

Universitatea POLITEHNICA Timișoara  
Facultatea de Chimie Industrială și Ingineria Mediului

**Cromatografia de lichide în fază inversă ca tehnică analitică de identificare și cuantificare din apa potabilă a reziduurilor de poluanți organici aparținând unor clase de substanțe cu polarități diverse (pesticide, alchilfenoli, hormoni estrogeni)**

- TEZĂ DE DOCTORAT -

Conducător științific,  
Prof. Dr. ALFA XENIA LUPEA

Doctorand,  
Ing. BRUMARU CLAUDIU STELIAN

UNIV. "POLITEHNICA"	
TIMIȘOARA	
BIBLIOTECĂ CENTRALĂ	
Nr. volum	649.101
Dulap	369 L. 7

TIMIȘOARA

2006

## CUPRINS

	Pag.
<b>Pagina de titlu</b>	1
<b>Cuprins</b>	2
<b>Cap. I.1. OBIECTIVELE TEZEI</b>	5
I.1.1. Definirea problemei – cadru, starea actuală, generalități	5
I.1.2. Structurarea tezei	7
I.1.3. Abrevieri și notații	9
I.1.4. Obiectivele concrete ale tezei	11
<b>I. PARTEA TEORETICĂ</b>	17
<b>Cap. I.2. Aspecte generale ale metodelor analitice moderne bazate pe tehnicile cromatografice</b>	18
I.2.1. Extracția în fază solidă – principiu de funcționare, materiale utilizate, abordări de lucru	18
I.2.2. Spectrometrul de masă cu trapă ionică ca detector în analizele LC-MS – principiu de funcționare, principii constructive	20
I.2.3. Interfețele de conectare API a lichid-cromatografelor cu spectrometrele de masă - tipuri, principii de funcționare	23
I.2.3.1 Interfața ESI	24
I.2.3.2. Interfața APCI	26
<b>Cap. I.3. Pesticide</b>	28
I.3.1. Generalități – utilizare, clasificări, principalele căi de transport în mediu	28
I.3.2. Exemple de metode lichid-cromatografice de identificare și cuantificare a pesticidelor din probe de apă	32
<b>Cap. I.4. Alchilfenoli</b>	40
I.4.1. Generalități – utilizare, clasificări, principalele căi de transport în mediu	40
I.4.2. Exemple de metode lichid-cromatografice de identificare și cuantificare a alchilfenolilor din probe de apă	42

---

	Pag.
<b>Cap. I.5. Estrogeni</b>	47
I.5.1. Generalități – principalele căi de transport în mediu, studii de toxicitate	47
I.5.2. Exemple de metode lichid-cromatografice de identificare și cuantificare a estrogenilor din probe de apă	49
<b>Cap. I.6. Validarea și estimarea incertitudinii de măsurare a metodelor analitice bazate pe tehnica HPLC</b>	58
I.6.1. Validare – definiții, necesitate, abordări de lucru	58
I.6.2. Parametri de performanță studiați în cadrul studiului de validare a metodelor analitice	60
I.6.3. Incertitudinea de măsurare - definiții, necesitate, abordări de lucru	65
<b>CONTRIBUȚII PROPRII</b>	67
<b>Cap. II.1. Studii de optimizare a separării lichid-cromatografice pentru unele grupuri de pesticide cu hidrofobicități variate</b>	68
II.1.1. Studiu de optimizare a separării RP-HPLC a unor insecticide cu hidrofobicitate scăzută prin eluție izocratică	68
II.1.2. Studiu de evaluare a comportării cromatografice în separarea RP-HPLC a unor erbicide cu hidrofobicitate medie și scăzută de largă utilizare	74
II.1.3. Studiu de optimizare a separării RP-HPLC a trei erbicide triazinice cu hidrofobicitate medie prin eluție izocratică	81
II.1.4. Studiu de optimizare a separării RP-HPLC a unui grup de pesticide organofosforice cu hidrofobicitate medie prin eluție izocratică	91
II.1.5. Separarea RP-HPLC a unui număr de cinci pesticide organoclorurate puternic hidrofobe	98
<b>Cap. II.2. Influența unor parametri de lucru asupra eficienței etapei de pregătire a probei din cadrul unei metode HPLC de identificare și cuantificare a unui set de 5 pesticide organoclorurate din apa potabilă</b>	101
II.2.1. Optimizarea unor parametri de lucru din cadrul etapei de pregătire a probei realizată prin extracție lichid-lichid	101
II.2.2. Testarea performanțelor extracției în fază solidă ca etapă de pregătire a probei	108

---

	Pag.
<b>Cap. II.3. Stabilirea limitărilor de natură instrumentală în utilizarea interfeței „electrospray ionization” și a trapei ionice quadrupolice la analiza LC-ESI-MS a alchilfenolilor</b>	115
<b>Cap. II.4. Dezvoltarea, optimizarea și validarea unei metode de determinare a unor hormoni estrogeni din apa potabilă prin cromatografie de lichide cuplată cu spectrometru de masă cu trapă ionică prin interfață ESI</b>	134
<b>Cap. III. Concluzii finale</b>	158
<b>BIBLIOGRAFIE</b>	167

## Capitol I.1. OBIECTIVELE TEZEI

### I.1.1. Definirea problemei – cadru, starea actuală, generalități

Ultimii zeci de ani s-au caracterizat prin apariția unui număr din ce în ce mai mare de compuși organici în apele de suprafață. Unul din principalele motive pentru apariția acestui fenomen îl constituie utilizarea acestui tip de ape drept mediu de stocare a apelor reziduale generate de așezările umane, activitățile industriale și cele agricole. În ciuda tratamentelor destul de complexe aplicate astăzi, apele de suprafață conțin încă dizolvate numeroase substanțe, fapt ce exercită efecte nocive atât asupra ecosistemelor cât și a surselor de apă potabilă. Vorbind despre acestea din urmă, pe plan mondial se utilizează încă frecvent apele de suprafață drept surse pentru obținerea apei de băut. Bineînțeles, monitorizarea fiecărei substanțe ce s-ar putea afla în apa de băut este un deziderat atractiv dar imposibil de pus în aplicare. Din acest motiv, s-a trecut la definirea țintelor majore de urmărit în cadrul acțiunilor de monitorizare a calității apei potabile.

În cadrul tezei de față, au fost abordate trei grupe majore de compuși, pe baza prezenței lor în apele naturale și a semnificației impactului asupra ecosistemelor: pesticidele, alchilfenolii și hormonii estrogeni. Ele interesează, în fapt, cele trei surse majore de contaminare cu poluanți organici: pesticidele – agricultura, alchilfenolii – industria, estrogenii – domeniul domestic (casnic).

Contaminarea cu *pesticide* a apelor de suprafață și de adâncime este, la ora actuală, bine documentată pe plan mondial datorită experienței acumulate. Majoritatea pesticidelor pătrund în mediu prin contaminare difuză, ca urmare a stropirii terenurilor agricole și preluării lor ulterioare de către apă. La nivelul legislației Uniunii Europene [1] și a celei naționale [2, 3] s-au stabilit limitele maxim admisibile pentru majoritatea pesticidelor; astfel, pentru apa potabilă valoarea este de  $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$  pentru analiții individuali respectiv  $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$  pentru suma pesticidelor din probă.

Prezența **alchilfenolilor** în apele de suprafață se datorează, în mare măsură, utilizării industriale a acestora. Alchilfenolii polietoxilați în special au fost mult utilizați ultimii 35-40 ani în industria surfactanților neionici industriali. În ultimii ani s-a manifestat tendința

înlocuirii lor cu alcoolii polietoxilați. Problemele de toxicitate sunt ridicate mai ales de compușii lor de degradare, cei mai importanți fiind 4-nonilfenolul și 4-octilfenolul.

Estrogenii provin în mare măsură din apele reziduale colectate din zona marilor așezări umane. Sursa primară o constituie excrețiile organismelor vii. Astfel, se estimează că o femeie elimină, preponderent prin urină, între 2 și 12  $\mu\text{g}$  pe zi, sub formă de estradiol și estronă hidroxilate și conjugate sub formă de glucuronide, în timp ce un bărbat excretă aproximativ 5  $\mu\text{g}$  estronă zilnic [4]. Cantitățile excretate de organismul femeilor variază semnificativ funcție de starea lor fiziologică (ciclul menstrual, starea de graviditate) [5]. În plus, la acești hormoni estrogeni naturali, se adaugă contraceptivul de sinteză etinilestradiol, utilizat pe scară largă astăzi. De asemenea, femelele efectivelor de animale domestice excretă cantități semnificative de hormoni estrogeni. Problema majoră pe care aceste substanțe o ridică constă în nivelul concentrației extrem de scăzut, de sub  $1 \text{ ng L}^{-1}$ , la care efectul lor disruptor asupra sistemului endocrin al faunei acvatice începe să se manifeste. Dacă dovezile privind efectul asupra peștilor este deja demonstrat, cele asupra omului sunt încă destul de contradictorii astfel că sunt necesare studii suplimentare aprofundate [6].

În ceea ce privește alchilfenolii și estrogenii, nu există în legislația specifică (incluzând aici și ghidurile privind calitatea apei potabile) de la nivelul continentului nostru [1], a celui nord-american [7] sau la nivel mondial [8], valori limită în apa potabilă. Ei nu sunt prevăzuți nici măcar în listele cu contaminanții propuși de EPA (Environmental Protection Agency) a intra în categoria poluanților supuși reglementărilor în domeniu [7]. Termenul generic pentru această categorie de contaminanți este „*emerging contaminants*”. Ei sunt definiți drept acei poluanți ce sunt nou identificați sau neconsiderați anterior a fi poluanți; în categoria lor intră compuși utilizați în viața cotidiană: surfactanți și produșii lor de metabolizare, medicamente, aditivi ai benzinelor, plastifianți etc. Există deja metode de analiză pentru determinarea majorității compușilor mai-sus menționați [9, 10, 11] dar totuși, pentru majoritatea lor, datele actuale referitoare la prezența în mediu, estimarea riscului și cele ecotoxicologice sunt încă insuficiente astfel că efectele lor asupra organismului uman și a celor acvatice sunt dificil de prevăzut [11].

Pentru anumite clase de pesticide (organoclorurate, triazinice) există standardizate la nivel național o serie de metode de analiză a lor din apa potabilă. Ele sunt majoritar bazate pe tehnica cromatografiei de gaze [12, 13]. Este evident că dezvoltarea de metode analitice de

rutină pentru monitorizarea și a celorlalte clase de compuși organici este imperios necesară. Cu cât protocoalele de lucru vor deveni, pe de o parte, mai simple, robuste, cu etape puține și cantități cât mai mici de reactivi și solvenți toxici și scumpi, și, pe de altă parte, mai sensibile, selective și reproductibile, cu atât mai facilă va deveni implementarea lor în cadrul uzinelor de tratare a apei. Ideal, construirea de sisteme automatizate on-line de monitorizare a calității apei potabile va putea fi posibilă tocmai datorită gradului redus de complexitate al metodelor analitice.

### *1.1.2. Structurarea tezei*

Cele două părți majore ale tezei sunt „Partea Teoretică” și „Contribuții Proprii”.

„Partea teoretică” cuprinde 6 subcapitole: Obiectivele tezei; Aspecte generale ale metodelor analitice moderne bazate pe tehnicile cromatografice; Pesticide; Alchifenoli; Estrogeni; Validarea și estimarea incertitudinii de măsurare a metodelor analitice bazate pe tehnica HPLC.

1. *Obiectivele tezei* – prezintă mai întâi generalitățile, cadrul și starea actuală în ceea ce privește metodele analitice bazate pe tehnica RP-HPLC pentru identificarea și cuantificarea reziduurilor de poluanți organici aparținând unor clase de substanțe cu polarități diverse (pesticide organoclorurate, alchilfenoli, hormoni estrogeni) din apa potabilă. Este apoi prezentată structurarea pe capitole a tezei pentru ca, în final, să fie stipulate obiectivele concrete ale tezei.

2. *Aspecte generale ale metodelor analitice moderne bazate pe tehnicile cromatografice* – în mod evident, datorită complexității problematicii, nu fac obiectul acestui capitol toate aspectele referitoare la considerațiile teoretice ale separării cromatografice: mecanisme, materiale utilizate, parametrii specifici (factor de retenție, rezoluție de separare, selectivitate, specificitate, instrumentația etc.). Sunt abordate succint următoarele trei problematici specifice:

- tehnica SPE ca variantă folosită frecvent în etapa de pregătire a probelor lichide
- spectrometrul de masă cu trapă ionică ca detector în analizele LC-MS
- interfețele de conectare API a lichid-cromatografelor cu spectrometrele de masă

3. *Pesticide* – prezintă mai întâi câteva din clasificările existente și principalele căi de transport în mediu iar apoi o serie de exemple de metode lichid-cromatografice de identificare și cuantificare a pesticidelor din probe de apă.

4. *Alchilfenoli* - prezintă clasificări existente, studii de toxicitate și căi de transport în mediu apoi un grup de exemple de metode lichid-cromatografice de identificare și cuantificare a alchilfenolilor din probe de apă.

5. *Estrogeni* - prezintă mai întâi studii de toxicitate și principalele căi de transport în mediu apoi câteva exemple de metode lichid-cromatografice de identificare și cuantificare a estrogenilor din probe de apă.

6. *Validarea și estimarea incertitudinii de măsurare a metodelor analitice bazate pe tehnica HPLC* – sunt prezentate o serie de definiții ale validării metodelor analitice și abordări de lucru recomandate de diverse standarde oficiale și ghiduri europene, apoi parametri de performanță ce trebuie estimati în cadrul unui studiu de validare și, în final, definiția incertitudinii de măsurare și modul în care ea poate fi estimată pe baza datelor colectate din studiile de validare.

„Contribuțiile Proprii” sunt structurate pe 4 subcapitole:

1. *Studii de optimizare a separării lichid-cromatografice pentru unele grupuri de pesticide cu hidrofobicități variate* – sunt abordate cinci grupuri de pesticide pentru care sunt efectuate o serie de experimente în vederea atingerii unor separări RP-HPLC cât mai performante în termenii timpului trecerii cromatografice, rezoluției separării, tipului de eluție:

- *un grup de 8 insecticide cu hidrofobicitate medie și scăzută*
- *un grup de 6 erbicide cu hidrofobicitate medie și scăzută*
- *un grup de 3 erbicide triazinice cu hidrofobicități medii apropiate*
- *un grup de 4 pesticide organofosforice cu hidrofobicitate medie*
- *un grup de 5 pesticide organoclorurate cu hidrofobicitate ridicată.*

2. *Influența unor parametri de lucru asupra eficienței etapei de pregătire a probei din cadrul unei metode HPLC de identificare și cuantificare a unui set de 5 pesticide organoclorurate din apa potabilă* – sunt abordate două tehnici de lucru posibil a fi utilizate în cadrul etapei de pregătire a probei pentru analiza celor 5 pesticide organoclorurate din apa potabilă:

- *Optimizarea unor parametri de lucru ai extracției lichid-lichid*



- Testarea performanțelor extracției în fază solidă.

3. *Stabilirea limitărilor de natură instrumentală în utilizarea interfeței „electrospray ionization” și a trapei ionice cuadrupolice la analiza LC-ESI-MS a alchilfenolilor* – este abordată mai întâi problematica optimizării parametrilor de lucru ai interfeței ESI și ai detectorului cu trapă ionică pentru analiza acestor analiți dificili, apoi cea a estimării stabilității semnalului, repetabilității și reproductibilității rezultatelor în vederea utilizării acestei separări ca etapă analitică în analiza alchilfenolilor din probe de apă.

4. *Dezvoltarea, optimizarea și validarea unei metode de determinare a unor hormoni estrogeni din apa potabilă prin cromatografie de lichide cuplată cu spectrometru de masă cu trapă ionică prin interfață ESI* – este prezentat mai întâi modul în care a avut loc dezvoltarea și optimizarea diversilor parametri de lucru pentru metode de determinare a unor hormoni estrogeni din apa potabilă prin cromatografie de lichide cuplată cu spectrometru de masă cu trapă ionică prin interfață ESI, apoi studiul de validare al metodei. În final capitolului este prezentată încercarea de translatare a metodei la probe de apă de râu, incluzând date de revalidare pe noua matrice (repetabilitate, reproductibilitate) precum și o aplicație pe o probă reală.

### I.1.3. Abrevieri și notații (tabel I.1.1)

Tabel I.1.1. Abrevieri și notații utilizate în cursul tezei.

Abrevierea sau Notația	Termenul în limba engleză	Echivalentul în limba română
0	1	2
RP-HPLC	Reverse Phase – High Performance Liquid Chromatography	Cromatografie de lichide de înaltă performanță în fază inversă
NP-HPLC	Normal Phase – High Performance Liquid Chromatography	Cromatografie de lichide de înaltă performanță în fază normală
SPE	Solid Phase Extraction	Extracție în fază solidă
SPME	Solid Phase Micro Extraction	Micro-extracție în fază solidă
DAD	Diode Array Detector	Detector cu șir de diode
L-L	Liquid-Liquid	Lichid-lichid
LC-MS	Liquid Chromatography-Mass Spectrometry	Cromatografie de lichide cuplată cu spectrometrie de masă
LC/MS/MS	Liquid Chromatography/Mass Spectrometry (tandem)	Cromatografie de lichide cuplată cu spectrometrie de masă (în tandem)

0	1	2
GC-MS	Gas Chromatography-Mass Spectrometry	Cromatografie de gaze cuplată cu spectrometrie de masă
API	Atmospheric Pressure Ionization	Ionizare la presiune atmosferică
ESI	Electrospray Ionization	Ionizare prin spray-ere în câmp electric
LC-ESI-MS	Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry	Cromatografie de lichide cuplată cu spectrometrie de masă prin intermediul interfeței de ionizare prin spray-ere în câmp electric
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization	Ionizare chimică la presiune atmosferică
NI	Negative Ionization	Ionizare negativă
UV	Ultraviolet	Ultraviolet
SIM	Single Ion Monitoring	Monitorizarea unui singur ion
SRM	Selected Reaction Monitoring	Monitorizarea reacțiilor selectate
MRM	Multiple Reaction Monitoring	Monitorizarea reacțiilor multiple
TIC	Total Ion Current	Semnalul generat de totalitatea ionilor detectați
CID	Collision-induced dissociation	Disociere indusă prin coliziune
ODS	Octadecyl silicagel	Silicagel derivatizat cu grupări octadecilice
$d_p$	Diameter of particles	Diametrul particulelor
v/v	Volume/volume	Procente volumice
APs	Alkylphenols	Alchilfenoli
APEOs	Alkylphenol ethoxylates	Alchilfenoli etoxilați
GLP	Good Laboratory Practice	Buna practică de laborator
MRC	Certified Reference Material	Material de referință certificat
F.M.	Mobile Phase	Fază mobilă
LOD	Limit of Detection	Limita de detecție
LOQ	Limit of Quantification	Limita de cuantificare
S/N	Signal/Noise	Semnal/Zgomot
$R_s$	Resolution of Separation	Rezoluția separării cromatografice

*I.1.4. Obiectivele concrete ale tezei**I.1.4.1. Optimizarea separării lichid-cromatografice pentru unele grupuri de pesticide cu hidrofobicități variate*

Drept criteriu de apreciere a hidrofobicității compușilor luați în studiu, s-a apelat la parametrul  $\log P$ . Coeficientul de partiție  $P$  indică modul în care o substanță se partiționează între un compus lipidic (hidrofob) și apă. Prin definiție, el este o constantă a respectivei substanțe, aflată în stare neutră (neionizată), și reprezintă raportul concentrațiilor compusului în faza organică și în faza apoasă, fazele fiind nemiscibile.

$$P = \frac{[Organic]}{[Apos]} \quad (1)$$

$\log P$  se definește drept logaritmul zecimal al coeficientului de partiție  $P$ .

În termeni practici, substanțele cu caracter bazic se află în stare neionizată (nedisociată) la  $\text{pH} > \text{pK}_a + 2$ , în timp ce substanțele cu caracter acid se află în stare neutră la  $\text{pH} < \text{pK}_a + 2$ .

Alegerea solventului organic de partiție rămâne un subiect de dezbatere. Cel mai utilizat în măsurătorile experimentale ale  $\log P$  este *n*-octanolul. Există și alți solvenți utilizați pentru determinarea  $\log P$ , în special atunci când acest parametru se utilizează pentru predicția și modelarea transportului compusului în cauză prin membranele biologice [14].

Există destul de multe încercări de utilizare a parametrului  $\log P$  pentru prezicerea retenției cromatografice. În general, rezultatele au fost destul de limitate datorită faptului că acest parametru necesită ca moleculele compușilor țintă să fie practic neionizate. Mai precise s-au dovedit metodele de predicție bazate pe valoarea  $\log D$  ( $D$  = coeficientul de distribuție) deoarece acest parametru (care nu e o constantă a substanței) depinde tocmai de starea de ionizare a compusului prin valorile  $\text{pK}_a$  și  $\text{pH}$ -ului la care se efectuează măsurătoarea [15]. De asemenea, există metode experimentale de măsurare a parametrului  $\log P$  pe baza timpilor de retenție în RP-HPLC. Din păcate, coloanele standard cu umplutură de silicagel derivatizat cu grupări C18 conțin grupări silanolice reziduale într-un număr greu reproductibil. Mai nou, coloanele bazate pe alumină derivatizată cu C18 sau grafit poros au condus, datorită

reproductibilității sporite a nivelului de încărcare cu grupe funcționale, la rezultate superioare [14].

Există la ora actuală disponibile mai multe software-uri care, utilizând baze de date experimentale destul de bogate, estimează valoarea lui logP cu o bună precizie. Principial, algoritmi de calcul iau în considerare tipurile de grupări funcționale existente în compuşii din baza de date pentru care s-au determinat anterior valorile logP [16].

#### *1.1.4.1.1. Optimizarea separării RP-HPLC a unor insecticide cu hidrofobicitate medie și scăzută prin eluție izocratică*

Obiectivul acestui studiu constă în alegerea condițiilor cromatografice care să asigure un timp al trecerii cromatografice cât mai redus (sub 20 min), utilizarea eluției izocratice, o compoziție a fazei mobile cât mai scăzută în acetonitril (în favoarea metanolului). Toate acestea trebuie realizate în condițiile asigurării unor cât mai bune rezoluții de separare ale perechilor de analiți luați în studiu ( $R_S \geq 1$ ) și lățimi ale picurilor rezonabile.

#### *1.1.4.1.2. Evaluarea comportării cromatografice în separarea RP-HPLC a unor erbicide cu hidrofobicitate medie și scăzută de largă utilizare*

Obiectivele studiului constau, pe de o parte, în evaluarea comparativă a comportării cromatografice a analiților studiați în RP-HPLC cu eluție izocratică și faze binare metanol - apă și, pe de altă parte, în evidențierea capacității detectorului cu arie de diode de a rezolva identificarea și cuantificarea lor, chiar în condițiile atingerii unor separări cromatografice modeste (coeluții parțiale).

#### *1.1.4.1.3. Optimizarea separării RP-HPLC a trei erbicide triazinice cu hidrofobicitate medie prin eluție izocratică*

Obiectivele studiului sunt, mai întâi, evaluarea comparativă a comportării cromatografice (timpilor de retenție) a analiților studiați în RP-HPLC într-un mod similar cu cel din studiul anterior și atingerea unor rezoluții de separare cât mai bune ale perechilor de analiți luați în

studiu (ideal, separări până la linia de bază). Ulterior, se dorește a se demonstra abilitatea detectorului cu arie de diode de a întări gradul de confirmare a identității analiților de interes și de a estima puritatea picurilor cromatografice pe baza facilității „purity check”.

*I.1.4.1.4. Studiu de optimizare a separării RP-HPLC a unui grup de pesticide organofosforice cu hidrofobicitate medie prin eluție izocratică*

Obiectivul studiului este acela de a asigura un set de condiții cromatografice cât mai simple cu putință (eluție izocratică, nu în gradient), la un cost redus (utilizarea metanolului în faza mobilă, nu și a acetonitrilului - mai scump de aproximativ 2,5 ori) și timpi acceptabili ai trecerii cromatografice (sub 20 min). Bazându-ne pe datele de literatură și valorile logP (aflăte într-un domeniu îngust, în special pentru 3 din cei 4 analiți luați în studiu), atingerea unor rezoluții de separare acceptabile pentru toate perechile de analiți, în condițiile mai sus menționate, va fi extrem de dificilă.

*I.1.4.1.5. Separarea RP-HPLC a unui număr de cinci pesticide organoclorurate puternic hidrofobe*

Scopul studiului este acela de a realiza o separare RP-HPLC a unui grup de cinci pesticide organoclorurate puternic hidrofobe care sunt, în mod tradițional, separate prin cromatografie de gaze și analizate cu captură de electroni. Se urmărește folosirea eluției izocratice, a amestecului binar metanol-apă drept fază mobilă și atingerea unui timp al trecerii cromatografice rezonabil (sub 20 min). Pentru a putea implementa separarea în cadrul unei metode de rutină pentru monitorizarea nivelului acestor pesticide în apa potabilă prin RP-HPLC cu detecție în UV, se urmărește atingerea unor limite de detecție instrumentale sub 0,4 mg L<sup>-1</sup> pentru fiecare analit.

*I.1.4.2. Influența unor parametri de lucru asupra eficienței etapei de pregătire a probei din cadrul unei metode HPLC de identificare și cuantificare a unui set de 5 pesticide organoclorurate din apa potabilă*

Obiectivul acestui set de studii este acela de a dezvolta un protocol de pregătire a probei simplu și având costuri reduse, în vederea implementării lui, împreună cu separarea RP-HPLC cu detecție în UV planificată anterior (vezi paragraful III.1.5), într-o metodă de identificare și cuantificare a setului de cinci pesticide organoclorurate puternic hidrofobe care sunt, în mod tradițional, separate prin cromatografie de gaze.

*I.1.4.2.1. Optimizarea unor parametri de lucru din cadrul etapei de pregătire a probei realizată prin extracție lichid-lichid*

Obiectivul primului set de experimente este, într-o primă fază, evidențierea unora dintre punctele critice care pot influența rezultatele studiilor de recuperare întreprinse pentru o metodă lichid-cromatografică de determinare a unor analiți puternic hidrofobi: nivelul solubilizării reale a analiților în soluțiile apoase preparate în laborator, numărul etapelor de extracție lichid-lichid, modul de concentrare a extractului organic (evaporare la presiune atmosferică, evaporare la vid). Ulterior, pe baza concluziilor desprinse, se dorește estimarea nivelului bias-ului metodei (recuperarea analiților de interes) și a limitelor de cuantificare (limita planificată fiind  $0,1 - 0,15 \mu\text{g L}^{-1}$  per analit, pentru a corespunde prevederilor legislației naționale) [2, 3].

*I.1.4.2.2. Testarea performanțelor extracției în fază solidă ca etapă de pregătire a probei*

Obiectivul setului al doilea de experimente este acela de a evalua performanțele în ceea ce privește recuperările și repetabilitățile pentru concentrarea unui grup de 5 pesticide organoclorurate pe două tipuri de cartușe SPE umplute cu silicagel derivatizat cu grupări C18. Se urmărește atingerea unor recuperări mai mari de 70% și dispersii de maxim 20% pentru soluțiile preparate în apă bidistilată, la nivelurile de concentrație de ordinul unităților de ppb. Dacă performanțele mai sus menționate vor fi atinse, va putea fi luată în considerare tehnica SPE drept etapă de pregătire a probei în locul extracției lichid-lichid urmată de evaporarea la rotavapor din cadrul metodei de identificare și cuantificare a setului de cinci pesticide organoclorurate puternic hidrofobe luate în studiu.

*I.1.4.3. Stabilirea limitărilor de natură instrumentală în utilizarea interfeței „electrospray ionization” și a trapei ionice quadrupolice la analiza LC-ESI-MS a alchilfenolilor*

Datele de literatură, numărul mic de metode de analiză a compușilor alchilfenolici prin metode LC-ESI-MS cu trapă ionică quadrupolică și limitele de detecție atinse indică existența unor limitări legate, pe de o parte, de natura tensioactivă a acestor compuși, și, pe de altă parte, de parametri de natură instrumentală. Scopul studiului este acela de a evalua influențele unora dintre parametri de lucru ai interfeței ESI și spectrometrului de masă cu trapă ionică asupra sensibilității instrumentale. Majoritatea valorilor parametrilor instrumentali pot fi optimizate de către software. În afara acestora, există o serie de alți parametri a căror valoare optimă poate fi stabilită manual. Astfel, se va studia modul în care debitul de gaz auxiliar și poziția axială a dispozitivului de sprayere - ca parametri instrumentali ai interfeței ESI, precum și numărul de evenimente de scanare, tipul de filtrare realizat de câmpul de radiofrecvență aplicat, tipul de control a cantității de ioni din interior – ca parametri de utilizare ai trapei ionice, pot conduce la intensificarea semnalului. Un alt obiectiv al studiului este acela de a evalua sensibilitatea instrumentală, liniaritatea, repetabilitatea și reproductibilitatea semnalului în această etapă analitică. În final, în condițiile în care parametri de performanță mai sus menționați sunt satisfăcători (sensibilitate instrumentală în zona 0,2 – 0,3 mg L<sup>-1</sup>, reproductibilități sub 20%, domeniu de liniaritate de cel puțin două ordine de mărime), se va purcede la dezvoltarea și optimizarea etapei de pregătire a probei prin extracție în fază solidă (SPE).

*I.1.4.4. Dezvoltarea, optimizarea și validarea unei metode de determinare a unor hormoni estrogeni din apa potabilă prin cromatografie de lichide cuplată cu spectrometru de masă cu trapă ionică prin interfață ESI*

Pentru analiza hormonilor estrogeni din diferite tipuri de probe de apă există la ora actuală câteva metode LC-ESI-MS cu triplu quadrupol robuste și performante [17, 18, 19], cu limite de detecție și cuantificare scăzute (de ordinul 0,1 ppt și chiar mai joase). În ceea ce privește metodele ce utilizează spectrometrul de masă cu trapă ionică quadrupolică, există în literatură citate și câteva astfel de metode [20, 21], cu performanțe mai scăzute. Principalul lor avantaj

stă în prețul spectrometrului de masă cu trapă ionică cuadrupolică (~ 200 000 USD), care e aproximativ jumătate din cel al spectrometrului de masă cu triplu cuadrupol. Drept exemplu, iată valorile performanțelor validate pe o serie de probe de apă minerală Evian:

- limite de detecție: 1 ng L<sup>-1</sup> pentru estronă, 2 ng L<sup>-1</sup> pentru estradiol și etinilestradiol.

- recuperări mai mari de 80% pentru toți analiții.

- repetabilități: 11% - estronă, 15% - estradiol, 23% - etinilestradiol [21].

Din păcate, protocolul de pregătire a probei folosit a fost unul complex, cuprinzând multe etape: SPE cu multiple faze succesive de condiționare cu diverși solvenți organici (hexan, acetat de etil, metanol etc), extracție lichid-lichid, deshidratarea extractului organic pe cartușe cu sulfat de sodiu anhidru, purificare pe cartușe cu Florisil.

Obiectivul studiului nostru constă în *dezvoltarea, optimizarea și validarea unei metode pentru matricea „apă de băut”, care să atingă aceleași performanțe cu cele ilustrate mai sus dar prin utilizarea unui protocol de pregătire a probei mult mai simplu (o singură etapă SPE, robustă, cu cât mai puțini solvenți, parametri de lucru simpli).*

În final, se va transfera metoda astfel validată (fără modificări sau cu unele minime) la matricea „apă de râu” și revalidarea ei. Se speră atingerea unor limite de detecție cu maxim 1 ordin de mărime mai ridicate decât în cazul apei de băut, recuperări peste 80% și repetabilități care să nu depășească 25%.



# I. PARTEA TEORETICĂ

17

3697 649.161  
UNIV. "POLITEHNICA"  
TIMIȘOARA  
BIBLIOTECA CENTRALĂ

## Capitol I.2. Aspecte generale ale metodelor analitice moderne bazate pe tehnicile cromatografice

Analizând etapele generale ale oricărei metode analitice bazate pe tehnica cromatografică, acestea sunt:

- pregătirea probei
- separarea cromatografică a analiților de interes
- detecția analiților de interes

În acest capitol vor fi tratate tehnica extracției în fază solidă (SPE) (ca operație folosită frecvent în etapa de pregătire a probei), spectrometrul de masă cu trapă ionică ca detector în analizele LC-MS și interfețele de ionizare la presiune atmosferică (API) (folosite pentru cuplarea cromatografelor de lichide cu spectrometrele de masă).

### *I.2.1. Extracția în fază solidă – principiu de funcționare, materiale utilizate, abordări de lucru*

Etapa de pregătire a probei este considerată de mulți autori, uneori poate în mod exagerat, drept faza cea mai importantă a întregului proces analitic. Este clar însă că, indiferent de magnitudinea importanței ce îi este acordată, etapa de pregătire a probei are un impact direct și semnificativ asupra principalilor parametri de performanță ai metodei analitice: justețea, fidelitatea, limitele de detecție și cuantificare, robustețea metodei. Tehnica SPE a fost dezvoltată și și-a găsit o utilizare adecvată în special în domeniul analizelor de analiți organici prezenți în probele apoase. Ea s-a dovedit o alternativă extrem de atractivă a tradiționalelor extracții L-L care au reprezentat, timp de mulți ani, abordarea standard pentru izolarea și concentrarea analiților organici din probele apoase. Sintetizând, tehnica SPE prezintă următoarele avantaje în raport cu tradiționala extracție L-L:

- consum redus de solvent organic și, implicit, cantități reduse de reziduuri de solvenți organici uzați necesar a fi eliminați respectiv recuperați
- factori de concentrare foarte buni atinși în majoritatea cazurilor
- evitarea problemelor de miscibilitate ale apei cu solventul de extracție

- tehnica potrivită pentru extracțiile foarte selective
- posibilități de automatizare avansate și multiple
- evitarea apariției emulsiilor specifice extracției L-L
- valori bune ale recuperării analiților de interes și repetabilității [22].

În ceea ce privește *principiul de funcționare* al tehnicii SPE, el este similar cu cel ce guvernează procesele intime de separare din cromatografia de lichide. La modul cel mai general, cele două abordări (strategii) de lucru posibile sunt :

- aplicarea probei lichide, în general câțiva mililitri de soluție organică, pe un cartuș sau disc conținând un material solid (“*sorbent*”) ce posedă anumite grupări funcționale în vederea reținerii multiplilor compuși interferenți din matricea probei; analiții de interes parcurg materialul solid fără a fi reținuți.
- aplicarea probei lichide, în general volume mari de soluție apoasă (sute sau mii de mililitri), pe un cartuș sau disc conținând un material solid ce posedă anumite grupări funcționale în vederea reținerii analiților de interes; compușii interferenți din matricea probei parcurg materialul solid fără a fi reținuți.

Prima abordare conduce la îndepărtarea selectivă a interferenților matriceali din probă, tehnică ce poartă numele generic de *curățarea extractului* (“*clean-up*”). Ea este utilizată în general pentru purificarea extractului rezultat în urma extracției cu solvent organic a probelor solide complexe (matrici naturale).

Cea de-a doua abordare se aplică în special probelor apoase și conduce atât la îndepărtarea unei părți a interferenților matriceali cât, mai ales și mai important, la *concentrarea* analiților de interes în fracțiunea finală ce urmează a fi supusă etapei cromatografice ulterioare.

Funcție de *tipul materialului solid* utilizat, se pot diferenția, similar clasificării din cromatografia de lichide, extracția în fază solidă inversă (RP-SPE) care utilizează materiale derivatizate cu grupări nepolare (cele mai frecvente fiind silicagelul cu grupări octadecilice sau octilice) respectiv extracția în fază solidă normală (NP-SPE) care utilizează materiale derivatizate cu grupări polare (cele mai frecvente fiind silicagelul și alumina).

Prin urmare, pentru determinarea diverselor reziduuri de poluanți organici din probele de apă potabilă, abordarea de lucru va fi extracția în fază solidă inversă cu concentrarea analiților de interes în fracțiunea organică finală.

Procedura efectivă de lucru va trebui să conțină următorii pași:

- spălarea materialului solid și a diverselor trasee ale echipamentelor implicate cu solvent organic (sau amestec de solvenți organici) în vederea îndepărtării potențialilor interferenți din sistem
- condiționarea sau activarea succesivă a materialului solid, mai întâi cu solvent sau amestec de solvenți organici apoi cu apă de puritate adecvată (bidistilată sau deionizată)
- prepararea probei apoase (de obicei prin adăugarea unei mici cantități de solvent organic) și aplicarea (trecerea) ei prin cartușul sau discul cu material solid
- uscarea materialului solid prin trecerea aerului sau azotului prin cartuș sau disc
- curățarea (îndepărtarea) selectivă a unor categorii de compuși interferenți din matrice rămași prinși pe materialul solid prin aplicarea unui solvent sau amestec de solvenți de tărie organică adecvată
- eluarea analiților de interes de pe materialul solid al cartușului sau discului prin aplicarea unui solvent sau amestec de solvenți de tărie organică adecvată.

În plus, funcție de specificul aplicației, se mai poate impune folosirea unor pași suplimentari cum ar fi: uscarea extractului organic în vederea eliminării urmelor de apă prin trecerea peste materiale de tipul clorurii de calciu, tiosulfat de sodiu (operație indicată mai ales în cazul metodelor gaz-cromatografice); curățarea extractului organic de anumite clase de interferenți matriceali prin supunerea lui unei noi etape de SPE (vezi mai sus prima strategie de aplicare a tehnicii SPE) [23].

### *1.2.2. Spectrometrul de masă cu trapă ionică ca detector în analizele LC-MS – principiu de funcționare, principii constructive*

Într-un mod foarte sugestiv, spectrometria de masă a fost descrisă ca fiind “cea mai mică scală din lume”. Baza acestei afirmații extrem de plastice o dă nu dimensiunea echipamentului ci a lucrurilor (entităților) care sunt “cântărite” și anume moleculele. Bazele teoretice ale acestei tehnici analitice se datorează lucrărilor lui J.J. Thomson de la sfârșitul secolului XIX; perioada 1930-1970 s-a caracterizat prin descoperiri și progrese remarcabile atât în zona aspectelor teoretice cât și a celor tehnologice. La modul cel mai general, cele 5 părți componente ale unui

spectrometru de masă sunt: sistemul de asigurare a vidului, sistemul de introducere a probei, sursa de ionizare, analizorul de masă și detectorul de ioni. Practic, spectrometrele de masă determină masele diverselor tipuri de fragmente ionice pe baza *raportului masă/sarcină electrică*, " $m/z$ " [24]. Există numeroase tipuri de spectrometre de masă ce pot fi utilizate în analizele lichid-cromatografice ale diversilor analiți organici din probele de apă. Dintre acestea, este prezentat în continuare spectrometrul de masă cu trapă ionică, varianta constructivă quadrupolică tridimensională.

*Trapa ionică quadrupolică* reprezintă un instrument extrem de interesant și fascinant din punctul de vedere al principiului de funcționare. Astfel, aceeași incintă joacă un rol dublu. Într-o primă fază, ionii aflați în fază gazoasă sunt captați, reținuți și acumulați în interiorul incintei de construcție quadrupolică (vezi figura I.2.1) pentru o anumită perioadă de timp [25].

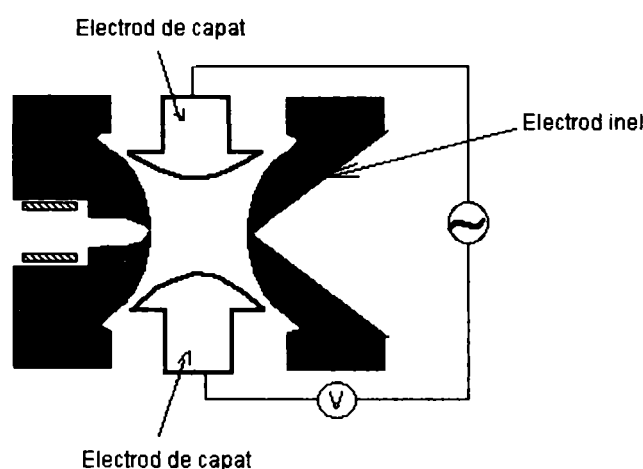


Figura I.2.1. Trapa ionică quadrupolică tridimensională.

Responsabil pentru această acțiune de "întemnițare" a ionilor este câmpul electric ce ia naștere prin aplicarea unor potențiale electrice adecvate electrozilor (polilor) trapei, câmp ce se manifestă sub forma unei gropi de potențial cu alura unei vas cu secțiunea transversală parabolică. Diversele specii ionice se aranjează în straturi succesive, funcție de raportul masă/sarcină electrică. Într-o a doua fază, instrumentul joacă rolul unui analizor de masă prin expulzarea succesivă, în timp, a ionilor captivi din trapă. Procesul este realizat și dirijat prin creșterea liniară a amplitudinii potențialului unui câmp din domeniul radiofrecvenței aplicat unuia din electrozii incintei, părăsirea incintei având loc în ordinea creșterii raportului  $m/z$  [26]. În final, ionii ce părăsesc incinta trapei ionice, sunt colectați de către sistemul de detecție.

Unul din cele mai răspândite sisteme îl constituie *multiplicatorul de electroni*. Acesta este alcătuit dintr-o serie de elemente numite „*dynode*” care funcționează pe baza principiului lui Faraday. Fiecare astfel de element, denumit și *cupă Faraday*, se bazează pe modificarea curentului electric atunci când un fragment ionic lovește suprafața metalică a acestei cupe. Suprafața metalică a cupei este acoperită cu un material ce provoacă emiterea de electroni (așa-ziii electroni secundari), cum ar fi BeO, GaP, CsSb. Are loc astfel amplificarea semnalului provocat de fragmentul ionic primar (vezi figura I.2.2).

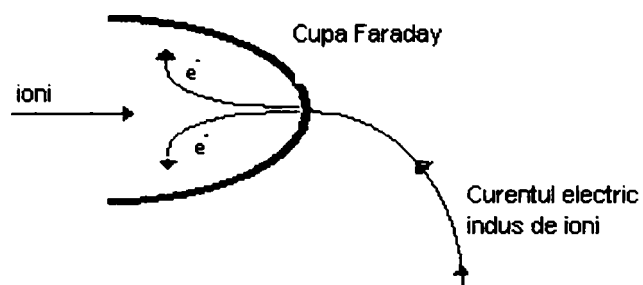


Figura I.2.2. Convertirea în curent electric de către cupa lui Faraday a ionului incident.

Multiplicatorul de electroni realizează în mod uzual amplificarea semnalului de aproximativ 1 milion de ori prin amplasarea în serie a *dynode*-lor, aflate sub acțiunea unor potențiale din ce în ce mai mari. Astfel, electronii secundari emiși de către un element sunt atrași de următorul element iar numărul global al electronilor va crește exponențial (vezi figura I.2.3) [24].

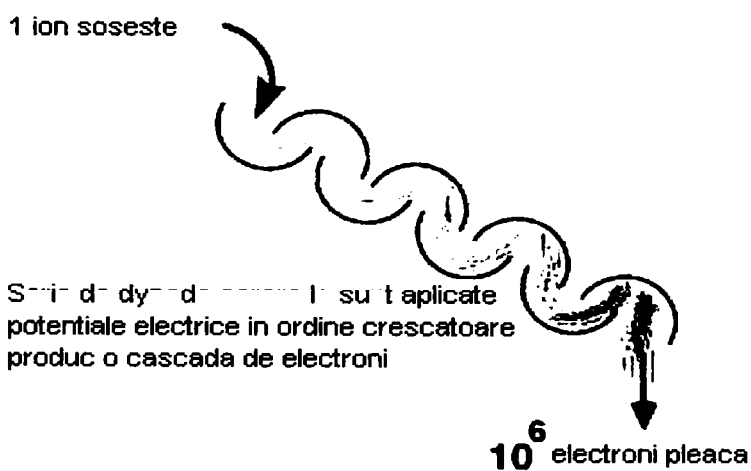


Figura I.2.3. Multiplicatorul de electroni ce realizează apariția unei cascade de electroni secundari și, implicit, factori de amplificare a semnalului de ordinul milioane.

În vederea sporirii sensibilității și specificității metodelor cromatografice ce folosesc detectoare de masă, una din variantele de lucru mult utilizate o constituie *deteția în tandem MS/MS*. Trebuie menționat faptul că această opțiune poate fi utilizată și ca tehnică analitică în sine (fără a o mai cupla cu vreo etapă preliminară cromatografică). Tehnica MS/MS implică două faze ale analizei de masă separate printr-o etapă de reacție sau fragmentare. În prima fază se realizează selectarea anumitor ioni, cu anumite valori  $m/z$ , ce poartă denumirea de ioni precursori; în etapa intermediară de reacție are loc fragmentarea precursorilor iar, în fine, cel de-al doilea analizor de masă produce spectrul de masă care conține informații structurale valoroase [27]. Tocmai acest principiu de funcționare asigură reducerea semnificativă a „zgomotului chimic” și, prin urmare, o specificitate înaltă. Există la ora actuală mai multe tipuri de spectrometre de masă capabile a desfășura acest tip de experimente. Principial, toate pot fi încadrate într-una din cele două categorii posibile: „tandem în timp” și „tandem în spațiu” [28]. În cazul MS/MS „în spațiu”, sistemul de lucru constă în două spectrometre de masă ce sunt cuplate. Ele pot fi de același tip sau de tipuri diferite (două analizoare de masă quadrupolice, două analizoare magnetice, unul magnetic și un quadrupol etc.). Fizic, etapa intermediară de fragmentare a ionilor precursori („CID – *colision-induced dissociation*” sau „*colision-activated dissociation*”) se realizează în celula de coliziune, care poate consta într-un quadrupol, hexapol, octapol etc. în care se găsesc molecule de gaz inert (uzual heliu). Cel mai cunoscut și utilizat instrument comercial prin care se poate realiza MS/MS în spațiu este spectrometrul de masă triplu-quadrupolic. În opoziție, spectrometria de masă în tandem realizată „în timp” realizează întregul proces secvențial, în aceeași incintă. Din acest motiv, spectrometrele de masă care funcționează pe baza acestui principiu sunt trape ionice. Printre cele mai cunoscute pot fi enumerate trapa ionică quadrupolică tridimensională (vezi fig. I.2.1.), trapa ionică liniară bidimensională, ciclotronul ionic cu transformată Fourier („FTICR – Fourier transform ion cyclotron”) [25].

### *1.2.3. Interfețele de conectare API a lichid-cromatografelor cu spectrometrele de masă - tipuri, principii de funcționare*

La începuturile utilizării spectrometrului de masă drept detector în analizele cromatografice, principala dificultate tehnologică a constat în cuplarea cromatografelor de lichide la ele. Din

acest motiv, o bună perioadă de timp spectrometrul de masă s-a consacrat drept detectorul cel mai performant utilizabil doar de către sistemele gaz-cromatografice. Situația s-a schimbat radical însă în perioada anilor '80 datorită introducerii așa-ziselor interfețe „*atmospheric pressure ionization*” (API). Cele două tipuri răspândite astăzi în construcția instrumentelor comerciale sunt ionizarea prin sprayere în câmp electric („*electrospray ionization*” - ESI) și ionizarea chimică la presiune atmosferică („*atmospheric pressure chemical ionization*” - APCI). Funcție de masa moleculară a analiților de interes și de polaritatea lor, se poate pleca, într-o primă abordare, la alegerea tehnicii cromatografice adecvate (figura 1.2.4) [29].

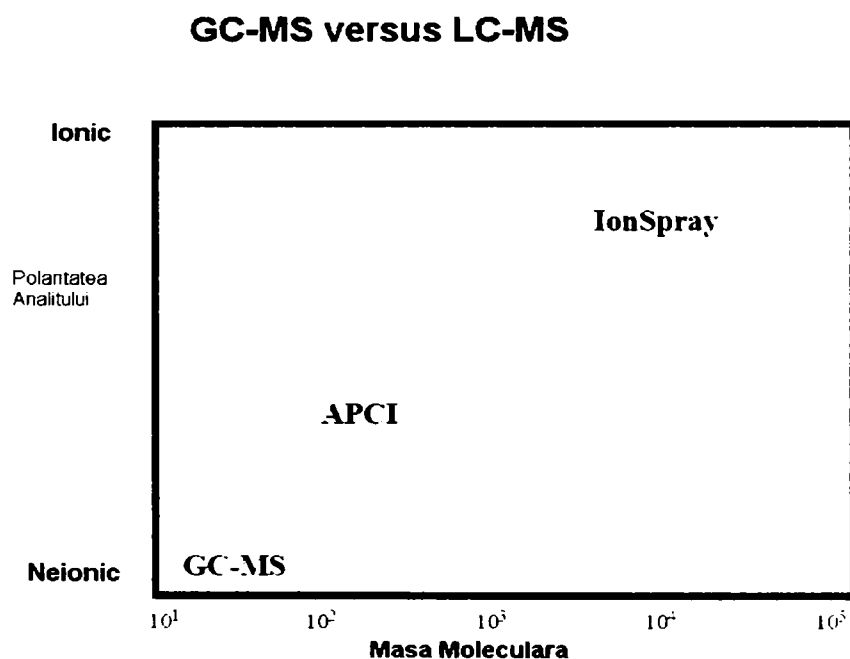


Fig. 1.2.4. Alegerea tehnicii cromatografice adecvate funcție de masa moleculară și polaritatea analiților de interes.

### 1.2.3.1 Interfața ESI

După cum se poate deduce și din figura 1.2.4, tehnica LC-ESI-MS s-a dovedit extrem de potrivită pentru determinarea masei moleculare a biomoleculelor ce au valori mai mari de 400-500 de Daltoni. Astfel, ea permite acestor molecule nevolatile și de mase moleculare ridicate să fie analizate direct din faza lichidă în care se găsesc. Principial, modul în care acționează interfața ESI este unul simplu. Astfel, soluția diluată conținând analitul de interes este pompată printr-un capilar, la debite de curgere mici ( $0,1 - 10 \mu\text{L min}^{-1}$ ), capilarul aflându-se



sub un potențial electric ridicat (2 – 5 kV), de polaritate adecvată naturii analitului. Acest potențial asigură gradientul de câmp electric necesar separării pe baza sarcinilor electrice la suprafața lichidului. Rezultatul constă în părăsirea capilarului de către lichid sub forma așa-numitului „con al lui Taylor”. Atunci când soluția care alcătuiește „conul lui Taylor” atinge „limita Rayleigh” (punctul în care repulsiile coulombice de la suprafața încărcată a lichidului egalează tensiunea superficială a soluției), mici picături, conținând un exces de sarcină pozitivă sau negativă, părăsesc capătul capilarului. Există mai multe ipoteze privind mecanismul intim prin care aceste picături se divid și devin din ce în ce mai mici, până la a consta dintr-un singur ion [30]. Figura I.2.5 prezintă sintetic etapele mai sus prezentate.

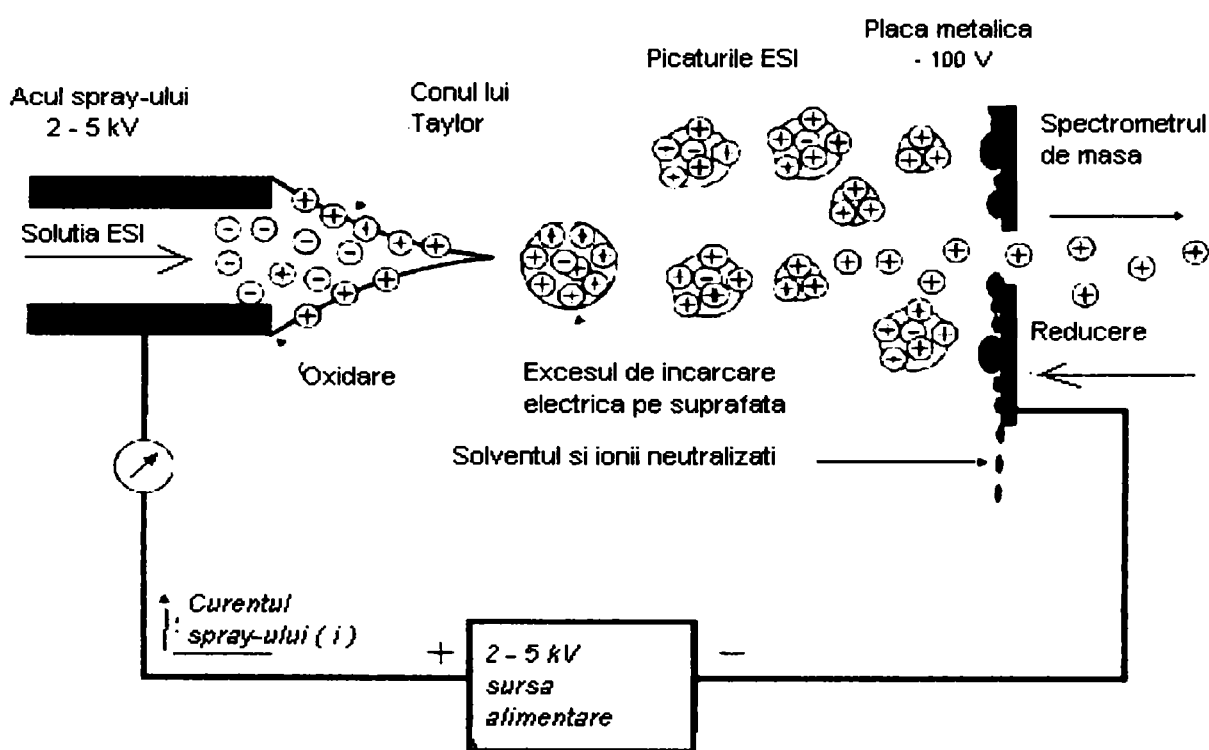


Fig. I.2.5. Modul de realizare a ionizării în interfața ESI.

Deoarece procesul care are loc în interfața ESI produce un amestec de ioni, specii neutre și clustere ale ionilor cu speciile neutre, a trebuit rezolvată problema separării ionilor din acest amestec complex și introducerea lor în regiunea spectrometrului aflată sub vid. Pentru aceasta s-a apelat la un jet coaxial de gaz ce acționează precum o pelerină sau o teacă („*sheath gas*”) în jurul capătului capilarului, în plus contribuind și la desolvarea picăturilor. Această variantă de lucru poartă numele de ionizare prin sprayere în câmp electric asistată pneumatic

(„*pneumatically assisted ESI*”). Alte variante constructive apelează la soluția poziționării capilarului de sprayere în afara axei tubului de intrare a ionilor în spectrometrul de masă. Poziționarea în afara axei („*off-axis*”) maximizează cantitatea de picături desolvatate care intră în spectrometru deoarece regiunea exterioară a conului jetului de spray este mai bogată în picăturile mai ușoare, mici și desolvatate [31].

Tendențele moderne merg în spre așa-zisele variante constructive „micro ESI” și nano ESI”. Debitele fazelor mobile scad semnificativ (de ordinul a câțiva  $\mu\text{L min}^{-1}$ ), diametrul intern al coloanelor (1 mm și mai mici) iar sensibilitatea se îmbunătățește semnificativ ( $10^{-15}$  mol pentru varianta „nano”). Pentru a atinge astfel de performanțe s-a recurs la îmbunătățiri ale multor detalii constructive ale variantelor clasice ESI care țin de construcția capilarului (materialul utilizat, diametrul, ascuțimea capătului etc.), modul de aplicare a potențialului electric, distanța în raport cu orificiul de intrare în spectrometrul de masă etc [32].

Unul din avantajele principale ale interfeței ESI constă în „blândețea” prin care ea realizează ionizarea compușilor în raport cu structura lor. Ea conduce la descompuneri mult mai reduse ale ionilor moleculari în raport cu interfața APCI. Practic, tehnica ESI reușește să aducă în fază gazoasă molecule cu mase moleculare foarte mari. Un exemplu concludent îl oferă lucrarea lui Siuzdak și colaboratorii [33] care au obținut experimental „ioni virali” prin infuzia directă a soluției acestora într-un spectrometru de masă triplu-quadrupol. Astfel, ei au determinat masele moleculare ale suprastructurilor moleculare ce iau naștere în soluțiile virușilor orezului galben pătat respectiv al mozaicului tutunului ( $M > 40$  milioane Da). Impresionant a fost faptul că aceste structuri virale ionizate și-au păstrat configurația la nivelul cuaternar (fapt dovedit experimental prin prezervarea capacității lor virulente), atestând astfel că tehnica ESI a menajat inclusiv interacțiunile necovalente din sânul acestor uriașe biomolecule complexe.

### 1.2.3.2. Interfața APCI

Acest tip de sursă de ionizare conține un vaporizator încălzit care facilitează desolvatarea picăturilor de lichid. Moleculele de probă trec în stare de vapori Ionizarea apare prin intermediul unei descărcări electrice corona care, într-o primă fază, crează ioni primari ( $\text{N}_2^+$ ,  $\text{O}_2^+$  în cazul mecanismului ionizării pozitive) cu aerul atmosferic. Ulterior, printr-o serie

complexă de reacții, aceștia generează ioni reactivi din moleculele de solvent ( $H_3O^+$ ,  $CH_3OH_2^+$ ). În final, are loc transferul de protoni sau electroni către moleculele de analit cu formarea de ioni moleculari  $[M+H]^+$  respectiv  $[M-H]^-$ . APCI este în special utilizată în industria farmaceutică pentru analiza compușilor relativ nepolari și semivolatili, cu mase moleculare mai mici de 1200 Da [7]. Figura I.2.6 prezintă sintetic modul de funcționare al acestei interfețe [29].

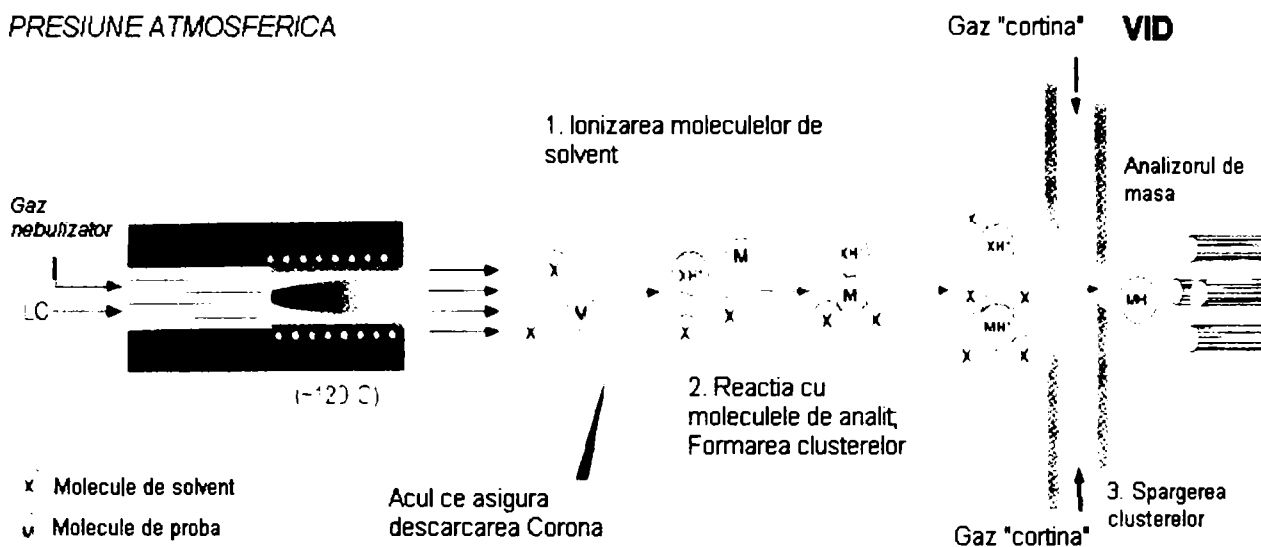


Fig. I.2.6. Modul de realizare a ionizării în interfața APCI.

