

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JASNA KALAN

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM KOZMETOLOGIJA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JASNA KALAN

**RAZVOJ ANALIZNE METODE ZA UGOTAVLJANJE ZAOSTANKOV
NEKATERIH FITOFARMACEVTSKIH SREDSTEV V OKOLJSKIH VZORCIH**

**DEVELOPMENT OF AN ANALYTICAL METHOD FOR THE DETERMINATION
OF PESTICIDE RESIDUES IN ENVIRONMENTAL SAMPLES**

Ljubljana, 2016

Diplomsko nalogo sem opravljala na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani pod mentorstvom izr. prof. dr. Roberta Roškarja, mag. farm.

ZAHVALA

Najprej bi se rada zahvalila izr. prof. dr. Robertu Roškarju, mag. farm. za strokovno pomoč in svetovanje pri nastajanju diplomske naloge, poleg tega pa tudi za pripravljenost za hiter potek dela. Iskreno se zahvaljujem tudi Aniti Klančar mag. farm. za vse nasvete in pomoč pri laboratorijskem delu, zahvaljujem pa se tudi vsem ostalim sodelavcem na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko, ki so pripomogli k prijetnem vzdušju in nastajanju diplomske naloge.

In nenazadnje, zahvalila bi se tudi domačim in bližnjim za stalno podporo na moji študijski poti.

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod vodstvom izr. prof. dr. Roberta Roškarja, mag. farm.

Jasna Kalan

KAZALO

1	UVOD	1
1.1	Pesticidi.....	1
1.2	Življenjski krog pesticidov.....	1
1.3	Razširjenost in prednosti rabe pesticidov	3
1.4	Slabosti pesticidov	3
1.5	Pravilnik o rabi fitofarmacevtskih sredstev	4
1.6	Pesticidi in kozmetika	5
1.7	Obravnavani pesticidi	7
1.7.1	Alaklor	7
1.7.2	Amitraz.....	7
1.7.3	Atrazin.....	7
1.7.4	Karbendazim	8
1.7.5	Klorpirifos.....	8
1.7.6	Diazinon.....	9
1.7.7	Diuron.....	9
1.7.8	Simazin	9
1.7.9	MCPA (2 – metil – 4 – klorofenoksiocetna kislina)	9
1.7.10	Mekoprop.....	10
1.7.11	Rotenon.....	10
1.7.12	Terbutilazin.....	11
2	NAMEN DELA	12
3	MATERIALI IN METODE	13
3.1	Materiali	13
3.1.1	Standardi	13
3.1.2	Interni standard.....	13
3.1.3	Realni vzorci	13
3.1.4	Topila in reagenti.....	13
3.1.5	Naprave in pribor	14
3.2	Metode	15
3.2.1	Priprava osnovnih raztopin	15
3.2.2	Priprava pufernih raztopin	17
3.2.3	Priprava elucijskega topila	17
3.2.4	Priprava rekonstitucijskega topila.....	17

3.2.5	LC-MS/MS analiza	17
3.2.6	SPE METODA	19
3.2.7	SPE-DEX METODA	25
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	27
4.1	Preverjanje instrumentalne metode	27
4.2	SPE METODA	28
4.2.1	Sušenje	28
4.2.2	Vpliv pH	30
4.2.3	Prisotnost organskega topila	31
4.2.4	Vrednotenje metode	32
4.2.5	Aplikacija razvite metode na realne vzorce	36
4.3	SPE-DEX METODA	37
4.3.1	Vrednotenje SPE-DEX metode pri dodatnem koncentriranju s sušenjem	37
4.3.2	Vrednotenje SPE-DEX metode z neposredno analizo vzorcev	38
4.3.3	Realni vzorci	40
5	SKLEP	42
6	LITERATURA	44

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1 Koncentracije pesticidov v prilagojeni delovni raztopini z deklarirano koncentracijo 1000 µg/L	16
Preglednica 2 Priprava standardne raztopine pesticidov v metanolu	16
Preglednica 3 Gradienti program LC-MS/MS metode.....	18
Preglednica 4 Nastavitve ionskega izvora.....	18
Preglednica 5 MRM prehodi, napetost fragmentorja, kolizijska energija, polariteta ionizacije in retencijski časi izbranih pesticidov.....	19
Preglednica 6 Priprava vzorcev za testiranje vpliva prisotnosti organskega topila.....	21
Preglednica 7 Priprava vzorcev za preverjanje linearnosti in ponovljivosti odzivov SPE metode z dodatnim koncentriranjem vzorcev s sušenjem.....	22
Preglednica 8 Priprava vzorcev za preverjanje linearnosti in ponovljivosti odzivov SPE metode z neposredno analizo vzorcev	23
Preglednica 9 Priprava vzorcev za vrednotenje linearnosti pri SPE-DEX metodi	25
Preglednica 10 Linearnost (R^2) in naklon premice za standardne raztopine v elucijskem (ET) in rekonstitucijskem topilu (RT)	27
Preglednica 11 1. Primerjava izkoristka ekstrakcije in ponovljivosti privzete SPE z in brez sušenja ..	28
Preglednica 12 Izkoristki [%] in ponovljivost (RSD[%]) SPE postopka pri različnih obdelavah eluata	29
Preglednica 13 Preverjanje stabilnosti pesticidov pri sušenju na 50 °C.....	30
Preglednica 14 Vpliv pH na izkoristek [%] in ponovljivost (RSD [%]) SPE postopka. Izkoristek je podan kot relativno glede na najvišji izkoristek	31
Preglednica 15 Vpliv vrste in deleža organskega topila v pufri pH 6 na izkoristek [%] in ponovljivost SPE postopka.....	32
Preglednica 16 Izkoristek, linearnost, meja določitve in območje linearnosti SPE metode z dodatnim koncentriranjem vzorcev s sušenjem.....	34
Preglednica 17 Ponovljivost (RSD) SPE metode z dodatnim koncentriranjem vzorcev s sušenjem pri različnih koncentracijah pesticidov	34
Preglednica 18 Izkoristek, linearnost, meja določitve in območje linearnosti SPE metode z neposredno analizo vzorcev.....	35
Preglednica 19 Ponovljivost (RSD) SPE metode z neposredno analizo vzorcev pri različnih koncentracijah pesticidov	35
Preglednica 20 Izkoristki analizne metode pri realnih vzorcih	36
Preglednica 21 Izkoristek, linearnost, meja določitve in območje linearnosti SPE-DEX metode z dodatnim koncentriranjem vzorcev s sušenjem.....	38
Preglednica 22 Ponovljivost (RSD) SPE-DEX metode z dodatnim koncentriranjem vzorcev s sušenjem pri različnih koncentracijah pesticidov	38
Preglednica 23 Izkoristek, linearnost, meja določitve in območje linearnosti SPE-DEX metode z neposredno analizo vzorcev	39
Preglednica 24 Ponovljivost (RSD) SPE-DEX metode z neposredno analizo vzorcev pesticidov	39
Preglednica 25 Izkoristki (%) SPE-DEX metode pri vzorcih odpadnih vod z dodatnim koncentriranjem s sušenjem	40
Preglednica 26 Izkoristki (%) SPE-DEX metode pri vzorcih odpadnih vod z neposredno analizo vzorcev	40

Slika 1 Kroženje pesticidov v okolju, prirejeno po (4).....	2
Slika 2 LC-MS/MS kromatogrami standardne raztopine pesticidov z deklarirano koncentracijo 25 $\mu\text{g/L}$	33

POVZETEK

V vodah, prsti, hrani in ne nazadnje tudi v nekaterih naravnih surovinah za kozmetične izdelke se pojavljajo zaostanki pesticidov oz. fitofarmaceutskih sredstev, kar pa ni le velik okoljski problem, pač pa lahko predstavlja tudi tveganje za zdravje ljudi. Kljub temu da se zadnje čase trendi močno nagibajo k ekološki pridelavi, raba fitofarmaceutskih sredstev raste, v okolju pa se zadržujejo tudi ostanki sredstev, ki so se uporabljala v preteklosti, a so bila kasneje prepovedana zaradi različnih vzrokov.

Namen diplomske naloge je bil razviti analizne metode za vrednotenje prisotnosti izbranih pesticidov (alaklor, amitraz, atrazin, diazinon, diuron, karbendazim, klorpirifos, mekoprop, MCPA, rotenon, simazin, in terbutilazin) v odpadnih vodah in nekaterih potencialnih naravnih sestavinah za kozmetiko. Obstoječe metode za pripravo vodnih vzorcev za učinkovine smo prilagodili in optimizirali za ekstrakcijo pesticidov. Uporabili smo dve metodi za pripravo vzorcev, sledila pa je analiza s tekočinsko kromatografijo sklopljeno z masno spektrometrijo. Prva metoda je vključevala klasični sistem ekstrakcije na trdno fazo (SPE), saj je ta korak primerna skupna točka za dodatno čiščenje in koncentriranje ekstraktov realnih vzorcev. Za pripravo vzorcev odpadnih vod pa smo uporabili polavtomatski sistem SPE-DEX. Obe metodi smo po optimizaciji ovrednotili v smislu selektivnosti linearnosti, ponovljivosti, meje določitve in izkoristka ekstrakcije. Obe metodi sta bili primerni za analizo izbranih pesticidov z izjemo klorpirifosa in amitraza, ki sta problematična zaradi neobčutljivosti in/ali obstojnosti. Validacijski parametri obeh metod so bili primerljivi, razen pri meji določitve, kjer smo s klasično SPE metodo dosegli nižje meje določitve za vse uspešno validirane pesticide (≤ 10 ng/L). Dodatno koncentriranje vzorcev s sušenjem pa je manj primerno za temperaturno neobstoječe pesticide (alaklor, diazinon, terbutilazin), še zlasti pri SPE-DEX metodi, kjer se čas sušenja zaradi več vode v vzorcu bistveno podaljša.

Ovrednoteni metodi smo nato uporabili za ugotavljanje prisotnosti pesticidov v realnih vzorcih. Izkoristki ekstrakcije so bili odlični iz bombaža in zelenega čaja, nekaj dodatne optimizacije metode pa bo potrebne iz riža in olj, predvsem pri izbiri topila za ekstrakcijo, pa tudi pri odstranjevanju lipidov iz koncentriranih vzorcev olja. V sedmih testiranih vzorcih smo zaznali le diuron v hladno stiskanem olivnem olju neekološke pridelave, in sicer v koncentraciji 6,8 ng/g. V enem od štirih testiranih vzorcev odpadnih vod smo zaznali atrazin, ki je že nekaj časa prepovedan na območju EU, in sicer v koncentraciji 10,2 ng/L. Atrazin je pogosto najden herbicid v vodah predvsem zaradi dobre topnosti in dolgega razpolovnega časa v vodi ter kopičenja v okolju, ki je posledica njegove intenzivne uporabe v preteklosti.

SEZNAM OKRAJŠAV

ACN – acetonitril

DR – prilagojena delovna raztopina

ESI – elektrorazprševalna ionizacija (*ang. Electrospray ionization*)

EU – Evropska unija

EPA – Ameriška organizacija za zaščito okolja (*ang. Environmental Protection Agency*)

FFS – fitofarmacevtsko sredstvo; pesticid

LC-MS/MS – tekočinska kromatografija sklopljena s tandemsko masno spektrometrijo (*Liquid Chromatography Coupled With Tandem Mass Spectrometry*)

LOQ – meja določitve (*ang. Limit of Quantitation*)

MeOH – metanol

MRM – multirezidualna analiza (*ang. Multiple Reaction Monitoring*)

R^2 – determinacijski koeficient

RSD – relativni standardni odklon

SPE – ekstrakcija na trdnih nosilcih (*ang. Solid-phase Extraction*)

SPE-DEX – pol-avtomatski SPE sistem SPE-DEX® 4790 proizvajalca Horizon Technology

st – standardna raztopina s koncentracijo x

ZDA – Združene države Amerike

1 UVOD

1.1 Pesticidi

Škodljivec (ang. pest) je katerakoli žival, rastlina, gliva ali drug organizem, ki tako ali drugače povzroča škodo (npr. na poljščinah, drevesih, sadju, gospodarskih poslopih ...) – z namenom zatiranja škodljivcev uporabljamo pesticide oziroma fitofarmacevtska sredstva. To so snovi ali mešanice snovi, ki so po izvoru lahko naravne ali sintetične, namenjene uničenju, zatiranju ali spreminjanju življenjskega cikla škodljivcev. Delujejo tako, da fizikalno, kemijsko ali biološko vplivajo nanje. Delimo jih na:

