

**UNIVERSITATEA “BABEȘ-BOLYAI” CLUJ NAPOCA
FACULTATEA DE CHIMIE ȘI INGINERIE CHIMICĂ**

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**CONTRIBUȚII LA DETERMINAREA REZIDUURILOR DE PESTICIDE
DIN LEGUME ȘI FRUCTE PRIN DIFERITE TEHNICI
CROMATOGRAFICE**

Conducător științific

Prof.dr. Constantin Măruțoiu

Doctorand

Adela Megheșan (căs. Breja)

Cluj-Napoca

-2014-

CUPRINS

LISTA DE ABREVIERI.....	15
INTRODUCERE.....	16
OBIECTIVE.....	18
CAPITOLUL 1. CONSIDERAȚII GENERALE PRIVIND PESTICIDELE SUFUSE STUDIULUI.....	19
1.1 PESTICIDELE. PREZENTARE GENERALA.....	19
1.1.1 CLASIFICAREA PESTICIDELOR.....	19
1.1.2 FORMULAREA.....	20
1.1.3 UNELE ASPECTE LEGATE DE TOXICITATEA PESTICIDELOR.....	21
1.2 PESTICIDE SUFUSE STUDIULUI.....	24
1.2.1 PROPRIETAȚI, ACȚIUNE ȘI ÎNTREBUNȚĂRI.....	24
1.2.2 METABOLIȚI ȘI PRODUSI DE DEGRADARE.....	26
1.2.2.1 2,4D.....	27
1.2.2.2 AZOXISTROBIN.....	27
1.2.2.3 IPRODION.....	28
1.2.2.4 CAPTAN.....	28
1.2.2.5 MICLOBUTANIL.....	29
1.2.2.6 TIOFANAT METIL.....	29
1.2.2.7 CLOROTALONIL.....	30
1.2.2.8 FOLPET.....	30
1.2.2.9 IMIDACLOPRID.....	31
1.2.2.10 DICOFOL.....	31
1.2.2.11 ACETAMIPRID.....	32
1.2.2.12 METALAXIL.....	32
1.2.2.13 PIRACLOSTROBIN.....	32
1.2.2.14 DIMETOAT.....	32
1.2.2.15 MALATION.....	33
1.2.2.16 CARBENDAZIM.....	33
1.2.2.17 PROCIMIDON.....	34
1.2.2.18 CIPRODINIL.....	34
1.2.2.19 PRIMETANIL.....	35
1.2.2.20 FENARIMOL.....	35
1.2.2.21 PENCONAZOL.....	35
1.2.2.22 METOMIL.....	35
1.2.2.23 BOSCALID.....	35
1.2.2.24 BROMOPROPILAT.....	36
1.2.2.25 FLUQUINCONAZOL.....	36
CAPITOLUL 2. METODE DE EXTRAȚIE A REZIDUURILOR DE PESTICIDE DIN PLANTE ȘI PRODUSE VEGETALE.....	37
2.1 EXTRAȚIA CU SOLVENȚI ORGANICI TRADIȚIONALI.....	37
2.1.1 EXTRAȚIA CU ACETONITRIL (ACN).....	39
2.1.2 EXTRAȚIA CU ACETONA.....	41
2.1.3 EXTRAȚIA CU ACETAT DE ETIL.....	42
2.2 TEHNICA DE EXTRAȚIE QUECHERS.....	44
2.3 ALTE TEHNICI DE EXTRAȚIE.....	46
2.3.1 MICROEXTRAȚIE DISPERSIVA LICHID-LICHID (DLLME).....	46
2.3.2 EXTRAȚIE ASISTATĂ DE MICROUND (MAE).....	47
2.3.3 EXTRAȚIE ASISTATĂ DE ULTRASUNETE (USE).....	48
2.3.4 EXTRAȚIA PE FAZA SOLIDĂ (SPE).....	48
2.3.5 MICROEXTRAȚIE PE FAZA SOLIDĂ (SPME).....	50
2.3.6 EXTRAȚIA PE FAZA SOLIDĂ CU BARĂ MAGNETICĂ (SBSE).....	50
2.3.7 EXTRAȚIE CU FLUIDE SUPERCRITICE (SFE).....	51

2.4	FACTORI CARE INFLUENȚEAZA EFICIENȚA EXTRAȚIEI	54
2.4.1	INFLUENȚA pH- ULUI.....	54
2.4.2	SARURILE PENTRU USCAREA EXTRACTELOR ORGANICE.....	55
2.4.3	SARURILE PENTRU PARTIȚIA LICHID-LICHID.....	56
2.5	METODE DE PURIFICARE A EXTRACTELOR.....	56
2.5.1	PARTIȚIA LICHID-LICHID.....	57
2.5.1.1	PARTIȚIA ACETONITRIL-HEXAN.....	57
2.5.1.2	PARTIȚIA CU TRATAMENT ACIDO/BAZIC.....	57
2.5.2	TRATAMENT CHIMIC.....	58
2.5.2.1	SAPONIFICAREA.....	58
2.5.2.2	PRECIPITAREA.....	58
2.5.2.3	OXIDAREA.....	58
2.5.2.4	PURIFICAREA LA TEMPERATURA JOASA.....	58
2.5.3	TEHNICI CROMATOGRAFICE DE PURIFICARE.....	59
2.5.3.1	CROMATOGRAFIA PE STRAT SUBȚIRE (TLC).....	59
2.5.3.2	CROMATOGRAFIA DE SCHIMB IONIC.....	59
2.5.3.3	CROMATOGRAFIA DE GEL PERMEAȚIE.....	59
2.5.3.4	PURIFICARE PRIN EXTRAȚIE PE FAZA SOLIDA (SPE).....	59
2.5.3.5	PURIFICARE CU FAZĂ SOLIDĂ DISPERSIVĂ dSPE.....	61
2.5.3.6	PURIFICARE SPE CU C18.....	61
2.5.3.7	PURIFICARE SPE CU NH ₂ ȘI PSA.....	61
2.5.3.8	PURIFICARE CU FLORISIL.....	62
2.5.3.9	PURIFICARE IN SISTEM AUTOMAT.....	63
2.5.3.10	PURIFICARE CU NANOTUBURI CU PEREȚI MULTIPLII.....	63
CAPITOLUL 3.	METODE DE ANALIZĂ A REZIDUURILOR DE PESTICIDE DIN PLANTE ȘI PRODUSE VEGETALE.....	64
3.1	DESCRIERE GENERALA.....	64
3.2	GAZCROMATOGRAFUL CUPLAT CU SPECTROMETRUL DE MASA.....	67
3.2.1	GC -EI -MS.....	67
3.2.2	GC -TOF -MS.....	68
3.3	LICHID CROMATOGRAFUL CUPLAT CU SPECTROMETRUL DE MASĂ.....	68
3.3.1	LC-ESI-MS.....	68
3.3.2	LC -QQQ-MS.....	69
3.4	FACTORI CARE INFLUENȚEAZA REZULTATELE IN ANALIZA REZIDUURILOR.....	69
3.4.1	SOLVENTUL DE EXTRAȚIE.....	70
3.4.2	PROPRIETAȚILE FIZICO-CHIMICE ALE PESTICIDELOR.....	72
3.4.3	CONCENTRAȚIA REZIDUURILOR ANALIZATE.....	72
3.4.4	INTERFERENȚE CROMATOGRAFICE.....	73
3.4.5	EFACTUL DE MATRICE.....	73
CAPITOLUL 4.	REGLEMENTARI DG SANCO. CRITERII DE VALIDARE A METODELOR DE ANALIZA.....	76
CAPITOLUL 5.	SELECTAREA ZONEI DE STUDIU. PREGATIREA LOTURILOR EXPERIMENTALE. CALENDARUL TRATAMENTELOR APLICATE. PRELEVARE PROBE.....	81
5.1	SELECTAREA ZONEI DE STUDIU.....	81
5.2	POLUAREA ISTORICA A SOLULUI ALES PENTRU LOTURILE EXPERIMENTALE.....	82
5.3	SELECTAREA SUBSTAȚELOR ACTIVE CARE SE VOR SUPUNE STUDIULUI.....	83
5.3.1	METODOLOGIA ȘI TEHNICA DE LUCRU.....	83
5.3.2	SELECTAREA PESTICIDELOR SUPUSE STUDIULUI.....	83
5.3.2.1	PROPRIETAȚILE FIZICO-CHIMICE ALE PESTICIDELOR SELECTATE.....	85
5.4	STABILIREA LOTURILOR EXPERIMENTALE PENTRU ROȘII CHERRY, CASTRAVEȚI , ARDEI IUȚI, SALATA ȘI STRUGURI.....	89
5.4.1	STABILIREA LOTURILOR EXPERIMENTALE.....	89
5.4.2	SEMANAREA ȘI PLANTAREA RASADURILOR.....	89
5.5	PRELEVAREA PROBELOR. CONDIȚII METEO.....	90

5.5.2	CONDIȚII METEO.....	91
CAPITOLUL 6. DETERMINAREA METODEI OPTIME DE EXTRAȚIE A REZIDUURILOR DE PESTICIDE ȘI DE PURIFICARE A EXTRACTELOR DIN PRODUSE VEGETALE ȘI SOL.....		95
6.1	EXTRAȚIA REZIDUURILOR DE PESTICIDE DIN PRODUSE VEGETALE.....	95
6.2.1	EXTRAȚIE MINILUKE modificată.....	97
6.2.2	EXTRAȚIE QUECHERS TAMPONATA modificată.....	97
6.2.3	EXTRAȚIE QUECHERS NETAMPONATĂ.....	97
6.2.4	EXTRAȚIE CU ACETAT DE ETIL.....	98
6.2.5	EXTRAȚIA CU METANOL (metoda DIN EN 15637) [12].....	98
6.2.6	ALEGEREA METODEI OPTIME DE EXTRAȚIE A PESTICIDELOR DIN FRUCTE ȘI LEGUME ⁹⁹	
6.3	EXTRAȚIA ACIDULUI 2,4 DICLOROFENOXIACETIC (2,4D).....	105
6.4	EXTRAȚIA REZIDUURILOR DE PESTICIDE DIN SOL.....	105
6.4.1	METODA CU PSA.....	106
6.4.2	METODA CU C18.....	106
6.5	PURIFICAREA EXTRACTELOR DIN PRODUSE VEGETALE.....	106
CAPITOLUL 7. ELABORAREA METODELOR DE DETERMINAREA A REZIDUURILOR DE PESTICIDE DIN PRODUSE VEGETALE ȘI SOL.....		113
7.1	ELABORAREA METODEI DE DETERMINARE PRIN GC-TOF-MS.....	113
7.1.1	MATERIAL ȘI METODA.....	113
7.1.2	STUDIUL CARACTERISTICILOR FIZICO-CHIMICE A SUBSTANȚELOR ACTIVE.....	114
7.1.3	FACTORI CARE INFLUENȚEAZA SEPARAREA.....	114
7.1.3.1	PUNCTUL DE FIERBERE.....	114
7.1.3.2	POLARITATEA ANALITULUI VS POLARITATEA FAZEI STAȚIONARE DIN COLOANA 114	
7.1.3.3	TEMPERATURA INJECTORULUI.....	115
7.1.3.4	TEMPERATURA CUPTORULUI COLOANEI. RAMPE DE TEMPERATURA.....	115
7.1.3.5	LUNGIMEA ȘI DIAMETRUL INTERN AL COLOANEI.....	117
7.1.3.6	DEBITUL GAZULUI PURTATOR.....	118
7.1.3.7	CANTITATEA DE PROBA INJECTATA.....	121
7.1.3.8	TEMPERATURA SURSEI DE IONI.....	121
7.1.3.9	RATA DE ACHIZIȚIE A SPECTRELOR.....	121
7.1.4	CONDIȚII FINALE DE DETERMINARE A REZIDUURILOR DE PESTICIDE PRIN GC-TOF-MS	122
7.2	ELABORAREA METODEI DE DETERMINARE A REZIDUURILOR DE PESTICIDE DIN PRODUSE VEGETALE PRIN LC-MS-QQQ.....	125
7.2.1	STUDIUL CARACTERISTICILOR FIZICO-CHIMICE A SUBSTANȚELOR ACTIVE.....	126
7.2.2	MATERIAL ȘI METODA.....	126
7.2.3	INFLUENȚA DEBITULUI FAZEI MOBILE ASUPRA SEPARARII.....	127
7.2.4	INFLUENȚA COMPOZIȚIEI FAZEI MOBILE ASUPRA SEPARĂRII.....	129
7.2.5	INFLUENȚA pH-ULUI FAZEI MOBILE ASUPRA SEPARARII.....	132
7.2.6	INFLUENȚA TEMPERATURII ASUPRA SEPARARII.....	133
7.2.7	INFLUENȚA ANUMITOR PROPRIETAȚI FIZICO-CHIMICE ALE SUBSTANȚELOR ACTIVE ASUPRA SEPARARII.....	134
7.2.8	IONIZAREA CHIMICA PRIN ESI IN LC-MS-QQQ.....	137
7.2.9	VOLTAJUL CAPILAREI.....	139
7.2.10	CONDIȚII FINALE DE DETERMINARE A REZIDUURILOR DE PESTICIDE PRIN LC-MS-QQQ	139
7.3	ELABORAREA METODEI DE ANALIZA MONOREZIDUALA A 2,4 D PRIN LC-MS-QQQ.....	144
7.3.1	STUDIUL CARACTERISTICILOR FIZICO-CHIMICE ALE SUBSTANȚEI ACTIVE.....	144
7.3.2	MATERIAL ȘI METODA.....	144
7.3.3	INFLUENȚA DEBITULUI FAZEI MOBILE ASUPRA SEPARARII.....	145

7.3.4	INFLUENȚA TEMPERATURII ASUPRA SEPARĂRII.....	146
7.3.5	INFLUENȚA pH-ULUI FAZEI MOBILE ASUPRA SEPARĂRII.....	146
7.3.6	INFLUENȚA VOLUMULUI DE PROBĂ INJECTATĂ ASUPRA SEPARĂRII.....	147
7.3.7	CONDIȚII FINALE DE DETERMINARE A REZIDUURILOR DE 2,4D PRIN.....	147
	LC-MS-QQQ.....	147
CAPITOLUL 8. VALIDAREA ANALITICĂ A METODELOR MULTIREZIDUALE GC ȘI LC PENTRU DETERMINAREA REZIDUURILOR DE PESTICIDE DIN LEGUME, FRUCTE ȘI SOL.....		148
8.1	CRITERII DE VALIDARE PENTRU GC CONFORM DG SANCO APLICATE PE LEGUME, FRUCTE ȘI SOL.....	148
8.1.1	LINIARITATEA.....	148
8.1.2	EFFECTUL DE MATRICE.....	149
8.1.3	LIMITA DE DETECȚIE (LOD).....	149
8.1.4	SENSIBILITATEA SAU LIMITA DE CUANTIFICARE (LOQ).....	149
8.1.5	SPECIFICITATEA.....	150
8.1.6	REPETABILITATEA (PRECIZIA).....	150
8.1.7	REPRODUCTIBILITATEA.....	150
8.1.8	INCERTITUDINEA DE MASURARE.....	151
8.2	VALIDAREA METODEI MULTIREZIDUALE GC PENTRU ROȘII ȘI STRUGURI.....	151
8.2.1	CONCLUZII PRIVIND VALIDAREA MULTIREZIDUALĂ GC-TOF-MS PE ROȘII ȘI STRUGURI.....	160
8.3	VALIDAREA METODEI MULTIREZIDUALE GC PENTRU SOL.....	160
8.3.1	CONCLUZIILE VALIDĂRII METODEI GC PENTRU SOL.....	166
8.4	VALIDAREA METODEI MULTIREZIDUALE LC PENTRU ARDEI IUȚI.....	166
8.4.1	LINIARITATEA.....	167
8.4.2	EFFECTUL DE MATRICE.....	167
8.4.3	LIMITA DE DETECȚIE (LOD).....	169
8.4.4	SENSIBILITATEA SAU LIMITA DE CUANTIFICARE (LOQ).....	169
8.4.5	SPECIFICITATEA.....	170
8.4.6	REPETABILITATEA (PRECIZIA).....	171
8.4.7	REPRODUCTIBILITATEA.....	172
8.4.8	INCERTITUDINEA.....	172
CAPITOLUL 9 . DETERMINAREA REZIDUURILOR DE PESTICIDE DIN LEGUME ȘI FRUCTE.....		173
9.1	DETERMINAREA REZIDUURILOR DE PESTICIDE DIN ROȘII CHERRY.....	175
9.1.1	METODA MULTIREZIDUALĂ GC-TOF-MS.....	175
9.1.1.1	BIFENTRIN.....	177
9.1.1.2	BROMOPROPILAT.....	178
9.1.1.3	CAPTAN.....	179
9.1.1.4	CLOROTALONIL.....	180
9.1.1.5	DICOFOL.....	182
9.1.1.6	FOLPET.....	183
9.1.1.7	IPRODION.....	184
9.1.1.8	PROCIMIDON.....	185
9.1.1.9	METALAXIL.....	187
9.1.1.10	FLUDIOXONIL.....	188
9.1.2	METODA MULTIREZIDUALĂ LC-MS-QQQ.....	188
9.1.2.1	ACETAMIPRID.....	190
9.1.2.2	TIOFANAT METIL.....	191
9.1.2.3	CARBENDAZIM.....	192
9.1.2.4	METOMIL.....	193
9.1.2.5	IMIDACLOPRID.....	194
9.1.2.6	PROPICONAZOL.....	195