## Capitol I.3. Pesticide

### *I.3.1. Generalități – utilizare, clasificări, principalele căi de transport în mediu*

În vederea dezvoltării unei agriculturi moderne, combaterea dăunătorilor se impune ca o necesitate de prim ordin. Pesticidele au fost utilizate, într-un număr redus ce-i drept, încă din vremuri străvechi. La începutul secolului XIX numai câțiva compuși erau valabili iar utilizarea lor nu era generală. Începând cu 1870 numărul acestor compuși începe să crească gradual și echipamentele necesare aplicării lor pe recolte încep să se dezvolte în același timp [34]. Compușii anorganici ca arsenitul de sodiu, cloratul de magneziu, sulfatul de cupru și cianamida de calciu au fost printre primii sintetizați, dar nu și-au găsit o largă utilizare practică, nefiind selectivi pentru plantele cultivate. În anul 1932, Truffant și Pastac constată că dinitroortocrezolul - sintetizat și folosit ca insecticid încă din 1892 - are și proprietăți de erbicid în combaterea unor dicotiledonate, fiind în același timp selectiv pentru cereale. În 1945, Templerman, Zimmerman și Hitchoch pun bazele sintezei erbicidelor pe baza de MCPA (acid 4-cloro-2-metoxifenoxiacetic), astfel că din acest moment se poate vorbi cu adevărat de începerea războiului chimic contra buruienilor [35].

Din totalul pesticidelor utilizate în agricultură, ponderea erbicidelor este, de departe, cea mai ridicată. Proporția acestora crește considerabil în condițiile unei agriculturi intensive care folosește cele mai moderne tehnologii. Un exemplu concludent îl constituie agricultura Statelor Unite ale Americii. În agricultura acestei țări ponderea cea mai mare o au încă erbicidele. Astfel, în perioada 1974-1984 procentul lor în agricultură a reprezentat 62-64 % [36]. În continuare, s-a ajuns la o tendință de stabilizare a acestei ponderi astfel că, în 1997, ele reprezentau 62% din totalul ingredientelor active utilizate în producția de pesticide. În ultimii ani s-a constatat o oarecare tendință de scădere a cantității de erbicide utilizate datorită, pe de o parte, reducerii suprafețelor agricole destinate recoltelor selecționate și, pe de altă parte, creșterii eficacității lor de acțiune (deci concentrații mai reduse în principiul activ care pot asigura nivelul cerut de protecție) [37]. Cele mai mari progrese în domeniul sintezei erbicidelor au avut loc în ultimele 2-3 decenii, perioadă în care s-au sintetizat peste 200 substanțe active cu acțiune erbicidă, ajungându-se la peste 2500 sortimente comerciale [38].

Această dezvoltare cu adevărat explozivă a producției de pesticide nu trebuie să conducă însă la folosirea lor exagerată și exclusivă în vederea combaterii dăunătorilor. Astfel, o abordare rațională constă în îmbinarea mai multor metode (agrotehnice, biologice, chimice) pentru asigurarea menținerii populației de dăunători sub un nivel acceptabil din punct de vedere economic. Pot fi enunțate câteva principii generale care pot eficientiza lupta integrată de nimicire a dăunătorilor:

- Utilizarea pesticidelor în funcție de gradul de infestare și pe baza unui plan de acțiune; este obligatorie avizarea lor de către specialiști;
- Folosirea erbicidelor selective, mai puțin persistente;
- Extinderea metodelor biologice de control prin folosirea dăunătorilor naturali;
- Introducerea varietăților de plante rezistente la dăunători;
- Utilizarea feromonilor și a hormonilor juvenili care influențează dezvoltarea paraziților;
- Aplicarea metodelor de sterilizare a dăunătorilor;
- Îmbunătățirea metodelor de condiționare și aplicare în scopul reducerii la minim a consumului de pesticide;
- Rotația sau utilizarea amestecurilor de pesticide pentru evitarea apariției rezistenței [39].

Clasificarea pesticidelor se poate face în funcție de mai multe criterii. Astfel, se pot urmări modul de acțiune, grupele (tipurile) de organisme pe care le combat, starea lor fizică, natura chimică, toxicitatea etc. Devine evident astfel că la ora actuală există, în literatura de specialitate, un număr de mare de clasificări ale pesticidelor, fiecare din ele fiind utilizată de diferitele categorii de specialiști implicate în protejarea plantelor cultivate precum și a diverselor consecințe ale utilizării lor. De exemplu, Bankowska și colaboratorii [40] împart pesticidele pe baza unei clasificări mixte, funcție de modul de acțiune și grupele de organisme pe care le combat (vezi tabelul I.3.1).

Gunn și Stevens [41] prezintă și ei o împărțire a pesticidelor pe baza unui criteriu mixt, acțiune funcțională și structură chimică (vezi tabelul I.3.2):

Tabel 1.3.1. – Clasificarea pesticidelor pe baza grupelor de organisme pe care le combat și a modului lor de acțiune.

Denumire grupă pesticide	Grupa țintă de organisme	
Zoocide	Insecticide	combat insectele
	Rodenticide	combat rozătoarele
	Moluscide	combat moluștele
	Nematocide	combat nematodele
	Larvicide	combat larvele
	Aficide	combat afidele
	Acaricide	combat acarienii
	Ovicide	combat ouăle de insecte și acarieni
Fungicide și fungistatice	combat ciupercile	
Erbicide	combat buruienile	
////////////////////		
Denumire grupă pesticide	Mod de acțiune	
Regulatori de creștere	Defoliați	defoliază plantele
	Desicanți	usucă plantele înainte de recoltare
	Defloranți	înlătură cantitățile excesive de flori
Atractanți	mijloace de ademenit	
Repelenți	mijloace de respingere	

Tabel 1.3.2. – Clasificarea pesticidelor pe baza modului lor de acțiune și a structurii chimice.

Grupa principală	Subgrupa
Insecticide	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Minerale</li> <li>- Organice                             <ul style="list-style-type: none"> <li>• Organoclorurate</li> <li>• organofosforice</li> <li>• carbamați</li> <li>• piretroide</li> </ul> </li> <li>- Microbiene</li> </ul>
Erbicide	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Minerale</li> <li>- Organice                             <ul style="list-style-type: none"> <li>• derivați fenolici</li> <li>• acizi fenoxiacetici</li> <li>• carbamați</li> <li>• uree substituite</li> <li>• triazine, diazine</li> <li>• compuși cuaternari de amoniu</li> <li>• derivați sulfonil ureici</li> </ul> </li> <li>- Microbiene</li> </ul>
Fungicide	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Minerale</li> <li>- Organice                             <ul style="list-style-type: none"> <li>• ditiocarbamați</li> <li>• ftalimide</li> <li>• organomercurice</li> <li>• organostanice</li> </ul> </li> <li>- Microbiene</li> </ul>
Rodenticide	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fumiganți</li> <li>- Anticoagulanți</li> <li>- Diverse</li> </ul>
Moluscide	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Acvatice</li> <li>- Terestre</li> </ul>

Bineînțeles, la rândul lor, diversele subclase de pesticide pot fi împărțite pe baza unor criterii cu un grad de specificitate mai avansat. De exemplu, erbicidele se pot subîmpărți în diferite grupe pe baza unui număr relativ mare de criterii: după selectivitate [42]; după modul de acțiune; după modul cum blochează procesele metabolice [43]; după epoca de aplicare [44]; din punct de vedere fizic [45].

Prin natura lor chimică, pesticidele, ce sunt sintetizate pentru a elimina diversele tipuri de organisme dăunătoare recoltelor, pot prezenta riscuri pentru sănătatea omului și a mediului înconjurător. Ele pot ajunge, în urma folosirii abuzive, în plantele și animalele tratate și, consecutiv, în alimentele obținute din acestea. Similar, ele pot ajunge și în apa potabilă prin intermediul diversele tipuri de ape naturale utilizate la obținerea acesteia. Unele din pesticide au potențial cancerigen, altele pot afecta sistemul endocrin, efectul lor dăunător fiind estimat pe baza studiilor toxicologice și de evaluare a riscurilor („*risk assessment*”) [46].

Pe baza considerentelor de mai sus, devine evident motivul pentru care s-a procedat la stabilirea unor norme care să limiteze nivelurile pesticidelor în produsele de natură vegetală și animală precum și în apa potabilă. Există o serie de organisme naționale și internaționale (cum ar fi Agenția pentru Protecția Mediului în Statele Unite - EPA, Asociația Internațională a Chimistilor Analisti – AOAC etc.) ce se ocupă atât de stabilirea limitelor maxime cât și de dezvoltarea, validarea și standardizarea metodelor analitice necesare a fi utilizate. În România există standardizate la nivel național o serie de metode de analiză a unor clase de pesticide (organoclorurate, triazinice) din apa potabilă. Ele au fost dezvoltate pe baza tehnicii cromatografiei de gaze [12, 13].

Metodele cromatografice, în diversele lor variante principale și de lucru, constituie alegerea de bază: cromatografia de gaze (cu detector selectiv pentru azot și fosfor [47], cu captură de electroni [12], termoionic [13]), cromatografia pe hârtie și cea în strat subțire [48], cromatografie de permeație prin gel [49], cromatografie de lichide în fază inversă cu detecție post-coloană în fluorescență [50] precum și cu detecție în ultraviolet [51]. Au fost dezvoltate, bineînțeles, metode cromatografice ce utilizează spectrometrele de masă drept detectoare dar, datorită performanțelor analitice acceptabile a metodelor standardizate mai sus menționate precum și a costurilor încă ridicate a echipamentelor conținând spectrometre de masă pentru monitorizările de rutină, întârzie standardizarea pe scară largă a acestora.

### I.3.2. Exemple de metode lichid-cromatografice de identificare și cuantificare a pesticidelor din probe de apă

În acest subcapitol vor fi prezentate o serie de exemple de metode HPLC dezvoltate și optimizate în vederea analizei unor clase de pesticide larg utilizate. Unele din exemple se vor concentra strict pe etapa analitică de separare cromatografică a analiților de interes (dezvoltarea metodei realizându-se experimental cu soluții standard de pesticide) în timp ce altele vor prezenta rezultatul final al dezvoltării metodei (cromatogramele achiziționate în urma injecției directe a unor probe de apă sau ale extractelor organice rezultate în urma procesării preliminare a probelor → extracție + concentrare).

Lucrând pe o coloană cromatografică Inertsil Chrom Sep ODS-3, 150 x 4,6 mm,  $d_p$  5  $\mu\text{m}$ , în condițiile de lucru următoare: faza mobilă acetonitril/apă – 80/20 (v/v); debitul de curgere al fazei mobile 1,0 mL/min; temperatura 40°C; detecție UV la  $\lambda = 254$  nm; volumul injecției 10  $\mu\text{L}$ ; concentrația analiților 10  $\mu\text{g/mL}$  [52], s-a reușit separarea unui amestec de 6 pesticide ureice; toate posedă în structura moleculei gruparea ureică (cu excepția tebufenozidei care este un hidrazo-derivat cu aldehide aromatice la ambii atomi de azot) și nuclee aromatice (figura I.3.1).

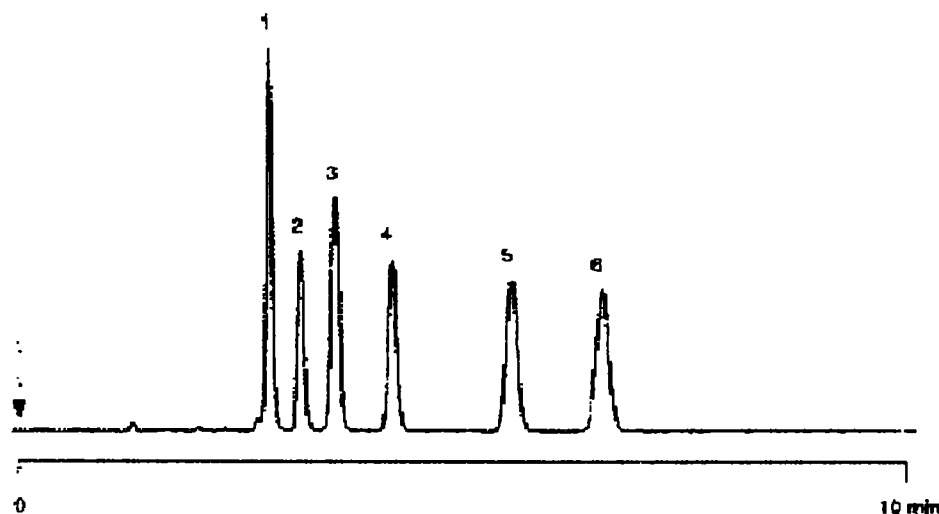


Fig. I.3.1. - Cromatograma separării unui amestec de pesticide ureice, unde: 1 – diflubenzuron, 2 – tebufenozida, 3- hexaflumuron, 4 – teflubenzuron, 5 – flufenoxuron, 6 – clorfluazuron [52].

În cazul separării izocratică a 8 pesticide carbamice, s-a apelat la detecția în fluorescență a analiților de interes, derivatizați după ieșirea din coloană în vederea sporirii sensibilității și



specificității metodei. Condițiile de lucru au fost următoarele: coloana Inertsil Chrom Sep ODS-3, 150 x 4,6 mm,  $d_p$  5  $\mu$ m; faza mobilă acetonitril/apă – 53/47 (v/v); debitul de curgere al fazei mobile 1,0 mL/min; temperatura 40°C; detecția FI,  $\lambda_{ex}$  = 345 nm,  $\lambda_{em}$  = 450 nm; reacție post-coloană cu NaOH la 100°C, apoi derivatizare cu aldehydă ortoftalică la 50°C; volumul injecției 25  $\mu$ L; concentrația analiților 50-100  $\mu$ g/mL (figura I.3.2) [53].

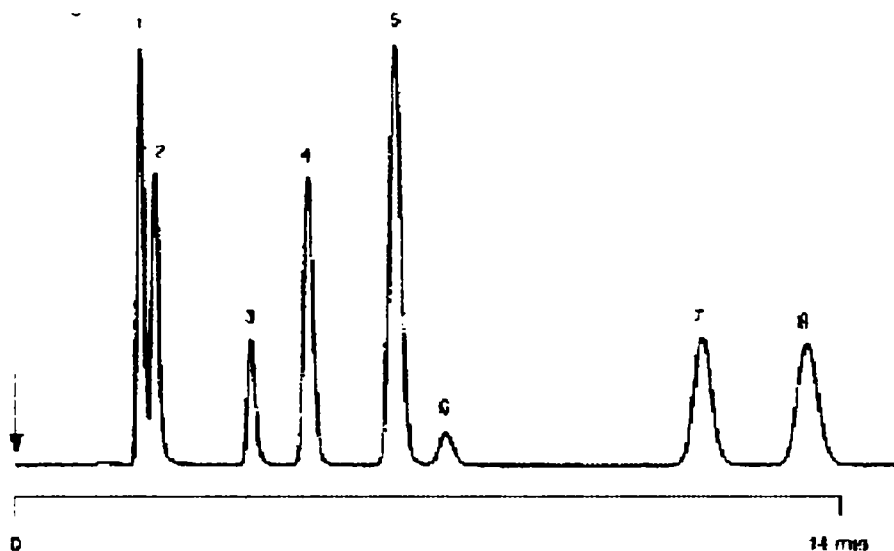


Figura I.3.2. - Cromatograma separării unui amestec de 8 pesticide carbamice unde: 1 – oxamil, 2 – metomil, 3 – aldicarb, 4 – bendiocarb, 5 – etiofencarb, 6 – pirimicarb, 7 – fenobucarb, 8 – metiocarb [53].

Lucrând pe o coloană Zorbax 5 SB-C18, 250 x 4,6 mm,  $d_p$  5  $\mu$ m, s-a realizat separarea unui grup de 9 pesticide din clasa acizilor fenoxicarboxilici. Condițiile de lucru au fost următoarele: debitul de curgere al fazei mobile 1,0 mL/min; temperatura 40°C; detecție UV la  $\lambda$  = 245 nm; volumul injecției 10  $\mu$ L (figura I.3.3) [54].

Faza mobilă:	A. 20 mM fosfat monopotasie		B. acetonitril
Gradient:	Timp (min)	%A	%B
	0	90	10
	2	90	10
	25	35	65

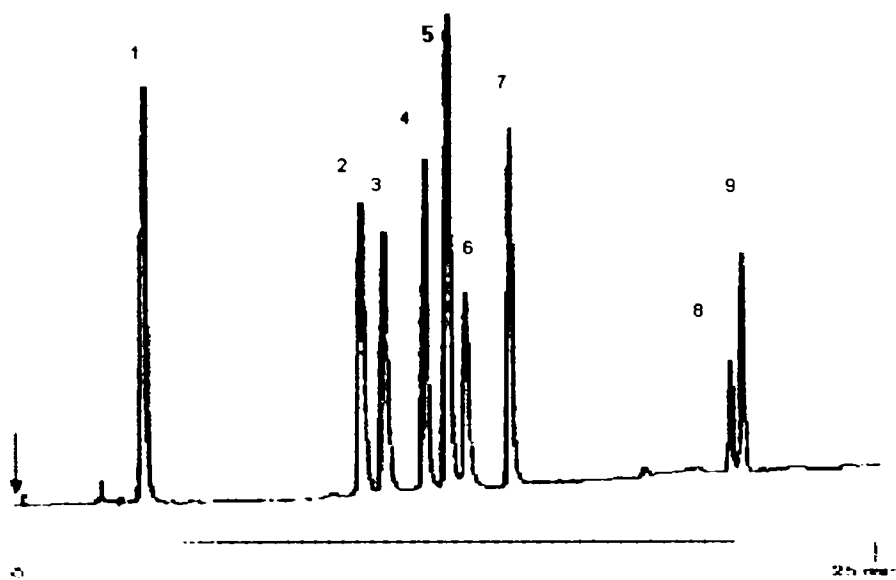


Figura I.3.3. - Cromatograma separării unui amestec de 9 acizi fenoxicarboxilici, unde: 1 – dicamba, 2 – 2,4-D, 3 – MCPA, 4 – 2,4-DP, 5 – diclorprop, 6 – 2,4,5-T, 7 – 2,4,5-TP, 8 – 2,4-DB, 9 – MCPB [54].

În cazul acestei separări, autorii ei au decis să aleagă soluția eluției în gradient pentru a asigura rezolvarea acceptabilă a picurilor cromatografice ale analiților de interes într-un timp de lucru rezonabil (< 25 min).

După cum s-a putut observa din exemplele anterioare, tehnica RP-HPLC reprezintă alegerea uzuală pentru rezolvarea separării cromatografice a unor astfel de amestecuri dificile. Se poate însă apela și la serviciile fazelor staționare normale pentru obținerea unor separări performante din punct de vedere al eficienței și rezoluției cromatografice. Astfel, figura I.3.4. prezintă separarea în gradient a unui amestec de 12 pesticide (triazinice, carbamice, ureice) utilizând o fază staționară normală de tipul silicagelului.

Condițiile cromatografice de lucru au fost: coloana cromatografică Inertsil 5 Si, 150 x 4,6 mm,  $d_p$  5  $\mu$ m; debitul de curgere al fazei mobile 1,0 mL/min; temperatura 40°C; detecție UV la  $\lambda=230$  nm; concentrația analiților 40 ng/component [55].

Faza mobilă: A: - hexane, B: - etanol

Gradient: A/B – 99/1 → (6 min) → 98/2 → (5 min) → 90/10

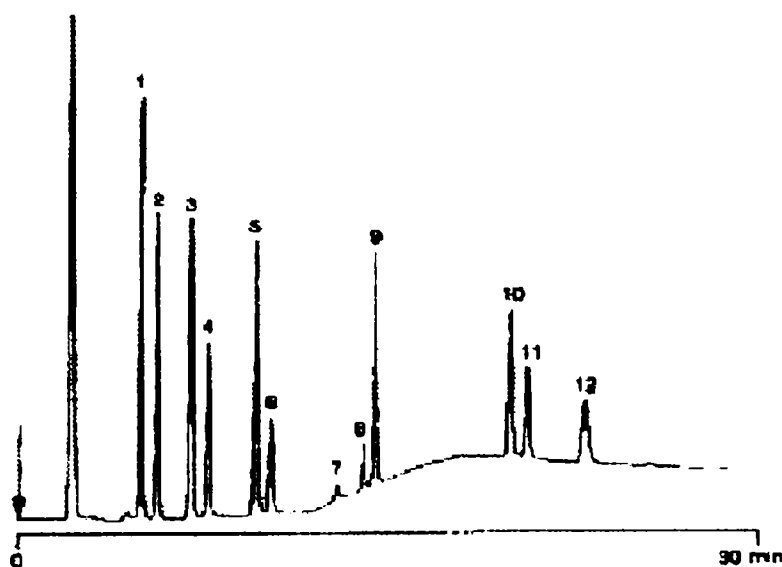


Figura. I.3.4. - Cromatograma separării unui amestec de pesticide triazinice, carbamice și ureice, unde: 1 – prometrina, 2 – terbutrina, 3 – ametrina, 4 – atrazina, 5 – simetrina, 6 – simazina, 7 – propoxur, 8 – carbofuran, 9 – carbaril, 10 – fenuron, 11 – monuron, 12 – metomil [55].

După cum s-a subliniat și în capitolul I.2, etapa de pregătire a probei este crucială în ceea ce privește influența ei asupra valorilor globale ale recuperării, limitei de detecție, repetabilității și reproductibilității, incertitudinii de măsurare, robustețea metodei. Astfel, Soriano și colaboratorii [56] prezintă un studiu interesant care evaluează eficiența extracției și recuperării unui amestec de 11 pesticide carbamice din probe de apă suplimentate cu standarde de puritate HPLC de pe cartușe conținând drept umplutură cărbune grafitizat, GCB (“*graphitized carbon black*”). Autorii au desfășurat o serie de experimente prin care să evalueze gradul de saturare al umpluturii, potențialele degradări ale analiților de interes la suprafața materialului, apariția canalelor de trecere preferențială, reținerea eventualilor contaminanți interferenți. Rezultatele experimentale au arătat că eluția cartușelor SPE cu un amestec diclormetan/acetonitril a condus la recuperări ale compușilor studiați > 77%. Gou și colaboratorii [57] au dezvoltat o metodă cromatografică de tipul “*in-tube*” SPME -RP-HPLC pentru separarea și cuantificarea unor pesticide polare de tip carbamic din probe de apă relativ clare. O astfel de aplicație realizează cuplarea echipamentului de extracție SPME (“*solid-phase microextraction*”) cu autosamplerul sistemului HPLC în scopul realizării “*on-line*” a etapelor de pregătire a probei. Denumirea “*in-tube*” a extracției provine de la modul de depunere a fazei solide responsabilă

de extracția analiților de interes pe tuburile pe bază de silice ale echipamentului SPME. Astfel, aceasta este depusă în interiorul unei porțiuni a tubulețului în contrast cu modul de aplicare practicat în SPME clasic (pe exteriorul lui). În final, deviația relativă standard în cazul tuturor pesticidelor studiate s-a încadrat în domeniul 1,7-5,3% iar coeficienții de regresie pentru curbele de etalonare (construite pe domeniul 5-10.000 ng/l) în intervalul 0,9824-0,9995. Metoda SPE–RP–HPLC–DAD dezvoltată de Martinez și colaboratorii [58] a urmărit monitorizarea în probe de apă a erbicidelor aparținând structural mai multor grupuri (triazinice, ureice, amidice). Concentrarea analiților de interes a fost realizată pe cartușe SPE cu umplutură polimerică (care s-a dovedit eficientă în raport cu polaritatea compușilor testați) iar limita de detecție (la  $\lambda = 220$  nm) a ajuns în domeniul 0,004-0,025 ng/l. Un studiu comprehensiv în ceea ce privește tipul probelor abordate, tehnicile de curățare și concentrare a analiților de interes și detecția utilizată a fost realizat de către Peruzzi și colaboratorii săi [59]. Autorii prezintă rezultatele obținute în urma optimizării operației SPE. În urma testării diferitelor tipuri de umpluturi, ionice și neionice, disponibile pe piață (C18, ENV+, ENV+-C8, SAX, Oasis HLB) ei au stabilit că umplutura copolimerică divinilbenzen-co-N-vinilpirolidonică din cartușele Oasis HLB realizează recuperările cele mai bune (> 70%) pentru aproape toți compușii studiați (erbicide din clasa acizilor fenoxicarboxilici).

Sunt prezentate în continuare o serie de aplicații pentru determinarea diverselor clase de pesticide din probe de apă, însoțite fiind și de informațiile referitoare la modul de pregătire a probei. Potter și colaboratorii [60] folosesc detecția DAD pentru analiza multireziduală prin RP-HPLC a probelor de apă recoltate din drenajul unor câmpuri cultivate cu bumbac. Metoda e pusă la punct pentru detecția și cuantificarea unor pesticide defoliante (tribufos, dimetipin și tiodiazuron), a erbicidului diuron și a insecticidului metilparation. Anterior injecției în sistemul HPLC este practică concentrarea probei de apă prin SPE pe cartușe cu umplutură de DVBVP (copolimerul divinilbenzen-N-vinilpirolidină). În ceea ce privește performanțele metodei, recuperărilor analiților s-au situat în domeniul 87-115% iar limita de detecție pentru toți analiții s-a situat sub 0,1 ng/L. Folosind aceleași principii de pregătire a probei și de detecție, Ruberu și colaboratorii [61] au pus la punct o metodă pentru determinarea unor erbicide fenilureice larg utilizate: clortoluron, diuron, fluometuron, isoproturon, linuron, metobromuron, metoxuron, monuron, neburon și siduron. Detecția s-a realizat în UV la 245 nm folosindu-se un detector DAD pentru o monitorizare preliminară a absorbăței analiților de

interes pe un domeniu mai mare de lungimi de undă. Probele de apă au fost mai întâi trecute pentru îmbogățirea în analiți peste cartușe SPE tip C18. Recuperarea atinsă a fost redusă (în domeniul 48-70%) dar, prin utilizarea de standard intern, acuratețea și reproductibilitatea rezultatelor au fost corectate la valori acceptabile. Limita de detecție a metodei se situează în intervalul 4-40 ppt (ng/L) pentru toți analiții identificați. Vandecasteele și colaboratorii [62] au reușit punerea la punct a unei metode SPE-RP-HPLC-DAD pentru identificarea a 77 de pesticide (neutre, acide, bazice) din probe de apă cu încărcătură organică ridicată (mai ales cele cu conținut relativ mare de acizi humici, substanțe recunoscute pentru capacitatea ridicată de adsorbție în raport cu multe pesticide). Între etapa de SPE (realizată pe o umplutură mixtă C18-EN) și injecția propriu-zisă autorii utilizează o extracție lichid-lichid pentru minimizarea efectului matricei, important în condițiile unei metode ce-și propune detecția unui număr așa de ridicat de analiți. O aplicație HPLC spectaculoasă dezvoltată de Brouwer [63] reușește separarea și identificarea a 19 pesticide dintr-o probă de apă recoltată din râul Rin, suplimentată pentru confirmarea identității piscurilor cromatografice cu cantități cunoscute de standard din fiecare analit (figura I.3.5).

Condițiile cromatografice de lucru au fost: coloana cromatografică ChromSpher 5 B, 250 x 4,6 mm Chrom Sep,  $d_p$  5  $\mu$ m; debitul de curgere al fazei mobile 1,0 ml/min; detecție UV (diode array)  $\lambda = 230$  nm; volumul probei analizate 100 ml apă (pH = 3 cu HNO<sub>3</sub>) suplimentată cu amestec de standarde de pesticide (5  $\mu$ g/l din fiecare) [39].

Faza mobilă: A. - acetonitril, B. – 10 mM tampon fosfat, pH = 6

Gradient:	timp (min)	%A	%B
	0	5	95
	30	50	50
	40	75	25

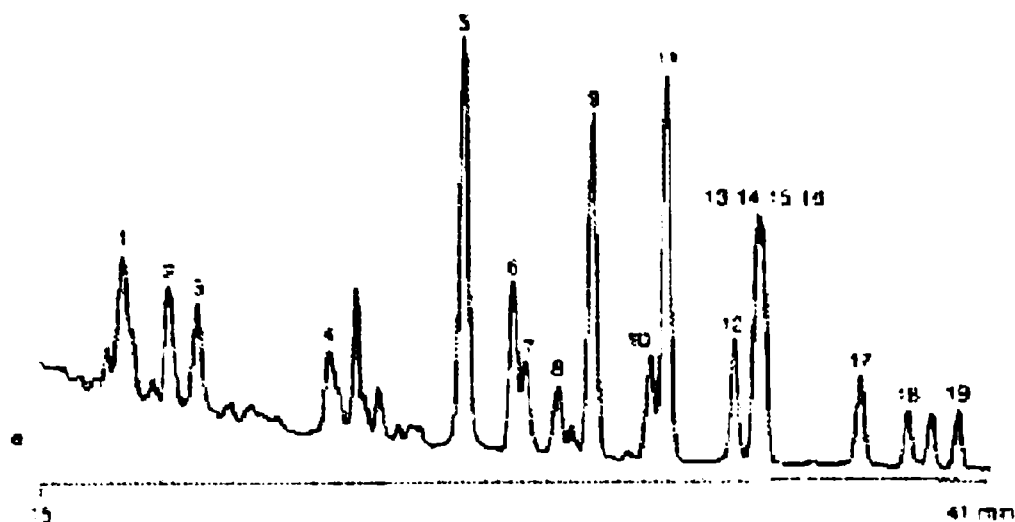


Figura I.3.5. – Cromatograma separării a 19 pesticide dintr-o probă de apă recoltată din râul Rin, suplimentată cu cantități cunoscute de standard din fiecare analit, unde: 1 – warfarin, 2 – dinoseb, 3 – dinoterb, 4 – pentaclorofenol, 5 – atrazină, 6 – 2-aminoantrachinonă, 7 – diuron, 8 – metazaclor, 9 – propazină, 10 – linuron, 11 – 1-aminoantrachinonă, 12 – 3,3-diclorbenzidină, 13 – betoxidim, 14 – barban, 15 – metolaclor, 16 – alaclor, 17 – 1,2,4-triclorobenzene, 18 – foxim, 19 – 1,2,4,5-tetraclorbenzen [63].

Detectorul spectrometru de masă se pretează foarte bine, prin însăși natura principiului său de funcționare, analizei compușilor ionici și ionizabili. Analiza și identificarea pesticidelor și a metabolizilor acestora din probele de apă prin cromatografia de lichide cuplată cu single sau triple-quadrupol prin intermediul interfețelor tip API, precedată de concentrarea prin SPE, tinde să devină varianta favorită de lucru în zilele noastre. În cazul metodelor ce se axează în special pe identificarea analiților de interes se folosesc în special spectrometrele de tip trapă ionică și TOF („*time-of-flight*”) [64].

În continuare sunt prezentate doar câteva din aplicațiile pentru determinarea diferitelor clase de pesticide din probele de apă.

O metodă eficientă de separare și elucidare a structurii pentru componenții anionici din matricele conținând amestecuri complexe de pesticide organofosforice, dezvoltată de Mohsin [65], folosește o coloană de schimbători de anioni și o soluție apoasă de hidroxid de sodiu drept eluent, interfața detectorului cu cromatograful de lichide este de tipul electrospray iar detecția este condusă în modul ion-negativ. În final, compoziția elementară a componenților necunoscuți se realizează prin spectrometrie de masă de înaltă rezoluție. Determinarea HPLC-

MS dezvoltată de Curini și colaboratorii [66] pentru analiza a 53 din cele mai utilizate erbicide în probe de apă implică o primă fază de preconcentrare pe cartușe SPE de tipul GCB, urmată de eluția analiților pe o coloană clasică RP-HPLC tip C18 cu  $d_i = 4,6$  mm, cu o viteză volumetrică de 1 ml/min. Din efluentul coloanei se introduce un debit de 100  $\mu$ l/min în detectorul MS prin intermediul interfeței ISI („*ionspray interface*”). S-a demonstrat că limita de detecție a metodei coboară sub 10 ppt (ng/L) pentru probe de apă potabilă. O metodă rapidă SPE-LC-APCI-MS-MS pentru analiza on-line a unui spectru larg de pesticide trazinice, organofosforice și fenilureice pentru probe de apă potabilă și apă de suprafață a fost dezvoltată de Asperger și colaboratorii [67]. Aplicația constă în etape de pregătire a probei (preconcentrare pe două coloane diferite de curgere turbulentă, una umplută cu material pe bază de carbon, cealaltă cu umplutură polimerică) urmate de separarea analitică (coloană cromatografică monolitică în locul uneia cu umplutură tradițională granulară).

În concluzie, cuplarea sistemelor HPLC cu detectoarele MS se dovedește a pune la dispoziție un instrument puternic și sensibil în identificarea și cuantificarea din amestecuri foarte complexe a reziduurilor termolabile și semivolatile din clasa pesticidelor și metaboliților lor. De mare importanță în identificarea compușilor necunoscuți se pot dovedi bibliotecile de spectre MS oferite de diverșii producători. Din nefericire, bibliotecile de spectre oferite pentru sistemele GC-MS (mult mai numeroase și bine puse la punct) nu sunt aplicabile sistemelor HPLC-MS astfel că este imperios necesară construirea unora largi și sistematice pentru aplicațiile HPLC [68].

Deși cele mai utilizate tipuri de detecție sunt spectrofotometria în UV (în variantele achiziției de date la o anumită lungime de undă sau a spectrului pe un domeniu) și spectrometria de masă, există aplicații care folosesc și alte mijloace de detecție. De exemplu, Galeano-Diaz și colaboratorii [69] au dezvoltat o aplicație interesantă prin prisma simplității, timpului de lucru și costurilor reduse. Metoda este dedicată analizei din probe de apă a unor nitropesticide (dinitro-o-crezol, fenitroion, metil și etilparation) și a principalilor metaboliți rezultați (4-nitrofenol, 3-metil-4-nitrofenol). Identificarea analiților de interes se realizează electrochimic utilizând tehnica detecției indirecte. Este de remarcat în această aplicație faptul că autorii au demonstrat, pe o serie de probe de apă de suprafață, atingerea unui nivel de detecție aflat în domeniul 0,05-0,14 ng/L în condițiile evitării vreunei etape de preconcentrare și a realizării unor deviații standard relative în domeniul 1-15%.

## Capitol I.4. Alchilfenoli

### I.4.1. Generalități – utilizare, clasificări, principalele căi de transport în mediu

Alchilfenolii polietoxilați (APEOs) reprezintă o clasă de compuși chimici mult utilizați în ultimii 35 ani în producția detergenților, atât a celor industriali cât și a celor de uz casnic. Astfel, în perioada anilor '70, ei reprezentau principala clasă de surfactanți neionici de pe piață. De asemenea, ei intră în compoziția multor produse formulate din categoria pesticidelor și vopselelor. După această perioadă, biodegradabilitatea lor relativ redusă a condus la limitarea și scăderea utilizării lor pentru produsele de uz casnic, rămânând însă destul de folosiți în domeniul detergenților industrial. Pentru înlocuirea lor treptată s-a apelat la alcoolii polietoxilați. În ultimii 10-15 ani, au fost efectuate studii care au ridicat problema toxicității acestor substanțe și, mai ales, a produșilor lor de degradare, alchilfenolii (APs) (cei mai importanți 4-nonilfenolul și 4-terț-octilfenolul). Concluziile care au apărut în urma acestor studii au confirmat faptul că alchilfenolii pot fi incluși în categoria substanțelor chimice ce provoacă dezechilibre în funcționarea sistemului reproducător și a celui endocrin, atât al faunei acvatice cât și al organismului uman [70]. Generic, grupul larg al compușilor chimici ce posedă potențialul de acțiune mai sus menționat poartă numele consacrat de „*endocrine disrupters*”, iar această titulatură anglo-saxonă va fi folosită de-a lungul acestei teze [19].

Astfel, studii detaliate au fost desfășurate în diverse zone și bazine hidrografice. De exemplu, Wenzel și colaboratorii [71] au monitorizat nivelurile de 4-nonilfenol (NP), 4-terț-octilfenol (TOP), nonilfenol monoetoxilat (NP1EO) și octilfenol monoetoxilat (OP1EO) în speciile de apă dulce ca plătica (*Abramis brama*) și midia-zebra (*Dreissena polymorpha*) precum și în midia comună de apă sărată (*Mytilus edulis*). Probele analizate au provenit din râurile Elba, Rin și Saar, din lacul Belau (colectate în perioada 1992-2001), precum și din Marea Nordului și Marea Baltică (colectate în perioada 1985-2001). NP și NP1EO au fost detectate în toate probele de plătică în timp ce OP1EO nu a fost detectat în nici una din probe. S-a putut observa însă o tendință de scădere a concentrațiilor analiților țintă în timp pentru toate punctele testate. Studii similare au fost conduse pe populații de plătică în nord-estul Angliei, în două zone puternic industrializate [72], precum și de-a lungul râului Cuyahoga, Ohio, pe populații de crap [73] și s-au finalizat cu concluzii asemănătoare. Distribuția și calea de urmată de



metaboliții neutri ai APEOs a fost studiată și de către Ferguson și colaboratorii [74] într-o zona unui estuar situat în vecinătatea unui puternic centru urban. Au fost testate atât apa cât și sedimentele în vederea stabilirii dependenței concentrației metaboliților țintă de traseele de intrare a apelor uzate în estuar. S-a putut observa că aceste concentrații reprezintă rezultanta globală a mai multor procese cum ar fi cele de depunere și penetrare a APEOs în stratul de sediment, degradarea lor în timpul contactului cu apa estuarului și evacuarea din zona estuarului prin procesele advecive și dispersive. Rudel și colaboratorii [75] au monitorizat nivelul APEOs, NP și OP atât în apa reziduală din zona Cape Cod (USA) cât și în cea de băut din surse de adâncime aflate în zona de colectare a apelor reziduale. A fost detectată prezența nonil și octilfenolilor tetraetoxilați în unele din puțurile de apă potabilă demonstrând astfel potențialul contaminant al sistemelor septice de colectare a apelor reziduale. Studiile s-au concentrat și asupra concentrațiilor din aer ale APEOs, NP și OP precum și a căilor de transport și degradare posibile. De exemplu, Van Ry și colaboratorii săi [76] au desfășurat un studiu în zona estuarului râului Hudson. Au fost estimate influențele direcției vântului, ale volatilizării și advecției către oceanul Atlantic precum și perioadele de înjumătățire ale nonilfenolilor în apa estuarului. Prezența în aerul din locuințe a metaboliților APEOs (NP și OP), pe lângă o serie de alți compuși toxici (pesticide, ftalați) a fost demonstrată experimental de Rudel și colaboratorii săi care au detectat valori de ordinul zecilor și sutelor de  $\text{ng/m}^3$  [77]. Toate aceste studii au demonstrat clar necesitatea reducerii cât mai mult posibil a nivelului APEOs din mediul înconjurător. Pe lângă metodele clasice prin biodegradare, unii autori au prezentat variante interesante, cum ar fi cea a lui Destailats și colaboratorii săi [78]. Ei au desfășurat un studiu care să evalueze eficacitatea iradierii ultrasonice în degradarea APEOs în sisteme apoase și a diversilor parametri de lucru. Mecanismul propus pentru degradare a fost acela al oxidării la nivelul lanțului hidrofobic alchilic.

Pentru a putea desfășura studii toxicologice pertinente de stabilire a relației doză-răspuns și a celor care să stabilească nivelul minim de concentrații din țesuturi la care începe răspunsul estrogenic, e evidentă necesitatea dezvoltării de metode analitice performante de identificare și cuantificare a acestor analiți din diverse tipuri de matrici. Primele determinări ale APs și APEOs au fost demarate încă din perioada anilor '80. Ele utilizau tehnicile cromatografiei de lichide, atât în varianta în fază normală (cu coloane umplute cu silicagel derivatizat cu grupări aminice) cât și în fază inversă, detecția realizându-se fie în ultraviolet fie în fluorescență. A

urmat apoi dezvoltarea metodelor bazate pe cromatografia de gaze și de lichide cuplate cu spectrometre de masă.

#### *I.4.2. Exemple de metode lichid-cromatografice de identificare și cuantificare a alchilfenolilor din probe de apă*

Metodele cromatografice clasice au realizat separarea și cuantificarea analiților de interes fie prin cromatografie de lichide realizată în fază normală sau inversă, cu detecție prin spectrofotometrie în UV și fluorescență) [79] fie prin cromatografie de gel-permeație (pe coloane umplute cu Sephadex) cu eluție cu amestec de solvenți organici, cum ar fi diclormetan:metanol – 90:10 (v/v), fie prin gaz-cromatografie (pe coloane din sticlă umplute cu OV-1) cu detecție prin ionizare în flacără [80]. De asemenea, au fost abordați și compușii APEOs. Astfel, Ahel și colaboratorii [81, 82] descriu două metode lichid-cromatografice în fază normală de cuantificare a NP, NP1EO și NP2EO din probe de apă reziduală și nămol de tratare precum și din ape naturale. Metodele au dezavantajul unor etape de pregătire a probei relativ complicate: antrenare cu abur, extracție cu solvent, distilare etc).

Metodele lichid-cromatografice moderne de identificare ale APEOs și produșilor lor de degradare apelează în marea lor majoritate la detecția cu ajutorul spectrometrului de masă. Sunt prezentate în continuare câteva aplicații privind analiza compușilor APEOs și produșilor de degradare (în special NP și OP) din probe de apă. Rigol și colaboratorii [83] prezintă o metodă LC-ESI-MS pentru determinarea mai multor aditivi și dezinfectanți din probe de apă recirculată provenită din procesele industriale de reciclare a hârtiei. Drept spectrometru de masă a fost folosit un detector de masă selectiv cu un singur quadrupol, identificarea și cuantificarea realizându-se pe baza ionului molecular (modul de lucru în ionizare negativă). Astfel, au fost monitorizate fragmentele ionice  $[M-H]^-$  cu valorile  $m/z$  227 pentru bis-fenol A (BPA), 263 pentru octilfenol monoetoxicarboxilat (OP1EC), 277 pentru nonilfenol monoetoxicarboxilat (NP1EC), 219 pentru NP și 205 pentru OP. În figura I.4.1 sunt prezentate cromatogramele TIC și SIM pentru o probă de apă prelevată la ieșirea din sistem. Se poate remarca, pe lângă picurile corespunzătoare alchilbensulfonaților lineari (LAS), apariția celor pentru compușii NP1EC și BPA.

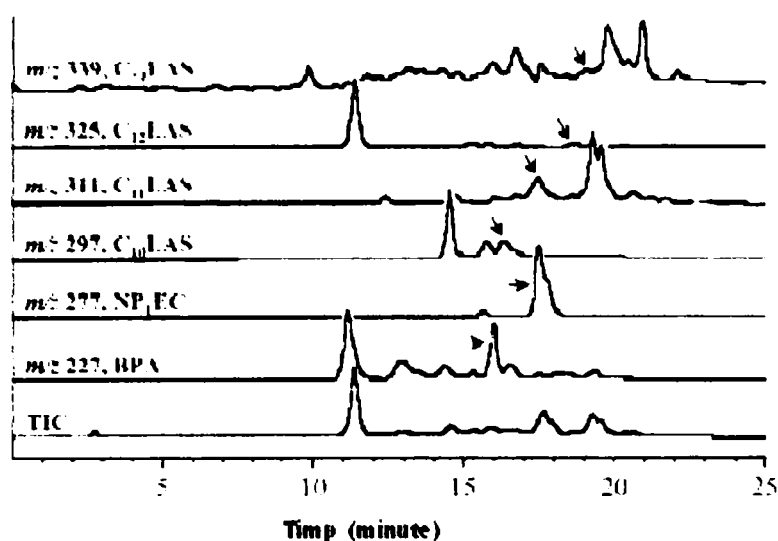


Figura I.4.1. Cromatogramele TIC și SIM pentru o probă de apă prelevată la ieșirea dintr-un sistem industrial de reciclare a hârtiei [83].

Bineînțeles, datorită complexității matricei analizate și a specificității limitate a monitorizării ionului molecular (în comparație cu spectrele MS/MS și a monitorizării de tip SRM), cromatogramele conțin picuri sistematice la diverși timpi de retenție dar ei nu interferă cu compușii țintă. În ceea ce privește performanțele metodei, valorile recuperărilor au fost mai mari de 90% pentru toate speciile. Efectele matricei au fost minimizate prin metoda standardizării interne (suplimentare cu heptilfenol, la nivel de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Limitele de detecție au fost 0,5  $\mu\text{g}/\text{L}$  pentru BPA și 10  $\mu\text{g}/\text{L}$  pentru NP1EC. Cohen și colaboratorii [84] au dezvoltat o aplicație LC-ESI-MS pentru analiza unui grup de APEOs (EPEO<sub>5</sub> - etilfenol pentaetoxilat, HPEO<sub>5</sub> - hexilfenol pentaetoxilat, NPEO<sub>x</sub> - nonilfenol polietoxilat) și alcooli polietoxilați (C<sub>10</sub>EO<sub>6</sub> - alcool decilic hexaetoxilat, C<sub>12</sub>EO<sub>6</sub> - alcool dodecilic hexaetoxilat, C<sub>14</sub>EO<sub>6</sub> - alcool tetradecilic hexaetoxilat, C<sub>16</sub>EO<sub>6</sub> - alcool hexadecilic hexaetoxilat, C<sub>18</sub>EO<sub>6</sub> - alcool octadecilic hexaetoxilat) din probe de apă reziduală. Separarea cromatografică în sine, condusă în fază inversă, realizează separarea omologilor pe baza lungimii lanțului alifatic în timp ce analiza spectrală de masă se ocupă de identificarea individuală a compușilor pe baza lungimii lanțului polietoxilat. Spre exemplificare, în figura I.4.2. e prezentată cromatograma TIC a amestecului de standarde utilizat la etalonarea metodei (nivel de concentrație 10 ppm).

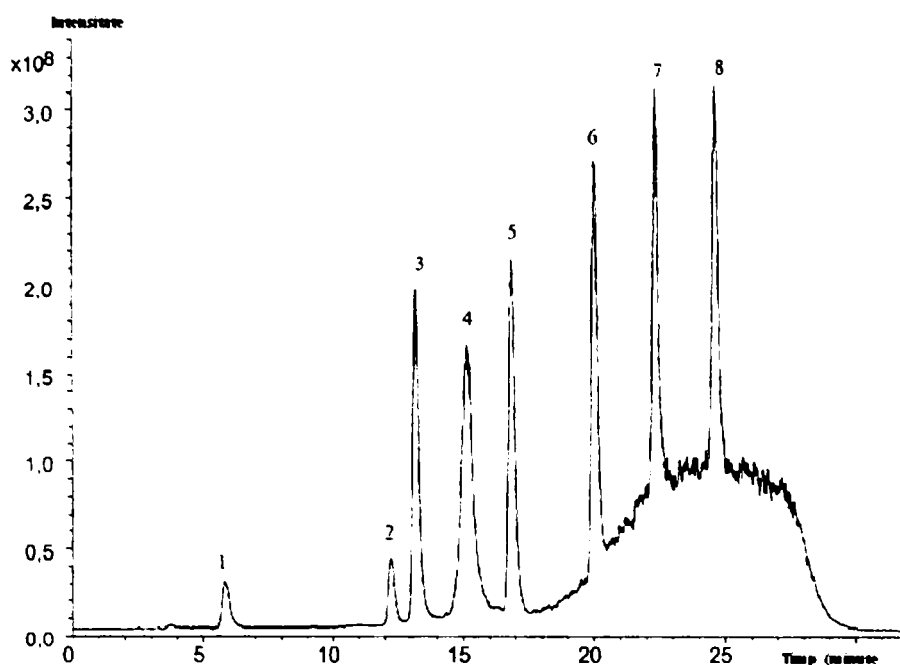


Figura I.4.2. Cromatograma TIC a uneia din soluțiile standard utilizate la etalonarea metodei; 1 – EPEO<sub>5</sub>, 2 – HPEO<sub>5</sub>, 3 – C<sub>10</sub>EO<sub>6</sub>, 4 – NPEO<sub>x</sub>, 5 – C<sub>12</sub>EO<sub>6</sub>, 6 – C<sub>14</sub>EO<sub>6</sub>, 7 – C<sub>16</sub>EO<sub>6</sub>, 8 – C<sub>18</sub>EO<sub>6</sub> [84].

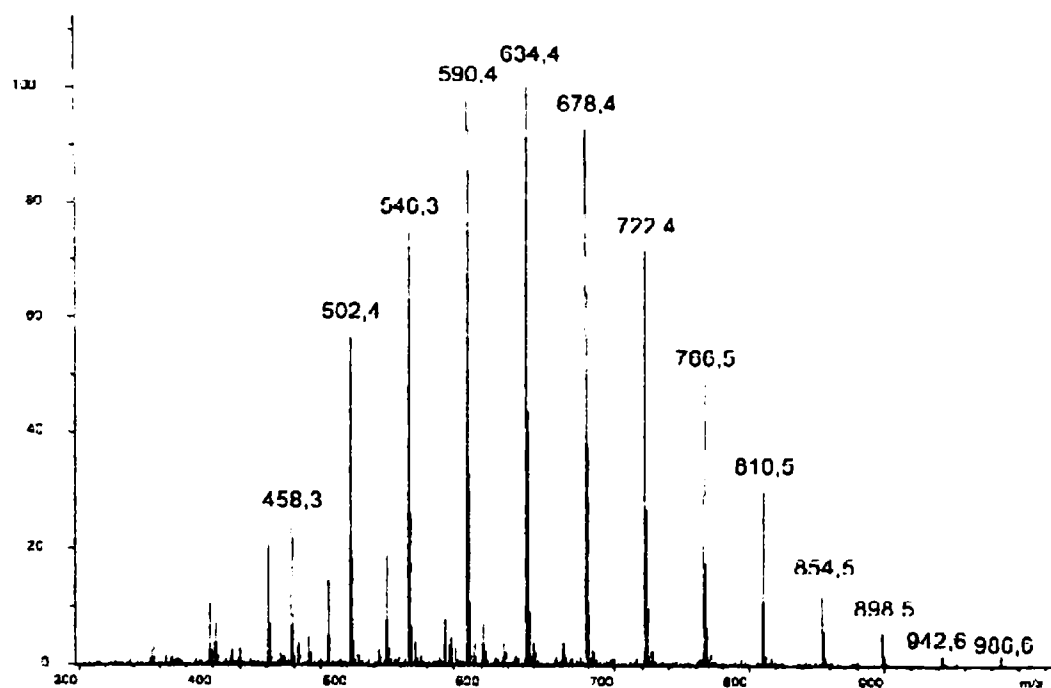


Figura I.4.3. Spectrul de masă al grupului polietoxilaților nonilfenolului NPEO<sub>x</sub> (corespunzător picului nr. 4 al cromatogramei din fig. I.4.2) [84].

Figura I.4.3 prezintă spectrul de masă al grupului polietoxilaților nonilfenolici (picul nr. 4 din cromatograma din figura I.4.2). Fiecare semnal corespunde unui lanț etoxilat. De exemplu, fragmentul cu  $m/z = 590$  este cel generat de  $C_9PhEO_8$ . Diferența dintre semnalele din spectrul de masă este de  $m/z = 44$ , valoarea masei unei unități etoxilice  $-CH_2-CH_2-O-$ . S-a lucrat în modul de ionizare pozitiv iar fragmentele ionice din spectru corespund aducțiilor formați cu ionul amoniu. În ceea ce privește etapa de pregătire a probei, într-o primă etapă s-a realizat ajustarea pH-ului în zona 10-12, după care s-a realizat extracția L-L cu diclormetan. Extractul organic a fost evaporat la sec iar reziduul a fost reluat cu metanol conținând 5 mM acetat de amoniu și 0,5 mM acid tricloracetic. Atât probele cât și soluțiile standard au fost suplimentate înainte de procesare cu două standarde interne, hexilfenol pentaetilenglicol și etilfenol pentaetilenglicol. Abordări similare au și alți autori în ceea ce privește determinarea APEOs, NP și OP din probele de apă. De exemplu, Jeannot și colaboratorii [85] utilizează, în metoda lor LC-ESI-MS, ionizarea pozitivă pentru compușii polietoxilați ai OP și NP și ionizarea negativă pentru OP și NP. Pentru extracția și concentrarea analiților de interes însă ei utilizează o procedură SPE pe cartușe copolimerice Oasis HLB sau pe bază de silicagel derivatizate cu C18, funcție de natura compușilor țintă. Performanțele metodei, estimate pe baza probelor de apă reziduală suplimentate cu analiții de interes, sunt foarte bune. Astfel, valorile recuperărilor pentru  $OPEO_n$ ,  $NPEO_n$ , OP și NP s-au situat în domeniul 92-102%, în condițiile unor repetabilități între 8 și 12% (pentru testele efectuate la nivelul de concentrație 20 ppb). Limitele de cuantificare estimate au fost 0,1  $\mu\text{g/L}$  pentru OP și NP (achiziția datelor în modul SIM, pentru ionul molecular) respectiv 0,5  $\mu\text{g/L}$  pentru  $OPEO_n$  și  $NPEO_n$  (criteriul  $S/N = 10$ ).

În afara probelor de apă de diverse tipuri (potabilă, reziduală, de suprafață, de adâncime etc.) există numeroase aplicații dezvoltate pentru separarea, identificarea și cuantificarea compușilor APEOs, OP și NP pentru o serie de alte matrici naturale. Probabil cea mai testată o reprezintă sedimentul (noroiul) rezultat în urma proceselor specifice din uzinele de tratare a apelor reziduale. Necesitatea analizării acestor tipuri de probe survine datorită faptului că APEOs sunt relativ rezistenți la digestia anaerobă, tratament aplicat în mod curent în uzinele de apă. Ulterior, datorită utilizării în agricultură a acestor sedimente, se poate ajunge în situația contaminării solului cu acești compuși. Bineînțeles, în cazul acestor metode pregătirea probei se dovedește o etapă extrem de importantă în întreg procesul analitic. Cantero și colaboratorii

[86] aplică un protocol de extracție foarte ingenios. Astfel, proba de sediment este acidulată cu soluție HCl 0,05 M și supusă agitării la 700 rpm, timp de 5 min, în vederea îndepărtării metalelor alcaline și alcalino-pământoase. La reziduul solid separat se adaugă drept extractant soluție de dodecilsulfonat de sodiu (SDS) 2% în HCl 4 M. După o nouă etapă de agitare la 700 rpm, la 60°C, timp de 1 h, proba se centrifughează la 5000 rpm, timp de 10 min. Se constată apariția a 3 faze: reziduul solid nedizolvat al matricei la fundul tubului de centrifugă, apoi o fază apoasă la mijloc și, la suprafață, faza de interes bogată în surfactanții neionici. Pentru separarea facilă a fazei de interes, se aduce proba la 0°C. Drept urmare, faza cu surfactanții de interes devine gelatinoasă și se poate ușor colecta cu o spatulă. După readucerea la temperatura camerei a acesteia, diluarea cu metanol și filtrarea prin filtru cu membrană de nylon de 0,45 μm, proba este gata pentru injectarea în sistemul cromatografic. Pentru detecție se utilizează un spectrometru de masă cu trapă ionică. Tot pe probe de sediment provenit de la uzinele de tratare a apelor reziduale, Petrovic și colaboratorii [87] au efectuat un studiu sistematic de monitorizare a compușilor APEOs precum și a derivaților lor clorurați și bromurați ce pot apărea în timpul clorinării apei. Alte tipuri de probe naturale investigate în vederea identificării și cuantificării compușilor APEOs, NP și OP au fost țesuturi de păstrăv (ficat și mușchi), cu o interesantă și eficientă etapă de extracție cu solvent organic în prezența microundelor [88].

Mai sunt descrise în literatură aplicații ce folosesc în etapa de pregătire a probei tehnica microextracției în fază solidă (SPME), cum ar fi cea a lui Boyd-Boland și Pawliszyn [89] folosită pentru extracția APEOs din probe de apă. Autorii susțin că nivelul de concentrare atins a fost foarte ridicat, permițând limite de detecție pentru omologii individuali de sub 1 μg/L, în condițiile detecției în UV la 220 nm. Bineînțeles că au fost dezvoltate și numeroase aplicații gaz-cromatografice pentru determinarea APs și APEOs. În general, ele sunt dezvoltate pentru compușii APs, cei mai importanți fiind OP și NP. Pot fi amintite drept exemple aplicația lui Li și Park de determinare a alchilfenolilor, clorofenolilor și BPA prin tehnica GC/MS, cu derivatizarea preliminară cu bis(trimetilsilil)trifluoracetamidă (BSTFA) [90], și cea a lui Kuklenyik și colaboratorii de identificare și cuantificare a NP, OP și BPA din urină prin GC/MS, cu SPE automatizată cuplată cu derivatizare cu bromură de pentafluorobenzil [91]. Aplicațiile gaz-cromatografice nu fac însă obiectul tezei de față astfel că nu sunt detaliate.

## Capitol I.5. Estrogeni

### *I.5.1. Generalități – principalele căi de transport în mediu, studii de toxicitate*

După cum s-a arătat și la începutul capitolului I.4., problematica prezenței în mediul înconjurător a compușilor „*endocrine disruptors*” a devenit una de mare actualitate. Printre aceștia, hormonii estrogeni naturali sunt de un interes deosebit datorită nivelului foarte scăzut al concentrației în apă la care efectele disruptor-endocrinice încep să se facă resimțite asupra peștilor. Astfel, dacă în cazul alchilfenolilor sunt necesare concentrații de ordinul microgramelor per litru, efectul dăunător al hormonilor estrogeni începe să se manifeste chiar de la nivelul nanogramelor per litru [17]. Există deja studii suficiente care confirmă legătura clară dintre hormonii estrogeni prezenți în apele naturale de suprafață și nivelul crescut al vitelogeninei plasmatică (o lipoproteină produsă de vertebrele care depun ouă și care e prezentă, în mod normal, numai în organismul femelelor [92]) în peștii masculi și femelele tinere precum și al vitezelor ridicate de intersexualizare. Routledge și colaboratorii [93] au publicat în 1998 un studiu referitor la răspunsul in vivo la acțiunea hormonilor estrogeni asupra păstrăvului și babușcei. Rezultatele au confirmat că nivelurile de estrogeni întâlnite în probele de apă de suprafață din Marea Britanie sunt suficient de ridicate pentru a genera răspunsul vitelogeninei plasmatică în masculi. Mai mult, deja au fost lansate tot mai multe ipoteze care pun pe seama creșterii nivelurilor de hormoni estrogeni din alimente și apă creșterea incidenței unor fenomene constatate la om: scăderea cantității și motilității spermatozoizilor din spermă, cancerul testicular precum și diverse alte tulburări ale fertilității masculine [17]. Sunt încă numeroase situațiile în care sursa pentru apa de băut o constituie apa poluată de suprafață. În ciuda diverselor procedee de tratare în vederea eliminării contaminanților, apa potabilizată poate conține încă nivele semnificative din numeroșii compuși chimici dizolvați. Devine astfel evidentă necesitatea monitorizării nivelului contaminanților cu potențial estrogenic în apa potabilă și aplicarea de metode noi, mai eficiente, de minimizare a prezenței lor în cazul în care ei depășesc anumite nivele [6]. Astfel, Baronti și colaboratorii [94] au monitorizat în perioada octombrie 1999 – martie 2000 nivelul unora din hormonii estrogeni naturali (estronă, estradiol, estriol) la intrarea și ieșirea a 6 uzine de tratare a apelor reziduale (utilizând procedeul nămolului activat) din zona orașului Roma.