- Baktericide – ti uničijo, zavrejo, ali preprečijo razrast bakterij; ta skupina ne vključuje razkužil.
 - Vabe – poznamo snovi, ki se uporabljajo za zabljanje škodljivcev (živali) v pasti, pa tudi produkte, ki se zamešajo v hrano (za nadzor večjih živali pa tudi členonožcev in polžev).
 - Fungicide uporabljamo za nadzor ali uničenje gliv, lahko pa jih naredimo neškodljive.
 - Genetsko spremenjene organizme – tu ne gre neposredno za snov, pač pa za rastline, ki so s pomočjo vstavljanja tujega gena pridobile lastnost, ki jih ščiti pred nekaterimi škodljivci.
 - Herbicide uporabljamo za zatiranje rastlin – večinoma plevelov na gospodarsko pomembnih območjih, v posebnih okoliščinah pa vsega rastja. V tem primeru gre za defoliante.
 - Insekticide, ki se uporabljajo za zatiranje vseh vrst žuželk.
 - Rodenticide, ki se uporabljajo za zmanjševanje števila podgan ter miši in za zaščito semen, skladišč in drugih objektov pred njimi.
 - Repelente, ki se uporabljajo za odganjanje škodljivcev, predvsem pikajočih insektov.
- (1)

1.2 Življenjski krog pesticidov

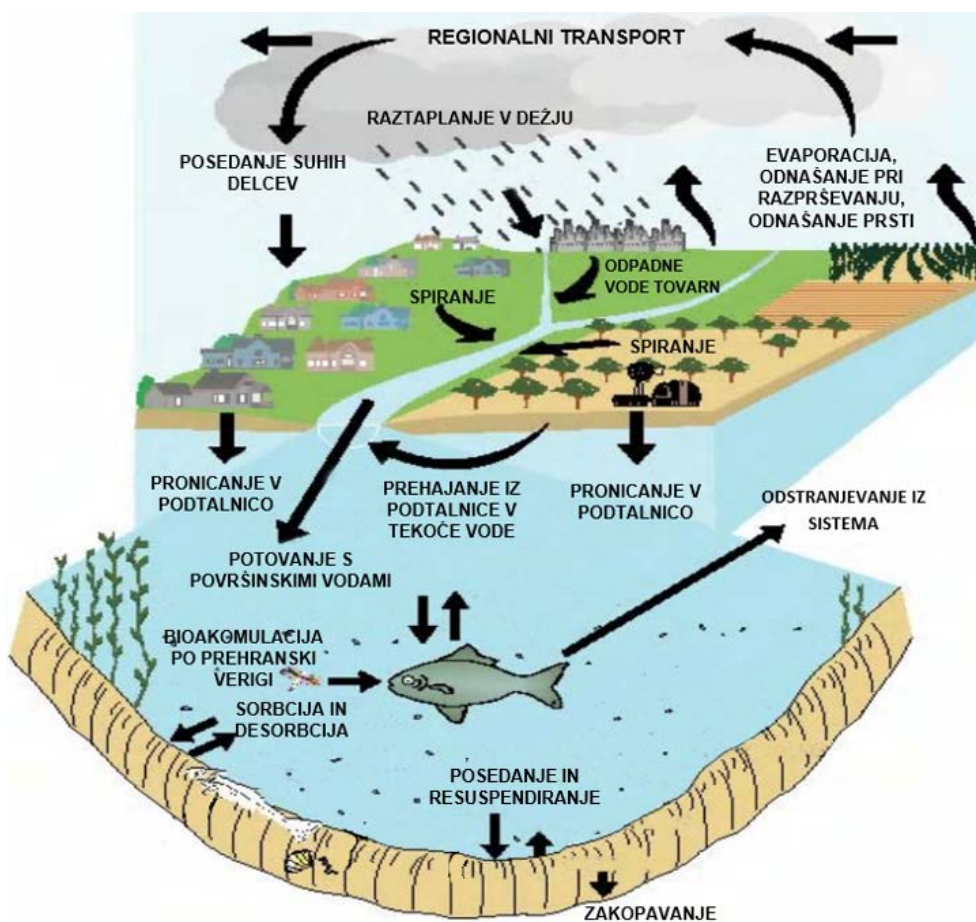
Pesticidi v okolje prehajajo na različne načine; najbolj očiten med njimi je razprševanje po kmetijskih zemljiščih, pomembni pa so tudi odpadki in odplake, ki nastanejo pri proizvodnji, ter nepravilna raba fitofarmacevtskih sredstev. (2) Pomembnejše poti potovanja pesticidov v okolju so označene na sliki 1.

Pesticidi, razpršeni po kmetijskih zemljiščih lahko prehajajo v ozračje zaradi izhlapevanja (nekateri so hlapni), ali pa veter odnaša razpršilo in celo erodirano zemljo, ki je kontaminirana

s pesticidi. Trdni delci se znova posedejo na tla, ko so pogoji primerni, nekaj pa se tudi raztopi v padavinah in se vrnejo na zemljo v obliki dežja ter tako prehajajo v površinske vode. Dež spira tudi površine, na katere so nanesena fitofarmacevtska sredstva in jih tako prenese v podtalnico, kjer se lahko ti zadržijo dlje časa (vezani na trdne delce ali v vodi), lahko pa se odplaknejo v površinske vode.

Pesticidi potujejo s površinskimi vodami, in sicer raztopljeni v vodi ali pa v vezani na dispergirane trdne delce, pri tem pa lahko vstopajo v prehransko verigo vodnih organizmov. Ti lahko določene snovi razgradijo, pesticidi pa se lahko biokopičijo. Poleg tega stalno poteka sorpcija in desorpcija tako na dispergirane, kot na sedimentirane delce, ostanki pesticidov pa se lahko tudi zakopljejo v dno rek, jezer in morij, od koder se kasneje lahko sproščajo.

Tako kot vse učinkovine se tudi pesticidi lahko razgradijo biološko, če niso dovolj kemijsko stabilni. V nasprotnem primeru je smiseln razvoj metod za odstranjevanje in razgradnjo okoljskih onesnažil z dolgo razpolovno dobo. (2, 3)



Slika 1 Kroženje pesticidov v okolju, prirejeno po (4)

1.3 Razširjenost in prednosti rabe pesticidov

Po podatkih iz leta 2009 se svetovnem merilu letno porabi okrog 2500 ton pesticidov. V svetovnem merilu so najbolj uporabljeni herbicidi (47,5 %), ki jim sledijo insekticidi (27,5 %) in fungicidi (17,5 %), 5,5 % pa predstavljajo ostala fitofarmacevtska sredstva. Ker je v državah v razvoju (Indija) večja poraba insekticidov za nadzor vektorskih boleznih in manjša uporaba herbicidov zaradi večinoma ročnega odstranjevanja plevelov, insekticidi predstavljajo kar 80 % uporabljenih pesticidov, sledijo pa jim herbicidi s 15 %. (5, 6)

Raba kljub trendom ekološke pridelave počasi narašča; glede na podatke ameriške Agencije za zaščito okolja (Environmental Protection Agency, EPA) je bilo leta 2001 porabljenih nekaj več kot 2200 ton pesticidov. (7, 8)

Razvoj in uporaba semen za visok donos pridelka ter naprednejše tehnike namakanja so pomembno prispevale k skoraj štirikratnemu povečanju letnega pridelka v prejšnjem stoletju, velik vpliv na ta napredek pa so imela tudi fitofarmacevtska sredstva oz. pesticidi. Obstaja predvidoma več kot 10 000 vrst insektov, 30 000 vrst plevelov ter prek 100 000 vrst boleznih, ki jih povzročajo glive, bakterije in virusi, pa tudi okrog 1000 vrst nematodov, ki lahko občutno zmanjšajo donos kulturnih rastlin. (9)

Pesticidi torej preprečujejo velike ekonomske izgube, ki bi močno vplivale predvsem na tiste države v razvoju, ki se večinsko ukvarjajo z izvozom poljščin – sadja in zelenjave ter drugih rastlin in rastlinskih produktov.

Drug večji problem, ki ga pesticidi lahko rešujejo, predstavljajo insekti, ki prenašajo bolezni, kot so na primer malarija, rumena mrzlica, spalna bolezen in druge (10); škropljenje velikih površin z insekticidi je pogosto edini praktičen način za zaustavljanje njihovega širjenja. Poleg zniževanja smrtnosti ljudi zaradi vektorskih boleznih v državah v razvoju pa so tudi pomemben način zaščite živine pred podobnimi vrstami boleznimi. (9, 11)

Raziskave so pokazale, da redno uživanje sadja in zelenjave (ki včasih težko uspeva oz. pride do potrošnika v pogojih brez pesticidov) močno pretehta škodljive učinke morebitnih zaostankov pesticidov – zniža pojavnost raka, visokega krvnega tlaka, srčno – žilnih boleznih, diabetesa in ostalih kroničnih boleznih. (9)

Manj izraziti, a vseeno pomembni vidiki so zaščita športnih površin (npr. golf igrišč) pred pleveli in zaščita stavb pred insekti (termiti). (9)

1.4 Slabosti pesticidov

Kljub pomembnosti pesticidov z zdravstvenega in ekonomskega vidika pa je nanje treba gledati tudi z druge strani – negativen vpliv na človeka in okolje. (12)

Najbolj ogrožene skupine so ljudje, ki so v neposrednem stiku s pesticidi, in sicer delavci v proizvodnji, načrtovalci formulacij, pa tudi njihovi uporabniki – kmetje. Pri tem je treba upoštevati, da so lahko nevarni sami pesticidi, poleg njih pa tudi surovine (reagenti), topila, ter (domnevno) inertni nosilci. (9)

Akutne zastrupitve se najpogosteje kažejo kot generalizirani simptomi – glavoboli, slabost, bruhanje, utrujenost, razdraženost, včasih pa se pojavijo tudi nevrološke, respiratorne in gastrointestinalne težave. Dolgotrajno izpostavljenost nekaterim pesticidom, predvsem tistim, ki so znani kot hormonski motilci, pa pogosto povezujejo z zavrtjem imunskega sistema, degeneracijo kostnega mozga, nevrotoksičnostjo, zavrtjem nekaterih encimov, hormonskimi motnjami, motnjami pri reprodukciji ter z nekaterimi oblikami raka. (13 – 15)

Eden bolj poznanih primerov množične zastrupitve s pesticidi je bil med Vietnamsko vojno, kjer so razprševali ogromne količine mešanice herbicidov, znane kot Agent Orange, da bi uničili poljščine ter odstranili gozdove, ki so vojski omogočali skrivanje enot in orožja. Vojni veterani, delavci, ki so bili mešanicam izpostavljeni na delovnem mestu, ter civilisti nosijo posledice še danes. (16)

Zastrupitve s pesticidi prek hrane sicer niso pogoste, obstajajo pa posamezni primeri, predvsem iz držav v razvoju. V EU od leta 1996 teče program nadzora zaostankov pesticidov v prehranskih izdelkih rastlinskega izvora. (9, 17)

Pesticidi negativno vplivajo tudi na okolje. Pesticidi pridejo v površinske vode pri odtekanju vode od škropljenih rastlin ter spiranju kontaminirane prsti, na isti način pa pridejo tudi v podtalnico. V prvem primeru je to problematično, ker se sredstva s tem nenadzorovano širijo ter vplivajo na vodne organizme tudi daleč stran od mesta nanosa, v drugem primeru pa zato, ker je podtalnica pogosto neposreden vir pitne vode za okoliško prebivalstvo. Poleg tega se podtalne vode zelo počasi (če sploh kdaj) očistijo onesnaževal. (18)

Pesticidi so pogosto slabo selektivni, zato vplivajo tudi na ne tarčne organizme; pretirana raba pesticidov na nekem področju lahko uniči mikrofloro v tleh, s tem pa izniči dolgotrajno rodovitnost tal. (19) Vplivajo lahko tudi na ne tarčne rastline (zato se pospešuje razvoj gensko spremenjenih rastlin, odpornih na določen herbicid), pa tudi na živali, ki se prehranjujejo s tarčnimi organizmi (npr. ptice, ježi ...). S tem se vztrajno manjša biološka pestrost in počasi uničujejo ekosistemi povsod po svetu. (9)

1.5 Pravilnik o rabi fitofarmaceutskih sredstev

Osnova za Zakon o fitofarmaceutskih sredstvih, ki je v Sloveniji stopil v veljavo leta 2014, je evropska direktiva iz leta 2009. Zakon določa ukrepe glede prometa, glede ravnanja s sredstvi

v skladu z varstvom okolja in ne ciljnih organizmov in skladiščenja, za osebe, ki se poklicno ukvarjajo s fitofarmaceutskimi sredstvi (svetovanje, prodaja in raba), pa zahteva dodatno usposabljanje. (20, 21)

Pri predpisani oz. predvideni rabi pesticidi ne predstavljajo resne grožnje za okolje, žal pa včasih prihaja do kršitev, npr.:

- neupoštevanje navodil na embalaži;
- obremenitev ne-tarčne rastline ali živali*;
- posedovanje in raba (ali namen rabe) neregistriranih ali celo prepovedanih sredstev;
- nelegalno odlaganje pesticidov ali zabojujnikov s pesticidi. (22)

* Npr. raba na nepredvidenih rastlinah povzroči nepotrebno izhajanje sredstev v okolje, lahko pa tudi uničenje rastline; raba na krmi za živali (npr. koruza, repa ...) in neupoštevanje karence lahko privede do zastrupitve živali ter vstop pesticida v prehrano človeka.