9.1.2.7	TIACLOPRID.....	196
9.1.3	STUDIU COMPARATIV 2 metode de extracție/2 metode de analiză.....	196
9.1.3.1	FENARIMOL.....	197
9.1.3.2	AZOXISTROBIN.....	199
9.1.3.3	BOSCALID.....	202
9.1.3.4	MALATION.....	204
9.1.3.5	CIPRODINIL.....	206
9.1.3.6	PENCONAZOL.....	207
9.1.3.7	DIMETOAT.....	209
9.1.3.8	PIRIMETANIL.....	211
9.1.3.9	MICLOBUTANIL.....	213
9.1.3.10	FENHEXAMID.....	215
9.1.3.11	PIRACLOSTROBIN.....	217
9.1.4	METABOLIȚI IDENTIFICAȚI ȘI /SAU CUANTIFICAȚI.....	218
9.1.4.1	CARBENDAZIMUL CA ȘI METABOLIT.....	218
9.1.4.2	TETRAHIDROFTALIMIDA.....	219
9.1.4.3	p, p' DICLOROBENZOFENONA.....	221
9.1.4.4	TIOFOSGEN.....	223
9.1.4.5	FTALIMIDA.....	224
9.1.4.6	OMETOAT.....	226
9.1.4.7	ALȚI METABOLIȚI IDENTIFICAȚI.....	227
9.1.4.7.1	3,5 DICLOROANILINA.....	227
9.1.4.7.2	p, p' DIBROMOBENZOFENONA.....	228
9.1.4.7.3	2,4 DICLOROBENZOFENONA.....	229
9.1.4.7.4	3,4 DICLOFENIL IZOCIANAT (DFI).....	230
9.1.4.8	CONCLUZII – REZIDUURILE DE PESTICIDE DIN ROȘII CHERRY.....	231
9.1.5	METODA MONOREZIDUALA LC-MS-QQQ PENTRU 2,4 D IN ROȘII.....	232
9.2	DETERMINAREA REZIDUURILOR DE PESTICIDE DIN CASTRAVEȚI.....	235
9.2.1	METODA MULTIREZIDUALA GC –TOF- MS.....	235
9.2.1.1	MALATION.....	236
9.2.1.2	PIRIMETANIL.....	237
9.2.1.3	BIFENTRIN.....	238
9.2.1.4	BROMOPROPILAT.....	239
9.2.1.5	CAPTAN.....	240
9.2.1.6	FOLPET.....	240
9.2.1.7	CLOROTALONIL.....	241
9.2.1.8	DICOFOL.....	242
	IPRODION.....	243
9.2.1.9	METALAXIL.....	244
9.2.1.10	FLUDIOXONIL.....	245
9.2.1.11	PROCIMIDON.....	246
9.2.2	METODA MULTIREZIDUALA LC-MS-QQQ.....	247
9.2.2.1	ACETAMIPRID.....	249
9.2.2.2	TIOFANAT METIL.....	250
9.2.2.3	IMIDACLOPRID.....	251
9.2.2.4	METOMIL.....	252
9.2.2.5	CARBENDAZIM.....	253
9.2.2.6	FLUQUINCONAZOL.....	254
9.2.3	STUDIU COMPARATIV (2 metode de extracție / 2 metode analiză).....	255
9.2.3.1	FENARIMOL.....	256
9.2.3.2	AZOXISTROBIN.....	258
9.2.3.3	BOSCALID.....	260

9.2.3.4	CIPRODINIL.....	262
9.2.3.5	PENCONAZOL.....	264
9.2.3.6	DIMETOAT.....	266
9.2.3.7	PIRACLOSTROBIN.....	267
9.2.4	METABOLIȚI IDENTIFICAȚI ȘI /SAU CUANTIFICAȚI.....	268
9.2.4.1	TETRAHIDROFTALIMIDA.....	268
9.2.4.2	FTALIMIDA.....	270
9.2.4.3	4,4 DICLOROBENZOFENONA.....	271
9.2.4.4	OMETOAT.....	272
9.2.5	CONCLUZII – REZIDUURILE DE PESTICIDE DIN CASTRAVEȚI.....	274
9.3	DETERMINAREA REZIDUURILOR DE PESTICIDE DIN ARDEI IUTI.....	275
9.3.1	METODA MULTIREZIDUALĂ GC-TOF-MS.....	275
9.3.1.1	CLOROTALONIL.....	276
9.3.1.2	FOLPET.....	277
9.3.1.3	CAPTAN.....	278
9.3.1.4	BROMPROPILAT.....	279
9.3.1.5	FLUDIOXONIL.....	280
9.3.2	METODA MULTIREZIDUALĂ LC-MS/MS.....	281
9.3.2.1	METOMIL.....	282
9.3.2.2	FLUQUINCONAZOL.....	283
9.3.2.3	PIRACLOSTROBIN.....	284
9.3.2.4	TIOFANAT METIL.....	285
9.3.2.5	ACETAMIPRID.....	286
9.3.2.6	IMIDACLOPRID.....	286
9.3.2.7	CARBENDAZIM.....	287
9.3.2.8	MICLOBUTANIL.....	288
9.3.3	STUDIUL COMPARATIV (2 metode de extracție / 2 metode analiză).....	289
9.3.3.1	CIPRODINIL.....	290
9.3.3.2	BOSCALID.....	291
9.3.3.3	PENCONAZOL.....	293
9.3.3.4	FENARIMOL.....	294
9.3.3.5	DIMETOAT.....	296
9.3.3.6	AZOXISTROBIN.....	297
9.3.4	METABOLIȚI IDENTIFICAȚI ȘI /SAU CUANTIFICAȚI.....	299
9.3.4.1	TETRAHIDROFTALIMIDA.....	299
9.3.4.2	FTALIMIDA.....	300
9.3.4.3	4,4' DICLOROBENZOFENONA.....	301
9.3.4.4	OMETOAT.....	302
9.3.5	CONCLUZII - REZIDUURILE DE PESTICIDE DIN ARDEI IUȚI.....	303
9.4	DETERMINAREA REZIDUURILOR DE PESTICIDE DIN SALATA.....	304
9.4.1	METODA MULTIREZIDUALĂ GC-TOF-MS.....	304
9.4.1.1	BIFENTRIN.....	305
9.4.1.2	CAPTAN.....	306
9.4.1.3	BROMPROPILAT.....	308
9.4.1.4	FOLPET.....	308
9.4.2	METODA MULTIREZIDUALĂ LC-MS-MS.....	309
9.4.2.1	ACETAMIPRID.....	311
9.4.2.2	METOMIL.....	312
9.4.2.3	TIOFANAT METIL.....	313
9.4.2.4	PIRACLOSTROBIN.....	314
9.4.3	STUDIUL COMPARATIV (2 metode de extracție / 2 metode analiză).....	315

9.4.3.1	BOSCALID.....	316
9.4.3.2	PENCONAZOL.....	317
9.4.3.3	DIMETOAT.....	319
9.4.4	METABOLIȚI IDENTIFICAȚI ȘI /SAU CUANTIFICAȚI.....	321
9.4.4.1	TETRAHIDROFTALIMIDA.....	321
9.4.4.2	FTALIMIDA.....	322
9.4.5	CONCLUZII - REZIDUURILE DE PESTICIDE IN SALATA.....	322
9.5	DETERMINAREA REZIDUURILOR DE PESTICIDE DIN STRUGURI.....	323
9.5.1	METODA MULTIREZIDUALĂ LC-MS-QQQ.....	324
9.5.1.1	FENHEXAMID.....	324
9.5.1.2	TIOFANAT METIL.....	325
9.5.2	METODA MULTIREZIDUALĂ GC-TOF-MS.....	325
9.5.2.1	CIPRODINIL.....	326
9.5.2.2	PROCIMIDON.....	327
CAPITOLUL 10. CONCLUZII FINALE.....		328
BIBLIOGRAFIE.....		331
ANEXĂ. UTILIZAREA METODELOR ELABORATE ÎN TESTE DE COMPETENȚĂ (PROFICIENȚĂ) EUROPEANA.....		338
I.	TEST BIPEA . Matricea testată – Mera.....	338
II.	TESTUL IMEP -37 . Matricea testată - Struguri.....	341
III.	TESTUL EUPT – FV 16 . Matricea Ardei gras verde.....	346
LUCRARI PUBLICATE PE TEMA DATA.....		349
ARTICOLE ÎN EXTENSO ACCEPTATE SPRE PUBLICARE.....		350
Multi-residue analysis of pesticides and metabolites from fruits and vegetables by gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry.....		350
MULTI-RESIDUES ANALYSIS FOR 88 PESTICIDES AND METABOLITES FROM SOIL BY GAS CHROMATOGRAPHY-TIME-OF-FLIGHT MASS SPECTROMETRY.....		389

În rezumatul tezei de doctorat se prezintă o sub formă restrânsă rezultatele experimentelor proprii, concluziile generale și bibliografie selectivă.

La redactarea rezumatului s-au păstrat notațiile din textul tezei de doctorat pentru capitolele, subcapitolele, figurile, și tabelele utilizate.

Cuvinte cheie : analiză multireziduală, reziduuri de pesticide, spectrometrie de masă, LC-MS-QQQ, GC-TOF-MS, sol, legume și fructe

LISTA DE ABREVIERI

ACN - acetonitril
AOAC – Asociația Comunităților Analitice
APCI – ionizare chimică la presiune atmosferică
ATD – desorbție termică automată
C18 - octadecilsilice
CIPAC - Collaborative International Pesticides Analytical Council
DG SANCO – Directoratul General pentru Sănătate și Consumatori al Uniunii Europene
DLLME – microextracție dispersivă lichid-lichid
dsPE – extracție pe fază solidă dispersivă
ECD – detector cu captură de electroni
EI – ionizare cu impact electronic
ESI – ionizare cu electrospray
EtOAC – acetat de etil
EURL-FV – Laboratorul de referință European –legume și fructe
FID – detector cu ionizare în flacără
FPD – detector flamfotometric
FULL SCAN – scanare completă
GBC – cărbune negru activ
GC – gaz cromatografie sau cromatografie de gaze
GPC – cromatografie de gel permeație
HPLC - cromatografie de lichide de înaltă performanță
LC –lichid cromatografie sau cromatografie de lichide
LLE – extracție lichid-lichid
LMA - limita maxim admisă
LOD – limita de detecție
LOQ - limita de cuantificare
MAE – extracție asistată de microunde
MRM – monitorizarea reacțiilor multiple (multi reaction monitoring)
MS – spectrometrie de masă

MS/MS – spectrometrie de masă în tandem

MSPD – extracție cu dispersia fazei în matrice solidă
MWCNT – extracție cu nanotuburi cu pereți multipli
NPD – detector pentru azot și fosfor
OC – pesticide organoclorurate
OP – pesticide organofosforice
PDMS - polidimetilsiloxan
PLE – extracție cu lichid sub presiune
PPB – părți per bilion
PPM – părți per milion
PSA - amină primară-secundară
PTFE - teflon
PYR - piretroizi
QQQ - analizor tripluadupolar
RSD – deviație standard relativă
RT - timp de retenție
SBME – extracție pe fază solidă cu bară magnetică
SDME – microextracție cu o singură picătură
SFE – extracție cu lichid supercritic
SI – standard intern
SIM –monitorizarea ionului selectat (selected ion monitoring)
SPE – extracție pe fază solidă
SPME – microextracție pe fază solidă
SRM – monitorizarea reacției selectate (selected reaction monitoring)
STDEV – deviație standard
TD – desorbție termică
TLC – cromatografie pe strat subțire
TOF – analizor cu timp de zbor (time of flight)
USE – extracție asistată de ultrasunete
LZDRPPV – Laboratorul Zonal pentru determinarea reziduurilor de pesticide din plante și produse vegetale
RC – celuloză reciclată

Teza de doctorat este constituită din două părți.

Prima parte, cuprinde primele patru capitole, în care se prezintă datele din literatura de specialitate privitoare la stadiul actual al cercetărilor în domeniul.

Partea a doua a tezei de doctorat prezintă contribuțiile experimentale originale, care sunt prezentate în cinci capitole, cel de-al șaselea constituind Concluziile finale.

Sub forma de Anexă , sunt prezentate rezultatele obținute cu metodele de extracție și analiză prezentate în teză , prin participarea la Teste de Competență Europeană.

INTRODUCERE

Monitorizarea nivelului de încărcare cu reziduuri de pesticide din produse agricole (legume și fructe), sol, apă și alte componente ale agrosistemelor constituie o preocupare majoră a protecției mediului. (Davidescu, Calancea, 1992)

Lucrările care prezintă determinarea unor reziduuri de pesticide din alte clase (mai greu de detectat fără o aparatură performantă), aduc deseori în atenție depășiri însemnate ale LMA al unor pesticide.

Foarte puține lucrări însă tratează modul de acumulare al pesticidelor, cantitatea acestora în diferite stadii de dezvoltare ale plantelor, în perioadele de pauză necesare fiecărui pesticid după aplicare, reziduurile acumulate în perioada de remanență a pesticidelor cât și după aceasta, precum și identificarea și/sau cuantificarea unor produși de degradare ai pesticidelor (metaboliții formați) utilizate în tratamente .

Prezenta lucrare își dorește să aborbeze toate situațiile expuse mai sus, folosind pentru studiu loturi experimentale cu diverse legume și fructe care vor fi tratate mai mult sau mai puțin în conformitate cu procedurilor de aplicare a tratamentelor rezultând uneori doze „accidentale” din mai multe clase de pesticide : fungicide, insecticide , acaricide ș.a..

Reziduurile de pesticide din produsele supuse studiului vor fi determinate utilizând metode cromatografice : lichid cromatografie cu spectrometrie de masă cu detector de tip tripluadupol (LC-MS-QQQ) și gaz cromatografie cu spectrometrie de masă cu detector cu timp de zbor (GC - TOF –MS) .