Au fost detectate nivele de ordinul ppb pentru analiții țintă (ba chiar mai mari, de ordinul zecilor de ppb pentru estronă). D'Ascenzo și colaboratorii [95] au continuat această monitorizare în perioada septembrie – decembrie 2001, urmărind în plus și nivelul concentrației formelor lor conjugate (ca sulfatați și compuși glucuronici). Dacă în cazul glucuronidelor nivelul de îndepărtare a lor din apa supusă tratării a fost de 100%, în cazul formelor libere și a celor de tip sulfatați, la ieșirea din uzină s-au mai putut detecta niveluri de 1-10 ppb (ceva mai ridicate pentru estronă, până la 17 ppb). Studii similare de monitorizare au fost efectuate de Belfroid și colaboratorii în Olanda (11 locații, 1997) [4], Desbrow, Johnson, Routledge și colaboratorii în Marea Britanie (7 locații, 1995) [96, 5, 97], Cargouët și colaboratorii în Franța (4 locații, 2002) [98]. Toate au demonstrat prezența estronei, 17 $\beta$ -estradiolului, estriolului și etinilestradiolului în apele uzate de suprafață supuse tratării în uzinele de apă. În general, estrona a fost găsită în concentrația cea mai ridicată, procedeele de tratare utilizate nereușind să îndepărteze complet hormonii estrogeni. Modul și traseul urmat de estrogeni în apele de suprafață (râuri), elucidarea vitezei și nivelul partiției lor între cele 2 faze, apă și sediment, sunt fenomene extrem de importante în vederea estimării destinului lor ulterior în mediul înconjurător. De aceea, unii autori, cum este cazul lui Lai și colaboratorii [99], au investigat influența pe care o exercită diverși factori de mediu asupra proceselor mai sus menționate: concentrația inițială a estrogenilor în apă, încărcarea sedimentului, încărcarea organică totală a apei și distribuția dimensiunilor particulelor de sediment, salinitatea apei.



*1.5.2. Exemple de aplicații ale cromatografiei de lichide pentru identificarea și cuantificarea estrogenilor din probe de apă*

Preocuparea pentru monitorizarea acestor compuși este de dată ceva mai recentă decât în cazul alchilfenolilor. Din acest motiv, precum și din acela al limitelor de detecție mai joase necesar a fi atinse (în condițiile unor matrici naturale complexe), majoritatea metodelor dezvoltate utilizează spectrometrele de masă în procesul de detecție. Dacă mai întâi primele aplicații au fost de tip GC/MS, ulterior au început să câștige în popularitate metodele LC-MS datorită deja cunoscutelor avantaje ale acestei tehnici în raport cu cea gaz-cromatografică: posibilitatea abordării probelor nevolatile și a celor conținând compuși cu mase moleculare ridicate și posibilitatea determinării atât a estrogenilor conjugați cât și a celor liberi fără necesitatea derivatizării sau hidrolizei lor preliminare. Cât privește tipul de interfață al sistemului lichid-cromatografic cu spectrometrul de masă, cel mai utilizat a fost ESI, operat în modul de ionizare negativ [17]. Articolul de sinteză al lui Gomes și colaboratorii [100] reușește să cuprindă diferitele abordări posibile în cazul aplicațiilor cromatografice destinate determinării hormonilor estrogeni din probe de ape, sediment și nămol, oferind un „ghid” util de abordare a diferitelor etape ale procesului analitic (colectarea probelor, extracția și concentrarea, curățirea extractului de interferenții matricei, cuantificarea compușilor țintă) (tabelul I.5.1).

Tabelul I.5.1. Abordările indicate pentru principalele etape ale aplicațiilor cromatografice destinate analizei hormonilor estrogeni din probe de ape, sediment și nămol.

Nr.	Denumirea generică a etapei	Modul de abordare al procedurii de lucru în vederea optimizării procesului analitic
0	1	2
1	Prelevarea și mânăuirea probelor	- Volumul de probă – uzual, 1 ÷ 20 L (funcție de sensibilitatea și selectivitatea urmărite) - Conservarea probelor – uzual, formaldehidă (1% v/v), metanol → pentru probele lichide; stocare la -18°C → pentru probele solide. De obicei, probele de sediment și nămol se supun uscării și omogenizării sau liofilizării înainte de etapa de extracție.

0	1	2
2	Pregătirea probei	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Filtrare – aplicată în cazul probelor lichide; de obicei , se face imediat după colectare. Se pot supune spălării cu solvent (metanol) particulele reținute de filtru în vederea estimării cantității de estrogeni adsorbite pe ele.</li> <li>▪ Extracție – uzual SPE cu cartușe sau discuri, pentru probele de apă; ultrasonicare, cu metanol sau acetonă, pentru probele uscate și congelate.</li> <li>▪ Purificare extract – uzual, nu este necesar a fi aplicată pentru probele apoase datorită complexității mai reduse a matricei; pentru probele de sediment și nămol, se practică în general cromatografia de adsorbție sau SPE.</li> </ul>
3	Cuantificarea	Istoric, primele abordări au fost spectrofotometria în UV și fluorescență. Astăzi, sunt preferate LC/MS și LC/MS/MS. Ca tehnică de ionizare, e preferată ESI în raport cu APCI, în varianta ionizării negative (NI).

Bineînțeles, deși utile, aceste strategii generale de abordare a schemelor analitice pentru identificarea și cuantificarea hormonilor estrogeni din probe naturale prin cromatografie de lichide cuplată cu spectrometria de masă nu reușesc să cuprindă multiplele aspecte ale problemei. Într-un studiu ulterior, Gomes și colaboratorii [101] analizează posibilele influențe ce pot apărea în decursul procesului analitic. De exemplu, în cazul etapei de extracție, îmbogățirea în analiții de interes va conduce inevitabil și la creșterea concentrației în interferenții specifici matricei. Etapa de curățare a matricei va conduce la înlăturarea unei bune părți a acestora dar va conduce și la creșterea riscului de pierdere a unei porțiuni semnificative din analiții țintă (scăderea recuperării). Devine astfel evidentă necesitatea unui compromis eficient între limitele de detecție dorite (reglate prin cantitatea de probă supusă extracției și volumul de extract injectat în sistemul cromatografic) și nivelul interferențelor matricei. Mai

departe, autorii abordează aspecte precum: transformarea (degradarea) analiților de interes în timpul prelevării și pregătirii probelor, efectul de supresiune ionică la nivelul interfeței tip ESI generat de interferenții co-extracși ai matricei, aditivi ai fazei mobile, design-ul interfeței ESI și a spectrometrului de masă, influența originii probei, în special pentru probele de nămol (istoricul probei) dar și principalele moduri de corectare a acestui fenomen (metoda suplimentării cu cantitate de analit cunoscut, metoda calibrării cu standard intern marcat cu izotopi stabili, utilizarea de aditivi adecvați în faza mobilă care să conducă la îmbunătățirea randamentului de ionizare etc.).

Lopez de Alda și colaboratorii au publicat un studiu [11] al aplicațiilor LC-MS și LC-MS-MS extrem de util, care se ocupă cu aplicațiile dezvoltate pentru determinarea cantitativă a hormonilor estrogeni în diverse tipuri de apă. Sunt prezentate limitele de detecție, tipurile de materiale staționare utilizate în etapa de extracție și concentrare prin SPE, coloanele cromatografice, fazele mobile utilizate și tipul de detecție. În tabelul I.5.2. sunt prezentate câteva dintre ele, remarcabile prin nivelul scăzut al limitei de detecție atinse.

Tabel I.5.2. – Aplicații LC-MS și LC-MS-MS, cu extracție prin SPE, pentru determinarea cantitativă a unor hormoni estrogeni din diverse tipuri de apă.

<b>Matricea și analiții determinați</b>	<b>Extracția</b>	<b>Coloana cromatografică și faza mobilă</b>	<b>Sistemul MS și metoda de detecție</b>	<b>Limita de detecție, ng/L</b>
0	1	2	3	4
- Apă de râu - Estronă, estradiol, estriol, etinil estradiol	SPE pe coloane C18	- Purospher STAR RP-18 (55 x 2 mm, 3 μm) - acetonitril / apă	- trapă ionică M-8000, Merck-Hitachi - IS(NI) – MS (SIM)	3,2 – 10,6
- Apă de râu - Estronă, estradiol, estriol, etinil estradiol	SPE pe coloane C18	- Hypersil ODS (100 x 4,6 mm, 3 μm) - 0,1% acid acetic / metanol	- triplu quadrupol SCIEX API 365, Perkin-Elmer - APCI(PI) – MS-MS	1 - 10

0	1	2	3	4
- Efluent de la uzine de tratare a apelor uzate -Estronă, estradiol	SPE (pe LiChrolut EN + C18) + extracție prin imunoafinitate	- Betasil C18 (150 x 2,1 mm, 3 μm) - acetonitril / apă	- Platform LCZ Micromass - ESI (NI) - MS	0,07 – 0,18
- Efluent de la uzine de tratare a apelor uzate + apă de râu - Estronă, estradiol, estriol, etinil estradiol, estriol-3 (β-D-glucuronidă), 17β-estradiol-3 (β-D-glucuronidă)	SPE pe coloane Carbograph-4	- Alltima C18 (250 x 4,6 mm, 5 μm) - acetonitril / apă (cu adiție postcoloană de amoniac)	- triplu quadrupol SCIEX API 2000, Perkin-Elmer - ESI(NI) – MS-MS	0,08 – 0,6

Benijts și colaboratorii [20] demonstrează și ei, prin aplicația dezvoltată și validată, înalta selectivitate a aplicațiilor LC-MS-MS, în special când etapa de pregătire a probei se realizează prin intermediul tehnicii SPE în vederea minimizării interferențelor matricei. Metoda reușește să identifice și să cuantifice, în două treceri cromatografice, un număr de 35 compuși chimici „*endocrine disruptors*”. Coloana cromatografică folosită a fost C18 Luna column (100 x 2 mm, 3 μm, guard column 4 x 2 mm, 3 μm), Phenomenex, iar cartușele polimerice pentru SPE au fost Oasis HLB (6 mL, 200 mg), Waters. Detecția este realizată prin intermediul unui detector cu trapă ionică (1100 LC-MSD Trap VL, Agilent), echipat cu interfață ESI. Pentru hormonii estrogeni a fost abordat modul de lucru în ionizare negativă. Fragmentele monitorizate în varianta de lucru MRM (multiple reactions monitoring) au fost:

- estriol -  $m/z = 145, 159$  și  $171$  ( $m/z$  pentru fragmentul „părinte” – 287)
- estradiol -  $m/z = 145, 158, 183, 225, 251$  și  $253$  ( $m/z$  pentru fragmentul „părinte” – 271)
- estradiol- $d_2$  (standard intern deuterat) -  $m/z = 145$  și  $185$  ( $m/z$  pentru fragmentul „părinte” – 273)
- $17\alpha$ -etinil estradiol -  $m/z = 185$  și  $267$  ( $m/z$  pentru fragmentul „părinte” – 295)
- $17\alpha$ -etinil estradiol- $d_4$  -  $m/z = 269$  ( $m/z$  pentru fragmentul „părinte” – 299)

- estrone -  $m/z = 145, 159, 183, 225, 251$  și  $253$  ( $m/z$  pentru fragmentul „părinte” – 269)
- estrone- $d_4$  -  $m/z = 147$  și  $187$  ( $m/z$  pentru fragmentul „părinte” – 273)

Unii din parametri de performanță ai acestei aplicații, *justețea* (estimată prin nivelul recuperării) și *fidelitatea* (exprimată prin deviația standard relativă), sunt prezentați în tabelul 1.5.3. Toate experimentele de validare a metodei au fost conduse pe probe blanc de apă de suprafață suplimentate cu cantități cunoscute de analiți de interes.

Tabel 1.5.3. – *Justețea și fidelitatea*, pentru 3 nivele de concentrație (10, 40 și 400 ng/L), atinse pentru determinarea unor hormoni estrogeni din probe de apă prin metoda dezvoltată de Benjits și colaboratorii [20].

Analitul	Recuperarea, %			RSD, %					
	(n = 5)			Fidelitatea intra-șarjă (n = 5)			Fidelitatea inter-șarje (n = 20)		
	10 ng/L	40 ng/L	400 ng/L	10 ng/L	40 ng/L	400 ng/L	10 ng/L	40 ng/L	400 ng/L
estriol	83,7	87,5	856,5	12,8	8,6	5,3	18,7	14,6	9,6
estradiol	95,6	97,1	99,2	10,0	7,5	5,6	16,0	8,1	6,8
17 $\alpha$ - etinil estradiol	89,5	95,5	96,1	7,9	4,1	3,9	13,3	7,7	7,2
estronă	99,5	97,3	98,7	8,9	6,9	4,6	14,5	8,6	10,5

Din datele de literatură prezentate mai sus, varianta detecției MS/MS reprezintă „favorita” aplicațiilor lichid-cromatografice dezvoltate pentru identificarea și cuantificarea hormonilor estrogeni în diversele tipuri de probe naturale. Limitările implementării în monitorizarea de rutină a afluenților și efluenților uzinelor ce tratează apele uzate orășenești sunt încă, la ora actuală, generate de costul prohibit al echipamentelor MS ce oferă facilitatea achiziționării în timp real a spectrelor  $MS^2$  și  $MS^n$ : spectrometrele de masă cu trapă ionică și cele cu triplu quadrupol. Și între aceste două tipuri de echipamente există deosebiri esențiale. Astfel, construcția și design-ul spectrometrelor cu trapă ionică conduc la prețuri ce sunt aproximativ la jumătatea celor cu triplu quadrupol. În schimb, acestea din urmă prezintă avantajele unei acurateți sporite de măsurare a masei fragmentelor ionice ( $m/z$ ) și a vitezei superioare de

achiziționare a datelor pentru modul de lucru SRM. Spre exemplificare, sunt prezentate trei aplicații ce utilizează ambele tipuri de instrumente.

Ingrand și colaboratorii au publicat o comunicare [21] referitoare la determinarea estronei, 17 $\beta$ -estradiolului și etinilestradiolului din efluenții uzinelor de tratare a apele uzate. Instrumentația MS de detecție și cuantificare a analiților de interes e constituită de spectrometrul de masă cu trapă ionică LCQ - ThermoFinnigan. Cele mai bune rezultate au fost obținute cu interfața tip ESI, modul NI. Performanțele analitice ale metodei (recuperarea, repetabilitatea și limita de detecție), estimate pe probe de apă minerală Evian, sunt prezentate în tabelul I.5.4.

Tabel I.5.4. – Limita de detecție, recuperarea și repetabilitatea estimate pe probe de apă minerală Evian pentru 3 hormoni estrogeni, pentru aplicația LC-ESI-trapă ionică MS/MS a lui Ingrand și colaboratorii [21].

Analitul	Limita de detecție, ng/L (cantitate injectată în coloana cromatografică)	Recuperare, % (n = 5)	RSD, % (n = 5)
17 $\beta$ -estradiol	2 (500 pg)	91	15
17 $\alpha$ -etinilestradiol	2 (500 pg)	87	23
Estronă	1 (250 pg)	97	11

La transferul aplicației însă pe probe reale de apă colectată din efluenți ai uzinelor de tratate a apelor uzate, suplimentate cu analiții țintă la nivele de concentrație de 10 și 20 ng/L, performanțele metodei prin aplicarea calibrării cu standard extern se deteriorează semnificativ. Prin urmare, metoda calibrării cu standard intern marcat izotopic devine indispensabilă (vezi tabelul I.5.5). Din păcate, pentru atingerea limitelor de detecție urmărite, autorii apelează la o etapă de pregătire a probei foarte complexă care include extracție în fază solidă pe cartușe C18 (cu utilizarea unor amestecuri binare de solvenți organici pentru eluția analiților de interes), extracție lichid-lichid pentru îndepărtarea interferențelor hidrofili (de tipul compușilor humici), deshidratarea prin trecerea peste sulfat de sodiu anhidru și purificarea finală a extractului organic, înainte de introducerea în sistemul LC-MS, prin extracție în fază solidă pe cartușe umplute cu Florisil.

Tabel 1.5.5. – Comparație între recuperările celor 3 hormoni estrogeni din probe de apă prelevate din efluenți ai uzinelor de tratare a apelor uzate, suplimentate cu analiții țintă la nivele de concentrație de 10 și 20 ng/L, estimate prin metoda etalonării externe respectiv prin cea cu standard intern [21].

Nivel concentrație suplimentată, ng/L	Etalonare externă			Etalonare internă		
	17β- estradiol	17α- etinilestradiol	estronă	17β- estradiol	17α- etinilestradiol	estronă
10	Nd	nd	60	100	94	99
20	Nd	nd	50	95	75	75

Legendă – nd = nedetectat

Herry și colaboratorii [18] au publicat o variantă a aplicației lui Ingrand, transferată pe un sistem LC-MS cu triplu-quadrupol (Quantum Thermo Electron). Utilizarea acestui tip de spectrometru de masă a permis atingerea unor limite de detecție și cuantificare mai scăzute în raport cu aplicația inițială care a utilizat trapa ionică:

- pentru estradiol și estronă
  - 0,2 ng/L – pentru probe de efluenți ai uzinelor de tratare a apelor uzate
  - 0,4 ng/L - pentru probe de afluenți ai uzinelor de tratare a apelor uzate
- pentru etinilestradiol
  - 0,4 ng/L – pentru probe de efluenți ai uzinelor de tratare a apelor uzate
  - 0,8 ng/L - pentru probe de afluenți ai uzinelor de tratare a apelor uzate

Deși din etapa de pregătire a probei a putut fi eliminată faza de extracție lichid-lichid, metoda rămâne însă, din păcate, destul de complicată.

Lagana și colaboratorii [19] prezintă o aplicație extrem de bine optimizată din toate punctele de vedere. În primul rând, ei reușesc să simplifice mult etapa de pregătire a probei (fiind eliminate fazele de extracție lichid-lichid și cele de purificare a extractului prin SPE pe cartușe de Florisil). Autorii au ales să testeze eficiența umpluturilor pe bază de cărbune grafitizat respectiv a celor pe bază de copolimer polistiren-divinilbenzen-N-vinilpirolidonă; eficiențele lor au fost aproximativ similare. În al doilea rând, autorii optimizează foarte bine condițiile instrumentale de lucru ale spectrometrului de masă utilizat în detecție, triplu-quadrupolul API 365 de la PE-Sciex (Concord, Canada). Interfața de tip ESI și modul de lucru NI s-au dovedit

cele mai eficiente în cazul estrogenilor aleși în raport cu interfața tip APCI. Pentru îmbunătățirea răspunsului global al analiților de interes, este practică adăugarea unei soluții amoniacale 50 mM, procedeu ce contribuie la eficientizarea deprotonării grupelor fenolice în interfața ESI. Bineînțeles, modul de scanare MRM a fost ales pentru identificare și cuantificare, cu monitorizarea următoarelor fragmente ionice:

- pentru estronă –  $m/z = 145$
- pentru  $17\beta$ -estradiol -  $m/z = 145$  și  $183$
- pentru  $17\alpha$ -etinilestradiol -  $m/z = 145, 159$  și  $199$ .

Performanțele atinse sunt remarcabile, în special în ceea ce privește valorile repetabilităților și recuperărilor; ele sunt prezentate în tabelul I.5.6.

Tabel I.5.6. Performanțele metodei dezvoltate de Lagana și colaboratorii, estimate pe 3 tipuri de matrici reprezentative pentru apă (afluenți ai uzinelor de tratare a apelor uzate, efluenți ai uzinelor de tratare a apelor uzate și apă de râu) [19].

Analit	Afluent			Efluent			Apă de râu		
	Recuperare, %	RSD <sub>5</sub> , %	LOD, ng/L	Recuperare, %	RSD <sub>5</sub> , %	LOD, ng/L	Recuperare, %	RSD <sub>5</sub> , %	LOD, ng/L
E1	95	6	1,2	89	5	0,8	99	4	0,1
E2	95	8	1,9	95	4	0,8	96	6	0,2
E3	91	1	7,0	92	6	0,5	97	7	0,3
EE2	96	6	1,6	96	8	1,1	100	3	0,4

Legendă: LOD – limită de detecție, RSD<sub>5</sub> – deviație standard relativă pentru 5 măsurări independente din aceeași șarjă analitică..

E1 – estronă, E2 –  $17\beta$ -estradiol, E3 – estriol, EE2 -  $17\alpha$ -etinilestradiol.

Note: recuperările au fost estimate pe probele de apă suplimentate înaintea procesării cu analiții de interes. Cuantificarea s-a făcut în raport cu standarde interne și s-au efectuat corecții în raport cu probele de blank (s-au scăzut cromatogramele acestora din cromatogramele analiților de interes).

După cum s-a menționat la începutul subcapitolului, aplicațiile GC-MS au fost destul de mult utilizate pentru determinarea hormonilor estrogeni din probe de apă, în special în perioada în care aplicațiile LC-MS întâmpinau probleme legate de dezvoltarea insuficientă a interfețelor dintre sistemul cromatografic și spectrometrul de masă. Se mai dezvoltă și publică încă



aplicații GC-MS datorită avantajelor recunoscute ale acestei tehnici (eficiența sporită a separărilor). Pot fi astfel menționate doar câteva:

- metoda dezvoltată de Xiao-Yao și colaboratorii [102] pentru analiza probelor de apă de râu și efluenți ai uzinelor de tratare a apelor uzate - SPE pe discuri de extracție polimerice SDB-XC, urmată de derivatizarea analiților de interes sub formă de esteri cu clorură de pentafluorobenzoil și, în final, injecția în sistemul GC-single-quadrupol MS (ionizare chimică negativă, modul de lucru SIM, cuantificare pe baza ionilor moleculari negativi)
- metoda dezvoltată de Nakamura și colaboratorii [103] pentru analiza probelor de apă de râu – SPE pe cartușe C18, urmată de derivatizarea secvențială a analiților de interes – mai întâi a grupelor hidroxilice fenolice cu bromură de pentafluorobenzil apoi a grupelor hidroxilice alifactice sub formă de derivați ai trimetilsililimidazolului, și, în final, injecția în sistemul GC-single-quadrupol MS (ionizare chimică negativă, modul de lucru SIM, cuantificare pe baza fragmentelor ionice [M-PFB]).

În ambele cazuri performanțele metodelor sunt satisfăcătoare, cu limite de detecție ajungând în zona unităților de ng/L (chiar sub 1 ng/L în cazul celei de-a doua). Principalul dezavantaj rămâne acela al etapei de derivatizare relativ complicate. Este adevărat că există prezentate în literatură și aplicații LC-MS în care autorii apelează la derivatizare în vederea intensificării semnalului analiților de interes. Astfel, Higashi și colaboratorii [104] folosesc 2-hidrazin-1-metilpiridina drept reactiv de derivatizare pentru eficientizarea ionizării în interfața ESI pentru hormonii steroidici neutri cum ar fi testosteronul. În cazul hormonilor estrogeni însă, datorită ușurinței cu care formează ioni negativi în interfața ESI, nu este necesară aplicarea derivatizării astfel că nu sunt descrise în literatură acest tip de aplicații.

Aplicațiile gaz-cromatografice nu fac obiectul tezei de față astfel încât nu vor fi prezentate. Articolul de sinteză al lui Giese [105] reprezintă o sursă bibliografică utilă în ceea ce privește aplicațiile gaz-cromatografice (pe lângă cele lichid-cromatografice) dezvoltate pentru determinarea hormonilor estrogeni.

## Capitol I.6. Validarea și estimarea incertitudinii de măsurare a metodelor analitice bazate pe tehnica HPLC

### I.6.1. Validare – definiții, necesitate, abordări de lucru

Practica îndelungată a utilizării metodelor de analiză în laboratoarele de chimie a condus la stabilirea a 6 principii generale care, prin aplicarea lor, conduc la așa-zisa „buna practică de laborator” (GLP):

- Încercările (măsurările) analitice trebuie conduse astfel încât să satisfacă anumite cerințe agreate (obiective clar definite înaintea aplicării lor efective).
- Încercările (măsurările) analitice trebuie executate folosindu-se metode și echipamente care au fost testate în vederea adecvării lor la scopul urmărit.
- Personalul de laborator care efectuează măsurările analitice trebuie să fie calificat și competent să execute respectivele sarcini și să poată demonstra că pot executa corespunzător analiza în cauză).
- Trebuie să existe un mod de evaluare, regulat și independent de laborator, a performanțelor tehnice ale acestuia.
- Măsurările analitice executate într-un anumit laborator trebuie să fie în acord cu cele executate în orice alt laborator.
- Organizațiile (laboratoarele) care execută încercări (măsurări) analitice trebuie să posede proceduri de control și asigurare a calității bine definite.

Practic, validarea metodelor analitice urmărește tocmai punerea în aplicare a celui de-al 2-lea principiu: adecvarea metodei la scopul urmărit (așa-zisul „*fit for purpose*”) [106].

Sunt necesare metode analitice de încredere pentru a putea îndeplini cerințele naționale și internaționale în ceea ce privește toate tipurile de analize. Laboratoarele trebuie să ia măsurile adecvate și să demonstreze că sunt capabile să furnizeze datele de calitate cerută. Principial, aceste măsuri sunt [107]:

- ❖ utilizarea de metode validate
- ❖ utilizarea de proceduri de control intern al calității
- ❖ participarea în scheme de intercomparare
- ❖ acreditarea în raport cu un standard internațional, uzual ISO CEI 17025.

Dacă este să prezentăm o definiție formală a **validării**, standardul ISO 8402:1994 o definește drept „*confirmarea prin examinare și furnizare de dovezi obiective că sunt împlinite toate cerințele particulare pentru un anumit scop bine definit*” [108]. Trebuie menționat că la ora actuală termenul **validare** a fost inclus în cadrul mai multor noțiuni din domeniul chimiei analitice. Astfel, se vorbește astăzi despre „*validarea instrumentului*”, „*validarea metodei*” etc. **Validarea metodei** poate fi definită drept procesul de stabilire a caracteristicilor de performanță și limitările unei metode precum și de identificare a influențelor care pot modifica aceste caracteristici precum și gradul în care o fac. O altă definiție a **validării metodei** o consideră drept procesul prin care se verifică faptul că ea este adecvată scopului urmărit (rezolvarea unei probleme analitice specifice). Depășind aspectul formal al definițiilor, validarea metodelor analitice este, în mod inevitabil, un proces costisitor în ceea ce privește fondurile de personal, timp și bani alocate. Din acest motiv, stabilirea profunzimii studiului de validare și, implicit, abordarea efectivă de lucru trebuie cântărită cu atenție. Astfel, unii din parametri de performanță ai metodei se pot dovedi neglijabili în raport cu scopul urmărit, unii din parametri au fost analizați anterior în timpul etapei de dezvoltare a metodei, unele tipuri de experimente (alese rațional) pot oferi simultan informații despre mai mulți parametri ai metodei etc. Este foarte util prin urmare să se țină cont de legătura naturală dintre etapele de dezvoltare și de validare a metodei analitice, să se realizeze interconectarea lor cât mai strânsă [106].

Legislația europeană actuală solicită ca metodele analitice standardizate să fie complet validate (“*fully validated*”). Aceasta noțiune presupune examinarea caracteristicilor metodei în cadrul unui studiu colaborativ interlaboratoare, studii pentru care au fost dezvoltate diverse protocoale și ghiduri internaționale. Există însă situații în care acest tip de studii nu sunt practice fie nu sunt necesare. De aceea, au fost dezvoltate și ghiduri pentru validarea unor metode de analiză în cadrul studiilor desfășurate într-un singur laborator. Acest tip de studii sunt indicate în următoarele situații:

- ❖ Testarea viabilității metodei înaintea unui costisitor studiu colaborativ interlaboratoare
- ❖ Demonstrarea faptului că o metodă analitică este de încredere atunci când nu există rezultate ale unui studiu interlaboratoare sau când desfășurarea acestuia nu este practică.

- ❖ Testarea faptului că metodele validate consacrate, “de raft”, sunt utilizate adecvat [107].

### *1.6.2. Parametri de performanță studiați în cadrul studiului de validare a metodelor analitice*

Parametri (caracteristicile) de performanță care trebuie estimați în cadrul validării unei metode analitice sunt :

1. *Aplicabilitatea* – documentația generată în urma studiului de validare trebuie să furnizeze informații clare despre :

- Identitatea analiților de interes, inclusiv specia acolo unde este cazul (de ex., „arsen total”, „azot total”, „azot anorganic”, „nitrat” etc.)
- Domeniul de concentrație acoperit de studiul de validare (de ex., „1–200 ppb”)
- Domeniul de matrici acoperite de studiul de validare (de ex., „fructe de mare”, „apă de băut” etc.)
- Protocolul de lucru, incluzând echipamentele, reactivii, limitele permise de variație pentru diverși parametri, etalonarea metodei, procedurile de control a calității
- Scopul în care se aplică metoda (de ex., „monitorizarea apei potabile”) și limitările (restricțiile) privind incertitudinea de măsurare (de ex., „incertitudinea standard  $u(c)$  la nivelul de concentrație  $c_i$  trebuie să nu depășească valoarea  $0,1 \times c_i$ ”)

2. *Selectivitatea* – reprezintă gradul în care metoda analitică este capabilă să cuantifice analitul, cu acuratețe, în prezența interferențelor. Firește, deoarece nu pot fi testate practic efectele tuturor interferențelor posibile, se vor testa experimental interferenții cei mai probabil a produce semnal. În cazul multor tipuri de analize, selectivitatea este un parametru calitativ. În cazul altora, așa cum este cazul metodelor HPLC, ea poate cuantificată prin intermediul unui indice de selectivitate care reprezintă raportul dintre pantele funcției (curbei) de etalonare în absența respectiv prezența interferențelor testat. Experimental, se supun întregii proceduri de lucru o probă de *blanc* (matrice fără interferența studiat) și una din același *blanc* suplimentat cu interferența în cauză. Este de remarcat faptul că efectul interferențelor nu trebuie confundat cu efectul de matrice.

3. *Etalonarea și liniaritatea* – în general, cu excepția cazurilor erorilor grosolane de preparare a materialelor (soluțiilor) pentru etalonare, erorile datorate etalonării au o contribuție minoră

în bugetul total al incertitudinii de măsurare și pot fi incluse în categoriile principale de tipul bias-ului run-ului cromatografic (în cazul erorilor randomizate) sau bias-ului laboratorului (în cazul erorilor sistematice).

- *liniaritatea și interceptia* – uzual, coeficientul de regresie  $r^2$  este foarte mult utilizat drept unic criteriu al adecvării modelului regresiei liniare pentru etalonarea metodei. Cu toate acestea el nu este potrivit acestui scop și se recomandă a nu fi utilizat. Mult mai potrivită este inspecția dependenței grafice a valorilor reziduale (diferențele între valorile estimate de funcția liniară aleasă și cele utilizate de regresia liniară în obținerea aceste funcții ecuații de etalonare) în raport cu concentrația. Orice tendință („*trend*”) observată în această dependență indică o inadecvare a regresiei utilizate, fenomen denumit *heteroscedasticitatea* datelor. Uzual, se apelează la ponderarea regresiei, adică acordarea de ponderi diferite a semnalului analitic în modelul regresiei liniare funcție de concentrație. În general, se utilizează coeficienții de ponderare  $1/x$ ,  $1/y$ ,  $1/x^2$ ,  $1/y^2$ ,  $1/s$  și  $1/s^2$  ( $y = ax + b \rightarrow$  ecuația curbei de etalonare,  $s =$  deviația standard).
- *testarea efectului general al matricei* – în cazul în care se apelează la strategia etalonării cu soluții standard simple de analit, în solvent organic sau fază mobilă (uzual aplicată în majoritatea metodelor HPLC), efectul matricei în etalonarea metodei nu se manifestă evident. În cazul în care se folosește etalonarea cu soluții ale analitului de interes derivate din materialul tipic de analizat (proba, matricea), se apelează la metoda „adițiilor de standard”. Comparația între pantele dreptelor de etalonare cu și fără adaos de analit, realizată prin unul din testele de diferență statistic semnificativă, confirmă sau infirmă existența unui efect general al matricei asupra etalonării metodei.

4. *Fidelitatea* – reprezintă nivelul (gradul) de apropiere dintre valoarea măsurării și valoarea de referință acceptată a măsurandului. Cantitativ, fidelitatea se exprimă prin așa-zisul „*bias*”. În cazul metodelor cromatografice, bias-ul se estimează prin determinarea nivelului recuperării analitului de interes din matricea în care se află [107]. Ideal, experimentele trebuie conduse pe materiale de referință certificate (MRC). Avantajul principal al acestora este faptul că ele sunt trasabile la standardele internaționale prin intermediul certificatului care le însoțește, act care certifică valoarea uneia sau mai multor caracteristici (concentrația sau puritatea în cazul metodelor din chimia analitică) cu o valoare determinată a incertitudinii

(incluzând nivelul de încredere al acesteia) [109]. Foarte importantă este alegerea judicioasă a tipului de MRC, atât în ceea ce privește nivelul de concentrație cât și matricea. Ele trebuie să fie cât mai apropiate de cele care vor fi apoi întâlnite regulat în analiza probelor reale prin intermediul metodei care se validează. În cazul indisponibilității MRC-urilor, se pot utiliza fie diverse materiale de referință care nu sunt certificate, fie o metodă de referință deja validată, fie metoda suplimentării („*spiking*”) matricilor disponibile cu cantități cunoscute din analitul de interes. Din păcate, dezavantajul principal al acestei ultime metode (la care se apelează frecvent datorită comodității și costului redus) constă în imposibilitatea estimării reale a recuperării analitului din probele reale, deoarece acolo el nu este liber ci, în general, este implicat în diverse tipuri de legături și interacțiuni cu componentele matricei [107].

5. *Precizia (justețea)* - reprezintă nivelul (gradul) de concordanță dintre rezultatele măsurătorilor independente obținute în condiții clar precizate. Precizia depinde doar de distribuția erorilor întâmplătoare (randomizate) și nu este legată în vreun fel de valoarea adevărată sau altă valoare specificată. Cele două mărimi folosite cel mai frecvent pentru estimarea cantitativă a preciziei sunt *repetabilitatea* și *reproductibilitatea*. Ele reprezintă, în fapt, cele două valori extreme ale preciziei care pot fi atinse. Astfel, *repetabilitatea* (valoarea „mică” a preciziei) oferă o estimare a variabilității care este de așteptat în cazul aplicării efective a metodei pe un singur echipament, de către un singur operator, într-un interval relativ scurt de timp (uzual, în timpul unei șarje analitice sau a unei zile de lucru). *Reproductibilitatea* (valoarea „mare” a preciziei) și, în accepțiunea formală corectă, reflectă variabilitatea metodei atunci când ea este aplicată în mai multe laboratoare (prin urmare, pe mai multe echipamente, de către mai mulți operatori, pe un interval de timp mai extins). Practic, se mai pot estima diverse nivele ale reproductibilității în cadrul aceluiași laborator: metoda aplicată pe mai multe echipamente similare de către un singur operator, cea aplicată pe un singur echipament de către mai mulți operatori, cea aplicată pe un singur echipament și de către un singur operator într-un interval de timp mai îndelungat (mai multe șarje analitice/zile de lucru). Matematic, în toate cazurile se calculează deviațiile standard ale rezultatelor măsurărilor luate în studiu. Cum în cazul majorității metodelor din chimia analitică, repetabilitatea și reproductibilitatea depind de nivelul de concentrație, se preferă exprimarea preciziei în forma deviației standard relative. În final, se mai pot calcula „*limita repetabilității*” respectiv „*limita reproductibilității*”,

mărimi care permit analistului să estimeze dacă diferențele obținute în cazul analizei în duplicat sunt statistic diferite:

$$r = t_{\infty} \times \sqrt{2} \times s_r \quad (2)$$

$$R = t_{\infty} \times \sqrt{2} \times s_R \quad (3)$$

unde  $t_{\infty}$  - coeficientul Student „*two-tailed*” pentru un anumit nivel de încredere (uzual,  $t = 1,96$  pentru nivelul de încredere 95%)

$s_r, s_R$  - deviațiile standard măsurate în condiții de repetabilitate respectiv reproductibilitate strânsă [106]

În cazul în care nu se poate determina experimental deviația standard a reproductibilității, se poate apela la modelul empiric cunoscut sub numele de „trompeta lui Horwitz” [110]. Relația matematică stabilită de acesta pe baza rezultatelor a mii de teste colaborative interlaboratoare (majoritatea din domeniul analizei de alimente) prezice deviația standard a reproductibilității ca funcție de concentrația analitului de interes:

$$s_H = 0,02 \times c^{0,8495} \quad (4)$$

unde  $s_H$  - deviația standard prezisă a reproductibilității, exprimată ca fracție masică  
 $c$  - concentrația analitului de interes, exprimată ca fracție masică (de ex. ppm, ppb)

6. *Domeniul* – reprezintă intervalul de concentrații în care metoda poate fi privită ca fiind validată. Trebuie menționat că nu este obligatoriu ca întreg domeniul în care calibrarea funcționează (este valabilă dependența matematică stabilită) să fie validat. În fapt, sunt relativ numeroase cazurile în care studiul de validare acoperă un domeniu de concentrații mai redus. În practică, se obișnuiește desfășurarea experimentelor la doar câteva nivele de concentrații, (de obicei 3), cum ar fi unul la limita de jos a intervalului considerat, altul la limita de sus iar cel de-al treilea la aproximativ la mijlocul intervalului. Se poate astfel extrapola validitatea studiului la toate valorile din domeniul în cauză. Precauții speciale în ceea ce privește extrapolarea trebuie luate în cazul valorilor din imediata apropiere a limitei de detecție sau a concentrației „zero” [107].

7. *Limita de detecție* – deși, la prima vedere, problema acestui parametru poate părea relativ simplă, în literatura de specialitate au existat și mai există încă abordări și definiții diverse, uneori contradictorii. Conform AOAC, limita de detecție reprezintă „cel mai scăzut conținut de analit care poate fi măsurat cu o certitudine (încredere) statistică rezonabilă”. IUPAC

consideră „limita de detecție, exprimată ca și concentrația  $c_L$  sau cantitatea  $q_L$ , ca derivând de la cea mai mică măsurare  $x_L$  care poate fi detectată cu o încredere rezonabilă”.  $x_L$  este dată de ecuația:

$$x_L = x_{bl} + k \times s_{bl} \quad (5)$$

unde  $x_{bl}$  – media aritmetică a măsurărilor blanc-ului

$s_{bl}$  – deviația standard a măsurărilor blanc-ului

$k$  – factor numeric ales funcție de nivelul de încredere dorit

Uzual, în practica validării majorității metodelor analitice (inclusiv a celor cromatografice), se folosește criteriul „blanc + 3 $\sigma$ ” ( $s$  – deviația standard a măsurărilor blanc-ului). Trebuie menționat faptul că limita de detecție este dependentă de matrice prin faptul că atât media aritmetică cât și deviația standard a măsurărilor blanc-ului depind de tipul matricei. În cazul aplicațiilor cromatografice, blanc-ul poate să producă sau nu semnal, adică pic cromatografic. În nici un caz nu se poate estima limita de detecție a metodei analitice pe baza multiplicării limitei de detecție instrumentale (determinate cu ajutorul soluțiilor standard de analit) cu factorul calculat de concentrare al analitului în urma etapei de pregătire a probei tocmai pentru că nu este luat în considerare efectul matricei probelor reale [106]. În final, trebuie totuși menționat că toate aceste criterii statistice de definiție a limitei de detecție pleacă de la premisa distribuției normale a măsurărilor în zona concentrațiilor joase de analit, premisă oarecum discutabilă [107].

8. *Limita de cuantificare* – ca definiție, ea reprezintă cea mai mică concentrație de analit care poate fi determinată cu nivele acceptabile ale preciziei și fidelității. Practic însă nu există un criteriu unic de definiție a acestor nivele. Astfel, pentru stabilirea limitei de cuantificare (definită uneori și ca „limita de determinare”) se multiplică deviația standard a măsurărilor probelor de blanc cu factorii 5, 6 sau 10. Trebuie deci menționat că acest parametru este, până la urmă, unul strict convențional și nu implică nicidecum faptul că rezultatele obținute sub limita de cuantificare sunt incorecte, neverosimile sau lipsite de informație utilă [106].

9. *Sensibilitatea* – reprezintă gradientul funcției de etalonare aleasă. Prin urmare, în cazul dependențelor liniare (cum e cazul majorității metodelor cromatografice) ea este dată de panta dreptei de etalonare. Un alt termen mult utilizat în cadrul aplicațiilor cromatografice pentru sensibilitate este „factorul de răspuns”.



10. *Robustețea* – reprezintă rezistența la schimbare a unei metode analitice atunci când sunt aplicate mici modificări (deviații) în condițiile experimentale de lucru în raport cu prevederile din protocolul metodei. Limitele de variație permise ale diversilor parametri ar trebui astfel prevăzute în protocolul metodei ca rezultat al secțiunii studiului de robustețe din cadrul validării metodei. Posibili parametri ai căror variație este testată pot fi extrem de diverși și sunt specifici fiecărei metode (pH, temperatura unei reacții, timpul de finalizare a unei reacții, debite de gaze, timp de extracție lichid-lichid, viteze de centrifugare etc).

11. *Variațiile în matricea probei* – reprezintă unul din factorii care poate influența semnificativ metoda analitică dar, din păcate, destul de greu de estimat și cuantificat. Oricum, cea mai corectă abordare o reprezintă specificarea clară, fără ambiguități, a tipului sau tipurilor de matrice luate în studiu și, astfel, validate [107].

### *1.6.3. Incertitudinea de măsurare - definiții, necesitate, abordări de lucru*

Standardul SR EN ISO CEI 17025 prevede ca toate metodele analitice care se doresc a fi acreditate să aibă estimată incertitudinea de măsurare [111]. Ca definiție, incertitudinea de măsurare reprezintă „un parametru asociat rezultatului unei măsurări care caracterizează dispersia valorilor ce pot fi în mod rezonabil atribuite măsurandului” [112]. Sursele ce pot contribui la incertitudinea de măsurare pot fi foarte numeroase incluzând, printre altele: modul de prelevare și stocare a probelor, efectele componentilor matricei, condițiile de mediu, efectele instrumentelor (limitele acurateții unei balanțe analitice, termostatul unui echipament care menține temperatura la o valoare medie diferită de cea indicată), toleranțele (erorile) de măsurare asociate sticlăriei volumetrice utilizate, aproximările și ipotezele incorporate în modul de lucru al metodei (de exemplu, stoechiometria reacțiilor ce au loc, eventualele reacții incomplete sau secundare ale analiților de interes), efectele datorate modului de calcul (adecvarea modelului de etalonare utilizat – liniar, pătratic etc., aplicarea sau nu a ponderării la estimarea regresiei etc.), efectele de operator (de exemplu, abilitățile diferite în citirea unei scale), efectele inevitabilelor variații aleatorii (randomizate). Sintetizarea tuturor surselor posibil a fi depistate (așa-zisul „buget de incertitudine”) se poate face sub mai multe forme. (tabele, diagrame cauză-efect etc.).

În ceea ce privește cuantificarea incertitudinii de măsurare, cele două abordări de bază sunt:

- evaluarea incertitudinilor individuale, corespunzătoare fiecărei surse luate în considerare, și apoi combinarea lor
- determinarea directă a contribuțiilor, la incertitudinea totală combinată, corespunzătoare tuturor sau doar unora din sursele posibile pe baza datelor ce cuantifică performanțele metodei analitice.

Prima abordare este mai degrabă folosită pentru estimarea incertitudinii de măsurare în cazul aplicațiilor simple: stabilirea titrului unor soluții acido-bazice, stabilirea acidității prin titrări acido-bazice, prepararea unor soluții folosite la etalonări etc. Este evidentă dificultatea punerii în practică a acestei prime abordări în cazul aplicațiilor analitice complexe, bazate pe tehnici precum sunt cromatografia de gaze și lichide. În plus, ordinele de mărime ale incertitudinilor datorate repetabilității diferitelor operații precum și a celei datorate recuperării în urma procesului de extracție sunt semnificativ mai mari decât cele asociate unor factori precum calibrarea, liniaritatea, rezoluția balanței analitice, variația de temperatură la măsurarea volumului cu sticlăria volumetrică, calibrarea detectorului UV etc., astfel că cea de-a doua variantă devine opțiunea de ales. Se poate ușor constata ușor importanța unora din datele și informațiile colectate în timpul studiilor de validare a metodei: influența inhomogenității probei, repetabilitatea, reproductibilitatea, biasul (recuperarea), robustețea [113]. Au apărut astfel în literatură ghiduri extrem de bine elaborate, dedicate special estimării incertitudinii de măsurare pe baza datelor de validare. Ele prezintă modul în care, pe baza celor două tipuri principale de experimente desfășurate în cadrul validării metodei, *studiul fidelității și studiul exactității*, se acoperă principalele surse de incertitudine. Ulterior, acele surse care nu sunt în mod adecvat acoperite, vor fi în final evaluate separat. În momentul planificării studiilor de validare, trebuie avut în vedere ca acestea să fie reprezentative pentru aplicabilitatea normală a metodei. Prin urmare, studiile trebuie să acopere întreaga metodă, să verifice un domeniu reprezentativ al matricilor posibile și să testeze un domeniu semnificativ al concentrațiilor analiților de interes.

## II. CONTRIBUȚII PROPRII

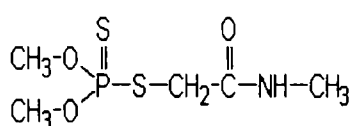
## Capitol II.1. Studii de optimizare a separării lichid-cromatografice pentru unele grupuri de pesticide cu hidrofobicități variate

În cadrul acestui capitol, comportarea cromatografică a pesticidelor studiate s-a realizat pe grupuri împărțite convențional pe baza valorii  $\log P$ . Astfel, pesticidele cu valori  $\log P < 2$  au fost considerate „cu hidrofobicitate scăzută”, cele cu  $2 < \log P < 5$  au fost cu „hidrofobicitate medie” iar cele cu  $\log P > 5$  au fost considerate pesticide „puternic hidrofobe”.

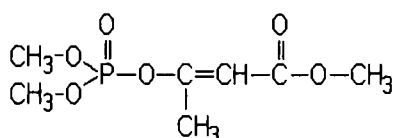
*II.1.1. Studiu de optimizare a separării RP-HPLC a unor insecticide cu hidrofobicitate scăzută prin eluție izocratică [114]*

Structurile chimice ale insecticidelor supuse studiului sunt prezentate în figura II.1.1.

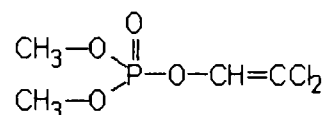
### Insecticide organofosforice



cygon (dimetoat)

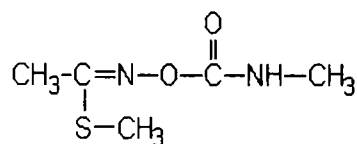


phosdrin (mevinfos)

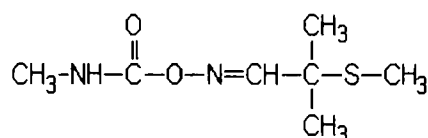


DDVP (diclorfos)

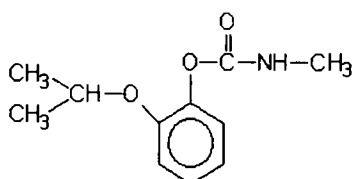
### Insecticide carbamice



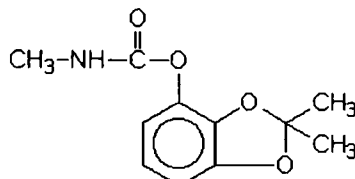
metomil



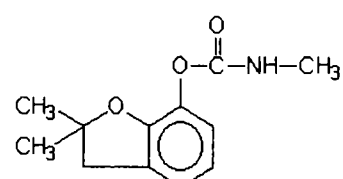
temik (aldicarb)



baygon (propraxur)



bendiocarb



carbofuran

Fig. II.1.1. Insecticidele cu hidrofobicitate medie și scăzută luate în studiu.

Pentru cei 8 analiți studiați, valorile logP, din baze de date experimentale [16], sunt:

- Phosdrin – 0,13
- Metomil – 0,60
- Cygon – 0,78
- Temik - 1,13
- DDVP - 1,47
- Baygon - 1,52
- Bendiocarb - 1,70
- Carbofuran - 2,32

## MATERIALE ȘI METODE

*Reactivi.* Toți reactivii chimici, inclusiv standardele de insecticide (Supelco), metanolul și acetonitrilul (Merck) folosiți pentru prepararea fazei mobile au fost de puritate HPLC. S-a folosit doar apă proaspăt bidistalată.

*Soluțiile standard de insecticide.* Standardele au fost dizolvate în metanol sau clorură de metilen (în funcție de solubilitatea lor) și diluate corespunzător cu faza mobilă. Înainte de injectare, soluțiile au fost filtrate pe filtre Millipore de 0,2  $\mu\text{m}$ .

*Sistemul HPLC.* Echipamentul HPLC a fost compus din următoarele module: pompa HPLC modul tip 126 Beckman, detector UV modul tip 166 Beckman, ambele conectate la un calculator tip IBM Pentium II și controlate prin software-ul *Gold<sup>TM</sup> Nouveau*. Detecția s-a realizat la 215 nm. Probele au fost injectate cu un autosampler tip *Prostar 430 Varian* și controlat cu software-ul *Star Chromatography Workstation, ver. 5.50, Varian*.

*Experimentele* - au fost realizate folosind ca fază staționară o coloană TRACER EXTRASIL ODS2, 150 x 4 mm,  $d_p$  3  $\mu\text{m}$ . (*Teknokroma*<sup>®</sup>). Fazele mobile au fost degazate și filtrate pe filtre de 0,2  $\mu\text{m}$ , înainte de utilizare. Compozițiile fazelor mobile sunt specificate în legendele figurilor și conțin, de obicei soluții de metanol și / sau acetonitril, tamponate la pH-uri mai mici de 6. Eluarea s-a realizat izocratic la debite de curgere sub 1 mL/min (valori specificate în legenda figurilor), la temperatura camerei.

## REZULTATE ȘI DISCUȚII

Datorită frecventelor cazuri de poluare cu insecticide raportate în ultima vreme, analizele acestor poluanți trebuie să realizeze rapid și cu cheltuieli cât mai reduse. Deși eluarea izocratică în cromatografia de lichide este mai puțin selectivă decât cea în gradient de concentrație a fazei mobile, metoda este mai rapidă (nu necesită reechilibrarea coloanei) și implică consum de solvenți organici (nota bene: și ei poluanți) mai mic. Nu trebuie neglijat nici aspectul costurilor ridicate ale analizelor HPLC, datorat în bună măsură prețului foarte ridicat al solvenților de puritate HPLC utilizați la prepararea fazelor mobile. Cei mai folosiți solvenți sunt acetonitrilul și metanolul. Prețul acetonitrilului este aproximativ de 2,5 ori mai mare decât cel al metanolului. Din acest motiv, în cercetarea realizată am încercat înlocuirea totală sau măcar parțială a acetonitrilului cu metanolul. În acest scop am studiat (figurile II.1.2 – II.1.4) influența concentrației metanolului din faza mobilă asupra selectivității separării unui grup de mai multe insecticide.

Figura II.1.2 prezintă cromatograma separării amestecului de Cygon, Phosdrin, DDVP, Metomil, Temik, Baygon, Bendiocarb și Carbofuran folosind o fază mobilă cu 70% metanol. Aceste insecticide, cu excepția carbofuranului, au valori ale logP relativ scăzute, sub 2.

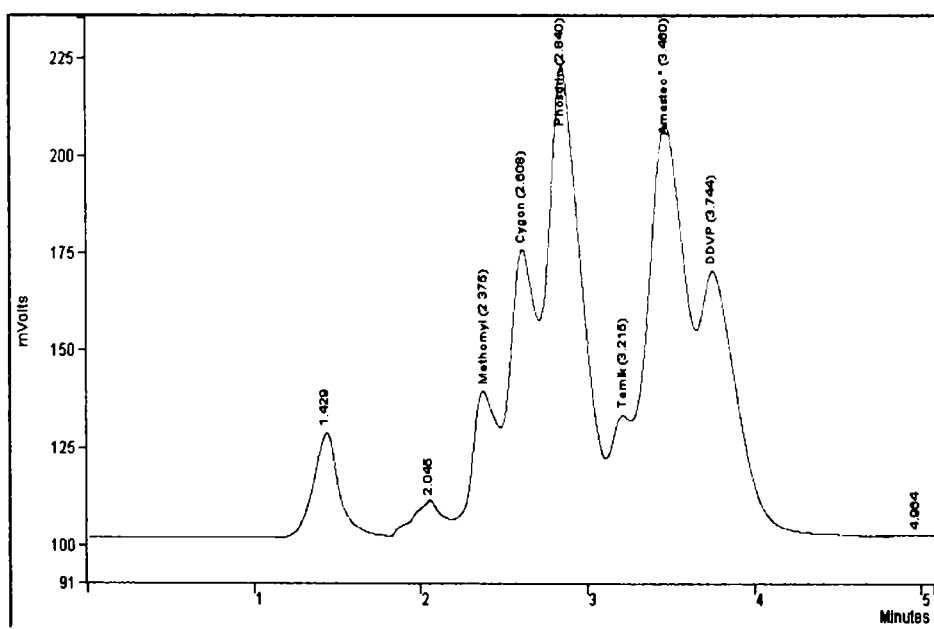


Fig.II.1.2. Separarea a 8 insecticide pe coloana TRACER EXTRASIL ODS2, 150 x 4 mm, dp 3 μm. F.M: 70% MeOH, 30% H<sub>2</sub>O, pH 5 - 5,5. Debit de curgere 0,60 ml/min.

Legendă: "Amestec\*" - baygon + bendiocarb + carbofuran.



Deși s-a reușit separarea baygonului de perechea bendiocarb - carbofuran (care coeluează în continuare), de această dată, DDVP este analitul care interferă cu eluarea celor 2 insecticide carbamice (timp de retenție 39,05 min.). În plus, timpul total al separării a crescut până la 40 minute, făcând această variantă de lucru neatractivă.

Deoarece scăderea în continuare a concentrației metanolului în faza mobilă ar duce la o creștere exagerată a timpului analizei, fără o îmbunătățire corespunzătoare a separării, s-a considerat că, deși mai ieftin, metanolul nu conduce la rezultatele dorite și trebuie înlocuit cu acetonitril.

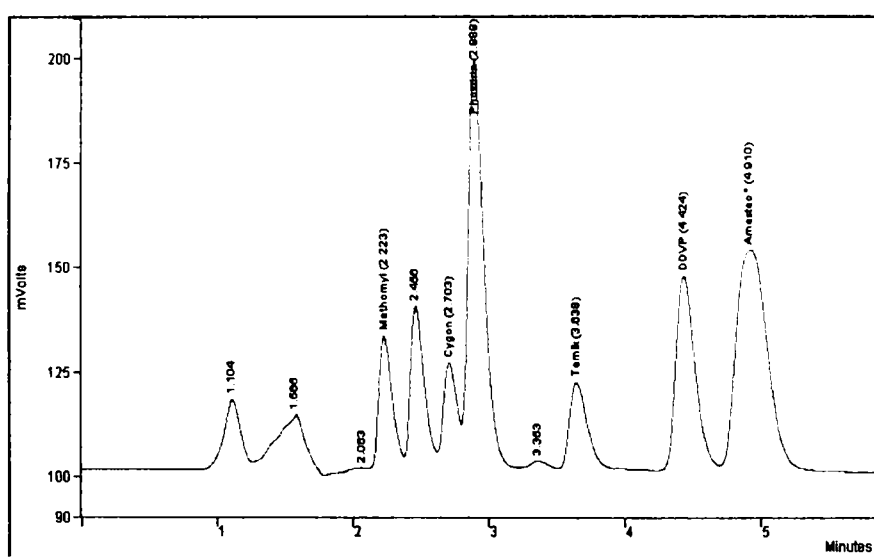


Fig. II.1.5. Separarea a 8 insecticide pe coloana TRACER EXTRASIL ODS2, 150 x 4 mm, dp 3  $\mu$ m. F.M: 45% MeCN, 55% H<sub>2</sub>O, pH 5 - 5,5. Debit de curgere 0,75 ml/min.

Legendă: "Amestec\*": baygon + bendiocarb + carbofuran.

Inițial s-a pornit de la o concentrație a acetonitrilului în faza mobilă de 45% pentru a realiza separarea în mai puțin de 5 minute. Totuși, grupul "problemă" baygon + bendiocarb + carbofuran nu este rezolvat cromatografic (figura II.1.5.)

Apelând la un compromis, creșterea timpului de analiză de trei ori, s-a redus concentrația acetonitrilului în faza mobilă la 30%, reușindu-se astfel separarea baygonului de insecticidele carbamice, fără a interfera cu DDVP (figura II.1.6.).



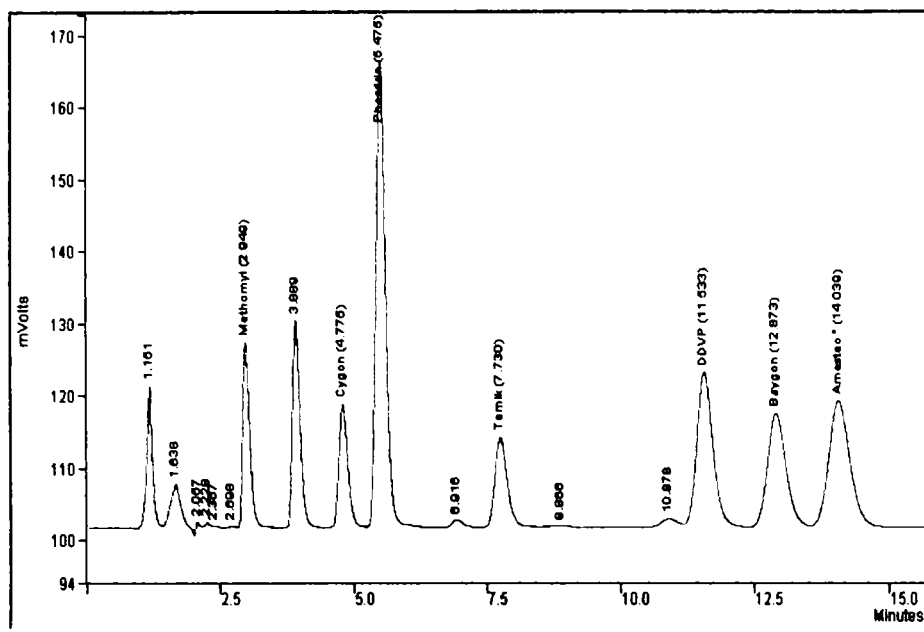


Fig. II.1.6. Separarea a 8 insecticide pe coloana TRACER EXTRASIL ODS2, 150 x 4 mm, dp 3  $\mu$ m. F.M: 30% MeCN, 70% H<sub>2</sub>O, pH 5 - 5,5. Debit de curgere 0,75 ml/min.

Notă: "Amestec\*": bendiocarb + carbofuran.

Cromatograma din figura II.1.6. prezintă o bună separare (cu linie de bază între picuri) pentru toate insecticidele analizate, mai puțin cele două carbamice (bendiocarb și carbofuran). Deși cele două insecticide au valori logP destul de diferite, conform datelor din literatura de specialitate, în majoritatea separărilor HPLC are loc coeluția lor.

II.1.2. Studiu de evaluare a comportării cromatografice în separarea RP-HPLC a unor erbicide cu hidrofobicitate medie și scăzută de largă utilizare [115]

Am studiat comportarea cromatografică în RP-HPLC a șase erbicide utilizate pe scară largă în practicile fitoterapeutice. Acestea sunt: glifosatul, atrazina, cianazina, 2,4-D, metamitron și cloridazon (fig. II.1.7).

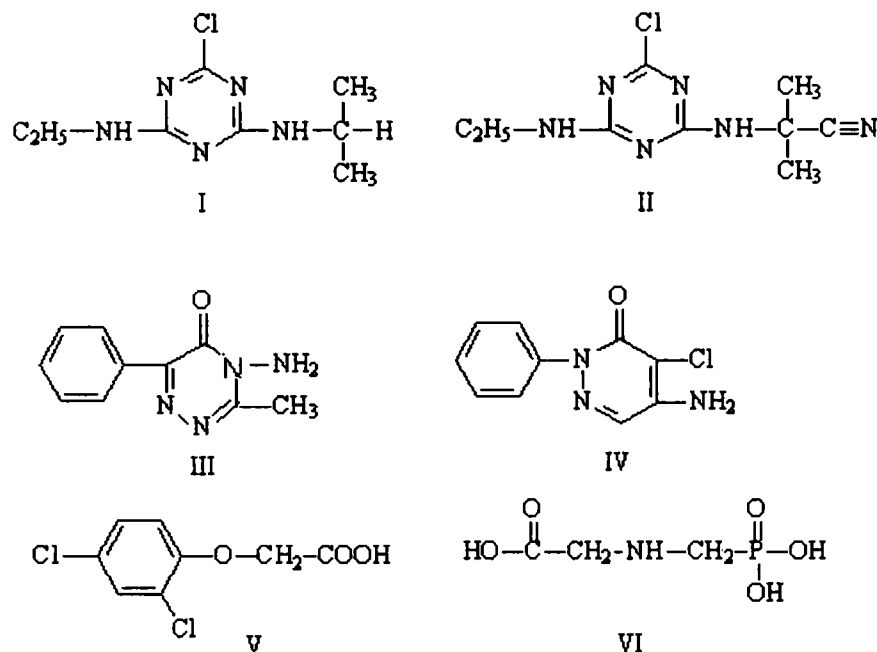


Fig. II.1.7. Principalele reprezentante ale erbicidelor utilizate în practică: I - atrazină, II - cianazină, III - metamitron, IV - cloridazon, V - 2,4-D, VI - glifosat.