Zaradi naštetega je nujno, da so fitofarmaceutska sredstva urejena tudi zakonsko.

Obstaja verjetnost, da se nekateri prepovedani ali neregistrirani pesticidi preprodajajo na črnem trgu ali pa uvažajo iz držav, kjer so dovoljeni, saj njihove zaostanke relativno pogosto odkrijejo v vodah. (23) Zato je pomembno, da se pri rednih vzorčenjih iščejo tako dovoljena kot nedovoljena sredstva. (24, 25)

Pogosti razlogi za prepoved določenega fitofarmaceutskega sredstva so visoka toksičnost za čebele in ostale ne tarčne organizme, dolg razpolovni čas v okolju ter neposredna nevarnost za človeka. (26, 27)

1.6 Pesticidi in kozmetika

Ostanki pesticidov se nenehno omenjajo v povezavi s hrano in pitno vodo, lahko pa se pojavijo tudi v kozmetiki s sestavinami naravnega izvora. Pogosto uporabljane sestavine naravnega izvora pridobivamo največkrat iz plantažnih rastlin, ki imajo že samo zaradi načina gojenja in skladiščenja ogromno škodljivcev (npr. zeleni čaj, soja, sončnice, olive, bombaž, žita ...).

To je problem, ker je ogromno fitofarmaceutskih sredstev lipofilnih in se absorbirajo skozi kožo (predvsem organofosfatni insekticidi), za nekatere pa velja tudi, da se iz telesa ne izločijo, ampak se akumulirajo in s tem povzročajo kronično zastrupljanje. (28)

Nekatere skupine pesticidov so znane kot potencialni alergeni, predvsem za astmatike in osebe z atopijskim dermatitisom, pesticidi, ki vsebujejo klor, so znani po tem, da povzročajo klorove akne (ang. »chloracne«), v splošnem pa je za veliko večino pesticidov značilno, da na kožo delujejo dražilno in povzročajo eritem. (28)

Večino kozmetike vsebuje vsaj nekaj naravnih sestavin (predvsem olj), zadnje čase pa se pojavlja tudi označevanje kozmetike z izrazi 'naravna', 'ekološka' in 'organska', za kar proizvajalec lahko pridobi potrdilo enega ali več standardov.

Obstaja veliko standardov tako v Evropi kot v Ameriki, nobenega od njih pa ne ureja zakonodaja. Eden pomembnejših in bolj prepoznavnih standardov je NaTrue, ki naravno kozmetiko deli na:

- naravno kozmetiko, ki zahteva določen odstotek sestavin naravnega izvora (odvisno od vrste izdelka);
- naravno kozmetiko z organskim deležem, ki zahteva vsaj 70 % sestavin organske pridelave;
- ter organsko kozmetiko, pri kateri naj bi bilo vsaj 95 % sestavin pridelanih ekološko. (29)

Večino obstoječih evropskih standardov naj bi povezal, poenotil in nekoliko zaostрил standard COSMOS, ki je bil objavljen leta 2010. Lasti si ga neprofitna organizacija s sedežem v Belgiji, prizadevajo pa si 'vzpodbujati podjetja, da bi izdelovali še bolj naravne in organske kozmetične izdelke' in 'zagotavljati potrošnikom čim bolj transparentne informacije, da lahko tudi sami sodelujejo v razvoju'. (30)

Glede na standard COSMOS mora proizvajalec certificirane sestavine, da lahko pridobi in obdrži certifikat, omogočati in dovoljevati odvzem vzorcev za laboratorijsko analizo (ki jo predlaga ISO/IEC 17025). Kvantitativno vrednotenje onesnažil izvajajo ob naključnih časovnih točkah ali v primeru suma na vsebnost teh snovi na kateri koli točki v nastajanju sestavine ali izdelka. Med onesnažila spadajo:

- težke kovine;
- aromatski ogljikovodiki;
- **pesticidi**;
- dioksini in poliklorirani bifenili (PCB);
- radioaktivnost;
- gensko spremenjeni organizmi;
- mikotoksini;
- zaostanki zdravil;
- nitrati in
- nitrozamini. (31)

1.7 Obravnavani pesticidi

1.7.1 Alaklor

Je herbicid iz družine kloroacetanilidov. Uporablja se za nadzor trav in širokolistnih plevelov pri koruzi, bombažu, oljni repici, redkvicah in soji.

Koncentracije, višje od 0,5 g/kg telesne mase pri peroralnem zaužitju so akutno toksične, testi na živalih kažejo na hepatotoksičnost, degeneracijo oči, pa tudi vpliv na mutagenost in kancerogenost. (32)

V EU je od leta 2006 prepovedan. (33)

1.7.2 Amitraz

Je triazapentadienski pesticid iz skupine formamidinov, ki deluje insekticidno, repelentno in kot sinergist z drugimi pesticidi. (34)

Deluje kot zaviralec monoamino oksidaze, je agonist alfa adenoreceptorjev v centralnem živčevju. Visoke koncentracije amitraza pri nanosu na kožo zavirajo delovanje insulina in povzročijo hiperglikemijo, njegov glavni metabolit glavni pa je methemoglobin. (35) Spada tudi v C kategorijo karcinogenov – možen humani karcinogen. (36)

Uporablja se za zatiranje škodljivcev na hruški (*Cacopsylla pyricola*), mušic in pršic na hruškah in bombažu, kot sredstvo proti klopom, ušem in pršicam pri govedu, svinjah, drobnici in psih ter za odpravljanje varoje (*Varroa Destructor*) v čebelarstvu. (36, 37)

Je zelo strupen za vodne živali, vendar pa naj ne bi prišel v okolje pri normalni rabi.

V EU je, z izjemo Španije, prepovedan od 2004. (38)

1.7.3 Atrazin

Atrazin je sistemski selektivni herbicid iz skupine triazinov. (28, 39, 40) Predvidoma vpliva na koncentracije estrogenov, lutenizirajočega hormona, prolaktina in progesterona v krvi, pri daljši in ponavljajoči se izpostavitvi se pokaže toksičnost za srce pa tudi upad rdečih krvnih celic, hemoglobina in hematokrita. Testi pri človeku iz etičnih razlogov niso bili izvedeni, epidemiološka študija v severni Italiji pa je pokazala relativno višje tveganje za neoplazije na jajčnikih pri ženskah, ki so bile izpostavljene atrazinu. (41)

Uporaben je za uničevanje trav (*Poaceae*) in širokolistnih plevelov v nasadih koruze, sladkornega trsa, špargljev, evkaliptusa, ananasa in drugih, uporablja pa se tudi za uničenje obcestnih plevelov in plevelov v gozdovih. (40, 41)

V okolje izhaja med proizvodnjo, še več pa med uporabo. Največ se zadržuje v površinskih vodah, kjer je njegov razpolovni čas lahko celo daljši od 200 dni. (42)

Na tem mestu je najbrž smiselno omeniti vpliv atrazina na ekosisteme. Nedavno poročilo ameriške 'Environmental Protection Agency' za javnost obvešča, da so koncentracije, ki jih sproščajo v okolje tako visoke, da so najverjetneje postale škodljive za večino vrst rastlin in živali, vključno s sesalci, pticami, dvoživkami in plazilci, pri čemer velja upoštevati, da je bil nivo dovoljenih ('level of concern') koncentracij presežen skoraj 200-krat, kar je več kot dovolj, da ubije dvoživko. (43)

Atrazin je eno najbolj uporabljanih herbicidnih sredstev v Avstraliji in drugo najbolj uporabljano fitofarmacevtsko sredstvo v ZDA, v EU pa je prepovedan že od leta 2004. (43 – 45)

1.7.4 Karbendazim

Je širokospektralni fungicid in antimikotik iz skupine benzimidazolov. (46) Študije na živalih so pokazale, da karbendazim deluje kot strup za delitveno vreteno, kar je neverjetneje razlog, da je toksičen za testise in povzroča neplodnost (pri podganah). Poleg tega deluje teratogeno (povzroča predvsem defekte oči in glave) in povzroča nižjo porodno težo ter manjše število mladičev, študije pa niso dokazale kancerogenosti. Pregled razmaza kostnega mozga je pokazal povečano število celic z mikrojedri, torej snov najverjetneje deluje genotoksično. V višjih koncentracijah naj bi deloval nekoliko nevrotoksično, glede na študijo na kokoših. *In vitro* študije na človeških limfocitih so dokazale, da karbendazim deluje kot strup za delitveno vreteno tudi pri človeku. (47)

Uporablja se za širok spekter bolezni žitaric, trte, oljne repice, sladkorne pese in nekaterih vrst zelenjav, glede na nekatere vire pa je prepovedan za uporabo na citrusih in sadnih drevesih iz družine *Rosaceae*. (48, 49)

Kljub omejitvi uporabe na področju EU je lokalno dovoljena raba v Španiji, na Portugalskem, na Poljskem in v Veliki Britaniji. Prepovedan je tudi v ZDA in Avstraliji, dovoljen pa je v Južni Ameriki. To včasih povzroča težave pri mednarodni trgovini, čeprav so koncentracije zaostankov v npr. pomarančnem soku precej nižje od mejnih. (50 – 52) Kljub temu da ni dobro topen v vodi, je močno toksičen za vodne organizme, zadržuje pa se v prsti in pozemnih vodah (v sedimentu). Je tudi eno najpogostejše najdenih fitofarmacevtskih sredstev v hrani. (53)

1.7.5 Klorpirifos

Je organofosfatni insekticid, ki se uporablja predvsem za zaščito koruze pa tudi soje, sadnih dreves in oreškov ter nekaterih poljščin. (54, 55)

Pri človeku deluje kot zaviralec holinesteraze in posledično povzroča vrtoglavico, slabost, zmedenost, v zelo visokih koncentracijah pa dihalno paralizo in smrt. Ogrožena skupina so predvsem ljudje, ki delajo s koncentrirano snovjo – delavci v proizvodnji, razprševalci (kmetje). (55)

V državah EU je dovoljen. (56)

1.7.6 Diazinon

Je organofosfatni insekticid. (57) Znan je kot zaviralec holinesteraze, je mutagen in predvideno teratogen, izpostavljeni pa smo mu lahko prek inhalacije razpršila, prek absorpcije skozi kožo in z zaužitjem. (57, 58)

V ZDA se uporablja za zaščito mandljev, sliv, breskev, orehov, solate, nektarin, koruze, tobaka, jabolk in vseh vrst citrusov pred različnimi insekti pa tudi za zatiranje insektov v prsti in na okrasnih rastlinah, v EU pa je od leta 2007 prepovedan. (58, 59)

1.7.7 Diuron

Je derivat sečnine, ki se uporablja kot herbicid, uničuje pa tudi alge. (60) Nekoliko je dražeč za kožo in oči, na dolgi rok pa povzroča anemijo, povečanje vranice in spremembe v kostnem mozgu, v višjih koncentracijah povzroči spremembe na večini notranjih organov (pri živalih). Je deloma teratogen, saj zniža porodno težo pri podganah in upočasni razvoj kosti, v višjih odmerkih pa povzroča težave s krvnim obtokom, jetri in skeletom, lahko pa celo smrt. Predvidoma je humani kancerogen. (60, 58)

Deluje tako, da zaustavlja fotosintezo pri rastlinah. Zadržuje se v površinskih vodah in v zemlji, dovoljen pa je tako v Evropi kot v ZDA. (56, 62, 63)

1.7.8 Simazin

Je triazinski herbicid, ki se uporablja za odstranjevanje plevela v nasadih mandljev, citrusov in drugih sadnih dreves, jagodičevja, špargljev, vseh vrst metuljnic, hmelja, vinske trte, pa tudi v gozdovih in ob cestah. (64, 65)

Študije niso pokazale posebne toksičnosti razen eritema in edema ter možne asociacije med triazinskimi herbicidi in tumorji na jajčnikih (majhna testna skupina). (66)

V EU je prepovedan od leta 2004. (67)

1.7.9 MCPA (2 – metil – 4 – klorofenoksiocetna kislina)

Je močan selektiven herbicid, ki spada med derivate fenoksiocetne kisline. (68) Uporablja se za zatiranje širokolistnega plevela na plantažah žit, pa tudi na golf igriščih, pašnikih in tratah.