Relevanța proiectului, atât din punct de vedere a programelor de monitorizare naționale cât și din acela al programelor de monitorizare europene în ceea ce privește conținutul de

pesticide din fructe și legume, este dată de faptul că răspunde unor cerințe importante în abordarea relației expunere la pesticide - risc asupra sănătății, concentrându-se asupra determinării reziduurilor de pesticide prin metode cromatografice revizuite sau nou elaborate, pe mecanismele de acțiune și acumulare a pesticidelor în condiții de aplicare repetitivă a tratamentelor fitosanitare, precum și efectul aplicării supradozelor de pesticid. Pe de altă parte proiectul va produce date, care doresc să susțină ideea că în agricultura modernă pentru obținerea unui randament mare, alegerea pesticidului, a momentului optim de tratare și în special modul de aplicare sunt factori determinanți. Produsele cu selectivitate și eficiență economică ridicată, nepoluante, netoxice, neremanente pot asigura obținerea unor recolte sporite și în același timp libere de pesticide. (ICPA,2002; Davidescu, Calancea, 1992; Grou și colaboratorii, 1979)

OBIECTIVE

Considerând situația pe plan european și național în ceea ce privesc reziduurile de pesticide în diverse matrici, această lucrare își propune ca obiectiv principal 'Elaborarea de metode de extracție și analiză optime pentru a determina reziduurile de pesticide din legume și fructe', ducând astfel la soluționarea altor obiective secundare cum ar fi:

- Evaluarea expunerii plantelor din terenul experimental ales, având în vedere tratamentele aplicate în anii anteriori efectuării studiului
- Crearea unui lot experimental ambiental și selectarea culturilor de interes (roșii Cherry, ardei iuți Chayenne, castraveți Cornișon, salată Boston, struguri de vin) pentru investigarea efectului pesticidelor selectate asupra plantelor în concentrația prescrisă de producător ținându-se cont de tehnica de tratament aplicată și de condițiile meteorologice existente
- Evaluarea efectelor pesticidelor și a gradului de acumulare al acestora în fructe și legume prelevate în diferite perioade de timp după aplicarea tratamentului fitosanitar : la 3 zile după stropire, la 10 zile după stropire (după perioada de pauză a substanței active), și/sau 15 zile sau 1 lună (după perioada de remanență a substanței active)
- Identificarea unor metaboliți și/sau produși de degradare și cuantificarea celor mai relevanți

- Întocmirea unor curbe de degradare reprezentând variația concentrației de pesticid pe o anumită perioadă, și compararea cu valoarea LMA după trecerea timpului de pauză

Problemele ridicate de acest studiu precum și obiectivele sunt în strânsă concordanță cu mai multe obiective și priorități ale unui program cu finanțare Sapard al Uniunii Europene care a vizat printre altele înființarea în 2008 a unui Laborator Zonal pentru Determinarea Reziduurilor de Pesticide din Plante și Produse Vegetale la Unitatea Fitosanitară Mureș din Târgu Mureș , acesta fiind și locația în care s-au efectuat toate experimentele și analizele din prezenta lucrare.

PARTEA EXPERIMENTALĂ

CAPITOLUL 5. SELECTAREA ZONEI DE STUDIU. PREGĂTIREA LOTURILOR EXPERIMENTALE. CALENDARUL TRATAMENTELOR APLICATE. PRELEVARE PROBE

Teza urmărește elaborarea de metode de extracție și analiză pentru a determina relația dintre acumularea, degradarea și remanența pesticidelor în probele de legume și fructe supuse tratamentelor fitoasanitare repetate . Problema este abordată într-o manieră multidisciplinară, sub forma unui studiu complex.

Subcapitolele **5.1** și **5.2** tratează aspecte legate de „Selectarea zonei de studiu” respectiv „Poluarea istorică a solului ales pentru loturile experimentale”, din care vom face câteva selecții.

Terenul pe care s-a desfășurat experimentul este situat la periferia orașului Târgu Mureș și în ultimii 7 ani a fost utilizat pentru cultivarea legumelor și a cartofilor. La o distanță de aproximativ 100m de acest teren se află o parcelă necultivată de 5 ani, având solul de același tip ca și terenul experimental, care a fost întrebuințată pentru cultivarea probelor martor de legume și deasemenea din această parcelă au fost prelevate probele martor de sol utilizate la validarea metodei GC pentru sol.

Desfășurarea studiului implică 4 linii de investigație. Prima se referă la elaborarea unor metode optime de extracție și analiză a reziduurilor de pesticide potrivite pentru a realiza scopul propus.

A doua linie de investigație pornește de la analiza chimică a solului ales pentru experimentare din punct de vedere al conținutului de pesticide, în scopul evaluării calității acestuia.

A treia linie de investigație urmărește situația expunerii probelor selectate la pesticide aplicate în doze normale prin tratamente repetate cu respectarea unui timp de pauză mediu de 20 zile între tratamente . Datele se obțin prin colectarea probelor în diferite perioade de timp, după efectuarea tratamentelor fitosanitare și analiza lor chimică. O serie de date, cele referitoare la poluarea istorică, vor fi colectate de la tratamentele efectuate în anii anteriori în zonele selectate și din analiza chimică a solului din punct de vedere al conținutului de pesticide.

Cea de a patra linie urmărește evaluarea prin investigații experimentale a metaboliților rezultați în urma degradării pesticidelor sau a eventualelor modificări structurale suferite de acestea în timpul analizelor instrumentale. La finalul proiectului se constituie o analiza integrată a datelor colectate .

5.3 SELECTAREA SUBSTANȚELOR ACTIVE CARE SE VOR SUPUNE STUDIULUI

5.3.1 METODOLOGIA ȘI TEHNICA DE LUCRU

Studiul s-a derulat pe parcursul a doi ani, 2012 respectiv 2013, pesticidele de interes fiind grupate câte 3 din clase diferite , care au efect asupra tuturor probelor selectate (roșii Cherry, castraveți, ardei iuți, salată, struguri). Tabloul expunerii istorice la pesticide va fi completat și pe baza datelor curente furnizate și de autoritățile care au efectuat tratamente anterioare în zonele alese pentru studiu.

Vor fi determinate reziduurile a 30 de pesticide din legume și fructe , în diferite stadii de maturitate a legumelor , respectiv fructelor, la 3, 10 și 15 zile, încercând să se acopere și timpii de pauză și remanența specifici fiecărui pesticid utilizat . Pentru un număr semnificativ de probe se vor face extracții și analize comparative. Concentrația de pesticide va fi raportată la Limita Maximă Admisă (LMA) stabilită de către organismele europene din domeniu și adoptată și de către țara noastră ca stat membru al acesteia.

Pesticidele selectate pentru derularea studiului au fost: 2,4D, Acetamiprid, Tiofanat metil, Carbendazim, Metomil, Imidacloprid, Propiconazol, Tiacloprid, Ciprodinil, Penconazol, Dimetoat, Ometoat , Pirimetanil, Miclobutanil, Piraclostrobin, Fenhexamid, Bifentrin, Bromopropilat, Captan, Clorotalonil, Dicofol, Folpet, Iprodion, Procimidon, Metalaxil, Fludioxonil, Fenarimol, Malation, Azoxistrobin, Boscalid.

Cercetarea eventualilor metaboliți are drept scop identificarea metaboliților respectivi și cuantificarea unora dintre ei. Fiecare tip de probă se presupune a avea un răspuns specific după

expunerea ambientală în ce privește atât doza cât și intervalul de timp până la apariția metaboliților.

În subcapitolele următoare (5.3.2 și 5.3.2.1) sunt prezentate variantele de produse fitosanitare cu care s-au efectuat tratamentele și proprietățile fizico-chimice cele mai relevante ale substanțelor active supuse studiului, din punctual de vedere al elaborării de metode de extracție și analiză.

În subcapitolul 5.4 sunt prezentate ”Stabilirea loturilor experimentale pentru roșii cherry, castraveți , ardei iuți, salată și struguri “,”Semnarea și răsădirea plantelor” supuse studiului “Modul de prelevare al probelor” de legume , fructe și sol și “Condițiile meteo” existente în momentul efectuării tratamentelor fitosanitare și a prelevării probelor.

CAPITOLUL 6. DETERMINAREA METODEI OPTIME DE EXTRACȚIE A REZIDUURILOR DE PESTICIDE ȘI DE PURIFICARE A EXTRACTELOR DIN PRODUSE VEGETALE ȘI SOL

In acest studiu au fost testate cinci metode de extracție pentru legume și fructe și două metode pentru sol , aceste metode având la bază metode cunoscute, unele dintre ele fiind ușor modificate pentru a obține o mai bună capacitate și precizie de extracție a pesticidelor din legume, fructe și sol, și, deasemenea, pentru a fi mai puțin costisitoare din punct de vedere a costurilor materiale.

6.1 EXTRACȚIA REZIDUURILOR DE PESTICIDE DIN PRODUSE VEGETALE

Pentru a determina metoda optimă de extracție s-au supus studiului 5 metode de extracție cunoscute (Luke, Klein, acetat de etil și QuEChERS original și tamponat), unora aducându-li-se mici modificări în scopul eficientizării acestora în funcție de matricea analizată și de instrumentul de analiză (GC-TOF-MS și LC- QQQ-MS).

S-a considerat că alegerea a unei matrici reprezentative din fiecare grup de probe clasificat conform directivelor DG SANCO este suficient de relevantă pentru stabilirea metodei optime de extracție a grupului respectiv. De exemplu, pentru grupul matricilor cu „conținut mare de apă” din care fac parte roșiile, castraveții, ardeii și salata ș.a, am ales roșiile ca matrice reprezentativă, iar din grupul matricilor „cu aciditate mare și conținut mare de apă” s-au ales strugurii ca matrice reprezentativă. (SANCO/12495/2011, SANCO 12571/2013)

Probe de salată au fost supuse studiului comparativ al determinării metodei de extracție optime pentru a evidenția eficiența metodei de purificare alese pentru matrici pigmentate.

În ceea ce urmează se vor prezenta detaliat doar metodele care au fost modificate și au fost în final selectate pentru desfășurarea studiului.

6.2.1 EXTRACȚIE MINILUKE modificată

10g din fiecare probă (struguri, roșii Cherry, salată și sol) sunt cântărite cu precizie într-un tub de centrifugă de 150mL din polipropilenă și este extrasă cu 10mL acetonă. Amestecul este agitat iar apoi se adaugă 10mL diclorometan și 10mL eter de petrol. Reziduurile sunt extrase utilizând un omogenizator Ultraturax timp de 2 minute la 15.000rpm , iar apoi au fost centrifugate 5min la 4000rpm. Pentru matricile pigmentate (salata) se adaugă suplimentar 7mg cărbune activ (GBC). Faza organică din partea superioară (ex. 26mL pentru struguri, 15 mL pentru roșii cherry) a fost evaporată la 40°C cu un rotavapor până aproape de sec. Pentru analiza GC, reziduurile se redizolvă în 2mL *iso*-octan:toluen 9:1, v/v, care conține 0.2μg/mL HCB , se filtrează prin filtru RC 0.2 μm și se analizează . Pentru analiza LC, după concentrare reziduurile sunt reluate cu 2 ml amestec acetonitril:apă 50:50, se filtrează prin filtru RC 0.2 μm și se analizează.

6.2.2 EXTRACȚIE QUECHERS TAMPONATĂ modificată

10g din fiecare probă (struguri, roșii cherry și salată) sunt cântărite cu precizie într-un tub de centrifugă de 100mL din polipropilenă și este extrasă cu 10mL acetonitril acidifiat cu 1% acid acetic. După adăugarea a 200μl dintr-o soluție de 10 μg/ml HCB (doar la extracțiile GC), reziduurile sunt extrase utilizând un omogenizator Ultraturax timp de 1min la 15.000 rpm . Se adaugă apoi 4g MgSO₄, 1g NaCl și 1g CH₃COONa iar soluția rezultată este agitată timp de 1 minut și apoi centrifugată pentru 5min la 4000rpm. Se ia un alicot din extractul de acetonitril (6mL) , se transferă într-un tub de centrifugă de 20mL din polipropilenă și se adaugă 150mg PSA și 900mg MgSO₄. Pentru matricile pigmentate (salata) se adaugă în plus 15mg cărbune activ (GBC). Pentru analiza LC, după agitare timp de 1 minut și centrifugare timp de 1 minut la 4000rpm se ia 1 ml extract de acetonitril purificat , la care se adaugă 1 ml amestec acetonitril: apă 50:50, se filtrează prin RC 0.2 μm și se analizează pe LC. Pentru GC, după agitare timp de 5 minute, s-a centrifugat pentru 5min la 4000rpm, s-a luat 1mL extract și s-a concentrat în curent

de azot. Reziduurile sunt redizolvate în 1mL *iso*-octan : toluen 9:1, v/v ,filtrate prin filtru RC 0.2 μ m și analizate.

6.2.6 ALEGEREA METODEI OPTIME DE EXTRAȚIE A PESTICIDELOR DIN FRUCTE ȘI LEGUME

Pentru a compara performanțele metodelor de extracție supuse studiului , probe martor (blank) din fiecare matrice reprezentativă (roșii, struguri și salată) au fost îmbogățite cu o soluție amestec la nivel 50 μ g/kg care conține 80 de pesticide. Dintre toți metaboliții identificați s-a decis cuantificarea a cinci dintre aceștia : tetrahidroftalimida, tiofosgen - metaboliți ai captanului, ftalimida - metabolit al folpetului, 2,4 '-diclorobenzofenonă – metabolit al fenarimolului și dicolfolului și 4,4'-diclorobenzofenonă- metabolit al dicofolului.

Comparația între metodele de extracție este ilustrată grafic în Figura 6.2 pe două intervale de rate de recuperare (sub 70% și peste 120%), rezultatele obținute prin extracția cu metoda Klein (DIN EN 15637) nefiind reprezentate deoarece au fost cuantificate numai 30 de pesticide și 15 pesticide au fost doar identificate.

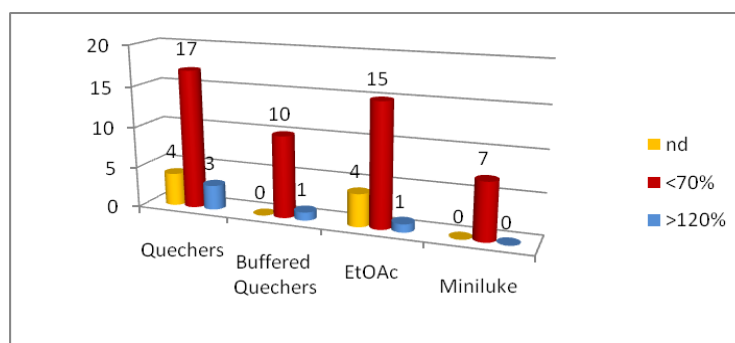


Figura 6.2 Compararea numărului de pesticide în două intervale de recuperare (<70% și > 120%) sau nedetectat (nd) la un nivel de 50 μ g/kg a probei-martor de struguri

Ratele de recuperare obținute pentru metaboliții analizați prin metodele de extracție testate sunt prezentate în Tabelul 6.1.

Tabel 6.1. Ratele de recuperare comparative ale metaboliților de pesticide extrași prin 4 metode de extracție

Metaboliți	QuEChERS	QuEChERS tamponat	EtOAc	Mini-Luke modificat
2,4'-Diclorobenzofenonă	0	69	0	59
Ftalimidă	0	41	0	73
p,p'-Diclorobenzofenonă	123	113	0	42
Tiofosgen	0	30	70	107
Tetrahidroftalimida	0	47	0	57

După analizarea tuturor datelor obținute se poate concluziona că metoda de extracție Mini-Luke modificată și metoda de extracție QuEChERS tamponată au oferit rezultate acceptabile, drept pentru care aceste două metode de extracție vor fi utilizate în continuare la definitivarea obiectivelor propuse în prezenta lucrare, respectiv pentru extracția reziduurilor de pesticide și a metaboliților lor din 5 matrici (roșii cherry, castraveți, ardei, salată și struguri) urmând a stabili pentru fiecare dintre ele care este metoda optimă de extracție asociată bineînțeles cu metoda de analiză. (Megheșan – Breja, Măruțoiu, Cimpoiu, 2014)

6.3 EXTRACȚIA ACIDULUI 2,4 DICLOROFENOXIACETIC (2,4D)

Prin hidroliza alcalină cu NaOH sau K_2CO_3 se poate realiza o creștere a extractibilității acestuia din legume și fructe, datorată ruperii legăturilor care pot exista între pesticid și matrice. Metoda propusă pentru extracția 2,4 D din roșii este următoarea:

10 g de probă cântărită cu precizie se introduce într-un tub de centrifugă de 250 ml din polipropilenă . Se adaugă 2 ml NaOH 10M ,se agită energic 1 min după care se lasă în repaus 30 min. Se neutralizează apoi cu 5 ml H_2SO_4 3M și se adaugă 15 ml ACN cu 1% CH_3COOH după care se agită la Ultraturax (1min la 15.000rpm). Se introduc apoi 3g CH_3COONa anhidru , 6g $MgSO_4$ și 3 g NaCl, se agită în mână timp de 1 minut, apoi se centrifughează 5 min la 4000 rot/min. Din extractul rezultat (cca.12 ml) se ia 1 ml, la care i se adaugă 1 ml ACN:H₂O în proporție 50:50 , se filtrează prin filtru 0.2 μm RC și se analizează pe LC.