## MATERIALE ȘI METODE

**Reactivi.** Metanolul pentru faza mobilă a fost furnizat de firma Merck. S-a folosit apă dublu distilată. Standardele de pesticide au fost procurate de la firma Riedel-de Haen.

**Aparatura și condițiile cromatografice.** Experimentele au fost realizate pe două sisteme HPLC. Sistemul Beckman este format din modulul de pompe model 126, modulul de detecție UV cu lungime de undă variabilă model 166, valva de injecție tip Altex 210 A, cu bucla de injecție a probei de 20  $\mu$ L. Sistemul este controlat prin intermediul unui computer tip IBM 586

de către softul dedicat GOLD 6.1 (Beckman). Cel de-al doilea sistem HPLC este format din pompa Merck - Hitachi model L-6200 A Intelligent Pump și modulul de detecție arie de diode model PDA 996 Waters. Detectorul este controlat prin intermediul unui soft specializat - Millennium<sup>32</sup> Waters. Coloana folosită a fost de tip C18 (ODS) tip Merck LiChrospher 100 RP-18, 5  $\mu\text{m}$  în LichroCART 125-4. Faza mobilă a constat din amestecuri de metanol cu apă (în proporții variind de la 30 - 100 % metanol) acidulate cu acid fosforic 3 mM (pH 3). Faza mobilă a fost filtrată și degazată prin ultrasonicare înainte de utilizare. Eluțiile au fost de tip izocratic, cu o viteză volumetrică a fazei mobile de 1 mL·min<sup>-1</sup>.

## REZULTATE ȘI DISCUȚII

Deși erbicidele luate în studiu nu se utilizează simultan la aceleași specii de plante, totuși, în produsele alimentare finite, reziduuri ale acestor erbicide pot apărea simultan. Din această cauză metoda de analiză trebuie să permită separarea acestora în vederea unei bune identificări și cuantificări. Modificarea rezoluției separării analiților în RP-HPLC se realizează cel mai ușor schimbând compoziția fazei mobile. În figura II.1.8 este prezentat comportamentul cromatografic al erbicidelor studiate atunci când se modifică concentrația modifierului organic în faza mobilă.

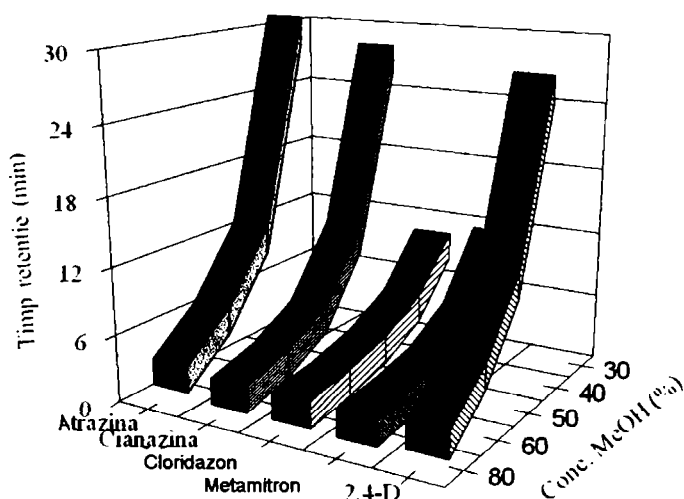


Fig. II.1.8. Variația timpilor de retenție pentru atrazină, cianazină, metamitron, cloridazon și 2,4-D în funcție de concentrația metanolului în faza mobilă. Coloana C-18, eluare izocratică cu soluții de diferite concentrații de metanol în acid fosforic 3 mM (pH 3), detecție la 254 nm.

Pentru cei 6 analiți studiați, valorile logP, din baze de date experimentale, sunt [16]:

- atrazină – 2,61 (2,80)
- cianazină – \* \* (2,48)
- metamitron – 0,83 (1,00)
- cloridazon - \*\* (1,71)
- 2,4-D - 2,81 (2,73)
- Glifosat - \*\* (- 3,06)

Legendă: \*\* - lipsă date experimentale

Notă: valorile dintre paranteze sunt estimate pe baza software-ului firmei *Interactiv Analysis*

Atrazina și cianazina (erbicide din grupa triazinelor) sunt substanțe cu structuri relativ apropiate. Datorită prezenței unei grupări nitril, grupare polară, în structura cianazinei, aceasta eluează mai rapid decât atrazina (fapt previzibil și prin prisma valorilor logP). Pe de altă parte, compuși cu structuri total diferite, cum ar fi atrazina și 2,4-D, au valori logP apropiate iar comportarea lor cromatografică asemănătoare confirmă faptul că hidrofobicitățile lor sunt apropiate. De remarcat că acest comportament se înregistrează la pH-ul de lucru, aflat în domeniul 2,5 - 3, zonă în care aproximativ jumătate din moleculele de 2,4-D (un acid carboxilic cu  $pK_a = 2,64$ ) se află în stare nedisociată. La valori mai ridicate ale pH-ului, procentul de molecule de 2,4-D aflate în forma deprotonată va crește iar hidrofobicitatea va scădea semnificativ. Faptul că cele două substanțe au timpi de retenție apropiați nu constituie un inconvenient major deoarece atunci când se detectează prezența simultană a celor două erbicide se poate ridica pH-ul fazei mobile, ceea ce va duce la anularea represiei ionice a grupării carboxil a 2,4-D care va elua rapid. Metamitronul și cloridazonul, deși au timpi de retenție apropiați, deoarece au specificități similare și deci sunt utilizați pentru aceleași culturi, este puțin probabilă întrebuițarea lor simultană. În figura II.1.8. nu se prezintă comportarea cromatografică a glifosatului deoarece acest erbicid posedă o hidrofobicitate mult scăzută în comparație cu ceilalți 5 compuși (valoarea estimată a lui logP este negativă).

Cea mai comună metodă de detecție în HPLC este cea în UV-VIS. Sensibilitatea acestei detecții este dată de valoarea coeficientului molar de absorbție, parametru ce depinde de structura chimică a compușilor analizați. Glifosatul nu are grupări cromofore și deci coeficienții de absorbție în UV-VIS au valori foarte mici. Acest lucru se poate vedea din figura

II.1.9, care prezintă atât profilul cromatografic al glifosatului, când concentrația metanolului în faza mobilă a fost 60%, cât și spectrul său de absorbție pe domeniul 200 - 380 nm.

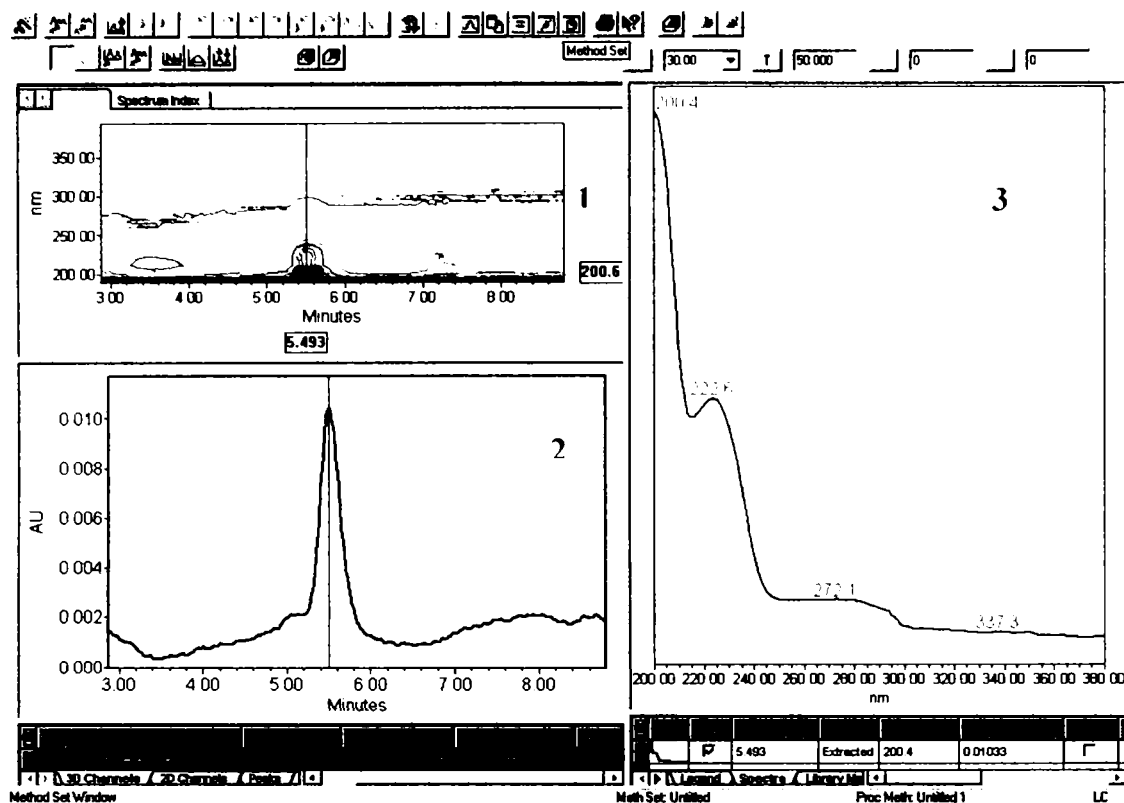


Fig II.1.9. Cromatograma și spectrul UV al glifosatului. Faza staționară C-18, eluare izocratică cu 60% metanol în 3 mM acid fosforic. Panoul 1 prezintă izocromatograma (o reprezentare 2D a informației 3D, curbe de nivel de izoabsorbantă la diferite lungimi de undă). Panoul 2 prezintă cromatograma extrasă la lungimea de undă la care absorbanta este maximă (200,6 nm). Panoul 3 prezintă spectrul pe domeniul 200 - 380 nm la momentul 5,49 minute (maximul picului din cromatograma extrasă).

Atrazina și cianazina au structuri similare, deci și spectre similare, dar timpii lor de retenție diferă deoarece cianazina are o grupare nitril polară și eluează mai repede. Figura II.1.10 prezintă separarea cromatografică a amestecului de atrazină, cianazină și 2,4-D. Deși atrazina și 2,4-D nu sunt bine separate, ele pot fi identificate deoarece au spectre diferite; cuantificarea se poate realiza pe baza înălțimii picului cromatografic.

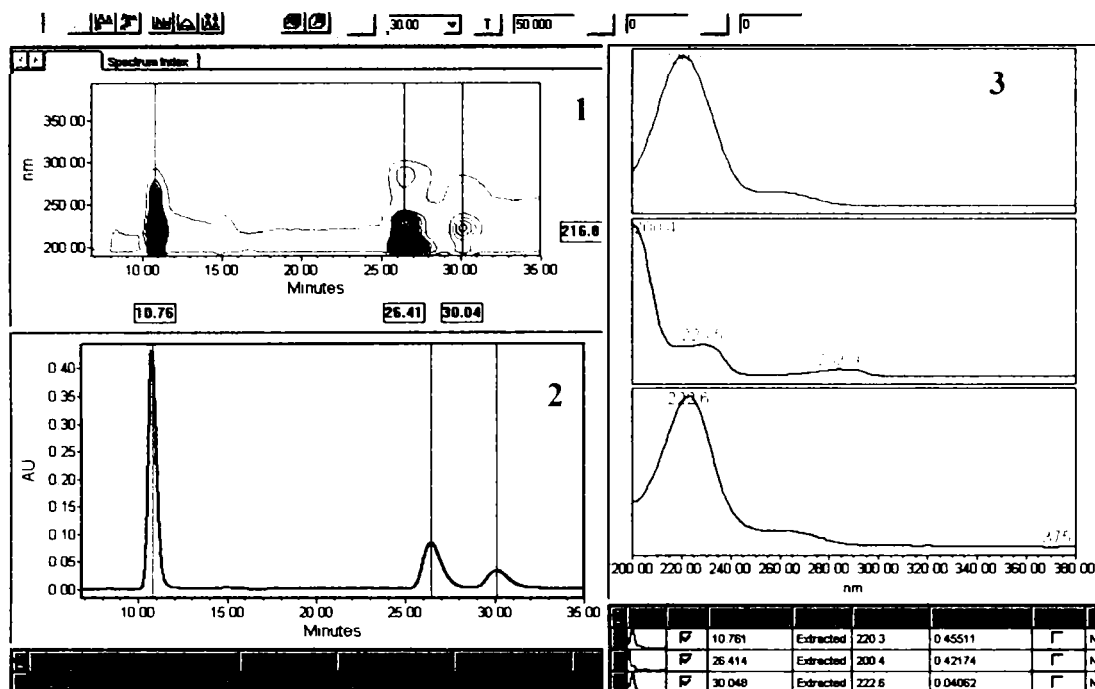


Fig II.1.10. Cromatograma și spectrele UV ale atrazinei, cianazinei și 2,4-D. Faza staționară C-18, eluare izocratică cu 40% metanol în 3 mM acid fosforic. Panoul 1 prezintă izocromatograma. Panoul 2 prezintă cromatograma extrasă la 216,8 nm a amestecului celor 3 erbicide. Panoul 3 prezintă spectrele (de sus în jos) ale cianazinei, 2,4-D și a atrazinei pe domeniul 200 - 380 nm la timpii de retenție corespunzători maximelor picurilor cromatografice.

Avantajul utilizării detectorului arie de diode se constată pregnant în cazul separării metamitronului și cloridazonului. Cele două substanțe au structuri similare și hidrofobicități asemănătoare motiv pentru care au timpii de retenție foarte apropiați (figura II.1.11).

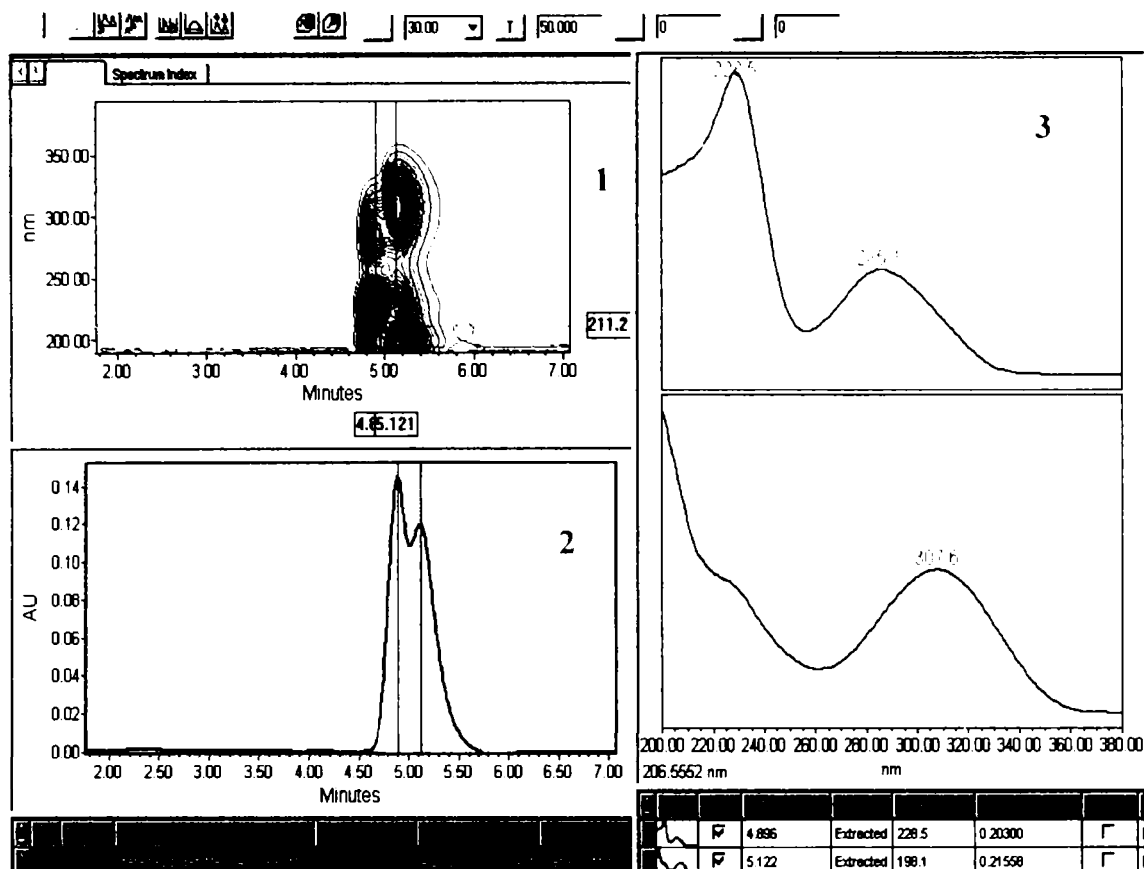


Fig II.1.11. Cromatograma și spectrele UV ale cloridazonului și metamitronului. Faza staționară C-18, eluare izocratică cu 40% metanol în 3 mM acid fosforic. Panoul 1 prezintă izocromatograma. Panoul 2 prezintă cromatograma extrasă la 211,2 nm a amestecului celor 2 erbicide. Panoul 3 prezintă spectrele (de sus în jos) ale cloridazonului și metamitronului pe domeniul 200 - 380 nm la timpii de retenție corespunzători maximelor picurilor cromatografice.

După cum se observă din cromatograma extrasă prezentată în figura II.1.11, cele două substanțe nu sunt bine separate. Totuși, deoarece ele au spectre diferite, identificarea lor poate fi realizată cu ușurință, cu ajutorul bibliotecii de spectre ce poate fi creată cu ajutorul software-ului Millennium<sup>32</sup>. În acest fel este posibilă chiar și cuantificarea celor 2 erbicide, fie folosind criteriul înălțimii picurilor fie extrăgând cromatograme la lungimi de undă convenabil alese. Acest procedeu de analiză a separării prin folosirea cromatogramelor extrase la lungimi de undă convenabil alese este ilustrat în figura II.1.12. Pentru detecția maximă a 2,4-D, s-a

utilizat cromatograma extrasă la 200,4 nm, unde celelalte substanțe au absorbante mai mici și în special atrazina cu care 2,4-D coeluează. Cromatograma extrasă la 222,6 nm permite cuantificarea optimă a atrazinei și cianazinei, ambele având maxime de absorbție în jurul acestei valori. Metamitronul, care coeluează cu cloridazonul (vezi figura II.1.11.), poate fi cuantificat cu ajutorul cromatogramei extrase la 307,6 nm.

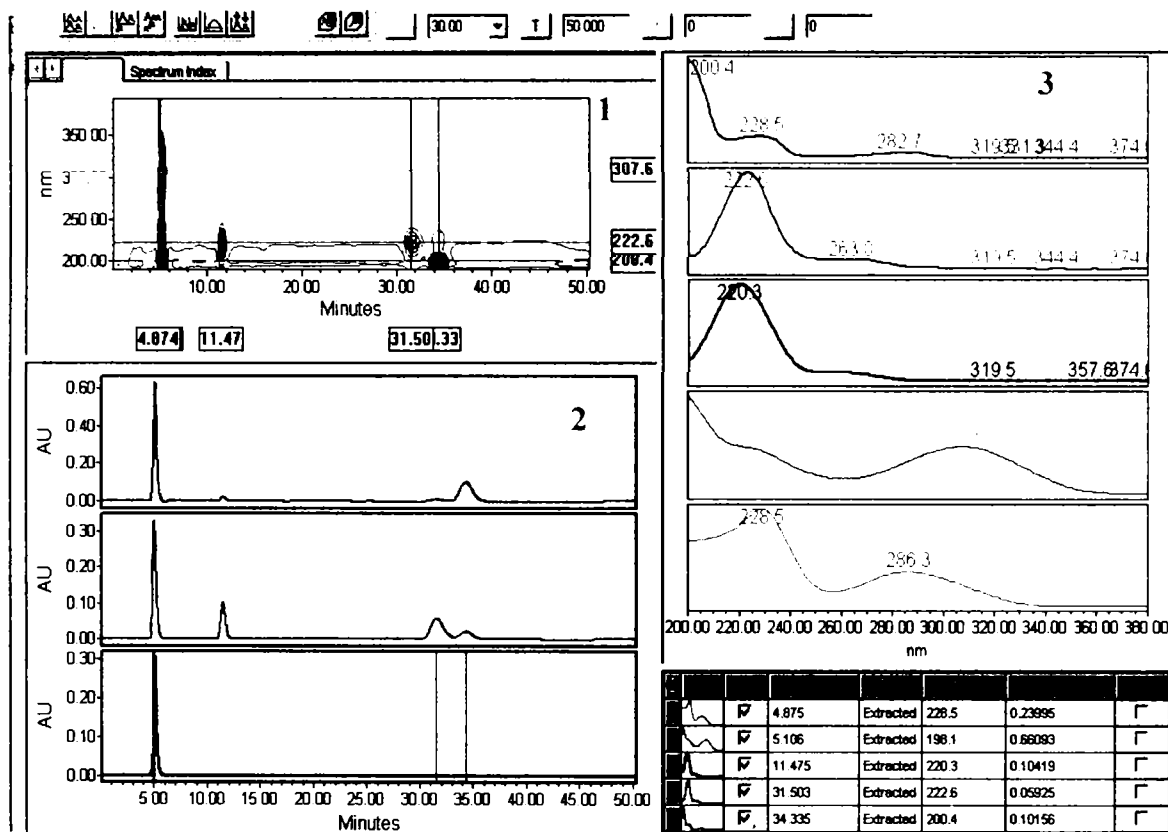


Fig II.1.12. Cromatograma și spectrele UV ale grupului de 5 erbicide. Faza staționară C-18, eluare izocratică cu 40% metanol în 3 mM acid fosforic. Panoul 1 prezintă izocromatograma. Panoul 2 prezintă cromatogramele extrase la (de sus în jos) 200,4, 222,6 și respectiv 307,6 nm.. Panoul 3 prezintă spectrele (de sus în jos) 2,4-D, atrazinei, cianazinei, metamitronului și cloridazonului pe domeniul 200 - 380 nm la timpii de retenție corespunzătorii maximelor picurilor cromatografice.



II.1.3. Studiu de optimizare a separării RP-HPLC a trei erbicide triazinice cu hidrofobicitate medie prin eluție izocratică [116]

Structurile chimice ale celor trei erbicide supuse studiului sunt prezentate în figura II.1.13

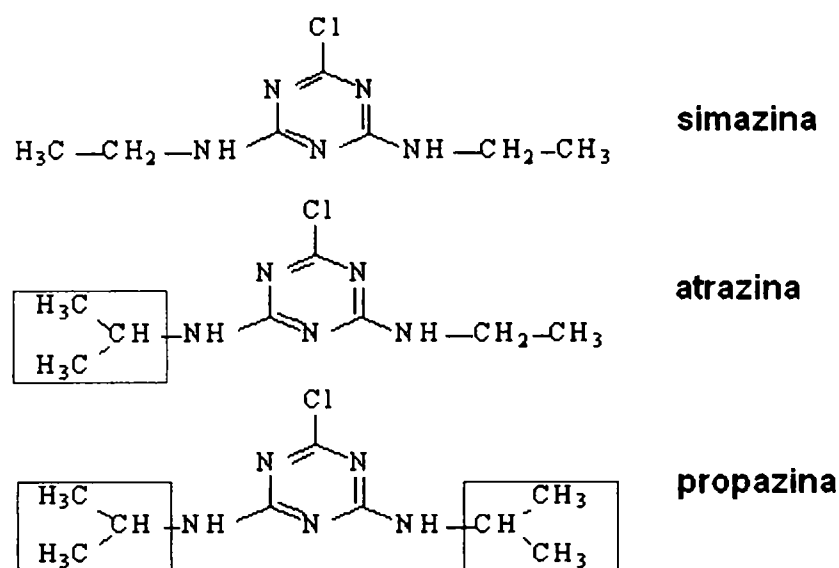


Fig.II.1.13. Erbicidele triazinice cu hidrofobicitate medie.

## MATERIALE ȘI METODE

**Reactivi.** Standardele solide de analiți studiați au fost achiziționate de la firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH. Metanolul a fost de puritate HPLC și achiziționat de la firma Merck.

Analizele HPLC au fost executate pe un sistem hibrid, compus din modulul de pompe *L 6200 A Intelligent Pump* - Merck-Hitachi și detectorul de UV *Photodiode-Array Detector model 996* - Waters. Injecțiile au fost efectuate manual prin intermediul valvei de injecție *Rheodyne 7125*, prevăzută cu o buclă de injecție de 20  $\mu\text{L}$ . Coloana cromatografică a fost *LiChroCart 125 mm*, diametru intern 4 mm, umplută cu *LiChroSpher 100 RP-18* (Merck),  $d_{\text{part}}$  5  $\mu\text{m}$ . Cromatogramele au fost procesate cu ajutorul software-ului *Millennium<sup>32</sup> Software* (Waters). Regimul de lucru a fost unul isocratic, eluțiile fiind executate la un debit de lucru de 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  cu metanol sau amestecuri metanol - apă (proporția de solvent organic variind în

intervalul 50 -100% - v/v). Degazarea fazelor mobile s-a făcut on-line prin trecere acestora printr-un degazor cu membrană. Înaintea introducerii în sistemul cromatografic, toate probele au fost filtrate prin filtre de 0,2  $\mu\text{m}$  tip *acrodisk*s, adaptabile la seringă,.

## REZULTATE ȘI DISCUȚII

Cele 3 erbicide posedă inelul aromatic triazinic de 6 atomi, 3 de carbon și 3 de azot aranjați alternativ, și un atom de clor în poziția de substituție 2. În pozițiile 4 și 6 apar grupări aminice substituie cu radicali alchil.

Modul de eluție cel mai rapid și simplu și care este recomandat a se utiliza în tehnica cromatografică atunci când este posibil îl constituie cel izocratic. Pentru început, s-a testat comportamentul cromatografic al simazinei pe coloana aleasă, cu metanol 100% drept fază mobilă. O cromatogramă tipică reprezintă prezentarea grafică a semnalului detectorului versus timpul de retenție. Spre deosebire de detectoarele clasice în UV folosite în HPLC, unde are loc setarea unei anumite lungimi de undă pentru înregistrarea cromatogramei, în cazul detectorului de tip arie cu fotodiode se poate achiziționa în timp real spectrul UV, pe un anumit domeniu de lungimi de undă stabilit, de-a lungul eluției cromatografice.

Software-ul Millennium redă grafic, în panoul 2 al figurii II.1.14, așa-zisa cromatogramă *MaxPlot*, cromatogramă în care e reprezentat maximum tuturor absorbțiilor optice din domeniul de lungimi de undă ales de-a lungul intervalului de timp de eluție. Acest mod de reprezentare grafică poate contribui la o sporire a sensibilității de detecție și ajută, într-o primă etapă, la punerea în evidență a diferiților compuși (de interes sau interferenți) care eluează de pe coloana cromatografică.

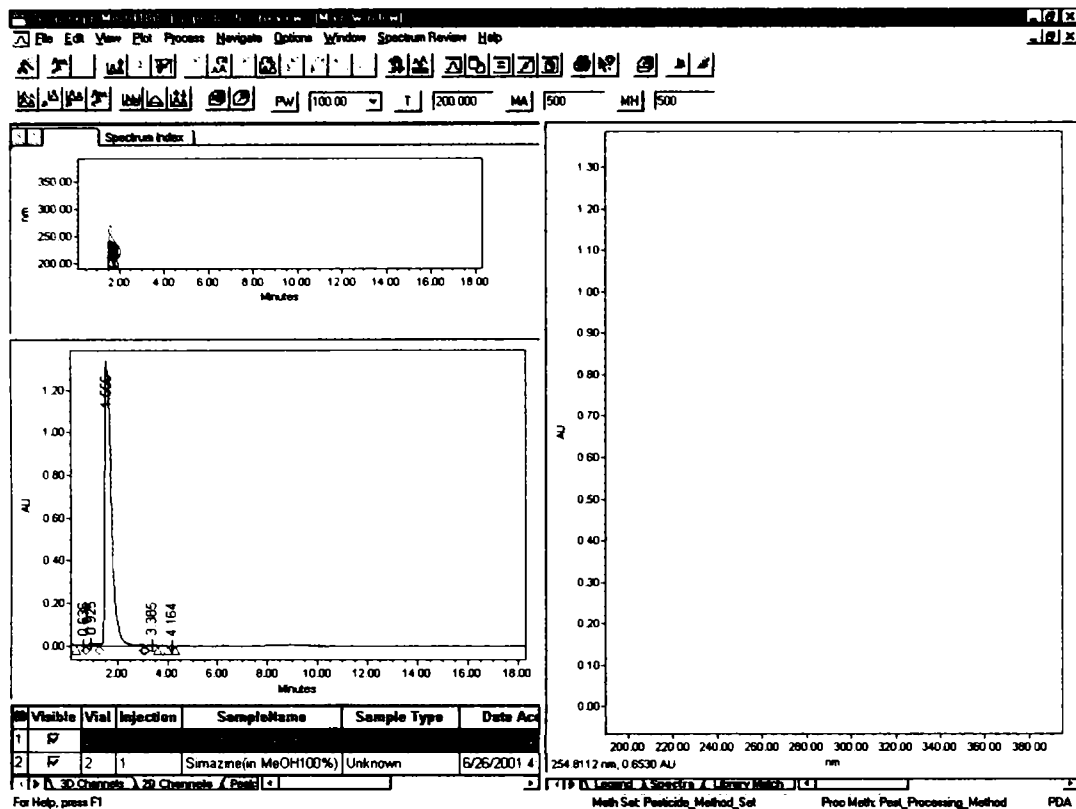


Figura II.1.14. Fereastra subprogramului principal (de lucru) a software-ului Millennium<sup>32</sup> înfățișând datele cromatografice obținute pentru simazină, cu faza mobilă metanol 100%. Panoul 1 prezintă izocromatograma. Panoul 2 prezintă cromatograma *MaxPlot* pentru domeniul de lungimi de undă scanat, 200 - 400 nm. Panoul 3 prezintă spectrul de absorbție în UV înregistrat în vârful (apexul) picului cromatografic de la  $t = 1,56$  min.

În cromatografia de lichide cu fază inversă, ordinea de eluție a compușilor ce străbat coloana cromatografică depinde de „tăria” modificatorului organic al fazei mobile. Astfel, dacă se dorește creșterea timpilor de retenție a analiților de interes, concentrația modificatorului organic (în cazul de față metanolul) în faza mobilă trebuie redusă corespunzător. Figura II.1.15 prezintă comparativ timpii de retenție ai simazinei pe coloana cromatografică aleasă în cazul utilizării metanolului în proporție de 100%, 80%, 60% și 60% (v/v) în faza mobilă: 1,55, 1,69, 4,51 și respectiv 9,11 minute. Toate cele 4 cromatograme sunt de tip *MaxPlot*, domeniul de lungimi de undă scanat a fost 200 - 400 nm.

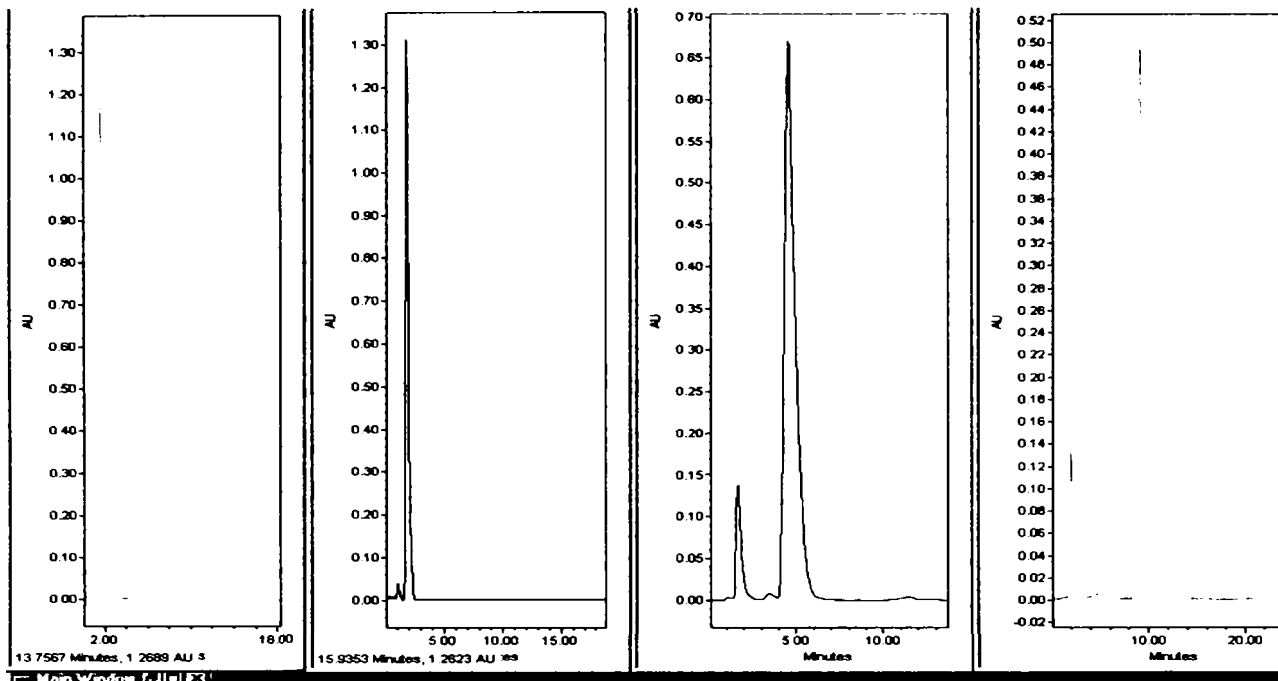


Figura II.1.15. Timpii de retenție ai simazinei în cazul utilizării (de la stânga la dreapta în figură) a 100%, 80%, 60% și 60% (v/v) metanol în faza mobilă.

Un comportament similar au manifestat atrazina și simazina. Cum era de așteptat însă, datorită diferențelor structurale dintre moleculele celor 3 analiți de interes (chiar dacă relativ mici), viteza de creștere a timpului de retenție pe coloana cromatografică pe măsură descreșterii concentrației de metanol în faza mobilă a diferit de la analit la analit. Figura II.1.16 ilustrează bine acest tip de comportament pentru cei 3 analiți studiați.

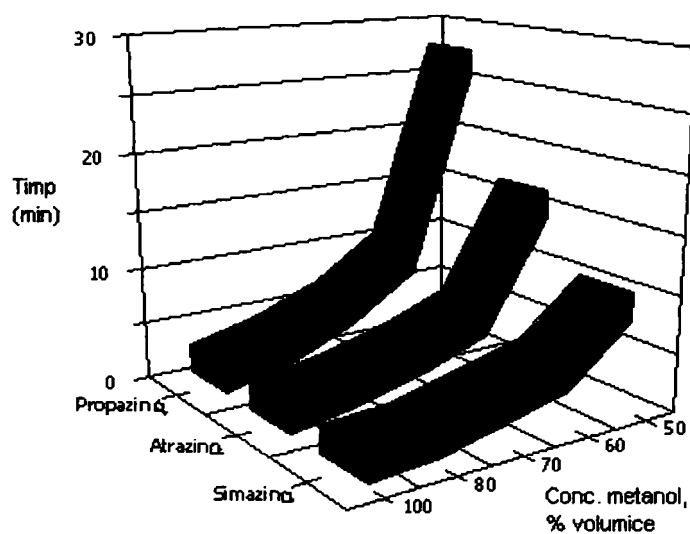


Figura II.1.16. Variația timpului de retenție a celor 3 derivați triazinici funcție de tăria fazei mobile și de tipul de analit.

Pentru cei 3 analiți studiați, valorile logP, din baze de date experimentale, sunt [16]:

- simazină – 2,18 (2,25)
- atrazină – 2,61 (2,80)
- propazină – 2,93 (3,38)

Notă: valorile dintre paranteze sunt estimate pe baza software-ului firmei *Interactiv Analysis*

Cum o arată și ordinea crescătoare a valorilor logP, ordinea de eluție a celor 3 analiți în cromatografia de lichide în fază inversă, indiferent de concentrația în modificador organic a fazei mobile ar trebui să fie simazina, atrazina și, în final, propazina. Diferențele structurale mici între analiți conduc însă la imposibilitatea apariției unor diferențe de eluție suficient de mari, pentru valorile mari ale concentrației de metanol în faza mobilă, diferențe care să poată fi concretizate în rezoluții de separare acceptabile ale picurilor cromatografice. Din acest motiv, pentru valori ale concentrației de metanol în domeniul 100 - 80 %, se vor înregistra coeluții mai mult sau mai puțin parțiale între picurile cromatografice de interes. Figura II.1.16 sugerează că începând de la concentrații mai mici de 75% se vor putea înregistra separări acceptabile.

Într-adevăr, așa cum o demonstrează experimentul din figura II.1.17, amestecul celor 3 analiți de interes este separat acceptabil (rezoluții de separare de aproximativ 0,9 pentru ambele perechi de picuri consecutive) pe coloana cromatografică aleasă, cu o fază mobilă 70% metanol – 30% apă.

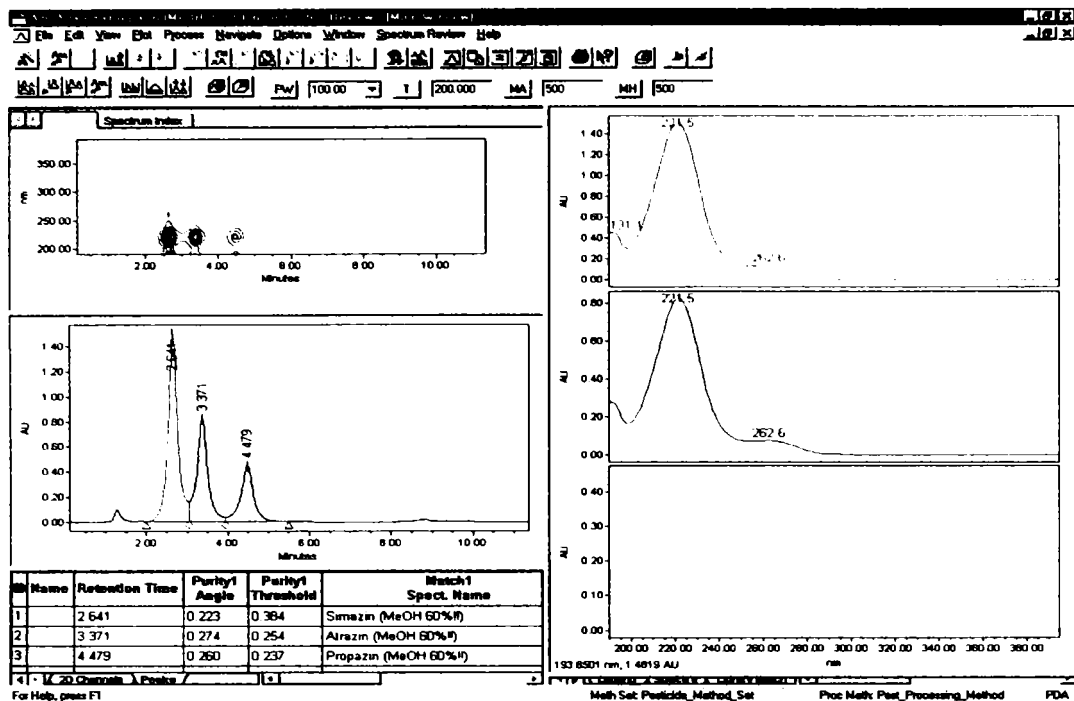


Figura II.1.17. Separarea cromatografică a amestecului de simazină, atrazină și propazină pe coloana cromatografică aleasă. Faza mobilă: 70% metanol – 30% apă. Panoul 1 prezintă izocromatograma. Panoul 2 prezintă cromatograma *MaxPlot* pentru domeniul de lungimi de undă scanat, 200 - 400 nm, cu cele 3 picuri cromatografice de la 2,64 min (simazina) 3,36 min (atrazina) și 4,48 min (propazina). Panoul 3 prezintă spectrele de absorbție în UV din apexul picurilor cromatografice pentru (de sus în jos) simazină, atrazină și propazină.

Ținând cont de faptul că se intenționează aplicarea metodei pentru identificarea și cuantificarea acestor erbicide din probe naturale complexe (produse vegetale, produse alimentare etc), este de dorit ca rezoluția separării picurilor cromatografice de interes să fie cât mai mare astfel încât inevitabilele interferențe matriceale (nici un tip de pregătire a probei nereușind să îndepărteze integral compoziții interferenți) să aibă „loc” suficient între picurile de interes. Din acest motiv s-au verificat experimental timpii de retenție ai simazinei, atrazinei și propazinei la eluția amestecului lor de pe coloana cromatografică cu o fază mobilă conținând 50% metanol. Figura II.1.18 prezintă grafic rezultatele obținute. Îmbunătățirea rezoluției este, ce-i drept, însoțită de o creștere a timpului unei treceri cromatografice la aproximativ 22 min, durată de lucru acceptabilă.

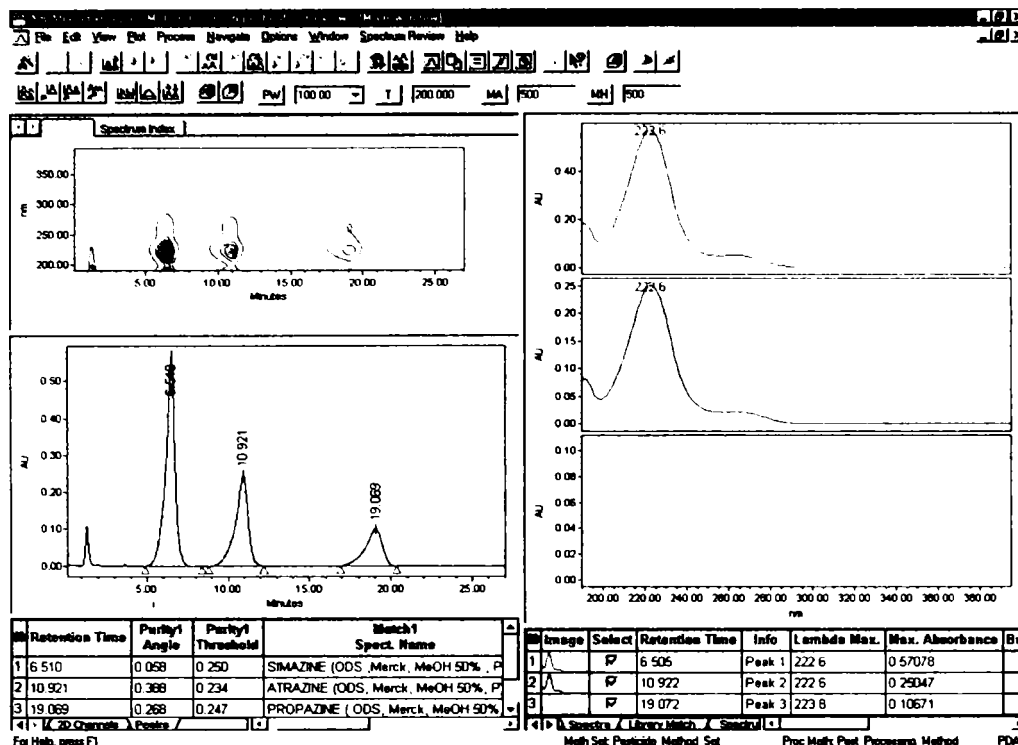


Figura II.1.18. Separarea cromatografică a amestecului de simazină, atrazină și propazină pe coloana cromatografică aleasă. Faza mobilă: 50% metanol – 50% apă. Panoul 1 prezintă izocromatograma. Panoul 2 prezintă cromatograma *MaxPlot* pentru domeniul de lungimi de undă scanat, 200 - 400 nm, cu cele 3 picuri cromatografice de la 6,51 min (simazina) 10,92 min (atrazina) și 19,07 min (propazina). Panoul 3 prezintă spectrele de absorbție în UV din apexul picurilor cromatografice pentru (de sus în jos) simazină, atrazină și propazină.

În tehnica clasică a cromatografiei de lichide cu detecție în UV, timpul de retenție al analiților constituia practic singurul criteriu de identificare a acestora. Ținând cont de complexitatea matricilor naturale, acest criteriu nu mai este considerat unul destul de puternic. Astfel, abordarea actuală a detecției în cromatografie, în special în domeniul analizei reziduurilor, o constituie folosirea unor caracteristici care să asigure maximizarea probabilității de confirmare a identității unui analit-țintă. Prin urmare, se utilizează pe scară tot mai largă detectoarele tip arie de diodă cu achiziționarea spectrului UV-VIS pe un domeniu larg de lungimi de undă, detectoarele în fluorescență la lungimi de undă adecvate și spectrometre de masă de diferite tipuri. În mod logic, se pot construi baze de date consistente conținând caracteristicile spectrale corespunzătoare analitului pur. Ulterior, se poate compara semnalul achiziționat în zona unui pic cromatografic suspect cu datele din baza de date în vederea confirmării sau infirmării identității acestuia.

Pentru a realiza compararea spectrelor între ele, software-ul transformă datele spectrale în vectori și apoi calculează diferențele între aceștia. El va considera apoi că similaritatea între spectrele comparate este cu atât mai mare cu cât congruența vectorilor este mai pronunțată. Diferențele mai-sus menționate între vectori sunt comparate cu vectorii corespunzători zgomotului liniei de bază. Cu cât diferențele sunt mai mici decât zgomotul, atunci probabilitatea ca substanța răspunzătoare de apariția picului analizat să fie identică cu standardul al cărui spectru este stocat în bibliotecă este mai mare.

Figura II.1.19 prezintă subprogramul software-ului Millennium<sup>32</sup> ce efectuează comparația dintre spectrul de absorbție în UV (spectrul de sus) pe domeniul 190–400 nm, achiziționat în zona apexului picului cromatografic de la 6,51 min din cromatograma MaxPlot din figura II.1.18, și cel care, din biblioteca de spectre, corespunde cel mai bine acestuia, anume simazina (spectrul din mijloc). Spectrul de jos reprezintă diferența dintre cele 2 spectre.

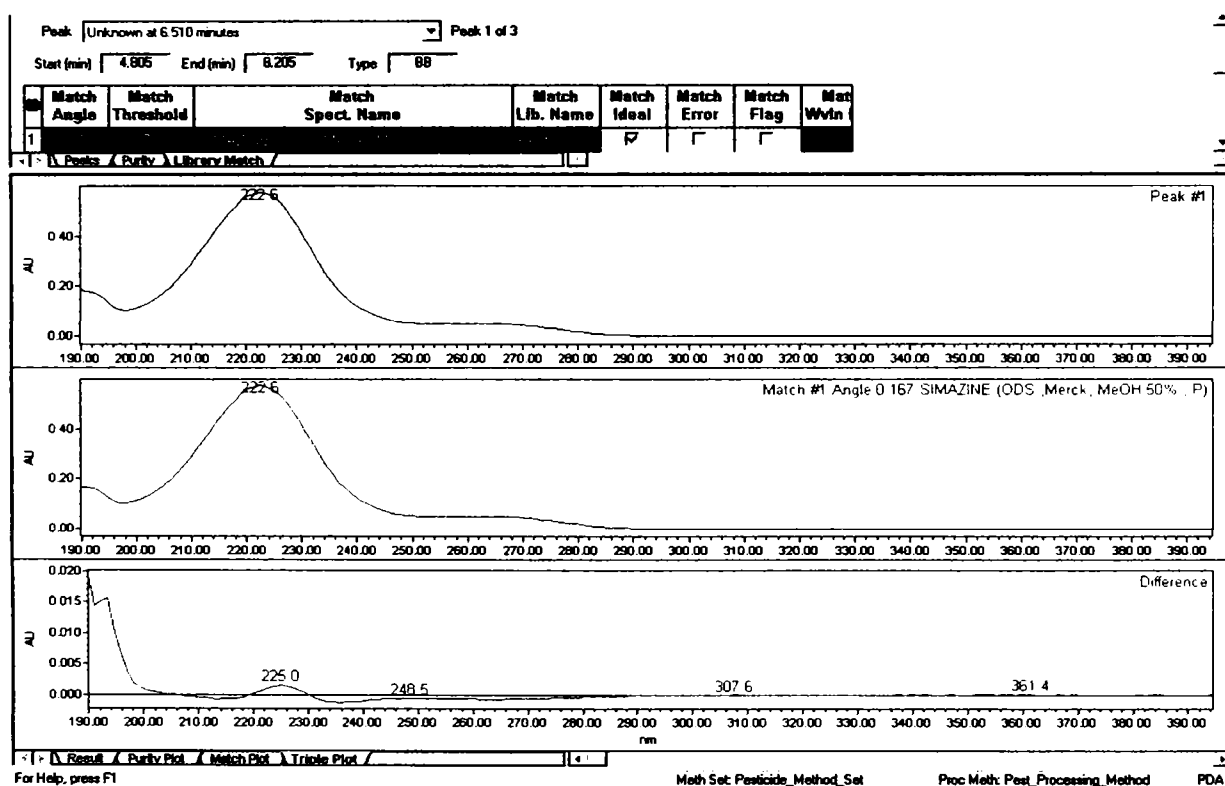


Figura II.1.19. Fereastra subprogramului software-ului Millennium<sup>32</sup> ce realizează identificarea spectrului de absorbție în UV din zona apexului picului cromatografic de la 6,51 min din cromatograma MaxPlot din figura II.1.18.



Trebuie să se țină însă seama de influențele pe care le pot exercita anumiți parametri (compoziția solventului în care e dizolvat analitul pentru care se achiziționează spectrul, pH-ul etc.) asupra formei spectrului. De aceea, este indicat ca, pe cât posibil, standardul al cărui spectru va fi stocat în baza de date să fie cromatografiat în aceleași condiții cu cele ale probei analizate.

O altă facilitate interesantă și foarte utilă a software-ului Millennium<sup>32</sup> o reprezintă așa-numita rutină de *verificare a purității spectrale* („*purity check*”). Ea permite estimarea aprecierii purității unui pic cromatografic (lipsa coeluției mai multor analiți într-un pic cromatografic) pe baza comparării spectrelor achiziționate în apexul și punctele de inflexiune ale picului analizat. Din nou, datele spectrale sunt transformate în vectori și sunt comparate diferențele angulare dintre vectorii corespunzători apexului și cei ai punctelor de inflexiune cu valorile unghiulare specifice zgomotului liniei de bază. Spre exemplu, figura II.1.20 prezintă grafic modul de lucru al acestui algoritm pentru simazină. Unghiul calculat al „purității” este de 0,062 iar cel al zgomotului este 0,250.

În ceea ce privește celelalte două picuri cromatografice, software-ul a identificat în biblioteca de spectre cei 2 analiți care le-au generat drept atrazina respectiv propazina. În ambele cazuri, unghiul „purității” a fost mai mic decât cel al „zgomotului”: 0,085 și 1,015 pentru atrazina respectiv 0,649 și 1,039 pentru propazina.

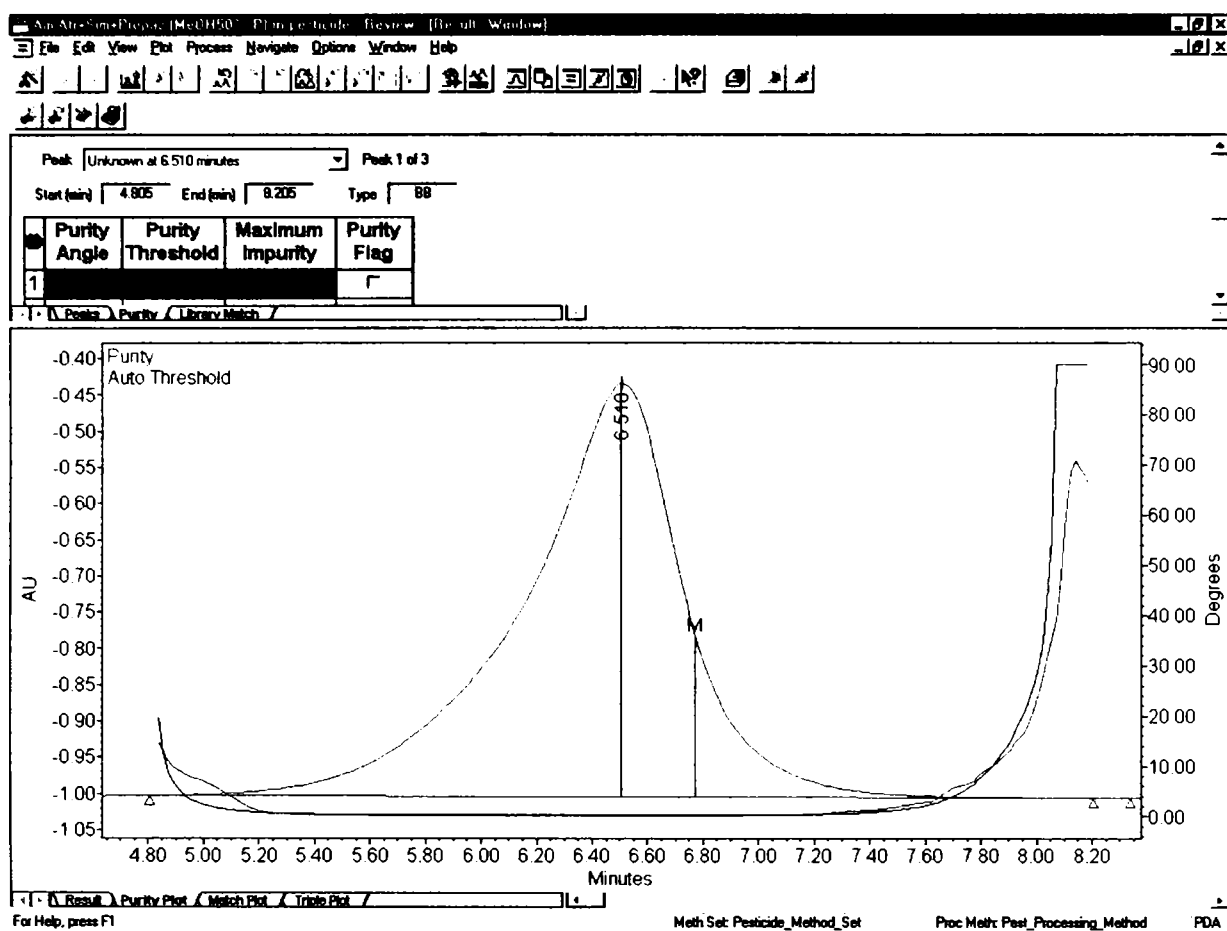


Figura II.1.20. Rutina „purity check” a software-ului Millennium<sup>32</sup>. Spectrul colectat în apexul picului cromatografic este comparat cu spectrul din punctele de inflexiune (sunt comparate diferențele unghiulare ale vectorilor). Linia verde, așa-zisa linie a „purității”, trebuie să fie sub linia albastră, cea a „zgomotului”. Diferența globală este cuantificată prin unghiul de „puritate” și cel al „zgomotului”.

II.1.4. Studiu de optimizare a separării RP-HPLC a unui grup de pesticide organofosforice cu hidrofobicitate medie prin eluție izocratică [117]

Pesticidelor organofosforice supuse studiului sunt derivați ai acizilor tiofosforic și ditiofosforic (figura II.1.21).

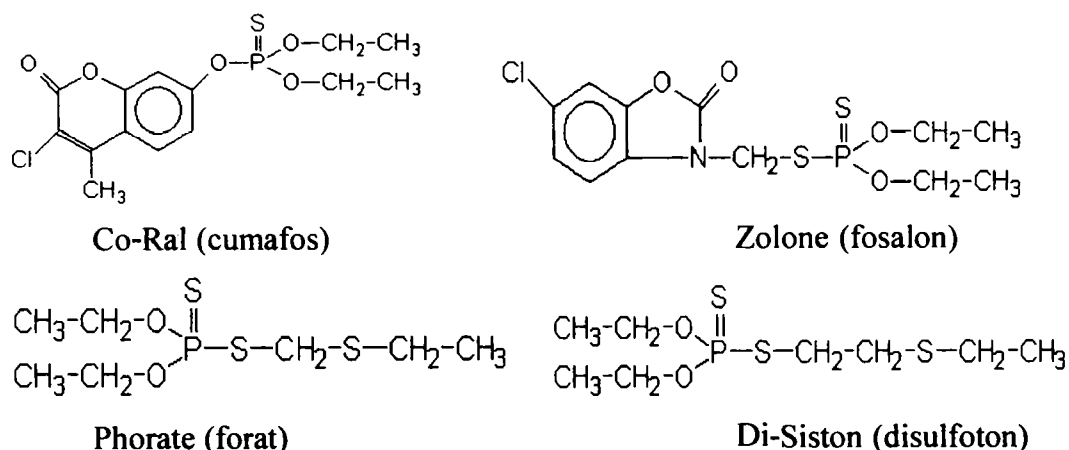


Fig. II.1.21. Pesticidele organofosforice cu hidrofobicitate medie.

## MATERIALE ȘI METODE

**Reactivi** - Standardele de pesticide au fost procurate de la firma Supelco. Metanolul și acetonitrilul de puritate HPLC au fost furnizate de firma Meck. Apa bidistilată a fost obținută în laborator.

**Soluțiile standard de pesticide** - Standardele (în stare solidă) au fost dizolvate în metanol și diluate cu fază mobilă. Soluțiile au fost filtrate înaintea injecției prin filtre de seringă tip acrodisk de 0,2  $\mu\text{m}$ .

**Sistemul HPLC** – Analizele au fost efectuate pe un sistem HPLC hibrid, compus din modulul de pompe binar model 126 și modulul de detecție UV model 166 al firmei Beckman, pe de o parte, și modulul automat de injecție Prostar 430 al firmei Varian (buclă de injecție de 100  $\mu\text{L}$ ). Detecția s-a efectuat la 215 nm. Sistemul a fost controlat iar cromatogramele au fost procesate de către softul dedicat *Star Chromatography Workstation, ver. 5.50, Varian*.

S-a utilizat o coloană cromatografică tip C18, TRACER EXTRASIL ODS2, 150 x 4 mm, dp 3 $\mu$ m. (*Teknokroma*®). Fazele mobile au fost filtrate și degazate sub vacuum, eluțiile au fost conduse în regim izocrat, la valori ale debitului de curgere de 0,75 mL min<sup>-1</sup>. pH-ul fazelor mobile a fost adus, prin utilizarea de tamponare fosfat, sub valoarea 6, iar valoarea temperaturii în incinta de lucru a fost menținută în domeniul 25  $\pm$  2°C.

## REZULTATE ȘI DISCUȚII

Scopul testărilor a fost acela de a stabili condiții cromatografice cât mai simple, neconsumatoare de solvenți scumpi și de timp, dar care să asigure rezoluții de separare acceptabile a celor patru analiți. Astfel, s-a urmărit evitarea lucrului în condiții de gradient de compoziției a fazei mobile (fază consumatoare de timp și solvenți organici) precum și utilizarea doar a metanolului în compoziția fazei mobile. Figura II.1.22 prezintă cromatogramele separărilor amestecului de analiți la două concentrații diferite de metanol în faza mobilă. În fereastra din stânga eluția a fost realizată cu 75% metanol (v/v), condiții în care zolone și phorate au coeluat total (timp de retenție 9,81 min). Scăderea concentrației de metanol la 60% a condus (vezi fereastra dreaptă) la rezolvarea parțială a coeluției amintite dar și la lărgirea excesivă a picurilor cromatografice și creșterea exagerată a timpului de separare (aproximativ 75 min).