Deluje tako, da se nalaga v meristemsko tkivo rastlin, od tam pa spodbuja rastlinske hormone tako, da povzroči motnje v rasti. (69)

Pri testih na živalih se je kratkotrajna izpostavljenost pokazala kot zaostanek v rasti, pri višjih koncentracijah pa tudi zmanjšana aktivnost ledvic in jeter ter konjunktivitis. Pri dolgotrajni izpostavljenosti se je pri visokih odmerkih pokazala nevropatija, reproduktivne toksičnosti, pa razen nekoliko nižje porodne teže MCPA ni povzročil. Epidemiološka študija na ljudeh, ki sodelujejo v proizvodnji in so uporabniki herbicida, je pokazala kancerogenost z 'omejenimi dokazi'. (70)

MCPA sicer ni topen v vodi, se pa širi po prsti, kar lahko povzroča slabšo rast nekaterih poljščin, kot so čebula, repa in solata. Ni nevaren za čebele, nekoliko toksičen je za sladkovodne ribe, na ostale živali pa nima posebnega vpliva. V splošnem je prepoznan kot varen herbicid in je na voljo tako v ZDA kot v EU. (69, 70)

1.7.10 Mekoprop

Je klorofenoksi herbicid. (71) Draži kožo in oči. Glede na študije na živalih je teratogen – povzroča smrt zarodka, zavira rast, počasnejši ali celo odsoten je razvoj kosti. V visokih odmerkih je mutagen, glede na študijo na delavcih v proizvodnji pa najbrž tudi kancerogen. (72) Mekoprop je le rahlo toksičen za ptice, ribe in čebele (v koncentracijah, ki se lahko zadržujejo v okolju).

Dovoljen je tako v ZDA kot v EU, pri čemer se v Evropi uporablja le v Franciji, Italiji in na Poljskem. (72, 73)

1.7.11 Rotenon

Rotenon je insekticid rastlinskega izvora, ki deluje kot zaviralec elektronske transportne verige v mitohondriju tako, da prepreči oksidacijo NADH v NAD prek koencima Q, torej zaustavlja tudi oksidacijo substratov, kot so glutamat, alfa-ketoglutarat in piruvat. (74, 75)

Izoliramo ga iz korenine *Derris spp.*, *Lonchocarpus spp.* in nekaterih drugih rastlin iz družine metuljnic. Insekticidne lastnosti teh rastlin so stari Kitajci poznali že dolgo pred izolacijo leta 1895, stari Malezijci pa so jih uporabljali kot strup za ribe. (75)

Je nesistemsko sredstvo, uporabno za nadzor klopotov, uši, parazitskih muh, ognjenih mravelj in celo ličink komarja. Uporablja se tudi kot sredstvo proti zunanji zajedavcem (proti *Varroa Destructor*) pri čebelah, saj nanje nima toksičnega učinka. (74, 75)

Pri izpostavitvi svetlobi in zraku se raztopina rotenona v organskem topilu razkraja na dehidrorotenon in rotenonon, ki sta prav tako toksična insektom, rotenon v obliki suhega praška pa je relativno stabilen. (74)

Koncentrirana snov je smrtno nevarna pri zaužitju in pri stiku s kožo, sicer pa deluje močno dražilno in korozivno za kožo, draži oči, lahko škoduje notranjim organom pri dolgi ali ponavljajoči se izpostavljenosti, poleg tega pa je močno strupena za vodne živali z dolgo trajajočim učinkom – glede na klasifikacijo sistema globalne harmonizacije (GHS). (74)

V EU je prepovedan od leta 2008. (76)

1.7.12 Terbutilazin

Je širokospektralni herbicid iz skupine triazinov.(78) Glede na študije na živalih povzroča zmanjšano pridobivanje telesne mase (zaradi neješčnosti), pa tudi sedacijo, oteženo dihanje, diarejo, tresavico, znižanje število rdečih krvnih teles. (77, 79)

Deluje kot močan zaviralec fotosinteze, predvsem na enoletne dvokaličnice. Uporablja se za zatiranje plevela med koruzo, krompirjem, grahom, sladkornim trsom, trto, sadnim drevjem, citrusi, oljnimi palmami in oljkami. Močno se veže na prst, zaradi hlapnosti pa so ga zaznali tudi že v dežju in snegu. Pri razlitju v vodo se veže na mulj in druge usedline.

Dovoljen je tako v ZDA kot v Evropi. (79, 80)

2 NAMEN DELA

V vodah, v prsti, v hrani in ne nazadnje tudi v nekaterih naravnih surovinah za kozmetične izdelke se pojavljajo zaostanki pesticidov oz. fitofarmaceutskih sredstev, kar pa ni le velik okoljski problem, pač pa lahko predstavlja tudi tveganje za zdravje ljudi. Kljub temu da se zadnje čase trendi močno nagibajo k ekološki pridelavi, je vsako leto proizvedena večja količina fitofarmaceutskih sredstev, poleg tega pa se v okolju zadržujejo tudi ostanki sredstev, ki so se uporabljala v preteklosti, kasneje pa prepovedala zaradi različnih vzrokov.

Namen diplomske naloge bo optimizirati analizne metode za vrednotenje vsebnosti nekaterih fitofarmaceutskih sredstev v odpadnih vodah in nekaterih potencialnih naravnih sestavinah za kozmetiko.

Obstoječe metode priprave vzorcev za učinkovine, razvite v laboratorijih Katedre za biofarmacijo in farmakokinetiko, bomo prilagodili in optimizirali za ekstrakcijo pesticidov.

Metoda bo vključevala pripravo vzorcev s klasičnim sistemom ekstrakcije na trdno fazo (SPE) in polavtomatskim sistemom SPE-DEX ter analizo pridobljenih ekstraktov s tekočinsko kromatografijo sklopljeno z masno spektrometrijo.

SPE bomo uporabili zato, ker je odlična skupna točka za dodatno čiščenje in koncentriranje vzorcev. Preverjali bomo vpliv vrednosti pH in vsebnosti organskih topil na izkoristek, metodo optimizirali in vrednotili linearnost ter ponovljivost, pa tudi vpliv dodatnega koncentriranja s sušenjem.

Pri SPE-DEX bomo ovrednotili linearnost in ponovljivost metode za pesticide, po potrebi optimizirali metodo in jo aplicirali na okoljske vzorce.

Prilagojeno in ovrednoteno SPE metodo bomo aplicirali tudi na nekatere potencialne naravne sestavine za kozmetične izdelke, metodo SPE-DEX pa na odpadne vode. Na vseh realnih vzorcih bomo preverili tudi ustreznost analizne metode. Hkrati pa bomo ugotavljali, ali so v teh vzorcih morda prisotni izbrani pesticidi.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

3.1.1 Standardi

- Alaklor, čistost 99,8 % (Sigma – Aldrich, Stenheim, Nemčija)
- Amitraz, čistost 99,9 % (Sigma – Aldrich, Stenheim, Nemčija)
- Atrazin, čistost 99,9 % (Supelco / Sigma – Aldrich, Stenheim, Nemčija)
- Karbendazim, čistost 98,0 % (Sigma – Aldrich, Stenheim, Nemčija)
- Klorpirifos, čistost 98,0 % (Sigma – Aldrich, Stenheim, Nemčija)
- Diazinon, čistost 98,5 % (Sigma – Aldrich, Stenheim, Nemčija)
- Diuron, čistost 99,6 % (Sigma – Aldrich, Stenheim, Nemčija)
- Simazin, čistost 99,8 % (Sigma – Aldrich, Stenheim, Nemčija)
- MCPA, čistost 99,8 % (Sigma – Aldrich, Stenheim, Nemčija)
- Mekoprop, čistost 99,6 % (Sigma – Aldrich, Stenheim, Nemčija)
- Rotenon, čistost 97,6 % (Sigma – Aldrich, Stenheim, Nemčija)
- Terbutilazin, čistost 99,4 % (Sigma – Aldrich, Stenheim, Nemčija)

3.1.2 Interni standard

- Haloperidol, čistost 99,4 % (Sigma – Aldrich, Stenheim, Nemčija)

3.1.3 Realni vzorci

- Zeleni čaj, poreklo Kitajska
- Sanitetna bombažna vata (Tosama)
- Beli riž (S – buget)
- Hladno stiskano olivno olje (ni iz ekološke pridelave) (GEA)
- Hladno stiskano sončnično olje (ni iz ekološke pridelave) (Spar vital)
- Hladno stiskano olivno olje domače pridelave (Primorska)
- Odpadne vode (iz dveh čistilnih naprav iz osrednjeslovenske in dveh iz severovzhodne regije Slovenije)

3.1.4 Topila in reagenti

2–propanol ($(\text{CH}_3)_2\text{CHOH}$), $M = 60,10 \text{ g/mol}$ (Sigma – Aldrich, Steinheim, Nemčija)

Acetonitril (CH_3CN), $M = 41,05 \text{ g/mol}$, $\geq 99,9 \text{ LC-MS grade}$ (Sigma – Aldrich, Steinheim, Nemčija)

Diklorometan (CH_2Cl_2), $M = 84,93 \text{ g/mol}$ (Merck KgaA, Darmstadt, Nemčija)

Etanol (C₂H₅OH), 96 %, M = 46,07 g/mol (Pharmachem Sušnik, Ljubljana, Slovenija)

Kalijev dihidrogen fosfat (KH₂PO₄), ≥ 99,5 %, M = 74,55 g/mol (Merck KgaA, Darmstadt, Nemčija)

Klorovodikova kislina (HCl 1 M), M = 36,46 g/mol (Merck KgaA, Darmstadt, Nemčija)

Metanol (CH₃OH), ≥ 99,9 %, M = 32,04 g/mol (Sigma – Aldrich, Steinheim, Nemčija)

Mravljinčna kislina (HCOOH), 98 – 100 % Suprapur[®], M = 46,03 g/mol (Merck KgaA, Darmstadt, Nemčija)

Natrijev hidroksid (NaOH 1 M), M = 40,00 g/mol (Merck KgaA, Darmstadt, Nemčija)

Ultračista voda, pridelana z Milli-Q – Advantage A 10 (Millipore Corporation, Billerica, Massachusetts, ZDA)

3.1.5 Naprave in pribor

Polavtomatske pipete: 2 – 20 μL, 20 – 200 μL, 100 – 1000 μL, 1 – 10 mL (Eppendorf Research, Hamburg, Nemčija)

Tehtnica AG 245 (Mettler Toledo, Greifensee, Švica)

pH meter PA 220 (Mettler Toledo, Greifensee, Švica)

Pufrne raztopine: pH 4, pH 7, pH 10 (Panreac Quimica S.L.U., Barcelona, Španija)

Ultrazvočni čistilnik Sonis 4 (Iskra, Kranj, Slovenija)

Elektro magnetno mešalo HI 190M (Hanna instruments, Póvoa de Varzim, Portugalska)

Stresalnik Vibromix 10 (Tehtnica, Železniki, Slovenija)

Centrifuga Centric 322a (Tehtnica, Železniki, Slovenija)

Hladilnik 2-8 °C z zamrzovalnikom -20 °C (Gorenje, Velenje, Slovenija)

Sistem za koncentriranje vzorcev s sušenjem TurboVap[®] LV Concentration Workstation (Biotage AB, Uppsala, Švedska)

Plastične mikrocentrifugirke 1,5 mL (Eppendorf Research, Hamburg, Nemčija)

Plastične mikrocentrifugirke 2 mL (Eppendorf Research, Hamburg, Nemčija)

Centrifugirke TPP, 15 mL (TPP, Techno Plastic, Products AG, Trasadingen, Švica)

Centrifugirke TPP, 50 mL (TPP, Techno Plastic, Products AG, Trasadingen, Švica)

Steklovina: čaše, merilne bučke, lij, epruvete, merilni valj, vialo, stekleni vložki

Ostalo: nastavki za pipete, spatule, vzmeti za steklene vložke, zamaški za vialo, Parafilm M, štoparica, magneti, škarje, pinceta, zaščitne rokavice

Sistem za SPE:

Oljna vakuumška črpalka (Gast Manufacturing Inc., Harbor, Michigan, ZDA)

Kadička Visiprep™ Solid Phase Extraction Vacuum Manifold (Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, ZDA)

Kartuše Strata-X 60 mg/3 mL (Phenomenex, Torrance, Kalifornija, ZDA)

Plastične brizge 20 mL BD Plastipak (BD Biosciences, ZDA)

Adapterski nastavki za brizge BD Plastipak (BD Biosciences, ZDA)

Sistem za Horizon Technology SPE-DEX®:

Programska oprema Envision™ platform Controller software

Oljna vakuumska črpalka (Gast Manufacturing Inc., Harbor, Michigan, ZDA)

Industrijski plin N₂ (Messer, Ruše, Slovenija)

Diski (Atlantic® HLB SPE Disk, Horizon Technology inc., New Hampshire, ZDA)

Filtri (Atlantic® Fast Flow Sediment Pre-Filters, 1 µm in 5 µm)

Stekleni vsebnik 1000 mL (Thermo Fisher Scientific, ZDA)

Viala za eluat 20 mL (Thermo Fisher Scientific, ZDA)

Posode za odpad

LC/MS-MS sistem

Agilent 1290 Infinity UHPLC (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornija, ZDA)

Agilent 6460 Triple Quadrupole LC-MS (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornija, ZDA)

Ionski izvor: Jetstream® ESI ionski izvor

Kolona: Poroshell EC-C18 100×3 mm, 2,7 µm (Agilent Technologies, ZDA)

Programska oprema MassHunter Workstation

3.2 Metode

3.2.1 Priprava osnovnih raztopin

3.2.1.1 Primarna (osnovna) raztopina

Pripravili smo raztopino izbranih pesticidov s koncentracijo 1 mg/mL po naslednjem postopku. V 5 mL merilno bučko smo natehtali 5 mg posameznih pesticidov in dopolnili do oznake z metanolom. Zaradi težav z raztapljanjem smo prilagodili koncentracijo osnovnih raztopin karbendazima in simazina na 0,1 mg/mL.