6.4 EXTRACȚIA REZIDUURILOR DE PESTICIDE DIN SOL

Dintre cele două metode prezentate mai jos a fost selectată ca optimă metoda de extracție cu PSA, aceasta având ca avantaj numărul de pesticide extrase, ratele de recuperare mai bune și faptul că extractul este mult mai “curat”, ceea ce a permis analiza unui număr mai mare de probe

de sol fără a fi necesară injectarea de acetonă pentru a curăța componentele de injectare ale instrumentului de analizat de analizat.

6.4.1 METODA CU PSA

10 g de probă de sol cântărită cu precizie se introduce într-un tub de centrifugă de 250 ml din polipropilenă și se amestecă cu 10 mL apă și 20 mL acetonitril acidifiat cu 1% acetic acid. După adaugarea Standardului Intern de HCB (0.2μg/mL), reziduurile sunt extrase utilizând un omogenizator Ultraturax (1min la 15.000rpm). Apoi se adaugă 4g MgSO₄, 1g NaCl și 1g CH₃COONa amestecul rezultat fiind agitat 1 minut și apoi centrifugat 5min la 4000rpm. Un alicot de extract de acetonitril (cca 6mL) este transferat într-un tub de centrifugă de 20mL din polipropilenă și se adaugă 150mg PSA și 900mg MgSO₄. Amestecul este apoi agitat în mână pentru 1 minut, centrifugat și apoi 1 ml din extractul rezultat (cca 4 mL) este analizat pe GC - TOF-MS .

6.5 PURIFICAREA EXTRACTELOR DIN PRODUSE VEGETALE

În studiul de față, în cazul probelor cu conținut mai mare de pigmenți , cum este salata , pentru metoda de extracție Mini-Luke am introdus o etapă de purificare cu GBC.

Pentru a evalua eficacitatea purificării, probele martor (struguri, roșii și salată) au fost îmbogățite la un nivel de concentrație de 0,05 și 0,1 μg/ml. Valorile scăzute ale ratei de recuperare a unor compuși cu structură planară sunt o consecință a utilizării GBC pentru purificare (acesta reține acești compuși din probe) și, de asemenea, probabil din cauza etapei de concentrare a extractului.

Ținând seama de aceste recomandări DG DANCO 12571/2013 s-a decis utilizarea în prezenta lucrare a HCB-ului ca și standard intern de injectare, astfel că adăugarea lui se face la final, odată cu soluția de reluare această decizie fiind susținută și de faptul că dacă este adăugat înainte de extracția probelor și ulterior se utilizează GCB pentru purificare, HCB-ul datorită structurii sale planare, va fi reținut de acesta .

Concluziile pe scurt referitoare la etapa de purificare cu GBC ar fi următoarele:

- În procedura de extracție cu EtOAc (în studiu au fost matricile struguri, salată și roșii cherry), purificarea cu GBC ar trebui să fie evitată, deoarece pierderea pesticidelor a fost foarte mare; numai 10% din substanțele active au fost găsite după purificare iar recuperările pentru pesticidele cuantificate au fost între 30-55%

- Extracția Mini-Luke a fost aplicată pe salată , roșii Cherry și struguri. După purificare, recuperările au fost între 55-161%. La analiza acestor extracte brute (nepurificate) de salată au fost întâmpinate următoarele probleme: înfundarea seringii de injectare, scăderea sau creșterea înălțimii picurilor pesticidelor și a abundenței m / z și modificarea timpilor de retenție, ultimile fiind clare efecte de matrice care intervin în analiză.
- În extracțiile cu ACN, influența componentelor matricilor (adică uleiuri esențiale și pigmenți) a fost mai mică decât la celelalte metode de extracție. Pierderile de pesticide de la etapa de purificare cu GBC au fost semnificative, dar comparabile cu cele obținute prin metoda Mini-Luke cu etapă de purificare GBC.
- Recuperările obținute indică faptul că metoda Mini-Luke modificată este mult mai potrivită pentru extracția de reziduuri de pesticide din probe variate excluzând probele pigmentate și uleioase, pentru astfel de probe (de exemplu salată) este preferată extracția în acetonitril (ACN)
- efectul de matrice a fost evaluat comparând aria picurilor pesticidelor obținute din soluții standard (n = 3) cu cele obținute din extractul de salata martor îmbogățită cu aceleași pesticide.
- rezultate asemănătoare s-au obținut și în cazul probelor de sol , unde purificarea extractelor s-a efectuat prin tehnica SPE, utilizând PSA și amestec de săruri
- În cazul determinărilor prin LC , etapă de purificare cu GBC a fost aplicată doar pentru proba de salată, iar metodele de extracție investigate au fost Mini-Luke modificată și QuEChERS tamponată., doar 4 (carbendazim , imidacloprid, tiofanat metil și metomil) dintre cele 17 pesticide investigate având ratele de recuperare mai mari în cazul extracției prin Mini-Luke modificată decât prin QuEChERS tamponată.

CAPITOLUL 7. ELABORAREA METODELOR DE DETERMINAREA A REZIDUURILOR DE PESTICIDE DIN PRODUSE VEGETALE ȘI SOL

7.1 ELABORAREA METODEI DE DETERMINARE PRIN GC –TOF- MS

7.1.1 MATERIAL ȘI METODĂ

Analizele din prezentul studiu sunt realizate cu un gaz cromatograf AGILENT seria 6890 modificat (cu două cuptoare), cuplat cu un spectrometru de masă cu timp de zbor LECO Pegasus (USA), un autosampler AGILENT seria 7683 și injector split/splitless.

Elaborarea metodei GC-TOF-MS are ca punct de plecare o metodă dezvoltată în 2008 în urma unui training de echipa de chimiști ai LZPDRPPPV (din care am făcut parte) împreună cu o echipă de analiști de la Centrul Tehnic European din Praga, al firmei producătoare LECO (USA). Inițial cu metoda respectivă s-au analizat 60 de pesticide, urmând ca în decursul anilor metoda să fie modificată aproape în întregime, iar numărul pesticidelor analizate să ajungă la peste 100. Metoda GC prezentată în această teză este modificată radical față de cea inițială la partea de GC, doar anumiți parametri de la metoda de procesare și metoda MS păstrându-se, acești parametri fiind în mare parte recomandați de producător ca fiind optimi. Astfel că dezvoltarea metodei a pornit de la separarea a 104 pesticide, urmând să se facă o selecție dintre acestea pentru studiul aplicativ (30 pesticide). Drept urmare, în ceea ce urmează să fie prezentat se va pune accentul pe pesticidele selectate pentru studiul aplicativ, dar se vor face numeroase referiri și la celelalte pesticide care pot fi determinate cu această metodă.

Standardele analitice și toți reactivii utilizați sunt de calitate certificată HPLC și GC și sunt achiziționați de la firma Sigma –Aldrich. Sărurile folosite sunt de puritate GC și sunt achiziționate de la firma Merck, iar cartușele, materialele adsorbante PSA și C18, GBC și filtrele de 0,2μm sunt achiziționate de la firma Supelco. Apa ultrapură este preparată cu un aparat TKA compus din două unități Lab tower și GenPure.

Altă mică aparatură utilizată: balanțe MettlerTolledo și Kern, omogenizatoare Grindomix și Ultraturax, rotaevaporator Heidolph, evaporator în curent de azot N-EVAP116 OA-SYS (SUA), centrifugă Consul20, baie de ultrasunete Sonorex, dispensere Hirshmann Laborgerate.

7.1.2 STUDIUL CARACTERISTICILOR FIZICO-CHIMICE A SUBSTANȚELOR ACTIVE

Substanțele active ale pesticidelor studiate sunt grupate în câteva clase chimice, care prezintă proprietăți fizico-chimice diferite chiar dacă fac parte din aceeași grupă chimică, cum ar fi solubilitate în apă, polaritate, presiune de vapori, punct de topire etc.

7.1.3 FACTORI CARE INFLUENȚEAZĂ SEPARAREA

În acest subcapitol se tratează o serie de factori care pot afecta separarea cromatografică a pesticidelor în analize gaz cromatografice, cu exemplificări a situațiilor apărute pe parcursul elaborării metodei de analiză GC-TOF-MS, astfel s-au analizat factori cum ar fi: punctul de fierbere, polaritatea analitului vs polaritatea fazei staționare din coloană, temperatura

injectorului, temperatura cuptorului coloanei- rampe de temperatură, lungimea și diametrul intern al coloanei, debitul gazului purtător, cantitatea de probă injectată, temperatura sursei de ioni, rata de achiziție a spectrelor, câteva dintre ele fiind prezentate mai în detaliu în ceea ce urmează.

7.1.3.4 TEMPERATURA CUPTORULUI COLOANEI. RAMPE DE TEMPERATURĂ

Temperatura coloanei este un factor care în gaz cromatografie poate modifica aria și înălțimea unui pic cromatografic în diferite proporții. O temperatură ridicată a coloanei scurtează timpul de retenție, dar aceasta este în dezavantajul separării întrucât majoritatea compușilor stau în faza gazoasă, iar pentru a avea loc separarea compușilor, aceștia trebuie să interacționeze cu faza staționară, altfel nu se vor înregistra diferențe pronunțate ale timpilor de retenție. Cea mai bună separare se obține la dezvoltarea unui program de temperatură a cuptorului, deoarece vor intervenii în separare și polaritatea și punctul de fierbere. (Fernandez-Alba, 2012)

Ținând cont de observațiile din literatura de specialitate, într-o prima încercare s-a folosit o temperatură inițială a cuptorului de 100°C, iar rampele de temperatură sunt prezentate în figura 7.1.

Enter oven temperature ramp below:

#	Rate (°C/min)	Target Temp (°C)	Duration (min)
1*	Initial	100.00	2.00
2	25.00	175.00	1.00
3	5.00	225.00	2.00
4	25.00	290.00	10.00

Coolant to Column Oven On Off Coolant timeout:

Add Remove

Figura 7.1 Selectarea rampelor de temperatură, încercarea 1

Totuși pentru a separa izomerii amunitor pesticide precum și pe cele cu puncte de fierbere ridicate și anumiți compuși contaminanți, trebuie construită o rampă de temperatură mai complexă. Astfel, s-a ajuns la următoarea rampă de temperatură, care are un timp total de analiză de 29.2 minute și separă 92 de pesticide.

Enter oven temperature ramp below:

#	Rate (°C/min)	Target Temp (°C)	Duration (min)
1*	Initial	80.00	2.00
2	20.00	180.00	0.00
3	5.00	220.00	0.00
4	25.00	300.00	11.00

Coolant to Column Oven On Off Coolant timeout:

Add Remove

Figura 7.2 Selectarea rampelor de temperatură, încercarea 2

În figura 7.3 sunt prezentate câteva pesticide injectate dintr-un amestec de concentrație 0.5 ppm ,cu toți ceilalți parametri GC identici exceptând rampele de temperatură , pentru a susține cele afirmate anterior.

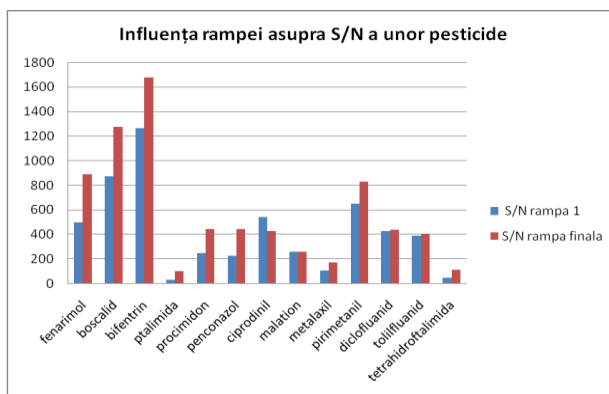


Figura 7.3. Influența rampei asupra raportului S/N a unor pesticide

7.1.3.6 DEBITUL GAZULUI PURTĂTOR

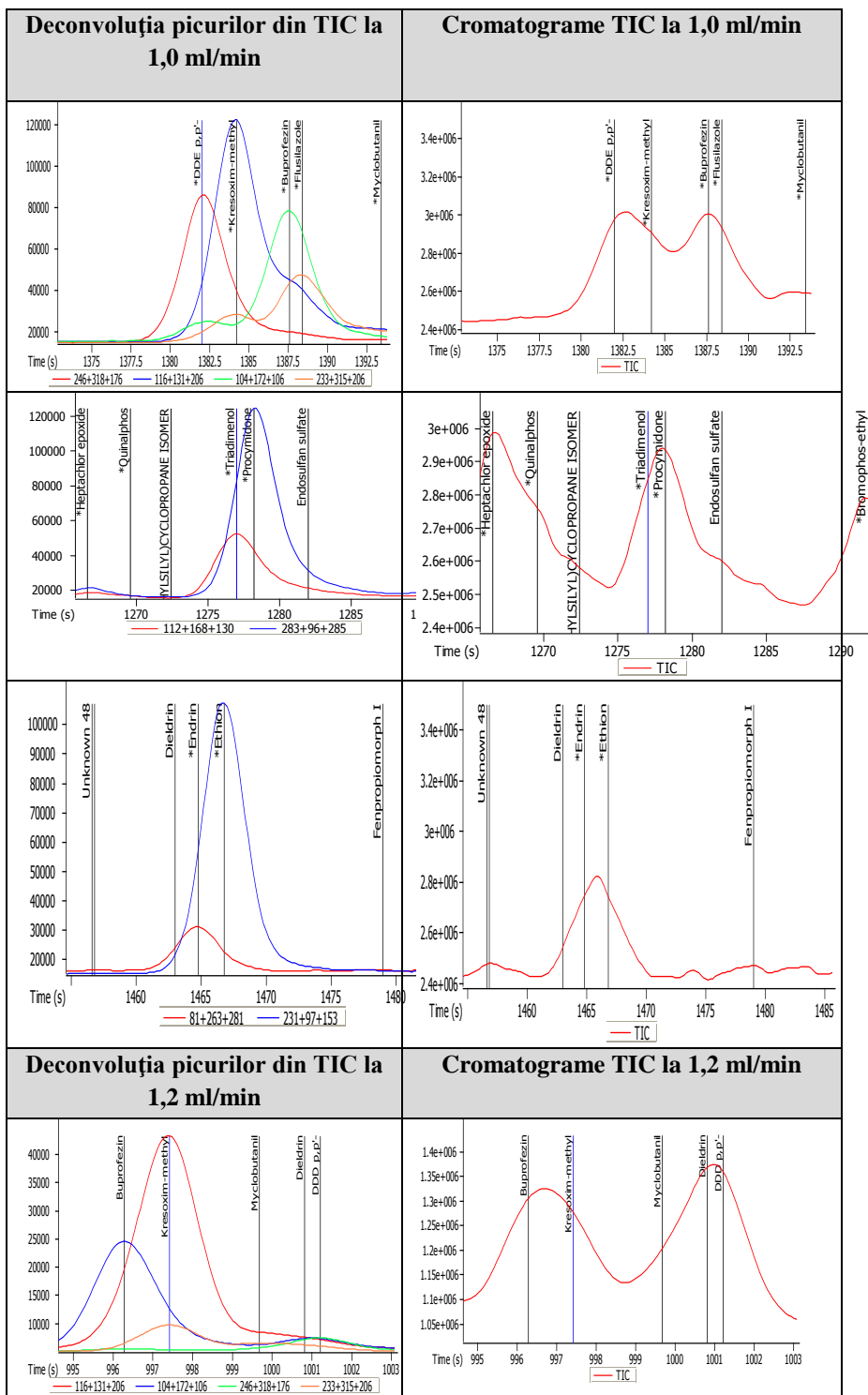
Un debit mare de gaz purtător (în cazul nostru Helium), reduce timpul de retenție și produce o separare slabă a analiților, datorită în special ca și în cazul temperaturii prea ridicate, faptului că analiții petrec prea puțin timp în coloană și nu au timp pentru a interacționa cu faza staționară. Un debit scăzut de gaz purtător crește timpul de retenție. (de Koning și Gumpendobler, 2007)

