), it is observed that the linearity range (LN) is very long, from 0.05 mg(Zn)/L to 2 mg(Zn)/L. However, the iTEVA software provides more details about the method, parameters such as: detection limit (LD), quantization limit (LQ), correlation coefficient (R^2) and others. Here, based in the standard solutions analyzed at the equipment, it results is ensured that an extraordinary linearity in the range from $LQ = 0.506 \mu\text{g}(\text{Zn})/\text{L}$ to 2.3 mg(Zn)/L, with a deviation of only $s_{Zn} = \pm 0.011 \mu\text{g}(\text{Zn})/\text{L}$. The degree of the linear equation is 1 taking the following form $y = a + bX$, with $a = 0.000353$ (in figure 3 A0), $b = 0.058255$ (in figure 3 A1) and $R^2 = 0.999956$. Under these conditions, the field of analysis LN, in which linearity is ensured, can be extended and can start from $0.506 \mu\text{g}(\text{Zn})/\text{L}$.

Figure 4.4 shows a multi-element analysis report issued by iTEVA.

The report contains all the necessary user information, organized in columns, for each element and the spectral line of the element, units of measure, average result and replication data, standard deviation in units of measure and in %. At the bottom right, the emission spectrum of the selected line and the interference inputs, if any, are displayed. Usually, the correct choice of spectral lines greatly reduces the probability of spectral interference of other elements present in the matrix of the samples to be analyzed.

Recommended methods for multi-elements determinations on different samples with applying the ICP-OES technique are ISO 11885: 2007, EPA 200.7 and EPA 200.5. The application of the ICP-OES analysis equipment allows the simultaneous multi-elements analysis of a conditioned sample in about 3-4 minutes and the quantification of up to 35 chemical elements.

The standardized, international method, ISO 11885: 2007 specifies a method for determining the dissolved elements and the total content of elements in water and wastes for 35 elements: Ag, Al, As, B, Ba, Be, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Ga, In, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, Sb, S, Si, Sn, Se, Sr, Ti, Tl, V, W, Zr and Zn. Taking into account specific and additional interferences, these elements can also be determined in digestions of alcoholic beverages, vegetable fats, oils, lubricants, biological, environmental and food samples, sludges and

sediments. The method is suitable for element concentrations below 2 g/L.

Recommended methods for sample digestion and preparation for ICP-OES analysis are ISO 15587-1, ISO 15587-2, EPA 200.2, 3050 and 3051A. These methods involve the use of laboratory equipment.

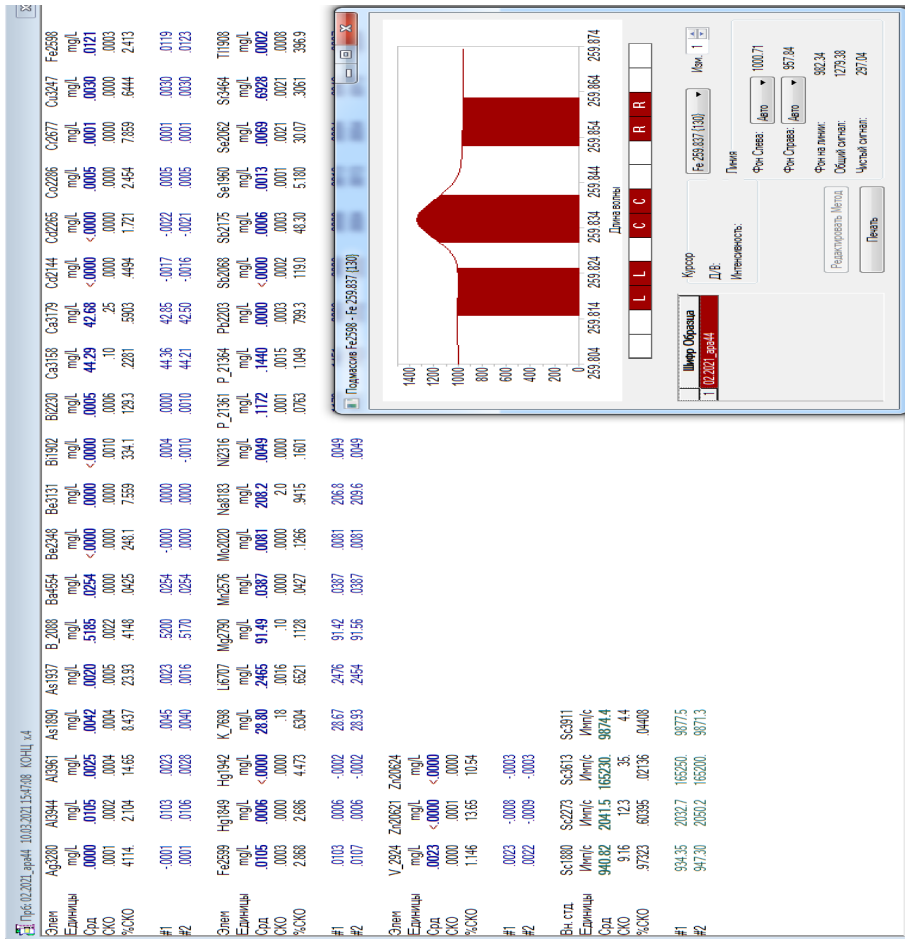


Figure 4.4. Sequence of a multi-element analysis report of a surface water sample in the iTEVA software and the intensity of the emitted radiation of an element at the wavelength of the selected spectral line.

The following equipment is often used for the conditioning of hydrochemical samples by acid digestion: 1) HotBlock SC 151 or SC 154 (Environmental Express) required for the preparation of liquid samples, for example surface water, groundwater or wastewater and 2) Sample preparation system with SpeedWave four SW-4 microwave (Berghof) for solid and semi-liquid samples. The main element of this HotBlock SC 151 (Environmental Express) equipment are the graphite heating mats and corrosion-resistant Kydex® that provide uniform heating in all parts of the block up to 150 ° C. Digestion at relatively low temperatures and the use of screw-cap poly-propylene vessels allow the preparation of samples for micro- and ultramicroanalysis of elements without the risk of contaminating the samples with traces of chemicals and inorganic substances (Figure 5a). The equipment offers the possibility to create digestion programs, where the number of stages, the temperature of each stage, the heating rate in °C/minute (or the temperature gradient) and the storage time of the samples at the required temperature can be programmed. At the same time, it allows the operator to prepare 54 samples simultaneously, in a volume of 50 or 100 ml.

The advantages of using the equipment HotBlock SC 151 (or HotBlock SC 154) are distinguished by simplicity, energy saving and costly reactions, ease of operation and convenience.



a. Liquid sample digester, HotBlock SC 151 (Environmental Express);



b. Microwave digester, for solid and semi-liquid samples, SpeedWave four SW-4 (Berghof).

Figure 4.5. Sample digestion techniques

SpeedWave four SW-4 is a microwave oven designed for digestion and/or chemical pyrolysis procedures at temperatures up to 300 °C and high pressures up to 100 bar, with the subsequent use of samples for ICP-OES spectrometric analysis (figure 5b). The mixtures to be analyzed are heated by microwave irradiation in the presence of concentrated acids, such as nitric, hydrochloric, hydrofluoric and sulfuric, as well as their mixtures. The advantages of this equipment, because all components that come into contact with digestive reagents are made of extrapure PFA and PTFE and the fact that the samples subjected to the digestion process are in hermetically sealed vessels are two key moments for ICP-OES instrumental analysis: contamination is excluded and analyte losses, and short time for the digestion process. The preparation time of the samples by microwave digestion, depending on the matrix of the samples to be analyzed, is from a few minutes to a few tens of minutes.

4.3. Bibliography

- Alfassi Zeev B. (Ed.), 1994, Determination of Trace Elements, Balaban Publishers, Weinheim, New York, pp. 192-226.
- ASTM D1976 20, Standard Test Method for Elements in Water by Inductively-Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy,
<https://shop.bsigroup.com/ProductDetail?pid=000000000030422520>
- BS EN ISO 11885:2009. Water quality. Determination of selected elements by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES), 2009,
<https://shop.bsigroup.com/ProductDetail?pid=000000000030081913>
- Fileenko O.F., 1988, Aquatic toxicology. Chernogolovka: Moscow State University Publishing House, 1988, 156 p. - Филенко О.Ф. Водная токсикология. Черногоровка:Изд-во МГУ, 1988, 156 с.
- SM SP EN ISO 15587-2:2012. Mineralizarea pentru determinarea unor elemente din apă. Partea 2: Mineralizare cu acid azotic.
- SP EN ISO 11885:2009. Determinarea elementelor selectate prin spectroscopie de emisie optică cu plasma cuplată inductiv (ICP-OES).

Chapter 5. Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) for environmental analysis

Liliana Teodorof¹, Adrian Burada¹, Cristina Despina¹,
Antoaneta Ene², Seceleanu-Odor Daniela¹

¹Danube Delta National Institute, 135 Babadag Street, Tulcea, Romania

²INPOLDE interdisciplinary research network, Dunarea de Jos University of Galati, 111 Domneasca St., Galati, Romania

5.1. Introduction

ICP methods demonstrates in the last years to be an excellent tool for metals and metalloids analysis in aqueous solutions for all environmental factors, one of the accurate, sensitive and reliable techniques. ICP has two detection systems: inductively coupled plasma with atomic emission spectrometry (ICP - AES) and inductively coupled plasma with mass spectrometry (ICP - MS). ICP - MS detection limits are three times superior to those of ICP - AES (Jorge et al., 2007).

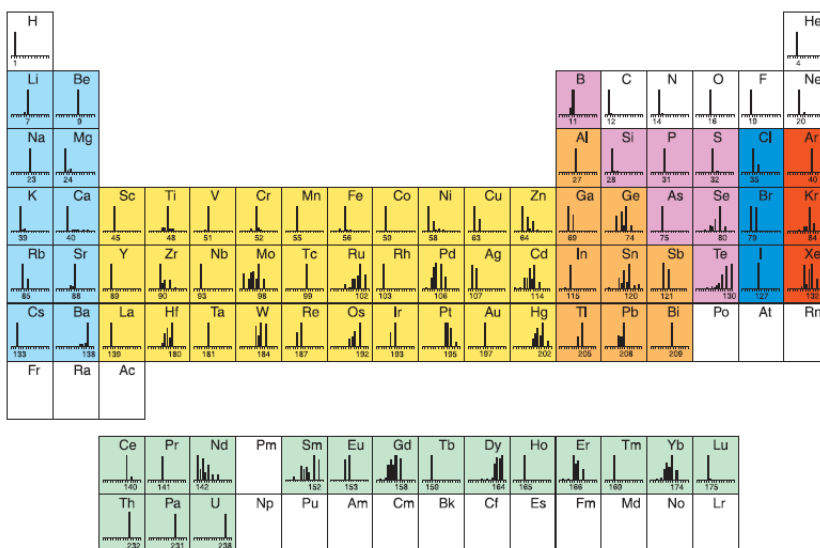


Figure 5.1. Elements analyzed using ICPMS (in color) (****2011)

An advantage of this method consists is the possibility to simultaneously analyse up to 62 chemical analytes for one sample (Figure 5.1). Other advantages of using ICP MS technique are: the detection limits are below of 1 ppt (part per trillion) for a lot of elements, analytical working is nine orders of magnitude, highest productivity, isotopic analysis with high accuracy (****2011).

A schematic diagram of ICP - MS spectrometer is represented in the Figure 5.2.

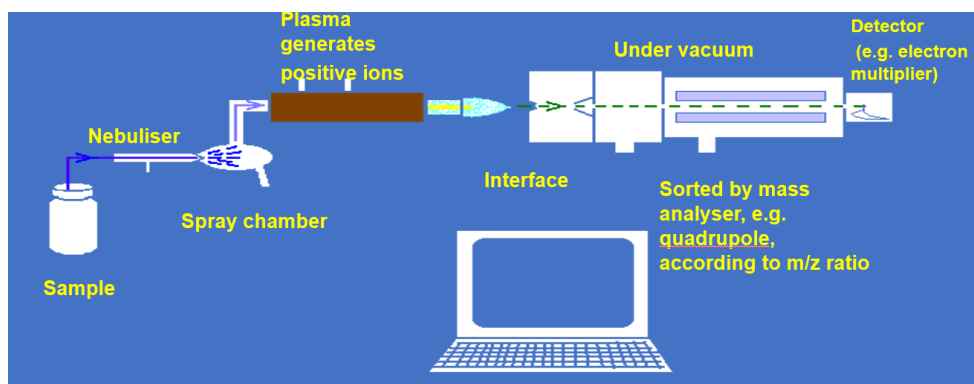


Figure 5.2. General representation of ICP - MS

5.2. Principles of Ion formation

In Mass Spectrometry, by applying energy, chemical analyte molecules are converted to ions, that are separated on the basis of their mass-to-charge ratio (m/z) and directed to a transducer that converts the number of ions (abundance) into an electrical signal. The ions of different mass-to-charge ratios are directed to the transducer sequentially by scanning or made to strike a multichannel transducer simultaneously. The ion abundance plotted against mass-to-charge ratio is called a *mass spectrum*. Often, singly charged ions are produced in the ionization source, and the mass-to-charge ratio is shortened to just mass so that the spectrum is plotted as number of ions versus mass (Skoog et al., 2007).

5.3. Sample introduction

As we know, for ICP - MS analysis, samples are in a liquid form. However, the samples must be introduced into the torch in either a gaseous form or an aerosol form. For that reason, liquid samples require sample nebulization. Via a peristaltic pump, the liquid sample is pumped from a vial, directly into the nebulizer. On the tip of a needle, liquid droplets are formed and they become nebulized due to argon gas flowing direct a second needle perpendicular to the sample needle. Into the torch, a small amount of aerosol created is swept, and most of sample condenses on the walls of the nebulizer and is wasted to the drain (Figure 5.3) (Bazilio et al., 2012).

The ICP torch consists of a copper induction coil wrapped around a concentric quartz structure. Argon gas is continuously flowing throughout the quartz torch, and a radio-frequency (RF) generator provides power to the radio - frequency coil at oscillating frequencies. Plasma (an electrical conducting gaseous mixture) generation occurs when the argon gas is seeded with a spark from a Tesla unit. The spark ionizes some of the argon, and the cations and electrons produced from that accelerate towards the radio - frequency coil. The cations and electrons collide with other argon molecules during this acceleration, creating high temperatures. With ample argon supplied, the plasma will reach equilibrium and remain at a constant temperature of about 6000°C for the duration of analysis (Bazilio et al., 2012).

The aerosol produced via nebulization enters this high temperature plasma, where it is first dried to a solid, and then heated to a gas, referred to as atomization. These atoms will continue to travel through the plasma, absorbing energy until they release an electron, becoming ionized, referred to as ionization. These newly formed ions then travel out of the torch and come to the interface (Bazilio et al., 2012).

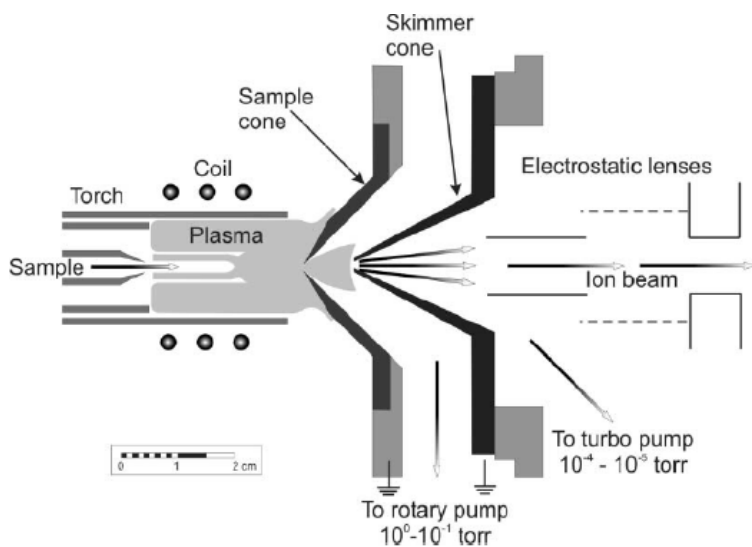


Figure 5.3. Cross section of sample introduction and interface region (Wilschefski et al., 2019)

5.4. Plasma source

The plasma source consists of three concentric quartz tubes through which streams of argon flow at a total rate of between 11 and 17 L/min. The largest tube has a diameter about 2.5 cm. A water-cooled induction coil powered by a radio-frequency generator, which radiates 0.5 to 2 kW of power at 27.12 MHz or 40.68 MHz, surrounding the top of this tube. A spark from a Tesla coil initiated the ionization of the flowing argon, resulting ions and their associated electrons then interact with the fluctuating magnetic field (labelled H in Fig.5.4) produced by the induction coil labelled I. This interaction causes the ions and electrons within the coil to flow in the closed annular paths shown in the Figure 5.4. The resistance of the ions and electrons to this flow of charge causes ohmic heating of the plasma (Skoog et al., 2007).

The temperature of the ICP is high enough that it must be thermally isolated from the quartz cylinder. Isolation is achieved by flowing argon tangentially around the walls of the tube, as indicated by the arrows in Figure 5.4. The tangential flow cools the inside walls of the central tube and focuses the plasma radially (Skoog et al., 2007).

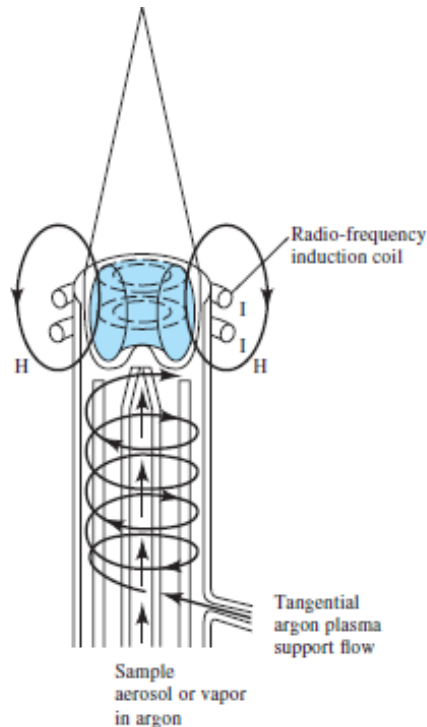


Figure 5.4. Inductively plasma source (Skoog et al., 2007)

Recent ICP instruments have incorporated the axial viewing geometry, as shown in Figure 5.5, in which the torch is turned 90°. The axial geometry was originally made popular for torches that were used as ionization sources for mass spectrometry. More recently, axial torches have become available for emission spectrometry. Several companies, in fact, manufacture torches that can be switched from axial to radial viewing geometry in atomic emission spectrometry. The radial geometry provides better stability and precision, while the axial geometry is used for achieving lower detection limits (Skoog et al., 2007).

5.5. Interface Region

Generally speaking, the interface can be described as the point at which sample from the ICP portion of the instrument is introduced to the mass spectrometry (MS) portion of the instrument.

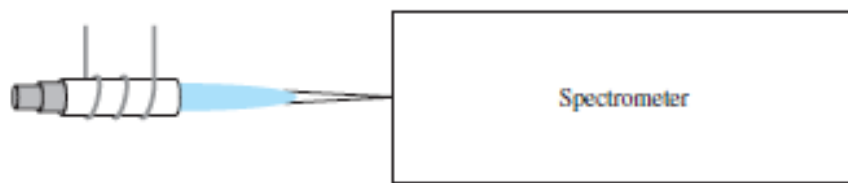


Figure 5.5. Axial geometry of ICP-MS plasma source (Skoog et al., 2007)

The interface portion of the instrument serves to allow the ICP and MS portions to be coupled. The first component the sample matrix confronts after ionization in the ICP torch is the sampler cone. This is a cone (water cooled), with a small orifice, allowing for the hot plasma gas to enter in a depressurizing chamber, where, rapid cooling and thus rapid expansion of the gas occurs. A fraction of this gas then passes through a skimmer cone and into a chamber that is maintained at a vacuum of MS (Figure 5.3). This two-step pressure reduction allows the ionic gas to enter the MS at proper temperature and pressure (Bazilio et al., 2012).

5.6. Mass Analyzer: Quadrupole Technology

The ion stream is focused into the quadrupole region by single ion lenses, after passing through the sample and skimmer cones. Ions generated in plasma are nearly all positively charged and have the tendency to repel each other and pass through a charged metallic cylinder which keeps the ion beam from diverging (Bazilio et al., 2012).

The application of mass spectrometry is to provide information about the elemental composition of matter, the structures of inorganic, organic, and biological molecules, the qualitative and quantitative composition of complex mixtures, the structure and composition of solid surfaces and isotopic ratios of atoms in samples. Energetic electrons collide with analyte molecules and impart enough energy to leave the molecules in an excited state. Relaxation then often occurs by fragmentation of part of the molecular ions to produce ions of lower masses (Bazilio et al., 2012).

Ions are dispersed in the mass analyzer based on their mass-to-charge ratio (m/z). Mass spectrometers require low pressures in all of

the instrument components except the signal processor and readout. The capability of a mass spectrometer to differentiate between masses is usually stated in terms of its resolution which is defined by $R=m/\Delta m$. In this equation, Δm is the mass difference between two adjacent peaks that are just resolved, and m is the nominal mass of the first peak (Bazilio et al., 2012).

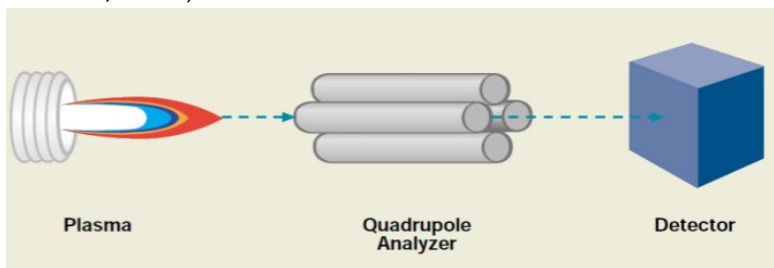


Figure 5.6. A quadrupole mass spectrometer (Banerjee D.)

The quadrupole mass spectrometer (Figure 5.6) is the most common type of mass spectrometer used in atomic mass spectroscopy. Four parallel cylindrical rods serve as electrodes; opposite rods are connected electrically with one pair connected to the positive side of a variable direct current (DC) source, and the other to the negative terminal. Variable radio- frequency alternating current (AC) voltages 180° out of phase are applied to each pair of rods. Ions are accelerated into the space between the rods by a potential of 5 to 10 V while the ac and dc voltage on the rods are increased simultaneously but with a constant ratio. The quadrupole is a mass filter which only allows ions having a limited range of m/z values reach the transducer. Ions that are not of the correct m/z collide with the rods or exit the path between the rods and are pumped out of the system. Quadrupole instruments easily resolve ions that differ in mass by one unit. The MS in the Elan DRC-e scans the mass range from 5 to 270 amu in milliseconds (Bazilio et al., 2012).

Ions that exit the mass analyzer enter in the detector. The Elan DRC-e is equipped with a dual mode detector (Figure 5.7). The ions exiting the quadrupole produce an amplified signal that is processed by the detection electronics and sent to the computer for data processing. The detector is comprised of 26 dynodes. The ions exiting the MS strike

the active surface of the first angled dynode. This allows the ions to follow a curved path, separating the signal ions from the background noise (neutral and radiation from the ion source). The dynode releases an electron each time an ion strikes it. The electrons released from the first dynode strike the second dynode and more electrons are released. Cascading of electrons continues until measurable pulse is created. A counting pulse system counts ions that first hit the dynode. If the pulse count exceeds about 2×10^6 counts, an isolated dynode is switched to ground potential, disabling the pulse section of the detector. The analogue portion of the detector is still available to measure the current produced by the ions hitting the first 23 dynodes (Bazilio et al., 2012)

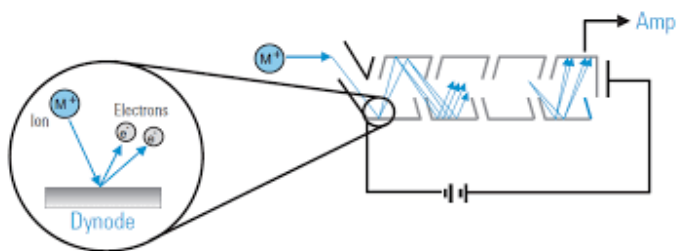


Figure 5.7. Ion Detector (Banerjee D.)

5.7. Dynamic Reaction Cell (DRC)

The Dynamic Reaction Cell (DRC) (Figure 5.8) is an enclosed quadrupole which acts as the interface between the single lens ion optics chamber and the mass analyzer high vacuum chamber. Reaction gas is introduced through a clean gas manifold and controlled by one or by both of the two mass flow controllers, with low flow (3 cm). The ion beam is introduced to the DRC through an entrance aperture inlet. Ions exit the cell through an aperture which communicates with the AC-only prefilter, and hence are transferred to the quadrupole mass filter. Reaction gas exits the cell through both the entrance and exit apertures. For experiments without reaction gas, the gas flow is stopped and the DRC enclosure is remotely opened for venting into the high vacuum chamber (Tanneer et al., 1999).

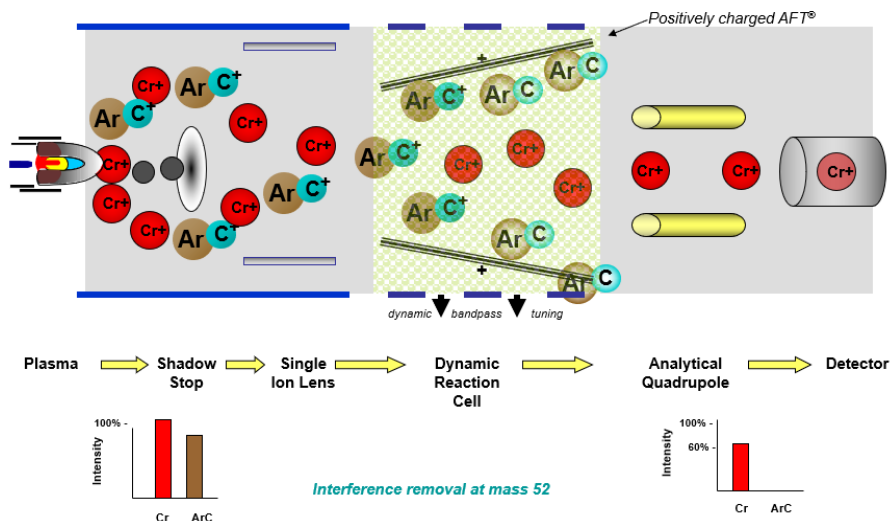


Figure 5.8. Dynamic Reaction Cell (Perkin Elmer ppt)

The chamber is pressurized by a reaction gas. Any gas can be used based on its ability to react with the interferent, react with the analyte, dissociate polyatomic species, electron or proton transfer. Dynamic bandpass tuning of the quadrupole ejects all unwanted reaction products and removes them from the cell. Only analyte ions are focused through both the reaction cell and the analytical quadrupole (Tanneer et al., 1999).

The advantages of Dynamic Reaction Cell are: minimal sensitivity loss (collisions are not the primary interference removal pathway, DRC promotes analyte movement through the cell with AFT), no kinetic energy barriers are set), reactions are predictable (interference removal follows predictable chemistry, not dependent on interference concentration), interference ejected (dynamic bandpass tuning ejects interferences and does not allow them to reach the analytical quadrupole) (Tanneer et al., 1999).

5.8. Methods for quantification

ICP-MS is a technique that enables measurements of elements and their isotopes over a very wide dynamic range. ICP-MS is a comparative technique: it requires a set of well-defined standards

and/or reference materials for accurate calibration. A variety of reference materials can be used in chemical measurements: pure substances (either essentially pure chemicals or well-characterized substances containing trace amounts of impurities); standard solutions and gas mixtures prepared from precursory pure substances; matrix reference materials (mimicking the chemical composition of the investigated objects). It should also be noted that the measurement methods are often standardized: the operational standards are defined by an exact procedure (Bulska et al., 2016).

The main quantification methods using IPC - MS are: semi - quantitative analysis (rapid for screening purposes, provides semi-quantitative data, information on spectral interferences), external calibration (assures high accuracy, lowest possible detection limits, possible to use multi-elements standards, traceability to RCM), external calibration with internal standard (IS) (assure high accuracy, lowest possible detection limit, possible to use multi-elements standards, traceability to high purity standards, robust for instrumental fluctuations, the ratio of analyte signal intensity to that of IS is measured), isotopic ratio measurements (robust for instrument fluctuation and matrix effect, robust for the poor recovery of analytical procedure), isotopic dilution (high accuracy; lowest uncertainty, interferences free; the analyte acts as its own IS, useful in trace elements determination and in speciation, fulfils the requirement as 'definite method') (Bulska et al., 2016).

The external calibration method relies on preparation of synthetic samples containing known quantities of the element to be measured. These synthetic samples are then introduced to the mass spectrometer, and the ion signal intensities are recorded. The signal intensities can be linked with the known concentrations of the elemental standards. The obtained signal concentration dependences are basic for further quantification. External calibration is the most popular calibration approach. It is widely used for analysis of samples for which the assumption (Bulska et al., 2016).

In order to analyse the metals and metalloids from different environmental samples like surface waters, underground water, drinking water, soil/sediments and biota, it is necessary to perform the digestion

step. The most used technique is the microwave digestion, using the Anton Paar microwave oven (Figure 5.9). The element contents were analyzed using the ICP - MS Elan DRC-e. Inductively coupled plasma - mass spectrometry (ICP-MS) is applicable to the determination of small concentrations of a large number of elements (Figure 5.10). When dissolved constituents are required, samples must be filtrated and acid-preserved before the analysis.

The external calibration method relies on preparation of synthetic samples containing known quantities of the element to be measured.



Figure 5.9. Microwave Oven Anton Paar (DDNI)



Figure 5.10. ICP - MS Elan DRCe Perkin Elmer (DDNI)

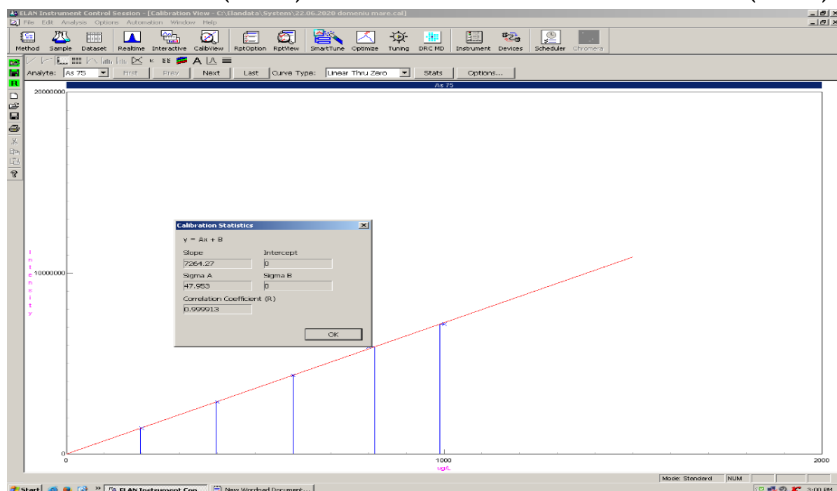


Figure 5.11. Calibration curve for arsenic (75) using ICP - MS Elan DRCe (DDNI)

These synthetic samples are then introduced to the mass spectrometer, and the ion signal intensities are recorded. The signal intensities can be linked with the known concentrations of the elemental standards. The obtained signal concentration dependences are basic for further quantification. External calibration is the most popular calibration approach. Calibration curves are usually made using 3-5 standard solutions in the area of interest and additionally of the blank solution. There is a possibility of simultaneous quantitative analysis of up to 62 data with an accuracy of $\pm 1-2\%$.

In Figure 5.11 is presented the calibration curve for Arsenic, in 5 points, with $R^2 = 0.9999$. By extrapolation, the desired metal concentration can be determined by measuring the intensity of the liquid sample.

5.9. Bibliography

****2011, https://www.perkinelmer.com/CMSResources/Images/44-74849tch_icpmsthirtyminuteguide.pdf

Banerjee D., Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS), (<https://www.iitk.ac.in/che/pdf/resources/ICPMS-reading-material.pdf>)

Bazilio A., Weinrich J., 2012, The easy guide to: Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry (ICP - MS), 12 pp.

Bulska E, Wagner B. 2016 Quantitative aspects of inductively coupled plasma mass spectrometry. Phil. Trans. R. Soc. A 374: 20150369.

Jorge E.M., Botte S.E., Ruben H.F., 2010. Heavy metals, Major Metal, Trace Elements, Book Chapter In: Handbook of Water Analysis, Second Edition, Leon M.L. Nollet, CRC Press, US, 745p.

Kashani A., Mostaghimi J., 2010. Aerosol characterization of concentric pneumatic nebulizer used in inductively coupled plasma–mass spectrometry (ICP-MS), Atomization and Sprays, 20(5):1-19.

Skoog D.A., Holler J.F., Crouch, S.R., 2007. Principles of Instrumental Analysis, Thomson Brooks/Cole.

Tanner S.D., Baranov V.I., 1999. Theory, Design and operation of Dynamic Reaction Cell for ICP-MS, Perkin-Elmer Sciex Instruments, Ontario, Canada L4K 4V8, Atomic Spectroscopy, 20 (2), 45-52.

Wilschefski S.C., Matthew B., 2019. Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: Introduction to Analytical Aspects, Clin. Biochem, 40(3) 133, 1-19.

Chapter 6. Gas chromatography with mass detector (GC-MS) for environmental analysis

Victor Ciornea¹, Anastasia Ivanova¹, Elena Zubcov^{1,2}, Antoaneta Ene²

¹*Institute of Zoology, Chisinau, Republic of Moldova*

²*INPOLDE interdisciplinary research network, Dunarea de Jos
University of Galati, 111 Domneasca St., Galati, Romania*

6.1. Introduction

Gas chromatography is the most effective method of separating volatile and semivolatile multicomponent mixtures. On the other hand, mass spectrometry is the most sensitive method of structural analysis, being a microanalytical technique. Mass spectrometry can be considered an exceptional technique and unique dexterity in measuring relative molecular masses and identifying unknown structures, with the opportunity to provide detailed structural information on most of the components present in the samples. In combination with these two methods, GC-MS, is successfully applied in various fields of analysis, in qualitative and quantitative analyzes, such as forensics, medicine, pharmaceutical and food industry, environmental analysis, etc. The GC-MS technique allows the analysis of concentrations of the order of pg/mL and lower.

6.2. Methodology

The Hydrobiology and Ecotoxicology Laboratory of the Institute of Zoology has a GC-MS unit, model "Agilent 8860 GC System" coupled with detector "5977B MS Detector" and separation column model Elite MS-5 with precolumn (Figure 6.1). Its use is applicable for GC-MS determinations on a wide range of indicators, in particular for the determination of organic ecotoxicants of anthropogenic origin (Bogdevich & Ene, 2015; Falaki, 2019; Hübschmann, 2015), such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), polychlorinated biphenyls (PCBs), organochlorine and organophosphorus pesticides, etc.

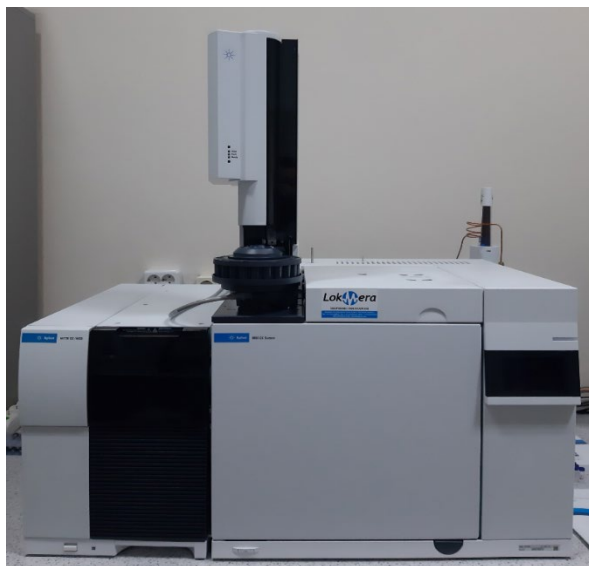


Figure 6.1. Image of the GC-MS unit, model “Agilent 8860 GC System” with “5977B MS Detector”.

GC-MS measurements can be performed in several working modes, SCAN, SIM (selected ion monitoring), or combined SCAN / SIM. Selecting the SCAN operating mode involves choosing a specific range of the mass spectrum and roughly identifying all components. Component identification is done in comparison to some MS libraries, such as the NIST library (Figure 2). This working regime provides qualitative information about the components present in the samples.

Figure 6.2 shows a sequence of TIC chromatogram performed in SCAN mode and identification of parathion by comparing the spectrum obtained with that of the NIST library. In the upper right is presented the mass spectrum, the identified cations and the retention time, 17,949 min. In this example, at the retention time 17,949 min, several cations with relative mass m/z (in descending order of spectral line intensity) were identified: 291, 109, 97, 125, 57, 93, 218, 160 and 176. In the lower right, is presented a mass spectrum of the component most likely identified by the NIST library. The highest probability of the identified component is for parathion, about 49.8% and its isomers (Figure 6.2 in the middle, bottom, the four positions).