3.2.1.2 Sekundarna raztopina

Sekundarno osnovno raztopino smo pripravili s 1000-kratnim redčenjem primarnih raztopin tako, da smo po 25 µL vsake primarne raztopine prenesli v 25 mL merilno bučko in nato dopolnili do oznake z metanolom.

3.2.1.3 Prilagojena delovna raztopina

Deklarirana koncentracija delovne raztopine je bila 1000 µg/L, vendar smo prilagodili koncentracije pesticidov z namenom poenotenja odzivov v delovni raztopini, kar je predstavljeno v preglednici 1.

Preglednica 1 Koncentracije pesticidov v prilagojeni delovni raztopini z deklarirano koncentracijo 1000 µg/L

	c [µg/L]	Faktor redčenja
Karbendazim	100	10
Simazin	1000	1
Atrazin	250	4
MCPA	2000	0,5
Diuron	2000	0,5
Mekoprop	2000	0,5
Terbutilazin	50	20
Rotenon	1000	1
Alaklor	1000	1
Diazinon	50	20
Klorpirifos	10000	0,1
Amitraz	50	20

3.2.1.4 Umeritvena premica

Za pripravo standardne raztopine pesticidov smo uporabljali prilagojeno delovno raztopino (ki je vsebovala tudi amitraz) in/ali pripravljeno standardno raztopino standardov, ki smo jo z metanolom razredčili na zelene koncentracije. Priprava standardnih raztopin pesticidov je predstavljena v preglednici 2.

Preglednica 2 Priprava standardne raztopine pesticidov v metanolu

c [µg/L]	V [µL]	V (MeOH) [µL]
1000	1000 (DR)	0
500	500 (DR)	500
250	250 (DR)	750
125	125 (DR)	875
100	100 (DR)	900
50	50 (DR)	950
25	100 (st 250 µg/L)	900
12,5	100 (st 125 µg/L)	900
10	100 (st 100 µg/L)	900
5	100 (st 50 µg/L)	900
2,5	100 (st 25 µg/L)	900
1	100 (st 10 µg/L)	900
0,5	100 (st 5 µg/L)	900
0,1	100 (st 1 µg/L)	900

DR – delovna raztopina; st – standardna raztopina pesticidov pri določeni koncentraciji

3.2.2 Priprava pufrnih raztopin

3.2.2.1 Priprava 50 mM KH_2PO_4 puфра, pH=7

Za pripravo 2 L 50 mM puфра smo si predhodno preračunali količino KH_2PO_4 . Natehtali smo 13,6 g KH_2PO_4 , ga kvantitativno prenesli v 2 L merilno bučko, dodali približno 1 L prečiščene vode in dali za približno 5 min na ultrazvok, da so se delci popolnoma raztopili. Vsebino smo nato prenesli v primerno veliko stekleno čašo, postavili na magnetno mešalo in ob konstantnem mešanju in merjenju pH dodajali 1 M NaOH do vrednosti pH=7 ($\pm 0,03$). pH meter smo predhodno umerili na pH=7 s pomočjo pred pripravljenih pufrnih raztopin.

Mešanico smo na koncu prelili nazaj v 2 L merilno bučko in jo s prečiščeno vodo dopolnili do oznake.

3.2.2.2 Priprava 25 mM KH_2PO_4 puфrov, pH=3, pH=6 in pH=9

Za pripravo 200 mL 25 mM puфра smo natehtali 0,68 g KH_2PO_4 , postopek nadaljnje priprave pa je bil enak kot v poglavju 3.2.2.1, le da smo za pufer pH=3 uporabili 1 M HCl namesto 1 M NaOH.

3.2.2.3 Priprava 20 mM KH_2PO_4 puфра, pH=6

Za pripravo 2 L raztopine smo natehtali 5,44 g KH_2PO_4 . Nadaljnji postopek je bil enak kot v poglavju 3.2.2.1.

3.2.3 Priprava elucijskega topila

- **ZA SPE-DEX:** S polavtomatsko pipeto smo prenesli v 50 mL centrifugirko 20 mL acetonitrila, 10 mL metanola in 10 mL izopropanola in zaprli z navojnim pokrovom.
- **ZA SPE:** S polavtomatsko pipeto smo prenesli v 50 mL centrifugirko 10 mL metanola in 30 mL acetonitrila in zaprli z navojnim pokrovom.

3.2.4 Priprava rekonstitucijskega topila

Pripravili smo 20 % raztopino mravljične kisline v prečiščeni vodi. V 50 mL centrifugirko smo prenesli 9 mL metanola, 9 mL acetonitrila ter 2 mL pripravljene raztopine in zaprli z navojnim pokrovom.

3.2.5 LC-MS/MS analiza

Za analizo smo uporabljali LC-MS/MS instrument. Kromatografska ločba je potekala na Poroshell EC-C18 100×3 mm, 2,7 μm koloni pri 50 °C. Injicirali smo 5 μL vzorca, čas analize je bil 8,20 minute, uporabili pa smo gradientno elucijo, pri čemer je bilo topilo A voda

z 0,05 % mravljične kisline, topilo B pa 100 % acetonitril. Pretoki in sestava mobilne faze so predstavljeni v preglednici 3.

Preglednica 3 Gradienti program LC-MS/MS metode

Čas	Delež topila A [%]	Pretok [mL/min]
0,50	85	0,50
1,00	85	0,65
2,00	67	0,65
3,00	65	0,65
4,80	60	0,65
5,10	50	0,65
5,30	30	0,65
6,50	5	0,65
6,70	5	0,65
6,90	92	0,65
8,20	92	0,50

Nastavitve ionskega izvora z elektrorazprševalno ionizacijo Agilent Jet Stream ESI so predstavljene v preglednici 4. Izbrane analite smo zaznali z uporabo multirezidualne analize (MRM), v preglednici 5 pa so podani MRM prehodi, kolizijske energije, napetosti fragmentorja, polariteta ionizacije in retencijski časi.

Preglednica 4 Nastavitve ionskega izvora

Temperatura sušilnega plina	275 °C
Pretok plina	10 L/min
Nebulizator	45 psi (3,1bar)
Temperatura plašča	350 °C
Pretok plina v plašču	11 L/min
Napetost na kapilari	4000 V
Napetost na šobi	1000 V

Preglednica 5 MRM prehodi, napetost fragmentorja, kolizijska energija, polariteta ionizacije in retencijski časi izbranih pesticidov

Učinkovina	MRM prehod [m/z]	Napetost fragmentorja [V]	Kolizijska energija [eV]	Polariteta ionizacije	Retencijski čas [min]
Karbendazim	192,1→160,0	86	17	Pozitivna	1,782
Simazin	202,1→132,0	110	13	Pozitivna	4,013
Atrazin	216,1→174,0	80	13	Pozitivna	5,314
MCPA	199,0→141,0	81	13	Negativna	5,412
Diuron	233,0→72,0	161	17	Pozitivna	5,507
Mekoprop	213,0→141,0	81	23	Negativna	6,115
Terbutilazin	230,1→174,0	81	13	Pozitivna	6,260
Rotenon	395,2→192,1	86	21	Pozitivna	6,572
Alaklor	270,1→238,0	81	10	Pozitivna	6,579
Diazinon	305,1→169,0	81	29	Pozitivna	6,892
Klorpirifos	349,9→96,9	86	37	Pozitivna	7,227
Amitraz	294,2→163,1	86	9	Pozitivna	7,455

3.2.6 SPE METODA

3.2.6.1 PRIVZETA SPE METODA

Metodo za analizo zaostankov zdravilnih učinkovin v vodi, razvito na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko, smo prenesli na zaostanke pesticidov. Pripravili smo si 4 kartuše Strata-X 60 mg/3 mL, adapterske nastavke, plastične brizge 20 mL, metanol, 4 vzorce po 50 mL v 25 mM s pH 4 ter čašo za odpad. Hitrosti nanosa je bila približno 8 mL/min. Najprej smo čez vsako kartušo spustili 10 mL metanola, nato 10 mL pufru s pH 4, nato pa na sistem pritrdili adapterske nastavke ter brizge in nanесли vzorec. Po končanem nanosu vzorca smo kartuše sušili v vakuumu 5 min, nato eluirali z 2 mL elucijskega topila v steklene epruvete.

Vzorec smo prenesli neposredno v vialo ali pa smo ga posušili do suhega na sistemu za sušenje vzorcev pri temperaturi 50 °C. Suhemu ostanku smo dodali 200 µL rekonstitucijskega topila, mešali 1 min na vibracijskem mešalniku, dali na ultrazvok za 15 min, nato pa vsebino prenesli v steklen insert za vialo.

3.2.6.2 OPTIMIZACIJA SPE METODE

3.2.6.2.1 Stopnja 1

Pripravili smo 250 mL ultračiste vode in vanjo dodali 250 µL prilagojene delovne raztopine (poglavje 3.2.1.3) ter 125 µL raztopine amitraza (c=100 µg/L). 4 paralelke po 50 mL smo pripravili po SPE metodi 3.2.6.1. Iz epruvete smo vzeli 200 µL eluata in ga prenesli v insert (neposredna analiza), preostanek eluata pa smo posušili pri 40 °C. Suh preostanek smo

rekonstituirali s 180 μL rekonstitucijskega topila po postopku, opisanem v poglavju 3.2.6.1 (vzorec - Koncentriranje s sušenjem).

Za izračun izkoristka ekstrakcije smo pripravili tudi dva standarda v metanolu s koncentracijama 12,5 $\mu\text{g/L}$ in 125 $\mu\text{g/L}$, po postopku iz poglavja 3.2.1.4.

3.2.6.2.2 Stopnja 2

Pripravili smo 250 mL vzorca z deklarirano koncentracijo analitov 1 $\mu\text{g/L}$. V 250 mL merilno bučko smo prenesli 250 μL prilagojene delovne raztopine analitov in 125 μL razredčene raztopine amitraza ($c=100 \mu\text{g/L}$), nato pa z vodo dopolnili do oznake. SPE postopek smo izvedli na 4 kartušah po postopku 3.2.6.1. Po eluciji smo en vzorec v celoti prenesli v vialo (tega smo 5-krat analizirali v različnih časovnih točkah), enega smo posušili do suhega in raztopili v 200 μL rekonstitucijskega topila. Dva eluata pa smo dali za 10 min na ultrazvok. Od slednjih dveh smo enega prenesli v 5 insertov po 200 μL , drugega pa smo razdelili na dva dela po 1 mL, sušili in suhi ostanek raztopili v 200 μL rekonstitucijskega topila.

Za izračun izkoristka ekstrakcije smo pripravili tudi dva standarda v metanolu s koncentracijama 12,5 $\mu\text{g/L}$ in 125 $\mu\text{g/L}$, po postopku iz poglavja 3.2.1.4.

3.2.6.2.3 Stopnja 3

Najprej smo pripravili standardni raztopini pesticidov s koncentracijami 10 $\mu\text{g/L}$ in 25 $\mu\text{g/L}$. V 25 mL merilno bučko smo prenesli 625 μL prilagojene delovne raztopine, ki je že vsebovala amitraz, nato pa dopolnili z metanolom do oznake (25 $\mu\text{g/L}$). 10 mL te raztopine smo prenesli v 25 mL merilno bučko in jo dopolnili do oznake z metanolom in dobili standardno raztopino s koncentracijo 10 $\mu\text{g/L}$. Iz vsak od obeh raztopin smo v epruvete za sušenje prenesli 6 paralelke po 2 mL. Vzorce smo posušili do suhega pri 50 $^{\circ}\text{C}$ in suh ostanek rekonstituirali po postopku, opisanem v poglavju 3.2.6.1

Za izračun izkoristka izgube pri sušenju smo pripravili zmes standardov pesticidov v metanolu s koncentracijami 100 $\mu\text{g/L}$ in 250 $\mu\text{g/L}$, po postopku iz poglavja 3.2.1.4.

3.2.6.2.4 Vpliv pH

Pripravili smo po 200 mL ultračiste vode, 25 mM pufru pH=3, pH=6 in pH=9 (poglavje 3.2.2.2). V vsako od teh smo dodali 200 μL prilagojene delovne raztopine in 100 μL raztopine amitraza ($c=100 \mu\text{g/L}$), da smo dobili koncentracijo 1 $\mu\text{g/L}$. Od vsake raztopine smo vzeli štiri paralelki po 50 mL in koncentrirali vzorce po postopku, opisanem v 3.2.6.1. Eluate smo prenesli v vialo za neposredno analizo. Za izračun izkoristka smo pripravili standardno raztopino pesticidov s koncentracijo 25 $\mu\text{g/L}$, po postopku iz poglavja 3.2.1.4. Uspešnost

ekstrakcije smo podali kot relativni izkoristek, ki smo ga izračunali kot razmerje med izkoristkom pri posameznem pH glede na izkoristek pri najvišjem pH.