Un aspect impredictibil l-a constituit evoluția ordinii de eluție din figura II.1.22. Dacă se consideră valorile logP ale celor patru analiți, Co-Ral – 4,13; Zolone – 4,38; Phorate – 3,56 și Di-Siston – 4,02 [16], ordinea de eluție în RP-HPLC ar trebui să fie phorate, Di-Siston, Co-Ral și zolone. Din păcate, parametrul logP își demonstrează utilitatea mai ales în predicția ordinii de retenție a membrilor seriilor omoloage. De exemplu, phorate și Di-Siston-ul diferă printr-o singură grupare metilenică astfel încât ordinea lor de eluție este în acord cu valorile lor logP. În cazul zolonei versus perechea phorate – Di-Siston, diferențele mari între structurile chimice conduc la imposibilitatea unei predicții clare a ordinii de retenție în RP-HPLC. Aceasta se datorează faptului că mecanismul de retenție în acest tip de tehnică cromatografică nu este unul simplu, unitar, ci un amestec al mai multor tipuri de interacții. Există astăzi mai multe modele teoretice care încearcă să explice acest mecanism complet dar

nici unul nu reușește pe deplin să prezică ordinea de eluție. Legăturile de hidrogen între moleculele fazei mobile și cele ale analiților pot fi luate în considerare.

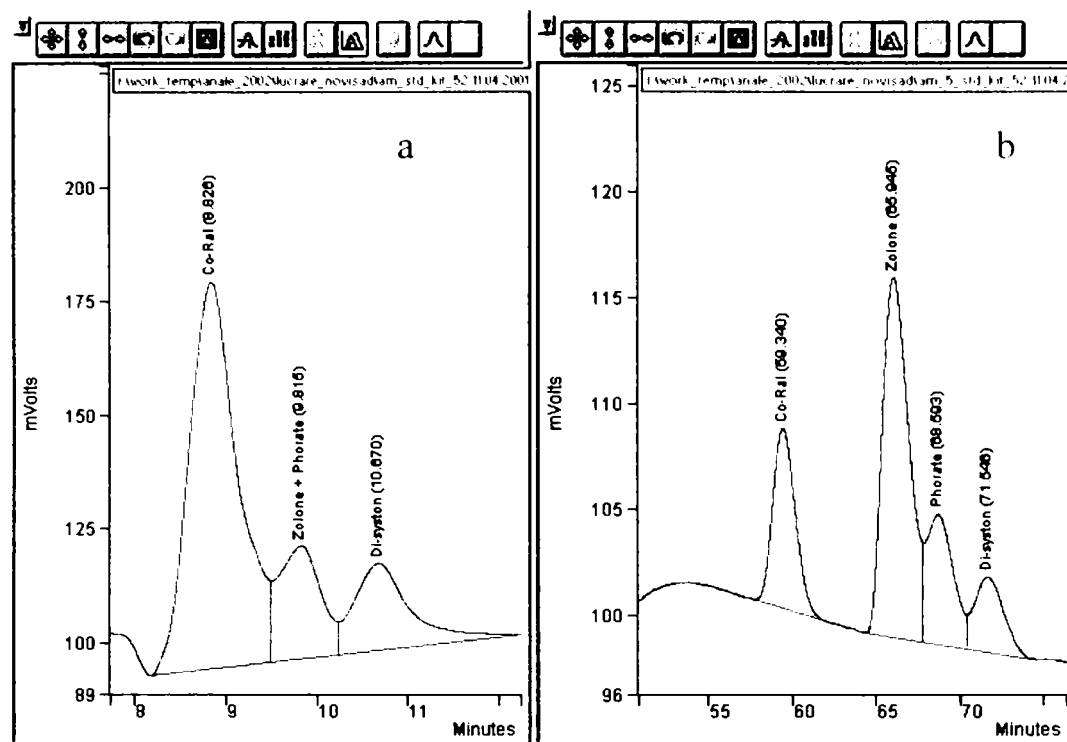


Figura II.1.22. Separarea amestecului de Co-Ral, zolone, phorate și Di-Siston în regim izocratic, cu 75% metanol (cromatograma a) respectiv 60% metanol (cromatograma b).

Figura II.1.22 arată prin urmare destul de clar că amestecul binar metanol-apă nu va putea conduce la atingerea unei rezoluții de separare acceptabile într-un interval de timp rezonabil (mai mic de 30 min).

Următoarea opțiune a fost aceea de a introduce în faza mobilă un al treilea component, acetonitrilul, care să nuanțeze proprietățile de eluție ale fazei mobile. Datorită prețului său mai mare și a toxicității mai accentuate (în raport cu metanolul), s-a urmărit folosirea într-o proporție cât mai redusă a acestuia. În figura II.1.23 sunt prezentate cromatogramele separării pesticidelor luate în studiu pentru trei faze mobile ternare, metanol-acetonitril-apă, a căror concentrație a metanolului variază în intervalul 45-55%. Concentrația de acetonitril a fost menținută constantă la 20%

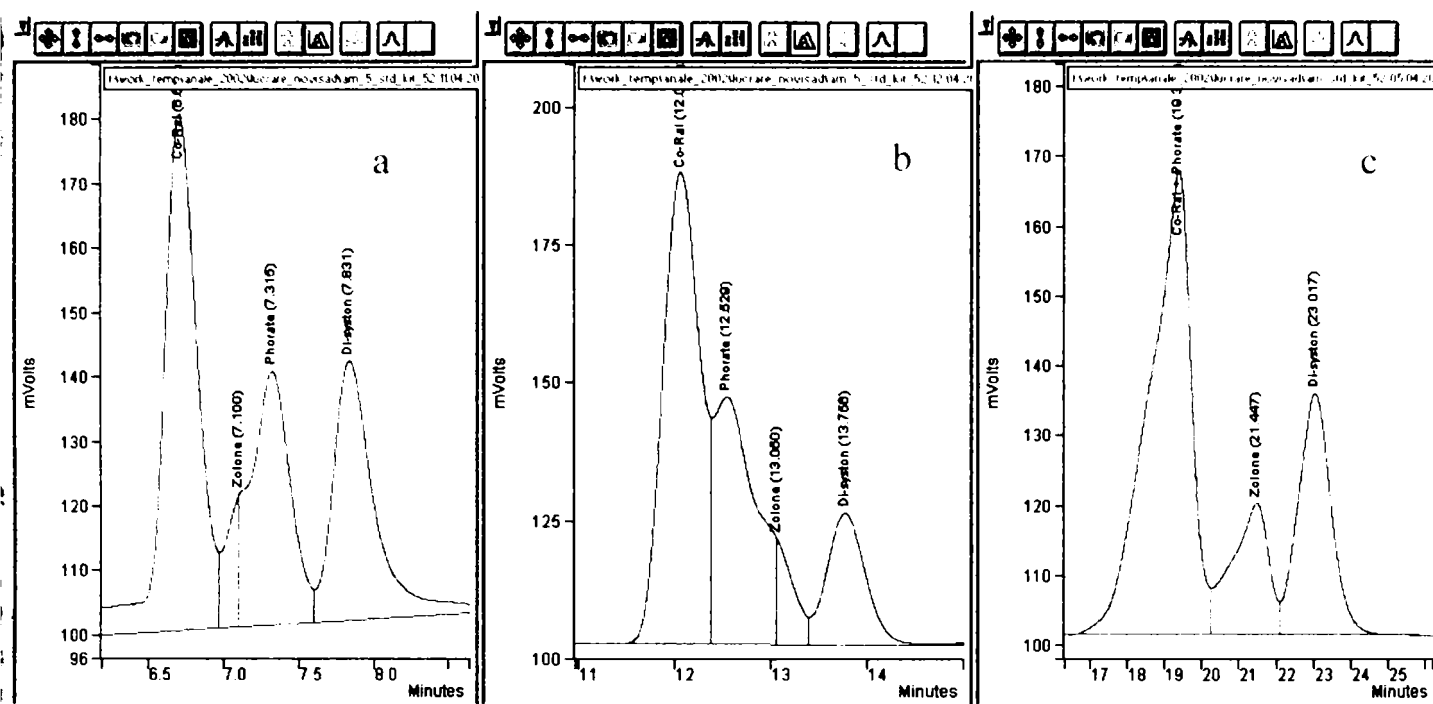


Figura II.1.23. Separarea amestecului de Co-Ral, zolone, phorate și Di-Siston în regim izocratic, cu 20% acetonitril în faza mobilă și 55% metanol (cromatograma a), 50% metanol (cromatograma b) respectiv 45% metanol (cromatograma c).

Se poate observa că pentru 45% metanol în faza mobilă apare o inversare a ordinii de retenție a perechii zolone-phorate în raport cu celelalte două situații. Devine evident astfel că cei 2 analiți, zolone și phorate, interacționează diferit, ca intensitate, cu moleculele de fază mobilă. Una din posibilele explicații poate fi legată de numărul diferit de legături de hidrogen formate, pe de o parte, între zolone și phorate (mai multe în cazul zolonei – vezi structurile lor chimice) și moleculele de metanol de cealaltă parte. Se ajunge astfel ca, la nivel global, retenția zolonei pe faza staționară să crească într-o proporție mai accentuată decât în cazul phorate-ului odată cu scăderea concentrației în metanol a fazei mobile. Din păcate, această inversare în ordinea de retenție nu poate fi folosită în scopul atingerii unei separări ideale din cauza prezenței analitului Co-Ral în zona timpilor de retenție mai scăzuți. Astfel, în condițiile dispariției coeluției perechii zolone-phorate apare noua coeluție phorate - Co-Ral (fig. II.1.23, cromatograma c).

Următoarea opțiune a fost aceea de a menține constantă concentrația apei în faza mobilă și de a crește concentrația acetonitrilului. În figura II.1.24 sunt prezentate efectele acestei abordări asupra separării cromatografice ale celor 4 analiți.

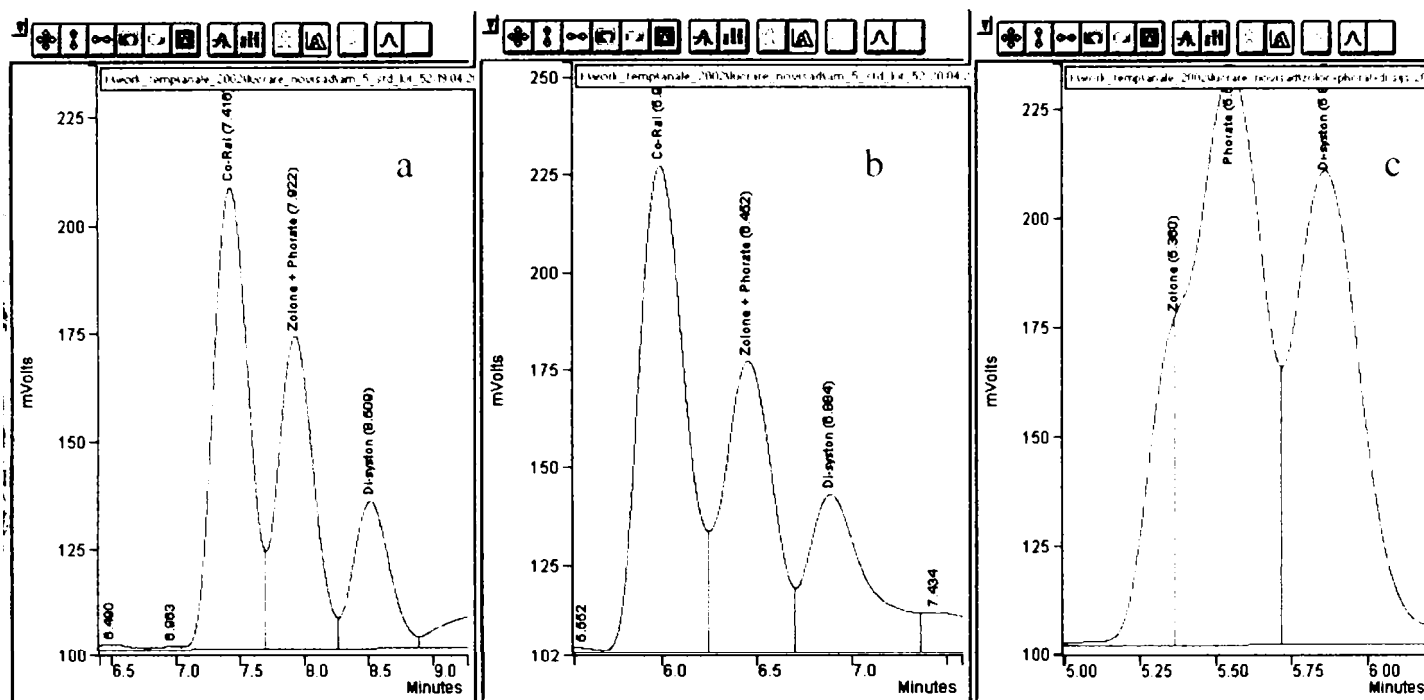


Figura II.1.24. Separarea amestecului de Co-Ral, zolone, phorate și Di-Siston în regim izocratic, cu 25% apă în faza mobilă și 30% acetonitril (cromatograma a), 40% acetonitril (cromatograma b) respectiv 55% acetonitril (cromatograma c).

Se poate observa ușor că nu apar inversări ale ordinii de retenție ale celor 4 analiți. Din păcate, în intervalul de lucru al concentrației de acetonitril, 30-55%, rezoluțiile de separare nu s-au îmbunătățit. Totuși, o observație utilă o dă comatograma c din figura II.1.24 prin faptul că oferă speranța rezolvării coeluției perechii zolone-phorate.

După cum am amintit la început, scopul inițial al studiului a fost acela de a evita lucrul în condiții de gradient de compoziției a fazei mobile (fază consumatoare de timp și solvenți organici) precum și acela de a utiliza doar metanolul, nu și acetonitrilul, în compoziția fazei mobile. Din păcate, studiile următoare au demonstrat faptul că numai amestecul binar acetonitril-apă posedă suficientă capacitate de discriminare a celor 4 analiți studiați. Figura II.1.25 prezintă variația timpilor de retenție pt cei 4 analiți în raport cu concentrația acetonitrilului în faza mobilă.

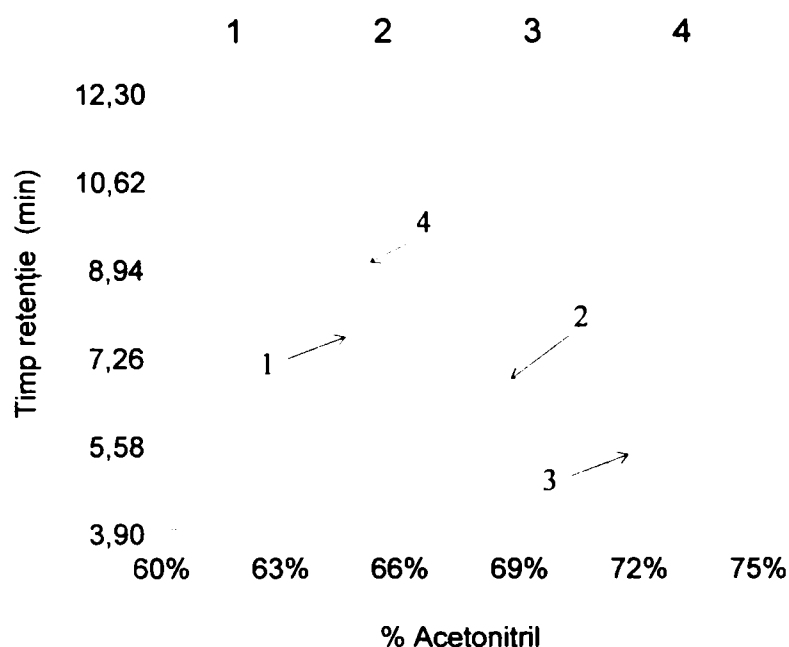


Figura II.1.25. Variația timpilor de retenție ai celor 4 pesticide organofosforice cu concentrația acetonitrilului în faza mobilă; Co-Ral - 1, phorate - 2, zolone - 3, Di-Siston - 4. Condițiile cromatografice de lucru sunt identice cu cele din figura II.1.24.

Se poate observa faptul că în zona concentrațiilor joase ale domeniului (60%) se înregistrează coeluția dintre zolone și phorate în timp ce în zona concentrațiilor ridicate de acetonitril (75%) vom întâmpina problema coeluției dintre phorate și Di-Siston. Graficul a fost obținut pe baza a 6 experimente, cu faze mobile spațiate din 5 în 5% acetonitril în faza mobilă, pentru soluțiile standard individuale ale celor 4 analiți studiați. Astfel, s-a putut concluziona că în domeniul de concentrații al acetonitrilului de 66 - 69% ar trebui să se poată obține rezolvarea acceptabilă a separării celor 4 analiți. Verificarea experimentală a acestei predicții este prezentată în figura II.1.26. Cromatograma de aici prezintă separarea lor cu o fază mobilă binară, 68% acetonitril - 32% apă, într-un timp de aproximativ 8 minute.



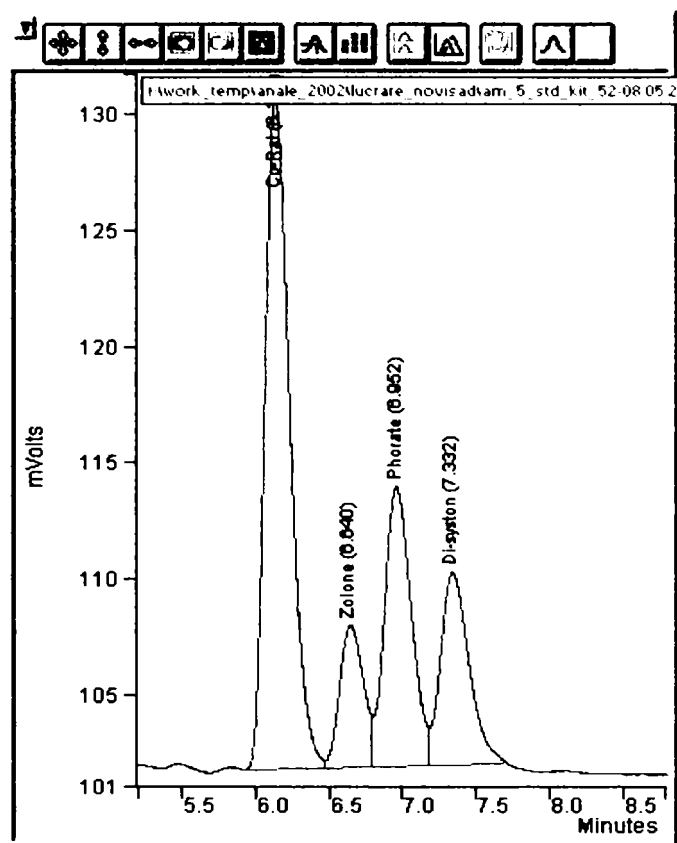


Figura II.1.26. Separarea amestecului de Co-Ral, zolone, phorate și Di-Siston în regim izocratic; faza mobilă: 68% acetonitril – 32 % apă.

II.1.5. Separarea RP-HPLC a unui număr de cinci pesticide organoclorurate puternic hidrofobe [118]

Structurile chimice ale celor cinci pesticide organoclorurate separate cromatografic sunt prezentate în figura II.1.27.

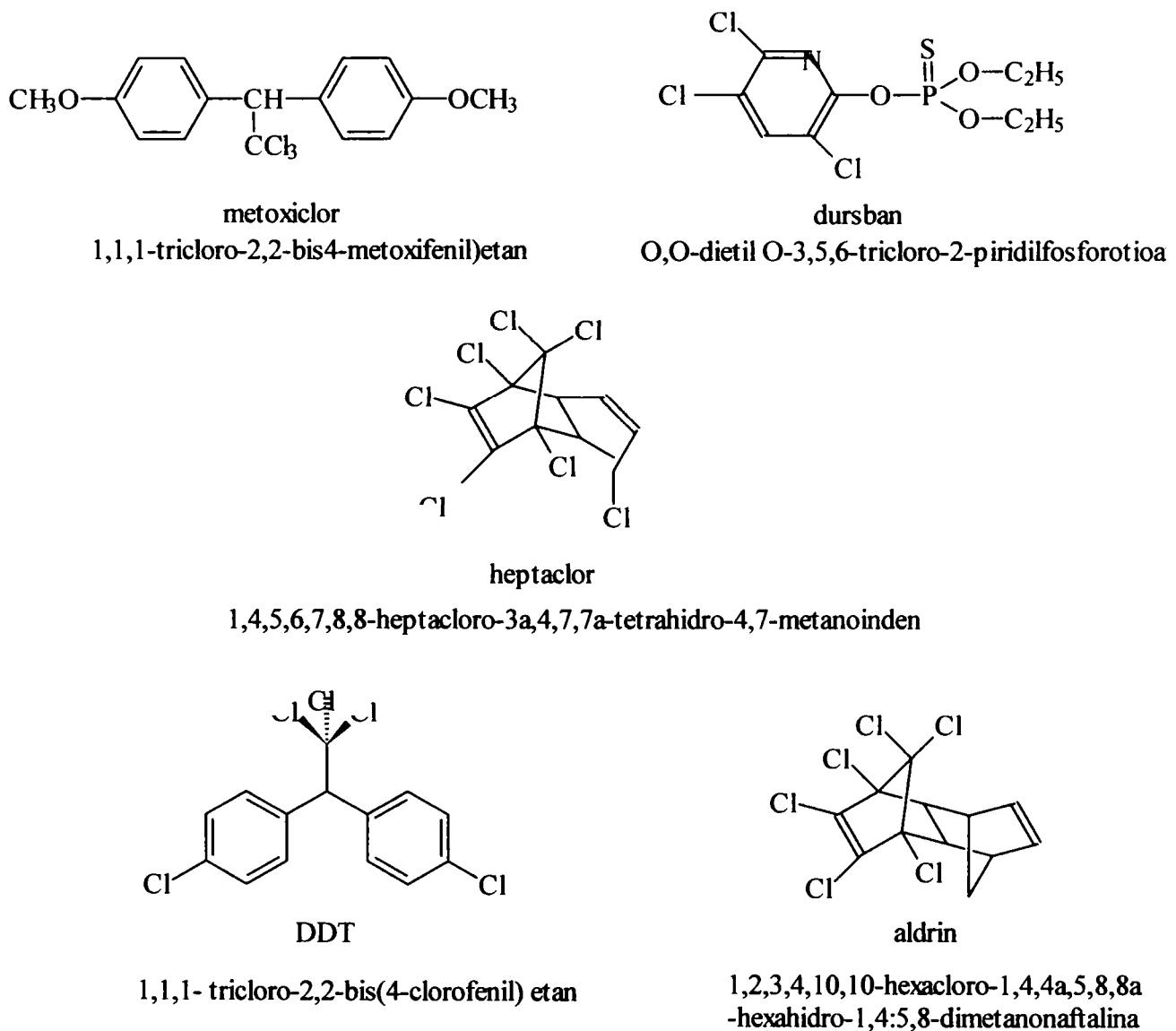


Figura II.1.27. Cinci pesticide organoclorurate puternic hidrofobe separate cromatografic.

Pentru cele 5 pesticide organoclorurate studiate, valorile logP, din baze de date experimentale, sunt [16]:

- Metoxiclor – 5,08
- Dursban – 4,96
- Heptaclor – 5,47
- DDT - 6,91
- Aldrin - 6,50

## MATERIALE ȘI METODE

*Reactivi.* Standardele de pesticide (produse Supelco), clorura de metilen și metanolul (produse Merck) au fost de puritate HPLC. S-a folosit doar apă proaspăt bidistalată.

*Soluțiile standard de pesticide.* Standardele au fost dizolvate în clorură de metilen și diluate corespunzător cu faza mobilă. Înainte de injectare, soluțiile au fost filtrate pe filtre Millipore de 0,2 μm.

*Sistemul HPLC.* Echipamentul HPLC a fost compus din următoarele module: pompa HPLC modul tip 126 Beckman, detector UV modul tip 166 Beckman, ambele conectate la un calculator tip IBM Pentium II și controlate prin software-ul Gold<sup>TM</sup> Nouveau. Detecția s-a realizat la 220 nm. Probele au fost injectate în volum de 50 μL, cu un autosampler tip Prostar 430 Varian și controlat cu software-ul Star Chromatography Workstation, ver. 5.50, Varian.

Experimentele au fost realizate folosind ca fază staționară o coloană TRACER EXTRASIL ODS2, 150 x 4 mm, d<sub>p</sub> 3 μm. (Teknokroma®). Fazele mobile au fost degazate și filtrate pe filtre de 0,2 μm, înainte de utilizare. Compozițiile fazelor mobile sunt specificate în legendele figurilor. Eluarea s-a realizat izocratic la viteze volumetriche de curgere de 0,70 mL min<sup>-1</sup>, la temperatura camerei.

## REZULTATE ȘI DISCUȚII

Datorită valorilor ridicate ale  $\log P$  (în domeniul 5 – 7), pesticidele organoclorurate luate în studiu pot fi eluate într-un timp de lucru rezonabil de pe coloanele cromatografice utilizate în RP-HPLC cu condiția ca faza mobilă să aibă o concentrație ridicată de modificator organic. Pentru grupul de 5 pesticide organoclorurate format din metoxiclor, dursban, heptaclor, DDT și aldrin, o serie de experimente de testare au arătat că 80% metanol reprezintă varianta optimă. Timpul necesar separării cromatografice a fost de aproximativ 27 minute (figura II.1.28).

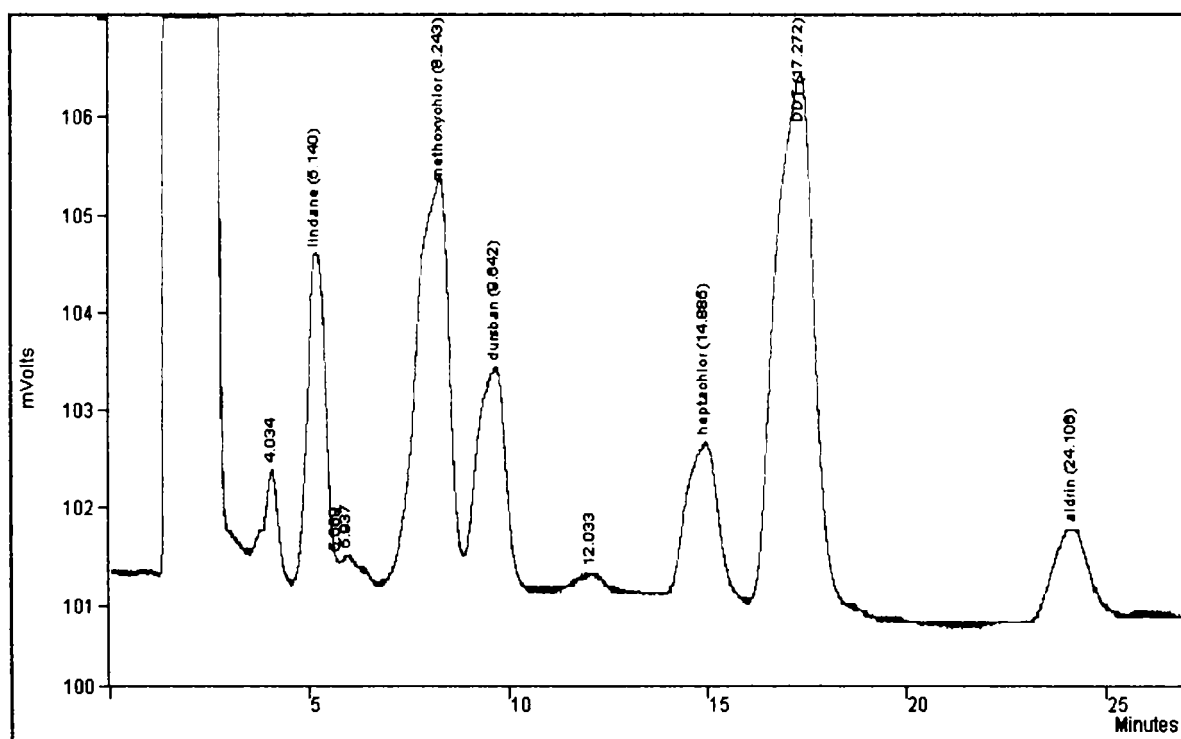


Fig. II.1.28. Cromatograma separării grupului format din pesticidele: metoxiclor, dursban, heptaclor, DDT și aldrin. F.M: 80% MeOH, 20% H<sub>2</sub>O, pH 3.

Notă: picul cromatografic de la  $t = 5,14$  min aparține lindanului. Acest analit a fost introdus în amestec doar pentru a verifica retenția, în condițiile cromatografice utilizate, a pesticidelor cu valoarea medie a  $\log P$  (pentru lindan  $\rightarrow \log P = 3,72$  [4]).

## Capitol II.2. Influența unor parametri de lucru asupra eficienței etapei de pregătire a probei din cadrul unei metode HPLC de identificare și cuantificare a unui set de 5 pesticide organoclorurate din apa potabilă

II.2.1. Optimizarea unor parametri de lucru din cadrul etapei de pregătire a probei realizată prin extracție lichid-lichid [119]

Cele 5 pesticide organoclorurate studiate sunt cele prezentate în fig. II.1.27.

### MATERIALE ȘI METODE

*Reactivi.* vezi subcapitolul II.1.5.

*Soluții standard de pesticide organoclorurate* – soluțiile S1 și S3 au fost preparate prin dizolvarea în clorură de metilen și filtrarea pe filtre Millipore de 0,2 μm.

*Soluția de lucru de apă bidistilată suplimentată cu standarde de pesticide (T1)* – 1,0 mL soluție standard S1 s-au pipetat în balon cotat cu volumul nominal  $V = 50$  mL, s-a adăugat apă bidistilată până la  $\frac{3}{4}$  din volumul balonului, s-a agitat aproximativ 15 min pe un aparat tip vibrofix și s-a adus la semn.

Tabelul II.2.1. Concentrațiile în analiții studiați ale soluțiilor de lucru

Denumire analit	Concentrații, în mg/L, în soluția S1	Concentrații, în mg/L, în soluția S3	Concentrații teoretice, în mg/L, în soluția T1*
Metoxiclor	8,36	11,5	0,1672
Dursban	10,32	18,0	0,2064
Heptaclor	11,96	9,0	0,2392
DDT	10,20	13,0	0,2040
Aldrin	9,60	10,0	0,1920

\* Notă – pentru soluția T1 au fost trecute valorile teoretice ale concentrațiilor analiților; dovezile experimentale și datele de literatură atestă faptul că pentru metoxiclor, heptaclor, DDT și aldrin concentrațiile teoretice din soluție depășesc limitele de solubilitate în apă la 25°C.

*Sistemul HPLC.* Echipamentul HPLC a fost compus din următoarele module: pompa HPLC modul tip 126 Beckman, detector UV modul tip 166 Beckman, ambele conectate la un calculator tip IBM Pentium II și controlate prin software-ul *Gold<sup>TM</sup> Nouveau*. Detecția s-a realizat la 220 nm. Probele au fost injectate cu un autosampler *Prostar 430 Varian* și controlat cu software-ul dedicat *Star Chromatography Workstation, ver. 5.50, Varian*. Același software a fost utilizat pentru prelucrarea cromatogramelor.

*Sistem de agitare tip „du-te - vino” Minitherm Shaker pentru extracția lichid-lichid a probelor.*

*Rotavapor KRvr BUCHI 65/45.*

*Coloana HPLC.* LiChrosorb RP18, 150 x 4,6 mm,  $d_p$  5  $\mu$ m (VARIAN).

*Fazele mobile.* Au fost degazate și filtrate pe filtre de 0,2  $\mu$ m înainte de utilizare. Fazele mobile sunt soluții metanol/apă, tamponate la pH ~ 3 cu soluții de acid fosforic. Eluarea s-a realizat izocratic la debitul de curgere 1 mL min<sup>-1</sup>, la temperatura camerei.

*Experimentele.*

**Experimentul 1.** 50 mL soluție de lucru T1 au fost supuși la două extracții, cu câte 25 mL diclormetan, într-un vas Erlenmeyer cu dop rodat de 200 mL, pe un sistem de agitare „du-te – vino”, timp de 2 ore. După fiecare extracție separarea fazelor s-a realizat într-o pâlnie de separare. Cele două extracte organice, notate cu F1 respectiv F2, au fost trecute într-o capsulă de porțelan și evaporate pe baie de nisip până la sec. Reziduul final, notat cu F, s-a reluat cu 1,5 - 2 mL acetonitril și s-a adus la semn la 2,0 mL.

**Experimentul 2.** S-au suplimentat 500 mL diclormetan cu 200  $\mu$ L soluție standard S3 apoi s-au trecut în balonul rotavaporului. S-a reglat temperatura băii de apă și vidul din sistem astfel încât fierberea să nu fie violentă. S-a concentrat la sec, s-a reluat reziduul cu 3-4 mL acetonitril, s-a reconcentrat până la aproximativ 1 mL apoi s-a adus la semn la 1,0 mL.

**Experimentul 3.** S-au extras 1000 mL probă (apă de rețea colectată în incinta Institutului de Sănătate Publică Timișoara și suplimentată cu 200  $\mu$ L soluție S3) cu 500 mL diclormetan într-o pâlnie de separare; operația trebuie executată energic, timp de cel puțin 1,5 ore, la temperatura camerei. Extractul organic (după separarea celor două faze) s-a evaporat în rotavapor, la vid, până la sec. În continuare s-a procedat similar experimentului 2.

*Notă:* toate extractele acetonitrilice au fost filtrate pe filtru PTFE 0,2  $\mu$ m după care s-au injectat câte 50  $\mu$ L în sistemul lichid-cromatografic.

## REZULTATE ȘI DISCUȚII

**Experimentul 1.** S-a estimat, pentru fiecare etapă a procesului, procentajul de recuperare în analiții de interes în raport cu cantitatea preluată din etapa precedentă. Verificarea concentrațiilor în analiții de interes în toate soluțiile s-a efectuat prin injecții directe în sistemul HPLC, în aceleași condiții cromatografice. Datele obținute sunt sintetizate în tabelele II.2.2 și II.2.3.

Tabelul II.2.2. Cantitățile de analit din fiecare fază a prelucrării probei

Denumire analit	mg analit în 1 mL soluție S1	mg analit în 50 mL soluție T1	mg analit în 25 mL soluție F1	mg analit în 25 mL soluție F2	mg analit în 2 mL soluție F
Metoxiclor	8,857	3,55	2,675	Sld	1,518
Dursban	9,384	4,80	2,175	Sld	1,134
Heptaclor	8,451	1,75	0,825	Sld	Sld
DDT	9,497	4,25	1,400	Sld	2,364
Aldrin	8,618	Sld	Sld	Sld	Sld

Notă: Sld = sub limita de detecție la 220 nm și volum de injecție 50  $\mu$ L.

Tabelul II.2.3. Procentul de recuperare al analiților pentru fiecare fază a prelucrării probei

Denumire analit	Recuperare (%), Prepararea sol. T1	Recuperare (%) *, Extracția L-L în 2 etape	Recuperare (%), Concentrarea extractului organic pe baie de nisip	Recuperare globală (%)
	S1 1 mL $\rightarrow$ T1 50 mL $\rightarrow$ F1 25 mL + F2 25 mL $\rightarrow$ F 2 mL			
Metoxiclor	40,08	73,35	56,75	17,14
Dursban	51,15	45,31	52,14	12,08
Heptaclor	20,71	47,14	0	0
DDT	44,75	32,94	168,86	24,89
Aldrin	0	0	0	0

\* Notă – s-a calculat randamentul pentru întreaga etapă de extracție L-L, cumulat pentru ambele extracții, deoarece nu s-a detectat prezența analiților de interes în soluția F2.

**Experimentul 2.** În vederea estimării eficienței concentrării extractului organic prin evaporare la vid, s-a determinat procentul de recuperare al analiților din diclormetan suplimentat cu cantitate cunoscută de analiți. Tabelul II.2.4 prezintă valorile acestor recuperări iar figura II.2.1 prezintă cromatogramele obținute pentru soluția standard S3 și extractul acetonitrilic rezultat în urma concentrării la rotavapor.

Tabel II.2.4. Recuperările atinse în urma evaporării diclormetanului în rotavapor.

Denumire analit	$A_{pic}$ în sol.std. POC (vol. injecție 20 $\mu$ L)	$A_{pic}$ teoretică (corespunzător inj. de 50 $\mu$ L)	$A_{pic}$ practic (în soluția cu volum final de 1 mL) (vol. injecție 50 $\mu$ L)	Recuperare (%)
Metoxiclor	227549	113774	77878	68,45
Dursban	212678	106339	126479	118,94
Heptaclor	73347	36673	32653	89,04
DDT	318166	159083	177689	111,69
Aldrin	90307	45153	Integrare imposibilă	-

Se remarcă faptul că recuperările atinse prin utilizarea rotavaporului pentru concentrarea extractului organic sunt superioare celor obținute în urma evaporării pe baie de nisip la presiune atmosferică (vezi tabelul II.2.3). Pentru metoxiclor s-a obținut un % mai mic din cauza interferenței cu o impuritate (coeluția parțială a picului de interes cu picul de impuritate), fapt ce a condus la o valoare a ariei integrate de către software mai mică decât cea reală; în cazul aldrinului a avut loc o dezechilibrare temporară a echilibrului sistemului fază-staționară-fază mobilă și, implicit, o destabilizare a liniei de bază.



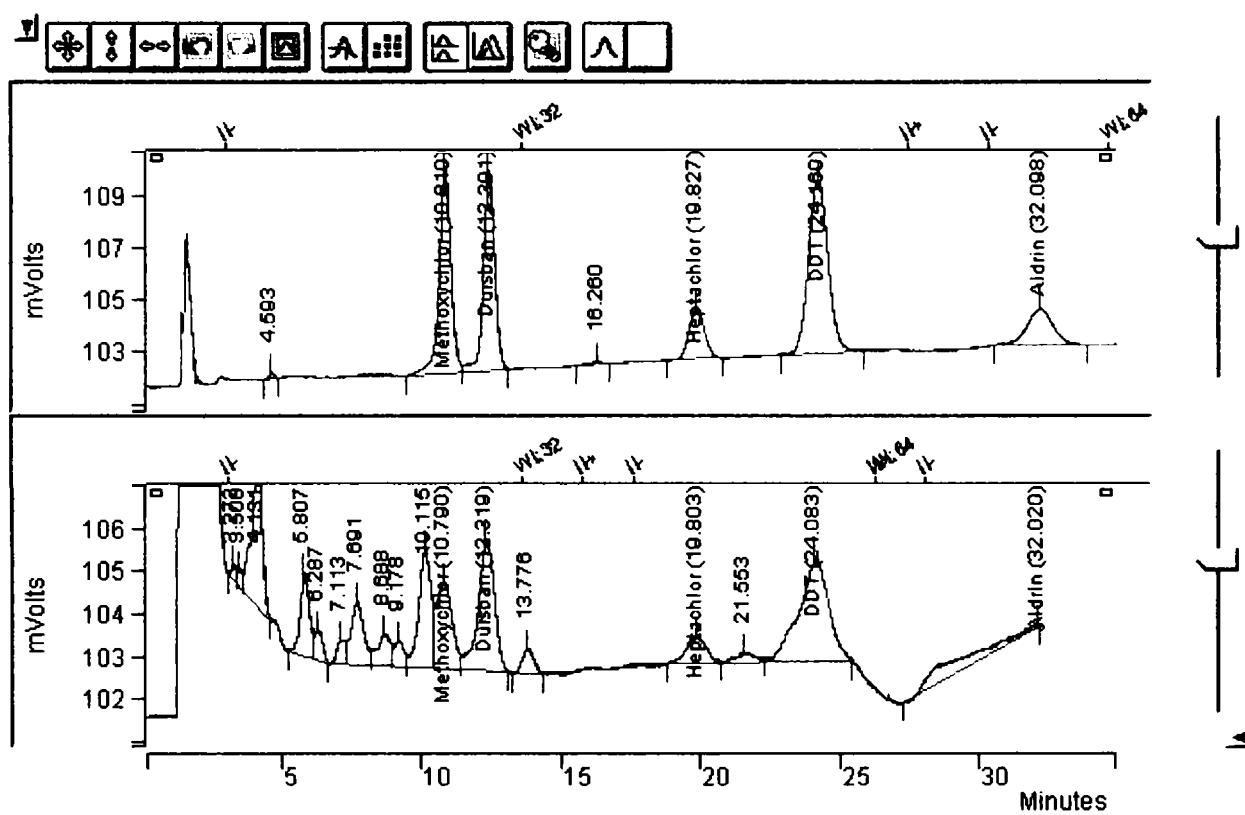


Figura II.2.1. Cromatogramele separării grupului de pesticide metoxiclor, dursban, heptaclor, DDT și aldrin din soluția standard S3 (panoul superior – volum injecție 20 µL) și a extractului acetonitrilic rezultat în urma concentrării la rotavapor a 500 mL diclormetan suplimentați cu 200 µL soluție standard S3 (panoul inferior– volum injecție 50 µL). Faza mobilă: 80% MeOH, 20% H<sub>2</sub>O.

### Concluzii parțiale

- ❖ trebuie avut în vedere atunci când se efectuează experimente cu probe de apă distilată fortifiată (suplimentate) cu standarde de compuși puternic hidrofobi faptul că solubilizarea acestora reprezintă, în general, o problemă semnificativă, mai ales în cazul preparării de soluții de concentrații apropiate de limita de solubilitate a analiților de interes. Acest tip de soluții este necesar însă pentru a putea estima (pe baza detecției în UV) concentrațiile în respectivii analiți înainte și după etapa analitică monitorizată. Prin urmare este necesar a se stabili concentrația reală a analiților de interes în soluția cu care se lucrează.
- ❖ Este ciudat faptul că, deși în urma primei faze a extracției cu diclormetan s-au atins randamente mici (< 50 %, cu excepția metoxiclorului), a 2-a fază de extracție nu a reușit să

mai solubilizeze cantități detectabile de analiți de interes (bineînțeles, în limitele detecției la 220 nm și 50  $\mu$ L volum de injecție).

- ❖ În urma etapei de concentrare a extractului organic prin evaporarea solventului organic pe baie de nisip se confirmă randamentele mici de recuperare a analiților cu excepția DDT unde s-a înregistrat o deviație pozitivă aberantă la integrarea suprafeței picului cromatografic. Fenomenul se datorează probabil interferenței cromatografice (coeluție) cu o impuritate a cărei concentrație în soluție a crescut în urma evaporării solventului organic, ipoteză susținută și de forma picului cromatografic (platou în zona apexului).

**Experimentul 3.** S-a realizat *estimarea unor parametri de performanță ai metodei (limita de cuantificare și bias-ul) pentru matricea „apă de băut”*. Tabelul II.2.5 prezintă valorile recuperărilor atinse în urma aplicării protocolului de lucru utilizat în cadrul experimentului 3 pe o probă de apă de rețea colectată în incinta Institutului de Sănătate Publică Timișoara suplimentată cu o cantitate cunoscută de analiți de interes. Figura II.2.2 prezintă cromatogramele obținute pentru soluția standard S3 și proba de apă de rețea colectată în incinta Institutului de Sănătate Publică Timișoara suplimentată cu o cantitate cunoscută de analiți de interes.

Tabelul II.2.5. Recuperările atinse în urma aplicării metodei propuse pentru o probă de apă de rețea colectată în incinta Institutului de Sănătate Publică Timișoara și suplimentată cu 200  $\mu$ L soluție standard S3.

Denumire analit	$A_{pic}$ în sol.std. S3 (vol. inj. 20 $\mu$ L)	Apic teoretică (corespunzător inj. 50 $\mu$ L)	$A_{pic}$ practic (în sol. cu vol. final 1 mL) (vol. inj. 50 $\mu$ L)	Recuperare (%)
Metoxiclor	223004	111502	111542	100,03
Dursban	213072	106536	45762	42,95
Heptaclor	75540	37770	25350	67,12
DDT	315206	157603	139370	88,43
Aldrin	77501	38750	29484	76,09

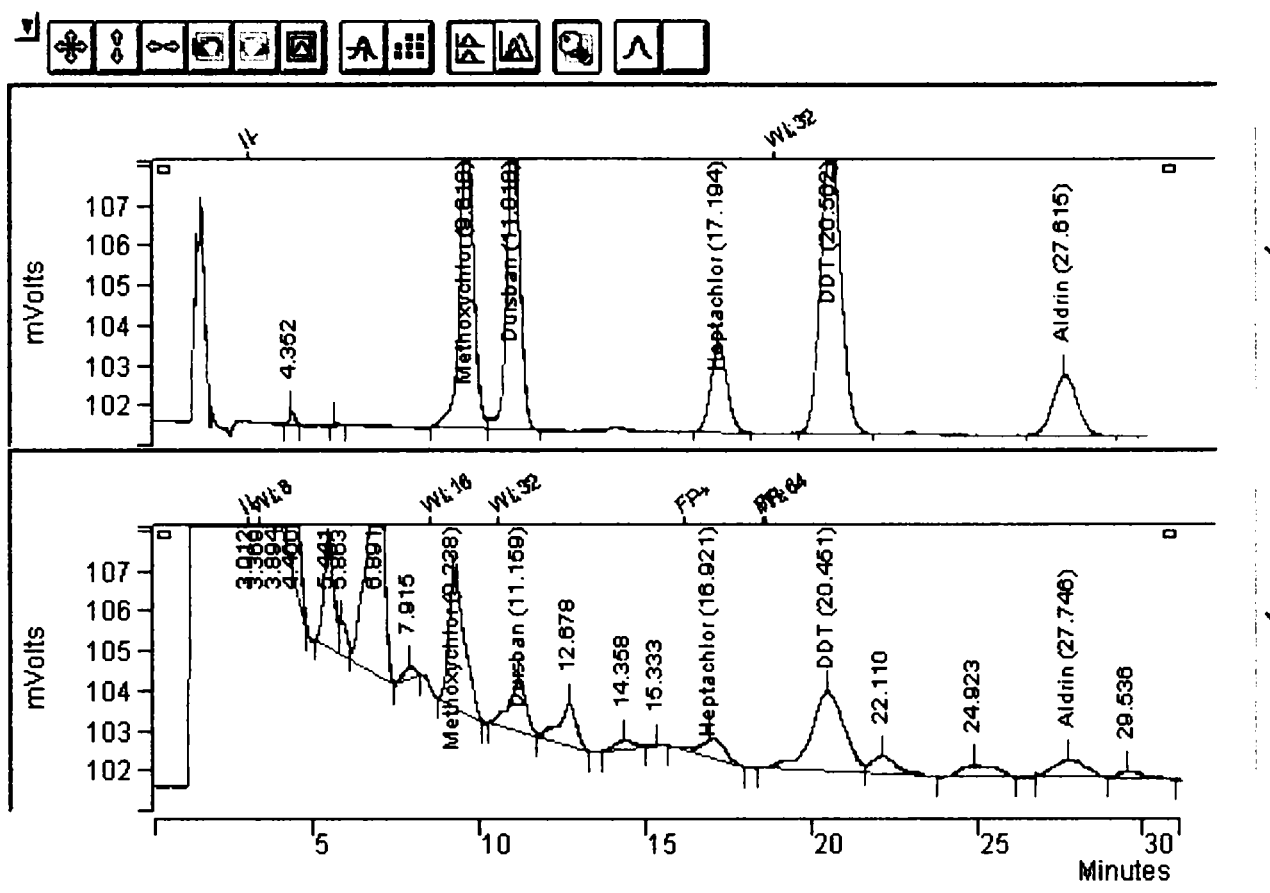


Figura II.2.2. Cromatogramele separării grupului de pesticide metoxiclor, dursban, heptaclor, DDT și aldrin din soluția standard. S3 (panoul superior– volum injecție 20  $\mu$ L) și a probei de apă de rețea colectată în incinta Institutului de Sănătate Publică Timișoara, suplimentată cu 200  $\mu$ L soluție standard S3 (panoul inferior– volum injecție 50  $\mu$ L). Faza mobilă: 80% MeOH, 20% H<sub>2</sub>O.

### Concluzii parțiale

- ❖ Proba de apă de rețea colectată în incinta Institutului de Sănătate Publică Timișoara a fost suplimentată cu 200  $\mu$ L sol. S3 astfel încât concentrațiile teoretice ale analiților de interes să se afle în domeniul 2,0 – 3,6  $\mu$ g/L și picurile cromatografice să fie suficient de puternice în raport cu “zgomotul” liniei de bază. Observând faptul că, pe deoparte, ariile picurilor cromatografice vor putea fi încă integrate relativ corect și la valori mai mici ale concentrației analiților de cel puțin 10 ori (în domeniul 0,20 – 0,36  $\mu$ g/L) iar, pe de altă parte, faptul că volumul de injecție a fost de 50  $\mu$ L (deci jumătate din volumul buclei de injecție, 100  $\mu$ L) și deci se poate dubla sensibilitatea detecției prin

dublarea volumului de injecție, se poate concluziona că limita de cuantificare a metodei este în zona 0,1 – 0,15  $\mu\text{g/L}$  per analit (suficient pentru a corespunde prevederilor legislației naționale) [2, 3].

Principalele dezavantaje ale metodei constau în volumul mare de solvent organic consumat, cu toate consecințele aferente (cost ridicat, lucrul cu cantități însemnate de solvent toxic) și valorile prea mici ale recuperărilor (< 70%) pentru dursban și heptaclor. Avantajele cel mai evidente constau însă în simplitatea metodei, absența etapelor prea laborioase și posibilitatea utilizării cromatografelor de lichide pentru determinarea pesticidelor organoclorurate în laboratoarele care nu au în dotare cromatografe de gaze .

### II.2.2. Testarea performanțelor extracției în fază solidă ca etapă de pregătire a probei [120]

## MATERIALE ȘI METODE

*Reactivi.* – vezi subcapitolul II.1.5.

*Soluții standard de pesticide organoclorurate* – vezi subcapitolul II.2.1.

*Soluțiile de lucru de apă bidistilată suplimentate cu standarde de pesticide:*

*Soluția A* – 12,5 mL soluție standard S4 s-au pipetat în balon cotat de 1000 mL, s-a adăugat apă bidistilată până la  $\frac{3}{4}$  din volumul balonului, s-a agitat aproximativ 15 min pe un aparat tip vibrofix și s-a adus la semn.

*Soluția B* – 1,0 mL soluție standard S4 s-au pipetat în balon cotat de 1000 mL, s-a adăugat apă bidistilată până la  $\frac{3}{4}$  din volumul balonului, s-a agitat aproximativ 15 min pe un aparat tip vibrofix și s-a adus la semn.

Tabelul II.2.6. Concentrațiile în analiții studiați ale soluțiilor de lucru

Denumire analit	Concentrații, în mg/L, în soluția S4	Concentrații, în mg/L, în soluția A	Concentrații, în mg/L, în soluția B
Metoxiclor	1,672	0,0209	0,001672
Dursban	2,064	0,0258	0,002064
Heptaclor	2,392	0,0299	0,002392
DDT	2,040	0,0255	0,00204
Aldrin	1,920	0,0240	0,00192

Sistemul HPLC. – vezi subcapitolul II.2.1.

*Fazele mobile.* – vezi subcapitolul II.2.1; debitul de lucru  $0,7 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ .

*Coloana HPLC.* Tracer Extrasil ODS 2 (*Teknokroma*),  $150 \times 4 \text{ mm}$ ,  $d_{\text{part}} 3 \mu\text{m}$ .

*Cartușele SPE.* Au fost utilizate mai multe tipuri și mărci de cartușe pentru extracție în fază solidă: SPE ExtraSep C18, 100 mg, SEP-PAK WATERS, 360 mg, and SPE-ED Florisil, 500 mg. Condiționarea cartușelor, aplicarea probelor și eluția analiților de interes s-a realizat în conformitate cu recomandările producătorilor.

*Experimentele* – toate au fost efectuate în triplicat. Prin urmare, valorile estimate ale recuperărilor sunt valori medii.

**Experimentul 1.** A constat în trecerea a 200 mL soluție A peste un cartuș SPE ExtraSep C18 100 mg. Aplicarea soluției s-a făcut prin aplicarea unui vid moderat care să asigure un debit de trecere de aproximativ  $6 \text{ mL}/\text{min}$ . Eluția analiților reținuți pe cartuș s-a realizat cu  $1,5 \text{ mL}$  acetonitril (trecuți fără aplicare de vid ci la debitul asigurat de forța gravitațională).

**Experimentul 2.** – similar cu experimentul 1, însă se trec 90 ml soluție A.

**Experimentul 3.** – similar cu experimentul 2, însă se folosește un cartuș SEP-PAK WATERS, 360 mg.

**Experimentul 4.** A constat în trecerea a 300 mL soluție B peste un cartuș SPE ExtraSep C18 100 mg. Aplicarea soluției s-a făcut prin aplicarea unui vid moderat care să asigure un debit de trecere de aproximativ  $6 \text{ mL}/\text{min}$ . Eluția analiților reținuți pe cartuș s-a realizat cu  $1,5 \text{ mL}$  acetonitril (trecuți fără aplicare de vid, la debitul asigurat de forța gravitațională).

**Experimentul 5.** – similar cu experimentul 4, însă se folosește un cartuș SEP-PAK WATERS, 360 mg.

**Experimentul 6.** – similar cu experimentul 4, însă se folosește un cartuș SPE-ED Florisil, 500 mg.

## REZULTATE ȘI DISCUȚII

**Experimentul 1.** Factorul de concentrare atins a fost 133,33 ( $200/1,5$ ). În tabelul II.2.7 sunt prezentate valorile recuperărilor pentru cei 5 analiți de interes, estimate funcție de concentrațiile teoretice și de cele experimentale.

Tabel II.2.7. Recuperările atinse pentru concentrarea de 133,33 ori a soluției A pe cartușul SPE ExtraSep C18, 100 mg.

Denumire analit	Concentrații teoretice, mg/L	Concentrațiile pe baza integrării picurilor cromatografice, mg/L	Recuperare, %
Metoxiclor	2,787	2,102	75,43
Dursban	3,440	2,578	74,94
Heptaclor	3,987	3,150	79,01
DDT	3,400	2,458	72,29
Aldrin	3,200	2,145	67,03

Identificarea analiților s-a făcut pe baza comparării timpilor de retenție cu cei observați în cazul soluțiilor amestec de standarde. Cuantificarea s-a realizat pe baza curbei de etalonare construite prin injectarea soluțiilor amestec de standarde, în seria diluțiilor successive (regresie liniară, cu  $r^2 = 0,9992$ ).

Figura II.2.3 prezintă comparativ cromatogramele injecțiilor soluției standard de amestec de pesticide organoclorurate (panoul superior) și a eluatului acetonitrilic de pe cartușul SPE ExtraSep C18, 100 mg (panoul inferior).

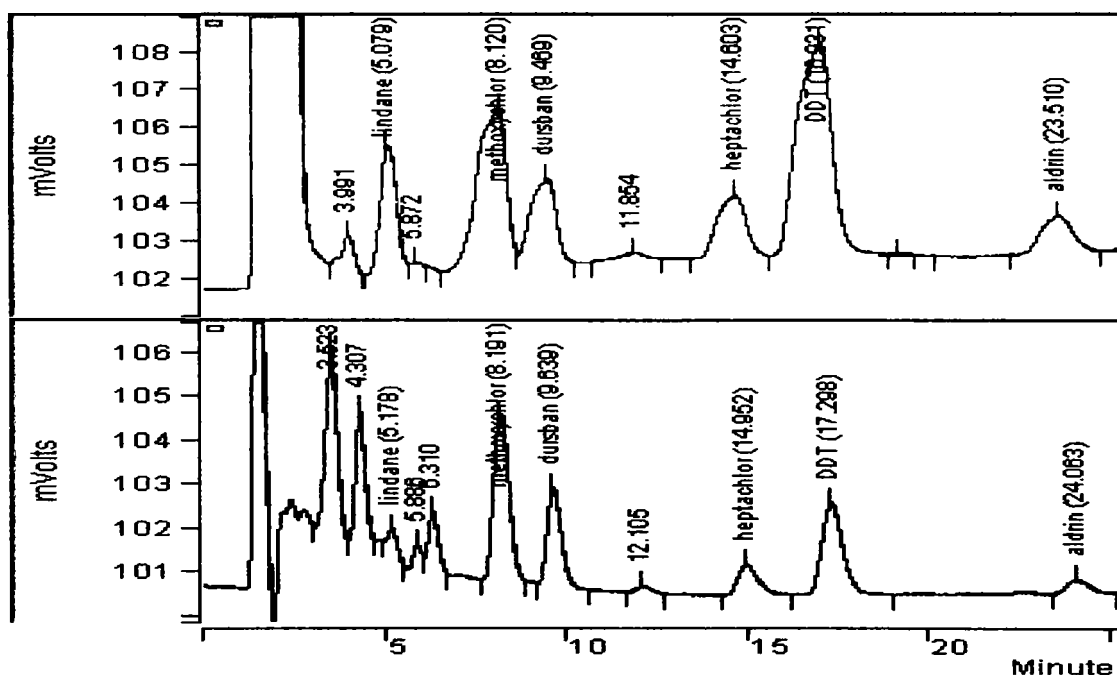


Figura II.2.3. Cromatogramele soluției amestec de standarde (panoul superior) și a eluatului acetonitrilic de pe cartușul SPE ExtraSep C18,100 mg, după concentrarea de 133,33 ori a soluției A (panoul inferior). Faza mobilă: 80% metanol, 20% H<sub>2</sub>O.

**Experimentul 2.** Factorul de concentrare atins a fost 60 (90/1,5). S-a verificat astfel ipoteza că principala cauză a recuperărilor < 80% atinse în experimentul 1 s-ar datora supraîncărcării cartușului SPE cu analiții studiați. În tabelul II.2.8 sunt prezentate valorile recuperărilor pentru cei 5 analiți de interes, estimate funcție de concentrațiile teoretice și de cele experimentale.

Tabel II.2.8. Recuperările atinse pentru concentrarea de 60 ori a soluției A pe cartușul ExtraSep C18, 100 mg.

Denumire analit	Concentrații teoretice, mg/L	Concentrațiile pe baza integrării picurilor cromatografice, mg/L	Recuperare, %
Metoxiclor	1,254	0,987	78,71
Dursban	1,548	1,121	72,42
Heptaclor	1,794	1,452	80,94
DDT	1,530	1,100	72,37
Aldrin	1,440	1,045	72,57

**Experimentul 3.** Factorul de concentrare atins a fost 60 (90/1,5). S-a verificat astfel influența caracteristicilor de adsorbție specifice altui tip de cartuș SPE, conținând tot umplutură solidă C18 dar produs de altă firmă, și anume Sep-Pak, 360 mg (Waters). În tabelul II.2.9 sunt prezentate valorile recuperărilor pentru cei 5 analiți de interes, estimate funcție de concentrațiile teoretice și de cele experimentale.

Tabel II.2.9. Recuperările atinse pentru concentrarea de 60 ori a soluției A pe cartușul Sep-Pak, 360 mg (Waters).

Denumire analit	Concentrații teoretice, mg/L	Concentrațiile pe baza integrării picurilor cromatografice, mg/L	Recuperare, %
Metoxiclor	1,254	1,045	83,33
Dursban	1,548	1,145	72,94
Heptaclor	1,794	1,354	75,47
DDT	1,530	1,125	74,01
Aldrin	1,440	1,102	76,53

Figura II.2.4 prezintă comparativ alura cromatogramelor extractelor acetonitrilice rezultate în urma aplicării tehnicii SPE pe cele două tipuri de cartușe. În ambele cazuri, factorul de concentrare atins a fost 60.