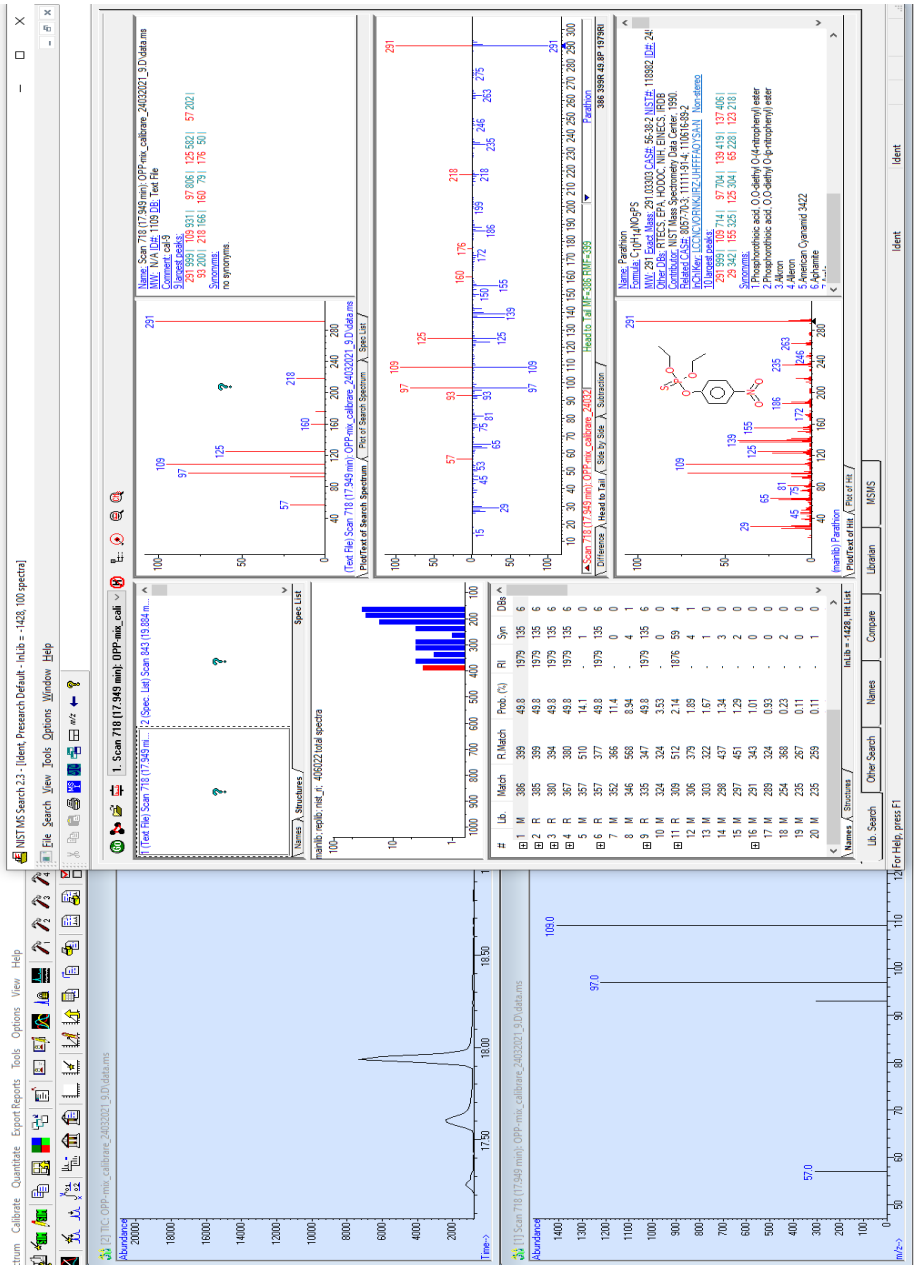


Figure 6.2. Visualization of an TIC chromatogram sequence performed in SCAN mode and identification of the “parathion” organophosphorus pesticide by comparing the spectrum obtained with that of the NIST library.

On the right, in the middle, is presented comparatively, in red, the mass spectrum obtained for the retention time 17,949 and, in blue, the spectrum according to the information of the NIST library. Here, at the same time, some additional information is provided, such as: component name, crude formula, molar mass, CAS number and some most common synonyms for this compound.

By the SIM method the individual ionic masses (m / z) are continuously selected, or when it is desired to measure several ions, each is detected in sequence for a period of time. In SIM mode, the sensitivity increases about 1000 times compared to SCAN mode. The results of the TIC chromatograms obtained in SIM mode are used to build the calibration curves of the components to be analyzed and to develop methods for quantitative determination.

Figure 6.3 shows some information of a method for determining organophosphorus pesticides such as: O,O,O-Triethyphosphorothioate, Thionazin, Sulfotep, Phorate, Dimethoate, Prometon, Simazine, Atrazine, Disulfoton, Alachlor, Methyl-parathion, Bromacil, Metolachlor, Parathion, Butachlor and Famphur. Solution no. 48469 from Sigma Aldrich served as the primary standard solution. As an internal standard (SI), the PCB-29 solution with a concentration of 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ was used.

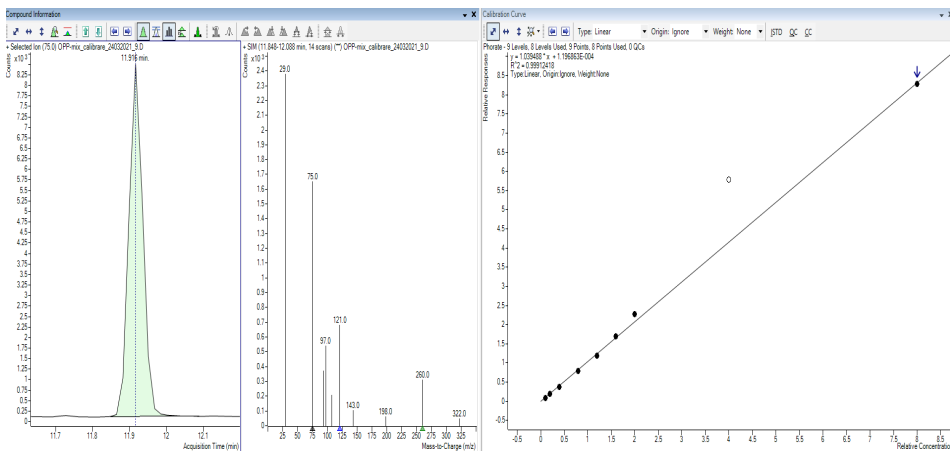


Figure 6.3. Viewing the resulting information in SIM mode; integrated chromatogram sequence with retention time, spectrum and m/z dates characteristic of cations and calibration curve

The retention time, the characteristic cations selected for the components of the solution are presented in Table 6.1. The technical conditions of the method are described in Table 6.2. The injection was performed manually.

Table 6.1. Calibration solution components and related information.

Signal	Compound	CAS Number	τ , min	Cation, m/z		
				1	2	3
1	O,O,O-Triethyphosphorothioate	126-68-1	5.083	121	198	93
2	Thionazin	297-97-2	10.565	97	107	143
3	Sulfotep	3689-24-5	11.514	322	29	97
4	Phorate	298-02-2	11.903	75	121	260
5	Dimethoate	60-51-5	12.573	87	93	125
6	Prometon	1610-18-0	12.699	58	168	210
7	Simazine	122-34-9	12.785	44	201	186
8	Atrazine	1912-24-9	12.933	200	215	58
9	Disulfoton	298-04-4	14.169	88	29	97
10	PCB29 (SI)	15862-07-4	15.285	256	186	93
11	Alachlor	15972-60-8	16.206	160	188	146
12	Methyl-parathion	298-00-0	16.206	125	109	263
13	Bromacil	314-40-9	17.276	205	42	70
14	Metolachlor	51218-45-2	17.591	162	238	91
15	Parathion	56-38-2	17.952	291	109	97
16	Butachlor	23184-66-9	19.886	57	176	160
17	Famphur	52-85-7	22.203	218	93	125

A good separation of the components of the calibration solution is observed. The resolution of peak identification on chromatograms is 0.001 minutes. The integration of the peaks was done in automatic mode (Figure 6.3, left window). For each component, 3 specific cations were chosen, the first being for the quantitative identification of the component, and two for the qualitative identification (Figure 6.3, middle window).

Table 6.2. Technical conditions of the method

Carrier gas (mobile phase)	Helium, constant pressure
Injection	Manual
Injection volume	1 μ L
Injector	Splitless, 280 °C, 50 ml/min
Thermostat	Column Agilent J&W HP-5ms UI, 30 m \times 0.25 mm, 0.25 μ m with precolumn 10 m Flow He 1 mL/min 80 °C (1 min) 10 °C/min up to 190 °C (4 min) 10 °C/min 300 °C (5 min)
Solvent delay	4 min
MS detector temperature	Source: 300 °C; Quad 150 °C
Transfer line	280 °C
MS Detector	SIM

The calibration curve was constructed from 9 levels of concentrations (Figure 6.3 right window). A good correlation of GC-MS data is observed. For the example in Figure 6.3, Phorate, the correlation coefficient $R^2=0.99912418$, and the equation of the calibration line is presented as $y=1.039488 \cdot x+1.96863 \cdot 10^{-4}$. This can be approximated, since $a \rightarrow 0$, and $b \gg a$, up to the form $y=1.039488 \cdot x$.

The application of the GC-MS analysis equipment allows the simultaneous analysis of a sample, conditioned, in a time from a few minutes to a few tens of minutes. However, in order to perform these analyzes, the samples require appropriate preparation and conditioning. A universal method for preparing samples for GC-MS analysis (and not only) is the EPA 3500C method. The recommended method for preparing solid samples is the EPA 3545A method by PFE (Pressurized Fluid Extraction).

For the application of this type of PFE extraction it is recommended to use an accelerated solvent extractor (ASE) from ThermoScientific Dionex ASE 150 (ThermoFisher Scientific). This type of extractor is an automated system for the extraction, filtration and cleaning of a single sample, hosting a sample from 1 to 100g and using

50 to 90% less solvent than other extraction methods (Figure 6.4). The extraction of the analytes from solid and semi-solid samples is done in a few minutes.

Purification of the extracts is performed according to EPA method 3530C. This method includes guidelines for the standard cleaning on silica gel columns of sample extracts containing PAHs, phenolic compounds, organochlorine, organophosphorus pesticides and PCBs.

The recommended method for the determination of organophosphorus pesticides, by applying the GC-MS technique for determinations on various hydrochemical samples, is the EPA 8270E method. The combination of this method, EPA 8270E, with EPA methods 3510, 3520, 3540, 3541, 3545, 3550, 3580 allows the concomitant analysis of about 254 components in a single injection.



Figure 6.4. Image of the ThermoScientific Dionex ASE 150 extractor.

6.3. Bibliography

- Bogdevich O., Ene, A., Chapter 4 - Gas chromatography technique in environmental analyses, pp. 89-112, in: Instrumental Techniques for Environmental Investigations: Methodological Guide = Tehnici Instrumentale pentru Investiții de Mediu: Ghid Metodologic (Editor - Ene, A.), Ed. Tehnopress, Iasi, 2015, ISBN 978-606-687-233-1, 220 pp.
- Falaki Foujan, 2019, Sample Preparation Techniques for Gas Chromatography, DOI:10.5772/intechopen.84259; <https://www.intechopen.com/chapters/66518>.
- Hübschmann Hans-Joachim, 2015, Handbook of GC-MS: Fundamentals and Applications, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.KGaA, Weinheim, Germany, 863 pp.

Chapter 7. High Resolution Mass Spectrometry-based methods for pharmaceuticals monitoring in water, soil and sediment

Carmen Lidia Chițescu¹, Antoaneta Ene²

¹ *Dunarea de Jos University of Galati, MORAS Research Center, Faculty of Medicine and Pharmacy, Str. Alexandru Ioan Cuza no.35, Galați, Romania*

² *INPOLDE International Interdisciplinary Research Center, Dunarea de Jos University of Galati, Faculty of Sciences and Environment, 47 Domneasca Street, 800008 Galați, Romania*

7.1. Introduction

The increased rate of the pharmaceuticals production has led to their widespread occurrence in the aquatic environment. Thus, active pharmaceutical compounds were found in soils, sediments, and surface and groundwater water (Carmona et al., 2017).

Pharmaceuticals for human or veterinary use are designed to have a specific biological action; however, the impact on non-target species is unknown (Van Donk et al., 2016). Furthermore, they are released into the environment as complex mixtures, which do not exclude unexpected biological effects due to possible synergistic or antagonistic interactions (Van Donk et al., 2016). Environmental effects of pharmaceuticals have been already documented in wildlife (Vestel et al., 2016), and potential effects are presumed in humans, especially concerning the emergence of antibiotic resistance in pathogenic bacteria (Malchi et al., 2014).

Although pharmaceuticals have been recognized as a potentially hazardous group of substances with respect to the environment, these are not regulated substances, and therefore not included in routine monitoring programs (Miarov et al., 2020).

Understanding the potential biological impact of pharmaceuticals in the environment involves primarily the identification and quantification of the active compounds. More information is needed to evaluate certain pharmaceutical compounds as regards their

concentrations in the environment and the resulting levels of risk. For the first time, in 2013, the European Commission proposed continuous monitoring for four pharmaceuticals of emerging concern: diclofenac, estrone (E1), 17- β -estradiol (E2) and 17- α -ethinylestradiol (EE2) (Directive 2013/39/EU). The new Watch List of the Decision 2015/495/EU also included the macrolide antibiotics.

Future projects and programs, should consider not only the compounds included in the EU decisions, but a wide range of pharmaceuticals classes. A comprehensive, unitary, analytical method that identifies and measures all possible pharmaceutical residues is unrealistic, since it would have to deal with thousands of compounds and active metabolites. Because of these, a preselection of the molecules is needed, in order to identify those most likely to pose environmental pressure. Prioritization approaches in the environmental monitoring campaigns are generally based upon hazard, exposure, or risk (von der Ohe et al., 2011). Widely used pharmaceutical compounds such as paracetamol, carbamazepine, diclofenac, amoxicillin, lipid-lowering agents or antidiabetics should be included.

Monitoring chemical substances involves several basic types of activities: sampling, compound prioritisation, extraction and instrumental analysis. As the types of matrices under investigation as well as the number and type of analysed compounds have increased, new analytical methods have been developed.

The present advanced LC-MS techniques (liquid chromatography tandem mass spectrometry) are able to confirm the identity of targeted and unknown compounds at trace concentrations in complex environmental samples (Kaufmann, 2020). Multi-target screening of hundreds of compounds can be accomplished on the acquired sensitive full scan HRMS (high resolution mass spectrometry) (von der Ohe et al., 2011; Casado et al., 2019). Furthermore non-target analytical approaches based on HRMS have been widespread in recent years. Because the analytes are not a priori selected, data files can be archived for a retrospective processing for thousands of 'suspects' compounds of interest, using MS-MS databases (Alygizakis et al., 2019). Bench-top instruments are becoming available in many universities, research institute or environmental monitoring laboratories.

The present chapter will discuss modern techniques which can be used in sampling and analysis of pharmaceuticals in environmental matrices as water, soil, sediments.

7.2. Sampling

Obtaining a representative sample of the matrix of interest is a main component of an environmental monitoring program. Planning the sampling campaign includes: 1) selection of the sampling method, 2) determination of the sample quantity needed for the analytical method, 3) identification of the Quality Assurance/Quality Control measures, 4) identification of safety measures (Li and Migliaccio, 2010). Establishing sampling sites can follow a judgmental, systematic, or random pattern, according to the monitoring study objectives (Li and Migliaccio, 2010).

According to the conventional sampling practices (ex. EPA Method 1694, Pharmaceuticals and Personal Care Products in Water, Soil, Sediment, and Biosolids by HPLC/MS/MS), for surface water, at least one liter of samples for each sampling site can be collected as grab samples in clean laboratory glass bottles. To prevent alteration, samples are transported chilled (<4-6 °C) into the laboratory. Amber bottles are usually used to prevent photodegradation. After prior filtration through a paper filter, water samples should be frozen at -20 °C until they will be analysed to minimize degradation.

Regarding the solid and semi-solid samples, grab samples can be collected using wide-mouth jars. The amount of wet material should be sufficient to produce a minimum of 10g of solids. Samples should be maintained in the dark at a temperature lower than 6 °C from the time of collection until receipt at the laboratory, then, store at less than -10 °C.

Any contamination during sample collection and transport should be avoided.

The field files should include sample collection procedures, coordinates of the location of the sampling sites or other data to identify the site(s), date and time.

7.3. Monitored compounds

As already mentioned, a prioritization approaches should be applied before the sampling campaign and analysis carry out in order to also consider the suitable extraction and instrumental methods.

According to literature, pharmaceuticals classes including antibiotics, antifungals, hormones, analgesic, antidepressants/anxiolytics, lipid-lowering agents, antidiabetic were recently selected as priority compounds by more monitoring exercises (Chitescu et al., 2015; Carmona et al., 2017; Hollende et al., 2018).

As an example, the target compounds included in the monitoring program within the MONITOX project are listed below (Table 7.1):

Table 7.1. Target pharmaceutical compounds included in the monitoring program 2019-2020 within the MONITOX project

Class	Compounds
Antibiotics	amoxicillin, ciprofloxacin, norfloxacin, flumequine, oxytetracycline, doxycycline, dicloxacillin, erythromycine, cefuroxime, clindamycin
Hormones	drospirenone, ethinyl estradiol
Lipid-lowering agents	clofibrinic acid, provastatin
NSAIDs	piroxicam, ketoprofen, indometacin, carprofen, diclofenac, meclofenamic acid, naproxen
Antiepileptic	Carbamazepine
Antifungal	ketoconazole, fluconazole, clotrimazole, miconazole, enilconazol

7.4. Extraction

Extraction, clean-up and concentration are typically operations in the preparation of environmental samples for LC-MS methods. Extraction is one of the most critical steps due to sample complexity, and different physico-chemical properties (octanol-water partition coefficients, Log Kow and pKa) of the target analytes. Available methods for this purpose are well established for water involving Solid Phase

Extraction (SPE). SPE was developed as an alternative to liquid-liquid extraction (LLE) which requires large amounts of high-purity solvents and is labor intensive. The retention mechanism involve hydrophobic or ionic interactions according the sorbent type and properties.

Each type of SPE cartridges can employ a wide-variety of sorbents such as silica based (ex. C18, C8), hydrophilic lipophilic balanced (HLB), mixed cation exchange (MCX), and mixed anionic exchange (MAX). Selection of the SPE sorbents are based on the physico-chemical properties of both analytes and the SPE phase (pK_a and K_{ow}).

HLB and C18 sorbents are commonly used in multi-target methods to lower the extraction selectivity. SPEs can separate humic and fulvic acids from basic analytes, or separate neutral lipids from charged analytes. pH- adjustment of the samples and the polarity of the eluants are important parameters in the separation mechanism.

Extraction procedure for surface water samples

These methods employs solid-phase extraction (SPE) procedures to extract the target analytes from aqueous samples.

Strata X cartridges, 200 mg / 6 ml, reversed-phase, SPE can be used. Polymer-based sorbent type are suitable for neutral and aromatics analytes. The cartridges are previously preconditioned with 5 ml methanol followed by 5 ml water. Two different SPE procedures were applied in order to ,catch' a wide range of compounds:

- Aliquot of 100 ml of water (pH previously adjusted to 3 with acetic acid) are applied in the cartridge, then, the column are washed with 5 ml water, followed by 5 ml methanol/water 15% (v/v) and then, dried under vacuum for 3 minutes. The analytes are eluted with 6 ml methanol. The eluate are concentrated by evaporation under a high purity nitrogen flow, at 42°C, and redissolved in 25 µl methanol and 225 µl water.
- Aliquot of 100 ml of water are applied in the cartridge, then, the column are washed with 5 ml water, followed by 10 ml methanol/water % (v/v) and dried under vacuum for 3 minutes. The analytes are eluted within three stages, first with 3 ml methanol with 0.5% ammonia, second with 3 ml methanol with

1.5% formic acid and finally with 2 ml methanol. The combined eluate are concentrated by evaporation under a high purity nitrogen flow, at 42 °C, and redissolved in 25 µl methanol and 225 µl water. Samples should be extracted within 24 hours of removal from the freezer.

Extraction procedure for solid samples

The extraction of pharmaceuticals compounds in soil or sediment is more difficult due to the interferences increase. Most of the studies describe the use of pressurized liquid extraction (PLE), ultrasonic-assisted extraction (UAE), solvent-based extraction (LLE) or microwave assisted extraction (MAE) followed by a SPE clean-up.

Solid samples are usually subjected to drying, grinding, homogenization, or blending for particle size reduction.

An optimised UAE method were applied within the MONITOX monitoring program and are described below:

- 5 g of samples are accurately weighed into a 50 ml centrifuge tubes. The analytes are extracted with 20 ml extraction solvent by placing the tube in an ultrasonic bath for 1 h, and finally shaking for another 1 h. The extraction solvent used was methanol: citric acid 0.2M - 50:50 (pH adjustment at 4.5 with sodium hydroxide). The samples are centrifuged 15 min, at 3500 rpm, and the supernatant transferred to a 50 ml flask. Extraction procedure are repeated once, with another 20 ml solvent. The extracts are combined, homogenised, and MQ water is added to 40 ml volume. An aliquot part of extract corresponding at 1 g of sample, diluted with water to a final concentration of 10% organic solvent is subjected to SPE clean-up and concentration using the same methods described for surface water samples.

7.5. Instrumental analysis

Traditionally, the organic pollutants in environmental matrices were analysed by quantitative target screening methods based on LC-MS

(liquid chromatography tandem mass spectrometry) or GC-MS (gas chromatography tandem mass spectrometry) (Maure et al., 2013). Several analytical methods were developed and validated to determine concentration of ng L^{-1} concentrations of pharmaceutical compounds (Ripollés Vidal et al., 2014; Hollender et al., 2019). Low resolution tandem mass spectrometry (MS-MS) that using ion trap (IT) or triple quadrupole (QQQ) analyzers are commonly used in target screening methods (Maure et al., 2013).

Several factors should be considered in developing LC-MS-MS methods: column type and dimensions, mobile phase composition, influence of pH on compounds separation, flow rate, and mass spectrometric parameters for mass spectrometric tandem system (Liigand et al., 2017). Since many of the emerging pharmaceutical contaminants have medium to high polarity, the reversed phase LC is usually preferred, using a combination of weak solvents (i.e. water) and stronger solvents (i.e. methanol, acetonitrile) as mobile phase (Badea et al., 2020). A solvent gradient approach is preferred, due to the advantage of sharper peaks, as well as minimizing the contamination in the LC column by increasing solvent strength (Chitescu et al., 2015). The pH of the mobile phase has a major influence on the LC separation as well as in compounds ionisation. In the ESI (electrospray ionisation interface) volatile mobile phase additives should be used, resulting in slightly acidic (HCOOH , CH_3COOH), slightly alkaline (NH_4OH) or neutral ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) ionisation environment (Liigand et al., 2017). The optimisation of the flow rate can also influence the LS separation. High flow rates are resulting in a decrease of the retention times and thus shortening the LC analysis time, but on the other hand, can also decrease the LC resolution (Badea et al., 2020).

The parameters of the tandem LC-MS/MS analysers among which: the flow of nebulizer and heater gases, Ion Spray voltage, declustering potential, temperature of ions source, collision energy should be optimised during the method development (Kaufmann et al., 2015). ESI in both negative and positive mode are extremely sensitive for polar compounds and is usually applied, sometimes with different mobile phases (Badea et al., 2020).

Selecting the spectrometer scan mode should consider the aim of the project and future application of the developed method. Full MS scan followed by selected ion monitoring (SIM) is widely used for trace analysis due to high selectivity, allowing quantification and confirmation in targeted application (Chitescu et al., 2015).

The evolution of tandem analytical techniques like UHPLC (ultra-high performance liquid chromatography), coupled with accurate mass high resolution mass spectrometry (HRMS) represented by time of flight (TOF) and Orbitrap mass analyzers, has led to development of non-target and ‘suspect’ screening as new analytical approaches that can support environmental monitoring (Hollender et al., 2019; Liigand et al., 2020).

Q Exactive high-performance benchtop quadrupole-Orbitrap LC-MS/MS method is one of the most efficient techniques used for the identification and quantification of selected target compounds as well as non-target screening (Kaufmann, 2020).

The Orbitrap is a mass analyser that dynamically traps ions in an electric field formed between a central spindle electrode and an outer barrel electrode. Ions circulate around the inner electrode with an axial frequency that is directly related to mass-to-charge ratio (m/z), according to equation (1).

$$\omega_{\varphi} = \omega \sqrt{\frac{\left(\frac{Rm}{R}\right)^2 - 1}{2}} \quad (1)$$

where:

ω_{φ} is frequency of angular rotation;

Rm is the characteristic radius;

ω is the frequency of the axial oscillations along the central electrode;

R is the radius of this spiral.

Time domain transients are detected and converted to mass spectra through Fourier transformation (Hecht et al., 2019) (Figure 7.1).

The Orbitrap mass spectrometer typically has a working resolution of ~ 120,000 FWHM (full width at half maximum) at m/z 200. Resolution is scan-time dependent, with longer scan times yielding higher resolution.

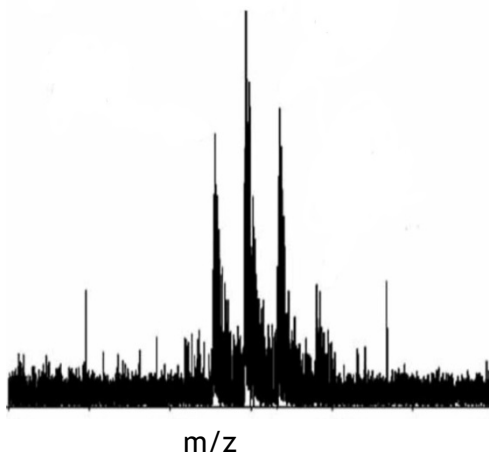
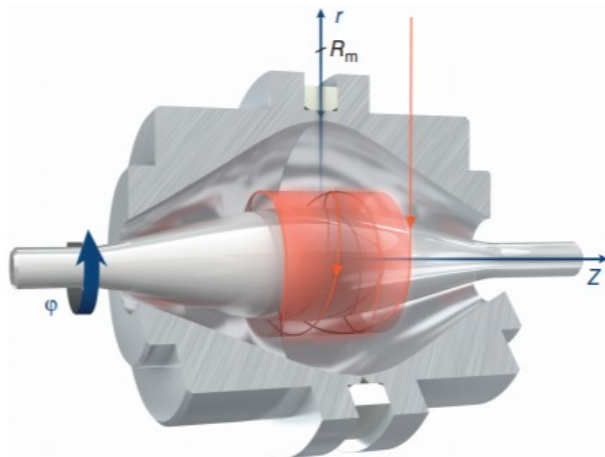


Figure 7.1. Diagram of the Orbitrap mass analyzer showing a spiral trajectory of an ion around the central electrode (according to Hecht et al., 2019)

New Q-Exacte Orbitrap HRMS is a tandem quadrupole-orbitrap system, allowing high resolution full scans and high resolution MS-MS approach, designed for high accuracy measurements and allowing confirmatory analysis (Hecht et al., 2019). The combination of a quadrupole mass filter with an Orbitrap analyzer offers unique and complementary advantages specifically the instrument can select ions

and it is able to fragment them in HCD mode (Higher-energy C-trap dissociation).

For targeted assays, SIM (selected ion monitoring) and targeted MS², or parallel reaction monitoring (PRM) scan mode enable high sensitivity and selectivity. For non-target screening, structural elucidation and identification of analytes can be achieved using data-dependent acquisition (DDA) or data independent acquisition (DIA), (Kaufmann et al., 2015), using spectral library data. Currently, there are different MS-MS spectra data bases, public or private, which allow users to compare the obtained MS-MS spectra with reference spectra for spectral allocation:

- NBS/EPA/NIH Mass Spectral Date Base, G.W.A. National Bureau of Standards Washinton;
- 'Eight peak index' by Mass Spectrometry Data Center of Royal Society, Cambridge;
- Norman MassBank (<https://massbank.eu/MassBank/>);
- Network clusters as mzCloude™ (<https://www.mycloud.com/#/>);
- ReSpect, NIST (The National Institute of Standards and Technology; <http://www.nist.gov/srd/nist1a.cfm>)
- Global Molecular Social Networking (GNPS).

Spectra processing and comparative analysis can be done manually, requiring extensive work and times, or automatically using software as Compound Discoverer™ Trace Finder™, MassHunter or MZmine.

The following parameters were used for analytical method used in the mentioned monitoring study within MONITOX project.

LC parameters

A Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 Series RS pump coupled with a Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 Series TCC-3000RS column compartments and a Thermo Fisher Scientific Ultimate 3000 Series WPS-3000RS autosampler controlled by Chromeleon 7.2 Software (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA and Dionex Softron GmbH Part of Thermo Fisher Scientific, Germany) are used for analysis.

A 15 min gradient over an ultra-performance Accucore U-HPLC

Column C18 (150 x 2.1 mm, 2.6 μm), (Thermo Scientific) was applied. The flow rate was set at 0.3 ml min^{-1} to enable the separation of the selected compounds in the U-HPLC system.

The mobile phase consisted of: eluent A, 100% water containing 160 μl formic acid (pH 3.1); eluent B, 100% methanol containing the same amount of formic acid.

For the hormones, analysis the mobile phase consist of: eluent A, water containing 1 mL/L ammonia 25%;, eluent B, methanol containing 1 mL/L ammonia 25%.

For both mobile phases, the step gradient is set as follow: 0-1 min 100% A; 1-2.5 min linear increase to 40% B; 2,5-10 linear increased to 100% B and hold 3 min; 13-13.2 decreasing to 0% B; 13.2-15 min 100% A.

The column temperature was set at 40°C and the injection volume at 15 μl . HESI (Heated Electrospray) ion source was used for the ionization in negative and positive mode.

MS parameters

Detection of the selected compounds is performed using a Q-Exactive mass spectrometer (Figure 7.2).

A vDIA (variable Data Independent Acquisition) fragmentation approach was used in method development. In the vDIA approach, in addition to full scan screening, a number of subsequent fragmentation events are used to cover the entire range of precursor ions in the same run.

Thus, full scan data in both positive and negative mode was acquired at a resolving power of 70, 000 FWHM at m/z 200. For the compounds of interest, a scan range of m/z 130-1000 can be chosen. In MS-MS confirmatory analysis, precursor ion ranges m/z 95-205, 195-305, 295-405, 395-505 and 495-1005 were consecutively selected. Resulting ions was measured with a resolving power of 35,000 in both positive and negative modes.



Figure 7.2. Q-Exactive Orbitrap high resolution mass spectrometer

The detection is based on calculated exact mass and on retention time of target compounds. Data is evaluated by the Quan/Qual Browser Xcalibur 2.3 (Thermo Fisher) and Thermo ToxID (version 2.1.1., Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA). The mass tolerance window can be set from 5 to 10 ppm.

For compounds identification, the peak assignment and integration can be achieved using both the most abundant precursor ion and fragments ion at the retention time of the precursor compound (Figure 7.3).

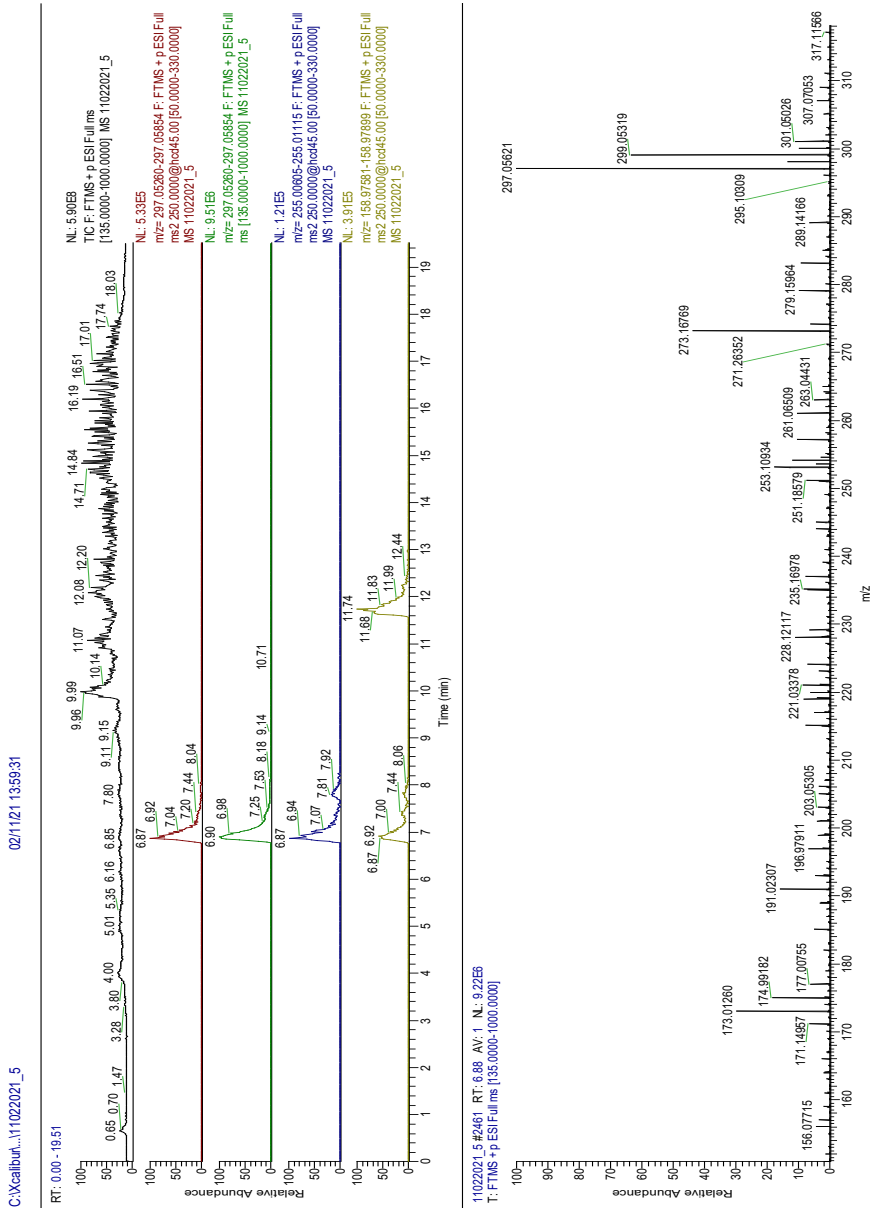


Figure 7.3. The precursor ion m/z 297.0555 (imazalil) and ion fragments m/z 255.00 and 158.97 at the retention time of 6.87 min. The chromatogram was extracted with 5 ppm mass tolerance.

Utilization of vDIA for non-targeted screening improves selectivity and sensitivity of the analysis and allowed the detection in compliance with the current EU guidelines of various compounds in water samples at ppt levels (Figure 7.4).

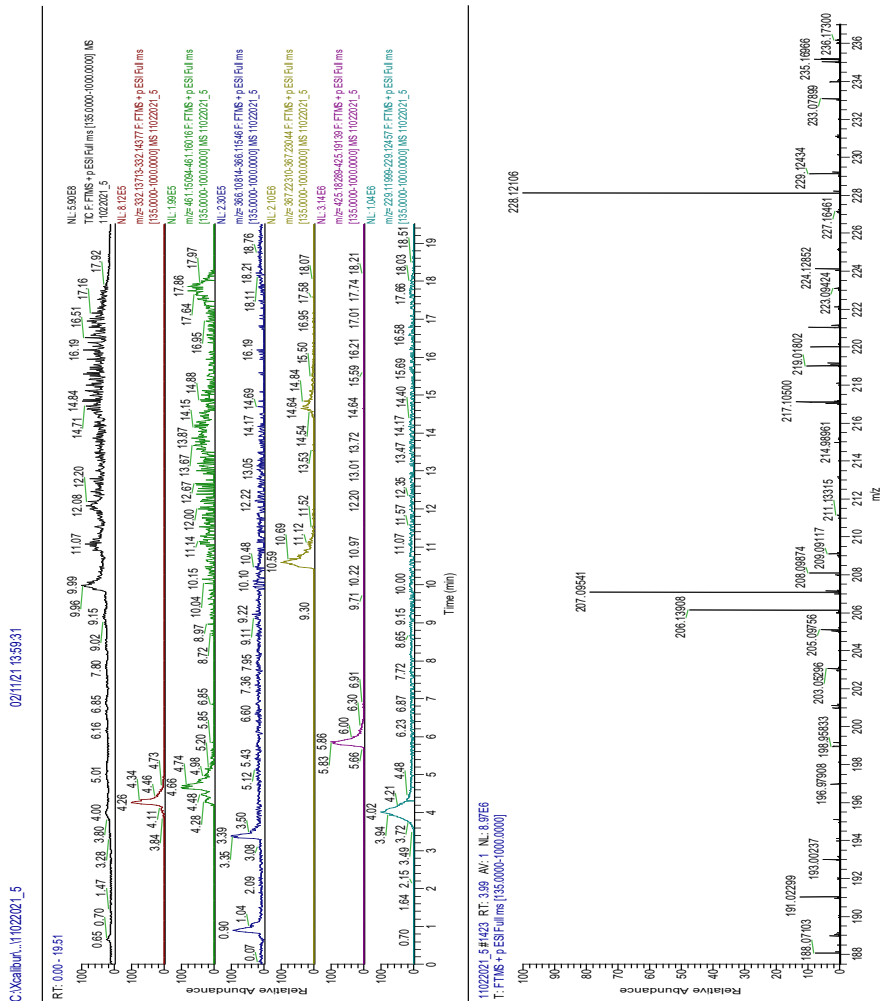


Figure 7.4. Extracted ion chromatograms (exact mass \pm 5 ppm) of water sample from Danube River. From the top to the bottom: TIC (total ions current); m/z 332.14 ciprofloxacin; m/z 461.15 oxytetracyclin; m/z 366.10 amoxicilin; m/z 425.18 drospirenone; m/z 229.12 bisphenol A.

7.6. Quality control. Method validation

Quality control includes analysis of standards (reference materials) whose concentrations are known, double analysis, and recovery tests. Following issues should be addressed:

- Regular checks for contamination by analysing blank and spiked samples;
- Recovery tests using spike samples with analyte concentrations similar to that in the samples to evaluate extraction method efficiency and matrix interferences. Same matrix should be used as sample for the recovery test;
- Analysis of check samples for each group of sample.

Trace analysis is different from macroanalysis, mainly due to source of errors as small amounts of contamination of the samples, reagents but also of the area used for the analysis. Thus, the working environment should be appropriate for that kind of analysis. Certified reference materials should be used in the preparation of calibration curves. Standard stock solutions have to be stored under controlled conditions that will not cause changes in concentration.