3.2.6.2.5 Vpliv prisotnosti organskega topila

Pripravili smo 2 L 20 mM pufru s pH=6. Vzorce smo pripravili po shemi v preglednici 6.

Preglednica 6 Priprava vzorcev za testiranje vpliva prisotnosti organskega topila

	V (pufer) [mL]	V (MeOH) [mL]	V (ACN) [mL]	V (heksan) [mL]	V (mix ²) [mL]	V (ami ³) [mL]
100 % pufer	200				200	100
5 % ACN	190		10		200	100
10 % ACN	180		20		200	100
5 % MeOH	190	10			200	100
5 % MeOH + ACN	190	10	10		200	100
10 % ACN + heksan¹	45		2,5	2,5	50	25

¹zaradi razslojevanja faz pripravljeno v 50 mL bučkah; ²prilagojena delovna raztopina; ³amitraz (c=100µg/L)

Vse vzorce smo pripravili v 4 paralelkah s SPE metodo, opisano v poglavju 3.2.6.3, eluate pa smo prenesli v vialo za neposredno analizo.

3.2.6.3 Končna SPE metoda

Najprej smo skozi vsako kartušo spustili 10 mL metanola, nato pa 10 mL pufru pH=6. Nato smo na SPE sistem pritrdili adapterske nastavke ter brizge in nanесли 50 mL vzorca. Hitrosti nanosa je bila približno 8 mL/min. Po nanosu vzorca smo čez kartušo spustili 5 mL ultračiste vode, nato pa sušili pod vakuumom 10 min in eluirali z 2 mL elucijskega topila v steklene epruvete.

Vzorec smo prenesli neposredno v vialo ali pa smo ga posušili do suhega na sistemu za sušenje vzorcev pri temperaturi 40 °C. Suhemu ostanku smo dodali 200 µL rekonstitucijskega topila, mešali 1 min na vibracijskem mešalniku, dali na ultrazvok za 15 min, nato pa vsebino prenesli v steklen insert za vialo.

3.2.6.4 VREDNOTENJE SPE - METODE

Preverjali smo linearnost, ponovljivost, izkoristek in selektivnost SPE metode. Linearnost smo preverjali z umeritvenimi premicami preko izračunanih determinacijskih koeficientov (R^2), ponovljivost pa z izračunom relativnega standardnega odklona (RSD), pri čemer smo

postavili meje za sprejemljive rezultate $R^2 > 0,99$ in $RSD < 20\%$. Izkoristke metode smo računali po enačbi 1, relativni standardni odklon pa po enačbi 2.

$$\text{Izkoristek [\%]} = \frac{\text{odziv v vzorcu}}{\text{odziv v raztopini standarda}} \times 100 \text{ (enačba 1)}$$

$$\text{Relativni standardni odklon (RSD)} = \frac{\text{standardni odklon odzivov vzorca}}{\text{povprečje odzivov vzorca}} \times 100 \text{ (enačba 2)}$$

Selektivnost metode smo preverili z analizo standardnih raztopin pesticidov (poglavje 3.2.1.4), realnih vzorcev (3.2.6.5) in slepih vzorcev. Naredili smo 4 paralelke slepega vzorca. 50 mL ultra prečiščene vode smo nanegli na SPE sistem, eluate sušili ter rekonstituirali po postopku, opisanem v poglavju 3.2.6.3.

3.2.6.4.1 Priprava vzorcev za preverjanje SPE metode z dodatnim koncentriranjem vzorcev s sušenjem

Linearnost SPE metode z dodatnim koncentriranjem vzorcev s sušenjem smo vrednotili v koncentracijskem območju od 0,001 – 1 $\mu\text{g/L}$. Postopek priprave raztopin je podan v preglednici 3. Pripravili smo po 200 mL 20 mM pufru s $\text{pH}=6$, pri čemer smo dodali sekundarno raztopino analitov glede na preglednico 7. Raztopine pri koncentracijah 0,005 $\mu\text{g/L}$, 0,02 $\mu\text{g/L}$ in 0,5 $\mu\text{g/L}$ smo pripravili v štirih, vse ostale pa v dveh paralelkah. Pred sušenjem smo v epruveto dodali 50 μL internega standarda haloperidola s koncentracijo 4 $\mu\text{g/L}$, sicer pa smo vzorce pripravili po SPE postopku, opisanem v poglavju 3.2.6.3.

Preglednica 7 Priprava vzorcev za preverjanje linearnosti in ponovljivosti odzivov SPE metode z dodatnim koncentriranjem vzorcev s sušenjem

Vraztopine v 200 mL bučko [μL]	Št. paralelk	Konc. v vzorcu pred nanosom na SPE [$\mu\text{g/L}$]	Konc. v vzorcu za analizo [$\mu\text{g/L}$]
20*	2	0,001	0,25
50*	2	0,0025	0,625
100*	4	0,005	1,25
400*	4	0,02	5
1000*	2	0,05	12,5
20 (DR)	2	0,1	25
100 (DR)	4	0,5	125
200 (DR)	2	1	250

* Standardna raztopina pesticidov s koncentracijo 10 $\mu\text{g/L}$ (poglavje 3.2.1.4.), DR – prilagojena delovna raztopina

Za vrednotenje izkoristka smo pripravili standardne raztopine pesticidov s koncentracijami 1 $\mu\text{g/L}$, 2,5 $\mu\text{g/L}$, 5 $\mu\text{g/L}$, 10 $\mu\text{g/L}$ in 25 $\mu\text{g/L}$, po postopku, opisanem v poglavju 3.2.1.4. Iz

razmerja naklonov umeritvene premice vzorcev in standardov smo izračunali izkoristek metode.

3.2.6.4.2 Priprava vzorcev za preverjanje SPE metode z neposredno analizo vzorcev

Metodologija vrednotenja je enaka kot pri vzorcih v poglavju 3.2.6.4.1. Priprava vzorcev je prikazana v preglednici 8.

Preglednica 8 Priprava vzorcev za preverjanje linearosti in ponovljivosti odzivov SPE metode z neposredno analizo vzorcev

Vraztopine v 200 mL bučko [μL]	Št. paralelk	Konc. v vzorcu pred nanosom na SPE [μg/L]	Konc. v vzorcu za analizo [μg/L]
20*	2	0,001	0,025
50*	2	0,0025	0,0625
100*	2	0,005	0,125
200*	2	0,01	0,25
1000*	4	0,05	1,25
20 (DR)	2	0,1	2,5
100 (DR)	4	0,5	12,5
200 (DR)	2	1	25
500 (DR)	2	2,5	62,5
1000 (DR)	2	5	125

* Standardna raztopina pesticidov s koncentracijo 10 μg/L; DR – prilagojena delovna raztopina

3.2.6.5 REALNI VZORCI

3.2.6.5.1 Zeleni čaj (suha droga)

Natehtali smo 10 g suhe droge v 50 mL merilno bučko, s polavtomatsko pipeto dodali 20 mL acetonitrila ter bučko dobro zamašili. Na vibracijskem mešalniku smo stresali 3 minute, nato pa pustili stati eno uro. Po maceraciji smo tekoči ekstrakt prelili v centrifugirko in centrifugirali 5 min pri sobni temperaturi in 5000 rpm. 2,5 mL bistrega ekstrakta smo prenesli v 50 mL bučko in z 20 mM pufrom pH=6 dopolnili do oznake. Sledilo je SPE čiščenje (poglavje 3.2.6.3); vzorec smo pripravili v 4 paralelkah, od katerih smo 2 vzorca dodatno koncentrirali s sušenjem, dva pa prenesli neposredno v vialo.

Za vrednotenje celokupnega izkoristka metode smo v 10 g suhe droge dodali 200 μ L sekundarne osnovne raztopine in 19,8 mL acetonitrila, nadaljevanje postopka pa je bilo enako, kot je navedeno zgoraj.

3.2.6.5.2 Bombažna vata

V 150 mL čašo smo natehtali 2,5 g bombažne vate, s polavtomatsko pipeto dodali 10 mL acetonitrila, pokrili s parafilmom in dali na ultrazvok za 10 minut. Nato smo dodali 10 mL prečiščene vode, pokrili s parafilmom in ponovili 10 minut ultrazvoka. Tekoči ekstrakt smo iz vate iztisnili s spatulo in ga prenesli v centrifugirko. 2,5 mL tekočega ekstrakta smo prenesli v 50 mL bučko in dopolnili do oznake z 20 mM pufrom pH=6. Nato smo izvedli ekstrakcijo s SPE metodo (poglavje 3.2.6.3) in 2 vzorca dodatno koncentrirali s sušenjem, dva pa prenesli neposredno v vialo.

Za vrednotenje celokupnega izkoristka metode smo v natehtano bombažno vato dodali 200 μ L sekundarne osnovne raztopine in 9,8 mL acetonitrila. Nadaljevanje postopka pa je bilo enako kot je navedeno zgoraj.

3.2.6.5.3 Riž

V 50 mL bučko smo natehtali 5 g riževih zrn, s polavtomatsko pipeto dodali 10 mL prečiščene vode in mešali na vibracijskem mešalniku 10 minut. Nato smo v zmes dodali še 10 mL acetonitrila in ponovno mešali na vibracijskem mešalniku 10 minut. Tekoči ekstrakt smo prenesli v centrifugirko in centrifugirali 5 minut pri sobni temperaturi in 5000 rpm. 2,5 mL ekstrakta smo prenesli v 50 mL merilno bučko in dopolnili z 20 mM pufrom pH=6 do oznake. Nato smo izvedli ekstrakcijo s SPE metodo (poglavje 3.2.6.3) in 2 vzorca dodatno koncentrirali s sušenjem, dva pa prenesli neposredno v vialo.

Za vrednotenje celokupnega izkoristka metode smo na 5 g riževih zrn dodali 200 μ L sekundarne osnovne raztopine in 9,8 mL acetonitrila. Nadaljevanje postopka pa je bilo enako kot je navedeno zgoraj.

3.2.6.5.4 Olja

V centrifugirko smo natehtali 2,5 g izbranega olja ter s polavtomatsko pipeto dodali 10 mL acetonitrila. To smo mešali 10 minut na vibracijskem mešalniku, nato pa centrifugirali 5 minut pri 4 °C in 5000 rpm. 2 mL ekstrakta smo razredčili z 38 mL vode in izvedli ekstrakcijo s SPE metodo po postopku 3.2.5.3. Analizirali smo samo nesušen vzorec, saj se koncentriran vzorec po sušenju zaradi visoke vsebnosti lipidov ni dovolj raztopil.

Za vrednotenje celokupnega izkoristka metode smo v 2,5 g olja dodali 100 μL sekundarne osnovne raztopine in 9,9 mL acetonitrila. Nadaljevanje postopka pa je bilo enako kot je navedeno zgoraj.

Izkoristke celotne SPE metode za posamezne realne vzorce smo izračunali po enačbi 1 (poglavje 3.2.6.4).

3.2.7 SPE-DEX METODA

3.2.7.1 Privzeta SPE-DEX metoda

Vzorec smo pripravili tako, da smo v steklenico za vzorec nalili 250 mL vodne raztopine pesticidov in 250 mL 50 mM pufra. Steklenico smo zaprli z aluminijasto folijo in namestili na aparat SPE-DEX. Vse stopnje priprave vzorca od te točke naprej so bile avtomatizirane in so potekale v skladu z metodo, razvito na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko.

Eluat smo prelili iz vial v 25 mL merilno bučko in dopolnili do oznake z elucijskim topilom. 1 mL tega vzorca smo prenesli neposredno v vialo in analizirali. Prenesli pa smo tudi 3-krat po 2 mL vzorca v epruvete in vzorce posušili na sistemu za sušenje. Suh preostanek smo raztopili z 200 μL rekonstitucijskega topila, 1 min mešali na vibracijskem mešalniku, nato pa vzorce, pokrite s parafilmom M, dali za 15 min na ultrazvok, nato pa prenesli v inserte in analizirali.

3.2.7.2 VREDNOTENJE SPE-DEX METODE

Linearnost metode smo preverjali v območju od 0,01 $\mu\text{g/L}$ do 5 $\mu\text{g/L}$, raztopine smo pripravljali po postopku v preglednici 9, koncentrirane vzorce pa po postopku iz poglavja 3.2.6.1, le da smo neposredno v eluat dodali 1 mL internega standarda s koncentracijo 25 $\mu\text{g/L}$. Prilagojena delovna raztopina je že vsebovala amitraz.