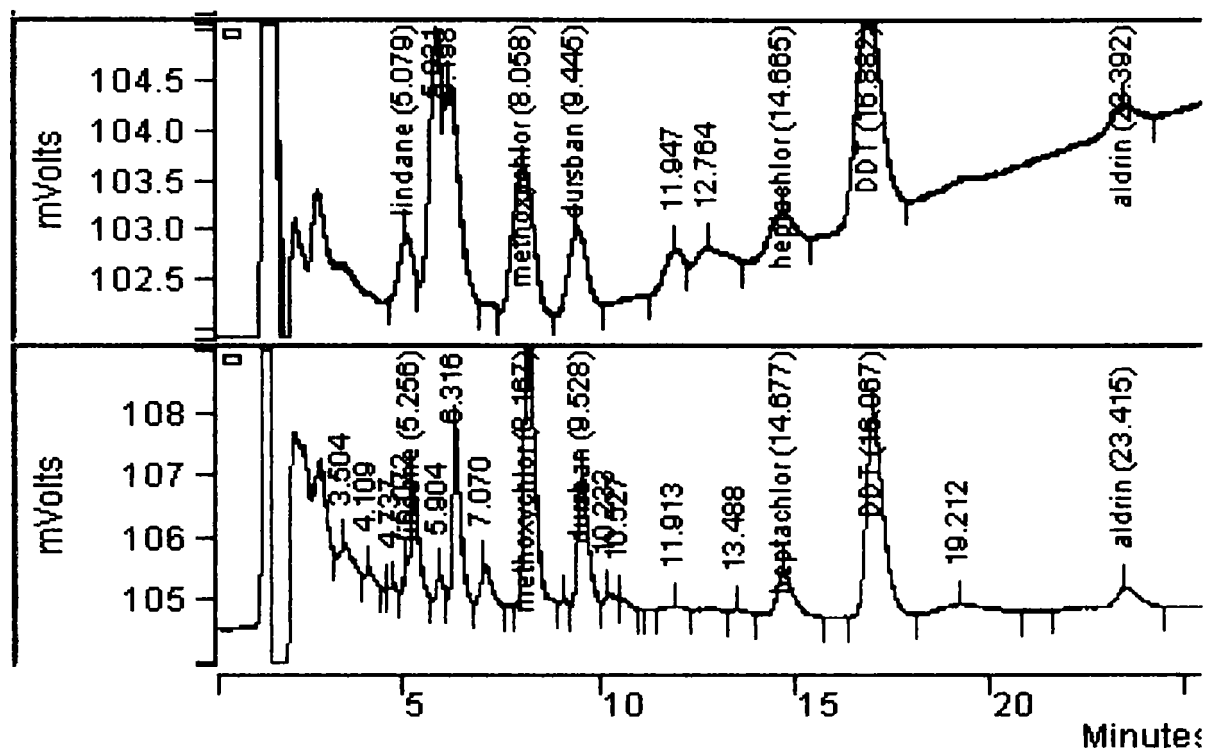


Figura II.2.4. Cromatogramele eluatului acetonitrilic de pe cartușul SPE ExtraSep C18, 100 mg (panoul superior) și a celui de pe cartușul Sep-Pak Waters, 360 mg (panoul inferior). Factorul de concentrare atins a fost 60 în ambele cazuri. Condițiile și parametri separărilor cromatografice sunt aceleași cu cei din figura II.2.3.

**Experimentele 4 și 5.** Factorul de concentrare atins a fost 200 (300/1,5). S-a testat influența concentrației analiților de interes în proba apoasă aplicată peste cartușul SPE. Astfel, soluția B a fost cu un ordin de mărime (mai exact de 12,5 ori) mai diluată în analiți decât soluția A. În tabelul II.2.10 și II.2.11 sunt prezentate valorile recuperărilor pentru cei 5 analiți de interes, estimate funcție de concentrațiile teoretice și de cele experimentale, pentru ambele tipuri de cartușe C18 luate în studiu.



Tabel II.2.10. Recuperările atinse pentru concentrarea de 200 ori a soluției B pe cartușul ExtraSep C18, 100 mg.

Denumire analit	Concentrații teoretice, mg/L	Concentrațiile pe baza integrării picurilor cromatografice, mg/L	Recuperare, %
Metoxiclor	0,334	0,346	103,59
Dursban	0,413	0,475	115,01
Heptaclor	0,478	0,316	66,11
DDT	0,408	0,349	85,54
Aldrin	0,384	0,231	60,16

Tabel II.2.11. Recuperările atinse pentru concentrarea de 200 ori a soluției B pe cartușul Sep-Pak, 360 mg (Waters).

Denumire analit	Concentrații teoretice, mg/L	Concentrațiile pe baza integrării picurilor cromatografice, mg/L	Recuperare, %
Metoxiclor	0,334	0,318	95,21
Dursban	0,413	0,434	105,08
Heptaclor	0,478	0,358	74,89
DDT	0,408	0,351	86,03
Aldrin	0,384	0,303	78,91

În ceea ce privește repetabilitatea experimentelor, dispersia rezultatelor este mai mare în cazul soluției B comparativ cu rezultatele înregistrate pentru soluția mai concentrată A. Astfel, pentru experimentele cu soluția A valorile deviației standard relative nu au depășit 10% pentru nici unul din analiți în timp ce pentru soluția B s-au înregistrat dispersii mai mari, în jurul lui 20%, chiar mai ridicate în cazul heptaclorului ~ 25%.

**Experimentul 6.** Factorul de concentrare atins a fost 200 (300/1,5). S-a testat influența naturii materialului adsorbant al cartușului SPE asupra recuperării analiților de interes. Astfel, s-a aplicat soluția B peste un cartuș umplut cu un material cu caracter polar, Florisilul (suport pe bază de silicat de magneziu). Tabelul II.2.12 prezintă valorile recuperărilor pentru cei 5 analiți de interes iar figura II.2.5. cromatogramele soluției standard de amestec de pesticide organoclorurate respectiv a eluatului acetoneitrilic de pe cartușul SPE-ED Florisil, 500 mg.

Tabel II.2.12. Recuperările atinse pentru concentrarea de 200 ori a soluției B pe cartușul SPE-ED Florisil, 500 mg.

Denumire analit	Concentrații teoretice, mg/L	Concentrațiile pe baza integrării picurilor cromatografice, mg/L	Recuperare, %
Metoxiclor	0,334	0,134	40,12
Dursban	0,413	0,417	100,97
Heptaclor	0,478	-	-
DDT	0,408	0,057	13,97
Aldrin	0,384	0,115	29,95

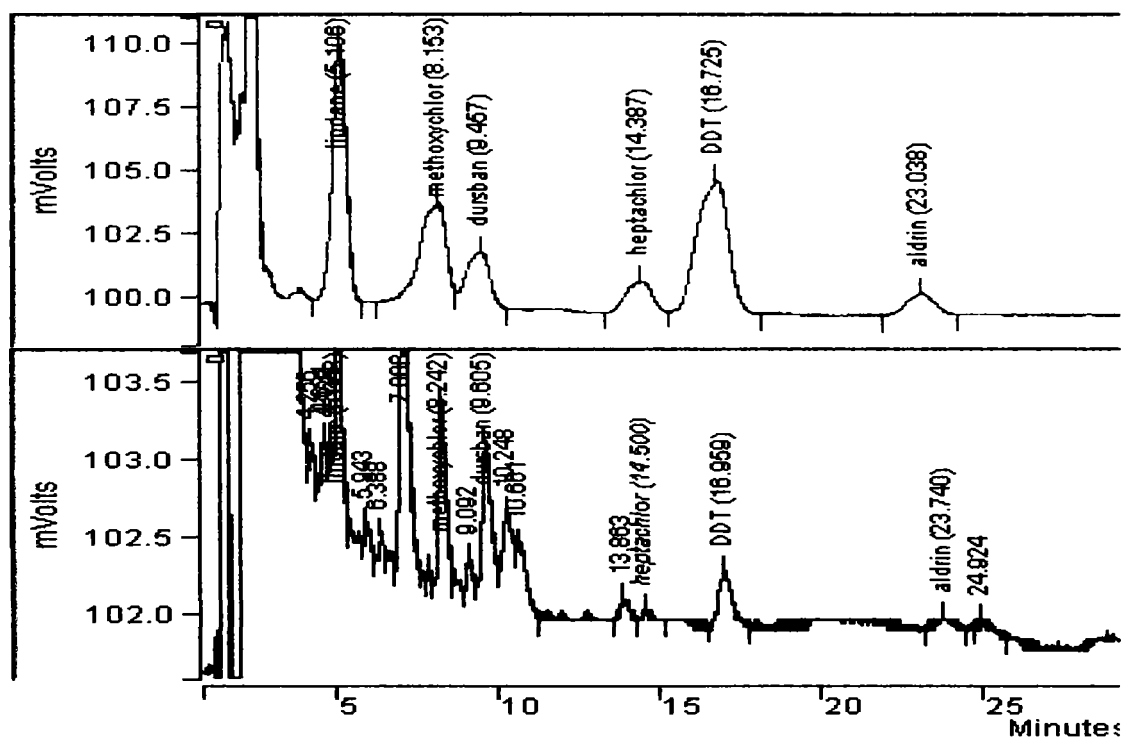


Figura II.2.5. Cromatogramele soluției amestec de standarde (panoul superior) și a eluatului acetonitrilic de pe cartușul SPE-ED Florisil, 500 mg, după concentrarea de 200 ori a soluției B (panoul inferior). Condițiile și parametrii separărilor cromatografice sunt aceleași cu cei din figura II.2.3.

### Capitol II.3. Stabilirea limitărilor de natură instrumentală în utilizarea interfeței „electrospray ionization” și a trapei ionice cuadrupolice la analiza LC-ESI-MS a alchilfenolilor \* [121]

Structurile chimice ale celor 4 compuși alchilfenolici studiați sunt prezentate în fig. II.3.1.

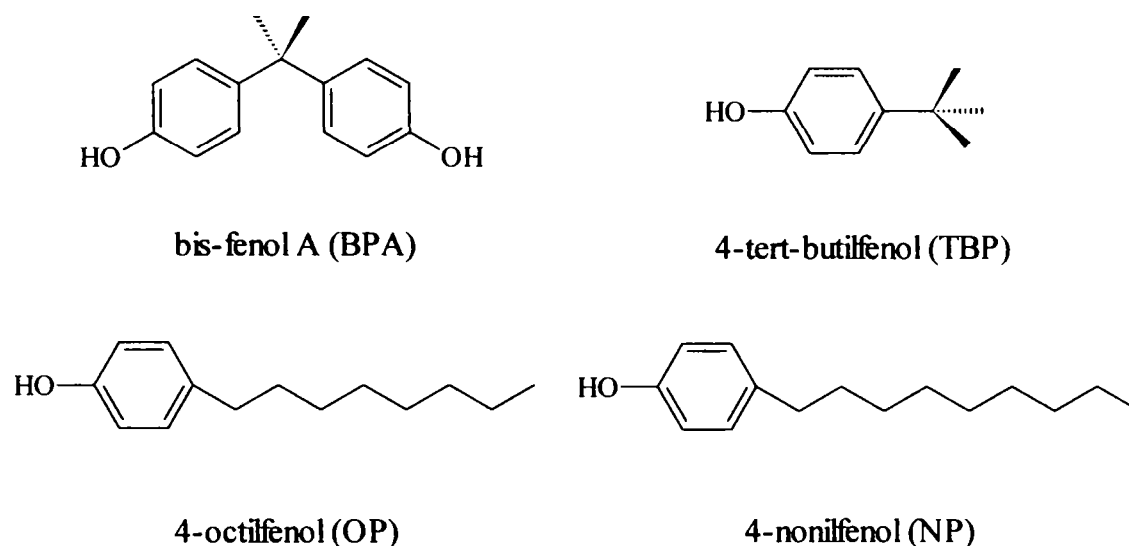


Figura II.3.1. Derivații alchilfenolici analizați prin LC-ESI-MS.

#### MATERIALE ȘI METODE

*Reactivi.* Standardele de bis-fenol A (BPA), 4-terț-butilfenol (TBP), 4-octilfenol (OP) și 4-nonilfenol (NP) (amestec de izomeri de puritate tehnică în cazul nonilfenolului) au fost produse Sigma-Aldrich. Metanolul de puritate “HPLC gradient type” a fost procurat de la firma Merck iar apa pentru cromatografie a fost purificată pe un sistem Milli-Q system (Millipore, Bedford (MA), USA) până la o valoare a conductivității de  $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ .

---

\* Experimentele au fost desfășurate în laboratoarele Institutului de Cercetări asupra Apei din Brugherio (Milano), în cadrul unei burse de cercetare oferite de NATO și Consiliul Național al Cercetării din Italia, pe perioada iulie – decembrie 2004.

*Soluții stoc de standarde de alchilfenoli.* Pentru fiecare analit a fost preparată o soluție stoc individuală de concentrație  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  prin dizolvarea în metanol, la balon cotat, a cantităților corespunzătoare de compus solid. Soluțiile de lucru de standarde individuale precum și cele de amestecuri au fost obținute prin diluții succesive cu metanol a soluțiilor stoc, în domeniul de concentrații  $0,1-10,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ .

*Sistemul HPLC.* *Finnigan Surveyor LC System*; configurația: modulul pentru rezervoarele de solventi *Solvent Platform*, modulul cuaternar de pompe *Finnigan Surveyor LC Pump* (cu degazor încorporat), modulul de injecție automată *Finnigan Surveyor Autosampler* (echipat cu încintă termostabilă pentru coloana cromatografică). Detectia s-a realizat cu ajutorul detectorului de masă cu trapă ionică *Finnigan LCQ Deca XP MAX* (ThermoFinnigan), echipat cu dispozitivul *Finnigan Ion Max universal source* drept interfață (tridimensional reglabilă) între sistemul HPLC și detectorul de masă. Volumul de injecție a fost de  $10 \text{ } \mu\text{L}$ ; temperatura de lucru a coloanei cromatografice a fost menținută constant la  $30^\circ\text{C}$ .

*Coloana HPLC.* Luna Phenyl-Hexyl,  $259 \times 2.0 \text{ mm}$ ,  $d_p 5 \text{ } \mu\text{m}$ , diametrul porilor  $100 \text{ \AA}$ .

*Fazele mobile.* Debitul de curgere a fazei mobile  $0,2 \text{ mL min}^{-1}$ ; eluțiile au fost conduse în regim izocratic, cu faze mobile binare metanol-apă 80: 20 (v/v).

*Experimentele ESI-MS/MS.*

S-au utilizat soluții standard de concentrații în zona  $10 \text{ mg L}^{-1}$ ; ele au fost introduse direct în interfața API (“*atmospheric pressure ionization*”) fără a mai parcurge sistemul HPLC, prin intermediul unei seringi automate. S-a utilizat modul de lucru în ionizare negativă în ideea realizării unei ionizări mai facile a analiților de interes (prezența grupei fenolice în structura acestora). Au fost testate ambele tipuri de interfețe API, ESI („*electrospray ionization*”) și APCI („*atmospheric pressure chemical ionization*”).

Parametri instrumentali de utilizare a interfeței ESI comuni tuturor experimentelor: debitul gazului “cortină” = 36; poziția spațială  $\rightarrow X = 0, Y = 0,25 + 0$ ; potențialul sursei de ionizare  $4,5 \text{ kV}$ ; modul de ionizare: negativ.

Parametri de scanare comuni tuturor experimentelor a. – d.: AGC = ON; numărul de microscanări = 2; timpul de maxim de injecție al ionilor în trapa ionică = 400 msec.

Parametri instrumentali comuni tuturor experimentelor MS/MS: temperatura capilarului =  $250^\circ\text{C}$ ; timpul de activare = 30 msec; fragmentarea în interiorul sursei = OFF (dezactivată).

## REZULTATE ȘI DISCUȚII

Valorile logP ale celor 4 compuși alchilfenolici studiați sunt, conform algoritmului de estimare Daylight CLOGP [122]:

- TBP – 3,31
- BPA – 3,32
- OP – 5,68
- NP – 6,21.

Conform acestor valori, este de așteptat ca, în condițiile utilizării unei faze mobile cu mult modificador organic (pentru scurtarea timpului trecerii cromatografice), perechile TBP-BPA respectiv OP-NP să coelueze parțial sau chiar total. Utilizarea spectrometrului de masă va conduce însă la rezolvarea semnalelor analiților de interes.

### 1. Spectrele MS/MS

Modurile de scanare disponibile pentru detectorul de masă cu trapă ionică sunt: „*full MS*” – achiziția spectrului MS pe un domeniu  $m/z$ ; „*single ion monitoring*” (SIM) – achiziția semnalului unui singur fragment ionic; „MS/MS” - achiziția spectrului MS/MS al unui anume fragment ionic, pe un domeniu definit  $m/z$ ; „*selected reaction monitoring*” (SRM) - achiziția semnalelor unor fragmente ionice din cadrul spectrelor MS<sup>n</sup>.

Rezultatele preliminare au demonstrat că sensibilitatea atinsă pentru varianta ESI este superioară celei atinse cu APCI, pentru toți analiții. Se confirmă astfel că varianta ESI este o tehnică de ionizare mai puțin brutală, mai puțin distructivă (descompuneri mai reduse ale ionului molecular) și că este mai indicată pentru ionizarea compușilor polari.

În tabelul II.3.1 sunt prezentate valorile  $m/z$  ale ionilor precursori, așa-zisii “părinți”, și ale principalilor ioni produși, așa-zisele “fiice”, obținute experimental în cadrul spectrelor MS/MS pentru analiții studiați. În general, spectrele MS/MS oferă avantajul unei înalte selectivități, în condițiile unui sensibilități rezonabile și a unui zgomot redus.

Tabel II.3.1. Valorile m/z ale ionilor precursori și ale principalilor ioni produși în cadrul spectrelor MS/MS pentru analiții studiați.

Compusul	Ion precursor, m/z	Ioni produși, m/z	Intervalul de scanare MS-MS, m/z
BPA	227	133; 211	60 – 300
TBP	149	133	50 - 210
OP	205	133	100 – 200
NP	219	133; 147; 161; 175; 189	100 - 300

În figurile II.3.2, II.3.3 și II.3.4 sunt prezentate spectrele MS/MS achiziționate pentru soluțiile standard individuale de NP, TBP respectiv BPA.

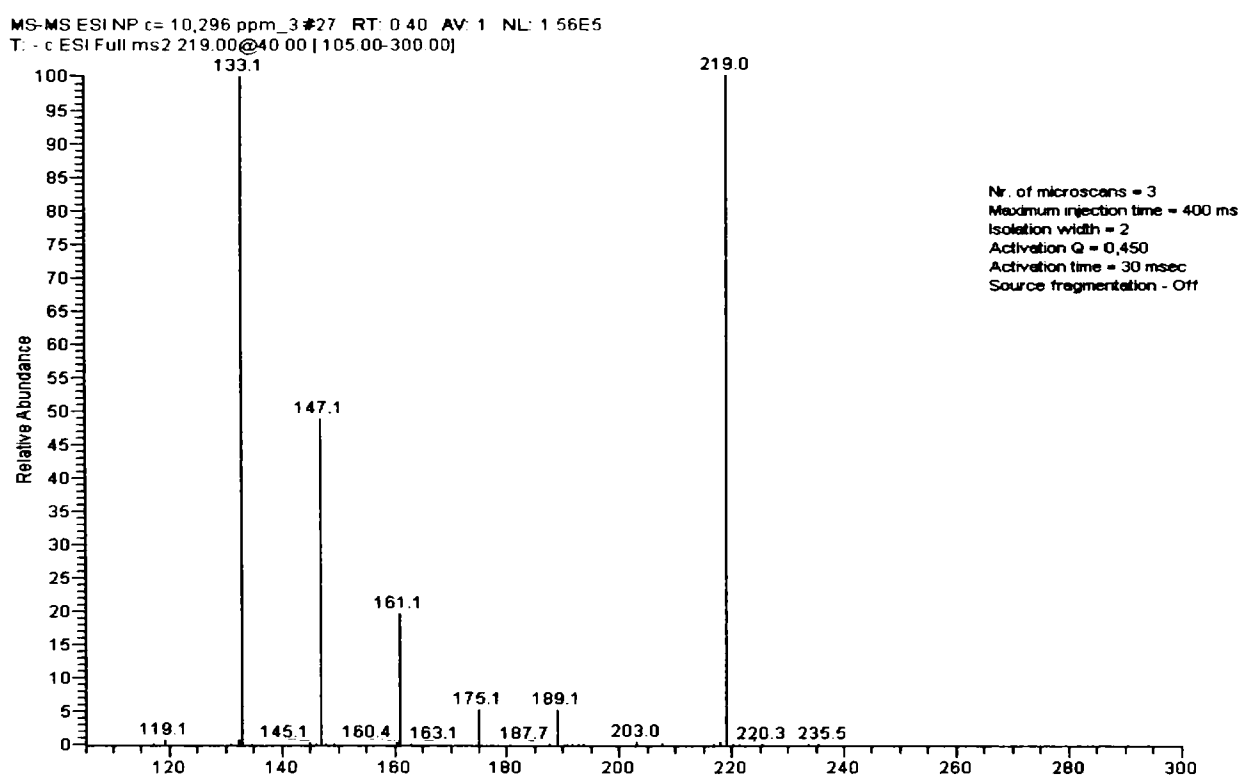


Fig. II.3.2. Spectrul MS/MS pentru soluția standard de 4-nonilfenol, c = 10,30 mg L<sup>-1</sup>.

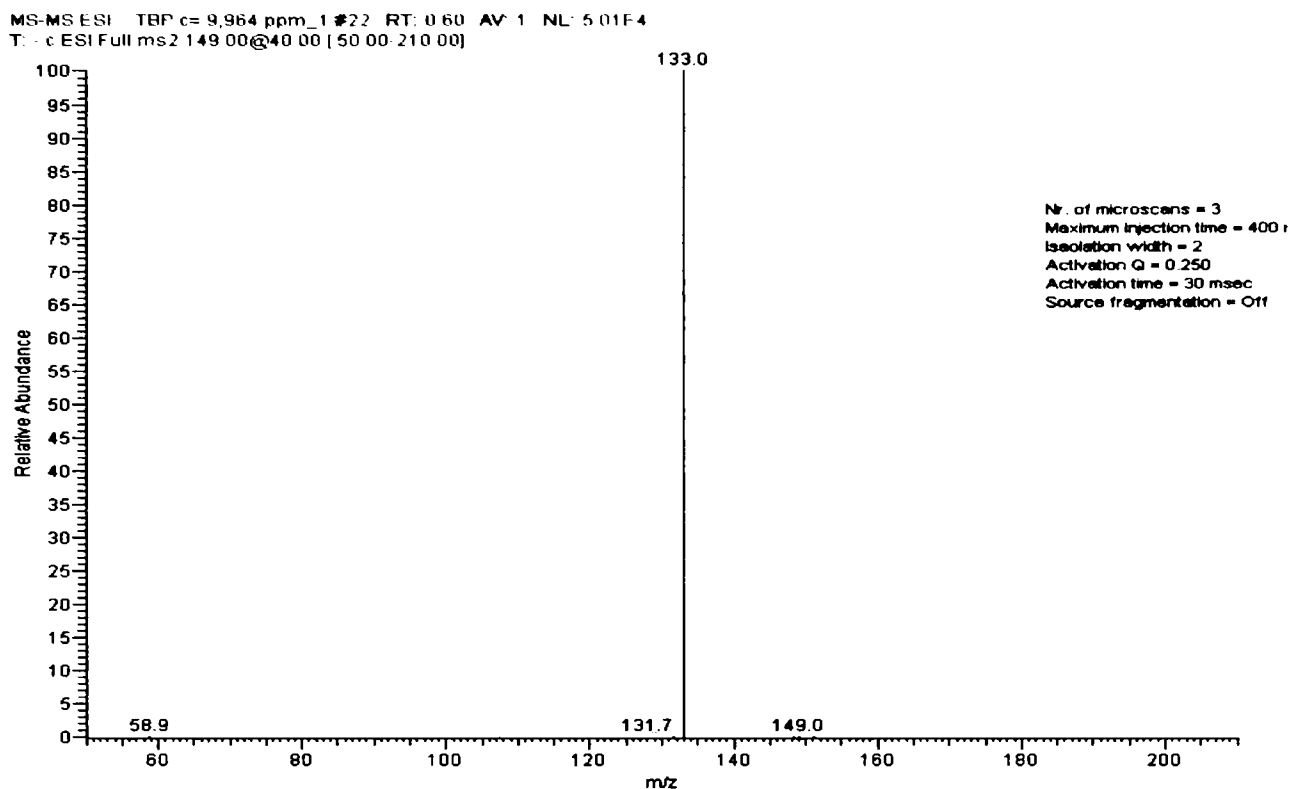


Fig. II.3.3. Spectrul MS/MS pentru soluția standard de 4-terț-butilfenol,  $c = 9,964 \text{ mg L}^{-1}$ .

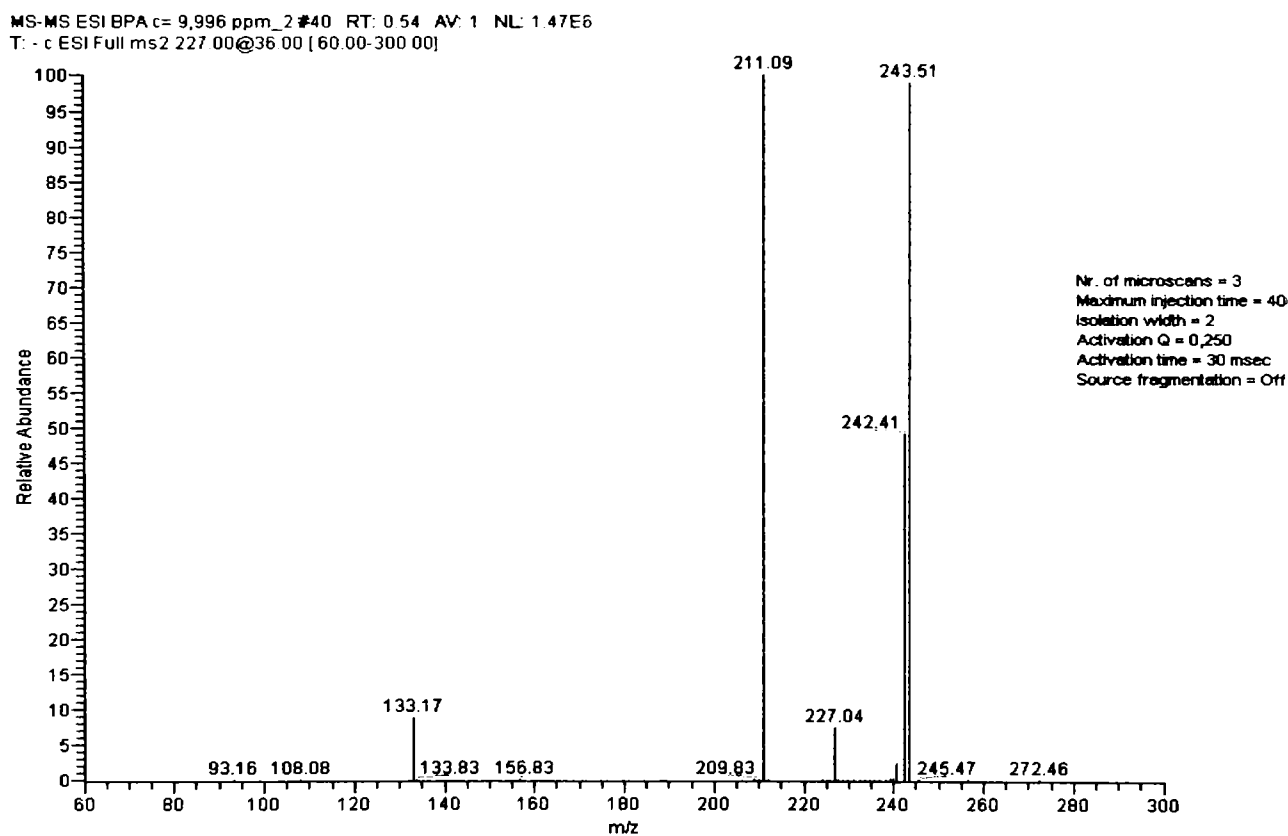


Fig. II.3.4. Spectrul MS/MS pentru soluția standard de bis-fenol A,  $c = 9,996 \text{ mg L}^{-1}$ .

## 2. Optimizarea parametrilor de lucru ai interfeței ESI și ai detectorului cu trapă ionică

În scopul creșterii cât mai mult a sensibilității întregii metode analitice, s-a stabilit un set de experimente menite a optimiza valorile diversilor parametri de lucru ai detectorului cu trapă ionică. Softul specializat ce manageriază funcționarea acestuia, *Xcalibur*, oferă posibilitatea setării fie automate, de către algoritmi incorporați, fie manuale, de către operator, a majorității parametrilor de lucru, cum ar fi: debitul gazului “cortină” (“*sheath gas*”), potențialul de ionizare al ESI, temperatura tubului capilar, potențialele diferitelor componente ale sistemului de ghidare al ionilor către trapă (“*ion optics*”). În general, cea mai bună abordare constă în a lăsa algoritmul softului să stabilească condițiile de lucru optime, așa-zisul fișier de reglare (“*tune*”). Experimentele preliminare și examinarea soluțiilor constructive ale detectorului cu trapă ionică alese de firma producătoare (ThermoFinnigan) ne-au determinat să examinăm influența pe care o pot avea și alți parametri asupra intensității semnalului achiziționat. Astfel, au fost desfășurate o serie de teste care să releve influența pe care o au:

- a. Debitul de gaz auxiliar
- b. Poziția spațială a capătului tubului metalic de sprayere al interfeței ESI
- c. Numărul evenimentelor de scanare (“*scan events*”) dintr-un segment al metodei de instrument
- d. Tipul câmpului de radiofrecvență aplicat (“*waveform type*”)
- e. Tipul de control (automat sau manual) a cantității de ioni din interiorul trapei ionice

Experimentele au fost desfășurate cu o soluție de amestec a celor patru analiți, la un nivel de concentrație de  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  pentru fiecare din ei. Injecțiile au fost efectuate de către modulul de injecție automată, analiții parcurgând sistemul cromatografic.

### a. Influența debitului de gaz auxiliar

S-au executat injecții, în triplicat, pentru două valori ale debitului gazului auxiliar (azot): “40” și “10”. Tabelul II.3.2. prezintă influența debitului gazului auxiliar asupra semnalului.



Tabel II.3.2. Influența debitului gazului auxiliar asupra semnalului, exprimat ca mediile aritmetice pentru 3 injecții ale ariei picului cromatografic respectiv raportului semnal/zgomot.

Analit	Filtrul de scanare utilizat	A <sub>pic</sub> (n = 3)		S/N (n = 3)	
		Debit gaz auxiliar		Debit gaz auxiliar	
		40	10	40	10
BPA	ESI SRM MS2 227@40 (131.50-134.50, 209.50-212.50)	3 603 813	2 561 284	507	449
TBP	ESI SRM MS2 149@40 (131.50-134.50)	118 476	56 450	93	74
OP	ESI full MS2 205@40 (100-200)	542 879	393 394	11	5
NP	ESI full MS2 219.20@40 (100-210)	577 551	266 486	47	17
NP	ESI SRM MS2 219.20@40 (159.60-162.60, 173.50-176.50)	42 061	21 605	47	34

*Notă:* Unitatea de măsură a debitului de gaz e una adimensională, pe o scală convențional aleasă de producătorul echipamentului; n = numărul injecțiilor.

*Condiții experimentale specifice:* poziția spațială a interfeței ESI → Z = D; AGC = ON; forma câmpului de radiofrecvență = tip 1.

Se poate observa ușor faptul că sporirea debitului de gaz auxiliar a condus la intensificarea semnalului. Bineînțeles, acest comportament trebuie corelat cu alți parametri cum ar fi debitul gazului “cortină” și poziția spațială a capătului tubului metalic de sprayere al interfeței ESI. Debitul nu poate fi crescut nelimitat datorită comportamentului dinamic al jetului de gaz în imediata apropiere a capătului tubului capilar de admisie în interiorul spectrometrului de masă.

*b. Influența poziției spațiale a capătului tubului metalic de sprayere al interfeței ESI*

S-au executat injecții, în triplicat, pentru două poziții spațiale ale interfeței ESI pe direcția axială Z: Z=“D” and Z=“C”. Tabelul II.3.3. prezintă influența poziției spațiale a capătului tubului metalic de sprayere al interfeței ESI asupra semnalului.

Tabel II.3.3. Influența poziției spațiale a capătului tubului metalic de sprayere al interfeței ESI asupra semnalului, exprimat ca mediile aritmetice pentru 3 injecții ale ariei picului cromatografic respectiv raportului semnal/zgomot.

Analit	Filtrul de scanare utilizat	A <sub>pic</sub> (n = 3)		S/N (n = 3)	
		Z = D	Z = C	Z = D	Z = C
BPA	ESI SRM MS2 227@40 (131.50-134.50, 209.50-212.50)	13 606 581	2 263 013	1 092	347
TBP	ESI SRM MS2 149@40 (131.50-134.50)	748 506	79 171	204	69
OP	ESI full MS2 205@40 (100-200)	1 486 045	446 495	16	7
NP	ESI full MS2 219.20@40 (100-210)	3 318 676	244 188	21	3
NP	ESI SRM MS2 219.20@40 (159.60-162.60, 173.50-176.50)	409 073	19 136	121	38

*Notă* – X, Y, Z sunt coordonate convențional alese pe baza design-ului instrumental al echipamentului.

*Condiții experimentale specifice:* debitul gazului “cortină” = 33; debitul gazului auxiliar = 12,85; AGC = ON; forma câmpului de radiofrecvență = tip 1.

Valoarea “D” pe direcția axei Z conduce la o îmbunătățire semnificativă a semnalului, pentru toți analiții, în raport cu valoarea “C”. Și în acest caz trebuie ținut cont de corelația intrinsecă între poziția spațială a capătului tubului metalic de sprayere al interfeței ESI, pe de o parte, și debitele celor două gaze și potențialul electric al interfeței ESI, de cealaltă parte.

*c. Influența numărului de evenimente de scanare (“scan events”) dintr-un segment al metodei de instrument*

Pentru a reuși identificarea și cuantificarea mai multor analiți posedând caracteristici cromatografice asemănătoare (coeluție parțială sau totală) cu ajutorul spectrometrului de masă, trebuie folosite mai multe evenimente de scanare în cadrul aceluiași segment al metodei de instrument. Ideal, e de dorit includerea cât mai multor astfel de evenimente, de diferite tipuri

(SIM, MS/MS, SRM), pentru a detecta potențiali izomeri ai analiților de interes și/sau interferenți ai matricei. Din păcate, datorită caracterului “tandem în timp” al achiziției spectrelor MS/MS specific trapei ionice, este de așteptat ca sporirea numărului de evenimente de scanare să conducă la scădere intensității semnalului pentru fiecare din acestea. S-au efectuat 2 injecții ale aceleiași soluții standard de amestec de analiți, la nivelul de concentrație  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ , pentru una din ele folosindu-se, pentru achiziția datelor corespunzătoare analiților de interes BPA și TBP, o metodă de instrument cu 6 evenimente de scanare în același segment (3 SIM + 3 SRM) în timp ce pentru cealaltă s-au inclus doar 3 evenimente de scanare (3 SRM). Două dintre evenimente (1 SIM + 1 SRM) pentru prima injecție respectiv unul (1 SRM) pentru cea de-a doua injecție au fost dedicate evidențierii potențialei prezențe a interferentului nonilfenoletoxicarboxilat (NPEC,  $M = 278$ ). S-a putut constata că aria picurilor cromatografice pentru analiții urmăriți a fost semnificativ mai mică (aproximativ de 4,5 ori pentru BPA respectiv 2,5 ori pentru TBP pentru modul de scanare SRM) în cazul primei injecții, cea cu 6 evenimente de scanare în metoda de instrument, decât în cazul injecției a 2-a. Similar, pentru analiții OP și NP s-a observat scăderea semnalului (aproximativ de 6,5 ori pentru OP respectiv 13 ori pentru NP pentru modul full  $MS^2$ ) în cazul injecției cu 6 evenimente de scanare în metoda de instrument în raport cu injecția cu 4 astfel de evenimente. *Condițiile experimentale specifice* au fost: poziția spațială a interfeței ESI  $\rightarrow Z = D$ ; debitul gazului “cortină” = 33; debitul gazului auxiliar = 12,85; AGC = ON; forma câmpului de radiofrecvență = tip 1.

Figurile II.3.5 și II.3.6 prezintă, ca exemplu, cromatogramele înregistrate pentru ambele injecții în cazul analiților BPA și TBP.

Cap. II.3. Stabilierea limitărilor de natură instrumentală în utilizarea interfeței „electrospray ionization” și a trapei ionice quadrupolice la analiza LC-ESI-MS a alchilfenolilor

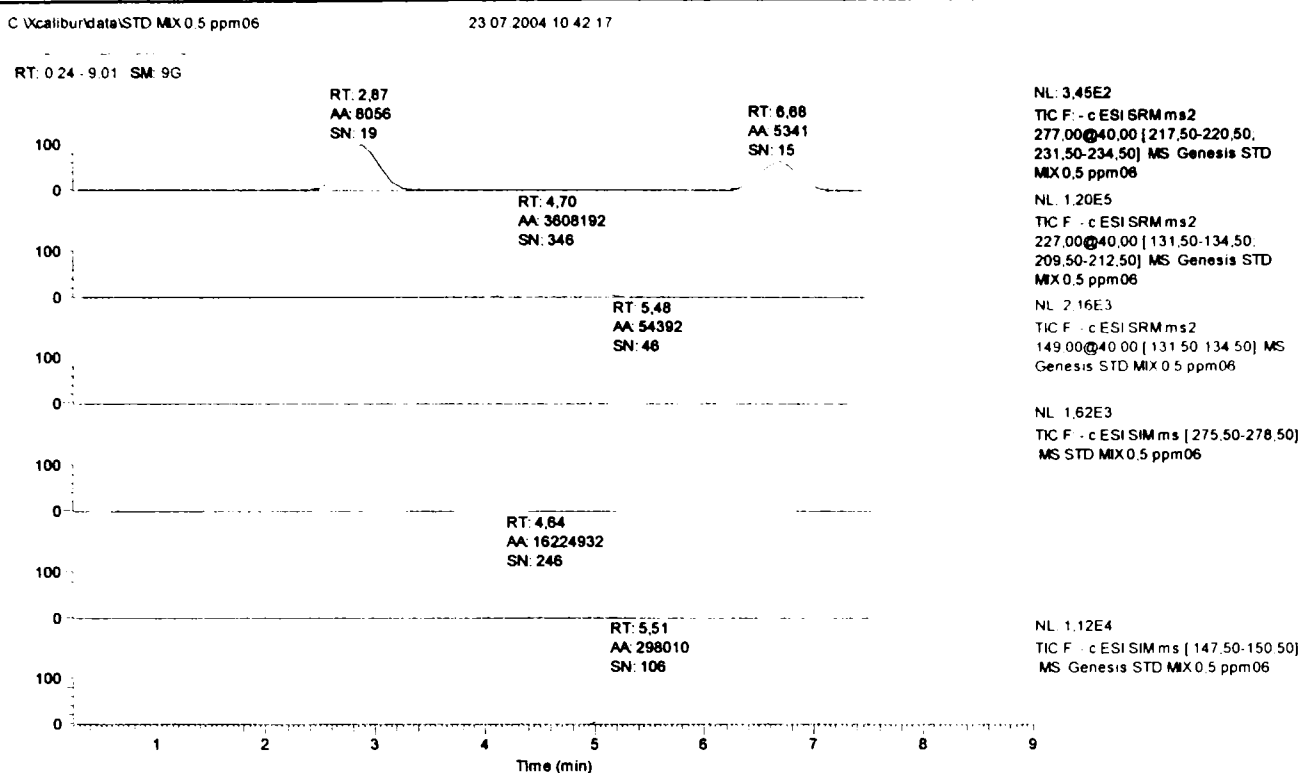


Fig. II.3.5. Cromatogramele achiziției cu 6 evenimente de scanare în segmentul I al metodei de instrument. De sus în jos: interferentul NPEC – cromatogramele nr. 1 (SRM) și 4 (SIM); bis-fenol A (BPA) – cromatogramele nr. 2 (SRM) și 5 (SIM); 4-terț-butilfenol (TBP) – cromatogramele nr. 3 (SRM) și 6 (SIM).

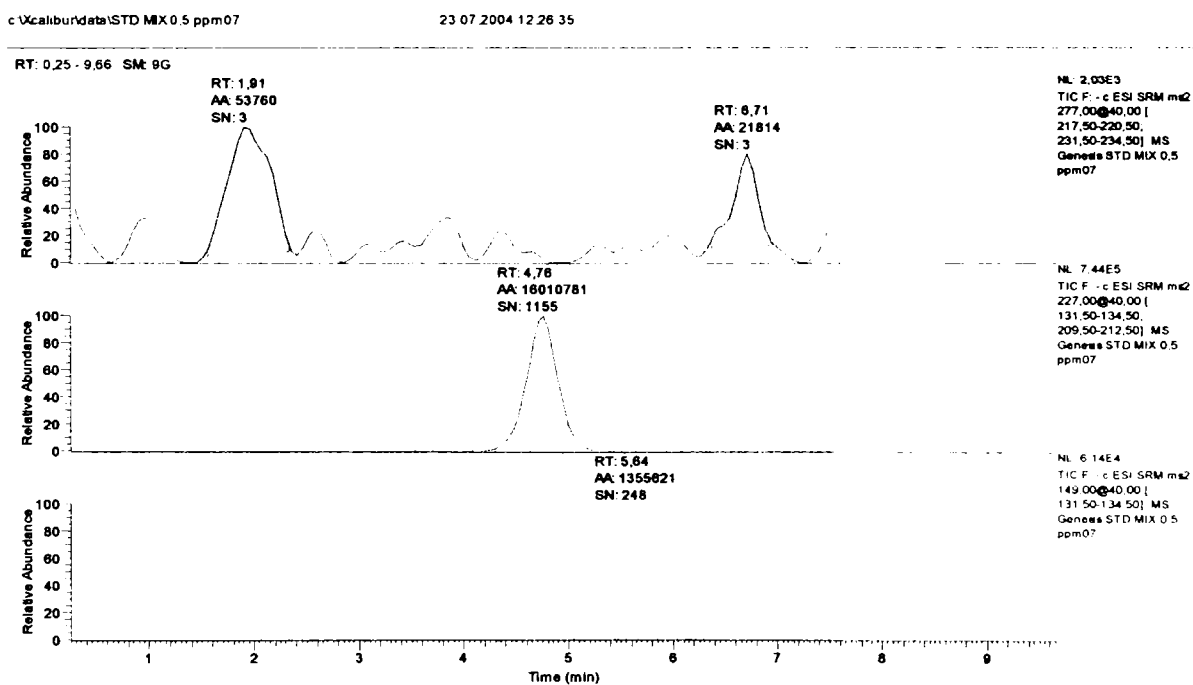


Fig. II.3.6. Cromatogramele achiziției cu 3 evenimente de scanare în segmentul I al metodei de instrument. De sus în jos: cromatogramele SRM ale NPEC, BPA și TBP.

*d. Influența tipului câmpului de radiofrecvență aplicat (“waveform type”)*

Spectrometrul de masă cu trapă ionică oferă posibilitatea de a restricționa selectiv accesul ionilor nedorți astfel încât incinta să fie disponibilă pentru acumularea câtor mai mulți ioni țintă. Fizic, fenomenul se realizează prin alegerea tipului câmpului de radiofrecvență aplicat trapei. *Tipul 1* permite aplicarea unui filtru îngust la injecția ionilor în trapă. Fragmentele ionice cu valori  $m/z$  mai mici și mai mari decât valoarea (sau domeniul de valori) setată de operator sunt respinși. Acest tip de opțiune este utilă în special în cazul în care trapa are tendința de a se umple excesiv cu ioni cu valori  $m/z$  mai mari decât valoarea sau domeniul de valori de interes. *Tipul 2* permite operatorului să aplice un filtru larg al injecției ionilor în trapă. Astfel, ionii cu valori  $m/z$  mai mici cu 50 unități decât valoarea (sau domeniul de valori) setată sunt respinși. Cea mai mare valoare  $m/z$  care poate fi eliminată din trapă folosind tipul 2 al câmpului de radiofrecvență este 350. Această variantă de lucru este în special utilă atunci când trapa ionică se umple excesiv cu fragmente ionice provenind din solvent.

S-au efectuat, în triplicat, injecțiile ale aceleiași soluții standard de amestec de analiți, la nivelul de concentrație  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ , pentru toate cele 3 variante posibile ale câmpului de radiofrecvență: tipul 1, tipul 2 și OFF. S-a constatat că:

- pentru analitul *BPA*, tipul OFF (neaplicarea nici unui tip de filtru) a favorizat acumularea ionilor țintă în raport cu tipul 1. Prin urmare, intensitatea semnalului (aria picului cromatografic) a fost de aproximativ 1,7 ori mai mare pentru modul de scanare SRM.
- Pentru analiții *TBP* și *OP*, tipul OFF a condus practic la rezultate similare cu cele obținute în cazul tipului 1 (modul de scanare SRM pentru TBP respectiv full  $MS^2$  pentru OP).
- pentru analitul *NP*, tipul 1 a condus la intensificări substanțiale ale semnalului în raport cu tipul OFF, în special pentru modul de scanare SRM (creștere de aproximativ 17,7 ori); pentru full  $MS^2$  creșterea a fost de aproximativ 3,3 ori.

Tipul 2 a condus la rezultate extrem de dispersate, uneori cu dispariția aproape totală a semnalului, pentru toți cei 4 analiți.

*Condițiile experimentale specifice* au fost: poziția spațială a interfeței ESI  $\rightarrow Z = D$ ; debitul gazului “cortină” = 33; debitul gazului auxiliar = 12,85; AGC = ON.

e. *Influența tipului de control (automat sau manual) a cantității de ioni din interiorul trapei ionice*

Ținând cont de modul de funcționare al spectrometrului de masă cu trapă ionică, devine lesne de înțeles de ce cantitatea de ioni acumulată în interiorul trapei reprezintă un parametru critic în ceea ce privește sensibilitatea unei potențiale metode analitice. Fenomenul major care apare și influențează în mod negativ întregul process (prin deplasări în spectru și lărgiri ale semnalelor spectrale) este reprezentat de încărcarea electrică spațială (“*space charging*”).

Detectorul de masă *Finnigan LCQ Deca XP MAX* posedă o facilitate numită “*automatic gain control*” (AGC). Această subrutină a software-ului setează optim timpul de injecție al ionilor în trapă astfel încât cantitatea de ioni din timpul fiecărei microscanări ce face parte dintr-o secvență de scanare să fie optimă. Facilitatea poate fi activată sau dezactivată (ON/OFF). Atunci cand funcția AGC este activă, singurul parametru (în ceea ce privește cantitatea de ioni ce pătrunde în trapă) pe care îl setează operatorul este valoarea maxim admisibilă a numărului total de ioni. Atunci când facilitatea AGC este dezactivată, operatorul controlează cantitatea de ioni din trapă prin intermediul setării valorii timpului de injecție.

Tabel II.3.4. Intensitățile semnalului, exprimat ca mediile aritmetice pentru 3 injecții ale ariei picului cromatografic, pentru diverse seturi ale parametrilor de scanare (AGC = OFF).

Parametrii de scanare		$A_{pic}$ (n=3 inj)			
Timpul de injecție a ionilor, (msec)	Număr de micro scanări	- ESI SRM 227@40 (131.50-134.50, 209.50-212.50) (BPA)	- ESI SRM 149@40 (131.50-134.50) (TBP)	- ESI SRM 205@40 (131.50-134.50) (OP)	ESI full MS <sup>2</sup> 219.20@40 (100-200) (NP)
200	4	43 617 747	3 166 740	-	-
400	4	64 341 897	2 774 862	-	-
400	2	60 133 520	1 963 364	-	-
200	1	-	-	2 498 535	-
600	1	-	-	24 884	-
3000	1	-	-	-	257 660 236
1500	1	-	-	-	104 216 248

S-au efectuat, în triplicat, injecții ale soluției standard de amestec de analiți, la nivelul de concentrație  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ , pentru a estima magnitudinea modificării intensității semnalului atunci când facilitatea AGC este dezactivată. Tabelul II.3.4 prezintă sintetic datele înregistrate pentru diverse seturi ale parametrilor de scanare.

*Condițiile experimentale specifice:* poziția spațială a interfeței ESI  $\rightarrow Z = D$ ; debitul gazului “cortină” = 33; debitul gazului auxiliar = 12,85; forma câmpului de radiofrecvență = tip 1.

Prin compararea rezultatelor din tabelele II.3.3 (AGC = ON) și II.3.4 (AGC = OFF) se poate lesne constata că intensitatea semnalului crește cu cel puțin un ordin de mărime, în special în cazul analiților BPA și NP. Din păcate, fenomenele mai sus menționate de încărcare electrică spațială, deși nu afectează semnificativ repetabilitatea rezultatelor, alterează dramatic reproductibilitatea acestora între zilele de lucru.

### 3. Domeniile de liniaritate ale curbelor de etalonare

Următorul pas în dezvoltarea metodei analitice ar trebui să îl constituie construirea curbelor de etalonare pentru analiții de interes. Ideal, curbele ar trebui să aibă un domeniu liniar (cel care se poate folosi efectiv pentru cuantificare) de aproximativ 3-4 ordine de mărime. Diversele studii experimentale au arătat că deviațiile de la liniaritate datorate saturării răspunsului apar, în zona superioară a curbelor, în jurul valorii de  $10^{-5} \text{ M}$  [31]. Din păcate, în cazul compușilor cu proprietăți tensioactive fenomenul pare extrem de pronunțat. Analiții luați în studiu posedă și ei proprietăți active de suprafață astfel că ne-am așteptat să întâmpinăm un comportament de tipul celui prezentat.

În figurile II.3.7, II.3.8 și II.3.9 sunt prezentate curbele de etalonare obținute pentru analiții NP, BPA și TBP, pe domeniul de concentrații  $0,5 - 10 \text{ mg L}^{-1}$ . În legendele figurilor sunt specificați coeficienții de regresie pentru domeniile liniare care pot fi folosite pentru cuantificarea lor. Se constată că numai în cazul TBP-ului poate fi folosit întreg domeniul de concentrații drept domeniu de liniaritate. Pentru BPA și NP trebuie apelat la divizarea în subdomenii de lucru cu coeficienți de regresie acceptabili ( $r^2 > 0,99$ ).

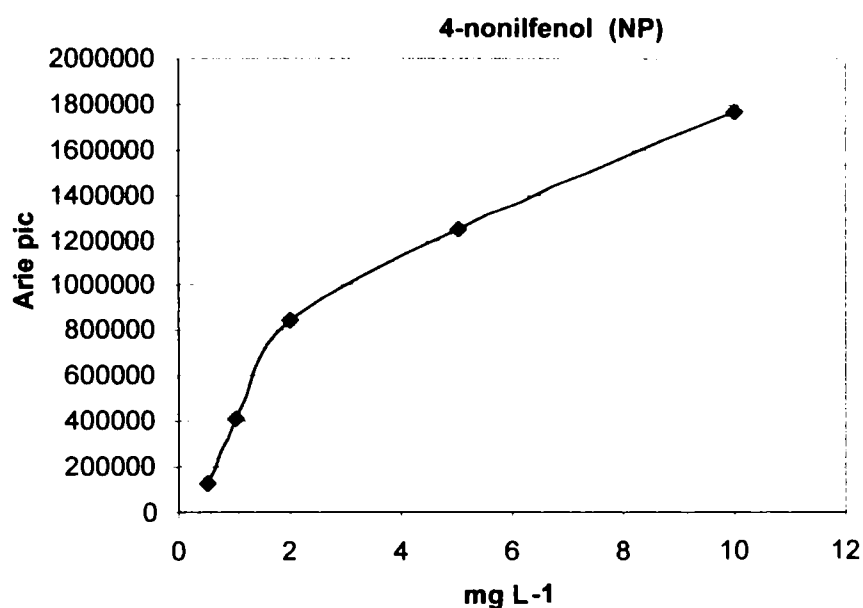


Fig. II.3.7. Curba de etalonare pentru analitul nonilfenol (NP); filtru de scanare: - ESI SRM 219.2@40 (132.0 - 134.0). Pentru domeniul de concentrații 0,5 – 2,0 mg L<sup>-1</sup> →  $r^2 = 0,9963$ ; pentru domeniul de concentrații 2,0 – 10,0 mg L<sup>-1</sup> →  $r^2 = 0,9959$ .

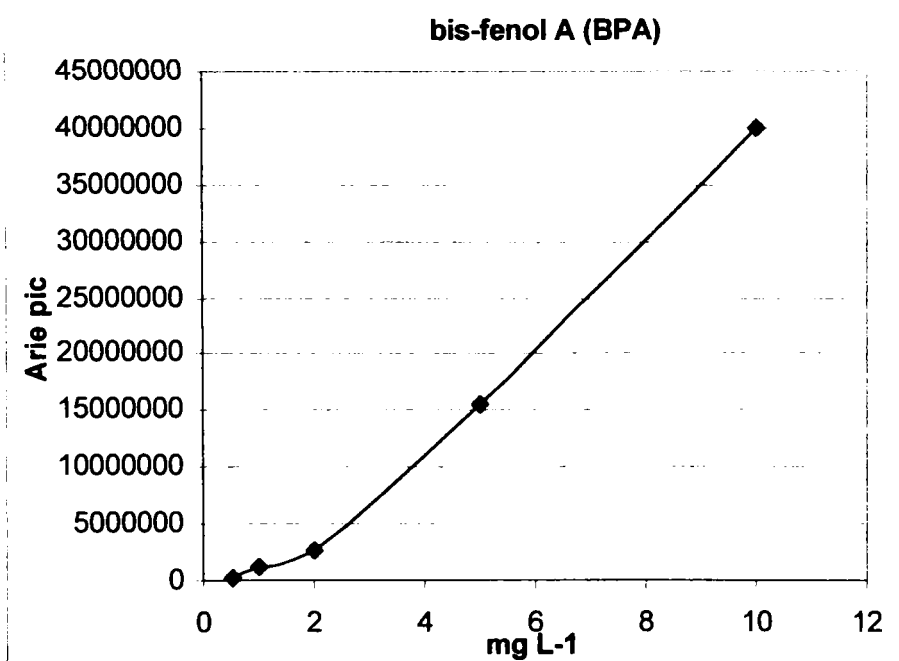


Fig. II.3.8. Curba de etalonare pentru analitul bis-fenol A (BPA); filtru de scanare: - ESI SRM 227@38 (210.0 - 212.0). Pentru domeniul de concentrații 0,5 – 2,0 mg L<sup>-1</sup> →  $r^2 < 0,99$ ; pentru domeniul de concentrații 2,0 – 10,0 mg L<sup>-1</sup> →  $r^2 = 0,9990$ .



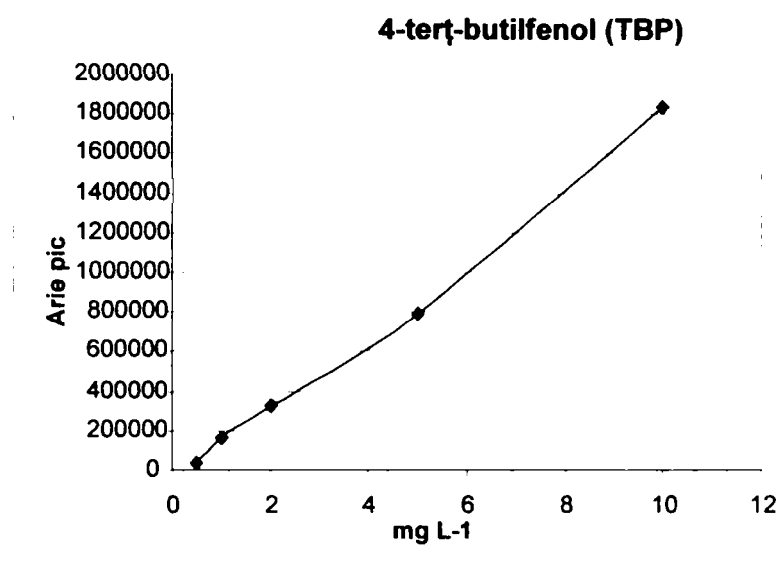


Fig. II.3.9. Curba de etalonare pentru analitul 4-terț-butilfenol (TBP); filtru de scanare: - ESI SRM 149@37 (132.0 - 134.0). Pentru domeniul de concentrații 0,5 – 10 mg L<sup>-1</sup> →  $r^2 = 0,9957$ .

#### 4. Teste de repetabilitate și reproductibilitate

Pentru estimarea stabilității semnalului în zona medie a concentrațiilor, au fost desfășurate o serie de teste intra-zi și inter-zile. A fost utilizată o soluție standard a amestecului celor patru analiți de interes, cu concentrația de 1 mg L<sup>-1</sup> ( $\sim 10^{-5}$  M) în fiecare din ei. Au fost umplute 5 vialuri de autosampler cu soluția amintită și au fost efectuate, 3 zile la rând, câte 4 injecții din fiecare vial. Prima injecție s-a executat pe rând din fiecare vial, urmate apoi de injecțiile următoare (vial 1 – inj 1, vial 2 – inj 1, ... , vial 5 – inj 1, vial 1 – inj 2, vial 2 – inj 2, ... , vial 5 – inj 4). Am decis să folosim 5 vialuri în locul unuia singur pentru a putea elimina influențele datorate diferitelor componente ale sistemului cromatografic (în special autosamplerul). Rezultatele sunt sintetizate în tabelele II.3.5 și II.3.6.

Tabel II.3.5. Repetabilitatea (intra-zi) a injecțiilor (RSD, în %, pentru n= 4) pentru soluția standard a amestecului celor patru analiți de interes, cu concentrația de 1 mg L<sup>-1</sup> în fiecare din ei.

Nr. vial	BPA - ESI SRM MS2 227@40 (131.50- 134.50, 209.50- 212.50)			TBP - ESI SRM MS2 149@40 (131.50- 134.50)			OP - ESI SRM MS2 205@40 (131.50- 134.50)			NP - ESI full MS2 219.20@40 (100- 200)		
	Ziua 1	Ziua 2	Ziua 3	Ziua 1	Ziua 2	Ziua 3	Ziua 1	Ziua 2	Ziua 3	Ziua 1	Ziua 2	Ziua 3
Vial 1	7,2	16,5	1,9	21,1	46,0	23,7	24,0	38,6	12,1	2,4	11,4	2,7
Vial 2	7,9	9,8	7,2	30,8	57,6	22,4	8,2	36,1	17,5	3,9	6,9	1,7
Vial 3	3,4	9,9	6,5	16,8	57,5	28,5	11,9	33,4	16,4	2,8	5,1	3,2
Vial 4	5,1	6,2	5,2	20,3	53,3	38,9	7,6	29,7	16,4	5,1	4,1	3,1
Vial 5	4,8	7,0	6,7	15,0	40,0	22,7	15,7	36,0	9,1	2,5	7,6	1,7

Tabel II.3.6. Reproducibilitatea (inter-zile) a injecțiilor (RSD, în %, pentru n=12) pentru soluția standard a amestecului celor patru analiți de interes, cu concentrația de 1 mg L<sup>-1</sup> în fiecare din ei.

Nr. vial	BPA - ESI SRM MS2 227@40 (131.50- 134.50, 209.50- 212.50)	TBP - ESI SRM MS2 149@40 (131.50- 134.50)	OP - ESI SRM MS2 205@40 (131.50- 134.50)	NP - ESI full MS2 219.20@40 (100- 200)
Vial 1	9,8	31,2	25,6	6,7
Vial 2	8,9	37,8	23,4	5,8
Vial 3	8,5	36,7	22,9	5,5
Vial 4	7,0	40,3	22,3	6,1
Vial 5	8,9	32,1	24,4	6,2

*Condițiile experimentale de utilizare a interfeței ESI: poziția spațială a interfeței ESI → Z = D; debitul gazului “cortină” = 39; debitul gazului auxiliar = 19.*

Parametri de scanare (AGC = ON):

- pentru BPA și TBP (segmentul I al metodei de instrument):
  - numărul de microscanări = 4
  - timpul maxim de injecție = 400 msec (AGC = ON)
  - waveform = OFF
- pentru OP (segmentul II al metodei de instrument):
  - numărul de microscanări = 1
  - timpul maxim de injecție = 100 msec (AGC = ON)
  - waveform = OFF
- pentru NP (segmentul III al metodei de instrument):
  - numărul de microscanări = 1
  - timpul maxim de injecție = 5000 msec (AGC = ON)
  - waveform = tip 1

Așa cum se poate observa din tabelele II.3.5 și II.3.6, s-au obținut valori ridicate ale RSD (> 20%) pentru analiții TBP și OP în comparație cu ceilalți doi analiți, BPA și NP. Ținând cont că etapa cromatografică reprezintă doar unul din pașii întregii metode analitice, devine evident că nu are rost a se trece la dezvoltarea și optimizarea etapei de pregătire a probei până nu se soluționează problema deviațiilor standard excesiv de ridicate.