Validation of multi-residues analytical method for pharmaceuticals should be done according to the EC guidance documents: SANCO/12571/2013, SANTE/11813/2017 and Commission Decision 657/2002.

Quantitative methods

The accurate mass of the precursor ion or of a characteristic fragment can be used for quantification. For multi-analyte methods it is advisable to use an internal standard IS (a compound added to the sample test or sample extract in a known quantity, in order to check the correct execution of the analytical procedure) (SANCO/12571/2013).

- At least five-point calibration curves in spiked matrix samples are obtained by passing the entire extraction and clean-up method (SPE). Using the Excel interface, for each calibration curves, can be calculated, the equations and the R^2 coefficients. R^2 should range from 0.99-0.999 for a good linearity;
- Repeatability (intra-day precision) is evaluated by analysis of the

same spiked sample at a relevant concentration five times on a single workday. Precision values were defined as the relative standard deviation (RSD);

- The recovery is evaluated by analyzing sample at an appropriate level, spiked before and after extraction and clean-up (sample treatment) with appropriate amounts of mix-standard solutions and calculate by equation (2):

$$\text{Recovery (\%)} = \frac{A_s}{A_{pts}} * 100 \quad (2)$$

where: A_s = the signal (area) corresponding of treated spiked before sample treatment, and

A_{pts} = the signal (area) corresponding of spiked after treatment sample.

Acceptable limits for recovery should be within the range of the mean recovery +/- 2x RSD (SANCO/12571/2013).

- Matrix effect is determinate by analyzing spiked after treatment water sample and Milli Q, ultrapure water sample, at the same level as in recovery tests. The negative result of this equation indicates ions suppression and the positive result ions enhancement;

Matrix effect is calculated by equation (3):

$$\text{Matrix effects(\%)} = \frac{A_{pts} - AMQ_{pts}}{AMQ_{pts}} * 100 \quad (3)$$

where:

AMQ_{pts} is the signal (area) corresponding of spiked after treatment ultrapure water sample, and

A_{pts} is the signal (area) corresponding of spiked after treatment sample.

- The LOD (limit of detection) and LOQ (limit of quantification) can be determined as 3.3 times and 10 times, respectively, the standard deviation of the y-intercept divided by the slope of the calibration curve in matrix sample (ICH Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1), International Conference on Harmonization, 2005);

Screening methods

For screening methods the Commission Decision 2002/657/EC describe as minimum performance characteristic to have a false compliant rate of <5 % (B-error) at the level of interest. For those methods, the validation was based on Regulatory Guidelines for Screening Methods of Residues of Veterinary Medicines, for Community Reference Laboratories Residues, 2010. Level of detection, maximum recovery, CCB, average and standard deviation of mass error (Δ ppm) are the required validation parameters of the screening methods.

Confirmatory analysis

Mass spectrometry, provides retention time, ion/charge ratios m/z and relative abundance data on the target analytes. As a regulatory requirement for targeted analysis, the retention time of the analytes in the extract samples and in the spike samples should correspond to that of the calibration standard with a tolerance of ± 0.2 min (Commission Decision 2002/657/EC; SANCO/12571/2013).

Different types of mass spectrometric techniques and different working modes provide different degrees of selectivity and specificity, which are closely related to the confidence in identification. In high resolution mass spectrometry discussed above, the identification criteria requires ≥ 2 diagnostic ions, including the precursor ion and at least one fragment ion, with a mass accuracy < 5 ppm, in selected ion monitoring acquisition mode (SIM) (SANCO/12571/2013). For other acquisition modes (selected/multiple reaction monitoring SRM/MRM or DIA), ≥ 2 product ions and the precursor ion are required for compounds identification.

Furthermore, in full-scan MS or SIM acquisition modes, the relative intensities or ratios of selective ions or product ions in MS/MS analysis, expressed as a ratio relative to the most intense (product) ion, should correspond to those of the calibration standard at comparable concentrations with a recommended maximum tolerances (Commission Decision 2002/657/EC).

7.7. Bibliography

- Alygizakis, N. A., Oswald, P., Thomaidis, N. S., Schymanski, E. L., Aalizadeh, R., Schulze, T., ... & Slobodnik, J. (2019). NORMAN digital sample freezing platform: a European virtual platform to exchange liquid chromatography high resolution-mass spectrometry data and screen suspects in “digitally frozen” environmental samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 115, 129-137.
- Badea, S. L., Geana, E. I., Niculescu, V. C., & Ionete, R. E. (2020). Recent progresses in analytical GC and LC mass spectrometric based-methods for the detection of emerging chlorinated and brominated contaminants and their transformation products in aquatic environment. *Science of The Total Environment*, 722, 137914.
- Carmona, E., Andreu, V., & Picó, Y. (2017). Multi-residue determination of 47 organic compounds in water, soil, sediment and fish—Turia River as case study. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 146, 117-125.
- Casado, J., Brigden, K., Santillo, D., & Johnston, P. (2019). Screening of pesticides and veterinary drugs in small streams in the European Union by liquid chromatography high resolution mass spectrometry. *Science of the total environment*, 670, 1204-1225.
- Chitescu, C. L., Kaklamanos, G., Nicolau, A. I., & Stolker, A. A. M. L. (2015). High sensitive multiresidue analysis of pharmaceuticals and antifungals in surface water using U-HPLC-Q-Exactive Orbitrap HRMS. Application to the Danube river basin on the Romanian territory. *Science of the total environment*, 532, 501-511.
- Commission Decision 2002/657/EC, implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Off. J. Eur. Comm.* L221:8-36. 2002.
- Commission Implementing Decision (EU) 2015/495 of 20 March 2015 establishing a watch list of substances for Union-wide monitoring in the field of water policy pursuant to Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council
- Community Reference Laboratories Residues (CRLS) 20/1/2010, Guidelines for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines (initial validation and transfer).
https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/cs_vet-med-residues_guideline_validation_screening_en.pdf
- Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the Council of 12 August 2013 amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards

- priority substances in the field of water policy”. O.J. L 226/1, 24 August 2013
- European Commission. Document no. SANTE/11813/2017 Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed.
https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2017-11813.pdf.
- European Commission. Document no. SANCO/11813/2017. Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/SANTE_11813_2017_MainChanges.pdf.
- Hecht, E. S., Scigelova, M., Eliuk, S., & Makarov, A. (2019). Fundamentals and Advances of Orbitrap Mass Spectrometry. *Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications, Theory and Instrumentation*, 1-40.
- Hollender, J., Rothardt, J., Radny, D., Loos, M., Epting, J., Huggenberger, P., ... & Singer, H. (2018). Comprehensive micropollutant screening using LC-HRMS/MS at three riverbank filtration sites to assess natural attenuation and potential implications for human health. *Water research X*, 1, 100007.
- Hollender, J., Van Bavel, B., Dulio, V., Farmen, E., Furtmann, K., Koschorreck, J., ... & Tornero, V. (2019). High resolution mass spectrometry-based non-target screening can support regulatory environmental monitoring and chemicals management. *Environmental Sciences Europe*, 31(1), 1-11.
- ICH. 2005. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). International Conference on Harmonization. Available at: <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/quality-single/article/validation-of-analytical-procedures-text-and-methodology.html>. Accessed: September, 2020.
- Kaufmann, A.; Butcher, P.; Maden, K.; Walker, S.; Widmer, M. Reliability of veterinary drug residue confirmation: High resolution mass spectrometry versus tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*. 2015, 856, 54.
- Li, Y., & Migliaccio, K. (Eds.). (2010). *Water quality concepts, sampling, and analyses*. CRC Press.
- Liigand, J., Laaniste, A., & Kruve, A. (2017). pH effects on electrospray ionization efficiency. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 28(3), 461-469.
- Liigand, J., Wang, T., Kellogg, J., Smedsgaard, J., Cech, N., & Kruve, A. (2020). Quantification for non-targeted LC/MS screening without standard substances. *Scientific reports*, 10(1), 1-10.
- Malchi, T., Maor, Y., Tadmor, G., Shenker, M., & Chefetz, B. (2014). Irrigation of root vegetables with treated wastewater: evaluating uptake of

- pharmaceuticals and the associated human health risks. *Environmental science & technology*, 48(16), 9325-9333.
- Miarov, O., Tal, A., & Avisar, D. (2020). A critical evaluation of comparative regulatory strategies for monitoring pharmaceuticals in recycled wastewater. *Journal of environmental management*, 254, 109794.
- von der Ohe, P. C., Dulio, V., Slobodnik, J., De Deckere, E., Kühne, R., Ebert, R. U., ... & Brack, W. (2011). A new risk assessment approach for the prioritization of 500 classical and emerging organic microcontaminants as potential river basin specific pollutants under the European Water Framework Directive. *Science of the Total Environment*, 409(11), 2064-2077.
- Ripollés Vidal, C., Ibáñez Martínez, M., Sancho Llopis, J. V., López Benet, F. J., & Hernández Hernández, F. (2014). Determination of 17 β -estradiol and 17 α -ethinylestradiol in water at sub-ppt levels by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry.
- Van Donk, E., Peacor, S., Grosser, K., Domis, L.N.D.S., Lüring, M., 2016. Pharmaceuticals may disrupt natural chemical information flows and species interactions in aquatic systems: ideas and perspectives on a hidden global change. In: *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 238. Springer International Publishing, pp. 91-105.
- Vestel, J., Caldwell, D. J., Constantine, L., D'Aco, V. J., Davidson, T., Dolan, D. G., ... & Wilson, P. (2016). Use of acute and chronic ecotoxicity data in environmental risk assessment of pharmaceuticals. *Environmental toxicology and chemistry*, 35(5), 1201-1212.

Chapter 8. Nuclear spectrometry in environmental analysis

Antoaneta Ene

INPOLDE interdisciplinary research network, Dunarea de Jos University of Galati, 47 Domneasca St., Galati, Romania

8.1. Introduction

Precise measurement of radionuclide activity concentrations in environmental samples has recently received a special attention. The necessity resulted from the importance of knowledge the radioactivity levels and the nuclear radiation doses which have serious impact upon life and human health (Ene & Pantelica, 2011a; Moghazy et al., 2021). Taking into consideration the strong penetration power of γ radiations, their measurement by gamma spectrometry in the environmental compartments is considered as significant. Moreover, the measurements of alpha emitting gaseous radionuclides radon and thoron and their progenies are of outmost importance due to the high ionization power of these particles which might provoke pulmonary cancer through inhalation. The chapter outlines the methodology used in the Laboratory of Experimental Nuclear Physics and Dosimetry of INPOLDE research center of UDJG, for high-precision measurements of radionuclide concentrations in environmental samples using gamma-ray and alpha spectrometry (Ene et al., 2019, 2020).

8.2. Gamma ray spectrometry

Gamma-ray spectrometry proved to be a powerful non-destructive analytical tool for the qualitative and quantitative determination of the gamma emitters (Ene & Nat, 1999; Ene et al., 2020). The gamma-ray spectrometry method was permanently improved and major advancements are now aiming at background reduction to obtain better detection limits of most nuclides and accuracy of determinations, without prolonging the measurement (Ene & Pantelica, 2011b).

Natural radioactivity of terrestrial origin is mainly based on three natural radioactive series, called the thorium (Th^{232}), uranium-radium (U^{238}) and actinium (U^{235}) series, as well as the non-series radionuclide K^{40} . The target natural radionuclides are the following: ^{226}Ra (from ^{214}Pb and ^{214}Bi activities, descendants of ^{222}Rn from ^{238}U - ^{226}Ra series), ^{238}U (from ^{234}Th activity), ^{232}Th (from ^{228}Ac , ^{212}Pb and ^{208}Tl activity), ^{235}U , ^{210}Pb (^{238}U - ^{226}Ra series) and ^{40}K . The most often analyzed artificial radionuclides are ^{60}Co , ^{137}Cs and ^{241}Am , but their concentrations are not usually correlated with the natural radioactivity levels (Table 8.1).

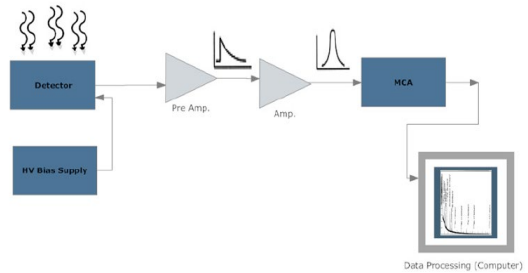
Table 8.1. Radionuclides and calculation of activity concentrations

Radionuclide	Observations/Calculation of activity concentration
^{226}Ra	Average of activities of ^{214}Pb , ^{214}Bi
^{214}Pb	^{238}U - ^{226}Ra series
^{214}Bi	^{238}U - ^{226}Ra series
^{238}U	Activity determined through the measurement of ^{234}Th , considered in radioactive equilibrium with ^{238}U
^{235}U	Natural radionuclide of U
^{210}Pb	^{238}U - ^{226}Ra series
^{232}Th	Average of activities of ^{228}Ac , ^{212}Pb , ^{208}Tl
^{228}Ac	^{232}Th series
^{212}Pb	^{232}Th series
^{208}Tl	It should be taken into account the branching decay of ^{212}Bi from the ^{232}Th series (branching ratio of 0.36)
^{40}K	Natural radionuclide of K
^{137}Cs	Artificial radionuclide
^{60}Co	Artificial radionuclide
^{241}Am	Artificial radionuclide

The low-background high resolution gamma-ray spectrometry (LB-HRGS) technique is applied at Laboratory of experimental nuclear physics and dosimetry, INPOLDE research center, Dunarea de Jos University of Galati, in order to determine the natural and artificial radioactivity of environmental materials.



a)



b)

Figure 8.1. Gamma spectrometer (a) and the block diagram of the spectrometric chain (b) at INPOLDE research center, UDJG.

The gamma spectrometric chain (Figure 8.1) is equipped with an Ortec HPGe detector (2.0 keV resolution at 1332 keV of ^{60}Co , and 30% detection efficiency relative to 3" x 3" NaI (Tl) standard), coupled to a PC based multichannel analyzer. In order to achieve a low-level background counting of environmental samples, a lead shield of 10 cm thickness, coated with foils of 1 mm Sn and 1.5 mm Cu thickness, should be used to reduce the ambient background radiation in the energy spectrum ranging from 0 to 2000 keV (Ene & Pantelica, 2011b).

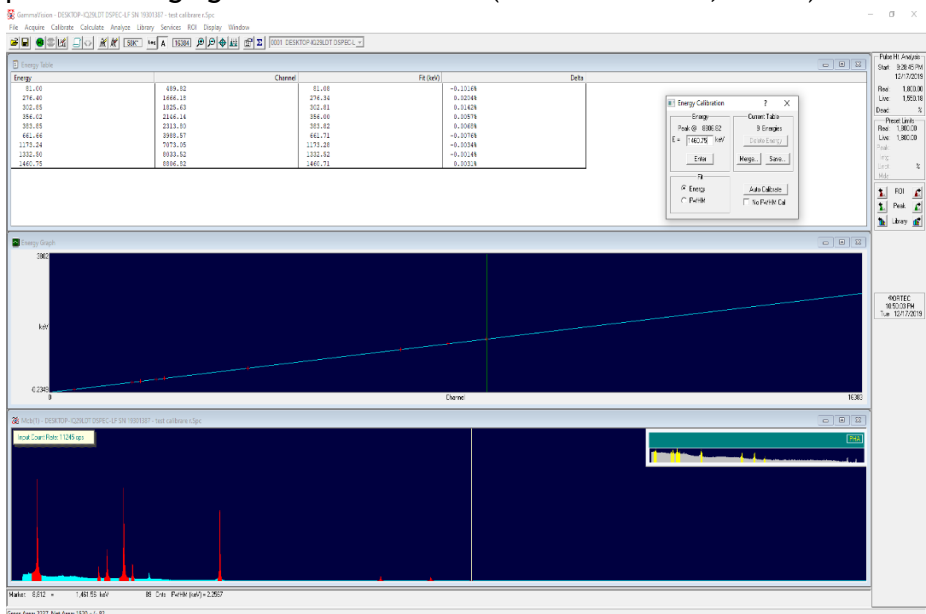


Figure 8.2. Calibration line of ORTEC gamma spectrometric chain

The dried and homogenized solid environmental samples are measured in Sarpagan or Marinelli beakers placed on the detector end cap, for counting times > 5 h, after 3-4 weeks of keeping sealed in the measuring box, in order to establish the radioactive equilibrium between ^{226}Ra and its gaseous radioactive descendant ^{222}Rn (radon). The system has to be calibrated for the detection efficiency using relatively high-activity ^{152}Eu , ^{137}Cs , and ^{241}Am volume standard sources, as well as IAEA reference materials of similar density and volume with those of measured sample, placed into identical beakers (the same measuring geometry). Typical calibration line is presented in Figure 8.2.

An example of gamma spectrum is presented in Figure 8.3 for a soil sample collected in the vicinity of iron and steel industry in Galati, SE Romania (Ene et al., 2020). It indicates the presence of the peaks resulted from radionuclides from natural series, the non-series radionuclide ^{40}K , and the artificial radionuclide ^{137}Cs in soils. The elemental concentrations of U and Th are calculated taking into account that 1 g natural U yields 12352.5 Bq ^{238}U and 568.8 Bq ^{235}U , 1 g natural Th yields 4057.2 Bq ^{232}Th .

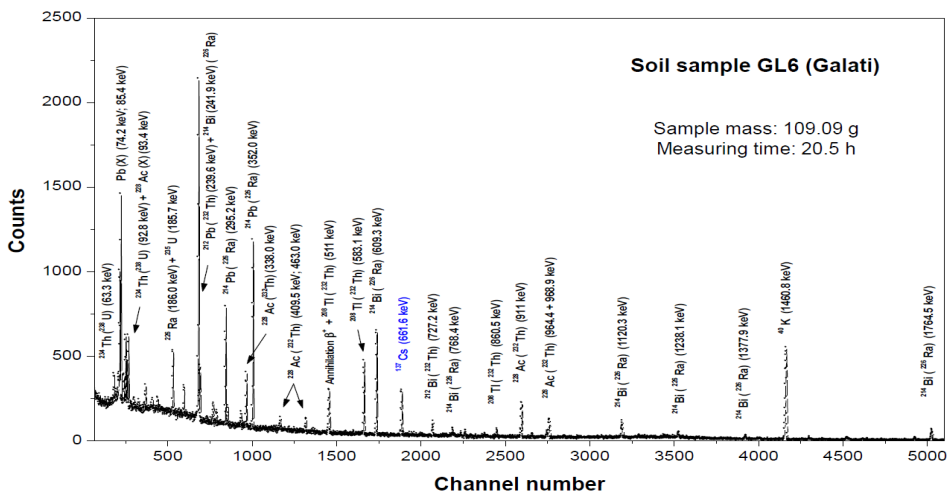


Figure 8.3. Typical gamma-rays spectrum of a soil sample; energy of emitted gamma rays is labeled on each radionuclide photopeak.

The radon-thoron monitor based on active measurements of progenies' concentrations by alpha spectrometry (Figure 8.4), has two regimes for measuring the radon concentration by delimiting regions of interest (ROI) (Ene et al., 2019):

- **Slow**, which takes into account not only the decay of ^{218}Po , but also of ^{214}Po , and
- **Fast** which only takes into account the decay of ^{218}Po .

The advantage of the fast recording mode is a fast reflection of the concentration fluctuations, while the slow mode has a 2 times higher sensitivity, which, in turn, reduces the margin of statistical error of measurement, depending on the number of decays detected (Ene & Vodarici, 2020). Typical analysis report of radon and thoron concentrations and the recorded values of temperature, humidity and indoor air pressure is presented in Figure 8.5.

8.3. Alpha spectrometry determinations of radon and thoron

The International Commission on Radiological Protection (ICRP) and the WHO have initiated measures to reduce the exposure of the population and have prescribed limits on the radon concentrations allowed in homes and public spaces.

Radon and thoron measurement techniques were developed in order to simultaneously determine their concentrations in indoor air, soil and water, along with physical parameters (temperature, pressure, humidity) (SARAD, 2017).

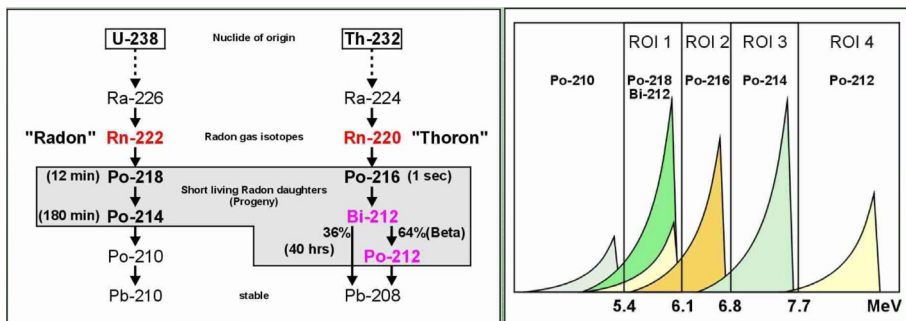


Figure 8.4. Delimitation of regions of interest (ROIs) in alpha spectrometry for the analysis of radon and thoron (www.sarad.de)

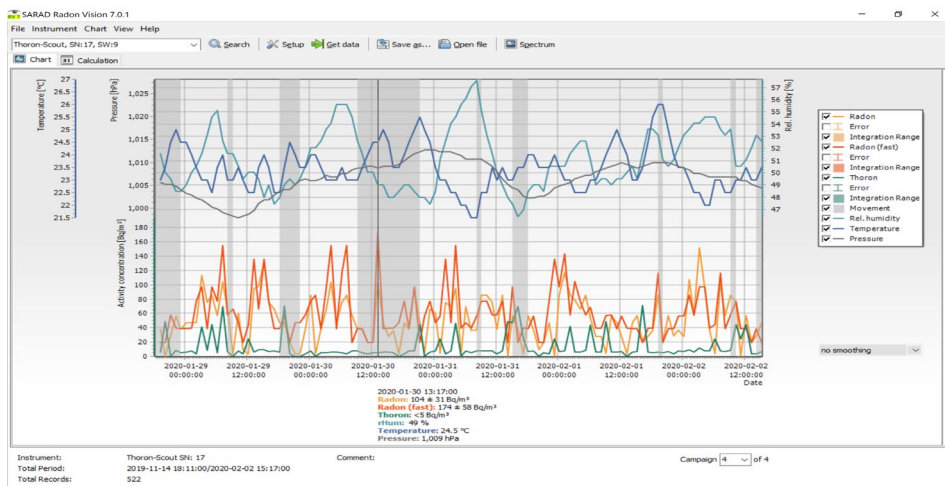


Figure 8.5. Typical analysis report of radon and thoron concentrations

8.4. Bibliography

- Ene, A., Nat, A., 1999, Indrumar de laborator de fizica atomica si nucleara, Universitatea Dunarea de Jos, Galati, 154 pag.
- Ene, A., Pantelica, A., 2011a, Tehnici analitice atomice și nucleare utilizate în monitorizarea mediului, Galati University Press, 100 pag.
- Ene, A., Pantelica A., 2011b, Characterization of metallurgical slags using low-level gamma-ray spectrometry and neutron activation analysis, *Rom. Journal Phys.* 56 (7-8), 1011-1018.
- Ene A., Pintilie V., Pantelica A., 2019, Assessment of radon, thoron and their descendants in selected indoor environments in Romania, International Symposium on Natural Radiation Sources - Challenges, Approaches and Opportunities, 21-24 May 2019, Bucharest, Romania.
- Ene A., Vodarici L., 2020, Active measurement methods of indoor radon and thoron in selected spaces in Galati town, MONITOX International Conference “Environmental Toxicants in Freshwater and Marine Ecosystems in the Black Sea Basin”, Kavala, Greece, September 8th-11th, 2020, p.34, S1.17, IL.B.6.
- Ene A., Pantelica A., Frontasyeva M., Sloata F., 2020, Low-background high resolution gamma-ray spectrometry applied for assessment of natural and artificial radioactivity of industrial soils in Danube River region (SE Romania) and health risk, International Conference ”Environmental Challenges in the Black Sea Basin: Impact on Human Health”, Galati, Romania, 23-26.09.2020.
- Moghazy N.M., El-Tohamy A.M., Fawzy M. M., Awad H.A., Zakaly H.M.H., Issa S.A.M., Ene A., 2021, Natural Radioactivity, Radiological Hazard and Petrographical Studies on Aswan Granites Used as Building Materials in Egypt, *Applied Sciences* 11 (14), 6471.
- SARAD, 2017, Radon basics, Application note AN_007.

CUPRINS

Capitolul 1. Metode de monitorizare a urmelor de substanțe toxice în mediu în bazinul Mării Negre	92
Antoaneta Ene	
Capitolul 2. Metode spectroscopice UV-VIZ pentru analize de mediu.....	96
Liliana Teodorof, Adrian Burada, Cristina Despina, Seceleanu-Odor Daniela, Antoaneta Ene	
Capitolul 3. Spectroscopia de absorbție atomică pentru analiza metalelor.....	110
Oleg Bogdevich, Elena Culighin, Antoaneta Ene	
Capitolul 4. Spectrometria de emisie atomică cu plasmă cuplată inductiv (ICP-OES) pentru analize de mediu	122
Victor Ciornea, Elena Zubcov, Nina Bagrin, Petru Ciorbă, Antoaneta Ene, Natalia Zubcov	
Capitolul 5. Spectrometria de masă cu plasmă cuplată inductiv (ICP-MS) pentru analize de mediu.....	130
Liliana Teodorof, Adrian Burada, Cristina Despina, Antoaneta Ene, Seceleanu-Odor Daniela	
Capitolul 6. Cromatografia gazoasă cu detector de masă (GC-MS) pentru analize de mediu.....	142
Victor Ciornea, Anastasia Ivanova, Elena Zubcov, Antoaneta Ene	
Capitolul 7. Metode bazate pe spectrometria de masă de înaltă rezoluție pentru monitorizarea reziduurilor farmaceutice în apă, sol și sedimente.....	150
Carmen Lidia Chițescu, Antoaneta Ene	
Capitolul 8. Spectrometria nucleară în analize de mediu.....	170
Antoaneta Ene	

Capitolul 1. Metode de monitorizare a urmelor de substanțe toxice în mediu în bazinul Mării Negre

Antoaneta Ene

INPOLDE interdisciplinary research network, Dunarea de Jos University of Galati, 47 Domneasca Street, 800008 Galati, Romania, aene@ugal.ro

1.1. Introducere

Migrația substanțelor chimice toxice (TOX) cu impact mare asupra sănătății umane în principalele ecosisteme acvatice și zone protejate din SE România, Republica Moldova și Macedonia de Est și Tracia, Grecia, afectează un număr mare de locuitori ai bazinului Mării Negre (BSB) și o problemă foarte importantă pentru populația acestui bazin extins este identificarea surselor de TOX în ecosistemele acvatice și apele subterane. Este nevoie de date de monitorizare de înaltă calitate pentru BSB și Uniunea Europeană în ansamblu, împreună cu date ecotoxicologice și un studiu aprofundat al riscurilor efectelor TOX asupra mediului (Ene et al., 2017, 2021).

Principala amenințare în regiune este imensa deteriorare a mediului natural indusă de activitățile umane, ceea ce determină o preocupare imperativă pentru supraviețuirea noastră colectivă. Poluarea nu are frontiere / nu se oprește la frontierele naționale. Studiul aprofundat al proceselor care au loc în bazinele hidrografice mari, interconectate, și evaluarea expunerii oamenilor la TOX pot fi realizate numai în parteneriat, în rețele transnaționale, prin cooperare bazată pe cunoștințe, schimb de bune practici și cercetări interdisciplinare.

1.2. Strategia MONITOX

Punctul de plecare al proiectului a fost problemele presente semnalate la nivel european și provocările comune din regiune identificate în comun prin analiza legislației și a directivelor europene pentru evaluarea calității mediului, precum și a convențiilor

internaționale privind substanțele chimice și deșeurile toxice (Ene et al., 2017, 2020).

Strategia rețelei internaționale MONITOX este prezentată în Figura 1.1., privind monitorizarea a șase clase de substanțe toxice în șapte compartimente de mediu interconectate (apă de suprafață, ape subterane, sedimente, soluri, roci de bază și biotă) din bazinul Mării Negre și regiunile de frontieră, împreună cu opt tipuri de investigații complementare (geomorfologice, geologice/ mineralogice, hidrogeologice, fizice, chimice, biologice, microbiologice, ecotoxicologice), cartografierea poluării cu BSB, modelarea proceselor de mediu și evaluarea riscurilor (Ene et al., 2021).

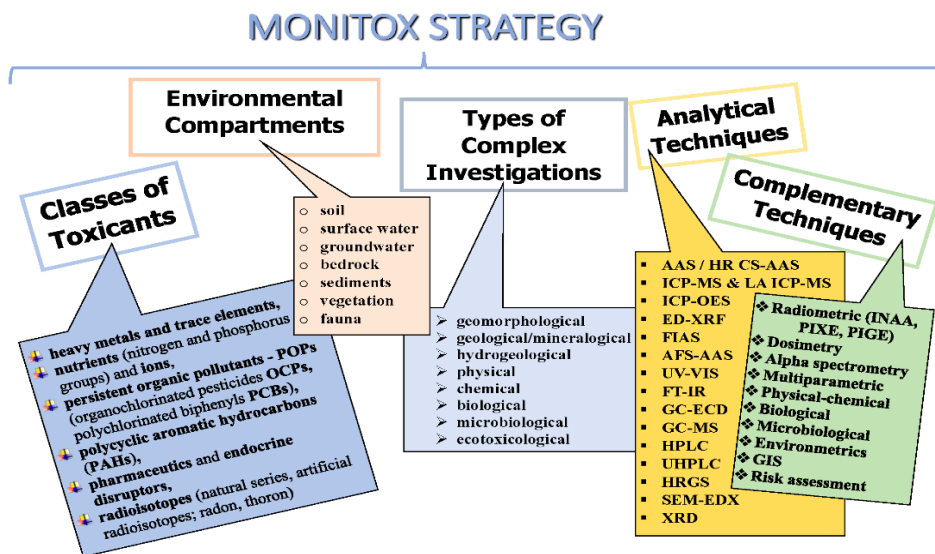


Figure 1.1. Strategia de investigare a rețelei internaționale MONITOX (Ene et al., 2021)

Unul dintre obiectivele proiectului este integrarea măsurătorilor chimice, radioactive, biologice și microbiologice, pentru a stabili pentru prima dată clasele de calitate a apelor de suprafață pe baza unui indice de calitate ecotoxicologic integrat, cu impact important asupra sănătății umane (Ene et al., 2019a, 2020).

Metodele analitice utilizate în complementaritate în instituțiile partener din România, Moldova, Grecia și cele colaboratoare pentru

determinarea elementelor și izotopilor în probe de mediu (aproximativ 50 de elemente chimice), sunt următoarele (Ene și colab., 2017, 2019a,b, 2021): spectrometrie de absorbție atomică (AAS), inclusiv tehnica cu sursă continuă de înaltă rezoluție (HR CS-AAS); spectrometrie de masă cu plasmă cuplată inductiv (ICP-MS) și ablație laser (LA) ICP-MS; spectrometrie de emisie optică cu plasmă cuplată inductiv (ICP-OES); spectrometria radiațiilor gama de înaltă rezoluție (HRGS). Mercurul este analizat prin injecție în flux pentru spectrometrie atomică (FIAS) și o combinație dintre fluorescență și spectrometrie de absorbție atomică (AFS-AAS). Acuratețea și precizia rezultatelor sunt evaluate prin măsurarea probelor de referință certificate cu matrice similară și organizarea mai multor exerciții de comparație între laboratoarele de cercetare (Ene & Pantelica, 2011; Ene, 2015).

Poluanții organici persistenti (OCP, PCB) și hidrocarburile aromatice policiclice (HAP) sunt cuantificate utilizând tehnici de cromatografie în gaze (GC-MS, GC-ECD) și cromatografie lichidă (HPLC). Mai mult, poluanții petrolieri (hidrocarburi petroliere totale) din mediul marin sunt investigați prin FT-IR (Ene, 2015).

Spectroscopia moleculară (UV-VIS) este utilizată pentru analiza nutrienților și a ionilor în probele de apă, în legătură cu investigațiile multiparametrice și fizico-chimice (Ene, 2015).

O noutate absolută a investigațiilor la nivelul bazinului maritim este adaptarea și aplicarea tehnicii Orbitrap UHPLC-MS pentru analiza substanțelor farmaceutice și a perturbatorilor endocrini în apele de suprafață (Dunăre, Marea Neagră).

O mare atenție trebuie acordată analizei izotopilor radioactivi prin tehnici spectrometrice nucleare (NS) (Ene & Pantelica, 2011) - spectrometrie gamma de înaltă rezoluție (HRGS) și spectrometrie alfa pentru radioizotopii gazoși ai radonului (^{222}Rn și ^{220}Rn) și a descendenților acestora.

În mai 2019, guvernele au modificat Convenția de la Basel pentru a include deșeurile de plastic într-un cadru legal obligatoriu, care va face comerțul global cu deșeuri de plastic mai transparent și mai bine reglementat. Deși microplasticele nu au fost incluse în lista propusă inițial de contaminanți monitorizați MONITOX, în cadrul proiectului s-au efectuat cercetări FT-IR privind identificarea acestor materiale

polimerice în produse cosmetice, de îngrijire personală și de uz zilnic (Ene și colab., 2019a, 2020).

Datorită capacității limitate a ghidului, următoarele șapte capitole acordă o atenție specială următoarelor tehnici instrumentale utilizate pentru investigarea precisă a nutrienților, oligoelementelor, poluanților organici persistenți, farmaceutice, perturbatori endocrini și radioizotopi în diferite compartimente de mediu: UV-VIS, AAS, ICP-OES, ICP-MS, GC-MS, UHPLC-MS, NS.

1.3. Bibliografie

- Ene A., Pantelica A., 2011, Tehnici analitice atomice și nucleare utilizate în monitorizarea mediului, Galati University Press, 100 pp.
- Ene A. (Ed.), 2015, Instrumental Techniques for Environmental Investigations: Methodological Guide = Tehnici Instrumentale pentru Investigații de Mediu: Ghid Metodologic, Ed. Tehnopress, Iasi, 2015, ISBN 978-606-687-233-1, 220 pp.
- Ene A., Zubcov E., Spanos T., Bogdevich O., Teodorof L., 2017, Application form no. 027, 1st Call JOP Black Sea Basin 2014-2020, May 2017.
- Ene A., Zubcov E., Spanos T., Bogdevich O., Teodorof L., 2019a, Interdisciplinary Cooperation for Ecological Monitoring in the Black Sea Basin, MONITOX International Symposium Deltas and Wetlands, September 15-17, 2019, Tulcea, Romania, p. 17-18.
- Ene A., Pantelică A., Stihă C., Frontasyeva M., Bogdevich O., Culighin E. et al., 2019b, Development of analysis methodology using Proton Induced X-ray Emission (PIXE) as a complementary technique to determine trace elements in environmental matrices, Annals Dunarea de Jos Univ. Galati, Fasc. II. Math Phys Theor Mech 42(2) (2019) 117-125.
- Ene A., Zubcov E., Spanos T., Bogdevich O., Teodorof L., 2020, MONITOX international network for monitoring of toxicants in the Black Sea Basin, International Conference "Environmental Toxicants in Freshwater and Marine Ecosystems in the Black Sea Basin", September 8-11, 2020, Kavala, Greece, p.16.
- Ene A., Zubcov E., Spanos T., Bogdevich O., Teodorof L., 2021, MONITOX international network for monitoring of environmental toxicants and risk assessment in the Black Sea Basin: research and interdisciplinary cooperation dimensions, 10th International Conference of Zoologists, Chisinau, Republic of Moldova, 15-17 September 2021.

Capitolul 2. Metode spectroscopice UV-VIZ pentru analize de mediu

Liliana Teodorof¹, Adrian Burada¹, Cristina Despina¹,
Seceleanu-Odor Daniela¹, Antoaneta Ene²

¹Institutul Național Delta Dunării, Strada Babadag nr.135, Tulcea, Romania

²Centrul de cercetare interdisciplinar INPOLDE, Universitatea Dunarea de Jos din Galați, Str. Domnească nr. 111, Galați, România

2.1. Introducere

Spectroscopia de absorbție în domeniul Ultraviolet și Vizibil se bazează pe măsurarea atenuării unei radiații luminoase după ce trece printr-o probă. Măsurătorile absorbției pot avea loc la o singură lungime de undă sau mai multe lungimi de undă.

2.2. Principii teoretice

2.2.1. Interacția dintre radiație și materie

După cum știm, lumina este o mică parte a unui fenomen numit radiație electromagnetică și are proprietăți de unde, ce constau din câmpul magnetic și electric care oscilează împreună, perpendicular unul pe celălalt (figura 2.1).

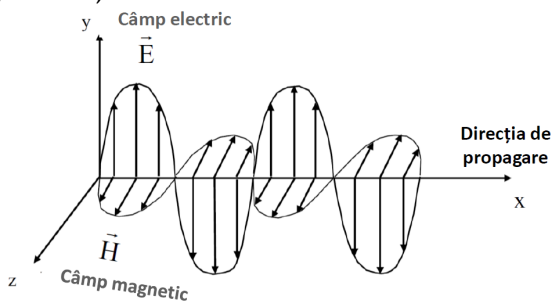


Figura 2.1. Unda electromagnetică alcătuită din câmpul electric și magnetic

Putem defini energia (E), exprimată în J și asociată radiației electromagnetice, ca frecvența radiației, exprimată în Herti (1Hz=1s⁻¹), multiplicată cu constanta lui Planck ($h=6.62 \cdot 10^{-34}$ J*s).

Frecvența radiației electromagnetice, este o măsură a vitezei luminii ($c=3 \cdot 10^8$ m/s) raportată la lungimea de undă (λ), exprimată în metri.