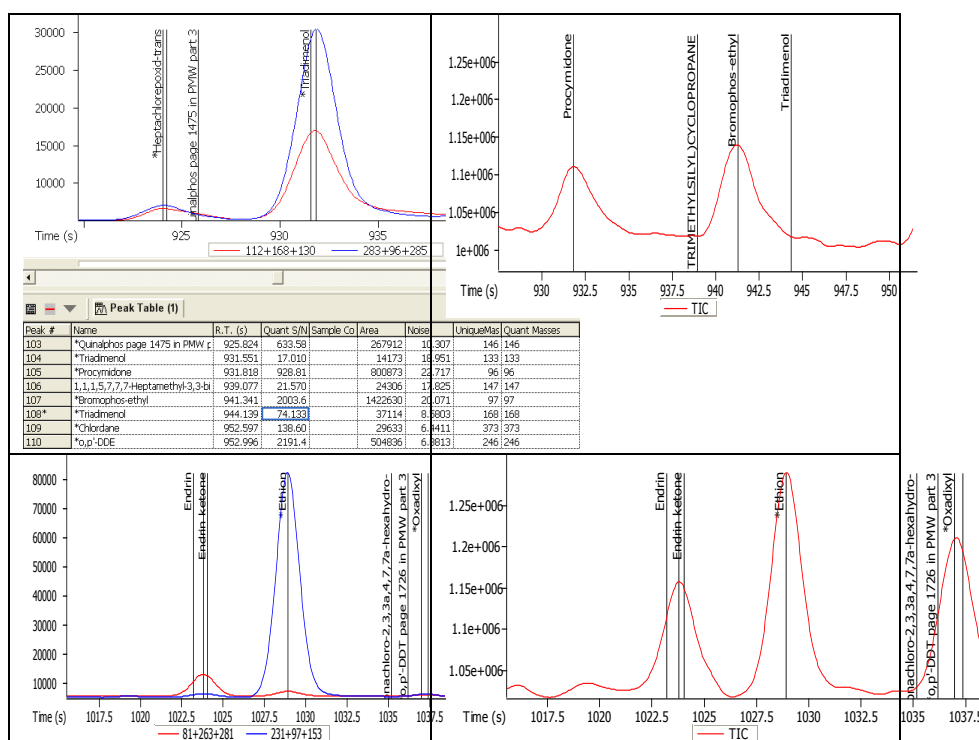
După stabilirea rampei de temperatură s-a trecut la stabilirea debitului optim de gaz purtător . S-a început cu un debit de 1,0 ml/min ,iar apoi s-a modificat la 1,2 ml/min, toți ceilalți parametri ai GC fiind păstrați neschimbați. Cel mai important motiv al acestei modificări de debit a fost acela că s-au observat coeluții a unor pesticide și astfel s-a încercat o separare mai bună a picurilor. In figurile 7.4 , 7.5 sunt prezentate 3 exemple cu pesticide care se comportă diferit la modificarea debitului de gaz purtător.

Ceea ce trebuie remarcat este faptul ca deși picurile pesticidelor prezentate nu sunt bine separate din punct de vedere cromatografic, ele sunt separate și integrate prin intermediul algoritmului de deconvoluțiune al instrumentului GC-TOF-MS de la LECO.

După cum se observă unele picuri sunt foarte bine separate după creșterea debitului de gaz purtător(ex. etion, endrin) , altele parțial separate (ex. kresoxim-metil, buprofezin au rămas coeluate, dar flusilazolul și pp' DDE s-au separat), iar altele au rămas neseperate , însă au apărut izomeri ai unora dintre ele (ex. triadimenol rămâne coeluat cu procimidonul, dar apare izomerul

2 al triadimenolului care poate fi cuantificat, izomer care la debit de 1,0 ml/min nu era nici măcar identificat).





7.1.4 CONDIȚII FINALE DE DETERMINARE A REZIDUURILOR DE PESTICIDE PRIN GC-TOF - MS

Spectrometrul de masă LECO Pegasus Time-of-Flight Mass Spectrometer (TOF-MS) (USA) este echipat cu un gaz cromatograf AGILENT seria 6890 modificat, cu două cuptoare, un autosampler AGILENT seria 7683 Autosampler și injector split/splitless. Pentru separarea cromatografică s-a optat pentru două coloane de polarități diferite, prima RXi-MS 30m x 0.25mm x 0.25μm (Restek, USA) și cea de-a doua BPX50 1.6m x 0.1m x 0.1μm (SGE Analytical Science, Australia). Temperatura injectorului a fost setată la 250°C, iar injectarea splitless a fost realizată utilizând heliu ca și gaz purtător cu un debit de 1.2mL/min.

Programul de temperatură a fost realizat, fără modulare, după cum urmează:

cuptor 1 - 80°C (2 min), 20°C/min to 180°C (0 min), 5°C/min to 220°C (0min), 25°C/min to 300°C (11min);

cuptor 2 - 110°C (2 min), 20°C/min to 210°C (0 min), 5°C/min to 250°C (0 min), 25°C/min to 330°C (10min).

Volumul de injecție este de 1μL. Spectrometrul de masă a operat în modul de ionizare (EI) și modul de monitorizare full scan pe un domeniu cuprins între m/z 40 și m/z 450, cu energia de ionizare de 70eV și o rată de achiziție de 15 spectre/secundă. Linia de transfer a fost

menținută la 280°C, iar temperatura sursei de ioni a fost setată la 220°C. În metoda de procesare și metoda MS mai este precizat un timp de delay, de întârziere a achiziției de 350s, pentru a se elimina solventul; o rată de potrivire (match) de minim 70% cu pesticidele din cele 10 librării de spectre de care dispune aparatul; un voltaj pe detector de 1700V, care în timp poate fi ridicat până la 2000V în funcție de durata de utilizare și uzura detectorului.

În figura 7.6 sunt ilustrate rampele de temperatură pentru cele două cuptoare, respectiv linia de transfer și timpul total de analiză (29.2 minute).

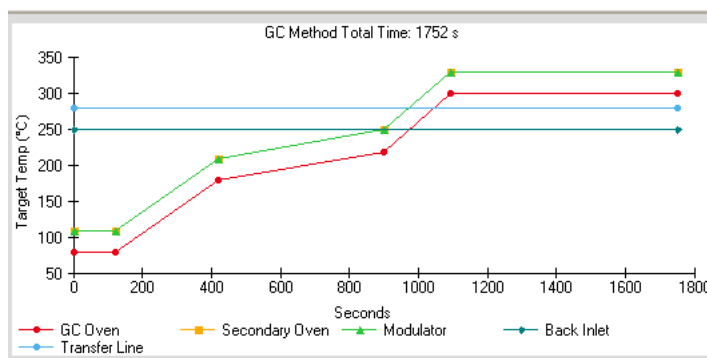


Figura 7.6 Rampele de temperatură pentru cele două cuptoare, linia de transfer și timpul total de analiză (29.2 minute)

7.2 ELABORAREA METODEI DE DETERMINARE A REZIDUURILOR DE PESTICIDE DIN PRODUSE VEGETALE PRIN LC MS QQQ

7.2.1 STUDIUL CARACTERISTICILOR FIZICO-CHIMICE A SUBSTANȚELOR ACTIVE

Pesticidele supuse analizei prin LC au fost : 2,4D, azoxistrobin, piraclostrobin, boscalid, tiofanat metil, ometoat, dimetoat, carbendazim, acetamiprid, fenarimol, penconazol, ciprodinil, pirimetanil, malation, imidacloprid, metomil tiacloprid, propiconazol, hexitiazox, cimoxanil, multe dintre ele fiind ca substanțe secundare în produsele fitosanitare utilizate pentru tratamente.

Din păcate cimoxanilul nu a putut fi analizat întrucât standardul analitic utilizat pentru optimizarea identificării și cuantificării lui a fost total degradat, în plus în mare parte din literatura de specialitate acest pesticid este catalogat ca nedetectabil ca urmare a structurii sale.

7.2.2 MATERIAL ȘI METODĂ

Aparatul cu care s-au efectuat analizele LC și studiile LC ale acestei lucrări este un lichid cromatograf AGILENT dotat cu o pompă cuaternară model 1200, dotat cu autosampler și cuplat cu un spectrometru de masă de tip triplu cuadrupol AGILENT 6410 cu sursă de ionizare de tip

mod de ionizare multiplu (Multi Mode Ionization sau MMI) ,ionizare ESI și APCI. În elaborarea metodei LC-MS-MS s-a lucrat doar pe ionizare ESI și s-a pornit de la consultarea unei mari diversități de metode , punând accentul pe câteva metode de producător (Agilent) care utilizau diverse faze mobile cu diverși modificatori . În final, ținând cont de parametrii necesari pentru a realiza o bună separare cromatografică, s-a considerat adecvat să fie aleasă ca și modalitate de lucru separarea cromatografică pe fază staționară inversă (coloana Zorbax XDB C18), folosind drept fază mobilă un amestec de ACN și apă ultrapură cu 0.1% acid formic ca și modificator. (Thurman , Ferrer, 2005; 2008)

Anumiți parametrii pentru sursa de ionizare Multi Mode ionization (MMI) și ionizare ESI sunt precizați de producător a se stabili la o anumită valoare , cum ar fi presiunea la nebulizator care întotdeauna trebuie să fie 60 psi, debitului gazului de uscare menținut întotdeauna la 5 l/min.(Agilent Ghidul utilizatorului, 2008)

În subcapitolele următoare au fost prezentați câțiva factori care guvernează retenția în cromatografia pe fază inversă, unii dintre vor fi prezentați mai în detaliu, în acest rezumat al tezei., cu exemplificările situațiilor întâlnite la dezvoltarea metodei de analiză LC-MS-MS.

7.2.3 INFLUENȚA DEBITULUI FAZEI MOBILE ASUPRA SEPARĂRII

Pentru studiul influenței debitului fazei mobile s-au păstrat toți ceilalți parametrii , variind doar debitul. Ținându-se seama și de indicațiile producătorului coloanei , s-au supus testului debite de 0,6, 0,5 și 0,4 ml/min, în final optându-se pentru debitul de 0,4 ml/min. Chiar dacă vizibil forma picurilor este aceeași pentru toate debitele studiate, pentru cele mai multe picuri s-au obținut arii mai mari și înălțimi ale picurilor mai bune, factori care contează la stabilirea LOD și LOQ. Pentru o mai bună exemplificare in tabelul 7.2 sunt prezentate comparative ariile picurilor pesticidelor supuse analizei la debite de 0,6 respectiv 0,4 ml/min.

Tabelul 7.2. Influența debitului fazei mobile asupra separării

Pesticid	Arie pic debit 0.4 ml/min	Arie pic debit 0.6 ml/min
Metomil	92414	91313
Carbendazim	168433	172844
Pirimetanil	77292	78110
Ometoat	47686	43418
Acetamiprid	252490	253549
Tiofanat metil	551260	593632
Boscalid	5642	5277
Fluquinconazol	911	917
Piraclostrobin	738841	650800
Azoxistrobin	1043487	895050
Dimetoat	178809	175322
Tiacloprid	216047	209082
Imidacloprid	186883	183300
Malation	18814	19538
Fenarimol	99090	104899

7.2.4 INFLUENȚA COMPOZIȚIEI FAZEI MOBILE ASUPRA SEPARĂRII

Luând în calcul indicațiile din literatura de specialitate s-au făcut o serie de modificări pentru a ajunge la o schema de eluție cu gradient cu care să se obțină o separare acceptabilă pentru toate pesticidele supuse analizei.

Iată unul dintre rezultatele optimizării gradientului (figura 7.8) . Carbendazimul și ometoatul având logP apropiat au tendința să coelueze în prima încercare de separare , după care modificând treptele de gradient se obține o separare frumoasă a celor două pesticide, însă apar și alte picuri ale altor pesticide care erau de fapt în soluție ,dar care inițial, înainte de modificarea de gradient, nici măcar nu au fost identificate. Pesticidele cu logP apropiat, dar mai ales cele polare, care au eluat primele, au fost o reală provocare în ceea ce privește obținerea unei separări cromatografice bune .

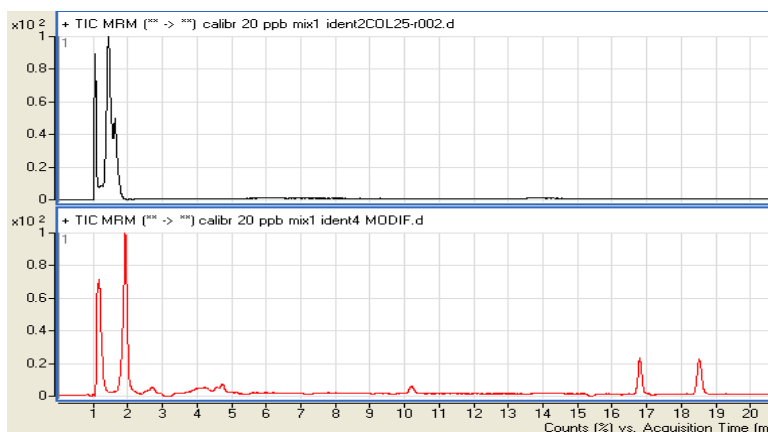


Figura 7.8. Influența gradientului în separarea unui amestec de pesticid

Schema finală de eluție cu gradient este următoarea:

	Time	B%	Flow	Max. Press.
1	0.00	20.0	0.400	400
2	28.00	80.0	0.400	400
3	30.00	100.0	0.400	400
4	31.00	100.0	0.400	400
5	33.00	20.0	0.400	400
6	35.00	20.0	0.400	400

7.2.5 INFLUENȚA pH-ULUI FAZEI MOBILE ASUPRA SEPARĂRII

În RP-LC controlul pH-ului se realizează cu ajutorul soluțiilor tampon sau al acizilor. Se folosesc soluții tampon pe bază de acetat sau formiat de sodiu sau amoniu și acizi ca acid acetic sau formic.

În figura 7.10 sunt prezentate cele trei modificări ale compoziției fazei mobile întreprinse în dezvoltarea metodei LC, accentul punându-se pe separarea primelor picuri eluate de pesticide, care au polarități apropiate și au fost destul de dificil de separat. În prima cromatogramă este ilustrată separarea cu fază mobilă având: A: apă cu modificator 0,1% acid formic + formiat de amoniu 5mM și B: acetonitril; a doua are ca fază mobilă A: apă cu modificator 0,1% acid formic și B: acetonitril cu modificator 0,1% acid formic; a treia cromatogramă are ca fază mobilă A: apă cu modificator 0,1% acid formic și B: acetonitril. Trebuie precizat că sunt prezentate pentru fiecare modificare cele mai bune cromatograme dpdv a separării primelor pesticide eluate, și că s-a injectat un amestec de aceeași concentrație în toate cazurile.