Un alt aspect nedorit l-a constituit tendința de scădere a intensității semnalului în timpul unei șarje analitice (zi de lucru). Figurile II.3.10, II.3.11, II.3.12 și II.3.13 vizualizează foarte bine acest comportament. După cum o arată toate cele 4 figuri, semnalul a fost recuperat practic integral la începutul fiecărei zile de lucru în raport cu injecția finală a zilei anterioare (a se compara intensitățile semnalelor pentru injecțiile consecutive 4 și 1). Acest tipar de comportament sugerează natura aderentă, “lipicioasă”, a analiților studiați la pereții metalici ai întregului traseu dintre dispozitivul ESI și trapa ionică și justifică necesitatea unor curățări energice și prelungite între injecții. Pentru a elimina potențialele efecte adverse jucate de partea cromatografică a experimentelor (“efect de memorie” al coloanei, supraîncărcarea acesteia, eficiența ei etc.) a mai fost executat un set de experimente menite să estimeze repetabilitatea aceleiași soluții standard de amestec de alchilfenoli de concentrație  $1 \text{ mg L}^{-1}$ , pe aceeași coloană cromatografică dar cu detecție clasică în UV la 254 nm. Rezultatele au demonstrat că nu s-a înregistrat degradarea continuă a semnalului în timpul șarjei analitice pentru nici unul din analiții studiați.

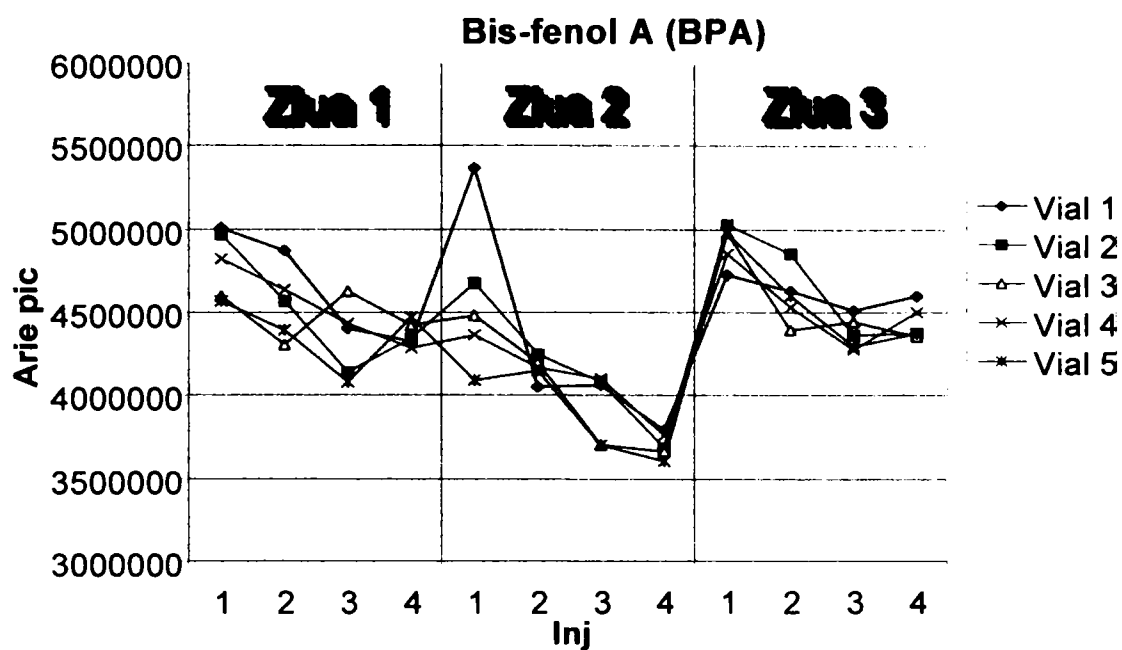


Fig. II.3.10. Descreșterea intensității semnalului (reprezentată prin aria picului cromatografic), pentru toate cele trei șarje analitice, în cazul analitului bis-fenol A (BPA); filtrul de scanare utilizat: - ESI SRM MS<sup>2</sup> 227@40 (131.50-134.50, 209.50-212.50).

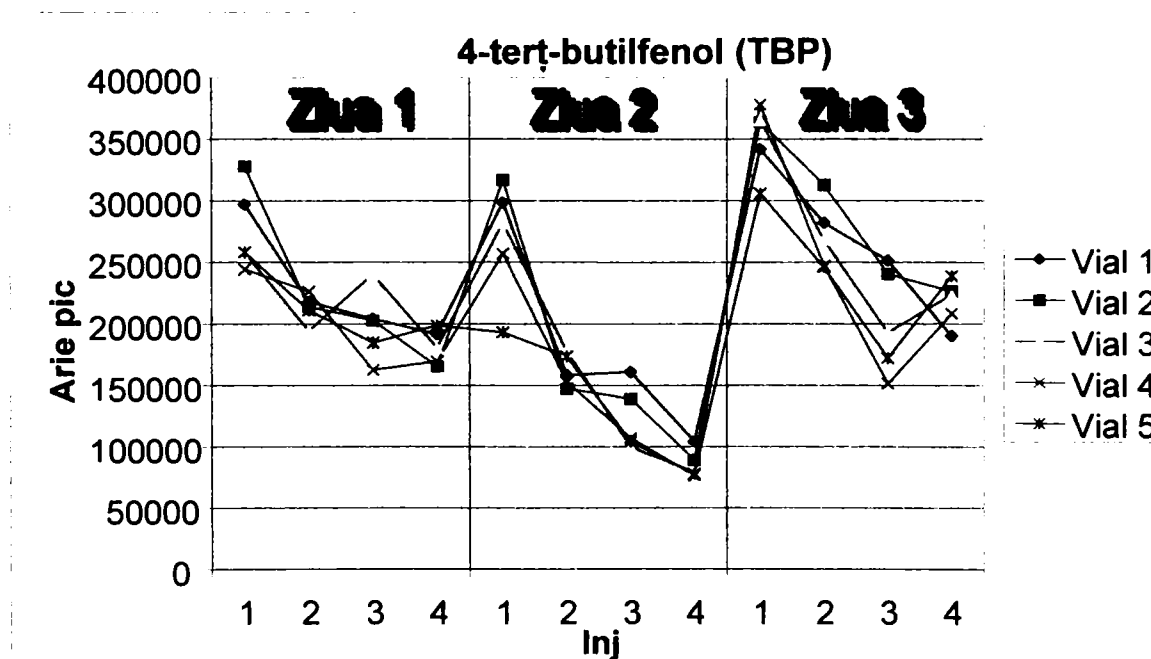


Fig. II.3.11. Descreșterea intensității semnalului (reprezentată prin aria picului cromatografic), pentru toate cele trei șarje analitice, în cazul analitului 4-terț-butilfenol (TBP); filtrul de scanare utilizat: - ESI SRM MS<sup>2</sup> 149@40 (131.50-134.50).

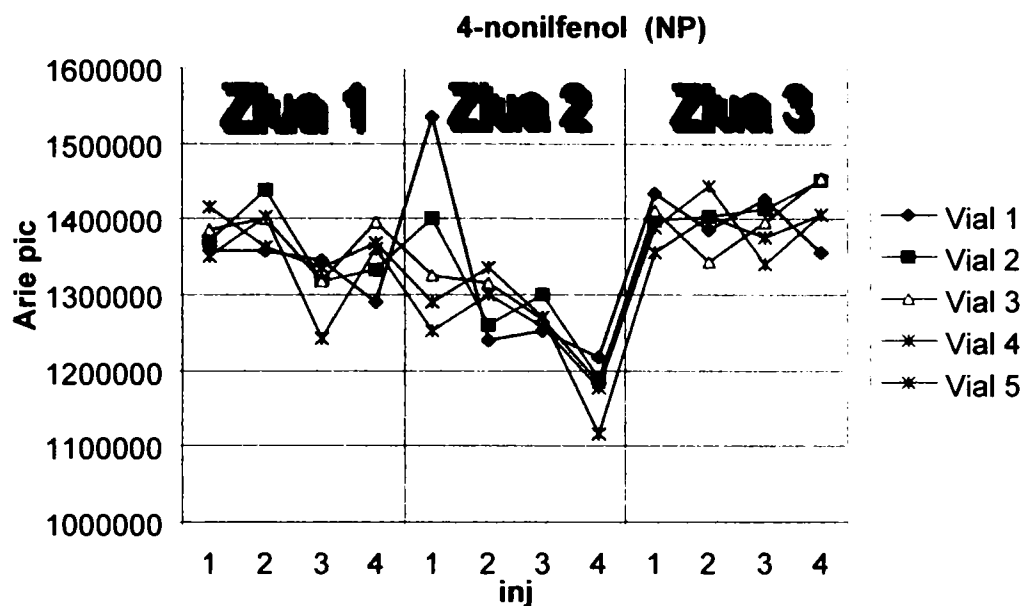


Fig. II.3.12. Descreșterea intensității semnalului (reprezentată prin aria picului cromatografic), pentru toate cele trei șarje analitice, în cazul analitului 4-nonilfenol (NP); filtrul de scanare utilizat: - ESI full MS<sup>2</sup> 219.20@40 (100-200).

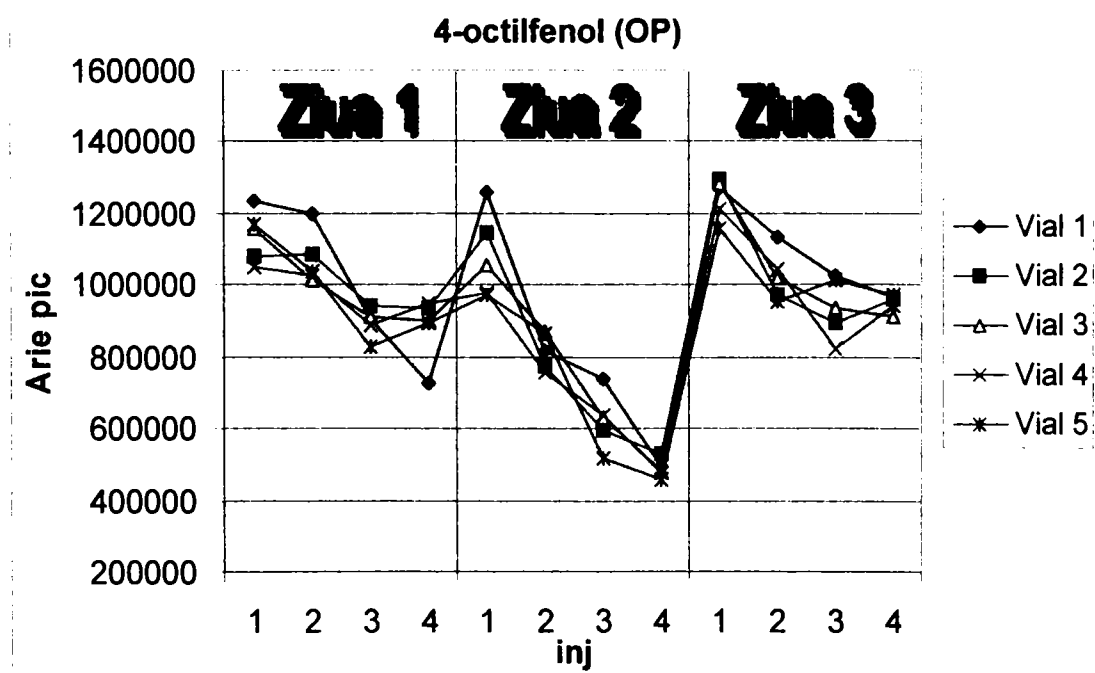


Fig. II.3.13. Descreșterea intensității semnalului (reprezentată prin aria picului cromatografic), pentru toate cele trei șarje analitice, în cazul analitului 4-octilfenol (OP); filtrul de scanare utilizat: - ESI SRM MS<sup>2</sup> 205@40 (131.50-134.50).

## Capitol II.4. Dezvoltarea, optimizarea și validarea unei metode de determinare a unor hormoni estrogeni din apa potabilă prin cromatografie de lichide cuplată cu spectrometru de masă cu trapă ionică prin interfața ESI \* [123]

Structurile chimice ale celor 3 hormoni estrogeni luați în studiu sunt prezentate în fig. II.4.1.

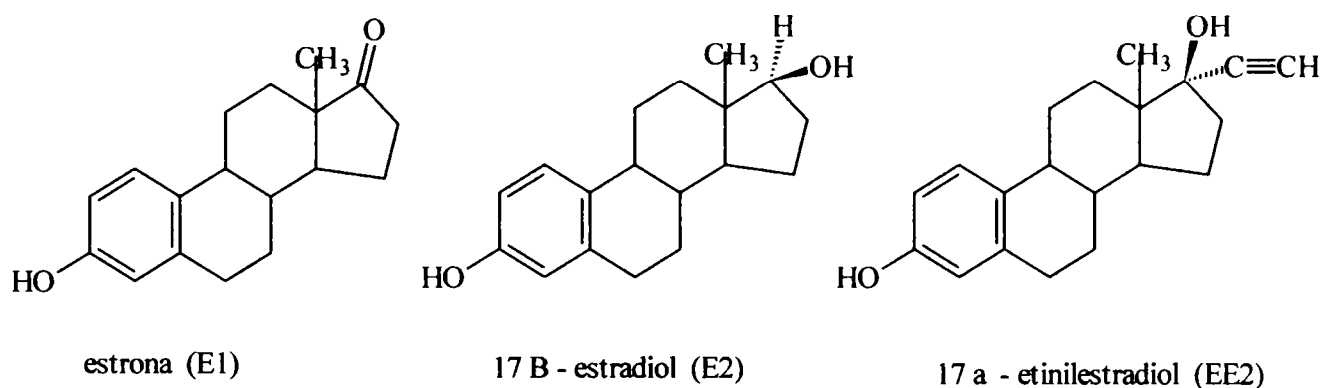


Figura II.4.1. Hormonii estrogeni analizați prin LC-ESI-MS.

### MATERIALE ȘI METODE

*Reactivi.* Estrona (E1), 17β-estradiolul (E2), 17α-etinilestradiolul (EE2) (produse Sigma-Aldrich), standard intern 17β-estradiol marcat cu deuteriu (E2-d<sub>5</sub>) (oferit de Laboratorul de Radioizotopi al Universității din Milano). Metanolul de puritate “HPLC gradient type” produs firma Merck iar apa pentru cromatografie a fost purificată pe un sistem Milli-Q system (Millipore, Bedford (MA), USA) până la o valoare a conductivității de 18 MΩ cm<sup>-1</sup>.

---

\* Experimentele au fost desfășurate în laboratoarele Institutului de Cercetări asupra Apei din Brugherio (Milano), în cadrul unei burse de cercetare oferite de NATO și Consiliul Național al Cercetării din Italia, pe perioada iulie – decembrie 2004.

*Soluții de standarde de hormoni estrogeni.*

Pentru fiecare analit a fost preparată o soluție stoc individuală de concentrație 1000 mg L<sup>-1</sup> prin dizolvarea în metanol, la balon cotat, a cantităților corespunzătoare de compus solid. Soluțiile de lucru conținând toți cei 3 analiți și compusul deuterat, folosite pentru calibrarea cu standard extern, au fost obținute prin diluții succesive cu metanol ale soluțiilor stoc, în domeniul de concentrații 1 – 1000 μg L<sup>-1</sup> (tabel II.4.1).

Tabel II.4.1. Concentrațiile soluțiilor de standarde de hormoni estrogeni folosite pentru calibrarea externă.

Analit	Concentrație (μg L <sup>-1</sup> )									
	C1	C2	C3	C4	C5	C5-a	C6	C6-b	C6-a	C7
estronă	1020	510	255,0	102,0	51,0	20,40	10,20	5,10	2,04	1,02
estradiol	1030	515	257,5	103,0	51,5	20,60	10,30	5,15	2,06	1,03
etinil estradiol	1080	540	270,0	108,0	54,0	21,60	10,80	5,40	2,16	1,08
estradiol deuterat	1168	584	292,0	116,8	58,4	23,36	11,68	5,84	2,34	1,17

Au fost de asemenea preparate 6 soluții standard ale celor 4 analiți folosite pentru calibrarea cu standard intern (concentrația estradiolului deuterat a fost aceeași pentru toate nivelele curbei de etalonare) (tabel II.4.2).

Tabel II.4.2. Concentrațiile soluțiilor de standarde de hormoni estrogeni folosite pentru calibrarea internă (S.I. = standard intern).

Analit	Concentrație (μg L <sup>-1</sup> )						
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7
estronă	1020	510	255,0	102	51,0	10,2	5,10
estradiol	1030	515	257,5	103	51,5	10,3	5,15
etinil estradiol	1080	540	270,0	108	54,0	10,8	5,40
estradiol deuterat (S.I.)	18,54	18,54	18,54	18,54	18,54	18,54	18,54

*Sistemul HPLC. Finnigan Surveyor LC System; configurația: modulul pentru rezervoarele de solvenți Solvent Platform, modulul cuaternar de pompe Finnigan Surveyor LC Pump (cu degazor încorporat), modulul de injecție automată Finnigan Surveyor Autosampler (echipat cu*

incintă termostabilă pentru coloana cromatografică). Detecția s-a realizat cu ajutorul detectorului de masă cu trapă ionică *Finnigan LCQ Deca XP MAX* (ThermoFinnigan), echipat cu dispozitivul *Finnigan Ion Max universal source* drept interfață (tridimensional reglabilă) între sistemul HPLC și detectorul de masă. Volumul de injecție a fost de 10  $\mu\text{L}$ ; temperatura de lucru a coloanei cromatografice a fost menținută constant la 25°C.

*Coloana HPLC.* Luna Phenyl-Hexyl, 259  $\times$  2.0 mm,  $d_p$  5  $\mu\text{m}$ , diametrul porilor 100 Å.

*Cartușele SPE.* Strata C18-U (Phenomenex), 500 mg / 6 mL, dimensiunea porilor - 67 Å, aria suprafeței particulelor - 505  $\text{m}^2/\text{g}$ , diametrul mediu al particulelor - 56  $\mu\text{m}$ . Toate eluțiile cu solvenți organici din etapa finală de preluare a analiților de pe cartușe s-au realizat gravitațional, fără aplicare de vid sau presiune.

*Filtre din fibră de sticlă.* Whatman GF/F, cu diametrul nominal al porilor de 0,7  $\mu\text{m}$ , pre-încălzite inițial la 480 °C timp de 4 ore. Au fost folosite pentru filtrarea probelor de apă de râu.

*Fazele mobile.* Debitul de curgere a fazei mobile 0,3  $\text{mL min}^{-1}$ . Prima porțiune a tuturor trecerilor cromatografice (cea dedicată separării analitice și eluției de pe coloană a analiților de interes) a fost condusă în regim izocratic, cu faze mobile binare metanol-apă 80: 20 (v/v); la finalul fiecărei treceri a fost însă adăugat un gradient de compoziție a fazei mobile cu scopul curățării sistemului de impuritățile din matricea probelor (tabel II.4.3).

Tabel II.4.3. Programul de compoziție a fazei mobile în timpul trecerilor cromatografice.

Timp, min	Apă, % v/v	Metanol, % v/v
0.00	20.0	80.0
6.50	20.0	80.0
8.50	0.00	100
21.00	0.00	100
25.00	20.0	80.0
35.00	20.0	80.0

#### *Experimentele ESI-MS/MS.*

S-au utilizat soluții standard individuale de concentrații în zona 10  $\text{mg L}^{-1}$ ; ele au fost introduse direct în interfața API fără a mai parcurge sistemul HPLC, prin intermediul unei seringi automate. S-a utilizat modul de lucru în ionizare negativă în ideea realizării unei



ionizări mai facile a analiților de interes (prezența grupei fenolice în structura acestora). Au fost testate ambele tipuri de interfețe API, ESI și APCI.

Testele au demonstrat faptul că se poate utiliza același fișier de tuning pentru toți analiții de interes. Valorile finale ale fișierului de tuning sunt prezentate în tabelul II.4.4.

Tabel II.4.4. Parametri de lucru folosiți în timpul experimentelor de dezvoltare, optimizare și validare a metodei.

Denumire parametru	Valoare
Debitul gazului "cortină"	36
Debitul gazului auxiliar	36
Poziția spațială a capătului tubului metalic de sprayere al interfeței ESI	X = 0 Y = 0,75 + 0 Z = D
Temperatura tubului capilar de transmitere a ionilor înspre "ion optics" a spectrometrului	250 °C
Potențialul electric al sursei ESI	4,5 kV
Potențialul electric al tubului capilar de transmitere a ionilor înspre "ion optics" a spectrometrului	- 6 V
"ion optics":	
➤ tube Lens Offset (deviația lentilelor tubului)	- 60,00 V
➤ multipole RF Amplifier (amplificatorul RF al multipolului)	400,00 Vp-p
➤ multipole 1 Offset (deviația multipolului 1)	7,50 V
➤ multipole 2 Offset (deviația multipolului 2)	10,00 V
➤ interMultipole Lens Voltage (potențialul lentilelor intermultipolului)	14,00 V
➤ entrance Lens (lentilele de intrare)	50,00 V
➤ trap DC Offset Voltage (potențialul deviației curentului continuu al trapei)	10,00 V
Parametri de scanare	
➤ numărul de microscanări	2
➤ timpul maxim de injecție	400 msec (AGC = ON)
Tipul câmpului de radiofrecvență aplicat ("waveform type")	type 2
factorul de activare Q	0,250
timpul de activare	30 msec
fragmentarea în interiorul sursei	OFF

## REZULTATE ȘI DISCUȚII

Valorile logP ale celor 3 hormoni estrogeni luați în studiu sunt, conform algoritmului de estimare Daylight CLOGP [122]: E1 – 3,13; EE2 – 3,67; E2 – 3,86.

Conform acestor valori, este de așteptat ca, în condițiile utilizării unei faze mobile cu mult modificator organic (pentru scurtarea timpului trecerii cromatografice), perechea estradiol-etinilestradiol să coelueze parțial sau chiar total. Utilizarea spectrometrului de masă va conduce însă la rezolvarea semnalelor analiților de interes.

### 1. Spectrele MS/MS

Rezultatele preliminare au demonstrat că sensibilitatea atinsă pentru varianta ESI este superioară celei atinse cu APCI, pentru toți analiții. Valorile m/z ale fragmentelor ionice monitorizate sunt prezentate în tabelul II.4.5.

Tabel II.4.5. Valorile m/z ale ionilor precursori și ale principalilor ioni produși în cadrul spectrelor MS/MS pentru analiții studiați.

Analit	Energia de coliziune normalizată, (%)	Ion precursor, m/z	Ioni produși, m/z
estronă	45	269,3	145; 159; 183; 253
estradiol	45	271,5	145; 183
etinil estradiol	45	295,0	185; 267
estradiol deuterat	55	276,5	147; 187

### 2. Dezvoltarea și optimizarea etapei de pregătire a probelor de apă potabilă cu ajutorul tehnicii SPE

Într-o primă etapă s-a urmărit dezvoltarea și optimizarea unui protocol de pregătire a probelor de apă potabilă prin SPE cât mai eficient cu putință dar și simplu în același timp.

Valorile medii ale principalelor caracteristici fizico-chimice ale apei de băut prelevată de la Istituto di Ricerca sulle Acqua (IRSA) și folosită în teste au fost:

- Conductivitatea – 535  $\mu$ S/cm
- pH 7,5.

### 2.1. Estimarea celor mai bogate fracțiuni în analiții de interes

#### 1. Primul set de experimente.

*Modul de lucru* – schema după care s-a lucrat este prezentată în figura II.4.2.

Concentrațiile exacte în probele finale sunt prezentate în tabelul II.4.6.

*Valori specifice:* - debitul mediu de trecere a probei prin cartuș → 7,14 mL min<sup>-1</sup>

Tabel II.4.6. Concentrațiile analiților adăugați probelor de apă de rețea din cadrul exp. 2.1.1.

Analit	Concentrație (ng/L)
E1	20,40
E2	20,60
EE2	21,60
E2-d <sub>5</sub>	23,36

*Concluzie intermediară:* toată cantitatea de analiți din proba reținută pe cartuș este eluată în primii 3 mL de solvent (metanol).

#### 2. Al doilea set de experimente.

*Modul de lucru* - schema după care s-a lucrat este prezentată în figura II.4.3.

Concentrațiile exacte în probele finale sunt prezentate în tabelul II.4.7.

*Valori specifice:* - debitul mediu de trecere a probei prin cartuș → 6,89 mL min<sup>-1</sup>

Tabel II.4.7. Concentrațiile analiților adăugați probelor de apă de rețea din cadrul exp. 2.1.2.

Analit	Concentrație (ng/L)
E1	255,0
E2	257,5
EE2	270,0
E2-d <sub>5</sub>	292,0

Figura II.4.4 prezintă nivelul celor 4 analiți în cele 6 fracțiuni de câte 0,5 mL fiecare, rezultate în urma aplicării procedurii SPE.

Fig. II.4.2. Modul de lucru pentru estimarea celor mai bogate fracțiuni în analiții de interes – experimentul 2.1.1.

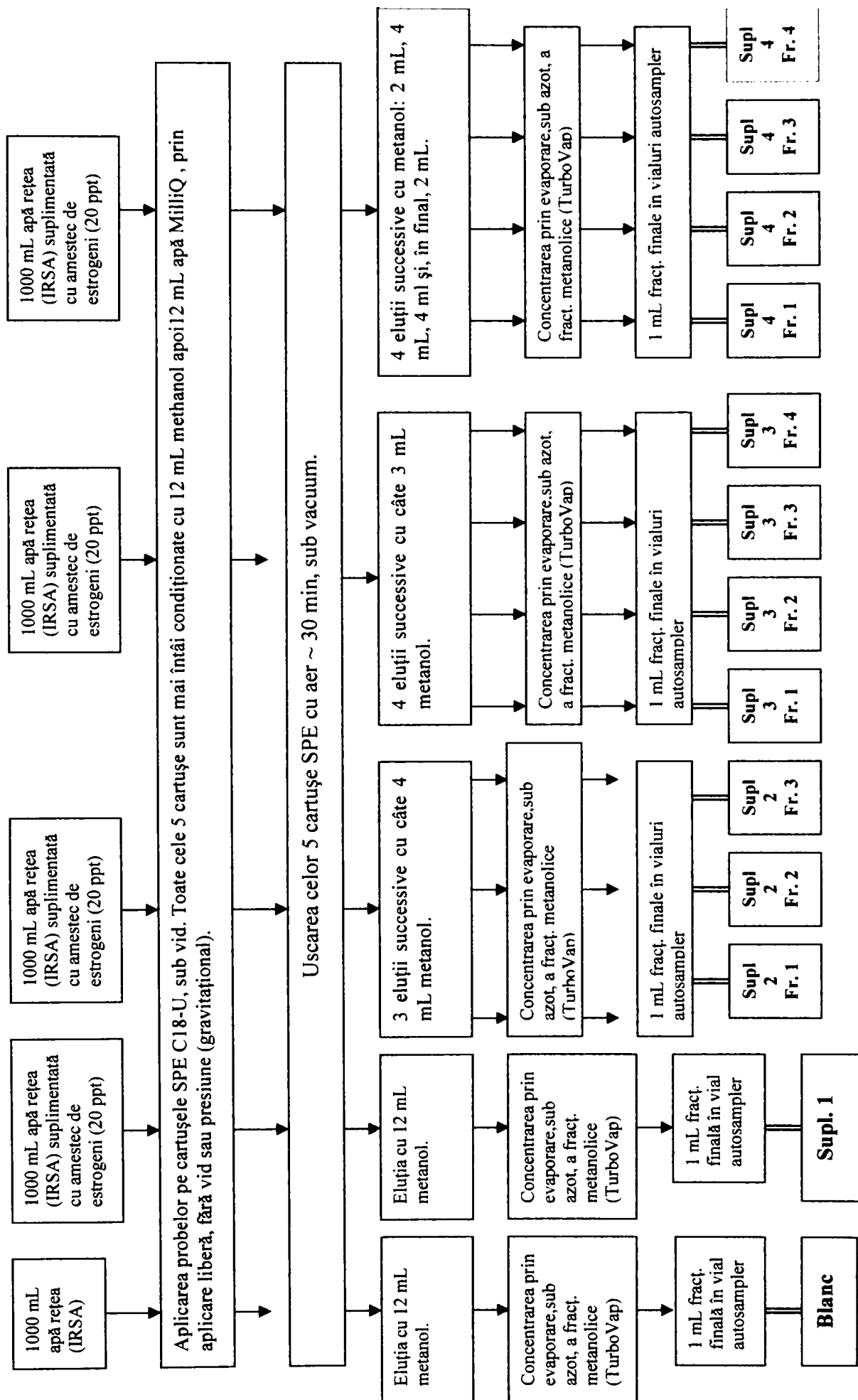
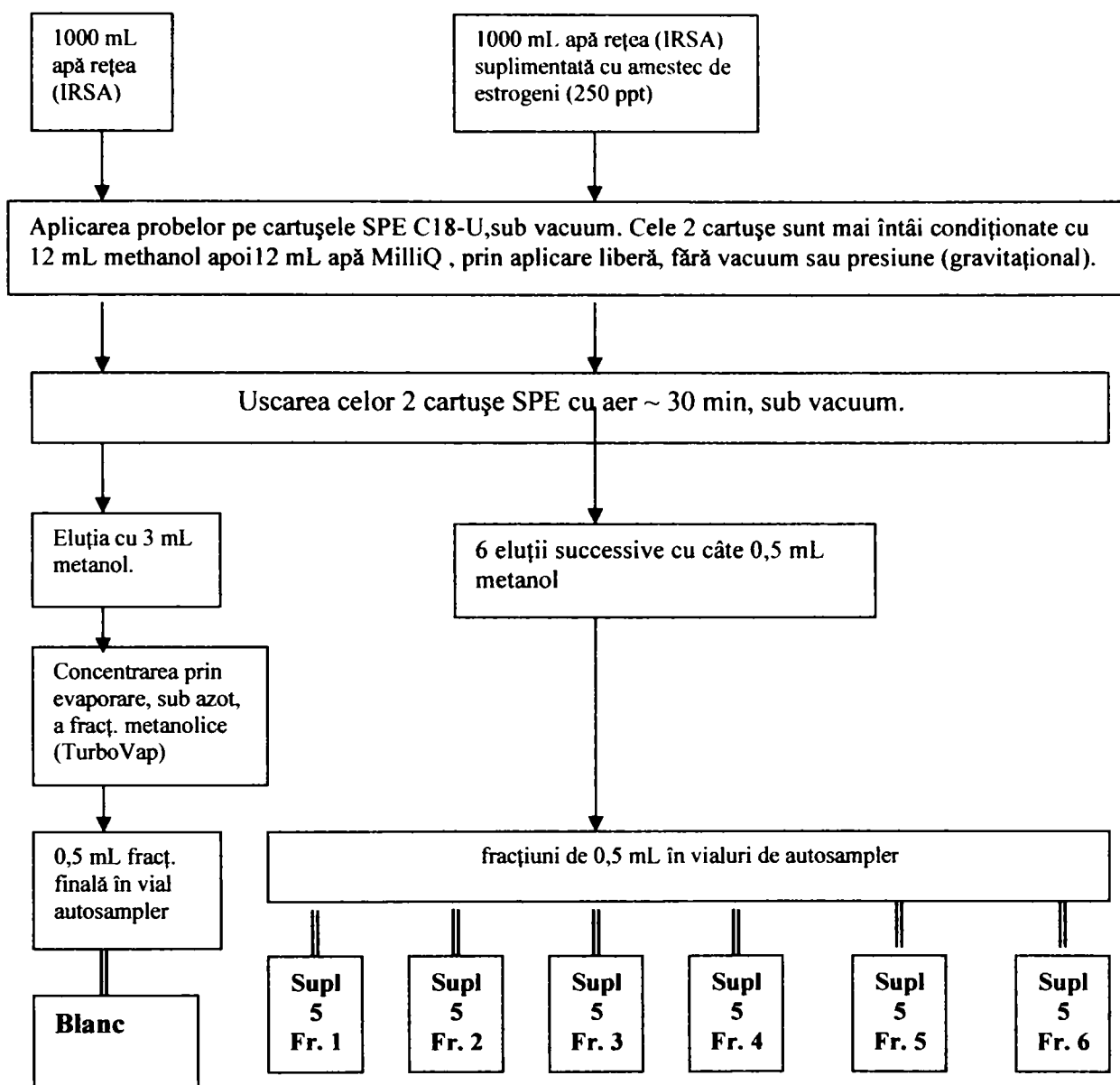


Fig. II.4.3. Modul de lucru pentru estimarea celor mai bogate fracțiuni în analiții de interes – exp. 2.1.2



**Concluzie intermediară:** aproape ½ din toată cantitatea de analiți din probă reținută pe cartuș este eluată în primul mL de solvent (metanol), restul fiind antrenată de următorii 1,5 mL.

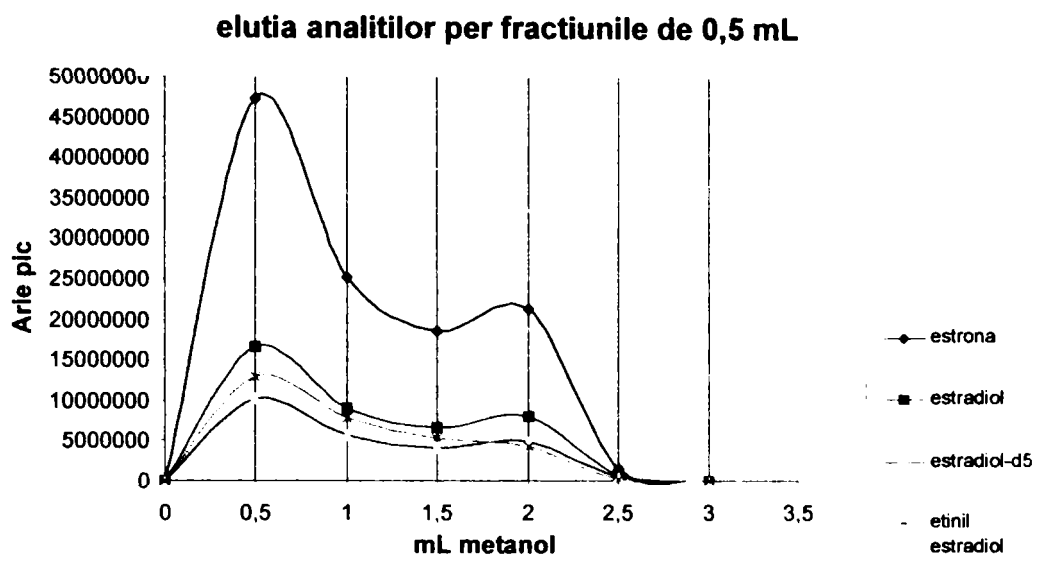


Fig. II.4.4. Nivelul analiților de interes (exprimat prin aria picurilor cromatografice) în cele 6 fracțiuni a câte 0,5 mL rezultate în cadrul experimentului 2.1.2.

### 2.2. Estimarea influenței pH-ului asupra nivelului recuperării analiților de interes

*Modul de lucru* – schema după care s-a lucrat este prezentată în figura II.4.5.

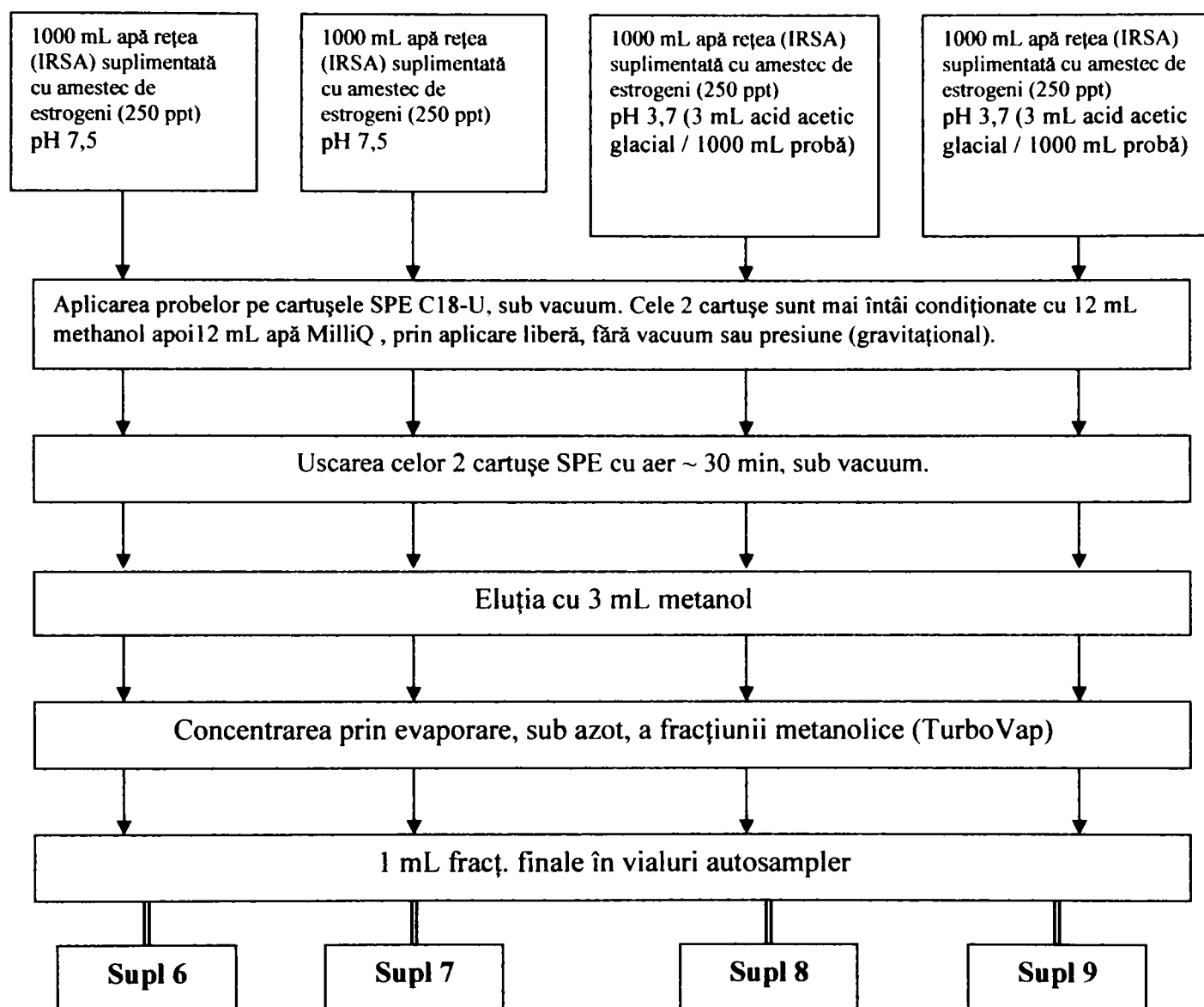
*Valori specifice:* - debitul mediu de trecere a probei prin cartuș → 7,57 mL/min; volumul de metanol utilizat la eluție → 3 mL.

Valorile recuperărilor atinse sunt prezentate în tabelul II.4.8. Pentru o apreciere cât mai exactă, ele au fost estimate pe baza comparării ariei picurilor cromatografice pentru injecțiile soluției standard de 250 ppb cu cele obținute pentru probele suplimentate și procesate.

Tabel II.4.8. Recuperările înregistrate pentru analiții de interes în cadrul experimentului 2.2.

Proba	Recuperare E1, (%)	Recuperare E2, (%)	Recuperare E2-d <sub>5</sub> (%)	Recuperare EE2, (%)
supl. 6 - pH = 7,5	115,53	93,88	97,91	85,91
supl. 7 - pH = 7,5	106,99	94,33	86,56	83,70
supl. 8 - pH = 3,7	46,32	11,12	14,59	8,28
supl. 9 - pH = 3,7	37,90	7,39	8,22	5,11

Fig. II.4.5. Modul de lucru pentru estimarea influenței pH-ului asupra nivelului recuperării analiților de interes – exp. 2.2.



*Concluzie intermediară:* probele cu pH acid au condus la valori extrem de mici ale recuperărilor și repetabilitate mai proastă.

### 2.3. Estimarea influenței debitului de trecere a probei prin cartuș asupra nivelului recuperării analiților de interes

*Modul de lucru* - similar celui folosit în cazul experimentului 2.2 (pentru estimarea influenței pH-ului).

*Valori specifice* - debitul mediu de trecere a probei prin cartuș pentru două dintre probe a fost 6,13 mL/min iar pentru celelalte două a fost de 12,50 mL/min; pH-ul tuturor probelor → 7,5. Valorile recuperărilor înregistrate în cazul celor patru probe sunt prezentate în tabelul II.4.9. Ele au fost estimate, pentru o apreciere cât mai exactă, pe baza comparării ariei picurilor cromatografice în cazul injecțiilor soluției standard de 250 ppb cu cele obținute pentru probele suplimentate și procesate.

Tabel II.4.9. Recuperările înregistrate pentru analiții de interes în cadrul experimentului 2.3.

Proba	Recuperare E1, (%)	Recuperare E2, (%)	Recuperare E2-d <sub>5</sub> , (%)	Recuperare EE2, (%)
supl. 10 → 6,13 mL/min	97,90	90,63	96,53	93,20
supl. 11 → 6,13 mL/min	98,27	86,78	81,41	87,15
supl. 12 → 12,5 mL/min	94,73	91,00	88,90	77,46
supl. 13 → 12,5 mL/min	86,43	78,67	81,41	75,40

*Concluzie intermediară:* debitul de trecere al probei mai redus a condus la recuperări ale analiților ceva mai ridicate; repetabilitățile sunt aproximativ aceleași.

### 2.4. Estimarea influenței volumului fracțiunii metanolice finale asupra nivelului recuperării analiților de interes

*Modul de lucru* - similar celui folosit în cazul experimentului 2.2 (pentru estimarea influenței pH-ului).



*Valori specifice* - pentru cele 2 probe de la nivelul de concentrație 250 ppt volumul fracțiunii metanolice finale a fost de 1 mL iar pentru cele 2 probe de la nivelul de concentrație 125 ppt volumul a fost de 0,5 mL; debitul mediu de trecere a probelor 7,66 mL/min; pH-ul tuturor probelor → 7,5.

Valorile recuperărilor înregistrate în cazul celor patru probe sunt prezentate în tabelul II.4.10. Ele au fost estimate, pentru o apreciere cât mai exactă, pe baza comparării ariei picurilor cromatografice în cazul injecțiilor soluției standard de 250 ppb cu cele obținute pentru probele suplimentate și procesate.

Tabel II.4.10. Recuperările înregistrate pentru analiți de interes în cadrul experimentului 2.4.

Proba	Recuperare E1, (%)	Recuperare E2, (%)	Recuperare E2-d <sub>5</sub> , (%)	Recuperare EE2, (%)
supl. 14 - V = 1,0 mL (factor de concentrare = 1000)	108,09	102,52	104,56	91,76
supl. 15 - V = 1,0 mL (factor de concentrare = 1000)	101,23	92,84	97,98	97,63
supl. 16 - V = 0,5 mL (factor de concentrare = 2000)	52,97	71,62	74,62	69,27
supl. 17 - V = 0,5 mL (factor de concentrare = 2000)	83,70	81,05	77,11	76,27

*Concluzie intermediară:* concentrarea la un volum final al fracțiunii organice de 0,5 mL a condus la recuperări semnificativ mai reduse decât în cazul volumului de 1 mL; repetabilitățile sunt și ele ceva mai proaste (cu excepția estronei pentru care repetabilitatea a fost semnificativ afectată).

*Concluzia studiului de dezvoltarea și optimizarea a etapei SPE.*

S-au stabilit următoarele valori (sau domenii de valori) optime pentru parametrii etapei de pregătire a probelor prin SPE:

- Volumul de probă aplicată – 1000 mL
- Debitul mediu de trecere a probei prin cartuș – 5 - 8 mL/min

- Cartușele SPE: Strata C18-U (Phenomenex), cantitate umplută - 500 mg/6 mL, dimensiunea porilor - 67 Å, aria suprafeței particulelor - 505 m<sup>2</sup>/g, diametrul mediu al particulelor - 56 μm..
- Condiționarea preliminară a cartușelor SPE – 12 mL metanol, apoi 12 mL apă MilliQ
- Solvent de eluție – 3 mL metanol 100%.
- Viteza de eluție – gravitațional (fără aplicare de vacuum sau presiune)
- Volumul fracțiunii metanolice finale (dupa concentrarea prin evaporare sub curent de azot - TurboVap) – 1 mL

### 3. Validarea metodei

În vederea validării metodei dezvoltate pentru matricea „apă de băut”, au fost estimați următorii parametri de performanță:

- *etalonarea și liniaritatea*
- *limitele de detecție și cuantificare*
- *fidelitatea*
- *justețea*

Studiul de *robustețe* a constat în suma experimentelor întreprinse în timpul dezvoltării și optimizării metodei (subcapitolul anterior).

#### 3.1. Curbele de etalonare

În tabelul II.4.10 sunt prezentați coeficienții curbelor de etalonare (panta și intercepția cu axa y) și coeficienții de regresie  $r^2$  obținute în urma aplicării metodei de calibrare externă. Pentru fiecare analit au fost obținute 3 curbe de etalonare (3 zile de lucru diferite). Domeniul de liniaritate a fost 5 – 1000 ng/L pentru toți analiții. S-au folosit factori de ponderare de tip  $1/y^2$  pentru calculul regresii liniare în vederea minimizării heteroscedasticității datelor. Tabelul II.4.10 mai conține și limitele de detecție estimate pe baza metodei US EPA („*United States – Environmental Protection Agency*”) pentru probele de apă. EPA definește limita de detecție drept concentrația minimă de analit măsurat pentru care se poate raporta, cu o probabilitate de 99%, că este mai mare decât 0. Metoda propune ca limita de detecție să fie estimată pe baza

deviației standard a rezultatelor pentru  $n$  măsurări ( $n \geq 7$ ), probele în cauză fiind suplimentate cu analitul de interes la un nivel de concentrație adecvat (în general, de 1 – 5 ori mai mare decât limita estimată la început) și procesate identic de la început la sfârșit [124]. Metoda este în special recomandată atunci când este dificil sau puțin practic să se măsoare zgomotul pentru o serie de probe de blanc și pleacă de la premisa că frecvența de distribuție a măsurărilor pentru probele suplimentate cu analit la concentrații joase este aceeași cu frecvența de distribuție în cazul lipsei analitului din probă (probe blanc cu „concentrație zero”). Aceasta din urmă se datorează măsurării zgomotului instrumental și/sau diverselor interferențe matriceale din probele de blanc.. Formula de calcul este dată de ecuația 6:

$$MDL = s \times t_{(n-1, 1-\alpha = 0,99)} \quad (6)$$

unde  $n$  = număr de măsurări de probe suplimentate cu analitul de interes  
 $s$  = deviația standard a rezultatelor pentru cele  $n$  probe suplimentate cu analitul de interes  
 $t$  = valoarea coeficientului Student pentru  $n-1$  grade de libertate și nivelul de încredere  $1-\alpha$   
 $\alpha$  = nivelul de semnificație statistică

În cazul metodei dezvoltate, s-au analizat în replicat ( $n = 12$ ), la un nivel de concentrație de 5 ppt (vezi tabelul II.4.12 pentru valorile exacte pentru fiecare analit). Valoarea coeficientului Student  $t$  a fost 2,71 (corespunzătoare la 11 grade de libertate și  $\alpha = 0,01$ ).

Limita de cuantificare (LOQ) a fost aleasă pentru toți analiții 5 ng/L (nivelul  $S/N > 5$ ), foarte aproape de valoarea concentrației alese pentru estimarea LOD prin metoda US EPA.

Tabel II.4.11. Parametri curbelor de etalonare precum și limitele de detecție și cuantificare ale metodei dezvoltate.

Analit	Panta dreptei (n=3)	Intercepția dreptei cu axa y (n=3)	Coeficientul de regresie $r^2$ (n=3)	LOD, ng/L (n= 12)	LOQ, ng/L (n= 12)
estrone	156888,1 ± 23249,5	-113024,8 ± 29483,1	0,999986 ± 0,000016	1,0	5,0
estradiol	58653,0 ± 6592,5	- 46112,1 ± 9121,6	0,999978 ± 0,000011	2,3	5,0
etinilestradiol	44959,2 ± 5746,6	- 63280,4 ± 12354,2	0,999986 ± 0,000010	3,4	5,0
estradiol deuterat	36550,2 ± 4228,2	-56150,9 ± 2337,5	0,999990 ± 0,000003	2,4	5,0

3.2. Estimarea repetabilității și reproductibilității metodei pentru matricea „apă de băut”

Tabel II.4.12. Bias-ul, repetabilitatea și reproductibilitatea metodei pentru matricea “apă de băut”, estimate prin metoda calibrării externe.

Analit	Concentrația, ng/L	Intra-zi		Inter-zile	
		Exactitate (recuperarea, %)	Fidelitate (RSD, %)	Exactitate (recuperarea, %)	Fidelitate (RSD, %)
estrone	5,10 (LOQ)	95,27 (n=2)	-	96,45 (n=2+5+5)	7,65
		96,38 (n=5)	6,52		
		96,98 (n=5)	8,18		
	255	111,26 (n=2)	-	104,67 (n=2+2+2)	4,16
		98,09 (n=2)	-		
		104,66 (n=2)	-		
10,20	107,50 (n=2)	-	-	-	
20,40	119,41 (n=1)	-	-	-	
estradiol	5,15 (LOQ)	88,27 (n=2)	-	89,46 (n=2+5+5)	19,69
		89,37 (n=5)	17,85		
		90,01 (n=5)	17,24		
	257,5	94,11 (n=2)	-	93,50 (n=2+2+2)	7,32
		88,71 (n=2)	-		
		97,68 (n=2)	-		
10,3	109,05 (n=2)	-	-	-	
20,60	100,10 (n=1)	-	-	-	
etinilestradiol	5,40 (LOQ)	92,96 (n=2)	-	93,35 (n=2+5+5)	24,66
		89,82 (n=5)	16,45		
		97,03 (n=5)	35,98		
	270	84,81 (n=2)	-	89,89 (n=2+2+2)	8,16
		90,18 (n=2)	-		
		94,70 (n=2)	-		
10,8	103,64 (n=2)	-	-	-	
21,60	94,93 (n=1)	-	-	-	
estradiol deuterat	5,84 (LOQ)	104,24 (n=2)	-	84,63 (n=2+5+5)	18,78
		70,65 (n=5)	17,20		
		90,78 (n=5)	16,15		
	292	92,24 (n=2)	-	94,16 (n=2+2+2)	4,56
		88,97 (n=2)	-		
		101,27 (n=2)	-		
11,68	106,13 (n=2)	-	-	-	
23,36	104,67 (n=1)	-	-	-	

Note:

1. valorile recuperărilor au fost estimate pe baza comparării ariei picurilor cromatografice în cazul injecțiilor soluției standard de analiți cu care s-a făcut suplimentarea cu cele obținute pentru probele suplimentate și procesate.
2. Valorile RSD au fost estimate pe baza ariei picurilor cromatografice
3. n = numărul de probe utilizate pentru estimare în fiecare șarjă analitică (zi de lucru)
4. Valorile RSD nu au fost calculate pentru probele în duplicat (n=2) pentru că, statistic vorbind, valoarea nu are sens pentru n=1 și n=2.

În vederea validării metodei pentru probele de apă de băut, au fost executate o serie de teste de repetabilitate și reproductibilitate (mai corect, repetabilitate intermediară) la 2 nivele de concentrație semnificative, 5 ppt (limita de cuantificare) și 250 ppt (valoare situată aproximativ la jumătatea domeniului 5 – 1000 ppt de liniaritate); au fost de asemenea verificate performanțele metodei în ceea ce privește recuperarea analiților și la alte valori ale concentrațiilor, 10 ppt și 20 ppt, valori presupuse a fi descoperite experimental cu o probabilitate mai mare în cazul probelor reale.

Tabelul II.4.12 sintetizează parametri de performanță ai metodei în termenii exactității – estimată ca recuperarea, în %, a analiților de interes din probe suplimentate cu aceștia – și ai fidelității – estimată ca deviația standard relativă (coeficientul de varianță), în %, pentru experimentele intra-zi (repetabilitatea) și inter-zile (reproductibilitatea) [125].

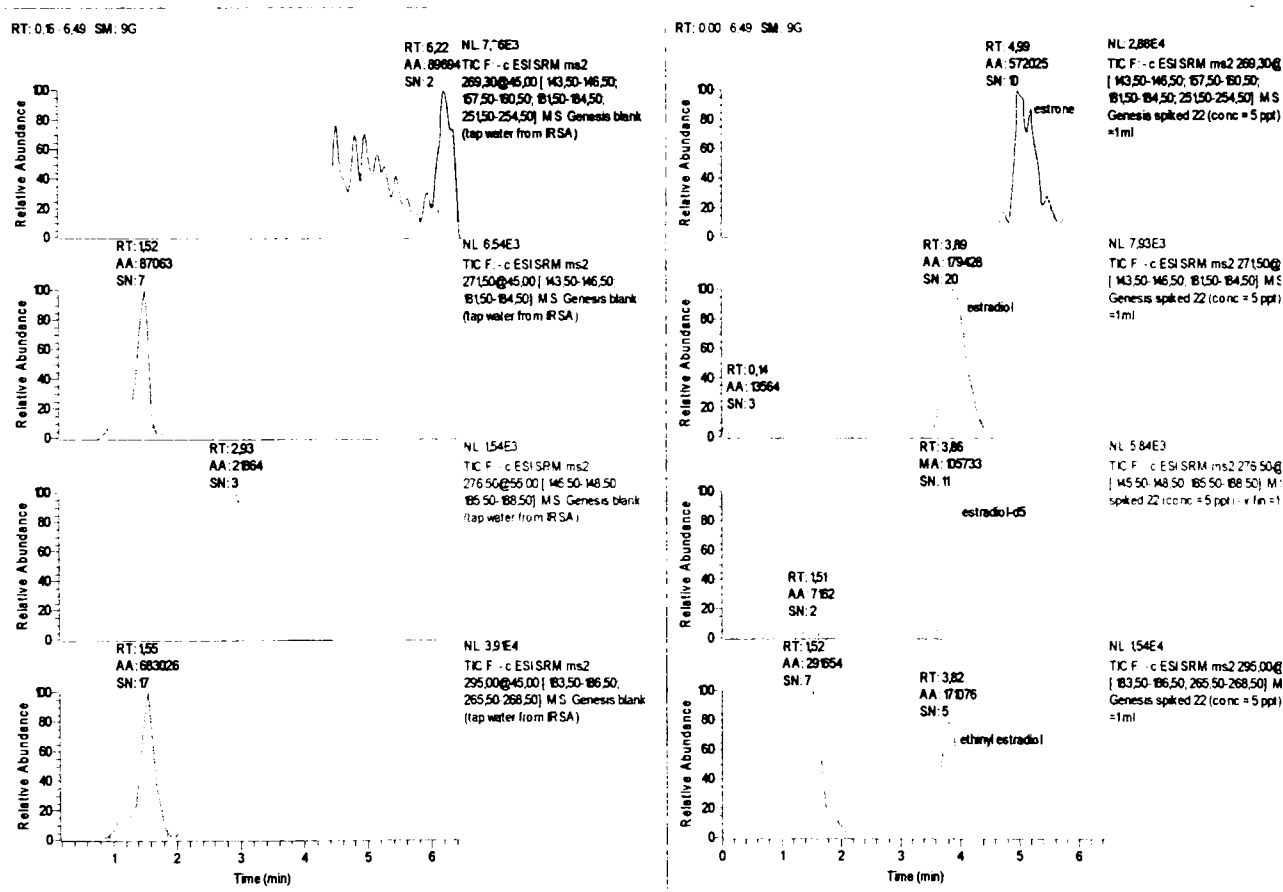


Fig. II.4.6. Cromatogramele achiziționate (în modul de scanare SRM) pentru o probă blank de apă de băut prelevată de la rețeaua IRSA (panoul din stânga) și pentru o probă suplimentată cu cei 4 analiți la nivelul de concentrație 5 ppt (panoul din dreapta).

Figura II.4.6 prezintă, ca exemplu, setul de cromatograme obținute pentru o probă blanc și una din probele folosite în testele de validare.

#### *4. Adaptarea și optimizarea metodei pentru analiza estrogenilor din apa potabilă la probe de apă de râu*

##### *4.1. Teste preliminare cu probe blanc*

Primul pas a constat în studiul efectului matricei “apă de râu” asupra recuperării analiților de interes. Astfel, au fost colectate probe din râul Lambro în două situsuri, unul în amonte de uzina de prelucrare a apelor uzate (situsul „Monza”) și celălalt în aval de această uzină (situsul „Brugherio”). Pentru pregătirea probelor s-a aplicat protocolul SPE din cadrul metodei pentru apa potabilă. Analizele au fost efectuate în duplicat. Din păcate, s-au înregistrat cromatograme cu „încărcare” puternică (zgomot ridicat al liniei de bază) în zona de retenție a analiților de interes precum și cu semnale reduse ca intensitate ale acestora. Importanță din punctul de vedere al optimizării metodei a fost stabilirea cauzei care a generat acest comportament. În mod evident au fost suspicionate ineficiențele în curățarea probelor de interferenții matriceali și în recuperarea corespunzătoare a analiților de interes în cadrul etapei SPE. Pentru verificarea ipotezelor au fost desfășurate următoarele două experimente:

- o primă porțiune de probă de râu, prelevată din situsul „Monza”, a fost procesată conform metodei pentru apa potabilă; fracțiunea metanolică finală a fost suplimentată cu soluție standard de analiți astfel încât nivelul final al acestora a fost de 20 ppb → “supl. 36”.
- cealaltă porțiune de probă de râu a fost mai întâi suplimentată cu soluție standard de analiți astfel încât nivelul acestora a fost de 20 ppt. A urmat procesarea probei conform protocolului pentru apa potabilă (factor de concentrare 1000) → “supl. 37”.

Tabelul II.4.13 prezintă valorile recuperărilor atinse pentru cele două probe. Luate separat, valorile recuperărilor sunt total nesatisfăcătoare în raport cu valoarea teoretică de referință (soluția standard de analiți cu care s-a făcut suplimentarea). Pentru recuperarea însă a analiților din proba suplimentată înaintea aplicării etapei SPE (“supl. 37”) în raport cu cea în care analiții de interes nu au fost supuși pregătirii probei (“supl. 36”), se ating randamente bune

(mai puțin pentru etinilestradiol). Prin urmare, doar valorile recuperărilor din coloana a 4-a a tabelului II.4.12 ne prezintă adevărata influență a etapei SPE în pierderile analiților de interes.

Tabel II.4.13. Recuperările pentru probele "supl. 36" și "supl. 37".

Analit	Recuperarea pt proba supl. 36 în raport cu soluția standard de reactivi, %,	Recuperarea pt proba supl. 37 în raport cu soluția standard de reactivi, %,	Recuperarea pt proba supl. 37 în raport cu proba supl. 36, %,
E1	47,08	50,43	107,12
E2	21,10	20,01	94,86
E2-d <sub>5</sub>	34,80	32,83	94,32
EE2	25,98	20,70	79,66

*Notă* - Valorile recuperărilor au fost estimate pe baza comparării ariei picurilor cromatografice în cazul injecțiilor soluției standard de analiți cu care s-a făcut suplimentarea cu cele obținute pentru probele suplimentate și procesate.