Procesele care au loc la interacția radiației cu lumina sunt: reflexia, împrăștierea, absorbția, fluorescența, fosforescența, reacție fotochimică. În general, energia totală (energia potențială) este suma energiei electronice, energiei de vibrație și energiei de rotație.

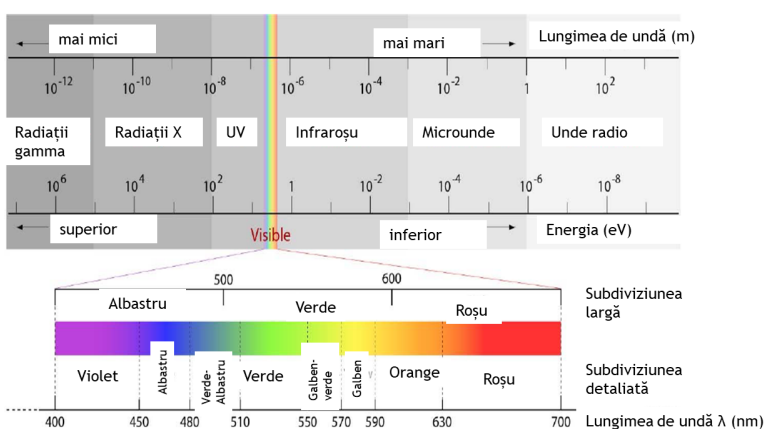


Figura 2.2. Spectrul electromagnetic cu subdiviziunile domeniului vizibil (Verhoeven, 2017)

În figura 2.2 este reprezentat un spectru alcătuit din diverse componente ale luminii. În acest spectru, fiecare culoare este specifică unei anumite lungimi de undă (de exemplu culoarea roșie pentru 660 nm, culoarea verde pentru 520 nm). În general, un spectru este reprezentat de distribuția energiei radiante, de la 390 nm la 780 nm (De Caro, 2015).

2.2.2. Legea Bouguer - Lambert - Beer

Când o probă este supusă unei radiații monocromatice, ceea ce înseamnă o posibilă tranziție electronică a moleculei, o parte din energie va fi absorbită de moleculă, iar electronii vor trece la un nivel

superior de energie la o anumită lungime de undă a radiației absorbite de moleculă.

Este știut faptul că atunci când lumina parcurge sau este reflectată de o probă, cantitatea de lumină absorbită este dată de diferența dintre radiația incidentă (I_0) și radiația transmisă (I) (figura 2.3). Cantitatea de lumină absorbită poate fi exprimată prin transmitanță (T) sau prin absorbanță (A). În general, valorile absorbantei sunt direct proporționale cu grosimea stratului parcurs de radiație (dependență lineară).

Deci, putem defini transmitanța ca fiind raportul dintre intensitatea radiației transmise (I_t), împărțită la intensitatea radiației incidente (I_0). Transmitanța poate fi raportată și procentual, prin înmulțirea cu 100.

Astfel,

$$T = \frac{I_t}{I_0} \text{ sau } T(\%) = \frac{I_t}{I_0} \cdot 100 \quad (1)$$

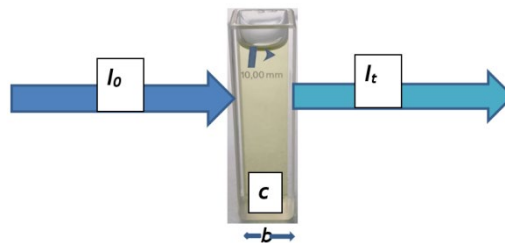


Figura 2.3. Reprezentarea schematică a atenuării luminii datorită absorbției, când trece printr-un mediu absorbant

Absorbanța, numită și extincție, A , poate fi calculată ca minus logaritmul zecimal al transmitanței:

$$A = E = -\lg T = -\lg \left(\frac{I_t}{I_0} \right) = \lg \left(\frac{I_0}{I_t} \right) \quad (2)$$

Relația dintre transmitanță, T , și grosimea stratului parcurs de radiație, b , a unei probe, poate fi descrisă prin legea Bouguer-Lambert:

$$I_t(b) = I_0 \cdot e^{-\alpha(\lambda) \cdot b} \Leftrightarrow T = \frac{I_t(b)}{I_0} = e^{-\alpha(\lambda) \cdot b} \quad (3)$$

unde I_0 este intensitatea radiației incidente, I_t este intensitatea radiației transmise, e este baza logaritmului natural, $\alpha(\lambda)$ este coeficientul de absorbție care caracterizează substanța, iar b este grosimea stratului parcurs, exprimată în centimetri.

Când analizăm soluții absorbante, legea Beer-Bouguer-Lambert este folosită pentru a exprima gradul de absorbție, iar cantitatea de lumină absorbită de o probă este direct proporțională cu concentrația speciilor absorbante din probă:

$$A = \varepsilon * b * c \quad (4)$$

Deci, absorbanta este definită ca produsul absorbitivității molare, (ε), grosimea stratului parcurs (b , exprimat în centimetri) și concentrația (c , exprimată în general în $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$).

Absorbanta și transmitanța sunt adimensionale.

După definirea absorbantei și transmitanței, putem defini un spectru de absorbție, care reprezintă dependența semnalului de lungimea de undă. Spectrele pot fi reprezentate în mai multe moduri: $A = f(\lambda)$, $T = f(\lambda)$, $\log A = f(\lambda)$, $\varepsilon = f(\lambda)$, $\log \varepsilon = f(\lambda)$. Cele mai folosite sunt cele care reprezintă dependența absorbantei de lungimea de undă (Nașcu et al.,2006). Fiecare analit chimic are un spectru de absorbție caracteristic, cu unul sau mai multe maxime de absorbție la o lungime de undă fixă (λ_{max}). Identificarea calitativă a unui analit chimic poate fi făcută după numărul maximelor de absorbție și forma picurilor, iar identificarea cantitativă este dată de înălțimea maximă a picului și de aria lui (Nașcu et al.,2006).

Pentru a explica identificarea calitativă, în figura 2.4 este reprezentat spectrul de absorbție ale azotului din azotiți din apele de suprafață, pentru 5 concentrații, într-o reprezentare $A = f(\lambda)$, la lungimea de undă de 540 nm (Nașcu et al.,2006). Cele 5 valori ale absorbantei sunt corespunzătoare celor 5 concentrații, obținându-se o curba de calibrare, ce trece prin origine și reprezintă aplicația legii Beer-Bouguer-Lambert. Conform acestei legi, cantitatea de lumină absorbită este direct proporțională cu concentrația analitului de analizat din probă, iar prin extrapolarea curbei de etalonare, cunoscând absorbanta, putem determina concentrația necunoscută.

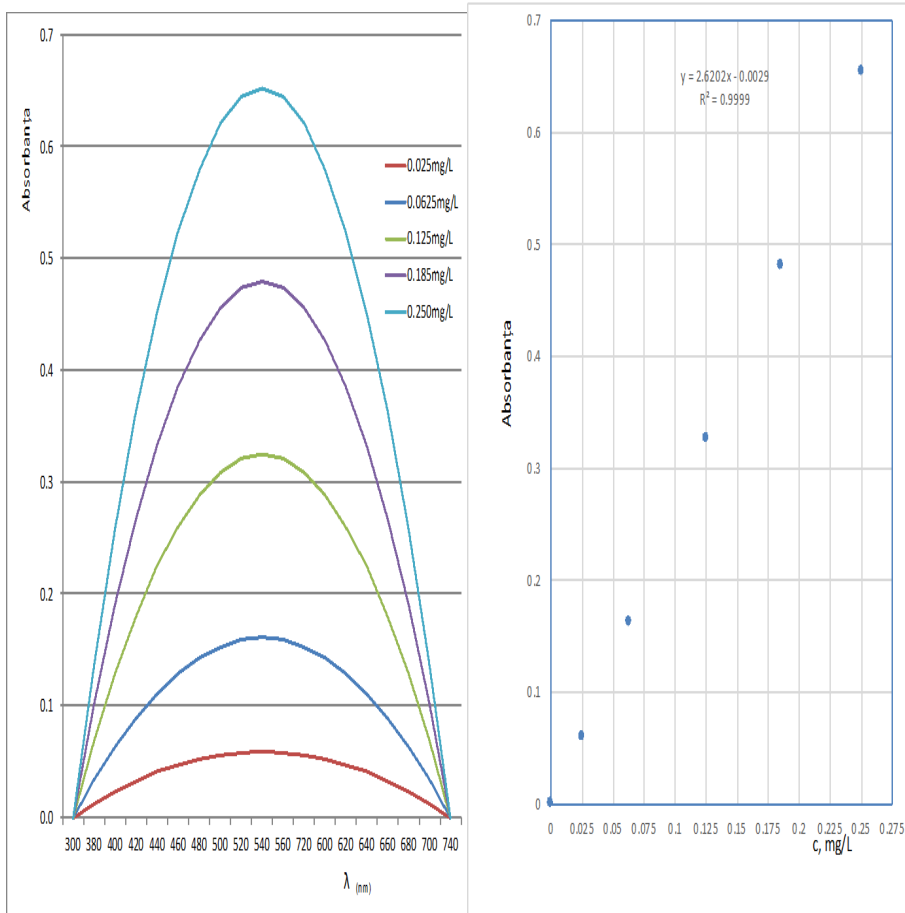


Figura 2.4. Familia picurilor de absorbție (în partea stângă) și ilustrarea legii Beer-Bouguer-Lambert sau curba de calibrare (în partea dreaptă), pentru azotul din azotiți, la 540 nm

2.2.3. Deviații de la legea Bouguer - Beer-Lambert

În concordanță cu legea Bouguer - Beer-Lambert ($A = \epsilon * b * c$), absorbanta unei probe specifice este direct proporțională cu concentrația, (c), cu lungimea drumului parcurs, (b). Relația trebuie să fie o linie dreaptă, care trece prin origine și cu panta egală cu $\epsilon * b$.

Dar, în diverse circumstanțe, această dependență nu este liniară și deci putem vorbi de deviații de la legea Bouguer - Lambert - Beer Lambert (pozitive sau negative, figura 2.5), care pot fi clasificate în 3 categorii (Mehta, 2012):

- **Deviațiile Reale**, care sunt deviații fundamentale datorită limitelor legii.
- **Deviații Chimice**, care sunt deviații observate atunci când radiația și particulele care absorb sunt cuplate, sau reacționează cu solventul producând astfel compuși cu spectre de absorbție diferite de spectrul analitului de interes.
- **Deviații Instrumentale:** au loc în funcție de modul în care se măsoară absorbanțele (radiația nu este monocromatică, radiații pierdute prin împrăștiere, sau reflexie prin instrument, folosirea celulelor necorespunzătoare) (Harris, 2007, Mehta 2012).

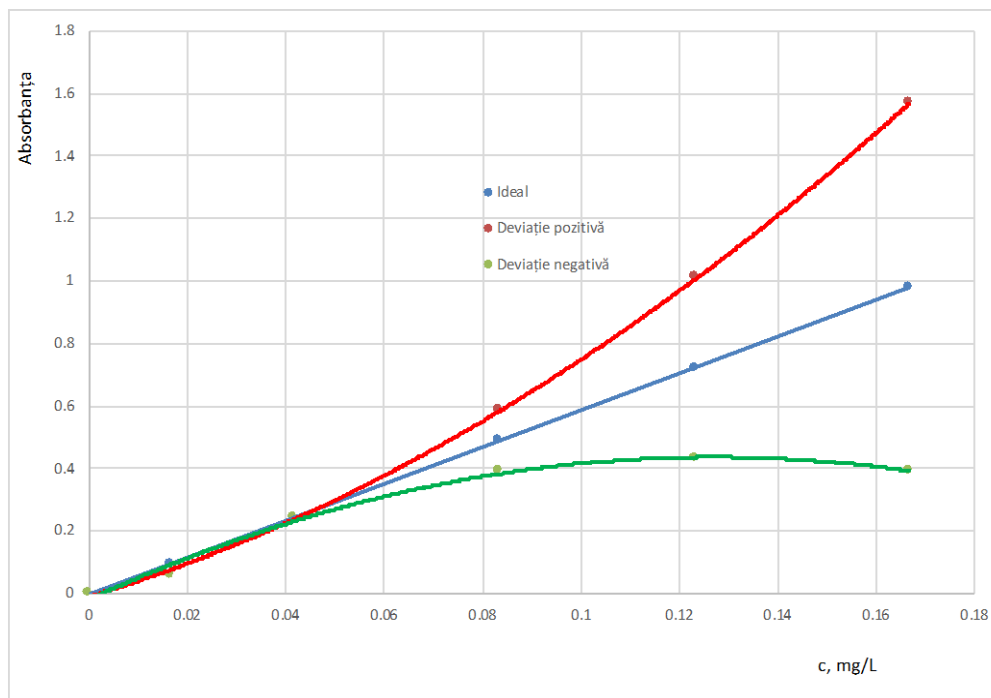


Figura 2.5. Curbele de calibrare arătând forma ideală și deviațiile pozitive și negative de la legea Bouguer Lambert Beer

2.3. Instrumentația UV-VIZ

Instrumentele UV - VIZ folosite pentru măsurarea absorbției în regiunea ultraviolet sau vizibil, sunt alcătuite din patru componente:

- a) O sursă adecvată de lumină care este constituită dintr-o lampă de gaz (xenon), sau o combinație de două lămpi, lămpi diferite tungsten/deuteriu;
- b) Compartimentul probei: pentru probele lichide se folosesc cuve, fabricate din quartz (pentru UVVIZ), sticlă borosilică (doar pentru VIS), plastic acrilic (doar pentru VIZ), iar pentru probele solide, acestea pot fi supuse radiațiilor la lungimile de undă de interes;
- c) Elementul de dispersie necesar pentru distribuția luminii în diverse lungimi de undă poate fi o prismă de quartz au o rețea de difracție;
- d) Detectorul care poate fi un multiplicator sau o rețea multicanal, sau un dispozitiv cuplat de încărcare (De Caro, 2015).

În analizele de mediu se folosesc două tipuri de instrumente: monofascicul și dublu fascicul.

În spectrofotometrele monofascicul, radiația monocromatică trece direct prin cuva cu probă și apoi ajunge în detector (figura 2.6.a). Este dificilă utilizarea spectrofotometrelor monofascicul, deoarece martorul și referința trebuie plasate alternativ în fața radiației. Pentru măsurătorile la mai multe lungimi de undă, martorul trebuie măsurat la fiecare lungime de undă. Absorbanta nu poate fi măsurată ca o funcție de timp (de exemplu în măsurătorile cinetice) (Kenkel, 2007).

La spectrofotometrele dublu fascicul, lumina provenită de la sursă, după ce trece prin monocromator, este împărțită în două radiații: una pentru soluția probei și una pentru blank (sau soluția de referință). Împărțirea radiației originale poate fi făcută în două moduri, deoarece există două tipuri de instrumente dublu fascicul: un instrument dublu fascicul în spațiu, în care cele 2 raze se formează în spațiu de o oglindă în formă de V, numită divizor de fascicul luminos (figura 2.6.b) și instrumentul dublu fascicul în timp, unde radiația este trimisă alternativ la cuvele cu martorul și proba înainte de a ajunge la fotodetector.

(figura 2.6.c). Aceste instrumente sunt folosite în determinările calitative unde este necesar întreg spectrul și măsurătorile devin independente de variația intensitatea și compoziția spectrală a sursei de radiație (Skook et al, 2007).

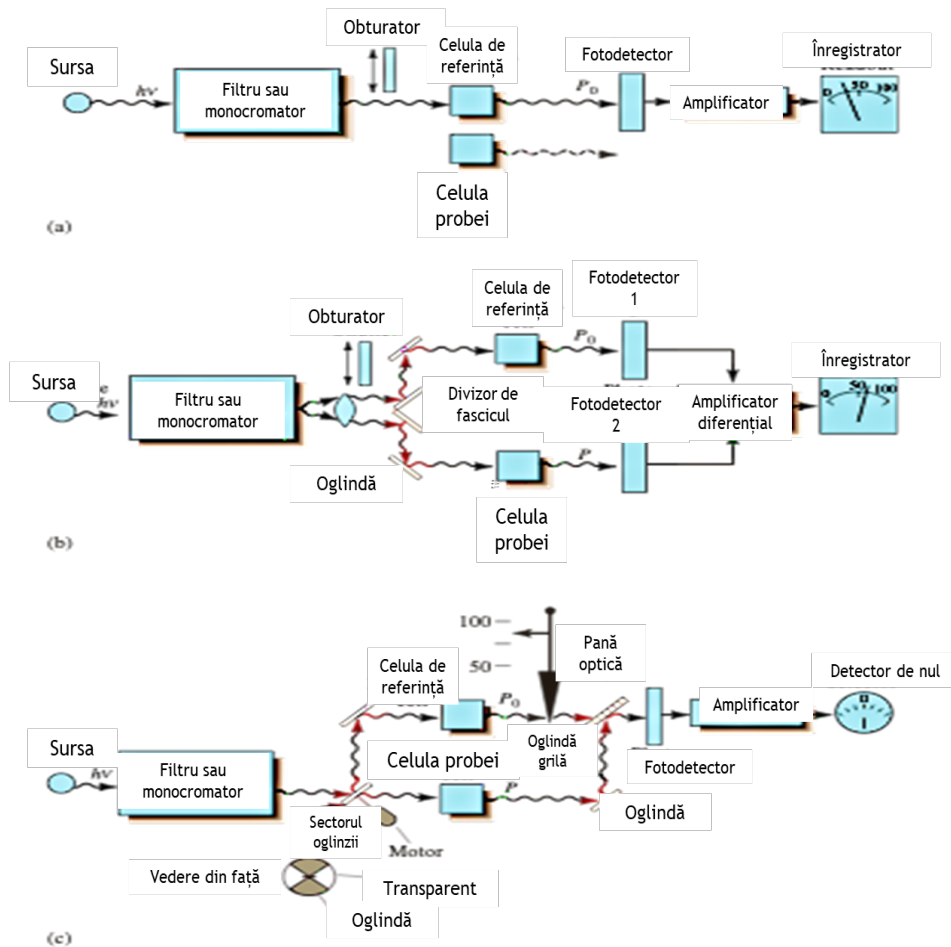


Figura 2.6. Designul instrumental pentru spectrofotometrele UV-VIZ (Skook et al, 2007)

2.4. Utilizarea spectroscopiei UV - VIZ în chimia analitică

2.4.1. Analiza Calitativă

În chimia analitică, analizele calitative sunt folosite pentru identificarea dacă un analit chimic este pur și nu a suferit descompuneri. În plus, determinările calitative folosesc specificitatea spectroscopiei UV - VIZ.

Probele absorb lumina la una sau mai multe lungimi de undă, având valori maxime de absorbanță. Deci, fiecare probă are un spectru UV- VIZ caracteristic și unic ce poate fi folosit pentru identificarea substanței, prin compararea spectrului probei cu un spectru cunoscut, al unor compuși puri (De Caro, 2015).

2.4.2. Analiza Cantitativă

Bazându-ne pe Legea Lambert-Beer, concentrația unui compus dintr-o soluție poate fi determinată cantitativ prin spectroscopia UV - VIZ. Pentru a realiza acest lucru, mai întâi trebuie trasată o curbă de calibrare prin măsurarea absorbanțelor unor soluții de standarde de concentrații cunoscute (De Caro, 2015). De exemplu, în figura 2.2.2 pentru azotul din azotiți este exemplificată curba de calibrare folosind 5 standarde de 0.025 mg/L, 0.0625 mg/L, 0.125 mg/L, 0.185 mg/L, 0.250 mg/L N-NO₂⁻. Prin reprezentarea absorbanței ca o funcție de concentrație, se obține curba de calibrare, lineară, ce trece prin origine, cu R² =0.9999, ceea ce reprezintă o foarte bună corelație între absorbanțe și concentrațiile standardelor. Ulterior, folosind curba de calibrare se poate determina concentrația azotiților pentru diferite probe de ape de suprafață.

2.5. Aplicațiile spectrofotometriei UV - VIZ în analizele de mediu

Spectrofotometria UV - VIZ are multe aplicații în analizele de mediu, pentru toți factorii de mediu. Este o tehnică versatilă și adaptabilă pentru mulți analiți chimici, pentru concentrații de la ppb la ppm. O astfel de clasă de compuși sunt nutrienții: azotiți, azotați, amoniu, azot total, ortofosfat, fosfor total din apele de suprafață, factori importanți

în eutrofizarea apelor de suprafață. Fiecare nutrient este analizat folosind standardele ISO în vigoare la spectrofotometrul UV - VIS Lambda 650 Perkin Elmer (figura 2.7). Sunt prezentate în continuare principiile metodelor pentru fiecare indicator menționat anterior.

Determinarea concentrației **azotului amoniacal**, N-NH_4^+ , exprimată în mg/L, se bazează pe măsurarea spectrometrică la aprox. 650 nm a compusului albastru format prin reacția ionului amoniu cu ionii salicilat și hipoclorit în prezența nitrozopentacianoferatului(III) de sodiu (nitroprusiat de sodiu). Ionii hipoclorit sunt generați prin hidroliza alcalină a sării de sodiu a N, N'-dicloro-1,3,5-2,4,6(1H,3H,5H)-triona (dicloroizocianurat de sodiu), urmată de reacția cloraminei cu salicilatul de sodiu ce are loc la pH 12.6 în prezența nitroprusiatului de sodiu.

Determinarea **azotului din azotiți** (N-NO_2^-) se bazează pe reacția ionilor nitriți prezenți în probă, la pH 1.9, cu reactivul 4-amino benzen sulfonamida ($\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2\text{SO}_2$) în prezența acidului ortofosforic pentru a forma o sare de diazoniu, ce formează un complex de culoare roșie cu N (1-naftil) etilen diamina diclorhidrat ($\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_2 \cdot 2\text{HCl}$) (ajutat de reactivul 4-amino benzene sulfonamidă), la 540 nm.

Azotul din azotați (N-NO_3^-) se determină prin măsurarea spectrometrică la 415 nm a absorbantei compusului galben format prin reacția acidului sulfosalicilic (format prin adiția la probă a salicilatului de sodiu și a acidului sulfuric) cu azotatul, urmată de tratarea cu soluție alcalină. Curba de etalonare se trasează utilizând azotatul de potasiu.

Pentru **azotul organic**, probele de apă de suprafață sunt mineralizate cu seleniu, pentru a forma sulfat de amoniu, din care este eliberat amoniacul. Următorul pas este conversia compușilor de azot care răspund la testul sulfatului de amoniu prin mineralizarea probei cu acid sulfuric, conținând o concentrație ridicată de sulfat de potasiu pentru a ridica punctul de fierbere al amestecului, în prezența seleniului care acționează ca un catalizator. Al treilea pas este determinarea ionilor de amoniu prin spectrometria UV - VIZ la Spectrometrul UV-VIZ Lambda 650 Perkin Elmer la 655 nm. Curba de etalonare se trasează folosind clorură de amoniu de înaltă puritate analitică.

Ortofosfații (P-PO_4^{3-}), exprimați în mg/L, se determină din proba de apă filtrată prin hârtie de filtru de 0.45 μm , pentru a separa fosforul dizolvat de formele în suspensie ale fosforului.

Fosforul total (Pt) se determină din proba de apă nefiltrată, prin mineralizare cu acid sulfuric și peroxidisulfat de potasiu. Pentru ambele forme de fosfor, principiul metodei constă din reacția ionilor de ortofosfat cu o soluție acidă care conține ioni de molibdat și de stibiu pentru formarea unui complex fosfomolibdenic de stibiu. Complexul se reduce cu acid ascorbic pentru formarea unui complex de molibden puternic colorat albastru. Se măsoară absorbanta acestui complex pentru determinarea concentrației de fosfor la 880 nm. Pentru trasarea curbei de etalonare se folosește dihidrogenofosfat de potasiu.

Nutrienții selectați sunt transformați prin tratarea umedă în compuși colorați cu o mare absorbivitate molară (Hansen et al, 1999), ceea ce asigură limite de detecție și cuantificare foarte mici (Kuss et al, 2020). Parametrii utilizați pentru analiza nutrienților pentru probele de apă sunt prezentați în tabelul 2.1.

Tabel 2.1. Limitele de detecție, cuantificare, valorile standard limită (mg/L), standardele de analiză și materiale de referință certificate

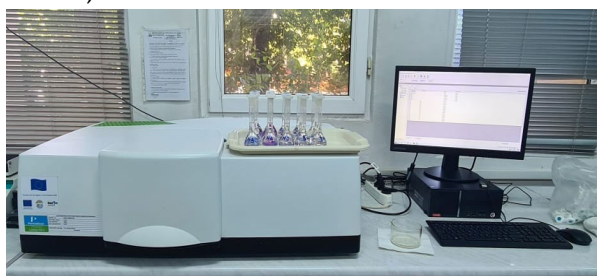
	Azotul din amoniu (N-NH ₄ ⁺)	Azotul din azotiți (N-NO ₂ ⁻)	Azotul din azotați (N-NO ₃ ⁻)	Azot Total (Nt)	Fosfor din ortofosfat (P-PO ₄ ⁻³)	Fosfor total (Pt)
Limita de detecție	0.028	0.0007	0.006	0.03	0.002	0.003
Limita de cuantificare	0.09	0.0024	0.021	0.011	0.01	0.01
Valoarea standard limită	0.8	0.03	3	7	0.2	0.4
Standardul de analiză	SR ISO 7150 - 1: 2001	SR EN 26777: 2002	SR ISO 7890 - 3: 2000	SR EN ISO 11905-1:2003	SR EN ISO 6878: 2005	SR EN ISO 6878: 2005
Materiale de referință certificate (trasabilitate NIST)	NH ₄ Cl în H ₂ O 1000 mg/L NH ₄ ⁺ CertiPUR	NaNO ₂ în H ₂ O, 1000 mg/L NO ₂ ⁻ CertiPUR	NaNO ₃ în H ₂ O, 1000 mg/L NO ₃ ⁻ CertiPUR	NH ₄ Cl în H ₂ O 1000 mg/L NH ₄ ⁺ CertiPUR	KH ₂ PO ₄ în H ₂ O 1000 mg/L PO ₄ ⁻³ CertiPUR	KH ₂ PO ₄ în H ₂ O 1000 mg/L PO ₄ ⁻³ CertiPUR



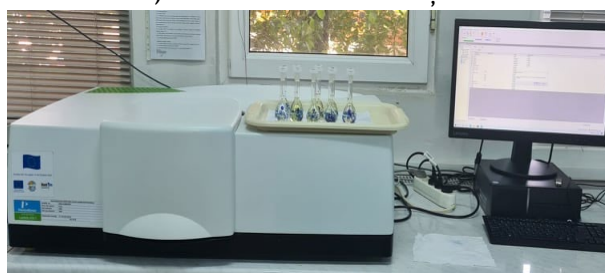
a) Determinarea fosforului



b) Determinarea azotului amoniacal



c) Determinarea azoțiților



d). Determinarea azotaților

Figura 2.7. Determinarea nutrienților în laboratorul de chimie al I.N.C.D.D.D. Tulcea, la spectrofotometrul UV VIS Lambda 650 Perkin Elmer

2.6. Bibliografie

- De Caro C.A., 2015. UV/VIS Spectrophotometry - Fundamentals and Applications, Mettler Toledo, Sonnenbergstrasse 74, CH-8603 Schwerzenbach, Switzerland, Analytical ME-30256131, Market Support Group AnaChem / RK, 52 p.
- Government of British Columbia. 1998. Guidelines for interpreting water quality data. Ministry of Env., Lands and Parks. Prep. for Resources Inventory Committee. <http://ilmbwww.gov.bc.ca/risc/pubs/aquatic/interp/index.htm>
- Hansen H P, Koroleff F. 1999. Determination of nutrients. In Methods of seawater analysis, 3rd Edn, eds K Grasshoff, K Kremling, and M Ehrhardt (Weinheim: Wiley-VCH). 159-228. DOI: 10.1002/9783527613984.
- Harris D. C., 2007. Fundamentals of Spectrophotometry, in Quantitative Chemical Analysis, Seventh Edition ed., New York, W.H. Freeman and Company, 2007, 379 p.
- Kenkel J., 2003. Analytical Chemistry for Technicians Third Edition, CRC Press, LLC.
- Kuss J, Nausch G, Engelke C, Weber M, Lutterbeck H, Naumann M, Waniek JJ, Schulz-Bull DE., 2020. Changes of nutrient concentrations in the western Baltic Sea in the transition between inner coastal waters and the central basins: Time Series From 1995 to 2016 With Source Analysis. Front Earth Sci. 8(106). DOI: 103389/feart202000106.
- Mehta A., 2012. Ultraviolet-Visible (UV-Vis) Spectroscopy - Limitations and Deviations of Beer-Lambert Law, Analytical Chemistry, Notes, <https://pharmaxchange.info/2012/05/ultraviolet-visible-uv-vis-spectroscopy--limitations-and-deviations-of-beer-lambert-law/>, accesat pe 10 mai 2021).
- Nașcu H.I., Jantschi L., 2006. Chimie Analitică instrumentală, Academic Press&Academic Direct, 317p.
- Skoog D.A., Holler J.F., Crouch, S.R., 2007. Principles of Instrumental Analysis, Thomson Brooks/Cole.

- SR ISO 7150 - 1: 2001- Calitatea apei. Determinarea conținutului de amoniu. Partea1: Metoda Spectrometrică manuală
- SR EN 26777: 2002 Determinarea conținutului de nitriți. Metoda prin spectrometrie de absorbție moleculară
- SR ISO 7890 - 3: 2000. Calitatea apei. Determinarea conținutului de azotați. Partea 3: Metoda spectrometrică cu acid sulfosalicilic
- SR EN ISO 11905-1:2003 Calitatea apei. Determinarea azotului Kjeldahl Metoda după mineralizare cu seleniu
- SR EN ISO 6878: 2005 Calitatea apei. Determinarea fosforului. Metoda spectrofotometrică cu molibdat de amoniu
- SR EN ISO 6878: 2005 Calitatea apei. Determinarea fosforului. Metoda spectrofotometrică cu molibdat de amoniu
- Verhoeven G.J., 2017. The reflection of two field - Electromagnetic radiation and its role in (aerial) imaging, AARGnews, 55, 12-18. DOI:10.5281/zenodo.3534245.

Capitolul 3. Spectroscopia de absorbție atomică pentru analiza metalelor

Oleg Bogdevich^{1,2}, Elena Culighin^{1,2}, Antoaneta Ene²

¹Institutul de Geologie și Seismologie, Chișinău, Republica Moldova

²INPOLDE rețea de cercetare interdisciplinară, Universitatea Dunarea de Jos din Galați, str. Domneasca, 47, 800008 Galați, România, aene@ugal.ro

3.1. Introducere

Spectrometria de absorbție atomică (SAA) este utilizată pentru analiza majorității metalelor în diverse probe de mediu, la fel ca și spectroscopia de emisie atomică cu plasmă cuplată inductiv (ICP). Există trei tehnologii SAA pentru analiza sensibilă a metalelor în apă, sol, sedimente și obiecte biologice 1): a) absorbția atomică în flacără; (b) absorbția atomică în cuptor de grafit (fără flacără); generarea de vapori reci și hidruri (Se, As, Hg).

Toate aparatele de spectrometrie atomică din rețeaua MONITOX sunt capabile să măsoare atât absorbția atomică (SAA), cât și emisia atomică (AES). Starea excitată a elementelor poate fi produsă la temperatură ridicată în flacără sau activare electrotermică. În absorbția atomică, funcția flăcării este de a converti eșantionul în vapori, care poate absorbi apoi lumina din sursa primară de lumină (lampă cu catod gol sau lampă cu descărcare fără electrod). Există cinci componente de bază ale instrumentelor SAA:

1. Sursa de lumină care emite spectrul elementului de interes, ca lămpile cu catod gol (unul sau multe-element) și lămpile cu descărcare fără electrozi;
2. O „celulă de absorbție” în care sunt produși atomi ai probei (flacără, cuptor de grafit, celule FIAS sau FIMS);
3. Un monocromator pentru dispersia luminii;
4. Un detector, care măsoară intensitatea luminii și amplifică semnalul;
5. Un afișaj care arată semnalele de citire după ce a fost procesat de aparatul electronic.

3.2. Tehnologia în Flacăra

Cele două combinații oxidant/combustibil utilizate în tehnologia SAA sunt cu flacăra aer - acetilenă și oxid de azot - acetilenă. Combinația aer - acetilenă este preferată pentru determinarea a aproximativ 35 de elemente prin tehnologia SAA. Temperatura acestei flăcări este de aproximativ 2300°C. Debitul de aer și acetilenă este reglat pentru obținerea unei atomizări optime. Flacăra oxid de azot - acetilenă are o temperatură maximă de 2900°C.

Măsurătorile cantitative din SAA se bazează pe legea Beer, care afirmă că concentrația este proporțională cu absorbția ($C = kA$). Această relație între absorbantă și concentrație pentru majoritatea elementelor este neliniară, în special la concentrații mari. Practica obișnuită este utilizarea unei curbe de calibrare în domeniul liniar pentru analiza metalelor. Partea superioară a gamei liniare pentru majoritatea elementelor este cuprinsă între 0,20 - 0,30 unități de absorbantă. Dar majoritatea instrumentelor moderne au capacitatea de a calibra și de a face calculul pentru majoritatea elementelor și pentru gama neliniară.

În cazul depășirii domeniului liniar, trebuie urmată procedura pentru selectarea standardului de calibrare:

1. Se pregătesc trei standarde. Primul este din intervalul de sus a gamei liniare. Al doilea - ar trebui să fie de trei ori mai mare decât primul standard și al treilea standard de șase ori mai mare decât primul standard (regula 1: 3: 6)
2. Instrumentul SAA este configurat în modul de calibrare, se îndeplinește funcția autozero și sunt măsurate cele trei standarde. Dacă al treilea standard are o valoare mai mare de 10% din concentrația așteptată, ar trebui să fie utilizate minimum trei standarde pentru calibrare.

Parametrul important în tehnica SAA este concentrația caracteristică (Char. Conc.) care a fost definită ca fiind concentrația elementului (în mg/L) necesară pentru a produce un semnal de absorbție de 1% (0,0044 unități de absorbantă). Informațiile despre acest parametru permit operatorului să prezică intervalul de absorbantă pentru concentrația cunoscută a elementului analizat. Concentrația caracteristică poate fi determinată în domeniul de lucru liniar prin citirea absorbantei concentrației cunoscute a elementului utilizând următoarea ecuație:

$$\text{Char. Conc} = (\text{Conc. of Std} \times 0.0044) / \text{Measured Abs.} \quad (1)$$

Valoarea de verificare a concentrației caracteristice este concentrația elementului care va produce un semnal de aproximativ 0,2 unități de absorbantă în condiții optime. Acest parametru este utilizat pentru optimizarea parametrilor instrumentului (Tabel 3.1).

Tabel 3.1. Condițiile standard și valorile de referință la concentrațiilor caracteristice pentru metoda SAA (Analytical Methods, 2000)

Element	Lungimea de undă, mm	Fanta, nm	Gazele flacării ¹	Valoarea de referință Conc. Charac ² . mg/l
Al	309.3	0.7	N-Ac	50.0
As	193.7	0.7	A-Ac	45.0
Ca	422.7	0.7	A-Ac	4.0
Cd	228.8	0.7	A-Ac	1.5
Co	240.7	0.2	A-Ac	7.0
Cr	357.9	0.7	A-Ac	4.0
Cu	324.8	0.7	A-Ac	4.0
Fe	248.3	0.2	A-Ac	5.0
Hg	253.7	0.7	A-Ac	200.0
K	766.5	0.7	A-Ac	2.0
La	550.0	0.2	N-Ac	2500.0
Mg	285.2	0.7	A-Ac	0.3
Mn	279.5	0.2	A-Ac	2.5
Mo	313.3	0.7	N-Ac	30.0
Na	589.0	0.2	A-Ac	0.5
Ni	232.0	0.2	A-Ac	7.0
Pb	283.3	0.7	A-Ac	20.0
Sb	217.6	0.2	A-Ac	25.0
Se	196.0	0.7	A-Ac	30.0
Si	251.6	0.2	N-Ac	100.0
Sn	286.3	0.7	N-Ac	150.0
Sr	460.7	0.4	N-Ac	5.0
V	318.4	0.7	N-Ac	90.0
W	255.1	0.2	N-Ac	450.0
Zn	213.9	0.7	A-Ac	1.0

¹ A-Ac - Air - Acetilenă, N-Ac Oxid de Azot - Acetilenă

² Concentrația metalului în mg/l în soluții apoase care vor demonstra o citire de aproximativ 0,2 unități de absorbție.

Limita de detecție (LOD) este o concentrație a elementului care poate produce o valoare a semnalului de trei ori mai mare decât zgomotul semnalului de bază. Acest parametru poate fi determinat prin utilizarea a două soluții standard. Una are o concentrație de aproximativ 5 ori mai mare decât cea așteptată LOD. A doua soluție standard este preparată cu concentrația de două ori mai mare decât primul standard. Toate standardele se citesc în condițiile optime ale instrumentului, de zece sau mai multe ori prin următoarea secvență: blanc - primul standard - blanc - al doilea standard, în acest caz în calitate de blanc este pregătită o probă fără adaos de metal. Media și deviația standard sunt calculate după această măsurare pentru fiecare concentrație standard din care se extrage valoarea blancului. Valorile medii obținute trebuie să se situeze în limitele statistice ale concentrațiilor preparate. LOD este calculat prin următoarea ecuație:

$$DL = (\text{Stand. Conc.} \times 3 \text{ Stand. Dev.}) / \text{Mean} \quad (2)$$

Calculul se face independent pentru fiecare concentrație standard și LOD este o medie a celor două rezultate. LOD (mg/g) pentru metoda în tehnica flăcării este determinată prin ecuație

$$\text{LOD (mg/l)} \times \text{Volume (liters)} \times 1000 \text{ sample weight (grams)}.$$

Limita de cuantificare (LOQ) este cea mai mică concentrație de analit dintr-o probă care poate fi determinată cantitativ cu precizie și acuratețe adecvate. Se determină utilizând standardul cu concentrația de 5 ori mai mare decât LOD. Se injectează standardul de concentrație LOQ de 6 ori și se calculează %RSD (devierea standard relativă). Criteriile de acceptare nu depășesc 15%.