Preglednica 9 Priprava vzorcev za vrednotenje linearnosti pri SPE-DEX metodi

V (DR) v 500 mL bučko [μL]	Št. paralelk	Konc. v vzorcu pred nanosom na SPE [$\mu\text{g/L}$]	Konc. v vzorcu za analizo [$\mu\text{g/L}$]	Konc. v vzorcu s sušenjem [$\mu\text{g/L}$]
50*	2	0,01	0,1	1
125**	2	0,025	0,25	2,5
250	2	0,05	0,5	5
50	2	0,1	1	10
250	2	0,5	5	50
500	2	1	10	100
1250	2	2,5	25	250
2500	2	5	50	500

*Standardna raztopina pesticidov s koncentracijo 10 µg/L; **Standardna raztopina pesticidov koncentracijo 100 µg/L (poglavje 3.2.1.4.); DR – prilagojena delovna raztopina

Za vrednotenje ponovljivosti smo pripravili po 6 vodnih raztopin analitov s koncentracijami 0,1 µg/L in 1 µg/L, tako, da smo odmerili 3 L vode in dodali 150 µL prilagojene delovne raztopine, ki je vsebovala tudi amitraz za prvo in 1500 µL za drugo koncentracijo. Vzorce smo pripravili po postopku, opisanem v poglavju 3.2.7.1, le da smo neposredno v eluat dodali 1 mL internega standarda s koncentracijo 25 µg/L.

Za vrednotenje izkoristka metode so pripravili standardne raztopine pesticidov s koncentracijami 1, 10 in 100 µg/L po postopku iz poglavja 3.2.1.4.

Validacijske parametre metode smo vrednotili na enak način kot v poglavju 3.2.6.4.

3.2.7.3 Realni vzorci

Z merilno bučko smo odmerili 250 mL odpadne vode in ji dodali 250 mL pufru. Vzorce smo pripravljali v dveh paralelkah po postopku, opisanem v poglavju 3.2.7.1, dodatno smo v eluat dodali 1 mL internega standarda s koncentracijo 25 µg/L.

Za vrednotenje celokupnega izkoristka smo pripravili dvakrat po pol litra odpadne vode, pri čemer smo v prvo dodali 250 µL, v drugo pa 1,25 mL prilagojene delovne raztopine (ki je vsebovala tudi amitraz), da smo dobili koncentraciji vzorca 0,5 in 2,5 µg/L. Oba smo koncentrirali po metodi SPE-DEX, opisani v poglavju 3.2.7.1, le da smo v eluat dodali 1 mL internega standarda s koncentracijo 25 µg/L.

Za izračun izkoristkov smo pripravili standardne raztopine s koncentracijami 5, 25, 50 in 250 µg/L po postopku, opisanem v poglavju 3.2.1.4.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 Preverjanje instrumentalne metode

Za vrednotenje izbranih pesticidov je bila predhodno razvita LC-MS/MS metoda. Preden smo začeli razvoj postopka priprave vzorca, smo s standardnimi raztopinami (poglavje 3.2.1.4) preverili ustreznost instrumentalne metode. Rezultati linearnosti in ponovljivosti metode so predstavljeni v preglednici 10. Metoda je linearna v območju 0,5-1000 µg/L, kar ob upoštevanju koncentriranja vzorca s SPE predstavlja dejanske koncentracije analitov 0,02-40 µg/L (brez sušenja eluata, koncentriranje 25-krat) oz. 0,002-4 µg/L (s sušenjem eluata in dodatnim koncentriranjem, koncentriranje 250-krat). Determinacijski koeficienti so za vse pesticide razen klorpirifosa višji od 0,999. Metoda je tudi ustrezno ponovljiva z RSD manjšimi kot 3 % za vse analite. Tudi rezultati analize standardov v dveh različnih topilih (elucijsko in rekonstitucijsko topilo) so dali podobne rezultate – naklona premic se ujemata znotraj 5 %. Razen pri amitrazu, kjer je v rekonstitucijskem topilu prišlo do njegovega razpada, kar je razvidno tudi iz parametra linearnosti ($R^2=0,06$). Glede na odzive posameznih analitov smo prilagodili njihove koncentracije v zmesi, da so bili odzivi vseh analitov približno enaki (preglednica 1). To smo naredili z namenom lažjega in bolj enotnega vrednotenja vseh analitov v širšem koncentracijskem območju. Preverjeno LC-MS/MS metodo in prilagojene zmesi analitov smo nato uporabili pri razvoju in validaciji analizne metode za vrednotenje izbranih analitov.

Preglednica 10 Linearnost (R^2) in naklon premice za standardne raztopine v elucijskem (ET) in rekonstitucijskem topilu (RT)

	R^2 (ET)	Naklon premice (ET)	R^2 (RT)	Naklon premice (RT)	RSD [%]*
Karbendazim	0,9999	1475618	0,9999	1439773	0,8
Simazin	0,9998	3779798	0,9999	3697660	1,1
Atrazin	1,0000	3117467	0,9999	3071006	0,9
MCPA	0,9997	2658212	1,0000	2603736	1,2
Diuron	0,9996	2262577	0,9999	2183986	0,1
Mekoprop	0,9999	1291275	1,0000	1301394	0,9
Terbutilazin	0,9999	2689449	0,9999	2601390	1,2
Rotenon	0,9993	3729462	0,9998	3824594	1,3
Alaklor	0,9997	3018717	1,0000	2984064	1,2
Diazinon	0,9999	4252071	0,9999	3998745	1,0
Klorpirifos	0,9977	796388	0,9940	752674	2,1
Amitraz	0,9084	1394491	0,0001	682	1,6

* ponovljivost injiciranja pri 25 µg/L.

4.2 SPE METODA

S SPE metodo smo želeli doseči skupen pristop za pripravo vzorcev. Realne vzorce smo namreč želeli v kasnejši fazi ekstrahirati z organskim topilom, jih dodatno očistiti ter skoncentrirali, da bi na ta način dosegli čim nižjo mejo zaznave. Privzeli smo SPE postopek za pripravo vzorcev učinkovin, ki se uporablja na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko (poglavje 3.2.6.1). Pri prilagoditvi SPE metode za pesticide smo vrednotili nekatere parametre, ki so bili kasneje pomembni pri postopkih priprave realnih vzorcev kot npr. dodatno koncentriranje vzorca s sušenjem ter vpliv pH in delež organskega topila v vzorcu.

4.2.1 Sušenje

Z namenom znižanja meje zaznave metode smo pridobljene eluate še dodatno desetkrat skoncentrirali. Vrednotenje in optimizacijo tega postopka smo izvedli v treh stopnjah.

4.2.1.1 Stopnja 1

Najprej smo uporabili SPE metodo, ki je bila prilagojena za učinkovine (poglavje 3.2.6.1). Primerjali smo postopek z in brez dodatnega koncentriranja vzorcev. Uspešnost postopka smo vrednotili z izkoristkom (enačba 1) in ponovljivostjo (RSD) (enačba 2) pri koncentraciji analitov 1 µg/L (preglednica 11).

Preglednica 11 1. Primerjava izkoristka ekstrakcije in ponovljivosti privzete SPE z in brez sušenja

	Neposredna analiza Izkoristek [%] (RSD[%])	Koncentriranje s sušenjem Izkoristek [%] (RSD[%])
Karbendazim	88,8 (92,4)	110,7 (13,6)
Simazin	83,6 (89,5)	85,8 (19,2)
Atrazin	83,6 (88,5)	81,5 (20,5)
MCPA	81,4 (96,0)	91,5 (16,3)
Diuron	79,3 (86,0)	98,3 (14,6)
Mekoprop	80,4 (96,0)	93,5 (18,8)
Terbutilazin	81,8 (83,4)	72,5 (19,2)
Rotenon	86,2 (77,9)	91,5 (10,6)
Alaklor	88,7 (91,5)	65,3 (22,3)
Diazinon	72,8 (85,7)	34,1 (24,5)
Klorpirifos	38,9 (43,7)	9,5 (22,0)
Amitraz	63,4 (35,0)	0,2 (50,4)

Pri neposredni analizi vzorcev je prišlo do velike variabilnosti rezultatov – relativni standardni odklon je dosegel celo 90 %. Rezultati so bili bolj enotni pri koncentriranih vzorcih, vendar pa so bila odstopanja še vedno višja od 20 %. Povprečni izkoristki za posamezne analite pri neposredni analizi presegajo 80 %, nekoliko slabši so le za diazinon,

klorpirifos in amitraz. Pri koncentriranju s sušenjem pa so na povišani temperaturi nekateri od analitov očitno razpadli ali se izgubili na druge načine (npr. terbutilazin je hlapen), saj so izkoristki nižji za terbutilazin, alaklor in diazinon; klorpirifosa po sušenju ostane le še 10 %, amitraz pa praktično ves razpade. Da bi pridobili manj variabilne rezultate, smo poskus prilagodili tako, da smo pridobljene vzorce na več različnih načinov obdelali pred analizo.

4.2.1.2 Stopnja 2

V drugi stopnji smo torej sistematično preverili vzroke za rezultate iz prve stopnje. Eksperiment smo izvedli v skladu s postopkom 3.2.6.2.2. Rezultati so prikazani v preglednici 12.

Preglednica 12 Izkoristki [%] in ponovljivost (RSD[%]) SPE postopka pri različnih obdelavah eluata

	Eluat celoten	Eluat razdeljen + ultrazvok	Koncentriranje eluata - celoten volumen	Ultrazvok eluata – 1 mL nato koncentriranje
Karbendazim	107,4 (1,8)	104,1 (4,2)	109,8	109,7 (6,7)
Simazin	115,1 (1,3)	108,6 (1,0)	75,4	74,3 (6,1)
Atrazin	114,3 (0,4)	107,9 (1,1)	98,1	91,0 (7,4)
MCPA*	-	-	-	-
Diuron	105,7 (1,6)	92,8 (1,4)	97,1	98,0 (9,1)
Mekoprop*	-	-	-	-
Terbutilazin	114,1 (2,0)	105,2 (6,5)	69,3	74,7 (9,5)
Rotenon	82,8 (9,5)	62,0 (7,9)	67,5	67,5 (13,6)
Alaklor	97,6 (4,1)	88,4 (3,5)	60,5	68,7 (17,2)
Diazinon	103,6 (0,5)	98,8 (5,5)	35,9	34,6 (1,3)
Klorpirifos	84,9 (16,5)	92,3 (38,4)	10,8	10,3 (1,1)
Amitraz	72,2 (4,1)	69,9 (6,2)	0,02	0,02 (62,2)

* zaradi tehničnih težav ni rezultata za analite, ki so v negativni ionizaciji

V primeru, da smo za neposredno analizo vzeli celoten eluat, je bila ponovljivost rezultatov izredno dobra, saj je le klorpirifos presegel RSD 5 %. Tudi ultrazvok je bistveno zmanjšal variabilnost rezultatov, če smo vzeli manjši del eluata in ga pred analizo obdelali z ultrazvokom. RSD so bili nižji od 10 %, z izjemo klorpirifosa in občutno boljši kot pri vzorcih brez obdelave z ultrazvokom (preglednica 12). Na osnovi rezultatov smo se odločili, da v nadaljevanju za neposredno analizo vzamemo celoten eluat. Pri sušenih vzorcih smo ponovno opazili nižje izkoristke za nekatere analite, zato smo sumili na nestabilnost pri povišani temperaturi. Izkoristki so zelo primerljivi med vzorci, kjer smo sušili celoten volumen (2 mL) in vzorci, pri katerih smo vzorec najprej obdelali z ultrazvokom in ga nato razdelili na 2 dela (po 1 mL) in sušili. Za nadaljnje delo smo se odločili, da raje vzamemo celoten eluat za sušenje, saj imamo v tem primeru dvakrat večjo količino analitov v končnem vzorcu.

Ugotovili smo, da ultrazvok bistveno izboljša homogenost vzorcev in posledično zmanjša variabilnost rezultatov.

4.2.1.3 Stopnja 3

V tretji stopnji smo preverili stabilnost izbranih pesticidov pri povišani temperaturi ($T = 50$ °C). V tem poskusu smo preverjali izgubo analitov pri sušenju standardne raztopine pesticidov pri koncentracijah 10 in 25 $\mu\text{g/L}$ (preglednica 13).