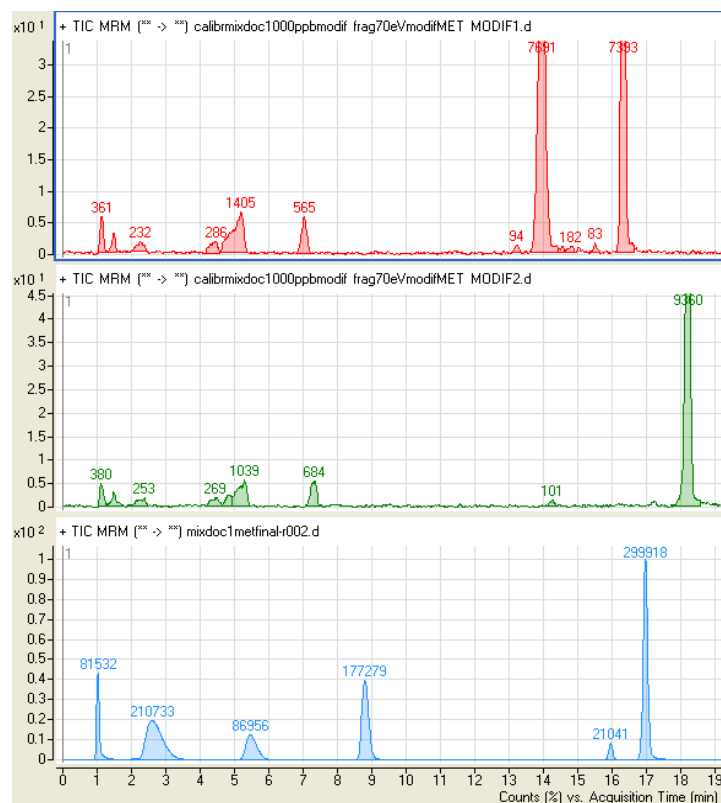


Figura 7.10 Studiul comparativ al modificării pH-ului fazei mobile prin introducerea unor modificatori (acid formic și formiat de amoniu)

7.2.6 INFLUENȚA ANUMITOR PROPRIETĂȚI FIZICO-CHIMICE ALE SUBSTANȚELOR ACTIVE ASUPRA SEPARĂRII

Substanțele active pot fi grupate în câteva grupe, în funcție de valorile ale coeficientului de repartiție octanol/apă ($\log P$). Cu un program de eluție cu gradient adecvat și gruparea pesticidelor pe serii separate de analiză astfel încât să nu fie în aceeași serie mai mult de două pesticide care ar putea să coelueze s-a putut realiza o separare cromatografică suficient de bună. În figura 7.11 sunt prezentate cromatogramele TIC efectuate cu aceeași metodă analitică, în aceleași condiții pentru: A- amestec care conține 25 pesticide la o concentrație de 100 ppb într-o singură injecție; B, C,D,E amestecuri de câte 3-8 pesticide, aceleași ca în amestecul A, la o concentrație de 100 ppb, dar injectate separat, astfel că în final, însumate, se obțin tot 25 picuri de pesticide.

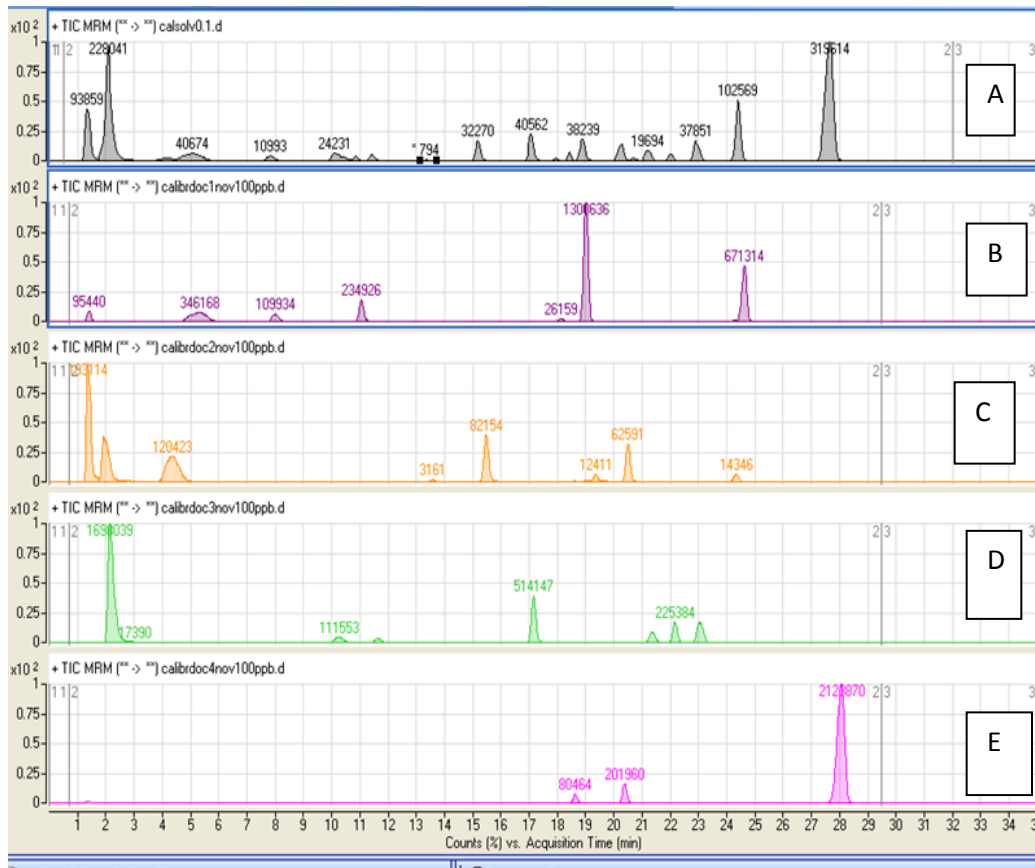


Figura 7.11 Influența numărului de pesticide dintr-o injecție asupra separării

Ceea ce este imediat vizibil, sunt ariile picurilor obținute în grupurile separate și amplitudinea picurilor obținute în urma acestor separări. De asemenea, forma picurilor este superioară celor obținute la injecția amestecului de 25 de pesticide. Foarte ușor pot fi observate substanțele care au coeluat în separarea A la RT 1-2, aprox. 4, dar care puse în grupuri separate pot aduce cu certitudine o îmbunătățire la efectuarea analizelor cantitative. Trebuie precizat de asemenea faptul că picurile largi obținute atât în cromatograma A cât și în celelalte, reprezintă coeluții de 2 pesticide, iar în cazul cromatogramei A pesticidele care coeluează la RT aprox 4 sunt în număr de 3 (acetamiprid, imidacloprid, metomil).

7.2.7 CONDIȚII FINALE DE DETERMINARE A REZIDUURILOR DE PESTICIDE PRIN LC-MS-QQQ

Metoda de analiză finală elaborată pentru LC-MS-QQQ în scopul determinării reziduurilor de pesticide din legume și fructe are următorii parametrii:

Parametrii LC:

Coloană cromatografică: Zorbax

Eclipse XDB-C18, 4.6x50mm

1.8 micron

Debit de fază mobilă: 0,4

ml/min

Temperatura coloanei:

ambientală (25°C)

Volum de injecție: 10μL

Fază mobilă: A: Apă + 0.1%

acid formic ; B: Acetonitril

Gradient de eluție:

Timp min	B %
0	20
28	80
30	100
31	100
33	20
35	20

Parametrii MS:

Sursa de ionizare: ESI

Mod de ionizare : pozitiv

Energie de fragmentare :
specifică fiecărui pesticid 70-
120 V

Energie de coliziune : specifică
fiecărui pesticid 5-20 eV

Tensiune pe capilară : 2500V

Temperatura gazului în sursa
de ionizare: 350°C

Presiune nebulizator : 60 psi

Debitului gazului de uscare : 5
L/min

Gaz pentru nebulizare,
desolvatare și coliziune: azot

7.3 ELABORAREA METODEI DE ANALIZĂ MONOREZIDUALĂ A 2,4 D PRIN LC-MS-QQQ

Erbicid selectiv, 2,4 D, este folosit pentru a proteja culturile de cereale împotriva buruienilor foioase. Acesta este, de asemenea, aplicat ca stimulator de creștere în timpul creșterii plantelor (roșii), și post-recoltare pentru protecția fructelor, în special a citricelor.

Roșiile este considerate una dintre culturile cele mai sensibile în ceea ce privește 2,4-D și derivații lui. Ca și stimulator de creștere se aplică în doze subletale variind între 0.42 - 13.44 g s.a /ha direct pe plante, în diferite stadii de creștere, de la începutul înfloririi.

7.3.1 MATERIAL ȘI METODĂ

Instrumentul de analiză este un lichid cromatograf Agilent 1200 , dotat cu pompă cuaternară și autosampler Agilent, și cuplat cu un spectrometru de masă tripluadupol QQQ Agilent 6410 , cu sursă de ioni de tip MMI (Multi Mode Ionization).

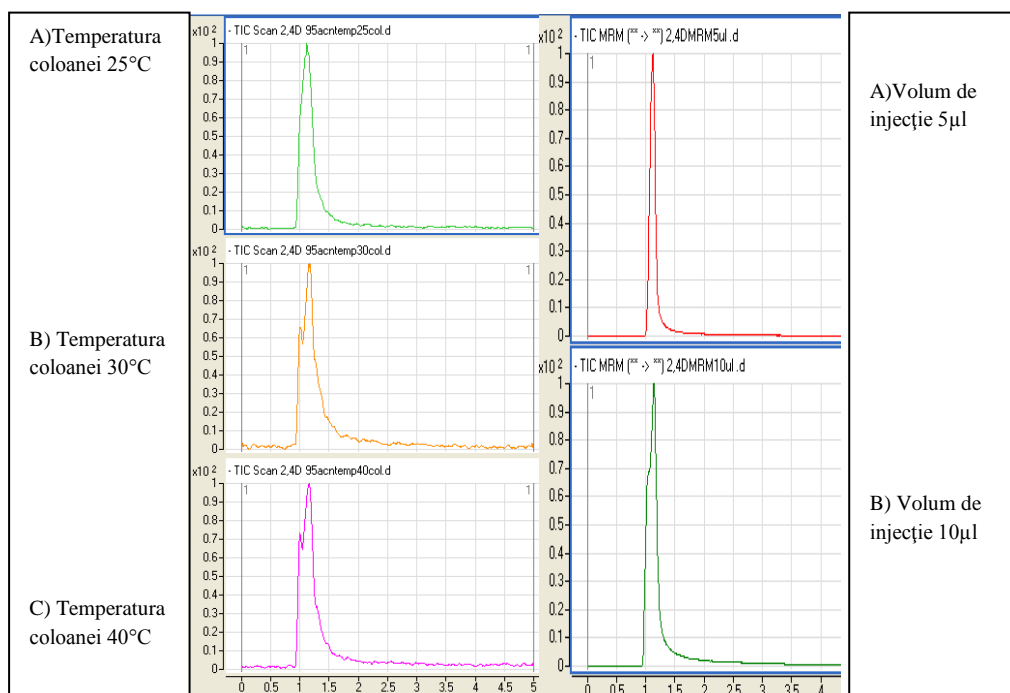
În subcapitolele următoare se tratează cu exemplificări de pe parcursul dezvoltării metodei, câțiva factori care influențează determinarea pesticidului 2,4D.

7.3.4 INFLUENȚA TEMPERATURII ASUPRA SEPARĂRII

Temperatura este un parametru important al separării cromatografice. Foarte bine ilustrată este influența sa în analiza 2,4D, forma picului obținut fiind vizibil determinată de temperatură (figura 7.14), valorile temperaturii comparate fiind 25, 30 și 40°C, temperatura finală de analiză a 2,4D a fost stabilită la 25 °C. (Agilent Ghidul Utilizatorului, 2008)

7.3.5 INFLUENȚA VOLUMULUI DE PROBĂ INJECTATĂ ASUPRA SEPARĂRII

Obținerea unor picuri splitate sau dublate, deasemenea a unor picuri largi au printre factori determinanți și volumul de probă injectată.



7.3.7 CONDIȚII FINALE DE DETERMINARE A REZIDUURILOR DE 2,4D PRIN

LC-MS-QQQ

Coloana : Zorbax Eclipse XDB-C18, 4.6x50mm 1.8 micron

Faza Mobilă:

B: 95% ACN+0.1% HCOOH

A: 5% H₂O+0.1% HCOOH

Debit FM : 0.5 ml/min, regim izocrat

Temperatură coloană : ambientală (25°C)

Tip ionizare: ESI negativ Tensiune pe capilară : 2500V
Temperatura gazului în sursa de ionizare: 350°C
Presiune nebulizator : 60 psi
Debitului gazului de uscare : 5 L/min
Gaz pentru nebulizare, desolvatare și coliziune: azot
Energie de fragmentare: 70eV
Energii coliziune :
 Tranziția 219→161, 10eV
 Tranziția 219→125 , 25eV
Volum injecție: 5μL
Timp total de analiză : 3 minute

CAPITOLUL 8. VALIDAREA ANALITICĂ A METODELOR MULTIREZIDUALE GC ȘI LC PENTRU DETERMINAREA REZIDUURILOR DE PESTICIDE DIN LEGUME, FRUCTE ȘI SOL

În acest capitol s-a prezentat validarea metodelor de analiză și extracție elaborate pe diverse matrici astfel:

- Metoda GC-TOF-MS cu metoda de extracție Mini-Luke modificată a fost validată pentru roșii și struguri
- Metoda GC-TOF-MS cu metoda de extracție cu PSA a fost validată pentru sol
- Metoda LC-QQQ-MS cu metoda de extracție QuEChERS modificată a fost validată pentru ardei iuți

8.1 CRITERII DE VALIDARE PENTRU GC CONFORM DG SANCO APLICATE PE LEGUME, FRUCTE ȘI SOL

Deși solul nu este o matrice încadrată în ghidul DG SANCO, în validarea metodei GC pentru sol s-au luat în considerație cerințele DG SANCO/12495/2011.

În conformitate cu ghidul DG SANCO 12495/2011 și DG SANCO 12571/2013, implementat la 01/01/2014 s-au verificat următoarele criterii de validare pentru fiecare matrice reprezentativă din grupurile de matrici conform DG SANCO, respectiv sol și pentru fiecare analit: liniaritate, efect de matrice, LOD, LOQ, specificitate, repetabilitate, reproductibilitate, incertitudine de măsurare.

Concluziile privind validările efectuate sunt prezentate în succinct în cele ce urmează.

- În urma validării pe roșii și struguri a metodei GC cu extracția Mini-Luke modificată se pot puncta câteva concluzii:
 - din cele 85 de pesticide supuse validării pe roșii metoda a fost validată pentru 67 de pesticide, doar acestea îndeplinind toți parametrii de acceptabilitate conform DG SANCO/12495/2011
 - din cele 85 de pesticide supuse validării pe struguri metoda a fost validată pentru 61 de pesticide, doar acestea îndeplinind toți parametrii de acceptabilitate conform DG SANCO/12495/2011
- Metoda GC cu extracția PSA specifică a fost total validată în sol pentru 60 de pesticide din 88 propuse pentru validare, din toate clasele chimice.
- Metoda de analiză LC cu metoda de extracție QuEChERS modificată a fost validată pentru un număr de 28 de pesticide din 32 supuse validării în matricea ardei iuți

CAPITOLUL 9 . DETERMINAREA REZIDUURILOR DE PESTICIDE DIN LEGUME ȘI FRUCTE

Tehnica de stropire a fost “preluată” de la majoritatea persoanelor fără o calificare în domeniul protecției plantelor, care își tratează plantele de cele mai multe ori peste doza recomandată și stropindu-le în exces (de fapt îmbăindu-le) folosind un vermores. În prezentul studiu, dozele utilizate au fost în concordanță cu cele recomandate de producătorul produselor fitosanitare. Cu toate acestea , faptul că produsul este aplicat în exces pe plantă, chiar și la doza recomandată ,va avea ca efect obținerea unor concentrații mai mari de substanță activă (pesticid)

Probele au fost cuantificate pe curbe de calibrare în solvent, fiecărui pesticid analizat fiindu-i prezentată curba de calibrare. Probele a căror conținut depășește valoarea maximă din curba de calibrare, au fost diluate cu solventul de reluare, factorul de diluție fiind specificat pentru fiecare pesticid în parte.