LOQ (mg/g) pentru tehnica flăcării se calculează prin ecuație:

$$\text{LOQ (mg/l)} \times \text{Vol. litre} \times 1000 \text{ masa mostrei în grame}.$$

Tehnica SAA este utilizată pentru probe lichide și solide. În cazul eșantionului solid, este necesară transformarea acestuia în soluție. Procedura de pregătire a probelor este necesară înainte de analiza matricelor specifice: apă, ape uzate, sol, sedimente, plante, obiecte biologice. Procedurile de pregătire sunt descrise în documentele normative respective (ISO, ASTM, EPA etc.).

Probele de apă naturală trebuie, de regulă, să fie filtrate printr-un filtru cu membrană de 0,45 microni și adăugat acid până la pH = 2-3 (conc. HNO₃ sau HCl). Probele de sol sunt de obicei convertite în soluție

prin digestia acidă. Cele mai importante metode utilizate pentru sol și sedimente sunt digestia deschisă în vase și digestia închisă în cuptorul cu microunde. Proba solidă trebuie pre-calcinat într-un cuptor de calcinare. Fiecare tip de obiect are o procedură specifică pentru pregătirea în tehnica SAA.

Tehnica SAA prezintă interferențe, care pot influența rezultatele: chimică, de ionizare, de matrice, emisie, spectrală și absorbție de fond.

Interferența chimică depinde de prezența în soluție a compușilor stabili care pot produce o reducere absorbției luminii. Această interferență poate fi redusă prin temperatura ridicată de analiză sau prin adăugarea agentului de realizare. Exemplu: adăugarea de lantan la soluție pentru analiza calciului.

Interferența de ionizare poate fi redusă prin adăugarea de element ușor ionizat la soluție. Metalele alcaline sunt bune pentru utilizare în acest caz (K, Na, Rb, Cs).

Se poate produce interferență de matrice, astfel caracteristicile fizice ale probelor și standardelor de calibrare fiind diferite. Exemplul acestei influențe poate fi concentrația mare de săruri sau acizi prezenți în probe. Două soluții de rezolvare sunt posibile în această situație. Una este să fie pregătite probe, soluții standard și probe martor din aceiași reactivi. Alta, este să fie utilizată metoda adaosului de standard. În acest caz, alicote ale unui standard sunt adăugate la porțiuni din probă, permițând astfel oricărui interferent prezent în probă să afecteze, de asemenea, standardul în mod similar. Ilustrația metodei adaosurilor este prezentată în Figura 3.1. (Analytical Methods, 2000).

Graficul absorbanței măsurate față de concentrația standardului adăugat este paralel cu standardele de apă în cazul în care nu există interferențe matrice. Dacă în eșantion este prezent un material care provoacă o interferență a matricei, va fi afectat numărul de atomi în stare de bază care produc absorbție atomică, la fel ca și absorbanta din analit din eșantionul fără adaos. Dacă există o substanță în probă care provoacă interferența matricei, panta liniei va fi diferită de probele fără influența matricei. Această metodă poate fi utilizată înțelegând că nu compensează alte tipuri de interferențe sau alte tipuri de interferență spectrală și, de regulă, nu compensează interferențele chimice sau cele de ionizare.

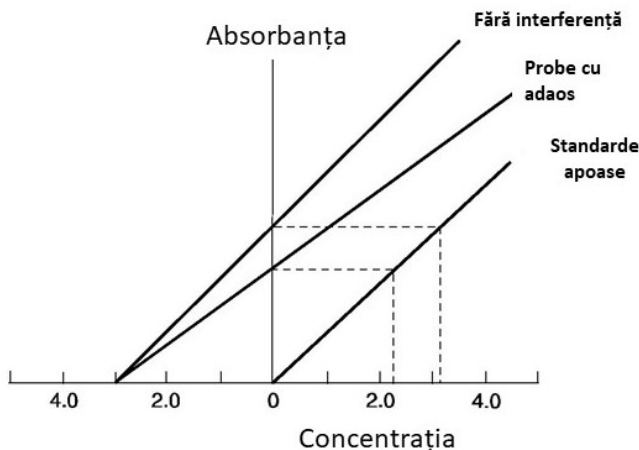


Figure 3.1. Metoda adaosurilor de standarde

Această metodă este o determinare indirectă și nu va fi la fel de precisă ca determinarea directă a concentrației dintr-o curbă de calibrare. Este întotdeauna cel mai bine să fie eliminată interferența, alegând condițiile analitice optime sau, dacă este posibil, tratamentul chimic al probei. Metoda adaosului de standard trebuie privită întotdeauna ca o ultimă soluție și nu ca o metodă de alegere.

Interferența de emisie are loc la concentrații mari de analit pentru elementele cu emisii mari dacă semnalul se încadrează în lățimea de bandă spectrală utilizată.

Interferența spectrală poate apărea atunci când lungimea de undă de absorbție a unui alt element prezent în probă se încadrează în banda de trecere a liniei de absorbție a componentei de interes. În acest caz, rezultatele determinării vor fi eronate de mari. Când se utilizează lămpi cu mai multe elemente, poate exista o combinație de elemente care creează posibilitatea interferenței spectrale. Lățimea fantei utilizată în mod obișnuit în lămpile cu un singur element poate fi suficient de mare pentru a permite trecerea lungimii de undă de absorbție a unui alt element prezent într-o lampă cu mai multe elemente. Acest lucru poate fi evitat prin utilizarea unei fante mai mici sau prin alegerea unei lungimi de undă diferite.

Interferența de absorbție a fundalului poate apărea din două motive: împrăștierea luminii de către particule într-o flacără și

absorbția luminii prin forme moleculare nedisociate ale matricei. Cel mai obișnuit mod de a compensa absorbția de fundal este de a utiliza un corector de fundal care utilizează o sursă continuă (lampă cu arc deuteriu UV sau lampă cu iodură de wolfram pentru lungimi de undă vizibile). Corecția de fond realizează compensarea simultană la aceeași lungime de undă utilizată pentru măsurători de absorbție atomică. În acest sistem, lumina dintr-o sursă primară și o sursă continuă trece alternativ prin flacăra. Elementul țintă absoarbe efectiv lumina numai din sursa primară, în timp ce absorbția de fundal afectează în mod egal ambele raze. Prin urmare, atunci când raportul celor două fascicule este măsurat electronic, efectul de absorbție a fondului este eliminat și se obține un semnal de absorbție atomică adevărat.

Procedura standard de operare pentru tehnica SAA include mai mulți pași (ALACC Guide, 2007; EURACHEM, 1995; ISO 11843-2:2000; ISO 8466-1:1990) pentru validarea metodei: interval liniar; intervalul de lucru; LOD; LOQ; coeficientul de corelație pentru curba de calibrare; repetabilitate; reproductibilitate. Exemplu cu rezultatele validării metodei SAA este prezentat în Tabelul 3.2.

Tabel 3.2. Exemplu al parametrilor metrologici pentru tehnica SAA în flacăra

Element	Cu	Mn	Zn	Ni	Pb	Mg	Ca	Cd	Cr
Lungimea de undă, nm	324,7	279,5	213,8	232,0	283,3	285,2	422,7	228,8	357,9
Calibrarea	Nelinear prin Zero								
Interval de lucru (mg/l)	0,05-30,0	0,2-30,0	0,05-12,0	0,1-60,0	5,0-150,0	0,9-5,0	3,0-50,0	0,1-10,0	0,5-20,0
Conc. maximă pentru intervalul linear (mg/l)	6,0	5,0	2,0	10,0	20,0	0,5	5,0	5,0	8,0
LOD (mg/l)	0,1	0,1	0,08	0,4	2,0	0,02	0,15	1,0	0,36
LOQ (mg/l)	0,4	0,47	0,26	1,2	6,8	0,07	0,5	3,4	1,19
Coef. de Corelare	0,9998	0,9998	0,9995	0,9996	0,9996	0,9994	0,9997	0,9983	0,9994
Repetabilitate:									
Valoare medie	0,154	0,138	2,0	0,46	4,9	0,097	0,5	0,46	1,95
StDev (n=9)	0,002	0,008	0,036	0,025	0,11	0,004	0,004	0,018	0,011
RStDev, %	1,3	5,72	1,961	5,51	2,26	4,17	0,602	3,82	0,6
Reproductibilitate:									
Valoarea medie	0,159	0,134	2,0	0,44	5,174	0,094	1,0	0,445	1,99
StDev. (n=9)	0,013	0,014	0,070	0,031	0,546	0,005	0,15	0,02	0,058
RStDev, %	8,31	10,39	3,67	7,2	10,55	4,74	13,52	4,46	2,92
Incertitudine relativă, U _x /X	0,0194	0,0194	0,0194	0,0194	0,0194	0,0194	0,0194	0,0194	0,0194

3.3. Atomizarea electrotermică

THGA (Transverse Heated Graphite Atomizer) Tehnica cuptorului cu grafit oferă analize fără standard în matrici variate și complexe cu o precizie de aproximativ 10-20%. Condițiile care controlează variabilitatea rămasă sunt temperatura de atomizare și variabilele spectroscopice, cum ar fi lățimea fantei spectrale și curentul lămpii. Alte condiții ale tehnicii THGA sunt corecția de fond (de preferință corecția Zeeman), încălzirea rapidă a cuptorului (aproape de 2000°C), platforma Lvov și tubul de grafit acoperit pirolitic, oprirea gazului în timpul atomizării, utilizarea modificatorilor de matrice.

Analiza fiecărui element ar trebui să optimizeze programul cuptorului, care include de obicei următorii pași:

- **Uscare** - proba este vaporizată la acest pas.
- **Piroliză** - elimină cât mai multe posibil componentele matricei, modificatorii matricei sunt folosiți pentru a stabiliza analitul sau a elimina impactul matricei.
- **Atomizare** - eșantionul este atomizat pentru a forma atomi de bază în calea fasciculului de radiație.
- **Curățare** - o etapă de curățare la temperatură ridicată după atomizare.

Optimizarea semnalului trebuie făcută la începutul analizei în conformitate cu ghidul de utilizare al instrumentului. Verificarea condițiilor instrumentului trebuie făcută la începutul analizei (Tabelul 3.3). Condițiile recomandate sunt prezentate în Ghidul utilizatorului pentru fiecare instrument SAA.

Soluția pentru verificarea instrumentului este realizată în baza a HNO₃ de concentrație 0,2%. Volumul de 20 μl este recomandat pentru analiza soluției de element care ar trebui să producă o valoare de absorbantă integrată optim între 0,1 - 0,3 unități de abs. Valorile mult mai mari nu sunt adecvate pentru măsurarea valorilor de masă caracteristice.

Tabel 3.3. Exemplu al programului THGA pentru verificarea instrumentului

Etapa	Temperatura, °C	Rampa Timpului, sec.	Timp de reținere, sec.	Debitul gazului (ml/min)
Uscare 1	110	1	20	250
Uscare 2	130	5	30	250
Piroliză	pentru element*	10	20	250
Atomizare	pentru element	0	5	0
Curățare	2400	1	2	250

* Informația despre condițiile standard ale elementului analizat.

Calculul masei caracteristice mass (m_o) se face prin următoarea ecuație:

$$m_o = (\text{volum, } \mu\text{l}) * (\text{Concentr. } \mu\text{g/l}) * 0.0044 / (\text{Abs. probei}) - (\text{Abs. blank})$$

Masa caracteristică trebuie să fie în limita a 20% din valoarea din condițiile recomandate pentru elementul analizat.

Utilizarea modifierului de matrice îmbunătățește analiza de către sistemul THGA. Modifierul de matrice face ca piroliza termică să fie mai previzibilă și mai reproductibilă pentru diferite matrici. Acest adaos convertește analitul într-o specie obișnuită și elimină problema celor două vârfuri. Modifierul permite piroliza mai eficientă prin stabilizarea analitului sau permite piroliza la temperaturi mai ridicate. Cei mai frecvent utilizați modifieri ai matricii sunt nitrații de paladiu și de magneziu. Alți modifieri pot fi fosfatul de amoniu și sărurile de lantan.

În majoritatea cazurilor, tehnica STPF, absorbanta integrată și modifierul de matrice elimină problemele potențiale din interferențe. Cu toate acestea, atunci când recuperarea este mai mică de 100%, se poate utiliza tehnica adaosului de standard.

Validarea metodei THGA a arătat următoarele rezultate pentru mai multe metale din probele de apă (Tabelul 3.4).

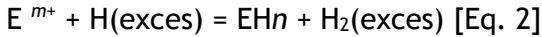
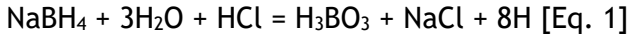
Tabel 3.4. Exemplet al parametrilor metrologici pentru tehnica THGA

Element	Cu	Mn	Ni	Pb	Cd	Cr	Se	As
Lungimea de undă, nm	324,7	279,5	232,0	283,3	228,8	357,9	196,0	193,7
Temperatura pirolizei	1200	1300	1100	850	500	1500	1300	1200
Temperatura de atomizare	2000	1900	2300	1600	1500	2300	1900	2000
Calibrare	Nelineară prin Zero							
Interval de lucru (μg/l)	1,0-50,0	1,0-50,0	1,0-50,0	1,0-50,0	0,2-10,0	1,0-50,0	5,0-300,0	2,0-50,0
Conc. maximală pentru interval linear (μg/l)	20,0	20,0	50,0	50,0	2,0	20,0	50,0	100,0
LOD (μg/l)	1,68	0,73	3,05	2,0	0,03	0,86	1,53	1,3
LOQ (μg/l)	5,60	2,43	10,16	6,8	0,15	2,86	5,09	4,26
Coef. de Corelare	0,9981	0,9996	0,9992	0,9996	1,000	0,9997	0,9998	0,9991
Repetabilitate: Valoare medie StDev. (n=9) RStDev, %	2,046 0,0534 2,61	4,54 0,055 1,21	19,71 1,02 3,83	19,18 0,25 1,29	0,2 0,014 6,99	10,0 0,299 1,17	20,0 0,34 1,71	20,0 1,49 7,18
Reproductibilitate: Valoare medie StDev. (n=9) RStDev, %	1,03 0,0695 6,74	4,582 0,154 3,35	19,5 0,75 5,6	19,89 0,84 4,24	0,2 0,033 17,52	10,0 0,78 7,78	20,0 1,54 7,68	20,0 4,18 20,01
Incertitudinea relativă, U_x/X	0,032	0,0194	0,0194	0,0194	0,036	0,025	0,033	0,0285

Toate condițiile necesare pentru analiza elementelor sunt prezentate în condițiile recomandate pentru tehnica THGA.

3.4. Tehnica generării hidrurilor

Tehnicile de generare de hidruri sunt utilizate în mod obișnuit pentru determinarea As și Se în probele de mediu. Avantajele includ sensibilitate ridicată, simplitate și libertate relativă de interferențe. Tehnica hidrurii implică reacția probelor apoase acidificate cu un agent reducător, cum ar fi borohidruza de sodiu. Reducerea borohidrurii de sodiu/acidului generează hidruri așa cum se arată în următoarele ecuații:



unde E = analitul de interes și m poate fi sau nu egal cu n

Această reacție generează o hidrură volatilă în FIAS (Flow Injection Analytical System) care este transportată într-o celulă de cuarț prin intermediul unui gaz purtător de argon. În celula de cuarț, hidrurile sunt transformate în atomi de metal gazos (Figura 3.2).

Parametrii de optimizare FIAS sunt prezentați în ghidurile operaționale pentru instrumentele respective. Interferențele posibile, care pot apărea cu FIAS, sunt în general asociate cu prepararea eșantionului sau standardului sau cu fluxul de gaz sau lichid prin sistem. FIAS are următoarea funcție în această tehnică: aspirarea probei lichide la o rată controlată; amestecarea probei lichide cu borohidru de sodiu și HCl; crearea unei hidruri volatile a analitului metaloid din această reacție; trecerea hidrurii gazoase în celula optică. Forma hidrură a metaloizilor este transformată în forma metalică a metalelor într-o celulă de cuarț la o temperatura data.

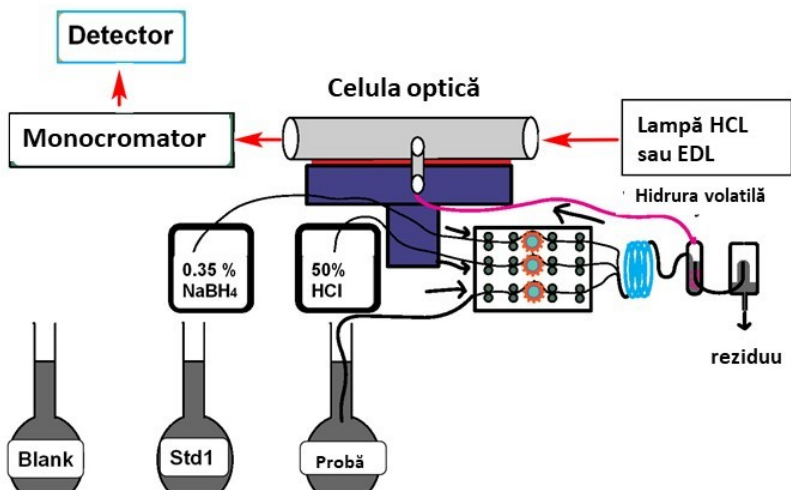


Figura 3.2. Schema FIAS pentru analiza hidrurilor.

Starea de oxidare este importantă pentru analiza metaloizilor în sistemul THGS. Analiza Se implică starea de oxidare Se (IV) (selenit). Așadar, seleniul în toate standardele de calibrare și probe pentru

determinarea Se trebuie să fie în forma de Se (IV). Acest lucru poate fi obținut prin oxidarea seleniului din probe la forma de selenat utilizând un oxidant puternic cum este acidul azotic sau peroxidul de hidrogen (descompunerea oxidantului în exces) și apoi reducând selenatul obținut în selenit prin fierbere cu HCl.

Este important controlul condițiilor de lucru ale FIAS pentru a produce o analiză de calitate bună: tuburile de conexiune, pompele peristaltice, debitele, fluxul de argon. O sensibilitatea mică se obține dacă există o problemă în generarea hidrurii, transportul ei spre celula de cuarț sau atomizarea hidrurii. Reactivii trebuie să fie proaspăt preparați (în ziua analizei) și de puritate înaltă.

Condițiile standard ale FIAS sunt stabilite în fereastra de control a instrumentului FIS. Fiecare analit are condiții standard specifice. Următorul algoritm este urmat: alinierea celulei de cuarț, optimizarea sistemului fluid FIAS, ajustarea fluxului purtătorului și reducătorului, ajustarea evacuării gazului/lichidului, ajustarea debitului gazului purtător

Procedura optimizării semnalului este efectuată pentru a performanță mai bună a analizei. Determinarea concentrației caracteristice este efectuată, de asemenea, pentru a verifica condițiile instrumentale. Toate procedurile sunt efectuate în fereastra de control a instrumentului FIAS.

3.5. Bibliografie

ALACC Guide 2007 “How to meet ISO 17025 requirements for method verification”.

Analytical Methods. Atomic Absorption Spectrometry. Perkin Elmer Inc. 2000. <https://chemistrydocs.com/analytical-methods-for-atomic-absorption-spectroscopy-by-perkin-elmer-corporation/>

EURACHEM. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. LGC, 1995. ISBN 0-948926-08-2.

ISO 11843-2:2000 Capability of detection – Part 2: Methodology in the linear calibration case

ISO 8466-1:1990 Water quality - Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics - Part 1: Statistical evaluation of the linear calibration function.

Capitolul 4. Spectrometria de emisie atomică cu plasmă cuplată inductiv (ICP-OES) pentru analize de mediu

Victor Ciornea¹, Elena Zubcov^{1,2}, Nina Bagrin¹, Petru Ciorbă¹,
Antoaneta Ene², Natalia Zubcov¹

¹*Institutul de Zoologie, Chisinau, Republica Moldova*

²*Centrul de cercetare interdisciplinar INPOLDE, Universitatea Dunărea de Jos din Galați, Str. Domnească nr. 111, Galați, România*

4.1. Introducere

Capacitatea de migrație a ecotoxicanților precum și a formelor de migrație sunt condiționate de proprietățile lor, cât și de valorile unor mărimi cum sunt pH-ul, gradului de oxidare, prezența radicalilor și a unor agenți de complexare, a substanțelor în suspensie, etc.

Spectrometria de emisie atomică se bazează pe fenomenul de desorbție (emisie) a energiei luminoase. Principiul metodei constă în încălzirea la temperaturi ridicate pentru a atomiza și pentru a excita atomii rezultați. Revenind la starea fundamentală atomii emit radiație caracteristică elementului. Concentrația atomilor în probă este proporțională cu intensitatea radiației emise. Spectru de emisie al atomilor unui element este rezultatul tranziției (revenirii) electronilor de pe nivele energetice superioare (stare excitate) pe nivele inferioare (stare fundamentală). Exemplu atomului de hidrogen cu nivelurile de energie și unele tranziții care dau naștere la linii spectrale de emisie este prezentat în Figura 4.1.

Spectroscopia de emisie atomică cu plasmă cuplată inductiv, denumită și spectrometrie de emisie optică cu plasmă cuplată inductiv (ICP-OES), este o tehnică analitică utilizată pentru detectarea elementelor chimice. Este un tip de spectroscopie de emisie care folosește plasma cuplată inductiv pentru a produce atomi excitați și ioni care emit radiații electromagnetice la lungimile de undă caracteristice unui anumit element (Alfassi, 1994; Filenko, 1988). Plasma este o sursă de temperatură ridicată (circa 6000 și 10 000 K) de aceea este menținută prin cuplare inductivă la bobine electrice răcite. Datorită temperaturii

sale ridicate, plasma este cea mai bună modalitate de vaporizare și excitare a atomilor în spectrometria de emisie atomică.

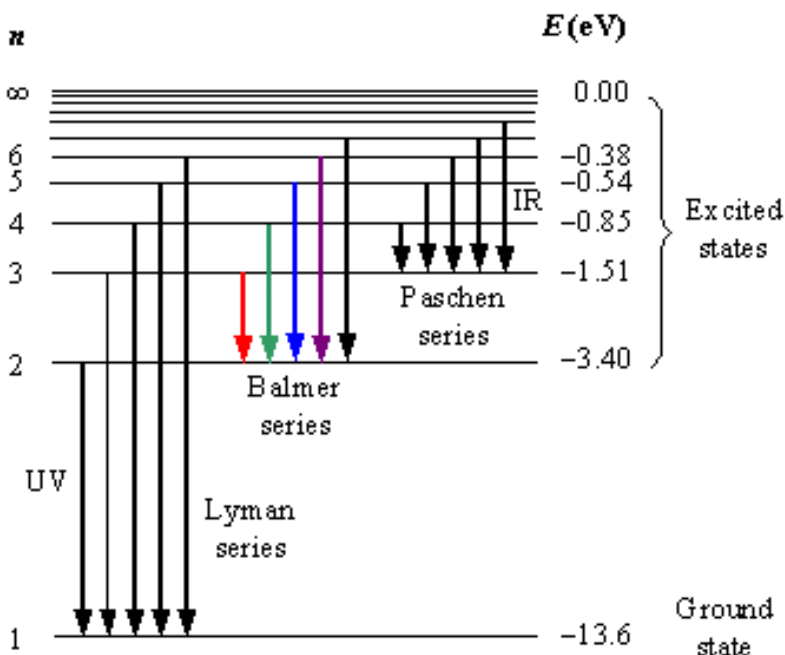


Figura 4.1. Exemplul atomului de hidrogen cu nivelurile de energie și unele tranziții care dau naștere la linii spectrale de emisie. Tranzițiile caracteristice din seria Lyman emit radiație în domeniul UV, cele din seria Balmer în domeniul vizibil, iar cele din seria Paschen în domeniul IR.

4.2. Metodologie

Laboratorul Hidrobiologie și Ecotoxicologie al Institutului de Zoologie posedă în dotare mai multe utilaje performante, moderne și metode de analiză a indicilor de calitate a mediului (apa de suprafață și subterană, nămol, hidrobionți, etc.), ce permite determinarea unui spectru larg de indicatori, în special pentru determinarea ecotoxicanți, cum sunt urme de elemente chimice, poluanți organici persistenti, dar și macrocomponenți, microelemente, oligoelemente, prin utilizarea

metodelor standardizate și validate (ASTM D1976 20, BS EN ISO 11885:2009, SM SP EN ISO 15587-2:2012, SP EN ISO 11885:2009).

Spectrometrul Thermo Scientific iCAP 6200 Duo, producător Thermo Fisher Scientific, prezentat în Figura 4.2, face parte din categoria spectrometrelor ICP-OES. Este un instrument, proiectat pentru cuantificarea multielementală simultană pe probe lichide, cu mai multe funcții preinstalate, astfel încât utilizatorilor nu le mai este necesară optimizarea vitezei pompei, puterea plasmei și a debitul de gaz inert, ceea ce ușurează mult lucru operatorului. Vizualizorul de plasmă Duo permite citirea axială și radială a informațiilor spectrale, ceea ce îmbunătățește considerabil sensibilitatea și limitele de detecție pentru elementele toxice, iar torța EMT (toleranță îmbunătățită de matrice) simplifică manipularea probelor cu matrici dificile.



Figura 4.2. Spectrometru de emisie atomică Thermo Scientific iCAP 6200 Duo

Softul iTEVA permite utilizatorul selectarea unor metode șablon, astfel fiind evitată cerința pentru dezvoltarea metodei și se economisește timp. De obicei, utilizatorului îi rămâne să aleagă elementul (sau elementele), linia (sau liniile) din spectru, mai sensibilă, sau mai puțin sensibilă, după necesitate, câte soluții standard urmează a fi analizate, unitățile de măsură și modul de citire a radiației emise de plasmă, radial, axial sau duo (mixtă).

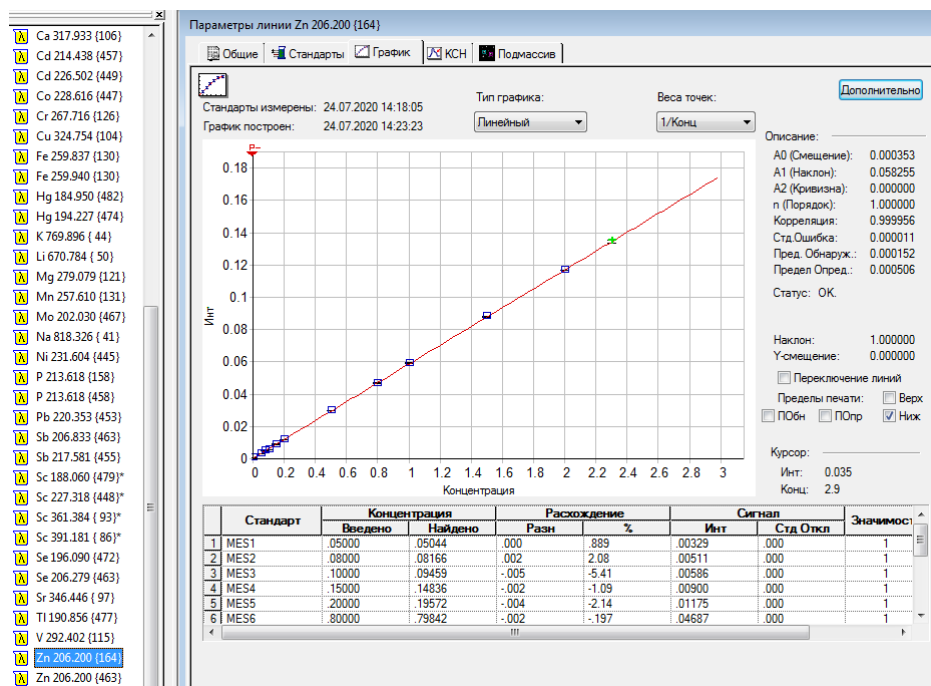


Figura 4.3. Secvența a metodei de analiză multielementală în softul iTEVA și curba de calibrare a unui element

O imagine a unei metode de analiză multielementale și curba de calibrare pentru unul din elementele de analizat este prezentată în Figura 4.3. În partea stângă a imaginii se observă numărul de elemente analizate și lungimile de undă selectate din spectrul fiecărui element. În total, metoda enumeră cca 30 elemente: Al, As, B, Ba, Be, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, Sb, Se, Sr, Tl, V și Zn. Soluția de Sc servește ca standard intern, iar liniile spectrale de la

188.060, 227.318, 361.384 și 391.181 nm servesc ca reper pentru cele patru grupuri de elemente. Se observă că pentru elementul, exemplu de aici, zincul, domeniul de liniaritate (LN) este ales unui foarte mare, de la 0,05 mg(Zn)/L până la 2 mg(Zn)/L. Totuși, softul iTEVA oferă mai multe detalii despre metodă, parametrii cum sunt limita de detecție (LD), limita de cuantificare (LQ), coeficientul de corelare (R^2) și altele. Aici, în baza soluțiilor standard analizate la echipament, rezultă că se asigură o liniaritate extraordinară în domeniul de la $LQ=0,506 \mu\text{g}(\text{Zn})/\text{L}$ până la 2,3 mg(Zn)/L, cu o abatere de doar $s_{zn} = \pm 0,011 \mu\text{g}(\text{Zn})/\text{L}$. Gradul ecuației liniare este 1 căpătând următoarea formă $y=a+bX$, cu $a=0,000353$ (în figura 3 A_0), $b=0,058255$ (în figura 3 A_1) și $R^2=0,999956$. În aceste condiții, domeniul de analiză LN, în care se asigură liniaritate, poate fi extins și poate să înceapă de la $0,506 \mu\text{g}(\text{Zn})/\text{L}$.

În Figura 4.4 se prezintă un raport de analiză multielementală emis de iTEVA.

Raportul conține toate informațiile necesare utilizatorului, organizate în coloane, pentru fiecare element și linia spectrală a elementului, unitățile de măsură, mărimea medie a rezultatului și datele replicilor, abaterea standard în unități de măsură și în %. În partea dreaptă, jos, pot fi vizualizate spectrul de emisie a liniei selectate și aportul interferențelor, dacă sunt. De obicei, alegerea corectă a liniilor spectrale reduce mult probabilitatea apariției interferențelor spectrale a altor elemente prezente în matricea mostrelor de analizat.

Metodele recomandate prin aplicarea tehnicii ICP-OES pentru determinări multielementale pe diverse probe sunt ISO 11885:2007, EPA 200.7 și EPA 200.5. Aplicarea echipamentului de analiză ICP-OES, permite analiza multielementală simultană a unei probe condiționate în cca 3-4 minute și cuantificarea până la 35 de elemente chimice.

Metoda standardizată, internațională, ISO 11885: 2007 specifică o metodă de determinare a elementelor dizolvate și a conținutului total al elementelor din diferite tipuri de mostre (cum sunt sol, ape de suprafață, brută, potabilă și uzată) pentru 35 elemente: Ag, Al, As, B, Ba, Be, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Ga, In, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, Sb, S, Si, Sn, Se, Sr, Ti, Tl, V, W, Zr și Zn. Luând în considerare interferențele specifice și care apar în mod suplimentar, aceste

elemente pot fi determinate și în digestii de băuturi alcoolice, grăsimi vegetale, uleiuri, lubrificanți, probe de mediu, biologice și alimentare, nămoluri și sedimente. Metoda este potrivită pentru concentrații ale elementelor sub 2 g/L.

Metodele recomandate pentru digestia mostrelor și pregătirea lor pentru analize ICP-OES, sunt ISO 15587-1, ISO 15587-2, EPA 200.2, 3050 și 3051A. Aceste metode presupune utilizarea unor utilaje de laborator.

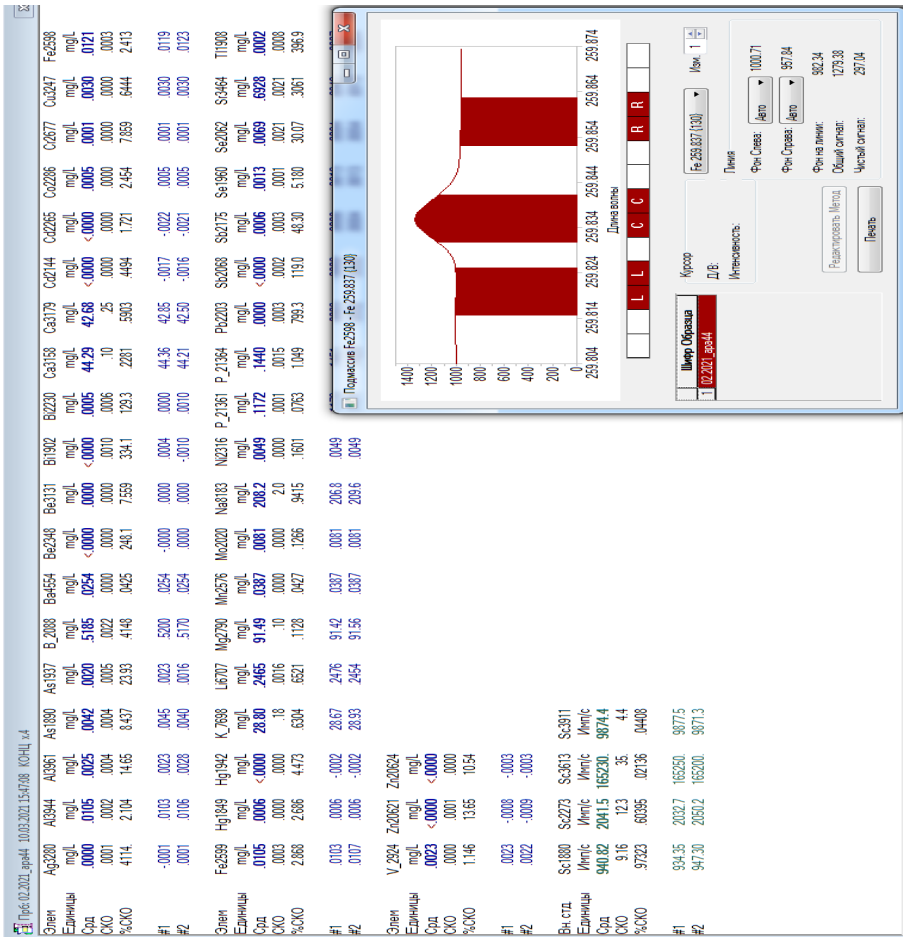


Figura 4.4. Secvență a unui raport de analiză multielementală a unei mostre de apă de suprafață în softul iTEVA și intensitatea radiației emise a unui element la lungimea de undă a liniei spectrale selectate

Deseori, pentru condiționarea mostrelor hidrochimice prin digestie acidă sunt folosite următoarele utilaje: 1) HotBlock SC 151 sau SC 154 (Environmental Express) necesar pentru pregătirea mostrelor lichide, spre exemplu apă de suprafață, subterană sau uzată și 2) Sistemul de pregătire a probelor cu microunde SpeedWave four SW-4 (Berghof) pentru mostre solide și semilichide.

Elementul principal al acestor echipamente HotBlock SC 151 (Environmental Express) sunt saltelele de încălzire din grafit și Kydex® rezistent la coroziune, de joasă putere care oferă încălzire uniformă în toate părțile blocului până la 150 °C. Digestia la temperaturi relativ joase și folosirea veselei de digestie din plastic permite pregătirea probelor pentru micro- și ultramicroanalize de elemente fără riscul de a contamina probele cu urme de elemente chimice și substanțe anorganice (Figura 4.5a). Echipamentul oferă posibilitatea creării programelor de digestie, unde pot fi programate numărul de etape, temperatura fiecărei etape, viteza de încălzire în °C/minut (sau gradientul de temperatură) și timpul de menținere a probelor la temperatura solicitată. Totodată, permite operatorului să pregătească 54 probe simultan, în volum de 50 sau 100 ml.



a. Digester pentru mostre lichide, HotBlock SC 151 (Environmental Express);



b. Digester cu microunde, pentru mostre solide și semilichide, SpeedWave four SW-4 (Berghof).

Figura 4.5. Tehnici de digestie a probelor

Avantajele utilizării acestor echipamente se remarcă prin simplitate, rapiditate, economie de energie și reactivi costisitori, ușurarea lucrului operatorului și comoditate.

SpeedWave four SW-4 este un cuptor cu microunde proiectat pentru procedurile de digestie și/sau piroliză chimică la temperaturi de până la 300 °C și presiuni ridicate de până la 100 bar, cu destinația ulterioară a probelor pentru analize spectrometrice ICP-OES (Figura 4.5b). Amestecurile de analizat se încălzesc prin iradiere cu microunde în prezență de acizi concentrați, cum sunt, azotic, clorhidric, fluorhidric și sulfuric, precum și amestecurile lor. Avantajele acestui echipament, deoarece toate componentele care vin în contact cu reactivii de digestie sunt din PFA și PTFE extrapure și faptul că mostrele supuse procesului de digestie sunt în vase închise ermetic, reprezintă două momente esențiale pentru analizele instrumentale ICP-OES: este exclusă contaminarea și pierderile de analiți, și timpul scurt pentru procesul de digestie. Timpul de pregătire a probelor prin digestie cu microunde, în dependență de matricea mostrelor de analizat, este de la câteva minute până la câteva zeci de minute.