*Concluzie intermediară:* diminuarea semnificativă a semnalului și zgomotul intens al liniei de bază se datorează prezenței interferențelor matriceale în fracțiunea metanolică finală și nu capacității insuficiente de retenție a cartușelor SPE. Este de presupus, ținându-se cont de principiul de funcționare al interfeței tip ESI, că are loc suprimarea parțială a ionizării analiților de interes.

#### 4.2. Încercări de optimizare a unor parametri în vederea diminuării efectelor interferențelor matriceale

##### a. parametrii instrumentali ai detectorului de masă cu trapă ionică

*Propuneri:*

- îngustarea dimensiunii ferestrelor pentru filtrele de scanare tip SRM, atât pentru fragmentele ionice de precursori cât și pentru produși
  - pentru precursori: de la 2 unități → 1 unitate.
  - pentru produși: de la 3 unități → 2 unități

În figurile II.4.7 și II.4.8 sunt prezentate comparativ, pentru estronă și estradiol, semnalele în cazul celor două variante de dimensiuni ale ferestrelor de izolare a fragmentelor ionice de interes pentru scanările tip SRM.

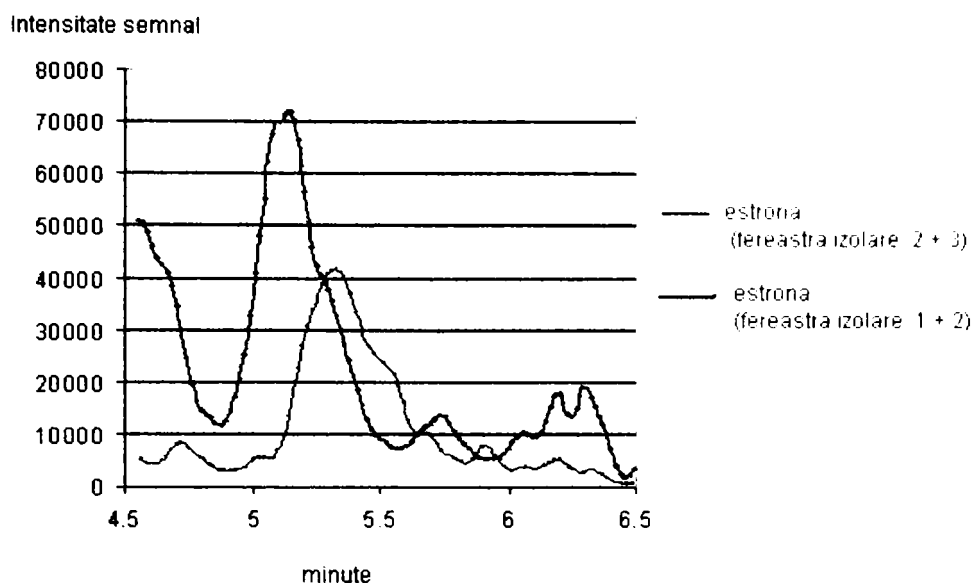


Fig. II.4.7. Comparație între cromatogramele pentru *estronă* achiziționate cu ferestrele de izolare 2 pentru precursor și 3 pentru produși (linia albastră) respectiv 1 pentru precursor și 2 pentru produși (linia roz), achiziționate cu filtru de scanare tip SRM.

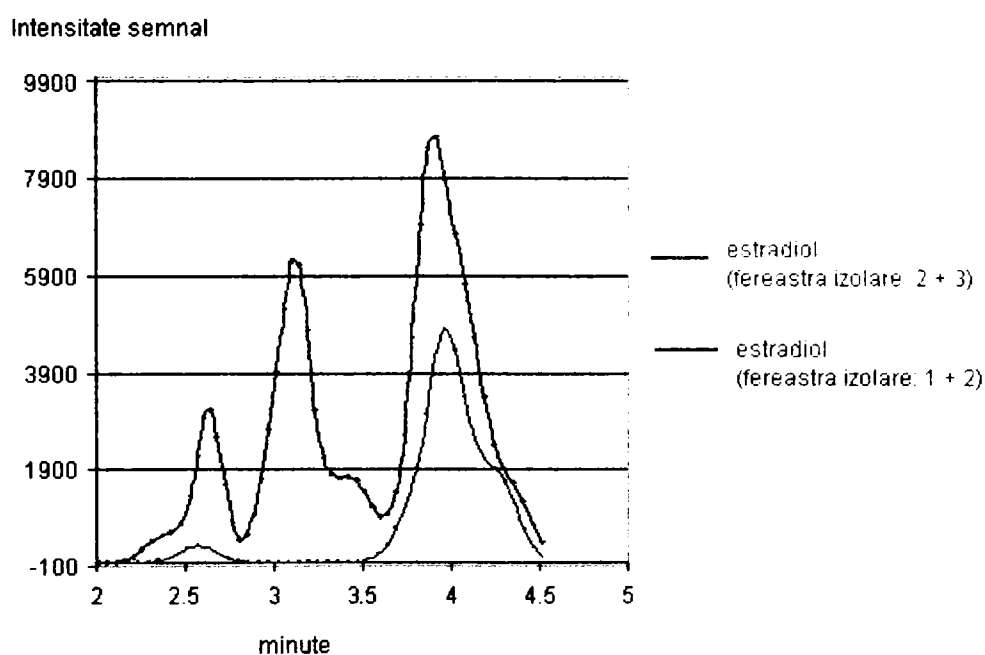


Fig. II.4.8. Comparație între cromatogramele pentru *estradiol* achiziționate cu ferestrele de izolare 2 pentru precursor și 3 pentru produși (linia albastră) respectiv 1 pentru precursor și 2 pentru produși (linia roz), achiziționate cu filtru de scanare tip SRM.



*Concluzie intermediară:* este evident faptul că zgomotul liniei de bază este mult mai puțin deranjant în cazul utilizării ferestrelor îngustate în raport cu semnalul achiziționat cu ferestrelor mai largi iar riscul unor potențiale coeluții (parțiale sau totale) scade semnificativ. În schimb, cum era de așteptat, în termenii sensibilității, îngustarea filtrului de scanare a fragmentelor ionice conduce la o scădere a acesteia. În cazul etinilestradiolului, se constată că nu are loc o îmbunătățire a detecției picului cromatografic.

- scăderea potențialului multiplicatorului de electroni

Toate experimentele de până acum au fost desfășurate la un voltaj al multiplicatorului detectorului de masă de -930 V. S-a testat efectul scăderii voltajului la -830 V asupra zgomotului liniei de bază.

*Concluzie intermediară:* diminuarea acestuia este însoțită și de scăderea drastică a semnalului analiților de interes astfel că, per total, nu se obține o îmbunătățire a sensibilității ci dimpotrivă.

- creșterea numărului de produși ce sunt monitorizați în filtrul de scanare tip SRM

S-a testat efectul pe care îl are adăugarea unui nou fragment (de produs) în filtrul de scanare SRM al etinilestradiolului (analitul cu cel mai scăzut semnal).

*Concluzie intermediară:* suplimentarea cu fragmentul  $m/z$  145 nu a condus la o îmbunătățire semnificativă a semnalului (atât pentru ferestrelor de izolare 1 + 2, cât și pentru 2 + 3).

#### b. *parametri ai etapei SPE de pregătire a probei*

##### *Propuneri:*

- reducerea volumului de probă procesată, bineînțeles cu păstrarea volumului fracțiunii metanolice finale (1 mL). S-a realizat astfel scăderea concentrației interferențelor matriceale injectați în sistem.

*Concluzie intermediară:* se constată o reducere relativ însemnată a zgomotului; din nefericire, ea e însoțită și de o scădere a sensibilității și, implicit, a limitelor de detecție și cuantificare.

#### 4.3. *Teste suplimentare pentru elucidarea influențelor cartușelor SPE asupra recuperării analiților de interes*

Pentru confirmarea suplimentară a faptului că valorile mici ale recuperărilor analiților de interes nu se datorează etapei de SPE, s-a procedat la verificarea posibilității ca valorile mici

ale recuperărilor să se datoreze unei eluări incomplete de pe cartușele SPE. Procesul ar fi putut apărea ca urmare a apariției unor efecte adsorbante puternice asupra analiților de interes de către stratul de interferenți matriceali reținuți din probă. Experimental, au fost procesate, în mod similar, două probe de câte 500 mL apă de râu (prelevate din situsul „Monza”). Volumul fracțiunii metanolice finale a fost de 1 mL. După terminarea procedurii, cele două cartușe SPE (notate „supl. 40” și „spike 41”) au fost supuse unor eluții suplimentare în vederea detectării posibilelor cantități de analiți neeluți:

- cartușul „supl. 40”
  - spălarea nr. 1 cu 3 mL acetonă → fracțiunea „supl. 40-a”
  - spălarea nr. 2 cu 6 mL acetonă → fracțiunea „supl. 40-b”
- cartușul „supl. 41”
  - spălarea nr. 1 cu 3 mL metanol → fracțiunea „supl. 41-a”
  - spălarea nr. 2 cu 6 mL metanol → fracțiunea „supl. 41-b”

*Concluzie intermediară:* cromatogramele tuturor celor 4 fracțiuni culese nu au putut decela prezența nici unuia dintre analiții de interes demonstrând astfel că nu cartușele SPE sunt responsabile pentru recuperările aparente scăzute. Se confirmă astfel, în plus, că responsabile pentru aceste valori sunt fenomenele de suprimare parțială a ionizării analiților de interes în interfața ESI în prezența interferențelor din probele de apă de râu.

#### 4.4. *Estimarea repetabilității și reproductibilității metodei pentru matricea „apă de râu”*

Probele de apă au fost prelevate din râul Lambro, în amonte de uzina de prelucrare a apelor uzate (situsul „Monza”) și suplimentate cu soluție standard de analiți de interes la nivelul de concentrație 40 ppt.

Valorile medii ale principalelor caracteristici fizico-chimice ale apei de râu (situsul „Monza”) au fost:

- Conductivitatea – 468  $\mu\text{S}/\text{cm}$
- pH 8,26
- carbon organic dizolvat (COD) – 5,52 mg/L.

Pe baza concluziilor seturilor de teste 4.2 și 4.3 s-a decis ca pregătirea probelor prin tehnica SPE utilizată pentru matricea „apă potabilă” să sufere o singură modificare:

- volumul de probă aplicată – 500 mL

Cealaltă modificare în metodă constă în îngustarea ferestrelor pentru filtrele de scanare tip SRM:

- pentru precursori: 1 unitate
- pentru produși: 2 unități.

Tabelul II.4.14 prezintă parametri de performanță ai metodei în termenii exactității – estimată ca recuperare, în %, a analiților de interes din probe suplimentate cu aceștia – și ai fidelității – estimată ca deviația standard relativă (coeficientul de varianță), în %, pentru experimentele intra-zi (repetabilitatea) și inter-zile (reproductibilitatea).

Tabel II.4.14. Bias-ul, repetabilitatea și reproductibilitatea metodei pentru matricea “apă de râu”, estimate atât prin metoda calibrării externe cât și prin cea cu standard intern.

Analit	Concentrație, ng/L		Recuperare (metoda calibrării externe), %	RSD, %	Recuperare (metoda standardului intern), %	RSD, %
Estrona	40,80	intra-zi	75,20 (n=5)	7,86	229,53 (n=5)	15,85
			68,38 (n=4)	4,12	181,63 (n=4)	10,72
		inter-zile	72,17 (n=5+4)	6,35	208,24 (n=5+4)	13,64
estradiol	41,20	intra-zi	31,51 (n=5)	23,52	94,92 (n=5)	22,30
			35,97 (n=4)	33,95	93,70 (n=4)	27,31
		inter-zile	33,49 (n=5+4)	36,32	94,38 (n=5+4)	28,65
etinilestradiol	43,20	intra-zi	21,95 (n=5)	15,37	67,06 (n=5)	23,47
			15,54 (n=4)	29,40	41,11 (n=4)	30,08
		inter-zile	19,10 (n=5+4)	26,25	55,53 (n=5+4)	33,60
estradiol deuterat	46,72	intra-zi	33,25 (n=5)	13,90	-	-
			37,87 (n=4)	7,55	-	-
		inter-zile	35,30 (n=5+4)	11,74	-	-

Note:

1. Valorile recuperărilor (cu metoda standardului intern) au fost estimate pe baza comparării ariei picurilor cromatografice în cazul injecțiilor soluției standard de analiți cu care s-a făcut suplimentarea cu raportul ariilor pic analit/pic estradiol deuterat din probele suplimentate și procesate.
2. Valorile recuperărilor (cu metoda calibrării externe) au fost estimate pe baza comparării ariei picurilor cromatografice în cazul injecțiilor soluției standard de analiți cu care s-a făcut suplimentarea cu cele obținute pentru probele suplimentate și procesate.
3. Valorile RSD au fost estimate pe baza ariei picurilor cromatografice.
4.  $n$  = numărul de probe utilizate pentru estimare în fiecare șarjă analitică (zi de lucru)

Tabelul II.4.14 prezintă comparativ valorile recuperărilor calculate atât pe baza metodei de calibrare externe cât și pe cea folosind standard intern. Din nefericire, s-a reușit procurarea unui singur compus deuterat, estradiolul deuterat, care poate juca rolul unui „adevărat” standard intern doar pentru analitul estradiol. Acest aspect este pe deplin ilustrat de valorile înregistrate în tabel. Astfel, doar pentru estradiol metoda calibrării cu standard intern reușește să corecteze influențele matricei. Pentru ceilalți 2 analiți, estrona și etinilestradiolul, valorile calculate cu această metodă sunt în afara domeniului acceptabil (80-120%), fapt previzibil teoretic. Metoda calibrării externe a oferit valori în afara domeniului acceptabil pentru toți analiții dovedind astfel necesitatea fie a utilizării de standarde interne adecvate pentru toți cei 3 analiți de interes, fie îmbunătățirea etapei SPE de pregătire a probelor în vederea minimizării concentrațiilor de interferenți matriceali.

Limita de detecție a metodei estimată pe baza procedurii US EPA pentru analitul estradiol (folosind metoda standardului intern) a fost  $15,4 \text{ ng L}^{-1}$  (coeficientul Student  $t = 2,90$ ,  $n-1 = 8$ ,  $\alpha = 0,01$ ).

#### 4.5. Aplicarea pe probe reale a metodei de determinare a hormonilor estrogeni din apă de râu

Pentru a demonstra capacitatea metodei de a identifica analiții țintă, un număr de probe reale de apă de râu au fost prelevate și analizate. Astfel, au fost analizate probe de apă prelevată din râul Lambro, în ambele situsuri („Monza” și „Brugherio”). Așa cum demonstrează setul de cromatograme din figura II.4.9, una din probele prelevate din situsul „Brugherio” (în aval de uzina de prelucrare a apelor uzate) s-a dovedit a fi pozitivă în ceea ce privește **estrona**. Pentru cuantificarea ei, din cauza imposibilității procurării unui standard deuterat pentru estronă, s-a utilizat aria picului din cromatograma unei porțiuni din aceeași probă dar suplimentată cu standard de estronă (metoda suplimentării cu cantitate cunoscută de analit). Valoarea calculată a fost  $13,7 \text{ ng L}^{-1}$ .

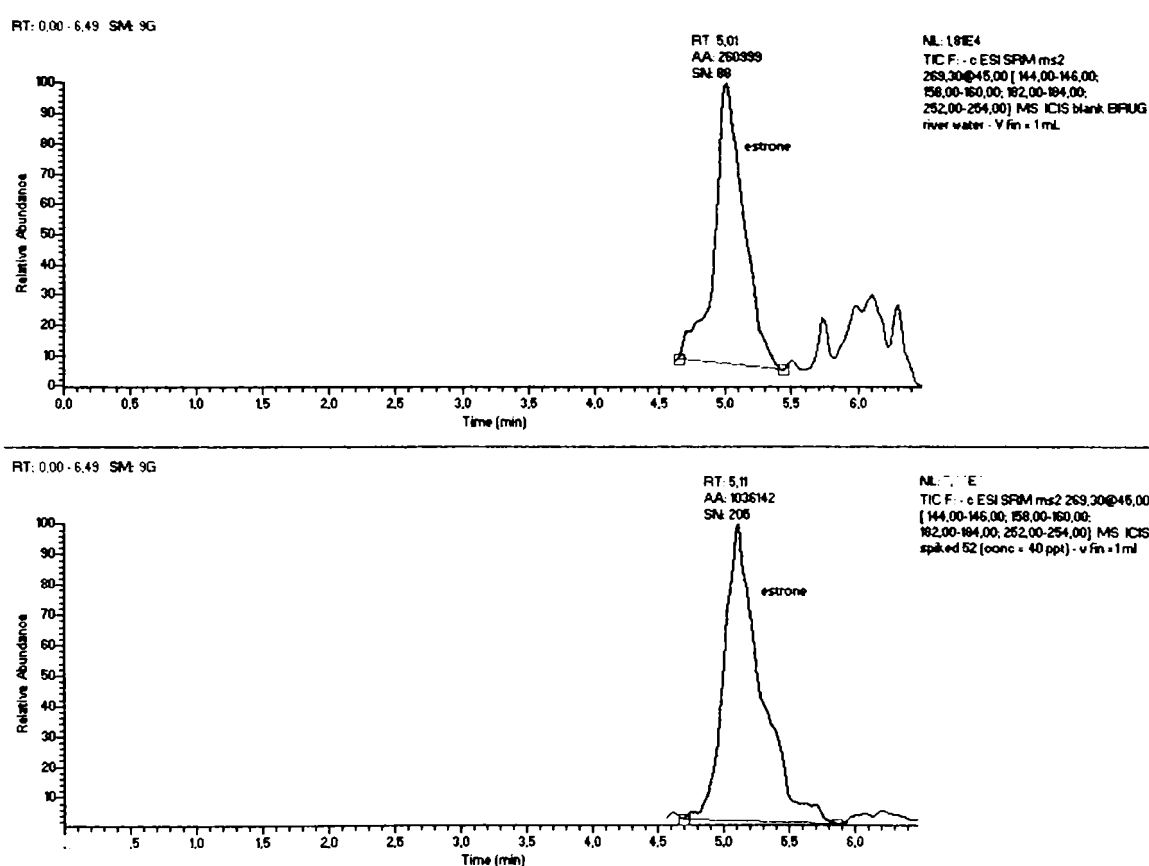


Fig. II.4.9. Cromatogramele achiziționate în modul de scanare SRM ale unei prime porțiuni de 500 mL de apă din râul Lambro, (situsul “Brugherio”) (panoul superior) și ale celei de-a doua porțiuni de 500 mL ale aceleiași probe dar suplimentată cu standard de estronă (20,40 ng analit la 500 mL probă) (panoul inferior).

## Capitol III. Concluzii finale

Cercetările realizate au urmărit, în prima lor parte, studiul comportării cromatografice și optimizarea separării pentru câteva clase de pesticide, de diferite polarități (pesticide carbamice, organofosforice, triazinice și organoclorurate). În a doua parte, s-au studiat o serie de limitări instrumentale asociate utilizării interfeței de ionizare prin sprayere în câmp electric (ESI) și a trapei ionice quadrupolice la analiza alchilfenolilor prin LC-ESI-MS. În cea de-a treia parte, este prezentată dezvoltarea, optimizarea și validarea unei metode de determinare a unor hormoni estrogeni din apa potabilă prin LC-ESI-MS. Robustețea, simplitatea etapei de pregătire a probei și performanțele analitice ale metodei de determinare a estrogenilor (în special sensibilitatea și selectivitatea) precum și costul rezonabil al echipamentului (în comparație cu sistemele lichid-cromatografice cuplate cu spectrometre de masă cu triplu-quadrupol) o recomandă pentru viitoarea ei implementare în sistemele automatizate LC-ESI-MS din dotarea uzinelor de apă ce vor efectua monitorizarea on-line a acestor contaminanți din probe de apă (potabilă, de râu etc.)

Subcapitolele din „Contribuțiile proprii” cuprind deja o serie de concluzii punctuale intermediare în secțiunile „Rezultate și Discuții” ale fiecăruia. Sintetizând, în cadrul lucrărilor experimentale s-au urmărit și realizat următoarele:

*1. Optimizarea separării lichid-cromatografice pentru unele grupuri de pesticide cu hidrofobicități variate (cap. II.1)*

*1.1. Optimizarea separării RP-HPLC a unor insecticide cu hidrofobicitate medie și scăzută prin eluție izocratică (cap. II.1.1)*

Separarea RP-HPLC propusă pentru grupul de insecticide cygon (dimetoat), phosdrin (mevinfos), DDVP (diclorfos), metomill, temik (aldicarb), baygon (propoxur), bendiocarb și carbofuran este suficient de rapidă (aproximativ 15 minute), simplă (se realizează în regim izocratic al compoziției fazei mobile binare) și selectivă (separare până la linia de bază pentru

toți analiții cu excepția perechii bendiocarb – carbofuran) pentru a fi utilizată drept etapă de separare cromatografică în metodele de rutină pentru depistarea și cuantificarea acestor insecticide în diverse tipuri de probe. Nu s-a reușit utilizarea metanolului în locul acetonitrilului în compoziția fazei mobile (primul fiind mai ieftin de aproximativ 2,5 ori și ceva mai puțin toxic) din cauza rezoluției proaste de separare înregistrate pentru diversele cupluri de analiți. Acetonitrilul și-a dovedit, în cazul acestei separări, utilitatea prin selectivitatea mai bună în raport cu grupul de analiți studiați. Cu toate acestea, folosirea unei concentrații relativ reduse de acetonitril, 30% (v/v), face ca metoda să nu fie semnificativ mai scumpă decât majoritatea analizelor HPLC similare.

*1.2. Evaluarea comportării cromatografice în separarea RP-HPLC a unor erbicide cu hidrofobitate medie și scăzută de largă utilizare (cap. II.1.2)*

Evaluarea comportării cromatografice a atrazinei, cianazinei, 2,4-D, metamitronului, cloridazonului și glifosatului a permis punerea la punct a unei separări RP-HPLC ce poate fi utilizată pentru identificarea și cuantificarea lor în cazul detecției simultane în diverse probe. Studiul a demonstrat utilitatea detectorului cu arie de diode în identificarea, pe baza spectrelor UV, a celor șase analiți luați în studiu atunci când separarea cromatografică nu reușește să îi rezolve (coeluții parțiale sau chiar totale înregistrate pentru perechile de analiți atrazină – 2,4-D respectiv cloridazon – metamitron). În ceea ce privește cuantificarea, detectorul arie de diode oferă posibilitatea obținerii de cromatograme extrase (într-un singură trecere cromatografică) la diferite lungimi de undă convenabil alese pentru a masca prezența unui analit ce coeluează cu analitul ce se dorește a se cuantifica. Deși nu există pe piață biblioteci (colecții) de spectre UV-VIS din cauza specificității relativ mici (în raport cu alte tipuri de spectre, cum sunt spectrele MS), se poate iniția construirea unei baze de date la nivelul laboratorului. Acestea vor putea fi utilizate pentru confirmări suplimentare în cazul unora din separările dificile din cadrul metodelor de rutină.

---

*1.3. Optimizarea separării RP-HPLC a trei erbicide triazinice cu hidrofobicitate medie prin eluție izocratică (cap. II.1.3)*

Pentru cele trei erbicide triazinice luate în studiu, simazina, atrazina și propazina, au fost stabilite condiții de lucru (debit de curgere, compoziția fazei mobile) simple și reproductibile pentru a asigura o separare lichid-cromatografică robustă și relativ rapidă: coloană cromatografică tip RP-C18, debit 1 mL min<sup>-1</sup>, fază mobilă metanol:apă - 50:50 (v/v), timp 22 min. Detectorul cu arie de fotodiode a permis, prin intermediul software-ului dedicat Millenium<sup>®</sup>, confirmarea identității analiților pe baza comparării spectrelor din apexul picurilor cu cele din baza de date construită anterior pe baza soluțiilor de standarde pure; în plus, subrutina „purity check” a permis verificarea purității spectrale a picurilor cromatografice (scăderea probabilității coeluțiilor totale, nedepistabile pe baza criteriului timpului de retenție).

*1.4. Optimizarea separării RP-HPLC a unui grup de patru pesticide organofosforice cu hidrofobicitate medie prin eluție izocratică (cap. II.1.4)*

Separarea RP-HPLC propusă pentru grupul de pesticide organofosforice Co-Ral (cumafos), zolone (fosalon), phorate (forat) și Di-Siston (disulfoton) este suficient de rapidă (aproximativ 8 minute) și simplă (se realizează în regim izocratic al compoziției fazei mobile binare) pentru a fi utilizată drept etapa de separare cromatografică în metodele de rutină pentru depistarea și cuantificarea acestor pesticide în diverse tipuri de probe. În ceea ce privește selectivitatea, ea s-a dovedit acceptabilă în condițiile abordării unui grup de analiți dificil de separat, cu valorile logP într-un domeniu restrâns. Parametrul logP și-a dovedit din plin în cazul acestei separări limitările în ceea ce privește predicția ordinii de retenție. Studiul demonstrează, mai pregnant decât în cazul grupului de opt pesticide prezentat anterior (vezi paragraful 1.1), ce diferențe remarcabile de selectivitate se pot manifesta între metanol și acetonitril. Devine evident faptul că, deși nu s-a reușit utilizarea metanolului în locul acetonitrilului în compoziția fazei mobile nici măcar parțial (ca și component al unei faze mobile ternare apă-acetonitril-metanol), capacitatea de separare a acetonitrilului îl transformă în solventul de ales pentru acest grup de analiți.



*1.5. Separarea RP-HPLC a unui număr de cinci pesticide organoclorurate puternic hidrofobe (cap. II.1.5)*

Compușii metoxiclor, dursban, hepaclor, DDT și aldrin, datorită structurii lor chimice, sunt substanțe puternic nepolare ( $\log P$  în domeniul 5 - 7). Tradițional, ei sunt analizați prin cromatografia de gaze. Separarea prezentată de noi a demonstrat că tehnica RP-HPLC poate fi folosită cu succes pentru separarea acestui grup de pesticide organoclorurate cu performanțe acceptabile în ceea ce privește rezoluția separării (chiar și pentru perechea metoxiclor-dursban), timpul trecerii cromatografice (aproximativ 27 minute) și tipul de eluție utilizat (izocratic). Detecția în UV la 220 nm asigură limite de detecție instrumentale în zona 0,2 – 0,3 mg L<sup>-1</sup> pentru toți analiții, pentru injecții directe de 50 μL.

*2. Influența unor parametri de lucru asupra eficienței etapei de pregătire a probei din cadrul unei metode HPLC de identificare și cuantificare a unui set de 5 pesticide organoclorurate din apa potabilă (cap. II.2)*

*2.1. Optimizarea unor parametri de lucru din cadrul etapei de pregătire a probei realizată prin extracție lichid-lichid (cap. II.2.1)*

Studiul a relevat faptul că atingerea unor performanțe acceptabile în ceea ce privește bias-ul metodei HPLC propuse pentru determinarea pesticidelor organoclorurate în probe de apă potabilă, este condiționată de o pregătire foarte atentă a probei în vederea minimizării pierderilor în analiții de interes. Datele experimentale au pus în evidență câteva dintre punctele critice care pot altera rezultatele studiilor de recuperare ce se realizează uzual pentru demonstrarea performanțelor unei metode lichid-cromatografice:

- necesitatea stabilirii concentrației reale a analiților de interes în soluțiile de apă bidistilată suplimentate datorită problemelor de solubilizare la preparare.
- verificarea necesității introducerii mai multor etape de extracție lichid-lichid.

S-a confirmat faptul că varianta concentrării extractului organic prin evaporarea lui pe baie de nisip conduce la pierderi mult mai mari în analiți în raport cu varianta concentrării la evaporator rotativ. În plus, nu s-a constatat necesitatea utilizării mai multor etape de extracție lichid-lichid.

S-a estimat că limita de cuantificare a metodei este în zona  $0,1 - 0,15 \mu\text{g L}^{-1}$  per analit, pentru factori de concentrare 1000 în urma etapei de pregătire a probei și pentru volume de injecție de  $100 \mu\text{L}$  extract organic final (suficient pentru a corespunde prevederilor legislației naționale).

Principalele dezavantaje ale metodei: volumul mare de solvent organic, toxic și scump, consumat și valorile prea mici ale recuperărilor ( $< 70\%$ ) pentru dursban și heptaclor. Avantajele cel mai evidente stau în simplitatea metodei (absența etapelor prea laborioase) și posibilitatea utilizării echipamentului HPLC pentru analiza celor 5 pesticide organoclorurate atunci când laboratorul nu are în dotare un cromatograf de gaze.

## *2.2. Testarea performanțelor extracției în fază solidă (SPE) ca etapă de pregătire a probei (cap. II.2.2)*

Studiul a evaluat performanțele în ceea ce privește recuperarea unui grup de 5 pesticide organoclorurate de pe două tipuri de cartușe SPE umplute cu silicagel derivatizat cu grupări C18 (produse de firme diferite) în urma concentrării pe ele a unor soluții de apă bidistilată. S-au atins recuperări apropiate, de aproape 80% (acceptate, în cadrul legislativ actual, în domeniul analizei pesticidelor organoclorurate din probele de apă potabilă), pentru ambele tipuri de cartușe luate în studiu și pentru toți cei 5 analiți. Diversele modificări ale volumului de probă aplicată și debitelor de aplicare a probelor nu au condus la îmbunătățiri ale recuperărilor. S-au observat însă diferențe semnificative în ceea ce privește repetabilitatea (dispersia) experimentelor în raport cu nivelul concentrației analiților de interes din proba trecută peste cartuș. Astfel, deviațiile standard relative pentru soluțiile cu concentrații de ordinul unităților de ppb s-au situat în zona 20% în timp ce pentru soluțiile cu concentrații de ordinul zecilor de ppb ele nu au depășit 10%. Folosirea de cartușe umplute cu Florisil drept material adsorbant în tehnica SPE pentru concentrarea pesticidelor organoclorurate metoxiclor, dursban, heptaclor, DDT și aldrin din probe de apă, s-a dovedit inefficientă în ceea ce privește parametri de performanță studiați (recuperarea, repetabilitatea).

3. *Stabilirea limitărilor de natură instrumentală în utilizarea interfeței „electrospray ionization” și a trapei ionice quadrupolice la analiza LC-ESI-MS a alchilfenolilor (cap. II.3)*

Au fost evaluate influențele unora dintre parametri de lucru ai interfeței ESI și spectrometrului de masă cu trapă ionică asupra semnalului pentru un grup de patru alchilfenoli: bis-fenol A, 4-terț-butilfenol, 4-nonilfenol și 4-octilfenol. S-a demonstrat că alegerea potrivită și conjugată a unora din parametri de lucru ai interfeței ESI (*debitul de gaz auxiliar, poziția axială a dispozitivului de sprayere*) poate conduce la intensificarea semnalului. În ceea ce privește parametri de utilizare ai trapei ionice, s-a demonstrat necesitatea găsirii compromisului optim între *numărul de evenimente de scanare* și intensitatea semnalului pentru filtrele de scanare ale analiților de interes precum și a *alegerii adecvate a tipului de filtrare realizat de câmpul de radiofrecvență* aplicat trapei ionice. Un aspect interesant l-a constituit *tipul de control (automat sau manual) a cantității de ioni din interiorul trapei ionice*. S-a constatat că restricționarea automată realizată de către software diminuează serios intensitatea semnalului (cu cel puțin un ordin de mărime). Este evident că problematica aceasta merită studii separate detaliate. Deși sensibilitatea atinsă pentru injecția directă în sistem (fără pași preliminari de pregătire și concentrare a probei) a fost acceptabilă (limită de detecție aproximativ 200 ppb pentru BPA, TBP și NP, aproximativ 400 ppb pentru OP), punctul critic al acestei faze analitice l-a constituit lipsa stabilității semnalului în timpul seriei analitice de probe. Experimentele susțin ipoteza că acest tip de comportament se datorează, în mare măsură, proprietăților specifice ale acestor analiți (aderență la nivelul pereților metalici ai întregului traseu dintre dispozitivul ESI și trapa ionică a spectrometrului, posibil și în interiorul trapei ionice), specificului constructiv al interfeței tip ESI (nu foarte performantă în ceea ce privește reproductibilitatea) cât și principiului de funcționare al spectrometrului de masă cu trapă ionică (puternic în ceea ce privește abilitatea de elucidare a structurii compușilor necunoscuți dar mai puțin performant în ceea ce privește reproductibilitatea rezultatelor analitice). Pentru a diminua semnificativ aceste efecte nedorite sunt necesari timpi lungi ai trecerilor cromatografice (care trebuie să includă o fază lungă de readucere a sistemului în stare de echilibru) și proceduri de curățare drastice între injecții (creșterea mare, la limita maxim admisibilă de producător, a temperaturii tubului capilar de transmitere de transmitere a ionilor

în spre partea de “ion optics” a spectrometrului, precum și executarea frecventă, la fiecare 5-6 șarje analitice, a procedurii de curățire a acestui tub prin ultrasonicare în solvent organic). Datorită nerezolvării problematicii scăderii semnalului în timpul șarjei analitice, s-a renunțat la etapa de dezvoltare și optimizare a etapei de pregătire a probei.

*4. Dezvoltarea, optimizarea și validarea unei metode de determinare a unor hormoni estrogeni din apa potabilă prin cromatografie de lichide cuplată cu spectrometru de masă cu trapă ionică prin interfață ESI (cap. II.4)*

S-a realizat dezvoltarea, optimizarea și validarea unei proceduri analitice simple și practice pentru determinarea unor hormoni estrogeni (estronă, 17 $\beta$ -estradiol și 17 $\alpha$ -etinilestradiol) din probe de apă potabilă. Ca detector, este utilizat spectrometrul de masă cu trapă ionică, un echipament semnificativ mai ieftin decât spectrometrul de masă cu triplu-quadrupol (aproximativ jumătate din prețul acestuia). Procedura folosește o singură etapă SPE în vederea concentrării probelor de apă în analiții de interes. Datorită robusteții și simplității procedurii de concentrare SPE dezvoltate, se estimează că ea poate fi ușor implementată într-un sistem on-line de monitorizare de rutină a nivelului hormonilor estrogeni în apa potabilă de la ieșirea din uzinele de apă. Astfel, setul de parametri cromatografici stabilit (compoziția binară a fazei mobile, eluția în regim izocratic pe perioada eluției efective a analiților) și protocolul de lucru SPE asigură o selectivitate și sensibilitate acceptabile în condițiile unei bune robusteți a metodei. În final, s-au atins limite de detecție în domeniul 1 – 3,5 ng L<sup>-1</sup> și limita de cuantificare 5 ng L<sup>-1</sup> pentru toți analiții de interes precum și recuperări peste 90% și reproductibilități mai mici de 20% (excepție etinilestradiolul – 25%), estimate la nivelul limitei de cuantificare a metodei. Un avantaj semnificativ l-a constituit neutilizarea de standard intern pentru calibrare.

Pentru apa de râu, metoda dezvoltată pentru apa potabilă a fost adaptată cu foarte mici modificări (scăderea volumului de probă de la 1000 mL la 500 mL și îngustarea ferestrelor pentru filtrele de scanare tip SRM cu câte o unitate de masă) astfel încât s-a reușit atingerea unei limite de detecție de 15,0 ng L<sup>-1</sup> și a unei limite de cuantificare de 40 ng L<sup>-1</sup> pentru analitul estradiol. Modificarea cu adevărat notabilă a constat în necesitatea utilizării unui standard intern deuterat pentru o calibrare corectă. Parametri caracteristici validării metodei

pentru estradiol, la nivelul limitei de cuantificare, s-au dovedit acceptabili: recuperarea medie – 94,38%, deviația standard relativă – 28,65%. Din păcate, tentativa de a utiliza estradiol-d<sub>5</sub> pentru calibrarea cu standard intern a estronei și etinilestradiolului s-a dovedit nereușită. Din acest motiv, în lipsa unor compuși deuterati adecvați utilizării ca standarde interne pentru acești doi analiți, metoda suplimentării cu cantitate cunoscută de analit a unei porțiuni a probei luate în lucru rămâne singura alternativă pertinentă.

5. Rezultatele cercetărilor experimentale au fost publicate astfel: 1 lucrare într-o revistă din țară, cotate ISI [119], 2 lucrări într-o revistă citată în baza de date CNCSIS la categoria B (până în 2005 – vezi site [www.cnscis.ro](http://www.cnscis.ro)) [116, 120], 3 lucrări în revista de specialitate a Institutului de Sănătate Publică Timișoara (citată în baza de date CNCSIS la categoria C până în 2002 – vezi site [www.cnscis.ro](http://www.cnscis.ro)) [114, 115, 118], 1 lucrare în *Proceedings* – Al 6-lea Simpozion Internațional privind Cercetarea Interdisciplinară Regională Ungaria – România – Iugoslavia (2002) [117], 2 lucrări trimise spre publicare în străinătate la reviste cotate ISI [121, 123].

6. S-au reușit următoarele:

- stabilirea seturilor de parametri cromatografici (tipul și concentrația în modifier organic al fazei mobile) pentru obținerea unor separări simple (în regim izocratic), relativ rapide (majoritatea mai scurte de 15 min), cu rezoluții de separare acceptabile (majoritatea > 0,9), prin cromatografie de lichide în fază inversă pentru câteva clase de pesticide carbamice, organofosforice, triazinice și organoclorurate. Coloanele cromatografice folosite au fost unele standard, umplute cu silicagel derivatizat cu grupări C18, relativ ieftine și accesibile datorită faptului că nu au fost branduri costisitoare și nu au fost supuse unor tratamente speciale de reducere a numărului grupărilor silanice libere reziduale (așa-zisul tratament de „*endcapping*”). Toate separările pot fi utilizate drept etapă analitică de separare în metodele lichid-cromatografice de identificare și cuantificare a respectivelor pesticide din probe cu matrici relativ simple (de exemplu, apa potabilă).
- evidențierea influenței unor parametri de lucru (numărul etapelor de extracție, modul de concentrare a extractului organic) asupra eficienței extracției lichid-lichid ca etapă

de pregătire a probei în cadrul unei metode lichid-cromatografice identificare și cuantificare a 5 pesticide organoclorurate din probe de apă potabilă.

- evidențierea capacității tehnicii extracției în fază solidă (SPE) pe cartușe cu umplutură de silicagel derivatizat cu grupări C18 de a fi utilizată drept etapă de pregătire a probei în cadrul unei metode lichid-cromatografice identificare și cuantificare a 5 pesticide organoclorurate din probe de apă potabilă.
- evaluarea influenței unor parametri instrumentali de lucru ai interfeței de ionizare prin sprayere în câmp electric (ESI) (debitul de gaz auxiliar, poziția axială a dispozitivului de sprayere) și ai trapei ionice (numărul de evenimente de scanare, tipul de filtrare realizat de câmpul de radiofrecvență, tipul de control a cantității de ioni) asupra sensibilității detecției unui grup de 4 derivați alchilfenolici analizați prin LC-ESI-MS.
- dezvoltarea, optimizarea și validarea unei metode de identificare și cuantificare sensibilă, selectivă și robustă a unui grup de 3 hormoni estrogeni din apa potabilă prin LC-ESI-MS cu trapă ionică. În plus, a fost demonstrată capacitatea metodei de a fi aplicată, cu modificări minore în protocolul de lucru, și probelor de apă de râu, însoțită, cum era de așteptat, de o reducere a sensibilității (creșterea limitei de detecție).

Datorită caracteristicilor ei, metoda se pretează foarte bine transferului pe echipamente automatizate de monitorizare on-line a calității apei potabile.

În urma unor studii de reoptimizare și revalidare, metoda poate fi transferată și în domeniul analizelor de hormoni estrogeni din probe biologice (urină, sânge, lapte) și de alimente.

## BIBLIOGRAFIE

1. Directiva Consiliului Europei 98/83/EC privind calitatea apei pentru consum uman, Ediția a 3-a, Noiembrie 1998.
2. Legea privind calitatea apei potabile nr. 458 din 29 Iulie 2002
3. Legea pentru modificarea și completarea Legii. Nr. 458/2002 privind calitatea apei potabile nr. 311 din 30 Iunie 2004.
4. Belfroid, A.C., Van der Horst, A., Vethaak, A.D., Schaffer, A.J., Rijs, G.B.J., Wegener, J., Cofino, W.P., *Sci. Total Environ.* **1999**, 225, 101-108.
5. Johnson, A. C., Williams, R. J., *Environ. Sci. Technol.* **1999**, 33, 369-370.
6. Rodriguez-Mozaz, S., Lopez de Alda, M.J., Barcelo, D., *J. Chromatograph. A.* **2004**, 1045, 85-92.
7. Drinking Water Contaminant Candidate List (ultima actualizare: 23 Februarie 2005) ([http://www.epa.gov/safewater/ccl/ccl2\\_list.html#casrn](http://www.epa.gov/safewater/ccl/ccl2_list.html#casrn))
8. WHO, „*Guidelines for Drinking Water Quality*”. Vol. 1, Ediția a 3-a, 2004, Geneva (ISBN 92 4 154638 7) ([http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/GDWQ2004web.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/GDWQ2004web.pdf))
9. Gomes, R.L., Birkett J.W., Scrimshaw, M.D., *Internat. J. Environ. Anal. Chem.* **2005**, 85(1), 1-14.
10. Rodriguez-Mozaz, S., Lopez de Alda, M.J., Barcelo, D., *Talanta* **2006**, 69(2), 377-384.
11. Lopez de Alda, M.J., Diaz-Cruz, S., Petrovic, M., Barcelo, D., *J. Chromatograph. A* **2003**, 1000, 503-526.
12. STAS 12650-88. Apă potabilă. Determinarea conținutului de pesticide organoclorurate.
13. STAS 12998-91. Apă potabilă. Determinarea conținutului de pesticide triazinice.
14. Earll, M., “A guide to Log P and pKa measurements and their use” (<http://www.raell.demon.co.uk/chem/logp/logppka.htm#logp>)
15. McBrien, M., Kolovanov, E., Williams A., “A Molecular Structure Based Software System for LC Simulation” ([http://www.acdlabs.com/download/publ/lc\\_sim\\_p.pdf](http://www.acdlabs.com/download/publ/lc_sim_p.pdf))
16. \*\* Interactive Analysis, 6 Ruben Duren Way, Bedford, MA 01730 ([www.logP.com](http://www.logP.com))
17. Rodriguez-Mozaz, S., Lopez de Alda, M.J., Barcelo, D., *Anal. Chem.* **2004**, 76(23), 6998-7006.

18. Herry, G., Raulet, C., Beausse, J., Analysis of steroid hormones in wastewater treatment plants. Proceedings of the 21<sup>st</sup> Annual Meeting on Liquid Chromatography /Mass Spectrometry (LC/MS), Montreux, Switzerland, 10-12 Nov 2004.
19. Laganà, A., Bacaloni, A., De Leva, I., Faberi, A., Fago, G., Marino, A., *Anal. Chim. Acta* **2004**, 501, 79-88.
20. Benijts, T., Lambert, W., De Leenheer, A., *Anal. Chem.* **2004** 76(3), 704-711.
21. Ingrand, V., Herry, G., Beausse, J. De Roubin, M-R., *J. Chromatogr. A* **2003**, 1020, 99-104.
22. \*\* <http://www.organicworldwide.net/spe.html#BE>
23. Beney, P.J., Breuer, G.M., Jacobs, G.H., Larabee-Zierath, D., Mollenhauer, P.J., Norton, K.K., Wichman, M.D., *Hotline - Solid Phase Extraction* **1996**, 35 (6), 1-5  
([http://www.uhl.uiowa.edu/newsroom/hotline/1996/1996\\_12/solidphase.html](http://www.uhl.uiowa.edu/newsroom/hotline/1996/1996_12/solidphase.html))
24. \*\* <http://masspec.scripps.edu/MSHistory/histpers.php>.
25. Hager, J.W., *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, 378, 845-850.
26. March, R.E., *J. Mass Spectrom.* **1997**, 32, 351-369.
27. De Hoffmann, E., *J. Mass Spectrom.* **1996**, 31, 129-137.
28. \*\* <http://www.jeolusa.com/ms/docs/ms-ms.pdf>.
29. \*\* <http://www.chembio.uoguelph.ca/educmat/chm343/martos%20old%20pages/LC%20MS.pdf>
30. Cole, R.B., *J. Mass Spectrom.* **2000**, 35, 763-772
31. Cech, N.B., Enke, C.G., *Mass Spectrom. Rev.* **2001**, 20, 362-387.
32. Abian, J., Oosterkamp, A.J., Gelpi, E., *J. Mass Spectrom.* **1999**, 34, 244-254.
33. Siuzdak, G., Bothner, B., Yeager, M., Brugidou, C., Fauquet, C.M., Hoey, K., Chang, C-M., *Chemistry & Biology* **1996**, 3 (1), 45-48.
34. Wayland, J., Hayes Jr., Edward R., "Handbook of Pesticides Toxicology" (Vol I: General Principles), Academic Press Inc., San Diego, California, 1991.
35. Șarpe, N., Strejan, Gh., "Combaterea chimică a buruienilor din culturile de câmp", Editura Ceres, București, 1981.
36. Thomson, W.T., "Agricultural Chemicals. Book II: Herbicides." Thomson Publications, Fresno, California, 1993.



37. Muir, P.S., „OREGON STATE UNIVERSITY: BI301 HUMAN IMPACTS ON ECOSYSTEMS” – curs on-line (<http://oregonstate.edu/~muirp/index.htm>)
38. Worthing, C.R., “*The Pesticide Manual: A World Compendium*”, Eighth Edition, The British Crop Protection Council, Croydon, UK, 1987.
39. Comăniță, E., Soldea, C., Dumitrescu, E., “*Chimia și tehnologia pesticidelor*”, Editura Tehnică, București, 1986.
40. Bankowska, J., Cwierniewska, E., Urbanek-Kartowska, B., Tuczak, J., Nikornorow, M., “*Pesticidele în lumina toxicologiei mediului*”, Editura Ceres, București, 1981.
41. Gunn D.L., Stevens J.G., “*Pesticide and human welfare*”, Oxford University Press, UK, 1976.
42. Weed Science Society of America, “*Herbicide Handbook*”, 6th Edition. Champaign, IL, 1989.
43. Ware, G.W., “*Fundamentals of Pesticides: A Self-Instruction Guide*”, Thompson Publications, Fresno, CA, 1986.
44. DuPont de Nemours, E.I., “*Technical Bulletin for Lannate Insecticide*”, Agricultural Products Division, Wilmington, DE, 1991.
45. Grădilă, M., “*Erbicidele și tehnica erbicidării*”, Editura M.A.S.T., Arad, 1997.
46. \* \* Human Health Issues (<http://www.epa.gov/pesticides/health/human.htm>)
47. AOAC Official Method 991.07. Pesticide conținând azot și fosfor în apa potabilă. Metoda prin cromatografie de gaze. Official Methods of Analysis of AOAC International, Ediția 17, Revizia #2, (2003).
48. AOAC Official Method 970.52. Reziduuri de pesticide organoclorurate și organofosforice. Metoda generală multireziduuri. Official Methods of Analysis of AOAC International, Ediția 17, Revizia #2, (2003).
49. AOAC Official Method 984.21. Reziduuri de pesticide organoclorurate în grăsimile animale. Metoda prin cromatografie de permeție prin gel. Official Methods of Analysis of AOAC International, Ediția 17, Revizia #2, (2003).
50. AOAC Official Method 991.06. N-metilcarbamoiloxime și carbamați N-metilici în apa potabilă. Metoda prin cromatografie de lichide. Official Methods of Analysis of AOAC International, Ediția 17, Revizia #2, (2003).

51. AOAC Official Method 992.14. Pesticide în apa potabilă. Metoda prin cromatografie de lichide cu detecție în ultraviolet. Official Methods of Analysis of AOAC International, Ediția 17, Revizia #2, (2003).
52. Varian Analytical Instruments, CHROMPACK APPLICATION NOTE A01489 – HPLC – Pesticide.
53. Varian Analytical Instruments, CHROMPACK APPLICATION NOTE A01486 – HPLC – Pesticide.
54. Varian Analytical Instruments, CHROMPACK APPLICATION NOTE A01204 – HPLC – Pesticide.
55. Varian Analytical Instruments, CHROMPACK APPLICATION NOTE A00980 – HPLC – Pesticide.
56. Soriano, J., Jimenez, B., Molto, J., Font, G., *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2000**, 23(18), 2829-2838.
57. Gou, Y., Eisert, R., Pawliszyn, J., *J. Chromatogr. A.* **2000**, 873(1), 137-147.
58. Martinez, R., Gonzalo, E., Laespada, E., San Roman, F., *J. Chromatogr. A.* **2000**, 869(1-2), 471-480.
59. Peruzzi, M., Bartolucci, G., Cioni, F., *J. Chromatogr. A.*, **2000**, 867(1-2), 169-175.
60. Potter, T., Marti, L., Belflower, S., Truman, C., *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48(9), 4103-4108.
61. Ruberu, S., Draper, W., Perera, S., *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48(9), 4109-4115.
62. Vandecasteele, K., Gaus, I., Debreuck, W., Walraevens, K., *Anal. Chem.* **2000**, 72(14), 3093-3101.
63. Varian Analytical Instruments, CHROMPACK APPLICATION NOTE A00735 (Rev. 02) – HPLC – Pesticide – Analysis of polar pesticides in Rhinewater.
64. Zwiener, C., Frimmel, F.H., *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, 378, 862-874.
65. Mohsin, S., *J. Chromatogr. A.*, **2000**, 884(1-2), 23-30.
66. Curini, R., Gentili, A., Marchese, S., Marino, A., Perret, D., *J. Chromatogr. A.* **2000**, 874(2), 187-198.
67. Asperger, K.T., Efer, A., Engewald, W., *Chromatographia* **2003**, 57, 93–101.
68. Schreiber, A., Efer, J., Engewald, W., *J. Chromatogr. A.*, **2000**, 869(1-2), 411-425.

69. Galeano-Diaz, T., Guiberteau-Cabanillas, A., Mora-Diez, N., *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48(10), 4508-4513.
70. Loyo-Rosales, J.E., Schmitz-Afonso, I., Rice, C.P., Torrents, A., *Anal. Chem.* **2003**, 75, 4811-4817.
71. Wenzel, A., Böhmer, W., Müller, J., Rüdell, H., Schroter-Kermani, C., *Environ. Sci. Technol.* **2004**, 38 (6), 1654-1661.
72. Lye, C.M., Frid, C.L.J., Gill, M.E., Cooper, D.W., Jones, D.M., *Environ. Sci. Technol.* **1999**, 33 (7), 1009-1014.
73. Rice, C.P., Schmitz-Afonso, I., Loyo-Rosales, J.E., Link, E., Thoma, R., Fay, L., Altfater, D., Camp, M.J., *Environ. Sci. Technol.* **2003**, 37 (17), 3747-3754.
74. Ferguson, P.L., Iden, C.R., Brownawell, B.J., *Environ. Sci. Technol.* **2001**, 35 (12), 2428-2435.
75. Rudel, R.A., Melly, S.J., Geno, P.W., Sun, G., Brody, J.G., *Environ. Sci. Technol.* **1998**, 32 (7), 861-869.
76. Van Ry, D.A., Dachs, J., Gigliotti, C.L., Brunciak, P.A., Nelson, E.D., Eisenreich, S.J., *Environ. Sci. Technol.* **2000**, 34 (12), 2410-2417.
77. Rudel, R.A., Camann, D.E., Spengler, J.D., Korn, L.R., Brody, J.G., *Environ. Sci. Technol.* **2003**, 37 (20), 4543-4553.
78. Destailats, H., Hung, H-M., Hoffmann, M.R., *Environ. Sci. Technol.* **2000**, 34 (2), 311-317.
79. Ogan, K., Katz, E., *Anal. Chem.* **1981**, 53, 160-163.
80. Wittmann, S., Decsy, Z., Regensperger, S., Pudmer, E., *Anal. Chem.* **1984**, 56, 989-991.
81. Ahel, M., Giger, W., *Anal. Chem.* **1985**, 57, 1577-1583.
82. Ahel, M., Giger, W., *Anal. Chem.* **1985**, 57, 2584-2590.
83. Rigol, A., Latorre, A., Lacorte, S., Barcelo, D., *J. Chromatograph. A* **2002**, 963, 265-275.
84. Cohen, A., Klint, K., Bøwadt, S., Persson, P., Jonsson, J.A., *J. Chromatograph. A* **2001**, 927, 103-110.
85. Jeannot, R., Sabik, H., Sauvard, E., Dagnac, T., Dohrendorf, K., *J. Chromatograph. A* **2002**, 974, 143-159.
86. Cantero, M., Rubio, S., Perez-Bendito, D., *J. Chromatograph. A* **2004**, 1046, 147-153.
87. Petrovic, M., Diaz, A., Ventura, F., Barceló, D., *Anal. Chem.* **2001**, 73 (24), 5886-5895.

88. Pedersen, S.N., Lindholst, C., *J. Chromatograph. A* **1999**, 864, 17-24.
89. Boyd-Boland, A.A., Pawliszyn, J.B., *Anal. Chem.* **1996**, 68(9), 1521-1529.
90. Li, D., Park, J., *Anal. Chem.* **2001**, 73(13), 3089-3095.
91. Kuklennyik, Z., Ekong, J., Cutchins, C.D., Needham, L.L., Calafat, A.M., *Anal. Chem.* **2003**, 75(24), 6820-6825.
92. GESAMP (IMO/FAO/UNESCO-IOC/WMO/WHO/IAEA/ UN/UNEP Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection). 2001. *Protecting the oceans from land-based activities - Land-based sources and activities affecting the quality and uses of the marine, coastal and associated freshwater environment*. Rep. Stud. GESAMP No. 71, 162 pp. ISBN 82-7701-011-7.  
(<http://www.oceansatlas.com/unatlas/uses/uneptextsph/infoph/gsglossary.html>)
93. Routledge, E.J., Sheahan, D., Desbrow, C., Brighty, G.C., Waldock, M., Sumpter, J.P., *Environ. Sci. & Technol.* **1998**, 32(11), 1559-1565.
94. Baronti, C., Curini, R., D'Ascenzo, G., Di Corcia, A., Gentili, A., Samperi, R., *Environ. Sci. & Technol.* **2000**, 34(24), 5059-5066.
95. D'Ascenzo, G., Di Corcia, A., Gentili, A., Mancini, R., Mastropasqua, R., Nazzari, M., Samperi, R., *Sci. Total Environ.* **2003**, 302, 199-209.
96. Desbrow, C., Routledge, E.J., Brighty, G.C., Sumpter, J.P., Waldock, M., *Environ. Sci. & Technol.* **1998**, 32(11), 1549-1558.
97. Routledge, E.J., Waldock, M., Sumpter, J.P., *Environ. Sci. & Technol.* **1999**, 33(2), 371.
98. Cargouet, M., Perdiz, D., Mouatassim-Souali, A., Tamisier-Karolak, S., Levi, Y., *Sci. Total Environ.* **2004**, 324, 55-66.
99. Lai, K.M., Johnson, K.L., Scrimshaw, M.D., Lester, J.N., *Environ. Sci. & Technol.* **2000**, 34(18), 3890-3894.
100. Gomes, R.L., E., Scrimshaw, M.D., Lester, J.N., *Trends Anal. Chem.* **2003**, 22(10), 697-707.
101. Gomes, R.L., Avcioglu, E., Scrimshaw, M.D., Lester, J.N., *Trends Anal. Chem.* **2004**, 23(10-11), 737-744.
102. Xiao, X-Y., McCalley, D.V., McEvoy, J., *J. Chromatogr. A* **2001**, 923, 195-204.
103. Nakamura, S., Sian, T.H., Daishima, S., *J. Chromatogr. A* **2001**, 919, 275-282.
104. Higashi, T., Shimada, K., *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, 378, 875-882.

- 
105. Giese, R.W., *J. Chromatograph. A* **2003**, 1000, 401-412.
106. "EURACHEM Guide: The fitness for purpose of analytical methods. A Laboratory Guide to method validation and related topics", LGC, Teddington, UK, 1998 ([www.eurachem.org](http://www.eurachem.org)).
107. Thompson, M., Ellison, S.L.R., Wood, R., "Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis" (IUPAC Technical Report), *Pure Appl. Chem.* **2002**, 74(5), 835-855.
108. ISO 8402: 1994. Quality – Vocabulary.
109. King, B., "The selection and use of reference materials. A basic guide for laboratories and accreditation bodies", *EEE/RM/062rev3*, grupul de lucru EEE-RM, 2002.
110. "The amazing Horwitz function", Statistical Subcommittee of the AMC, The Royal Society of Chemistry, AMC Technical Briefs Nr. 17, 2004, M. Thompson (Ed.), [www.rsc.org/lap/rsc.com/amc](http://www.rsc.org/lap/rsc.com/amc)
111. SR EN ISO CEI 17025: 2001. Cerințe generale pentru competența laboratoarelor de încercări și etalonări.
112. International Vocabulary of Basic and General Terms in Metrology. ISO, Geneva, (1993). (ISBN 92-67-10175-1)
113. EURACHEM/CITAC GUIDE CG4. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. Ediția a 2-a, 2000 (ISBN 0 948926 15 5) ([www.eurachem.org](http://www.eurachem.org)).
114. **Brumaru, C.**, Ostafe, V., Papoe, G., Lupșa, I., Goie, A., Timar, R., *Analele Institutului de Sănătate Publică Timișoara* **2002**, 8-9 (17-18), 258-269.
115. Ostafe, V., Papoe, G., **Brumaru, C.**, Goie, A., Lupșa, I., *Analele Institutului de Sănătate Publică Timișoara* **2000**, 7 (16), 207-218.
116. Jurchescu, C., Ostafe, V., **Brumaru, C.**, Papoe, G., Lupșa, I., Chiriac, A., *Annals of West University of Timișoara* **2000**, Series Chemistry 9(2), 77-87.
117. **Brumaru, C.**, Papoe, G., Ostafe, V., Lupșa, I., Goie, A., Proceedings of The 6<sup>th</sup> International Symposium Interdisciplinary Regional Research Hungary – Romania – Yugoslavia, 3 - 4 October 2002, Novi Sad, FR Yugoslavia.
118. Lupșa, I., Ostafe, V., Goie, A., Papoe, G., **Brumaru, C.**, Timar, R., *Analele Institutului de Sănătate Publică Timișoara* **2002**, 8-9 (17-18), 270-279.

- 
119. **Brumaru, C.**, Papoe, G., Lupea, A.X., *Rev. Chim* **2004**, 55 (7), 561-564.
120. Stoian C., **Brumaru, C.**, Papoe, G., Lupşa, I., Ostafe, V., *Annals of West University of Timișoara* **2003**, Series Chemistry 12(3), 1145-1156.
121. **Brumaru, C.**, Polesello, S., Lupea, A.X., lucrare trimisă pentru publicare la *Journal of Serbian Chemical Society*, depus pentru publicare în mai 2006, nr. înregistrare al manuscriptului 3732 / 12.05.2006.
122. \*\* Daylight CLOGP (<http://www.daylight.com/daycgi/clogp>).
123. **Brumaru, C.**, lucrare trimisă pentru publicare la *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, depus pentru publicare în februarie 2006, nr. înregistrare al manuscriptului 4420 /27.02.2006.
124. Oblinger Childress, C.J., Foreman, W.T., Connor, B.F., Maloney, T.J., New Reporting Procedures Based on Long-Term Method Detection Levels and Some Considerations for Interpretations of Water-Quality Data Provided by the U.S. Geological Survey National Water Quality Laboratory, USGS, Open-File Report 99-193, Reston, Virginia, 1999 ([http://water.usgs.gov/owq/OFR\\_99-193/](http://water.usgs.gov/owq/OFR_99-193/)).
125. Guidance for Industry, Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, November 1996, ICH (<http://www.fda.gov/cder/guidance/1320fml.pdf>)