Rezultatele obținute sunt prezentate sub forma unor grafice comparative care cuprind tehnica de analiză (GC și/sau LC) și metoda de extracție(Mini-Luke modificată și/sau QuEChERS modificată) pentru fiecare pesticid. Deasemenea , sunt construite grafice de degradare a pesticidelor cuprinzând valorile extracțiilor Mini-Luke modificată pentru GC , respectiv QuEChERS modificată la LC la 3, 10 și 15 zile.

9.1 DETERMINAREA REZIDUURILOR DE PESTICIDE DIN ROȘII CHERRY

9.1.1 METODA MULTIREZIDUALĂ GC-TOF-MS

În 2012 s-au supus studiului pentru matricea roșii Cherry ,următoarele pesticide: fenarimol, azoxistrobin, boscalid, malation, ciprodinil, penconazol, dimetoat, pirimetanil, bifentrin, bromopropilat, captan, folpet, clorotalonil, dicofol, iprodion, procimidon, metalaxil .

În 2013 s-au adăugat studiului alte pesticide: fludioxonil, miclobutanil.

Probele au fost cuantificate pe curbe de calibrare în solvent izooctan:toluen 9:1, fiecărui pesticid analizat fiindu-i prezentată ecuația curbei de calibrare. Probele a căror conținut depășește valoarea maximă din curba de calibrare, au fost diluate cu solventul de reluare, acest lucru fiind specificat pentru fiecare pesticid în parte, iar pentru raportarea rezultatelor în mg/kg s-a aplicat un factor de corecție , în funcție de metodă și cantitate de extract organic rămas după toate etapele de prelucrare, însă în graficele comparative și curbe comparative rezultatele corectate sunt exprimate ca și ppb.

Curbele de calibrare au fost construite la 7 nivele de calibrare, respectiv 0,01-0,03-0,06-0,09-0,27-0,54-0,81 $\mu\text{g/ml}$.

Secvența de lucru este constituită din o injecție la fiecare nivel de calibrare , urmată de probele de roșii supuse analizei, o probă martor îmbogățită la nivel de 0,05 $\mu\text{g/ml}$ (50ng/ml) pentru fiecare din cele două metode de extracție și se încheie cu o noua serie de injecții din curbele de calibrare. Astfel fiecare nivel de calibrare e constituit din 2 puncte.

Fiecare pesticid este identificat și cuantificat cu minim 3 rapoarte m/z, cu o similaritate cu librăriile de spectre (în număr de 10) de minim 70% și deasemenea fiecăruia i se va stabili metoda de extracție optimă folosind programul statistic GraphPad InStat , aplicând orientativ, un calcul statistic (testul t în perechi), definitiv fiind rata de recuperare obținută, iar în unele cazuri se vor consulta și valorile LOQ și picurile cromatografice obținute.

9.1.2 METODA MULTIREZIDUALA LC-MS-QQQ

În 2012 s-au supus studiului pentru matricea roșii Cherry ,următoarele pesticide: fenarimol, azoxistrobin, boscalid, malation, ciprodinil, penconazol, dimetoat, pirimetanil,ometoat, acetamiprid, tiofanat metil,imidacloprid, metomil, carbendazim.

În 2013 s-au adăugat studiului alte pesticide: fenhexamid, miclobutanil, propiconazol, piraclostrobin, tiacloprid.

Probele au fost cuantificate pe curbe de calibrare în solvent acetonitril: apă 50:50, fiecărui pesticid analizat fiindu-i prezentată ecuația curbei de calibrare în tabelul 9.1.2. Probele a căror conținut depășește valoarea maximă din curba de calibrare, au fost diluate cu solventul de reluare, acest lucru fiind specificat pentru fiecare pesticid în parte și deasemenea a fost aplicat un coeficient de corecție pentru a exprima cantitățile obținute în mg/kg, în funcție de metodă și cantitatea de extract organic obținută după prelucrare .

Pentru pesticidele carbendazim , boscalid, ciprodinil, malation, imidacloprid, metomil au fost construite curbele de calibrare pe 5 nivele de calibrare, respectiv 0,01-0,025-0,05-0,1 și 0,25 $\mu\text{g/ml}$. Pentru pesticidele tiofanat metil, piraclostrobin, azoxistrobin, fenarimol, propiconazol, tiacloprid, acetamiprid, dimetoat , ometoat, au fost construite curbele de calibrare pe 5 nivele de calibrare, respectiv 0,01-0,025-0,05-0,14 și 0,25 $\mu\text{g/ml}$. Pentru pesticidele miclobutanil, pirimetanil și fenhexamid au fost construite curbele de calibrare pe 4 nivele de calibrare, respectiv 0,02-0,05-0,1 și 0,4 $\mu\text{g/ml}$, iar pentru penconazol a fost construită curba de calibrare pe 5 nivele de calibrare, respectiv 0,006-0,015-0,03-0,06 și 0,15 $\mu\text{g/ml}$.

Secvența de lucru este constituită dintr-o injectare la fiecare nivel de calibrare , urmată de probele de roșii supuse analizei , o probă martor îmbogățită la nivel de 0,05 $\mu\text{g/ml}$ pentru fiecare metodă de extracție și încă o injectare la fiecare nivel de calibrare. Astfel fiecare nivel de calibrare este constituit din 2 puncte. Fiecare pesticid este identificat și cuantificat prin două tranziții, (una de cuantificare și a doua de confirmare), și deasemenea fiecăruia i se va stabili care dintre cele două metode de extracție este optimă folosind pentru aceasta un program statistic GraphPad InStat și aplicând un calcul statistic (testul t în perechi) orientativ, definitorie fiind rata de recuperare obținută pentru fiecare pesticid.

9.1.3 STUDIU COMPARATIV 2 metode de extracție/2 metode de analiză

Au fost comparate cele două metode de extracție QuEChERS tamponată modificată și Mini-Luke modificată și cele două metode de analiză GC-TOF-MS și LC-QQQ-MS. Definițiile în alegerea celei mai eficiente metode de extracție și de analiză sunt ratele de recuperare obținute în urma îmbogățirii (fortificării) unei probe martor la nivel de 0,05 $\mu\text{g/ml}$ și prelucrării prin cele două metode de extracție , apoi dacă este nevoie se vor compara forma picurilor obținute și amplitudinea lor și orientativ se va aplica din programul statistic GraphPad InStat, testul ANOVA- Bonferroni (analiza de varianță) .

Pesticidele analizate comparativ în roșii Cherry cu cele 4 combinații metodă extracție/metodă analiză au fost: fenarimol, azoxistrobin, boscalid, malation, ciprodinil, penconazol, dimetoat, pirimetanil, miclobutanil, fenhexamid și piraclostrobin.

9.1.4.8 CONCLUZII – REZIDUURILE DE PESTICIDE DIN ROȘII CHERRY

Concluziile privind eficiența combinațiilor folosite în această matrice sunt formulate succint sub forma unui tabel .

Tabel 9.1.3 Eficiența metodele de extracție și analiză pentru pesticidele din roșii Cherry, conform studiului efectuat

LC QuEChERS modif	LC Mini-Luke modif	GC QuEChERS modif	GC Mini-Luke modif
Acetamiprid	Tiofanat metil	Bifentrin	Bifentrin
Tiofanat metil	Carbendazim	Bromopropilat	Bromopropilat
Carbendazim	Fenarimol	Dicofol	Captan
Metomil	Azoxistrobin	Folpet	Clorotalonil
Imidacloprid	Boscalid	Iprodion	Dicofol
Propiconazol	Penconazol	Procimidon	Folpet
Tiacloprid		Fludioxonil	Iprodion
Ciprodinil		Ciprodinil	Procimidon
Penconazol		Pirimetanil	Metalaxil
Dimetoat		Miclobutanil	Fludioxonil
Pirimetanil		Fenhexamid	Fenarimol
Miclobutanil			Malation
Piraclostrobin			Pirimetanil
Fenhexamid			

În această matrice s-au identificat și cuantificat 5 metaboliți ai pesticidelor cu care s-au efectuat tratamentele fitosanitare (tetrahidroftalimida, ftalimida, 4,4'-diclorobenzofenonă, tiofosgen ,ometoat) și s-au identificat aproximativ 10 alți metaboliți, fiind prezentați doar cei mai importanți și care au avut o similaritate mare cu librăriile de spectre: 3,5 Dicloroanilinei, p,p' Dibromobenzofenonei, 2,4 Diclorobenzofenonă, 3,4 Diclofenil izocianat.

În ceea ce privește depășirea LMA, ținând cont de condițiile de efectuare a tratamentelor fitosanitare și de condițiile climatice, un număr de 5 pesticide au avut depășiri ale LMA după timpul de pauză recomandat.

9.1.5 METODA MONOREZIDUALA LC-MS-QQQ PENTRU 2,4 D ÎN ROȘII

În prezentul studiu s-a dorit observarea persistenței acestui ierbicid ca și stimulator de creștere, în acest scop fiind preparată o soluție de 0,2% de produs DMA numită și sare de amină , în care s-au înmuiat florile de roșii iar după fructificare și fructele verzi, ultima tratare fiind aproximată să fie efectuată înainte cu 2 săptămâni de coacere. Au fost recoltate probe după

coacerea roșiilor tratate, au fost măcinate și depozitate la -18°C . Din păcate, nu s-a putut efectua analiza acestor probe, putând dezvolta doar metoda de analiză, construite curbele de calibrare în solvent și matrice și analizarea a 3 probe martor fortificate la $0,5 \mu\text{g/ml}$ pentru calcularea unor rate de recuperare, după care s-a produs o defecțiune a unui echipament auxiliar al LC (generatorul de azot), ceea ce a determinat amânarea acestei părți din studiu și evident a obținerii unor rezultate în ceea ce privește conținutul de 2,4D din probele de roșii tratate.

Calibrarea în solvent s-a efectuat pe 5 nivele de calibrare, și anume $0,016-0,048-0,096-0,288-0,576 \mu\text{g/ml}$, cu două injecții în fiecare nivel de calibrare. Calibrarea în matrice (roșii) s-a efectuat pe 5 nivele de calibrare, mai scăzute ca și concentrație decât în solvent și anume $0,0099-0,0247-0,0495-0,148-0,297 \mu\text{g/ml}$, fiecare nivel de calibrare fiind format din 3 injecții.

Ratele de recuperare obținute (65%) sunt satisfăcătoare având în vedere modul de extracție al acestui pesticid și alte rezultate raportate în literatură, acestea situându-se de la nedetectat (Pizzutti, 2009) la 104% (Klein&Alder, 2003) în diverse matrici printre care și roșii.

9.2 DETERMINAREA REZIDUURILOR DE PESTICIDE DIN CASTRAVEȚI

9.2.1 METODA MULTIREZIDUALA GC –TOF- MS

În 2012 s-au supus studiului pentru matricea Castraveți Cornișon următoarele pesticide: fenarimol, azoxistrobin, boscalid, malation, ciprodinil, penconazol, dimetoat, pirimetanil, bifentrin, bromopropilat, captan, folpet, clorotalonil, dicofol, iprodion, metalaxil.

În 2013 s-au adăugat studiului alte pesticide: fludioxonil, fenhexamid și piraclostrobin. Curbele de calibrare au fost construite la 7 nivele de calibrare, respectiv $0,01-0,02-0,05-0,1-0,2-0,5-0,8 \mu\text{g/ml}$.

Secvența de lucru este constituită dintr-o injecție la fiecare nivel de calibrare, urmată de probele de castraveți supuse analizei și se încheie cu o probă martor îmbogățită la nivel de $0,05 \mu\text{g/ml}$ (50ng/ml) pentru fiecare din cele două metode de extracție, astfel fiecare nivel de calibrare e constituit dintr-un singur punct.

Cuantificarea probelor și identificarea pesticidelor s-a realizat în același mod ca și la roșii Cherry.

9.2.2 METODA MULTIREZIDUALĂ LC-MS-QQQ

În 2012 s-au supus studiului pentru matricea Castraveți Cornișon ,următoarele pesticide: fenarimol, azoxistrobin, boscalid, ciprodinil, penconazol, dimetoat, ometoat, acetamiprid, tiofanat metil, imidacloprid, metomil, carbendazim.

În 2013 s-au adăugat studiului alte pesticide: fluquinconazol, piraclostrobin, tiacloprid

Curbele de calibrare au fost constuite pe 5 nivele, pentru penconazol la nivele 0,006-0,015-0,03-0,06 și 0,15 $\mu\text{g/ml}$, iar pentru toate celelalte pesticide nivelele de calibrare au fost 0,01-0,025-0,05-0,1-0,25 $\mu\text{g/ml}$.

Secvența de lucru este constituită dintr-o injectare la fiecare nivel de calibrare , urmată de probele de castraveți supuse analizei și în final o probă martor îmbogățită la nivel de 0,05 $\mu\text{g/ml}$ pentru fiecare metodă de extracție, fiecare nivel de calibrare fiind constituit dintr-un singur punct.

Cuantificarea probelor și identificarea pesticidelor s-a realizat în același mod ca și la roșii Cherry.

9.2.3 STUDIU COMPARATIV (2 metode de extracție / 2 metode analiză)

S-au supus studiului comparative următoarele pesticide: fenarimol, azoxistrobin, boscalid, ciprodinil, penconazol, dimetoat și piraclostrobin.

Nivele de calibrare și secvența de analiză sunt asemănătoare cu cele prezentate mai sus pentru pesticidele determinate prin LC și GC, iar cuantificarea probelor și identificarea pesticidelor s-a realizat în același mod ca și la roșii Cherry.

9.2.5 CONCLUZII – REZIDUURILE DE PESTICIDE DIN CASTRAVEȚI

Au fost identificați și cuantificați 4 metaboliți ai pesticidelor utilizate pentru tratamentele fitosanitare, respective, tetrahidroftalimida, ftalimida, 4,4 diclorobenzofenonei și ometoatul.

Limitele maxime admise au fost depășite pentru un număr de 6 pesticide , respectiv bromopropilat, captan, folpet, dicofol, procimidon și tiofanat metil.

Concluziile privind eficiența combinațiilor folosite în această matrice sunt formulate succint sub forma unui tabel .

Tabel 9.2.8 Metodele eficiente de extracție și analiză pentru pesticidele din castraveți Cornișon, conform studiului efectuat

LC QuEChERS modif	LC Mini-Luke modif	GC QuEChERS modif	GC Mini-Luke modif
Acetamiprid	Fluquinconazol	Pirimetaniil	Malation
Tiofanat metil	Dimetoat	Dicofol	Bifentrin
Imidacloprid		Metalaxil	Bromopropilat
Carbendazim		Fludioxonil	Captan
Fluquinconazol		Procimidon	Folpet
Fenarimol		Fenarimol	Clorotalonil
Azoxistrobin		Boscalid	Iprodion
Boscalid		penconazol	Ciprodinil
Ciprodinil			
Penconazol			
Piraclostrobin			

9.3 DETERMINAREA REZIDUURILOR DE PESTICIDE DIN ARDEI IUȚI

9.3.1 METODA MULTIREZIDUALA GC-TOF-MS

Studiul s-a desfășurat pe durata a doi ani 2012 și 2013 , supunându-se analizelor pentru matricea Ardei iuți soi Chayenne următoarele pesticide: fenarimol, azoxistrobin, boscalid, ciprodinil, penconazol, dimetoat, bromopropilat, captan, folpet, clorotalonil, fludioxonil

Curbele de calibrare au fost construite la 4 nivele de calibrare, respectiv 0,01-0,05-0,2-0,8 μg/ml.

Secvența de lucru este constituită din o injecție la fiecare nivel de calibrare , urmată de probele de ardei iuți supuse analizei ,o probă martor îmbogățită la nivel de 0,05 μg/ml (50ng/ml) pentru fiecare din cele două metode de extracție și în final încă o injecție la toate nivelele de calibrare, astfel fiecare nivel de calibrare e constituit din 2 puncte.

Cuantificarea probelor și identificarea pesticidelor s-a realizat în același mod ca și la probele prezentate anterior.