4.3. Bibliografie

- Alfassi Zeev B. (Ed.), 1994, Determination of Trace Elements, Balaban Publishers, Weinheim, New York, pp. 192-226.
- ASTM D1976 20, Standard Test Method for Elements in Water by Inductively-Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy, <https://shop.bsigroup.com/ProductDetail?pid=000000000030422520>
- BS EN ISO 11885:2009. Water quality. Determination of selected elements by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES), 2009, <https://shop.bsigroup.com/ProductDetail?pid=000000000030081913>
- Fileenko O.F., 1988, Aquatic toxicology. Chernogolovka: Moscow State University Publishing House, 1988, 156 p. - Филенко О.Ф. Водная токсикология. Черногоровка:Изд-во МГУ, 1988, 156 с.
- SM SP EN ISO 15587-2:2012. Mineralizarea pentru determinarea unor elemente din apă. Partea 2: Mineralizare cu acid azotic.
- SP EN ISO 11885:2009. Determinarea elementelor selectate prin spectroscopie de emisie optică cu plasma cuplată inductiv (ICP-OES).

Capitolul 5. Spectrometria de masă cu plasmă cuplată inductiv (ICP-MS) pentru analize de mediu

Liliana Teodorof¹, Adrian Burada¹, Cristina Despina¹,
Antoaneta Ene², Seceleanu-Odor Daniela¹

¹Institutul Național Delta Dunării, Strada Babadag nr.135,
Tulcea, România

²Centrul de cercetare interdisciplinar INPOLDE, Universitatea
Dunărea de Jos din Galați, Str. Domnească nr. 111, Galați,
România

5.1. Introducere

Metodele ICP demonstrează în ultimii ani că reprezintă un instrument excelent pentru analiza metalelor și a metalozilor în soluții apoase pentru toți factorii de mediu, una dintre tehnicile precise, sensibile și fiabile. ICP are două sisteme de detecție: plasmă cuplată inductiv cu spectrometrie de emisie atomică (ICP-AES) și plasmă cuplată inductiv cu spectrometrie de masă (ICP-MS). Limitele de detecție ICP-MS sunt de trei ori mai mici decât cele ale ICP-AES (Jorge et al, 2007).

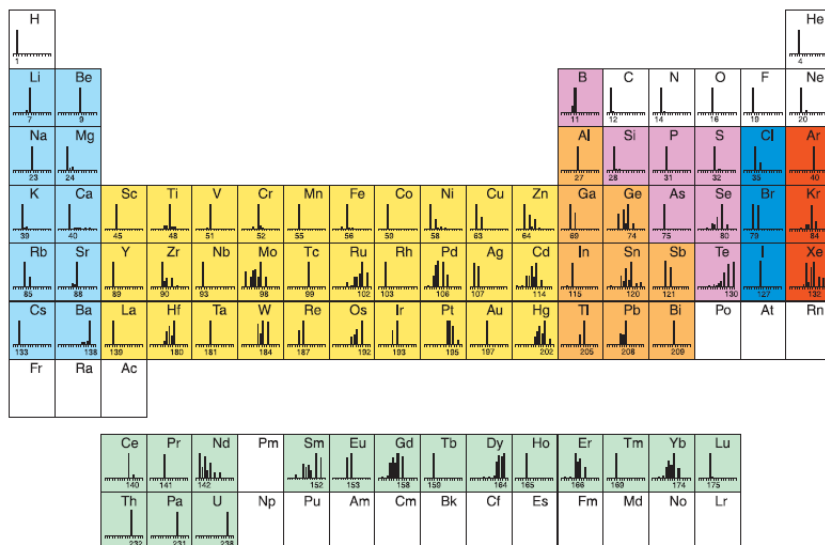


Figura 5.1. Elementele analizate folosind ICP-MS (color) (***2011)

Un avantaj al acestei metode constă în posibilitatea de a analiza simultan până la 62 analiți chimici pentru un eșantion (Figura 5.1.1). Alte avantaje ale utilizării tehnicii ICP-MS sunt: limitele de detecție mai mici de 1 ppt (parte per trillion) pentru o mulțime de elemente, concentrațiile determinate începând de la nanograme, cea mai mare productivitate, analiza izotopică cu precizie ridicată (**2011).

O diagramă schematică a ICP- MS este reprezentată în Figura 5.2.

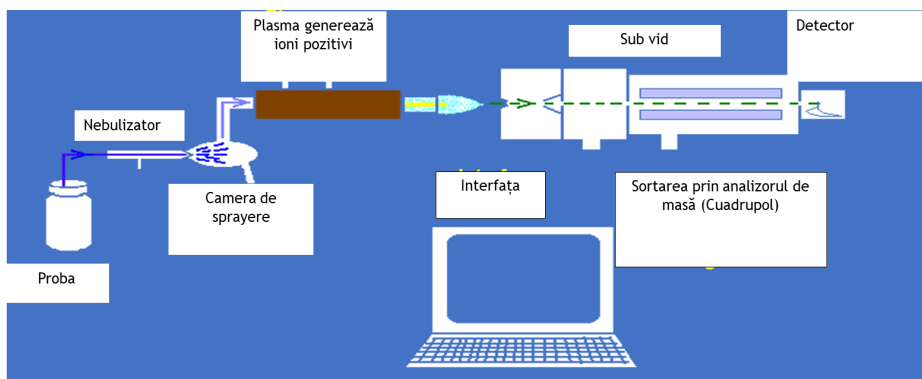


Figura 5.2. Reprezentarea schematică a ICP-MS

5.2. Principiul formării ionilor

În spectrometria de masă, prin aplicarea energiei, moleculele de analit chimic sunt transformate în ioni, care sunt separați pe baza raportului masă-sarcină (m/z) și direcționați către un traductor care transformă numărul de ioni (abundență) într-un semnal electric. Ionii corespunzători diferitelor rapoarte masă-sarcină (m/z) sunt direcționați secvențial către traductor prin scanare sau sunt făcuți să lovească simultan un traductor multicanal. Abundența de ioni reprezentată în raport cu raportul masă-sarcină (m/z) se numește un *spectru de masă*. Adesea, ionii încărcăți individual sunt produși în sursa de ionizare, iar raportul masă-sarcină (m/z) este redus chiar la masă, astfel încât spectrul este reprezentat ca număr de ioni în raport cu masa (Skoog et al., 2007).

5.3. Introducerea probelor

După cum știm, pentru analiza ICP-MS, probele sunt în formă lichidă. Cu toate acestea, probele trebuie introduse în torță fie sub formă gazoasă, fie sub formă de aerosoli. Din acest motiv, probele lichide necesită nebulizarea. Prin intermediul unei pompe peristaltice, proba lichidă este pompată dintr-un vial, direct în nebulizator. Pe un vârf ascuțit, se formează picături lichide ce devin nebulizate din cauza argonului care curge direct un al doilea vârf ascuțit perpendicular pe cel anterior. În torță, o cantitate mică de aerosol creat trece repede și cea mai mare parte a eșantionului condensează pe pereții nebulizatorului și este eliminat în vasul de colectare (Figura 5.3) (Bazilio et al, 2012).

Torța ICP constă dintr-o bobină de inducție de cupru înfășurată în jurul unei structuri concentrice de cuarț. Argonul curge continuu în întreaga torță de cuarț, iar un generator de radiofrecvență (R.F.) alimentează bobina R.F. la frecvențe oscilante. Generarea plamei (un amestec gazos conductor electric) are loc atunci când argonul este supus unei scânteii de la o unitate Tesla. Scânteia ionizează o parte din argon, iar cationii și electronii produși din aceasta accelerează către bobina R.F. Cationii și electronii se ciocnesc cu alte molecule de argon în timpul acestei accelerări, creând temperaturi ridicate. Cu argonul amplu furnizat, plasma va ajunge la echilibru și va rămâne la o temperatură constantă de aproximativ 6000°C pe durata analizei (Bazilio et al, 2012).

Aerosolii produși prin nebulizare intră în această plasmă cu temperatură ridicată, unde sunt supuși procesului de atomizare. Acești atomi vor continua să se deplaseze prin plasmă, absorbind energia până când eliberează un electron, devenind ionizat, iar procesul se numește ionizare. Acești ioni nou formați, din torță ajung la interfață (Bazilio et al, 2012).

5.4. Sursa de plasmă

Sursa constă din trei tuburi concentrice de cuarț prin care curge argon la o viteză totală cuprinsă între 11 și 17 L/min. Diametrul celui mai mare tub este de aproximativ 2.5 cm.

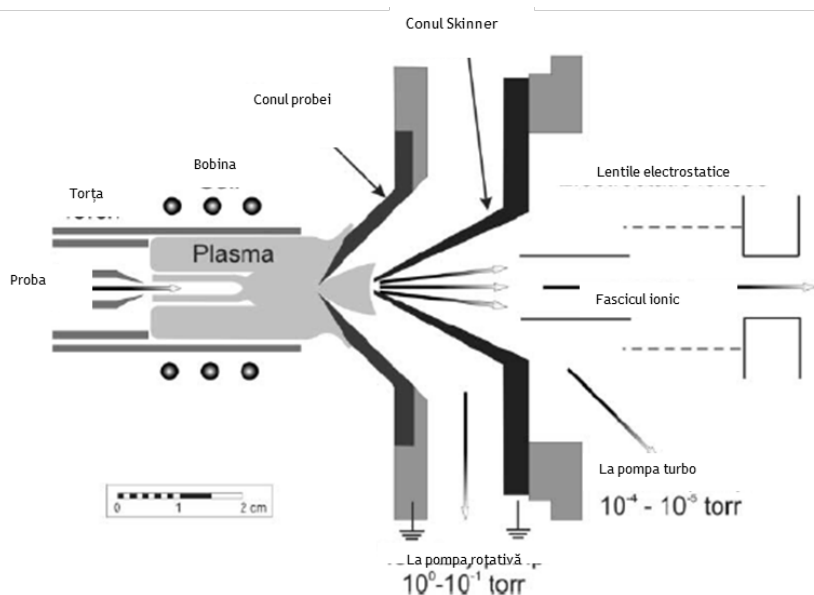


Figura 5.3. Secțiunea zonei de introducere a probei și a regiunii interfeței (Wilschefski et al., 2019)

În jurul părții superioare a acestui tub este o bobină de inducție răcită cu apă, alimentată de un generator de radiofrecvență, care radiază la o putere de 0.5 până la 2 kW, la 27.12 MHz sau 40.68 MHz. Ionizarea argonului curgător este inițiată de o scânteie de la o bobină Tesla. Ionii rezultați și electronii lor asociați interacționează apoi cu câmpul magnetic fluctuant (etichetat H în Figura 5.4), produs de bobina de inducție I. Această interacțiune determină ca ionii și electronii din interiorul bobinei să curgă în căile circulare închise prezentate în Figura 5.4. Rezistența ionilor și electronilor la acest flux de încărcare, provoacă încălzirea ohmică a plasmei (Skoog et al., 2007).

Temperatura I.C.P. este suficient de ridicată încât trebuie izolată termic de cilindrul de cuarț. Izolarea se realizează prin curgerea argonului tangențial în jurul pereților tubului, așa cum indică săgețile din Figura 5.4. Fluxul tangențial răcește pereții interiori ai tubului central și centreează plasma radial (Skoog et al., 2007).

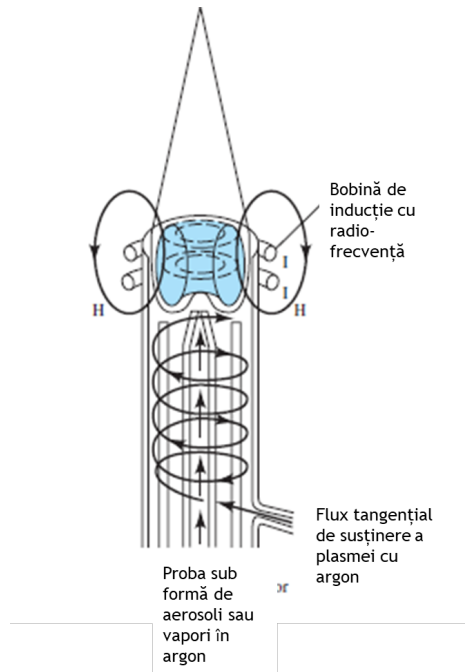


Figura 5.4. Sursa plasmă (Skoog et al., 2007)

Instrumentele I.C.P. recente au încorporat geometria de vizualizare axială, așa cum este prezentat în Figura 5.5, în care torța este rotită cu 90° . Geometria axială a fost inițial folosită pentru torțele utilizate ca surse de ionizare pentru spectrometria de masă. Mai recent, torțele axiale au devenit disponibile pentru spectrometrie de emisie. Mai multe companii, de fapt, produc torțe care pot fi comutate de la geometria de vizualizare axială la radială în spectrometria de emisie atomică. Geometria radială asigură o mai bună stabilitate și precizie, în timp ce geometria axială este utilizată pentru atingerea unor limite de detecție mai mici (Skoog et al., 2007).

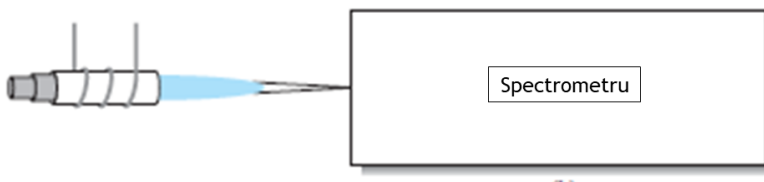


Figura 5.5. Geometria axială pentru sursa de plasmă ICP-MS (Skoog et al., 2007)

5.5. Regiunea interfeței

În general, interfața poate fi descrisă ca fiind punctul în care proba din zona I.C.P. a instrumentului, este introdus în zona spectrometrului de masă (M.S). Partea de interfață a instrumentului servește la cuplarea porțiunilor I.C.P. și M.S.. Prima componentă cu care matricea probei se confruntă după ionizare în torța I.C.P. este conul dispozitivului. Acesta este un con răcit cu apă, cu un orificiu mic, care permite gazului cu plasmă fierbinte să intre într-o cameră de depresurizare. În această cameră se produce răcirea rapidă și astfel expansiunea rapidă a gazului. O fracțiune din acest gaz trece apoi prin skimmerul conului și într-o cameră care este menținută la un vidul înalt al spectrometrului de masă (Figura 5.3). Această reducere a presiunii în două etape permite gazului ionic să intre în spectrometrul de masă la temperatura și presiunea corespunzătoare (Bazilio et al, 2012).

5.6. Analizorul de masă: tehnologia cuadrupol

După ce trece prin eșantion și skimmerile conurilor, fluxul de ioni este concentrat în regiunea cuadrupolilor. Ionii generați în plasmă sunt aproape toți încărcăți pozitiv și au tendința de a se respinge reciproc. Ionii trec printr-un cilindru metalic încărcat care păstrează fasciculul de ioni de la lentila divergentă (Bazilio et al, 2012).

Spectrometria de masă este utilizată pentru a furniza informații despre compoziția elementală a diferitelor tipuri de probe, structurile moleculelor anorganice, organice și biologice, compoziția calitativă și cantitativă a amestecurilor complexe, structura și compoziția suprafețelor solide și rapoartele izotopice ale atomilor din probe. Electronii energici se ciocnesc cu moleculele de analit și conferă suficientă energie pentru a lăsa moleculele într-o stare excitată. Relaxarea apare adesea prin fragmentarea unei părți a ionilor moleculari pentru a produce ioni de mase inferioare (Bazilio et al, 2012).

Ionii sunt dispersați în analizorul de masă pe baza raportului masă-sarcină (m/z). Spectrometrele de masă necesită presiuni scăzute în toate componentele instrumentului, cu excepția procesorului de semnal și a citirii. Capacitatea unui spectrometru de masă de a face

diferența între mase este de obicei menționată în ceea ce privește rezoluția sa, care este definită de $R=m/\Delta m$. În ecuație, Δm este diferența de masă dintre două vârfuri adiacente care sunt doar rezolvate, iar m este masa nominală a primului pic (Bazilio et al, 2012).

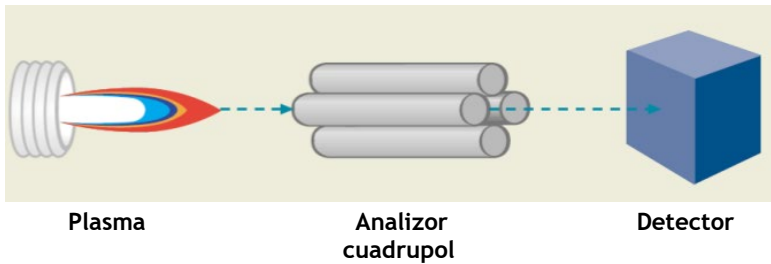


Figura 5.6. Structura cuadrupolului spectrometrului de masă (Banerjee, D.)

Cuadrupolul spectrometrului de masă (Figura 5.6) este cel mai frecvent tip de spectrometru de masă utilizat în spectroscopia atomică de masă. Patru tije cilindrice paralele servesc ca electrozi. Ionii sunt accelerați în spațiul dintre tije cu un potențial de 5 până la 10 V, în timp ce tensiunea de curent alternativ și de curent continuu pe tije sunt crescute simultan, dar cu un raport constant. Cuadrupolul este un filtru pentru masă care permite accesul la traductor numai al ionilor cu o rază limitată de valori m/z . Ionii care nu sunt de m/z corect intră în coliziune cu tijele sau ies din calea dintre tije și sunt pompați din sistem. Spectrometrul de masă al Elan DRCe scanează în milisecunde domeniul de masă de la 5 la 270 amu (Bazilio et al, 2012).

Ionii care ies din analizorul de masă intră în detector. Elan DRC- e este echipat cu un detector cu mod dublu (Figura 5.7). Ionii care ies din cuadrupol produc un semnal amplificat care este procesat de detector și trimis la calculator pentru prelucrarea datelor. Detectorul este compus din 26 dinode. Ionii care ies din spectrometrul de masă lovesc suprafața activă a primei dinode înclinată. Aceasta permite ionilor să urmeze o cale curbată, separând ionii de semnal de zgomotul de fond (neutru și radiații de sursa de ioni). Dinoda eliberează un electron de fiecare dată când un ion o lovește. Electronii eliberați de la prima dinodă lovesc a doua dinodă și mai mulți electroni sunt eliberați.

Propagarea în cascadă a electronilor continuă până când se creează un impuls măsurabil. Un sistem de numărare a pulsului numără ionii care au lovit mai întâi dinoda. Dacă numărul de impulsuri depășește aproximativ 2×10^6 numărări, o dinodă izolată este comutată la potențialul de împământare, dezactivând secțiunea de puls a detectorului. Porțiunea analogică a detectorului este încă disponibilă pentru măsurarea curentului produs de ionii care lovesc primele 23 de dinode (Bazilio et al, 2012).

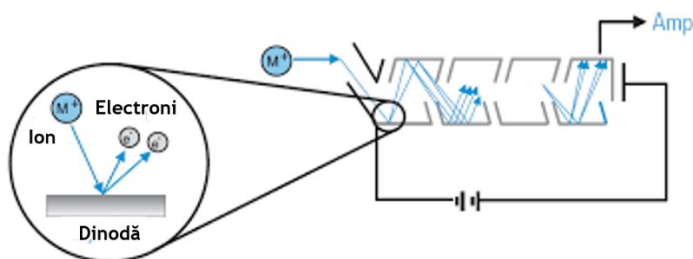


Figura 5.7. Detectorul de ioni (Banerjee, D.)

5.7. Celula Dinamică de Reacție (D.R.C).

Celula dinamică de reacție (D.R.C.) (Figura 5.8) este un cuadropol închis care acționează ca interfață între camera de ionizare cu lentilă unică și camera de vid înaltă a analizorului de masă. Gazul de reacție este introdus printr-un colector de gaz curat și controlat de unul sau ambele regulatoare de debit masic, cu debit redus (3 cm). Fasciculul de ioni este introdus în celula dinamică de reacție printr-un orificiu de intrare. Ionii ies din celulă printr-o deschidere care comunică cu numai cu prefiltrul și, prin urmare, sunt transferați în filtrul de cuadropolului de masă. Gazul de reacție iese din celulă atât prin orificiile de intrare, cât și prin cele de ieșire. Pentru experimente fără gaz de reacție, fluxul de gaz este oprit, iar incinta celulei dinamice de reacție este deschisă pentru aerisire în camera de vid înalt (Tanneer et al., 1999).

Camera este presurizată de un gaz de reacție. Orice gaz poate fi utilizat pe baza capacității sale de a reacționa cu interferentul, de a reacționa cu analitul, de a disocia speciile poliatomice, de a transfera electroni sau protoni. Se ejectează toate produsele de reacție nedorite și se îndepărtează din celulă. Numai ionii de analit sunt concentrați atât

prin celula de reacție, cât și prin cuadrupolul analitic (Tanneer et al. 1999).

Avantajele celulei dinamice de reacție sunt: pierderea minimă de sensibilitate (coliziunile nu sunt calea de îndepărtare a interferențelor primare, ea promovează deplasarea analitului prin celulă), nu sunt stabilite bariere de energie cinetică, reacțiile sunt previzibile, interferențele sunt eliminate (Tanneer et al. 1999).

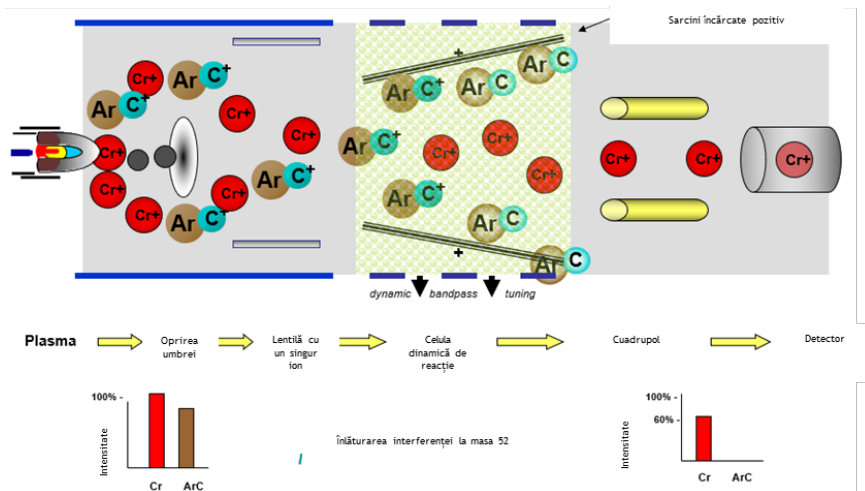


Figura 5.8. Celula Dinamică de Reacție (Perkin Elmer ppt)

5.8. Metode pentru cuantificare

ICP-MS este o tehnică care permite măsurarea elementelor și a izotopilor acestora pe un interval dinamic foarte larg. ICP-MS este o tehnică comparativă: necesită un set de standarde bine definite și/sau materiale de referință pentru o calibrare precisă. O varietate de materiale de referință pot fi utilizate în măsurători chimice: substanțe pure (fie substanțe chimice în esență pure, fie substanțe bine caracterizate care conțin urme de impurități); soluții standard și amestecuri de gaze preparate din substanțe pure precursorare; matrici de materiale de referință (imitând compoziția chimică a substanțelor investigate). De asemenea, trebuie remarcat faptul că metodele de

măsurare sunt adesea standardizate, standardele de analiză sunt definite printr-o procedură exactă (Bulska et al., 2016).

Principalele metode de cuantificare folosind ICP-MS sunt: analiza semicantitativă (rapidă în scopul verificării, furnizează date semicantitative, informații privind interferențele spectrale), calibrarea externă (asigură o precizie ridicată, cele mai mici limite de detecție posibile, posibilitatea de a utiliza standarde multi-element, trasabilitatea la material de referință certificat), calibrarea cu standardul intern (I.S.) (asigură o precizie ridicată, cea mai mică limită de detecție posibilă, utilizarea standardelor multielement, trasabilitatea la standarde de puritate înaltă, robustă pentru fluctuațiile instrumentale, raportul dintre intensitatea semnalului analitului și cea a standardului intern), măsurătorile raportului izotopic (robust pentru fluctuația instrumentului și efectul matricei, robust pentru recuperarea slabă a procedurii analitice), diluarea izotopică (acuratețe ridicată; cea mai scăzută incertitudine, fără interferențe; analitul acționează ca atare, fiind util în determinarea oligoelementelor și în specificații, îndeplinește cerința ca „metodă finită” (Bulska et al., 2016).

Metoda de calibrare externă se bazează pe prepararea standardelor care conțin cantități cunoscute de element ce urmează să fie măsurat. Aceste standarde sunt apoi introduse în spectrometrul de masă, iar intensitățile semnalelor ionice sunt înregistrate. Intensitățile semnalului pot fi legate de concentrațiile cunoscute ale standardelor elementare. Dependențele de concentrație a semnalului obținute sunt esențiale pentru o cuantificare ulterioară. Calibrarea externă este cea mai populară abordare a calibrării. Este utilizată pe scară largă pentru analiza multor tipuri de probe (Bulska et al., 2016).

Pentru a analiza metalele și metaloizii din diferite probe de mediu, cum ar fi apele de suprafață, apa subterană, apa potabilă, solul/sedimentele și biota, este necesar să se efectueze etapa de digestie. Tehnica cea mai utilizată este digestia cu microunde, folosind cuptorul cu microunde Anton Paar (Figura 5.9). Concentrația elementului de interes se determină folosind ICP-MS Elan RDC-e. Spectrometria de masă cu plasma cuplată inductiv (ICP-MS) se aplică la determinarea concentrațiilor mici dintr-un număr mare de elemente (Figura 5.10). Când este necesară determinarea concentrațiilor formelor

dizolvate, probele trebuie filtrate și conservate în acid înainte de analiză.



Figura 5.9. Cuptorul cu microunde Anton Paar (DDNI)



Figura 5.10. ICP - MS Eland DRCE Perkin Elmer (DDNI)

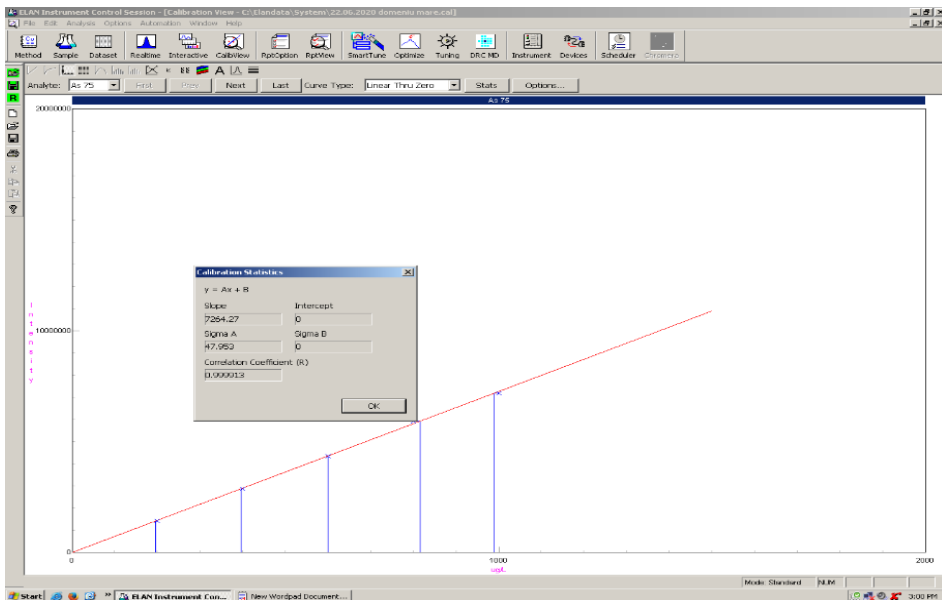


Figura 5.11. Curba de etalonare pentru arsen (75), folosind ICP - MS Elan DRCE (DDNI)

Curbele de etalonare se fac de obicei folosind 3-5 soluții standard din etaloane multielement, care conțin toți analiții de determinat, precum și soluția martor. Există posibilitatea unei analize cantitative simultane a datelor de până la 62 de analiți cu o precizie de $\pm 1-2\%$.

În Figura 5.11 este prezentată curba de calibrare pentru arsen, în 5 puncte, cu $R^2 = 0.9999$. Prin extrapolare pe curba de etalonare după măsurarea intensității probei mineralizate, lichide, se poate determina concentrația elementul dorit.

5.9. Bibliografie

****2011, https://www.perkinelmer.com/CMSResources/Images/44-74849tch_icpmsthirtyminuteguide.pdf

Banerjee D., Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS), (<https://www.iitk.ac.in/che/pdf/resources/ICPMS-reading-material.pdf>)

Bazilio A., Weinrich J., 2012, The easy guide to: Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry (ICP - MS), 12 pp.

Bulska E, Wagner B. 2016 Quantitative aspects of inductively coupled plasma mass spectrometry. Phil. Trans. R. Soc. A 374: 20150369.

Jorge E.M., Botte S.E., Ruben H.F., 2010. Heavy metals, Major Metal, Trace Elements, Book Chapter In: Handbook of Water Analysis, Second Edition, Leon M.L. Nollet, CRC Press, US, 745p.

Kashani A., Mostaghimi J., 2010. Aerosol characterization of concentric pneumatic nebulizer used in inductively coupled plasma–mass spectrometry (ICP-MS), Atomization and Sprays, 20(5):1-19.

Skoog D.A., Holler J.F., Crouch, S.R., 2007. Principles of Instrumental Analysis, Thomson Brooks/Cole.

Tanner S.D., Baranov V.I., 1999. Theory, Design and operation of Dynamic Reaction Cell for ICP-MS, Perkin-Elmer Sciex Instruments, Ontario, Canada L4K 4V8, Atomic Spectroscopy, 20 (2), 45-52.

Wilschefski S.C., Matthew B., 2019. Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: Introduction to Analytical Aspects, Clin. Biochem, 40(3) 133, 1-19.

Chapter 6. Cromatografia gazoasă cu detector de masă (GC-MS) pentru analize de mediu

Victor Ciornea¹, Anastasia Ivanova¹, Elena Zubcov^{1,2}, Antoaneta Ene²

¹*Institute of Zoology, Chisinau, Republic of Moldova*

²*INPOLDE interdisciplinary research network, Dunarea de Jos University of Galati, 111 Domneasca St., Galati, Romania*

6.1. Introducere

Cromatografia de gaze este cea mai eficace metodă de separare a amestecurilor multicomponente volatile și semivolatile. Pe de altă parte, spectrometria de masă este cea mai sensibilă metodă de analiză structurală, fiind o tehnică microanalitică. Spectrometria de masă poate fi considerată o tehnică de excepție și dexteritate unică la măsurarea maselor moleculare relative și identificarea structurilor necunoscute, cu oportunitatea de a furnizează informații structurale detaliate despre majoritatea componentelor prezenți în mostre. În cuplu aceste două metode, GC-MS, se aplică cu succes în diferite domenii de analiză, în analize calitative și cantitative, cum ar fi criminalistică, medicină, industria farmaceutică și alimentară, analiza mediului, etc. Tehnica GC-MS permite analiza concentrațiilor de ordinul pg/mL și mai mici.

6.2. Metodologie

Laboratorul Hidrobiologie și Ecotoxicologie al Institutului de Zoologie posedă în dotare o unitate GC-MS de ultima generație, model "Agilent 8860 GC System" cuplat cu detector "5977B MS Detector" și coloană de separare model Elite MS-5 cu precoloană (Figura 6.1). Utilizarea acestuia este aplicabilă pentru determinări GC-MS pe un spectru larg de indicatori, în special pentru determinarea ecotoxicanților organici de origine antropogenă (Bogdevich & Ene, 2015; Falaki, 2019; Hübschmann, 2015), cum sunt hidrocarburile aromatice policiclice (PAH), bifenili policlorurați (PCB), pesticide organoclorurate și organofosforice, etc.



Figura 6.1. Imaginea unității GC-MS, model "Agilent 8860 GC System" cuplat cu "5977B MS Detector"

Măsurătorile GC-MS pot fi efectuate în câteva modalități de lucru, SCAN, SIM (selected ion monitoring), sau combinat SCAN/SIM. Selectarea regimului de lucru SCAN presupune alegerea unui anumit domeniu al spectrului de masă și identificarea aproximativă a tuturor componentelor. Identificarea componentelor se face în comparație cu unele biblioteci MS, cum ar fi biblioteca NIST (Figura 6.2). Acest regim de lucru oferă informații calitative despre componentele prezente în mostre.

În Figura 6.2 se observă o secvență de cromatogramă TIC efectuată în regim SCAN și identificarea pesticidului organofosforic "parathion" prin compararea spectrului obținut cu cel al bibliotecii MS NIST. În dreapta sus este prezentat spectrul de masă, cationii identificați și timpul de retenție, 17.949 min. În acest exemplu, la timpul de retenție 17.949 min au fost identificați mai mulți cationii cu masa relativă m/z (în ordinea descrescătoare a intensității liniilor spectrale): 291, 109, 97, 125, 57, 93, 218, 160 și 176. În dreapta, jos, este prezentat spectrul de masă din biblioteca NIST al componentului identificat cu cea mai mare probabilitate. Probabilitatea cea mai mare a componentului identificat este pentru paration, circa 49.8 % și izomerii lui (Figura 6.2, pe mijloc, jos, patru poziții).

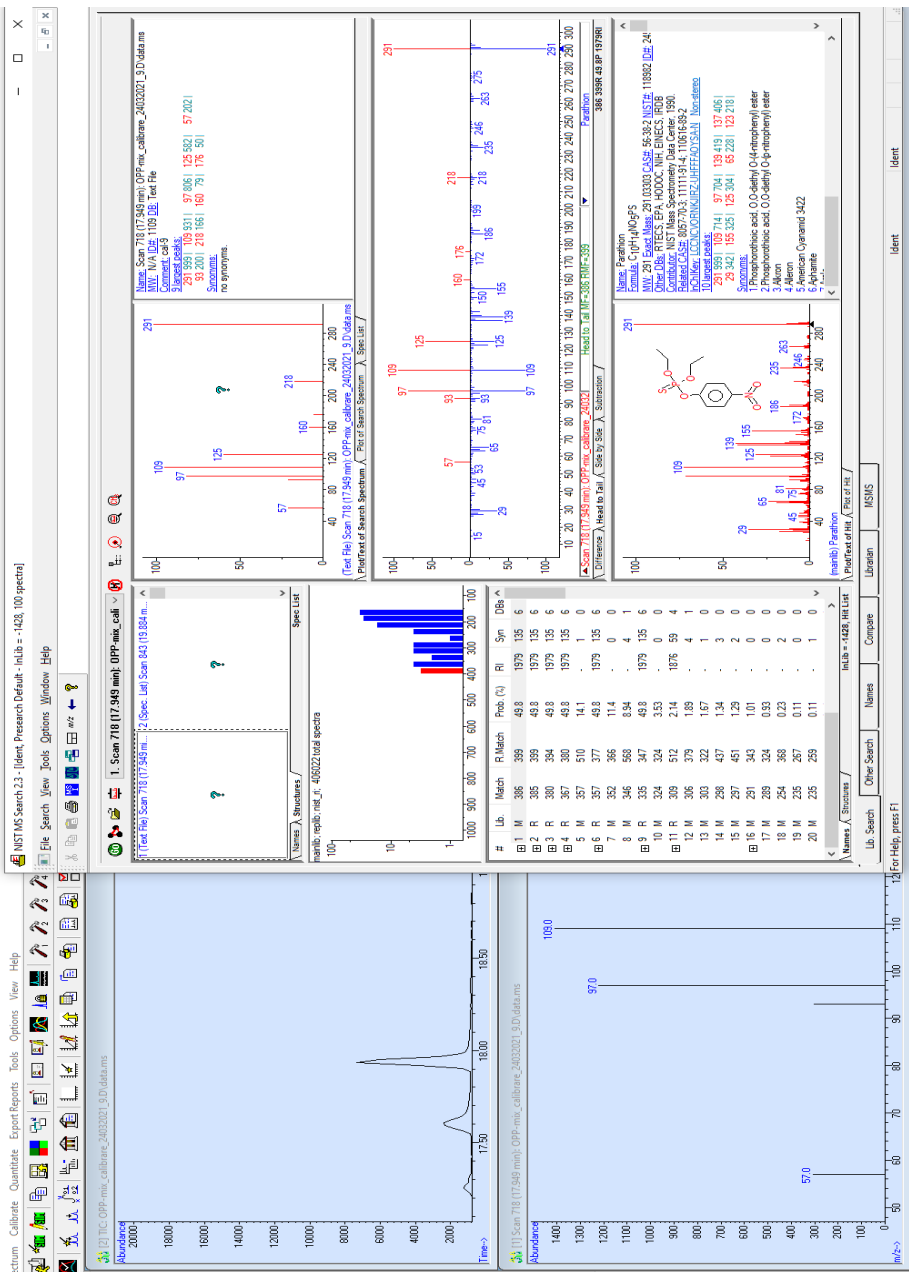


Figura 6.2. Vizualizarea unei secvențe de cromatogramă TIC efectuată în regim SCAN și identificarea pesticidului organofosforic "parathion" prin compararea spectrului obținut cu cel al bibliotecii MS NIST.

În dreapta, la mijloc, este prezentat comparativ, cu roșu, spectrul de masă obținut pentru timpul de retenție 17.949 și, cu albastru, spectrul conform informațiilor bibliotecii NIST. Aici, în același timp, sunt furnizate câteva informații suplimentare, cum ar fi: numele componentului, formula brută, masa molară, numărul CAS și unele dintre cele mai comune sinonime pentru acest compus.

Prin metoda SIM, masele individuale ale ionilor (m/z) sunt selectate continuu sau când se dorește măsurarea mai multor ioni, fiecare este detectat în secvență pentru o perioadă de timp. În modul de lucru SIM sensibilitatea crește de aproximativ 1000 de ori față de modul de lucru SCAN. Rezultatele cromatogramelor TIC obținute în regim SIM servesc pentru construirea curbelor de calibrare ale componentilor de analizat și elaborarea metodelor de determinare cantitative.

Figura 6.3 prezentată câteva informații despre o metodă pentru determinarea unor pesticide organofosforice cum sunt: O,O,O-trietilfosforotioat, tionazin, sulfotep, forat, dimetoat, prometon, simazin, atrazin, disulfoton, metil-paration, alaclor, paration, butaclor și famfur. În calitate de soluție standard primară a servit soluțiile 48469 (Sigma Aldrich). Ca standard intern (SI), s-a utilizat soluția PCB-29 cu concentrația de 0,5 $\mu\text{g/ml}$.

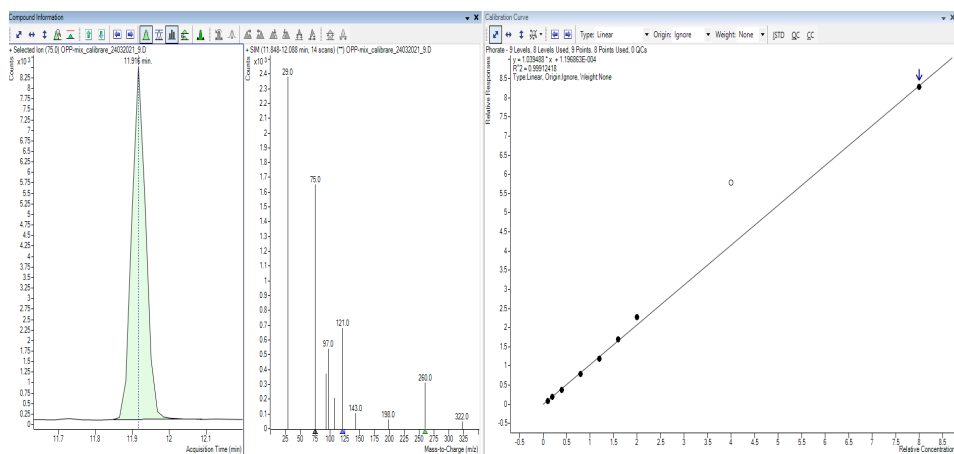


Figura 6.3. Vizualizarea informațiilor ce rezultă în regim SIM; secvență de cromatogramă integrată cu timpul de retenție, spectrul și datele m/z caracteristice cationilor și curba de calibrare

Timpul de retenție, cationii caracteristici selectați pentru componenții din soluției sunt prezentați în Tabelul 6.1. Condițiile tehnice ale metodei sunt descrise în Tabelul 6.2. Injectarea a fost efectuată manual.

Tabel 6.1. Componenții soluției de calibrare și informații conexe.

Semnal	Compus	Numărul CAS	τ , min	Cation, m/z		
				1	2	3
1	O,O,O-trietilfosforotioat	126-68-1	5,083	121	198	93
2	Tionazin	297-97-2	10,565	97	107	143
3	Sulfotep	3689-24-5	11,514	322	29	97
4	Forat	298-02-2	11,903	75	121	260
5	Dimetoat	60-51-5	12,573	87	93	125
6	Prometon	1610-18-0	12,699	58	168	210
7	Simazin	122-34-9	12,785	44	201	186
8	Atrazin	1912-24-9	12,933	200	215	58
9	Disulfoton	298-04-4	14,169	88	29	97
10	PCB29 (SI)	15862-07-4	15,285	256	186	93
11	Alaclor	15972-60-8	16,206	160	188	146
12	Metil-paration	298-00-0	16,206	125	109	263
13	Bromacil	314-40-9	17,276	205	42	70
14	Metolaclor	51218-45-2	17,591	162	238	91
15	Paration	56-38-2	17,952	291	109	97
16	Butaclor	23184-66-9	19,886	57	176	160
17	Famfur	52-85-7	22,203	218	93	125

Se observă o bună separare a componenților soluției de calibrare. Rezoluția de identificare a picurilor pe cromatograme este 0.001 minute. Integrarea picurilor s-a realizat în regim automat (Figura 6.3, fereastra stânga). Pentru fiecare component s-a ales câte 3 cation specifici, primul fiind pentru identificarea cantitativă a componentului, iar doi pentru identificare calitativă (Figura 6.3, fereastra mijloc). Curba de calibrare a fost construită din 9 nivele de concentrații (Figura 6.3 fereastra dreaptă).

Tabel 6.2. Condițiile tehnice ale metodei

Carrier gas (mobile phase)	Helium, constant pressure
Injection	Manual
Injection volume	1 μ L
Injector	Splitless, 280 °C, 50 ml/min
Thermostat	Column Agilent J&W HP-5ms UI, 30 m \times 0.25 mm, 0.25 μ m with precolumn 10 m Flow He 1 mL/min 80 °C (1 min) 10 °C/min up to 190 °C (4 min) 10 °C/min 300 °C (5 min)
Solvent delay	4 min
MS detector temperature	Source: 300 °C; Quad 150 °C
Transfer line	280 °C
MS Detector	SIM

Se observă o bună corelare a datelor GC-MS pentru aceste nivele. Pentru exemplul din Figura 6.3, componentul *forat*, coeficientul de corelare $R^2=0.99912418$, iar ecuația liniei de calibrare se prezintă ca $y=1.039488 \cdot x + 1.96863 \cdot 10^{-4}$. Aceasta, poate fi aproximată, deoarece $a \rightarrow 0$, iar $b \gg a$, la forma $y=1.039488 \cdot x$.

Aplicarea echipamentului de analiză GC-MS, permite analiza simultană a unei probe, condiționate, în timp de la câteva minute la câteva zeci de minute. Totuși pentru a efectua aceste analize, mostrele necesită pregătire și condiționare corespunzătoare. O metodă universală pentru pregătirea probelor pentru analize GC-MS (și nu numai) este metoda EPA 3500C. Metoda recomandată pentru pregătirea mostrelor solide este metoda EPA 3545A prin extracție PFE (Pressurized Fluid Extraction).

Pentru aplicarea acestui tip de extracție PFE este recomandat utilizarea unui extractor cu solvenți accelerat (ASE) de la ThermoScientific Dionex ASE 150 (ThermoFisher Scientific). Acest tip de extractor este un sistem automatizat pentru extracția, filtrarea și curățarea unei singure probe, găzduind o probă de la 1 la 100g și folosind

cu 50 până la 90% mai puțin solvent decât alte metode de extracție (Figura 6.4). Extragerea analiților din probe solide și semisolide se realizează în câteva minute.



Figura 6.4. Imaginea extractorului ThermoScientific Dionex ASE 150.

Purificarea extractelor se realizează conform metodei EPA 3530C. Această metodă include îndrumări pentru curățarea standard pe coloane cu silicagel a extractelor de probe care conțin PAH-uri, compuși fenolici, pesticide organoclorurate, organofosforice și PCB-uri.

Metodă recomandată pentru determinarea pesticidelor organofosforice, prin aplicarea tehnicii GC-MS pentru determinări pe diverse probe hidrochimice, este metoda EPA 8270E. Combinarea acestei metode, EPA 8270E, cu metodele EPA 3510, 3520, 3540, 3541, 3545, 3550, 3580 permit analiza concomitentă a circa 254 de componenți dintr-o singură injecție.

6.3. Bibliografie

- Bogdevich O., Ene, A., Capitolul 4 - Tehnica cromatografiei de gaze în analize de mediu, pp. 197-220, in: Instrumental Techniques for Environmental Investigations: Methodological Guide = Tehnici Instrumentale pentru Investiții de Mediu: Ghid Metodologic (Editor - Ene, A.), Ed. Tehnopress, Iasi, 2015, ISBN 978-606-687-233-1, 220 p.
- Falaki Foujan, 2019, Sample Preparation Techniques for Gas Chromatography, DOI:10.5772/intechopen.84259; <https://www.intechopen.com/chapters/66518>.
- Hübschmann Hans-Joachim, 2015, Handbook of GC-MS: Fundamentals and Applications, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.KGAA, Weinheim, Germany, 863 p.

Capitolul 7. Metode bazate pe spectrometria de masă de înaltă rezoluție pentru monitorizarea reziduurilor farmaceutice în apă, sol și sedimente

Carmen Lidia Chițescu¹, Antoaneta Ene²

¹ *Universitatea Dunărea de Jos din Galați, Centrul de cercetare MORAS, Facultatea de Medicină și Farmacie, Str. Alexandru Ioan Cuza nr.35, Galați, România*

² *Universitatea Dunărea de Jos din Galați, Centrul de cercetare internațional interdisciplinar INPOLDE, Facultatea de Științe și Mediu, Str. Domnească nr.47, 800008 Galați, România*

7.1. Introducere

Producția crescută de produse farmaceutice a condus la apariția reziduurilor acestora în mediul acvatic. Astfel, substanțele farmaceutice au fost identificate în soluri, sedimente, în apele de suprafață și subterane (Carmona et al., 2017).

Produsele farmaceutice de uz uman sau veterinar sunt concepute pentru a avea o acțiune biologică specifică însă impactul acestora asupra speciilor nevizate este necunoscut (Van Donk et al., 2016). Mai mult, aceste substanțe active sunt eliberate în mediu ca amestecuri complexe, care nu exclud efecte biologice neașteptate din cauza posibilelor interacțiuni sinergice sau antagoniste (Van Donk et al., 2016). Efectele farmaceuticelor asupra mediului acvatic au fost deja studiate, demonstrate și documentate (Vestel et al., 2016), însă și la om sunt posibile potențiale efecte negative, în special în ceea ce privește apariția rezistenței la antibiotice la bacteriile patogene (Malchi et al., 2014).

Deși reziduurile farmaceutice au fost recunoscute ca un grup cu potențial de risc cu privire la mediu, acestea nu sunt substanțe reglementate de Directiva-cadru pentru apă 2000/60 / CE și, prin urmare, ele nu sunt incluse în programele de monitorizare de rutină (Miarov et al., 2020).

Înțelegerea impactului biologic potențial al reziduurilor farmaceutice în mediu implică în primul rând identificarea și cuantificarea compușilor activi. Sunt necesare mai multe informații pentru a evalua anumiți compuși farmaceutici în ceea ce privește

concentrațiile lor în mediu și nivelurile de risc rezultate. Pentru prima dată, în 2013, Comisia Europeană a propus monitorizarea continuă a patru compuși farmaceutici de interes emergent: diclofenac, estrona (E1), 17- β -estradiol (E2) and 17- α -etinilestradiol (EE2) (Directiva 2013/39/EU). Noua lista de monitorizare din Decizia 2015/495/EU include de asemenea antibioticele din grupa macrolidelor.

Viitoarele proiectele și programe de monitorizare ar trebui să ia în considerare nu numai compușii prevăzuți de recente deciziile ale UE, ci o gamă mai largă de substanțe farmaceutice. În orice caz, o metodă analitică cuprinzătoare, unitară, care să identifice și să măsoare toate reziduurile farmaceutice posibile este nerealistă, deoarece ar trebui să cuprindă mii de compuși și metaboliți activi. Din această cauză, este necesară o preselectie a substanțelor, pentru a le identifica pe cele mai susceptibile de a pune presiune asupra mediului. Prioritizarea și selectarea compușilor țintă în campaniile de monitorizare a mediului se bazează, în general, pe identificarea hazardului, pe evaluarea expunerii la risc (von der Ohe et al., 2011). Compușii farmaceutici foarte utilizați, cum ar fi paracetamolul, carbamazepina, diclofenacul, amoxicilina, agenții hipolipemianți sau antidiabeticele ar trebui să fie incluse obligatoriu

Monitorizarea substanțelor chimice implică mai multe tipuri de activități de bază: prelevarea de probe, prioritizarea compușilor, extracția compușilor de interes și analiza instrumentală. Pe măsură ce tipurile de matrice în curs de investigare s-au variat, iar numărul și tipul de compuși analizați a crescut, au fost dezvoltate noi metode analitice.

Tehnicile avansate actuale bazate pe cromatografia de lichide în tandem cu spectrometria de masă (LC-MS) sunt capabile să confirme identitatea atât a unor compuși vizați (țintă) cât și necunoscuți la concentrații de ordinul ppt în probe complexe de mediu (Kaufmann, 2020). Screening-ul a sute de compuși în aceeași multi-metodă poate fi realizat în prezent utilizând spectrometria de masă de înaltă rezoluție (HRMS) (von der Ohe et al., 2011; Casado et al., 2019). Abordările analitice non-target bazate pe HRMS au fost dezvoltate rapid în ultimii ani. Deoarece analiții nu sunt selectați *a priori*, fișierele de date pot fi arhivate pentru o procesare retrospectivă pentru compuși „suspecți” sau de interes utilizând baze de date MS-MS (Alygizakis et al., 2019). Mai

mult, aceste instrumente de top devin în prezent disponibile în multe universități, institute de cercetare sau laboratoare de monitorizare a mediului, permițând dezvoltarea și implementarea de noi metode analitice.

Capitolul de față abordează tehnicile moderne care pot fi utilizate în prelevarea, extracția, purificarea și analiza reziduurilor farmaceutice din matrici de mediu precum apa, solul, sedimentele.

7.2. Prelevarea probelor

Obținerea unui eșantion reprezentativ al matricei de interes este o componentă principală a unui program de monitorizare a mediului. Planificarea campaniei de prelevare a probelor include: 1) selectarea metodei de prelevare, 2) determinarea cantității de eșantion necesare pentru metoda analitică, 3) identificarea măsurilor de asigurare a calității / controlul calității, 4) identificarea măsurilor de siguranță (Li and Migliaccio, 2010). Stabilirea punctelor (siturilor) de prelevare poate urma un model rațional, sistematic sau aleatoriu, în conformitate cu obiectivele studiului de monitorizare (Li and Migliaccio, 2010).

Conform practicilor convenționale de prelevare (ex. EPA Method 1694, *Pharmaceuticals and Personal Care Products in Water, Soil, Sediment, and Biosolids by HPLC/MS/MS*), pentru apa de suprafață, pentru fiecare sit trebuie colectat cel puțin un litru de probă de la aproximativ 30 cm sub suprafața apei în sticle curate de laborator. Recipientul se introduce cu gura în jos în apă și se umple sticla. Când există un curent de apă, sticla se ține contra curentului. Pentru a preveni degradarea probelor, acestea sunt transportate în laborator la temperaturi controlate (< 4 - 6 °C). De obicei sunt utilizate sticle brune pentru a preveni fotodegradarea. După filtrarea prealabilă printr-un filtru de hârtie, probele de apă trebuie congelate la -20 °C până când vor fi analizate pentru a preveni degradarea.

În ceea ce privește probele solide și semisolide, acestea pot fi colectate folosind borcane cu gură largă. Cantitatea de material umed trebuie să fie suficientă pentru a produce minimum 10 g de material solid uscat. Probele trebuie menținute la întuneric, la o temperatură

mai mică de 6 °C, de la momentul colectării până la primirea în laborator, apoi depozitate la mai puțin de -10 °C.

Orice contaminare în timpul prelevării și transportului probelor trebuie evitată.

Fișele de teren întocmite trebuie să includă procedurile de colectare a probelor, coordonate ale locației siturilor de eșantionare sau alte date pentru a identifica site-ul, data și ora prelevării.

7.3. Compușii monitorizați

Așa cum s-a menționat deja, este necesară o prioritizare a compușilor ce vor fi monitorizați înainte de efectuarea campaniei de prelevare și analiza propriu-zisă pentru a lua în considerare strategiile de prelevare, metodele de extracție și instrumentale adecvate pentru analiză.

Conform literaturii, diferite clase de compuși farmaceutici, incluzând antibiotice, antifungice, hormoni, analgezice, antidepresive / anxiolitice, agenți hipolipemianți, antidiabetice au fost selectate recent în numeroase studii de monitorizare (Chitescu et al., 2015; Carmona et al., 2017; Hollende et al., 2018).

Ca exemplu, compușii țintă incluși în programul de monitorizare din cadrul proiectului MONITOX sunt enumerați în Tabelul 7.1.

7.4. Extracția

Extracția, purificarea și concentrarea sunt operațiuni întâlnite în mod obișnuit în prepararea probelor de mediu pentru metodele analitice LC-MS. Extracția este unul dintre cei mai critici pași datorită complexității probei și a proprietăților fizico-chimice diferite (coeficienți de partiție octanol-apă, Log Kow și pKa) ale analiților țintă. Pentru apă, există disponibile metodele standardizate pentru determinarea contaminanților farmaceutici (EPA **Method 1694**) care implică de regulă extracția în fază solidă (SPE). SPE a fost dezvoltat ca o alternativă la extracția lichid-lichid (LLE), care necesită cantități mari de solvenți de înaltă puritate și manipulare extensivă a probelor, ceea ce poate fi o sursă importantă de erori. Mecanismul de retenție al SPE

implică interacțiuni hidrofobe sau ionice în funcție de tipul și proprietățile absorbantului.

Tabel 7.1. Compuși farmaceutici țintă incluși în programul de monitorizare 2019-2020 în cadrul proiectului MONITOX

Clasa	Compuși
Antibiotice	amoxicilină, ciprofloxacina, norfloxacina, flumequin, oxitetracilină, doxiciclină, dicloxacilină, eritromicina, cefuroxim, clindamicin
Hormoni	drospirenonă, etinil estradiol
Hipocolesterolemiant	acid clofibrice, provastatin
Antiinflamatoarele nesteroidiene	piroxicam, ketoprofen, indometacin, carprofen, diclofenac, acid meclofenamic, naproxen
Antiepileptice	carbamazepină
Antifungice	ketoconazol, fluconazol, clotrimazol, miconazol, enilconazol

Fiecare tip de cartus SPE poate folosi o mare varietate de sorbenti cum ar fi cel pe bază de silice (ex. C18), lipofil-hidrofil (HLB), cu schimb cationic mixt (MCX) sau schimb anionic mixt (MAX). Selecția sorbenților SPE se bazează pe proprietățile fizico-chimice ale analiților (pKa și Kow) și pe caracteristicile cartușelor SPE.

Cartușele HLB și C18 sunt utilizate în mod obișnuit în metodele multi-target pentru a reduce selectivitatea extracției. Cartușele SPE pot separa acizii humic și fulvic de analiții bazici sau pot separa lipidele neutre de analiții încărcăți. Reglarea pH-ului probelor și polaritatea eluanților sunt parametrii importanți în mecanismul de separare.

Procedura de extracție pentru probe de apă de suprafață

Metodele descrise mai jos utilizează proceduri de extracție în fază solidă (SPE) pentru a extrage analiții țintă din probele apoase. Se pot utiliza cartușe cu fază inversă tip Strata X, 200 mg / 6 ml. Tipul de sorbent pe bază de polimeri este potrivit pentru analiți neutri și

aromatici. Cartușele sunt preconditionate anterior cu 5 ml metanol apoi 5 ml apă. Au fost aplicate două proceduri SPE diferite pentru a „prinde” o gamă cât mai largă de compuși:

- porțiuni alicote de 100 ml apă (cu pH ajustat anterior la 3 cu acid acetic) se aplică în cartușul preconditionat, apoi coloana se spală cu 5 ml apă, urmată de 5 ml amestec metanol / apă 15% (v / v) și se usucă sub vid timp de 3 minute. Analizii sunt eluați cu 6 ml metanol. Eluatul este concentrat prin evaporare sub un flux de azot de înaltă puritate, la 42 °C și redizolvat în 25 μl metanol și 225 μl apă.

- porțiuni alicote de 100 ml apă se aplică în cartușul preconditionat, apoi coloana se spală cu 5 ml apă, urmată de 5 ml amestec metanol / apă 15% (v / v) și se usucă sub vid timp de 3 minute. Analizii sunt eluați în trei etape, mai întâi cu 3 ml metanol cu 0,5% amoniac, apoi cu 3 ml metanol cu 1,5% acid formic și în final cu 2 ml metanol. Eluatul combinat este concentrat prin evaporare sub un flux de azot de înaltă puritate, la 42 °C și redizolvat în 25 μl metanol și 225 μl apă.

Probele trebuie extrase în termen de 24 de ore de la scoaterea din congelator.

Procedura de extracție din probe solide

Extracția compușilor farmaceutici din sol sau sedimente este dificilă datorită complexității matricei. Majoritatea studiilor descriu utilizarea extracției lichide sub presiune (PLE), extracției cu ultrasunete (UAE), extracției lichid-lichid cu solvenți (LLE) sau extracției asistate cu microunde (MAE), urmate de o purificare a extractului prin extracție în fază solidă (SPE).

Probele solide de sol sau sediment sunt de obicei supuse uscării, măcinării și omogenizării pentru reducerea dimensiunii particulelor.

O metodă optimizată pentru UAE a fost aplicată în cadrul programului de monitorizare MONITOX și este descrisă mai jos:

- 5 g de proba sunt cântărite într-un tub de centrifugă de 50 ml. Reziduurile farmaceutice sunt extrase cu 20 ml solvent de extracție prin plasarea tubului într-o baie cu ultrasunete

timp de 1 oră urmate de agitare timp de încă o oră. Solventul de extracție este un amestec metanol:acid citric 0,2M - 50:50 (ajustarea pH-ului la 4,5 cu hidroxid de sodiu). Probele sunt centrifugate 15 minute la 3500 rpm și supernatantul transferat într-un balon de 50 ml. Procedura de extracție se repetă o dată, cu încă 20 ml solvent. Extractele sunt combinate, omogenizate și se adaugă apă MQ la 40 ml volum. O parte alicotă din extract care corespunde la 1 g de probă, diluată cu apă la o concentrație finală de 10% solvent organic este supusă purificării și concentrării prin SPE utilizând aceleași metode descrise pentru probele de apă de suprafață.

7.5. Analiza instrumentală

În mod tradițional, poluanții organici din matricile de mediu sunt analizați prin metode calitative sau cantitative bazate pe LC-MS (cromatografie de lichide tandem cu spectrometrie de masă) sau GC-MS (cromatografie de gaze tandem cu spectrometrie de masă) (Maure et al., 2013). Mai multe metode de analiză au fost elaborate și validate pentru determinarea de compuși farmaceutici în concentrații de ordinal ppt (ng L^{-1}) (Ripollés Vidal et al., 2014; Hollender et al., 2019). Spectrometria de masă de joasă rezoluție tandem MS-MS care utilizează analizoare cu trapa ionică (IT) sau triplu quadrupol (QQQ) sunt utilizate în mod obișnuit în metodele de screening-țintă (Maure et al., 2013).

Mai mulți factori trebuie luați în considerare în dezvoltarea metodelor LC-MS-MS: tipul și dimensiunile coloanei cromatografice, compoziția și debitul fazei mobile, influența pH-ului asupra separării compușilor și parametrii de ionizare și fragmentare ai spectrometrului de masă pentru sistemul tandem MS-MS (Liigand et al., 2017).

Deoarece mulți dintre contaminanții farmaceutici au o polaritate medie spre mare, cromatografia în fază inversă (RP-LC) este de obicei preferată, folosind ca fază mobilă o combinație de solvenți slabi (apă ultrapură) și solvenți cu polaritate mai mare (metanol, acetonitril) (Badea et al., 2020). Se preferă o abordare gradient de solvent, datorită avantajului obținerii de pic-uri ascuțite, precum și minimizării contaminării în coloana LC prin creșterea tăriei solventului la finalul

gradientului (Chitescu et al., 2015). pH-ul fazei mobile are o influență majoră asupra separării cromatografice, precum și asupra ionizării compușilor. În ESI (interfață de ionizare cu electrospray) trebuie să se utilizeze aditivi de fază mobilă volatili, având ca rezultat un mediu de ionizare ușor acid (HCOOH , CH_3COOH), ușor alcalin (NH_4OH) sau neutru ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) (Liigand et al., 2017). Optimizarea debitului poate de asemenea influența și separarea LC. Debitul ridicat are ca rezultat o scădere a timpilor de retenție și astfel scurtarea timpului de analiză LC, dar pe de altă parte, poate reduce și rezoluția separării cromatografice (Badea et al., 2020).

Parametrii analizorilor tandem LC-MS / MS printre care: debitul gazelor nebulizatorului, tensiunea de pulverizare ionică, potențialul de declustrare, temperatura sursei ionilor, energia de coliziune ar trebui optimizate în timpul dezvoltării metodei (Kaufmann et al., 2015). Ionizarea ESI atât în modul negativ cât și în modul pozitiv sunt extrem de sensibile pentru compușii polari și se aplică uneori cu diferite faze mobile (Badea et al., 2020).

În selectarea modului de achiziție a datelor pentru spectrometru ar trebui să se ia în considerare scopul proiectului și aplicabilitatea viitoare a metodei dezvoltate. Scanarea completă MS urmată de monitorizarea ionilor selectați (selected ions monitoring, SIM) sunt modurile de achiziție a datelor utilizate pe scară largă pentru analiza reziduurilor datorită selectivității ridicate, permițând atât cuantificarea cât și confirmarea în aplicațiile dezvoltate (Chitescu et al., 2015).

Evoluția tehnicilor analitice în tandem precum UHPLC (cromatografie lichidă de ultra înaltă performanță), cuplată cu spectrometrie de masă de înaltă rezoluție (HRMS) reprezentată de spectrofotometrul cu timp de zbor (TOF) și de spectrometria de masă tip Orbitrap, a condus la dezvoltarea metodelor non-țintă (non-target) și screening-ul de compuși „suspecți” ca noi abordări analitice care pot sprijini monitorizarea mediului (Hollender et al., 2019; Liigand et al., 2020).

UHPLC-Q Exactive quadrupol-Orbitrap LC-HRMS/HRMS reprezintă una dintre cele mai eficiente tehnici utilizate pentru identificarea și cuantificarea compușilor țintă, precum și pentru screeningul non-target (Kaufmann, 2020). Orbitrap-ul este un analizor de masă care captează

în mod dinamic ioni într-un câmp electric format între un electrod central sub forma de fus și un electrod exterior. Ionii circulă în jurul electrodului interior cu o frecvență axială care este direct proporțională cu raportul masă-sarcină (m/z), conform ecuației (1).

$$\omega_{\varphi} = \omega \sqrt{\frac{\left(\frac{Rm}{R}\right)^2 - 1}{2}} \quad (1)$$

unde: ω_{φ} este frecvența rotației unghiulare; R_m este raza caracteristică; ω este frecvența oscilațiilor axiale de-a lungul electrodului central; R este raza acestei spirale.

Aceste oscilații sunt detectate și convertite în spectre de masă printr-o transformată Fourier (Hecht et al., 2019) (Figura 7.1).

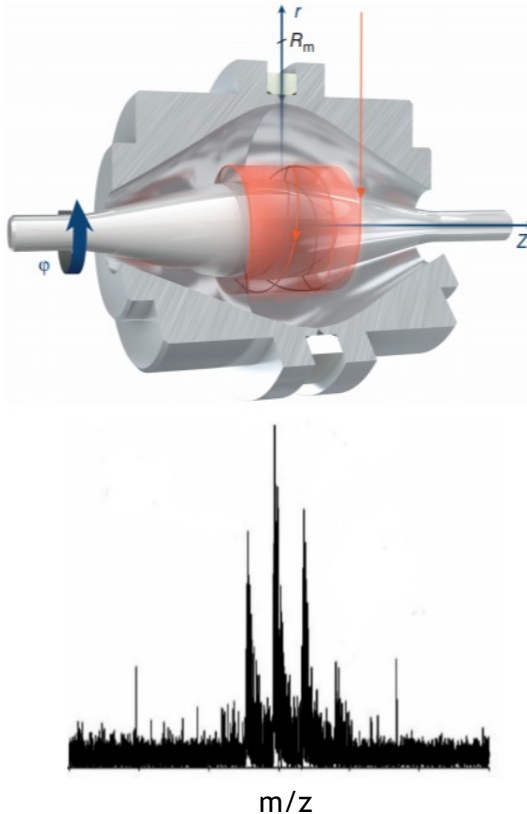


Figura 7.1. Diagrama analizatorului de masă Orbitrap, arătând traiectoria în spirală a unui ion în jurul electrodului central (după Hecht et al., 2019)

Spectrometrul de masă Orbitrap are de obicei o rezoluție de lucru de ~ 120.000 FWHM (full width at half maximum) la m/z 200. Rezoluția este dependentă de timpul de scanare, timpii de scanare mai lungi oferind o rezoluție mai mare.

Noul Q-Exactive Orbitrap HRMS este un sistem tandem cvadrupol-orbitrap, care permite scanări complete de înaltă rezoluție în full MS și abordarea MS-MS la înaltă rezoluție, fiind proiectat pentru măsurători de înaltă precizie și permițând analize MS-MS de confirmare (Hecht et al., 2019). Combinația între filtrul de masă cvadrupolar și analizorul Orbitrap oferă avantaje unice și complementare, în special în selectarea ionilor ce urmează a fi fragmentați în celula de fragmentare.

Pentru testele țintite (target-screening), abordările de tipul SIM (monitorizarea ionilor selectați) și MS² targeted prin monitorizarea reacției paralele (PRM) permit o sensibilitate și o selectivitate ridicate. Pentru screeningul non-țintă, elucidarea structurală și identificarea analiților pot fi realizate utilizând achiziția dependentă de date (DDA) sau achiziția independentă de date (DIA) (Kaufmann et al., 2015), folosind pentru procesarea datelor librării spectrale. În prezent, există diferite baze de date publice sau private conținând spectre MS-MS, care permit utilizatorilor să compare spectrele MS-MS obținute din analize proprii cu spectrele de referință:

- NBS/EPA/NIH Mass Spectral Data Base, G.W.A. National Bureau of Standards Washington;
- 'Eight peak index' by Mass Spectrometry Data Center of Royal Society, Cambridge;
- Norman MassBank (<https://massbank.eu/MassBank/>);
- Cluste în rețea ca mzCloudTM (<https://www.mycloud.com/#/>);
- ReSpect, NIST (The National Institute of Standards and Technology; <http://www.nist.gov/srd/nist1a.cfm>.)
- Global Molecular Social Networking (GNPS).

Procesarea spectrelor și analiza comparativă pot fi realizate manual, necesitând însă un volum de muncă și timp extinsiv, sau automat utilizând software-uri ca: Compound DiscovererTM Trace FinderTM, MassHunter sau MZmine. Următorii parametri au fost utilizați pentru metoda analitică utilizată în studiul de monitorizare menționat din cadrul proiectului MONITOX.

Parametrii LC

Sistemul LC utilizat pentru analiză a fost format din: pompă RS Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 Series cuplată cu compartimentul de coloane Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 Series TCC-3000RS și un autosampler Thermo Fisher Scientific Ultimate 3000 Series WPS-3000RS controlat de software-ul Chromeleon 7.2 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA și Dionex Softron GmbH parte a Thermo Fisher Scientific, Germania).

S-a aplicat un gradient de 15 minute pe o coloană C18 de înaltă performanță tip Accucore U-HPLC (150 x 2,1 mm, 2,6 μm), (Thermo Scientific). Debitul a fost stabilit de 0,4 ml min⁻¹ pentru a permite separarea compușilor selectați în sistemul U-HPLC. Faza mobilă a constat din: eluant A, 100% apă conținând 160 μl acid formic (pH 3,1); eluant B, 100% metanol conținând aceeași cantitate de acid formic. Pentru analiza hormonilor faza mobilă constă din: eluant A, apă conținând 1 mL/L amoniac 25%; eluant B, metanol conținând 1 mL/L amoniac 25%.

Pentru ambele faze mobile, gradientul este setat după cum urmează: 0-1 min 100% A; 1-2,5 min creștere liniară la 40% B; 2,5-10 creștere liniară la 100% B și menținere 3 min.; 13-13.2 scădere lineară la 0% B; 13,2-15 min. menținere 100% A. Temperatura coloanei a fost stabilită la 40 °C și volumul injecției la 15 μl. O sursă de ioni HESI a fost utilizată pentru ionizare în modul pozitiv și negativ.

Parametrii MS

Detectarea compușilor selectați s-a efectuat cu ajutorul unui spectrometru de masă Q-Exactive Orbitrap MS (Figura 7.2).

În dezvoltarea metodei a fost utilizată o abordare full scan urmată de fragmentare vDIA (achiziție independentă de date variabilă). În abordarea vDIA, pe lângă screening-ul complet, sunt ulterior utilizate un număr de evenimente de fragmentare pentru a acoperi întreaga gamă de ioni precursori, în aceeași analiză.

Astfel, datele de scanare completă atât în modul pozitiv, cât și în modul negativ au fost achiziționate la o rezoluție de 70 000 FWHM la m/z 200.



Figura 7.2. Spectrometrul de masă de înaltă rezoluție Q-Exacte Orbitrap

Pentru compușii de interes, se poate alege un domeniu de scanare de m/z 130-1000. În analiza de confirmare MS-MS, ionii precursori au fost fragmentați folosind următoarele intervale selectate consecutiv: m/z 95-205, 195-305, 295-405, 395-505 și 495-1005. Fragmentele ionice rezultate au fost măsurate cu o rezoluție de 35.000 FWHM atât în modul pozitiv, cât și negativ.

Detectia se bazează pe masa exactă calculată și pe timpul de retenție al compușilor țintă. Datele sunt evaluate de Quan / Qual Browser Xcalibur 2.3 (Thermo Fisher) și Thermo ToxID (versiunea 2.1.1., Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, SUA). Fereastra de toleranță a masei poate fi setată de la 5 la 10 ppm.

Pentru identificare, atribuirea pic-ului și integrarea pot fi realizate utilizând ionul precursor cel mai abundent și fragmente ionice rezultate, la timpul de reținere al compusului precursor (Figura 7.3).

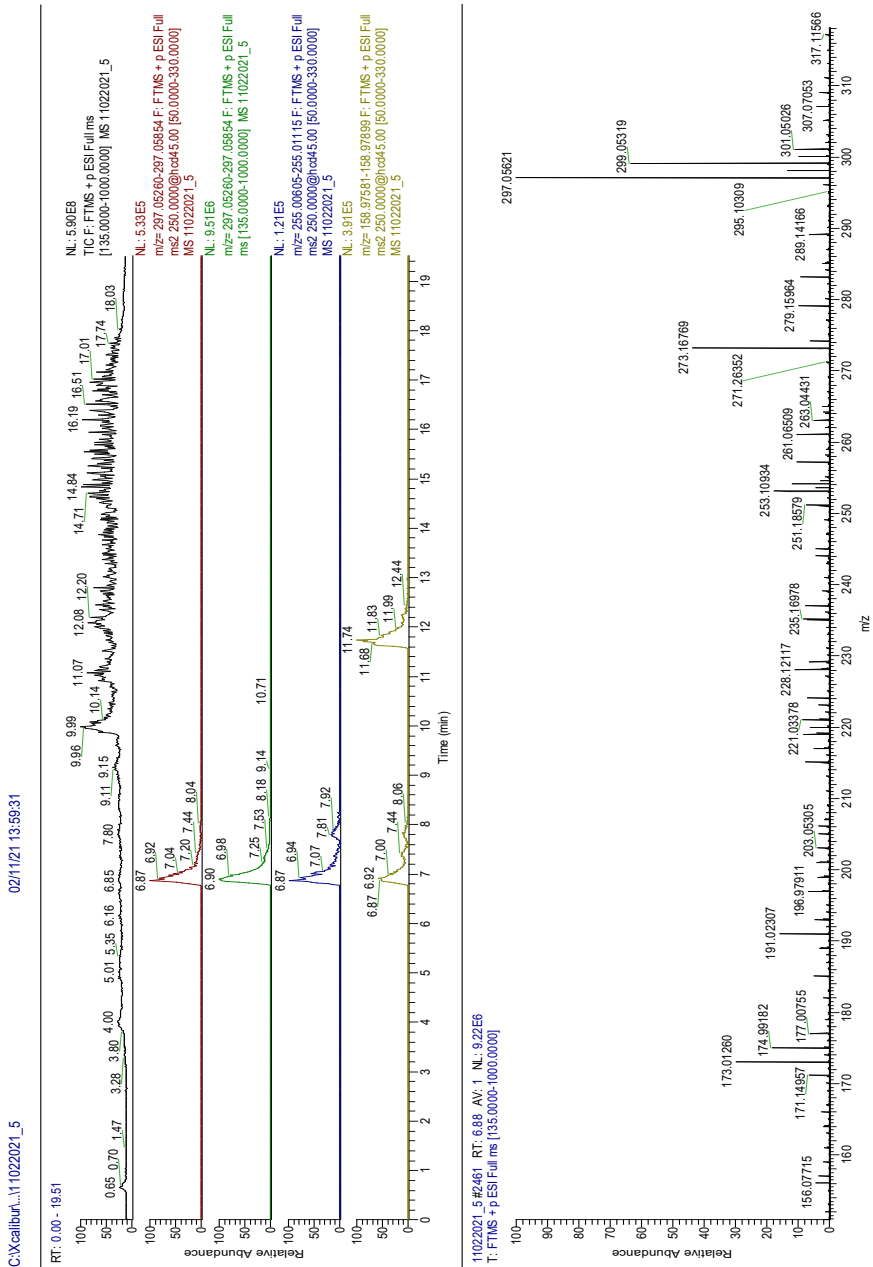


Figura 7.3. Ionul precursor m/z 297.0555 (imazalil) și fragmentele ionice m/z 255.00 și 158.97 la timpul de retenție 6.87 min. Cromatogramele au fost extrase cu o toleranță de 5 ppm.

Utilizarea abordării vDIA pentru screening non-target îmbunătățește selectivitatea și sensibilitatea analizei și permite identificarea reziduurilor în probe de mediu la niveluri de ppt în conformitate cu reglementările actuale ale UE (Figura 7.4).