9.3.2 METODA MULTIREZIDUALĂ LC-MS/MS

În 2012 și 2013 timp în care s-a derulat acest studiu , pentru matricea Ardei Iuți Chayenne s-au analizat următoarele pesticide: fenarimol, azoxistrobin, boscalid, ciprodinil, penconazol, dimetoat, metomil , fluquinconazol, piraclostrobin, tiofanat metil, acetamiprid, fenhexamid, ometoat, imidacloprid, carbendazim, miclobutanil.

Curbele de calibrare au fost constuite pe 5 nivele de calibrare și anume 0,01-0,04-0,1-0,2- 0,4 μg/ml.

Secvența de lucru este constituită dintr-o injecție la fiecare nivel de calibrare, urmată de probele de ardei supuse analizei și în final o probă martor îmbogățită la nivel de 0,04 μg/ml pentru fiecare metodă de extracție, fiecare nivel de calibrare fiind constituit dintr-un singur punct.

9.3.3 STUDIU COMPARATIV (2 metode de extracție / 2 metode analiză)

Pesticidele analizate comparativ pentru matricea ardei iuți au fost: ciprodinil, boscalid, penconazol, fenarimol, dimetoat, azoxistrobin.

Nivele de calibrare și secvența de analiză sunt asemănătoare cu cele prezentate mai sus pentru pesticidele determinate prin LC și GC, iar cuantificarea probelor și identificarea pesticidelor s-a realizat în același mod ca și la matricile prezentate anterior.

9.3.5 CONCLUZII - REZIDUURILE DE PESTICIDE DIN ARDEI IUȚI

Au fost identificați și cuantificați 4 metaboliți ai pesticidelor utilizate pentru tratamentul fitosanitar al ardeilor iuți și au fost identificați alți 3 metaboliți fără a avea însă suficiente date pentru cuantificarea lor: 1,2,4 triazol (metabolit al miclobutanilului sau fluquinconazol) identificați la RT 1190,3s și RT 649,5s, glicina la RT 427,98s posibil produs de degradare al cimoxanilului, pesticid care nu a fost analizat, dar cu care s-au efectuat tratamente și metabolitul acid al azoxistrobinului.

Din punctul de vedere al respectării LMA, un număr de 4 pesticide au avut valori peste cele stabilite de normele europene în domeniu, dar trebuie avute în vedere și condițiile de efectuare a tratamentelor și cele climatice.

O parte dintre aceste concluzii pot fi regăsite într-o formă restrânsă în tabelul 9.3.9.

Tabel 9.3.9 Metodele eficiente de extracție și analiză pentru pesticidele din ardei iuți Chayenne, conform studiului efectuat

LC QuEChERS modif	LC Mini-Luke modif	GC QuEChERS modif	GC Mini-Luke modif
Metomil Piraclostrobin Acetamiprid Imidacloprid Carbendazim Miclobutanil Ciprodinil Boscalid Azoxistrobin	Ciprodinil Penconazol	Folpet Brompropilat Fludioxonil Dimetoat	Clorotalonil Captan Boscalid Fenarimol

9.4 DETERMINAREA REZIDUURILOR DE PESTICIDE DIN SALATĂ

La această matrice s-a introdus în metodele de extracție și etapa de purificare cu GBC ca o consecință a încărcării foarte mari cu clorofilă a extractelor organice obținute după extracție, indiferent care ar fi aceasta. Din aceste considerente pentru această matrice s-a efectuat un singur tratament fitosanitar, după care s-au făcut prelevări de probe la 3 zile și 10 zile.

Analiza instrumentală pe GC s-a efectuat atât pe extracte purificate cât și extracte nepurificate, diferența între rezultatele obținute fiind la unele pesticide foarte mare ca urmare a reținerii unei cantități din acestea pe cărbunele activ. Prin LC s-a analizat o singură probă fără purificare (restul fiind purificate cu GBC), și anume probele prelevate la 3 zile, pentru a evita colmatarea coloanei cromatografice și a impurifica întregul sistem MS.

Pentru cuantificarea reziduurilor de pesticide din salată s-au folosit aceleași curbe de calibrare în solvent ca și la ardei, aceste două matrici împreună cu strugurii fiind analizate în aceeași secvență, atât în cazul GC cât și LC.

Nivele de calibrare și identificarea pesticidelor sunt aceleași ca și la matricea ardei iuți.

9.4.1 METODA MULTIREZIDUALĂ GC-TOF- MS

Pesticidele analizate prin GC în această matrice sunt : bifentrin, captan, folpet , brompropilat, boscalid , penconazol și dimetoat .

9.4.2 METODA MULTIREZIDUALĂ LC-MS- QQQ

Prin LC pentru matricea salată s-au analizat pesticidele : acetamiprid, metomil, piraclostrobin și tiofanatul metil, boscalid, penconazol, și dimetoat

9.4.3 STUDIU COMPARATIV (2 metode de extracție / 2 metode analiză)

În studiul comparativ s-au analizat pesticidele: boscalid, penconazol, și dimetoat

9.4.5 CONCLUZII - REZIDUURILE DE PESTICIDE ÎN SALATĂ

Valorile LMA au fost depășite în 4 cazuri, la unele dintre pesticide sugerându-se un timp de pauză întrucât acestea nu erau omologate pentru această matrice , dar pot fi întâlnite accidental în ea ca urmare a efectuării de tratamente fitosanitare în sere care cuprind mai multe culturi, pentru care produsele fitosanitare respective sunt omologate.

În salată nu s-a urmărit cu precădere cuantificarea metaboliților identificați deoarece substanțele active din care provin nu sunt omologate pentru salată și nu apar decât accidental în această matrice, acești metaboliți fiind: tetrahidroftalimida și ftalimida.

În tabelul 9.4.5 sunt prezentate restrâns câteva din concluziile prezentate mai sus.

Tabel 9.4.5 Metodele eficiente de extracție și analiză pentru pesticidele din salată, conform studiului efectuat

LC QuEChERS modif	LC Mini-Luke modif	GC QuEChERS modif
Piraclostrobin Penconazol	Acetamiprid Tiofanat metil Boscalid Dimetoat	Bifentrin Captan Bromopropilat Folpet

9.5 DETERMINAREA REZIDUURILOR DE PESTICIDE DIN STRUGURI

Analizele s-au efectuat în 2013, utilizând ca și metodă de extracție pentru LC doar metoda QuEChERS modificată, iar pentru GC s-au efectuat ambele extracții. S-a efectuat un singur tratament fitosanitar, în luna august când strugurii erau copti în proporție de 30%, cu produse specifice pentru a fi aplicate în această fază fenologică, în special pentru combaterea putregaiului cenușiu.

Metoda GC validată pe struguri a fost utilizată și pentru determinarea pesticidelor dintr-o varietate de tipuri de vinuri albe, metoda de extracție folosită pentru a extrage reziduurile de pesticide din vinuri fiind metoda Mini-Luke modificată, aceste rezultate nefiind prezentate în această teză, dar fac subiectul unui articol.

Pentru cuantificarea reziduurilor de pesticide din salată s-au folosit aceleași curbe de calibrare în solvent ca și la ardei, aceste două matrici împreună cu strugurii fiind analizate în aceeași secvență, atât în cazul GC cât și LC.

Nivele de calibrare și identificarea pesticidelor sunt aceleași ca și la matricea ardei iuți.

9.5.1 METODA MULTIREZIDUALĂ LC-MS-QQQ

Pesticidele supuse studiului prin această metodă sunt fenhexamid, tiofanat metil și hexitiazox, acesta din urmă neputând fi cuantificat ca urmare a valorii prea ridicate a LOQ.

9.5.2 METODA MULTIREZIDUALĂ GC-TOF-MS

Pesticidele determinate prin această metodă au fost ciprodinil și procimidon, două dintre cele mai utilizate pesticide pentru combaterea putregaiului cenușiu (botrytis cinerea) la struguri.

CAPITOLUL 10. CONCLUZII FINALE

Această teză de doctorat și-a propus ca obiectiv principal **elaborarea de metode de extracție și analiză** pentru a determina relația dintre acumularea, degradarea și remanența pesticidelor în probele supuse studiului. Problema este abordată într-o manieră multidisciplinară, sub forma unui studiu complex.

Problemele ridicate de acest studiu precum și obiectivele sunt în strânsă concordanță cu mai multe obiective și priorități ale unui program cu finanțare Sapard al Uniunii Europene care a vizat printre altele înființarea în 2008 a unui Laborator Zonal pentru Determinarea Reziduurilor de Pesticide din Plante și Produse Vegetale la Unitatea Fitosanitară Mureș din Târgu Mureș, acesta fiind și locația în care s-au efectuat toate experimentele și analizele din prezenta teză.

Elementele de noutate cele mai importante ale tezei de doctorat sunt:

- elaborarea de noi metode de extracție și analiză și/sau modificarea celor existente în scopul simplificării și creșterii parametrilor de performanță (ale metodelor de analiză)
- validarea metodelor elaborate pe anumite matrici și folosirea lor în teste de competență europeană (prezentate în anexă)
- abordarea expunerii matricilor de legume și fructe alese, la 30 de pesticide din mai multe clase chimice, în condiții normale de concentrație, prin tratamente repetate
- obținerea de date de expunere prin analizarea reziduurilor de substanțe active (pesticide) prin tehnici cromatografice, GC- TOF –MS și LC- QQQ MS
- obținerea de date privind metaboliții și produșii de degradare rezultați ca urmare a proceselor metabolice sau a condițiilor de analiză a pesticidelor
 - Pentru determinarea metodei optime de extracție s-au testat comparativ 5 metode de extracție pentru legume și fructe și 2 metode pentru sol, aceste metode bazându-se pe metodele de extracție QuEChERS tamponată, QuEChERS originală, Mini-Luke, Acetat de etil, DIN EN 15637 (Klein), unele dintre ele fiind modificate în teză
 - După analizarea tuturor datelor obținute s-a concluzionat că metoda de extracție Mini-Luke modificată și metoda de extracție QuEChERS tamponată modificată au oferit rezultate acceptabile, drept pentru care aceste două metode de extracție au fost utilizate pentru extracția reziduurilor a 30 de pesticide și a metaboliților lor din 5 matrici (roșii Cherry, castraveți, ardei iuți, salată și struguri)

- Metoda de analiză GC a fost validată DG SANCO/12495/2011 pe un număr extins de pesticide, față de cele selectate pentru studiul reziduurilor de pesticide din probele de legume și fructe : 60 pesticide în sol, 67 pesticide în roșii, 61 de pesticide în struguri, printre acestea aflându-se și pesticidele folosite în tratamentele culturilor de pe terenul experimental
- Metoda de analiză LC a fost validată pe un număr 28 de pesticide în ardei iuți , mai multe decât cele analizate prin LC în probele supuse studiului reziduurilor de pesticide
- Concentrația de reziduuri de pesticide determinată, după trecerea timpului de pauză, a fost raportată la LMA stabilită de către organismele europene din domeniu și adoptată și de către țara noastră ca stat membru al acesteia.
- S-au identificat metaboliți și/sau produși de degradare și s-au cuantificat cei mai relevanți (tetrahidroftalimida, ftalimida, 4,4'diclorobenzofenona, tiofosgen, ometoat)

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. ICPA. Coduri de bune practice agricole.Agrochimie.Cap.7, 2002
2. D. Davidescu, L.Calanca , Protecția chimică în agricultură, Editura Academiei Române, București ,1992
3. E.Grou, M.Cicotti, L.Ghinea, V.Radulescu, E.Goga, Metode pentru determinarea reziduurilor de produse fitofarmaceutice, Editura Ceres, București, 1979
4. C.Bolcu, Scurte considerente pro si contra utilizării pesticidelor. Știința si Viața Noastră- Revistă de Informare. Revista 1/2010
5. Gh.Lixandru,C .Caramete, Cr. Hera Agrochimie, Editura Didactică și Pedagogică, București, 1990;
6. T.Baicu, Combaterea integrată a bolilor și dăunătorilor și limitarea poluării cu pesticide, Editura Ceres, București , 1982
7. L.Ghinea , Gh.Ștefanic, A.Popescu, G.Oprea , Cercetări în domeniul chimiei și biologiei solului, an. I.n.c.d.a. Fundulea, vol. Lxxv, volum jubiliar, 2007;
8. F.Stătescu , Monitorizarea calitatii solului.Ed."Gh. Asachi" Iasi, 2003;
9. F.Moraru, **A.Megheșan- Breja**, Solul – Mediu Ecologic, Editura Universității „Petru Maior”, Târgu –Mureș , 2011
10. SANCO/12495/2011, Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and feed, Supersedes Document No. SANCO /10648/2009, Implemented by 01/01/2012, European Commission, Brussels, Belgium
11. SANCO 12571/2013, Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed, Supersedes SANCO/12495/2011, Implemented by 01/01/2014, European Commission, Brussels, Belgium
12. <http://www.eurl-pesticides.eu/> , Method information and validation data (EURL-FV)
13. Directorate General for Health & Consumers, Pesticide EU-MRLs Regulation (EC) No 396/2005

14. Directorate General for Health & Consumers, Active substances Regulation (EC) No 1107/2009
15. <http://www.inchem.org/>
16. European Commission Directorate D - Food Safety: production and distribution chain ,D3 - Chemicals, Contaminants and Pesticides , Review report for the active substance fenarimol, 2007
17. J.L. Tadeo, F.J. Schenk and J.W. Wong, Analysis of Pesticides in Food and Environmental Samples, CRC Press, Taylor & Francis Group, 2008, pp. 152-166
18. Pesticides – Strategies for Pesticides Analysis, 2011, Margarita Stoytcheva .(Ed.), InTech
19. M.A.Luke, G.M.Doose, Bull.EnvIRON.Contam.Toxicol, 30, 1983, 110
20. P.A Mills, J.H Onley, R.A Gaither, J. AOAC Int, 46, 1963, 186
21. Mumma et al, Science, 152, 1966, 530
22. R.W. Storherr, J.R. Pardue, R.R Watts, J. AOAC Int, 52,1969,522
23. W.Liao, W.G. Cusick, T.Joe, J.AOAC Int. ,74,1991, 554
24. S.M. Lee, Fresenius J.Anal.Chem., 339, 1991, 376
25. J. Fillion, F. Sauve, J. Selwyn, J.AOAC Int., 83, 2000, 698
26. M. Anastassiades, <http://www.QuEChERS.com/>
27. Official method EN 15662:2008.
28. S.J. Lehotay, AOAC Official Method 2007.01 , J. AOAC Int, 90, No. 2, 2007, pp. 485-520
29. S.J. Lehotay, K. Mastovska and A.R. Lightfield, J. AOAC Int., 88, 2005, 615.
30. M. Anastassiades, D. Mack and D. I. Ströher, CRL-SRMLAPRW 2009 Santa Fé/Argentina, 8-11 June ,2009.
31. S.J Lehotay, J.Hajslova, Trends in analytical chemistry, 21, nos. 9+10, 2002
32. J.Hajslova and J. Zrostlikova, J. Chromatogr. A, 1000, 2003,181
33. I.R. Pizzutti, A. de Kok, M. Hiemstra, C. Wickert and O. D. Prestes, J. Chromatogr. A, 1216, 2009 ,4539
34. **A. Megheșan – Breja**, C. Măruțoiu, C. Cimpoiu, Revista de Chimie, acceptată pentru publicare
35. **A. Megheșan-Breja**, C. Cimpoiu, A. Hosu, Acta Chromatografica, acceptată pentru publicare
36. **A. Megheșan** , A. Csiszer , M.S. Beldean-Galea, T. Hodișan, Acta Universitatis Cibiniensis, Seria F Chemia, 10, 2007, pp 69-73
37. **A. Meghesan – Breja**, F. Morar, Proceeding of The 6th edition of the Interdisciplinarity in Engineering International Conference “Petru Maior” University of Tîrgu Mures, Romania, 2012
38. D. Scutaru, Spectrometria de masă, Editura Cermi, 1998
39. C.M. Torres, , Y. Pico, J. Manes, J. Chromatogr. A. 754. 1996. 301-331.
40. J. Klein and L. Alder, J. AOAC Int., 86, 2003, 1015.