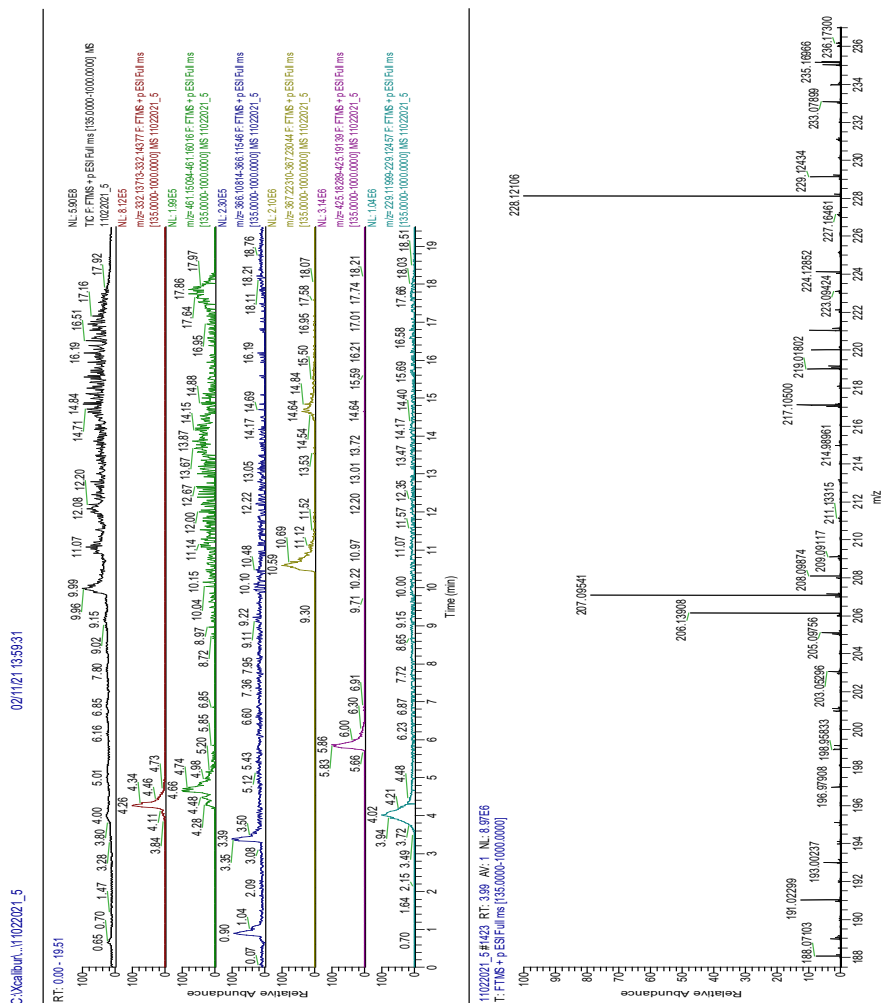


Figura 7.4. Cromatograme pentru o probă de apă prelevată din Dunăre (toleranță ± 5 ppm). De sus în jos: TIC (total ions current); m/z 332.14 ciprofloxacină; m/z 461.15 oxitettraciclină; m/z 366.10 amoxicilină; m/z 425.18 drospirenonă; m/z 229.12 bisfenol A.

7.6. Controlul de calitate. Validarea metodei

Controlul calității include analiza standardelor analitice (materiale de referință) la concentrații apropiate de cele așteptate și teste de recuperare. Analizele se realizează cel puțin în duplicat. Următoarele probleme ar trebui abordate:

- Verificări periodice ale contaminării prin analiza de probe îmbogațite;
- Testele de recuperare folosind probe îmbogațite cu concentrații de analit similare cu cele așteptate în probe pentru a evalua eficiența metodei de extracție și interferențele matricei. Pentru testele de recuperare se utilizează matricea de analizat;

Analiza reziduurilor este diferită de macroanaliză, în principal din cauza surselor de erori cum ar fi concentrațiile mici de contaminanți în probe, reactivii, dar și a zonei sau a zonelor utilizate pentru analiză. Astfel, mediul de lucru ar trebui să fie adecvat pentru acest tip de analiză. Pregătirea curbelor de calibrare trebuie realizată utilizând materialele de referință certificate. Soluțiile standard stoc trebuie depozitate în condiții controlate care să nu provoace modificări ale concentrației.

Validarea metodei analitice pentru reziduuri multiple de produse farmaceutice trebuie să se facă în conformitate cu ghidurile CE SANCO/12571/2013, SANTE/11813/2017 și Commission Decision 657/2002.

Validarea metodelor cantitative

Pentru cuantificare poate fi utilizată atât aria ionului precursor cât și a unui fragment caracteristic.

- Curbele de calibrare trebuie trasate în puțin cinci puncte în matrice îmbogațită obținute prin trecerea probelor prin întreaga metoda de extracție și purificare (SPE). Folosind interfața Excel, pentru fiecare curbă de calibrare, pot fi calculate ecuațiile și coeficienții R^2 . R^2 ar trebui să varieze de la 0,99-0,999 pentru o bună liniaritate;

- Repetabilitatea este evaluată prin analiza aceleiași probe îmbogățite la o concentrație relevantă de cel puțin cinci ori într-o singură zi. Precizia este definită ca deviația standard relativă (RSD);
- Recuperarea este evaluată prin analiza de probe îmbogățite (înainte și după extracție) cu cantități adecvate de soluții mix-standard și se calculează prin ecuația (2):

$$\text{Recuperarea (\%)} = \frac{A_s}{A_{pts}} * 100 \quad (2)$$

unde: A_s = semnalul (aria) corespunzătoare pentru proba îmbogățită înainte de extracție;

A_{pts} = semnalul (aria) corespunzătoare pentru proba îmbogățită după extracție.

Limitele acceptabile pentru recuperare ar trebui să se încadreze în intervalul de recuperare medie +/- 2x RSD (SANCO/12571/2013).

- Efectul matricei este determinat prin analiza probei de apă după extracție și a probei de apă ultrapură Milli Q, îmbogățite la același nivel ca în testele de recuperare. Un rezultat < 0 al acestei ecuații indică supresia ionilor pe când un rezultat pozitiv indică o intensificare a ionizării; efectul matricei este calculat prin ecuația (2):

$$\text{Efectul matricei (\%)} = \frac{A_{pts} - AMQ_{pts}}{AMQ_{pts}} * 100 \quad (2)$$

unde: AMQ pts = semnalul corespunzător pentru proba de apă ultrapură îmbogățită după extracție;

A_{pts} = semnalul corespunzător pentru proba îmbogățită după extracție.

- LOD (limita de detecție) și LOQ (limita de cuantificare) pot fi determinate de 3,3 ori respectiv 10 ori, deviația standard a interceptului y împărțită la panta curbei de calibrare construită într-un eșantion de matrice (Validarea ICH a procedurilor analitice: text și metodologie Q2 (R1), Conferința internațională de armonizare, 2005);

Validarea metodelor de screening

Pentru metodele de screening, conform Deciziei 2002/657/EC caracteristica minimă de performanță este de a avea o rată de rezultate false < 5% (eroare B) la nivelul de concentrație de interes. Pentru aceste metode, validarea se bazează pe ghidul Linii directe de reglementare pentru metodele de screening a reziduurilor de medicamente veterinare, pentru laboratoarele comunitare de referință, 2010. Nivelul de detecție, recuperarea maximă, CCB, deviația medie și standard a erorii de masă (Δ ppm), sunt parametrii de validare necesari ai metodelor de screening.

Analiza confirmatorie

Informațiile analitice oferite de spectrometria de masă sunt: timpul de retenție, raportul ion/sarcină m/z și date privind abundența relativă pentru analitii țintă. Ca o cerință reglementată pentru analiza țintită (target screening), timpul de retenție al analiților în probe și în probele îmbogățite trebuie să corespundă cu cea a standardului de referință, cu o toleranță de $\pm 0,2$ min. (Commission Decision 2002/657/EC; SANCO/12571/2013).

Diferite tipuri de tehnici spectrometrice de masă și diferite moduri de lucru oferă diferite grade de selectivitate și specificitate, strâns legate de gradul de identificare incontestabilă. În spectrometria de masă de înaltă rezoluție discutată mai sus, criteriile de identificare sunt cel puțin 2 ioni, incluzând ionul precursor și cel puțin un fragment ionic, cu o precizie de masă < 5 ppm, în modul de achiziție (SIM - monitorizarea ionilor selectați) (SANCO / 12571 / 2013). Pentru alte moduri de achiziție (monitorizarea reacțiilor multiple SRM / MRM sau DIA), pentru identificarea compușilor este necesară identificarea a cel puțin două fragmente ionice și a ionului precursor. Mai mult, în modurile de achiziție full MS sau SIM cu scanare completă, intensitățile sau rapoartele relative ale ionilor precursori selectați sau a fragmentelor ionice produse în analiza MS / MS, exprimate ca raport față de cel mai intens fragment ionic, trebuie să corespundă cu cele ale standardului analitic la concentrații comparabile, cu toleranțe maxime recomandate (Commission Decision 2002/657/EC).

7.7. Bibliografie

- Alygizakis, N. A., Oswald, P., Thomaidis, N. S., Schymanski, E. L., Aalizadeh, R., Schulze, T., ... & Slobodnik, J. (2019). NORMAN digital sample freezing platform: a European virtual platform to exchange liquid chromatography high resolution-mass spectrometry data and screen suspects in “digitally frozen” environmental samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 115, 129-137.
- Badea, S. L., Geana, E. I., Niculescu, V. C., & Ionete, R. E. (2020). Recent progresses in analytical GC and LC mass spectrometric based-methods for the detection of emerging chlorinated and brominated contaminants and their transformation products in aquatic environment. *Science of The Total Environment*, 722, 137914.
- Carmona, E., Andreu, V., & Picó, Y. (2017). Multi-residue determination of 47 organic compounds in water, soil, sediment and fish—Turia River as case study. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 146, 117-125.
- Casado, J., Brigden, K., Santillo, D., & Johnston, P. (2019). Screening of pesticides and veterinary drugs in small streams in the European Union by liquid chromatography high resolution mass spectrometry. *Science of the total environment*, 670, 1204-1225.
- Chitescu, C. L., Kaklamanos, G., Nicolau, A. I., & Stolker, A. A. M. L. (2015). High sensitive multiresidue analysis of pharmaceuticals and antifungals in surface water using U-HPLC-Q-Exactive Orbitrap HRMS. Application to the Danube river basin on the Romanian territory. *Science of the total environment*, 532, 501-511.
- Commission Decision 2002/657/EC, implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Off. J. Eur. Comm. L221:8-36. 2002.*
- Commission Implementing Decision (EU) 2015/495 of 20 March 2015 establishing a watch list of substances for Union-wide monitoring in the field of water policy pursuant to Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council
- Community Reference Laboratories Residues (CRLS) 20/1/2010, Guidelines for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines (initial validation and transfer). https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/cs_vet-med-residues_guideline_validation_screening_en.pdf

- Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the Council of 12 August 2013 amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy". O.J. L 226/1, 24 August 2013
- European Commission. Document no. SANTE/11813/2017 Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed. https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2017-11813.pdf.
- European Commission. Document no. SANCO/11813/2017. Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/SANTE_11813_2017_MainChanges.pdf.
- Hecht, E. S., Scigelova, M., Eliuk, S., & Makarov, A. (2019). Fundamentals and Advances of Orbitrap Mass Spectrometry. *Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications, Theory and Instrumentation*, 1-40.
- Hollender, J., Rothardt, J., Radny, D., Loos, M., Epting, J., Huggenberger, P., ... & Singer, H. (2018). Comprehensive micropollutant screening using LC-HRMS/MS at three riverbank filtration sites to assess natural attenuation and potential implications for human health. *Water research X*, 1, 100007.
- Hollender, J., Van Bavel, B., Dulio, V., Farnen, E., Furtmann, K., Koschorreck, J., ... & Tornero, V. (2019). High resolution mass spectrometry-based non-target screening can support regulatory environmental monitoring and chemicals management. *Environmental Sciences Europe*, 31(1), 1-11.
- ICH. 2005. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). International Conference on Harmonization. Available at: <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/quality-single/article/validation-of-analytical-procedures-text-and-methodology.html>. Accessed: September, 2020.
- Kaufmann, A.; Butcher, P.; Maden, K.; Walker, S.; Widmer, M. Reliability of veterinary drug residue confirmation: High resolution mass spectrometry versus tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*. 2015, 856, 54.
- Li, Y., & Migliaccio, K. (Eds.). (2010). *Water quality concepts, sampling, and analyses*. CRC Press.
- Liigand, J., Laaniste, A., & Kruve, A. (2017). pH effects on electrospray ionization efficiency. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 28(3), 461-469.
- Liigand, J., Wang, T., Kellogg, J., Smedsgaard, J., Cech, N., & Kruve, A. (2020). Quantification for non-targeted LC/MS screening without standard substances. *Scientific reports*, 10(1), 1-10.

- Malchi, T., Maor, Y., Tadmor, G., Shenker, M., & Chefetz, B. (2014). Irrigation of root vegetables with treated wastewater: evaluating uptake of pharmaceuticals and the associated human health risks. *Environmental science & technology*, 48(16), 9325-9333.
- Miarov, O., Tal, A., & Avisar, D. (2020). A critical evaluation of comparative regulatory strategies for monitoring pharmaceuticals in recycled wastewater. *Journal of environmental management*, 254, 109794.
- von der Ohe, P. C., Dulio, V., Slobodnik, J., De Deckere, E., Kühne, R., Ebert, R. U., ... & Brack, W. (2011). A new risk assessment approach for the prioritization of 500 classical and emerging organic microcontaminants as potential river basin specific pollutants under the European Water Framework Directive. *Science of the Total Environment*, 409(11), 2064-2077.
- Ripollés Vidal, C., Ibáñez Martínez, M., Sancho Llopis, J. V., López Benet, F. J., & Hernández Hernández, F. (2014). Determination of 17 β -estradiol and 17 α -ethinylestradiol in water at sub-ppt levels by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry.
- Van Donk, E., Peacor, S., Grosser, K., Domis, L.N.D.S., Lürling, M., 2016. Pharmaceuticals may disrupt natural chemical information flows and species interactions in aquatic systems: ideas and perspectives on a hidden global change. In: *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 238. Springer International Publishing, pp. 91-105.
- Vestel, J., Caldwell, D. J., Constantine, L., D'Aco, V. J., Davidson, T., Dolan, D. G., ... & Wilson, P. (2016). Use of acute and chronic ecotoxicity data in environmental risk assessment of pharmaceuticals. *Environmental toxicology and chemistry*, 35(5), 1201-1212.

Capitolul 8. Spectrometria nucleară în analize de mediu

Antoaneta Ene

INPOLDE interdisciplinary research network, Dunarea de Jos University of Galati, 111 Domneasca St., Galati, Romania

8.1. Introducere

Măsurarea precisă a concentrațiilor de activitate a radionuclizilor în probele de mediu a primit recent o atenție specială. Necesitatea a rezultat din importanța cunoașterii nivelurilor de radioactivitate și a dozelor de radiații nucleare care au un impact serios asupra vieții și sănătății umane (Ene & Pantelica, 2011a; Moghazy et al., 2021). Luând în considerare puterea mare de penetrare a radiațiilor γ , măsurarea lor prin spectrometrie gama în compartimentele de mediu este considerată semnificativă. Mai mult, măsurătorile radionuclizilor gazoși emițători alfa radon și toron și a descendenților lor sunt de cea mai mare importanță datorită puterii mari de ionizare a acestor particule, care ar putea provoca cancer pulmonar prin inhalare.

Capitolul prezintă metodologia utilizată în Laboratorul de Fizică și Dozimetrie Nucleară Experimentală din cadrul centrului de cercetare INPOLDE din UDJG, pentru măsurători de înaltă precizie ale concentrațiilor de radionuclizi în probe de mediu folosind spectrometria radiațiilor gama și alfa (Ene et al., 2019, 2020).

8.2. Spectrometria radiațiilor gama

Spectrometria radiațiilor gama s-a dovedit a fi un instrument puternic analitic, nedistructiv, utilizat pentru determinarea calitativă și cantitativă a emițătorilor gama (Ene & Nat, 1999; Ene et al., 2020).

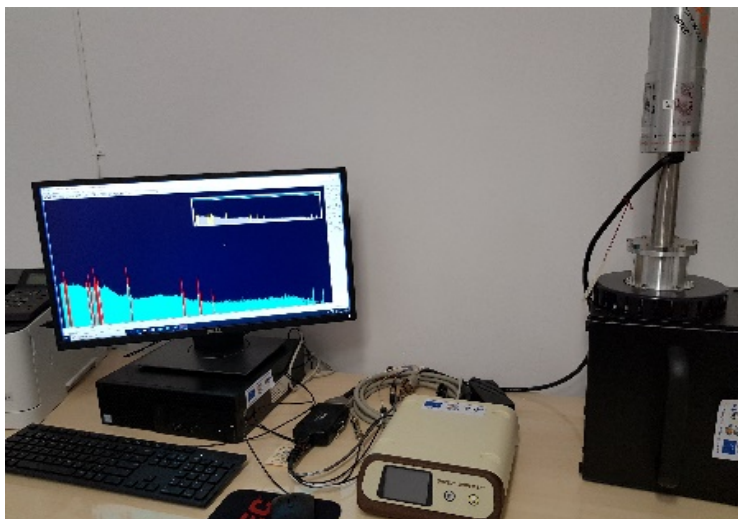
Metoda spectrometriei radiațiilor gama a fost permanent îmbunătățită și progresele majore vizează acum reducerea fondului pentru a obține limite mai bune de detecție a majorității nuclizilor și o mai bună precizie a determinărilor, fără a prelungi măsurarea (Ene & Pantelica, 2011b).

Radioactivitatea naturală de origine terestră se bazează în principal pe trei serii radioactive naturale, numite seriile toriului (Th232), uraniului (U238) și actiniului (U235), precum și pe radionuclidul primordial K40. Radionuclizii naturali țintă sunt următorii: ^{226}Ra (din activitățile ^{214}Pb și ^{214}Bi , descendenți ai ^{222}Rn din seria ^{238}U - ^{226}Ra), ^{238}U (din activitatea ^{234}Th), ^{232}Th (din activitatea ^{228}Ac , ^{212}Pb și ^{208}Tl), ^{235}U , ^{210}Pb (^{238}U - Seria ^{226}Ra) și ^{40}K . Cei mai des analizați radionuclizi artificiali sunt ^{60}Co , ^{137}Cs și ^{241}Am , dar concentrațiile lor nu sunt de obicei corelate cu nivelurile naturale de radioactivitate (Tabel 8.1).

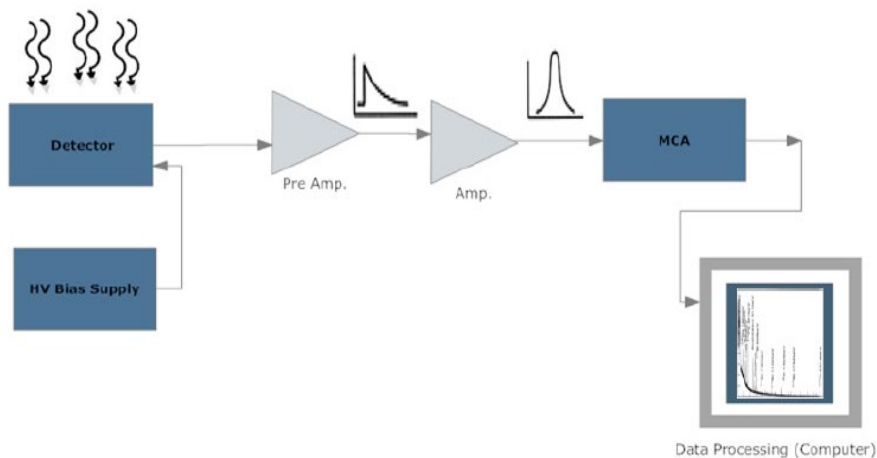
Tabel 8.1. Radionuclizi și calculul concentrației de activitate

Radionuclid	Observații/Calculul concentrației de activitate
^{226}Ra	Media activităților ^{214}Pb , ^{214}Bi
^{214}Pb	Seria ^{238}U - ^{226}Ra
^{214}Bi	Seria ^{238}U - ^{226}Ra
^{238}U	Activitatea determinată prin măsurarea ^{234}Th , considerat în echilibru radioactiv cu ^{238}U
^{235}U	Radionuclid natural al U
^{210}Pb	^{238}U - ^{226}Ra series
^{232}Th	Media activităților ^{228}Ac , ^{212}Pb , ^{208}Tl
^{228}Ac	Seria ^{232}Th
^{212}Pb	Seria ^{232}Th
^{208}Tl	Trebuie să se țină cont de dezintegrarea ramificată a ^{212}Bi din seria ^{232}Th (raportul de ramificație de 0,36)
^{40}K	Radionuclid natural al K
^{137}Cs	Radionuclid artificial
^{60}Co	Radionuclid artificial
^{241}Am	Radionuclid artificial

Tehnica de spectrometrie cu raze gamma de înaltă rezoluție (LB-HRGS) este aplicată la Laboratorul de fizică nucleară experimentală și dozimetrie, centrul de cercetare INPOLDE, Universitatea Dunarea de Jos din Galați, pentru a determina radioactivitatea naturală și artificială a materialelor de mediu.



a)



b)

Figura 8.1. Spectrometrul gamma (a) și diagrama bloc a lanțului spectrometric (b) la centrul de cercetare INPOLDE, UDJG.

Lanțul spectrometric gamma (Figura 8.1) este echipat cu un detector Ortec HPGGe (rezoluție 2,0 keV la energia 1332 keV a ^{60}Co și o eficacitate de detecție de 30% față de detectorul standard de NaI (Tl) de 3" x 3"), cuplat la un multicanal pe bază de PC analizor.

Pentru a obține un nivel scăzut de numărare a fondului pentru probe de mediu, se utilizează un castel de plumb de 10 cm grosime,

acoperit cu folii de Sn de 1 mm și Cu de 1,5 mm grosime, pentru a reduce radiația de fond ambiental în spectrul de energie variind de la 0 la 2000 keV (Ene & Pantelica, 2011b).

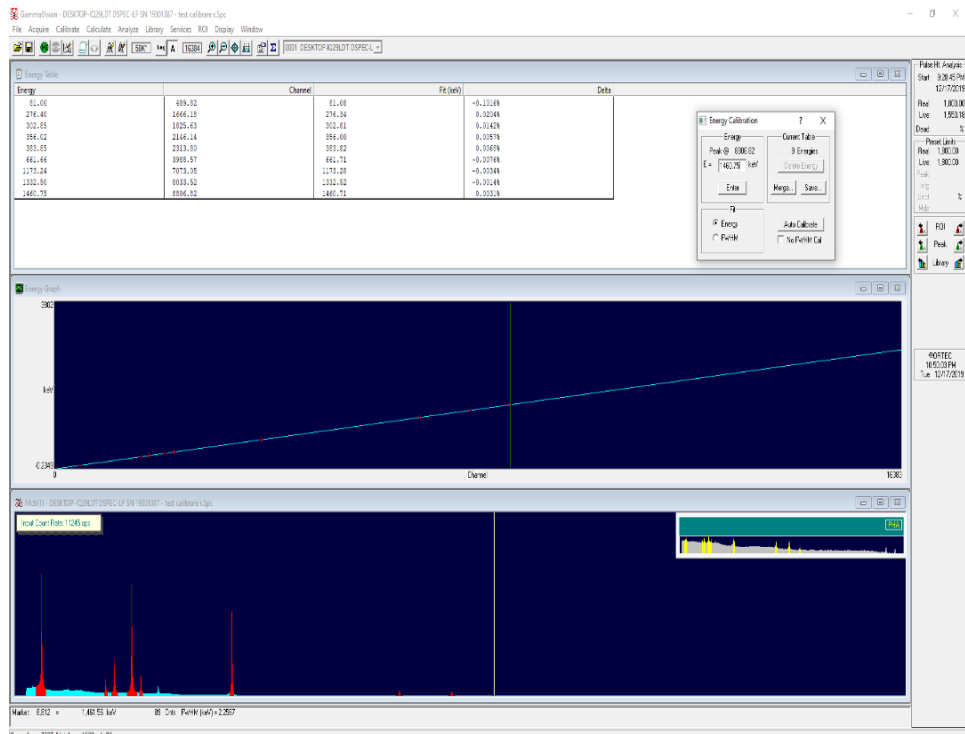


Figura 8.2. Linia de calibrare a lanțului spectrometric gamma ORTEC

Probele de mediu solide uscate și omogenizate sunt măsurate în pahare Sarpagan sau Marinelli plasate pe capacul detectorului, pentru numărare > 5 h, după 3-4 săptămâni de păstrare în cutia de măsurare, sigilate, pentru a stabili echilibrul radioactiv între ²²⁶Ra și descendentul său radioactiv gazos ²²²Rn (radon).

Sistemul trebuie să fie calibrat pentru eficacitatea de detecție folosind surse standard de volum ¹⁵²Eu, ¹³⁷Cs și ²⁴¹Am de activitate relativ ridicată, precum și materiale de referință IAEA cu densitate și volum similare cu cele ale probei măsurate, plasate în pahare identice (în aceeași geometrie de măsurare). Dreapta de calibrare tipică este prezentată în Figura 8.2.

Un exemplu de spectru gama este prezentat în Figura 8.3 pentru un eșantion de sol colectat în vecinătatea combinatului siderurgic din Galați, regiunea de SE a României (Ene et al., 2020).

Acesta indică prezența a picurilor rezultate din radionuclizii din seria naturală, radionuclidul natural 40K și radionuclidul artificial 137Cs existenți în soluri. Concentrațiile elementare de U și Th sunt calculate ținând seama de faptul că 1 g de U natural generează 12352,5 Bq din ^{238}U și 568,8 Bq din ^{235}U , iar 1 g de Th natural 4057,2 Bq din ^{232}Th .

8.3. Determinarea radonului și toronului prin spectrometrie alfa

Comisia Internațională pentru Protecție Radiologică (ICRP) și OMS au inițiat măsuri pentru a reduce expunerea populației și au prescris limite privind concentrațiile de radon permise în case și spații publice.

Tehnicile de măsurare a radonului și toronului au fost dezvoltate pentru a determina simultan concentrațiile lor în aerul interior, solul și apa, împreună cu parametri fizici (temperatură, presiune, umiditate) (SARAD, 2017).

Monitorul radon-toron bazat pe măsurători active ale concentrațiilor descendenților prin spectrometrie alfa (Figura 8.4), are două regimuri de măsurare a concentrației de radon prin delimitarea regiunilor de interes (ROI) (Ene și colab., 2019):

- **Lent**, care ia în considerare nu numai dezintegrarea ^{218}Po , ci și a ^{214}Po și

- **Rapid** care ia în considerare doar dezintegrarea lui ^{218}Po .

Avantajul modului de înregistrare rapidă este o reflectare rapidă a fluctuațiilor de concentrație, în timp ce modul lent are o sensibilitate de 2 ori mai mare, ceea ce, la rândul său, reduce marja de eroare statistică de măsurare, în funcție de numărul de dezintegrări detectate (Ene & Vodarici, 2020).

Un raport tipic de analiză al concentrațiilor de radon și toron și valorile înregistrate ale temperaturii, umidității și presiunii aerului interior este prezentat în Figura 8.5.

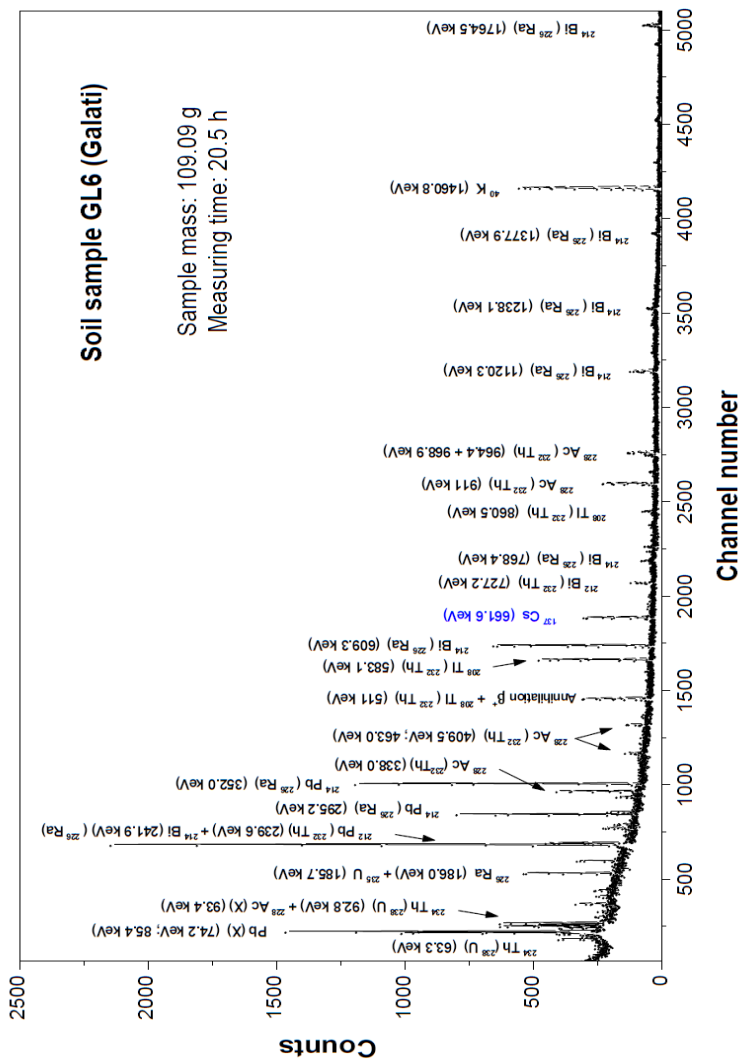


Figura 8.3. Spectrul tipic de radiații gama al unei probe de sol; energia razelor gama emise este etichetată pe fotopicul fiecărui radionuclid.

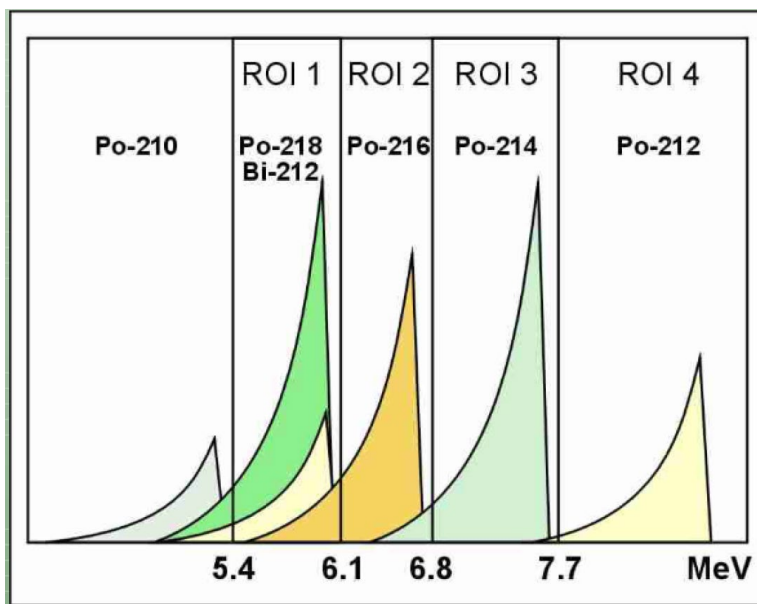
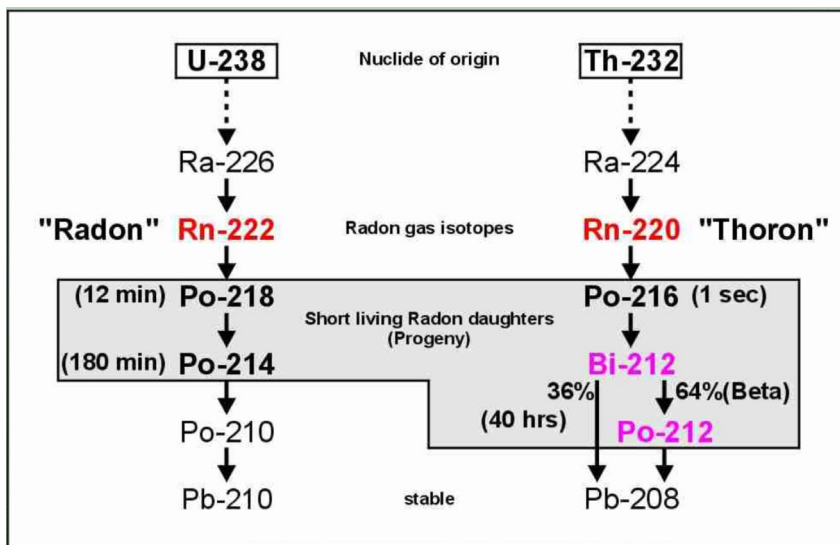


Figura 8.4. Delimitarea regiunilor de interes (ROI) în spectrometrie alfa pentru analiza radonului și toronului (SARAD, 2017)

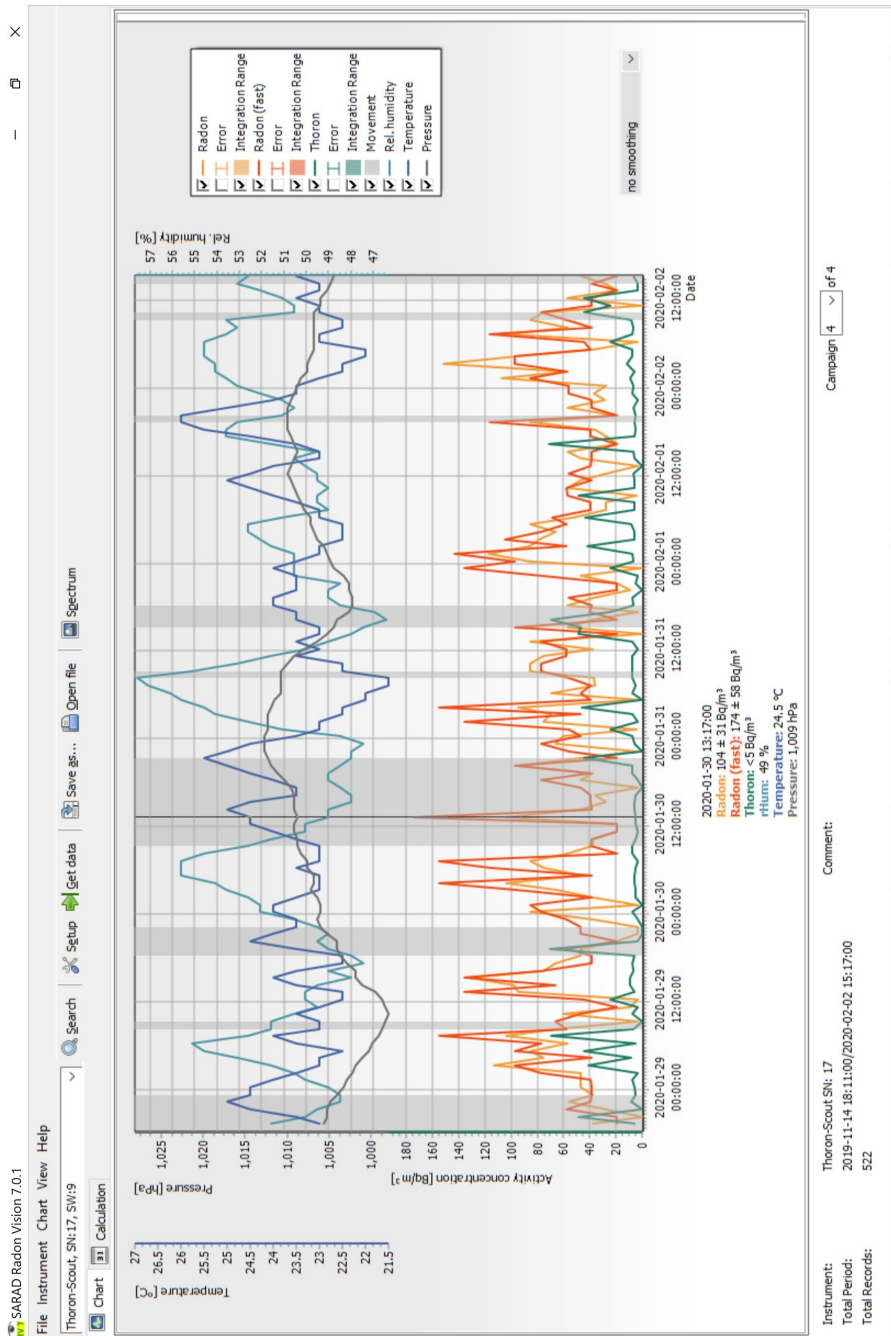


Figura 8.5. Raport tipic de analiză a concentrațiilor de radon și toron

8.4. Bibliografie

- Ene, A., Nat, A., 1999, Indrumar de laborator de fizica atomica si nucleara, Universitatea Dunarea de Jos, Galati, 154 pag.
- Ene, A., Pantelica, A., 2011a, Tehnici analitice atomice și nucleare utilizate în monitorizarea mediului, Galati University Press, 100 pag.
- Ene, A., Pantelica A., 2011b, Characterization of metallurgical slags using low-level gamma-ray spectrometry and neutron activation analysis, *Rom. Journal Phys.* 56 (7-8), 1011-1018.
- Ene A., Pintilie V., Pantelica A., 2019, Assessment of radon, thoron and their descendants in selected indoor environments in Romania, International Symposium on Natural Radiation Sources - Challenges, Approaches and Opportunities, 21-24 May 2019, Bucharest, Romania.
- Ene A., Vodarici L., 2020, Active measurement methods of indoor radon and thoron in selected spaces in Galati town, MONITOX International Conference "Environmental Toxicants in Freshwater and Marine Ecosystems in the Black Sea Basin", Kavala, Greece, September 8th-11th, 2020, p.34, S1.17, IL.B.6.
- Ene A., Pantelica A., Frontasyeva M., Sloata F., 2020, Low-background high resolution gamma-ray spectrometry applied for assessment of natural and artificial radioactivity of industrial soils in Danube River region (SE Romania) and health risk, International Conference "Environmental Challenges in the Black Sea Basin: Impact on Human Health", Galati, Romania, 23-26.09.2020.
- Moghazy N.M., El-Tohamy A.M., Fawzy M. M., Awad H.A., Zakaly H.M.H., Issa S.A.M., Ene A., 2021, Natural Radioactivity, Radiological Hazard and Petrographical Studies on Aswan Granites Used as Building Materials in Egypt, *Applied Sciences* 11 (14), 6471.
- SARAD, 2017, Radon basics, Application note AN_007, https://www.sarad.de/cms/media/docs/applikation/AN_007_RadonBasics_PPT_EN_11-04-08.pdf