Preglednica 13 Preverjanje stabilnosti pesticidov pri sušenju na 50 °C

	10 $\mu\text{g/L}$ Izkoristek [%] (RSD)	25 $\mu\text{g/L}$ Izkoristek [%] (RSD)
Karbendazim	99,9 (2,4)	103,2 (1,8)
Simazin	95,3 (9,2)	96,3 (2,8)
Atrazin	88,8 (8,2)	86,9 (5,1)
MCPA	103,0 (3,6)	105,3 (2,8)
Diuron	101,8 (3,3)	103,3 (2,2)
Mekoprop	104,4 (3,2)	105,6 (2,4)
Terbutilazin	84,5 (7,6)	81,0 (7,0)
Rotenon	99,3 (3,0)	102,9 (2,0)
Alaklor	74,8 (19,1)	72,9 (10,2)
Diazinon	62,3 (9,9)	58,0 (8,3)
Klorpirifos	38,3 (36,1)	34,7 (38,0)
Amitraz	0,02 (40,0)	0,06 (55,6)

Dokazali smo, da so nekateri analiti nestabilni pri sušenju – najbolj izrazita sta klorpirifos, pri katerem je po sušenju prisotnega še 40 %, in amitraz, ki popolnoma razpade. Izgubimo pa tudi terbutilazin, alaklor in diazinon, a v manjšem obsegu. Rezultati so primerljivi pri obeh koncentracijah. Pri obstojnejših analitih (izkoristek, višji od 95 %) so ponovljivi rezultati, variabilnosti pa narašča z nestabilnostjo analita.

Nekateri od pesticidov torej niso primerni za koncentriranje s sušenjem, kar pomeni, da je treba analizirati tudi ne-koncentrirane vzorce. Zaradi izredne nestabilnosti amitraza pri povišani temperaturi, dodatno pa je nestabilen tudi v raztopini, še posebej v vodnem mediju, smo se odločili, da ga izključimo iz vrednotenja metode in analize realnih vzorcev.

4.2.2 Vpliv pH

V nadaljevanju smo preverjali, ali pH vzorca vpliva na izkoristek ekstrakcije. pH je namreč pomemben dejavnik, saj so analiti glede na pKa pri različnem pH različno nabiti. Poskus smo izvedli v pH območju med 3 in 9 pri koncentraciji 1 $\mu\text{g/L}$ z neposredno analizo po postopku 3.2.6.2.4.

Preglednica 14 Vpliv pH na izkoristek [%] in ponovljivost (RSD [%]) SPE postopka. Izkoristek je podan kot relativno glede na najvišji izkoristek

	voda	pH=3	pH=6	pH=9
Karbendazim	77 (1,4)	98 (1,2)	100 (2,1)	98 (0,7)
Simazin	79 (0,7)	94 (1,8)	100 (1,8)	95 (0,8)
Atrazin	81 (1,6)	95 (2,7)	100 (2,9)	96 (0,9)
MCPA	77 (5,1)	92 (5,0)	100 (4,5)	98 (2,1)
Diuron	79 (2,2)	93 (4,4)	100 (4,6)	97 (1,5)
Mekoprop	82 (5,3)	94 (5,2)	100 (3,9)	93 (1,1)
Terbutilazin	81 (2,6)	94 (0,5)	100 (3,7)	95 (1,4)
Rotenon	100 (6,5)	96 (8,5)	97 (5,4)	94 (3,6)
Alaklor	100 (7,0)	93 (23,0)	83 (3,2)	77 (0,6)
Diazinon	87 (8,5)	94 (7,8)	100 (1,7)	99 (2,9)
Klorpirifos	99 (8,7)	93 (10,7)	88 (8,3)	100 (5,4)
Amitraz	84 (14,3)	88 (6,0)	91 (6,0)	100 (8,8)

Izbira pH je bila narejena na podlagi relativnega izkoristka in ponovljivost. Za nadaljnje delo smo izbrali pufer z vrednostjo pH=6, saj ima najvišji izkoristek v večini primerov (pri 8 od 12 analitov), najnižji relativni izkoristek pri tem pH ima alaklor in odstopa le za 1/6 od najvišjega izkoristka. Najnižja variabilnost rezultatov je sicer v primeru pufera s pH 9, vendar ima nižje izkoristke kot pH=6. Najnižja ponovljivost in uspešnost ekstrakcije je bila v primeru pufera s pH=3 in vode.

Opazili smo, da se je v tem poskusu pri uporabi pufrov pojavila oborina. Zato smo vzorec pred analizo centrifugirali. Ta oborina je najverjetneje posledica ujetega pufera na SPE kartuši, ki se spere z elucijskim topilom, v katerem pa ni topen. Da bi se izognili tej težavi, smo kartušo pred elucijo sprali s 5 mL ultračiste vode. V nadaljevanju nismo imeli več teh težav.

4.2.3 Prisotnost organskega topila

Realni vzorec običajno najprej ekstrahiramo z organskim topilom. Ta ekstrakt pa dodatno čistimo s SPE metodo. Da bi ugotovili, kakšen delež organskega topila v vodi še ne vpliva za uspešnost ekstrakcije, smo pri različnih deležih preverili najbolj pogosta ekstrakcijska topila za pripravo realnih vzorcev. Rezultati so podani v preglednici 15.

Preglednica 15 Vpliv vrste in deleža organskega topila v pufru pH 6 na izkoristek [%] in ponovljivost SPE postopka

	0 % topila	5 % ACN	10 % ACN	5 % ACN + heksan*	5 % MeOH	5 % ACN + MeOH*
Karbendazim	112,9 (2,3)	96,2 (2,7)	27,2 (10,2)	81,1 (7,6)	99,0 (2,5)	101,5 (2,3)
Simazin	102,2 (3,9)	102,9 (1,5)	65,8 (7,3)	99,6 (9,2)	101,7 (0,5)	102,7 (2,9)
Atrazin	104,3 (1,7)	105,5 (2,4)	103,0 (4,5)	99,1 (11,7)	102,3 (1,3)	103,3 (3,5)
MCPA	104,5 (3,8)	52,4 (3,0)	9,7 (10,4)	12,1 (5,9)	102,6 (1,3)	88,1 (3,8)
Diuron	101,9 (2,7)	103,8 (2,6)	102,0 (2,8)	102,0 (9,7)	97,5 (0,8)	101,0 (3,6)
Mekoprop	102,8 (1,5)	49,8 (7,1)	12,2 (9,4)	25,9 (5,3)	99,2 (1,7)	95,7 (2,6)
Terbutilazin	101,9 (2,1)	102,0 (2,2)	102,0 (1,7)	71,5 (21,3)	101,0 (2,5)	102,5 (1,2)
Rotenon	88,8 (1,5)	91,3 (2,0)	92,4 (3,2)	48,1 (28,1)	95,8 (2,5)	96,6 (2,7)
Alaklor	101,2 (3,5)	102,3 (2,1)	101,9 (3,0)	29,0 (20,7)	99,1 (3,2)	100,6 (4,5)
Diazinon	105,0 (1,7)	105,6 (2,4)	108,7 (3,3)	8,8 (7,3)	95,7 (1,2)	103,0 (3,8)
Klorpirifos	69,1 (4,6)	75,9 (4,4)	87,7 (4,0)	21,4 (6,0)	68,7 (10,8)	87,8 (7,9)
Amitraz	56,7 (3,6)	51,7 (2,8)	77,6 (4,5)	12,3 (5,4)	46,4 (2,8)	55,8 (6,4)

* razmerje 1:1

Najvišji izkoristki ob prisotnosti organskega topila so bili v 5 % metanola ter 5 % mešanici metanola in acetonitrila (1:1), saj so bili praktično vsi izkoristki okrog 100 %. Enako velja tudi za 5 % acetonitril z izjemo MCPA in mekopropa, ki imata v tem primeru za polovico manjši izkoristek. 10 % acetonitril ni primeren za vzorce, saj se polarni analiti ne zadržijo več na kartuši, MCPA in mekoprop pa imata izkoristke samo še okrog 10 %. Dodatek heksana v vzorec povzroča težave zaradi ločevanja faz, poleg tega pa so izkoristki za večino analitov občutno nižji. Izkoristki so nižji od 30 % za MCPA, mekoprop, rotenon, alaklor, diazinon, klorpirifos in amitraz.

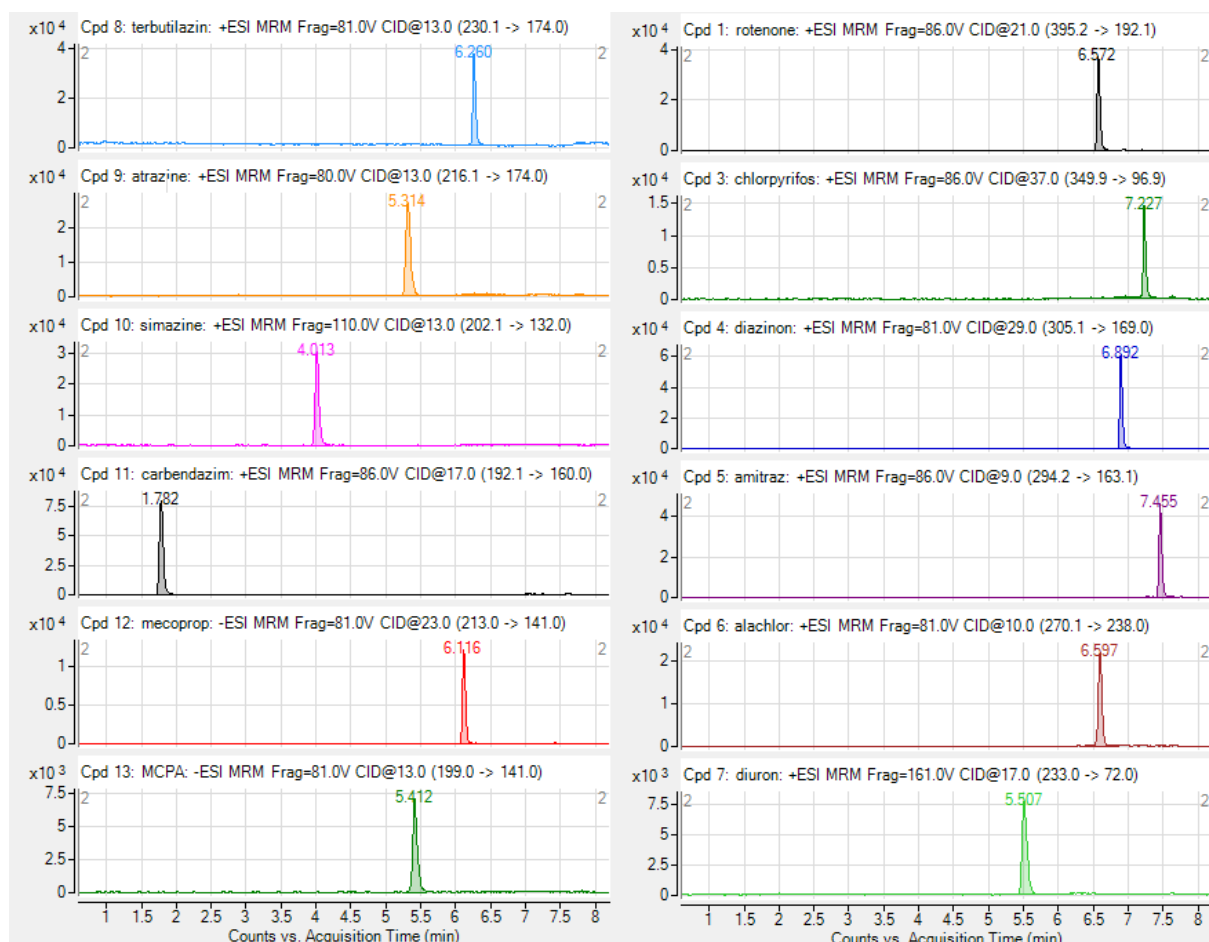
Za uporabo pri realnih vzorcih ustreza koncentracija organskih topil do 5 %, pri čemer lahko uporabljamo acetonitril, metanol ali pa njuno mešanico, saj dejansko ne izgubimo pesticidov v primerjavi z vzorcem brez organskega topila.

4.2.4 Vrednotenje metode

Metodo smo validirali z namenom, da dokažemo, da daje verodostojne rezultate. V skladu s FDA (Food and Drug Administration – Uprava za hrano in zdravila) smernicami za validacijo bioanaliznih metod smo vrednotili selektivnost, ponovljivost, linearnost, izkoristek in mejo določitve (86).

Selektivnost metode smo preverili in potrdili z analizo standardne raztopine pesticidov ter realnih vzorcev. Ugotovili smo, da ni prišlo do interferenc pri retencijskih časih analitov v posameznih MRM kanalih. Prav tako nobeden od pesticidov ne moti analize drugih pesticidov pri izbranih MRM prehodih. Kromatogram standardne raztopine pesticidov pri koncentraciji

25 µg/L je prikazana na sliki 2. Analizirali smo tudi slepe vzorce in opazili amitraz in v manjši meri tudi karbendazim v tem vzorcu. To je bil tudi razlog, da smo za karbendazim določili višjo mejo določitve kot bi pričakovali glede na njegov odziv. Amitraz pa smo predhodno že izločili iz metode.



Slika 2 LC-MS/MS kromatogrami standardne raztopine pesticidov z deklarirano koncentracijo 25 µg/L.

4.2.4.1 Vrednotenje SPE metode z dodatnim koncentriranjem vzorcev s sušenjem

Rezultati validacije so predstavljeni v preglednicah 16 in 17. Izkoristki so za temperaturno neobstoje pesticide nizki, pri ostalih pa so 70 % ali več. Nestabilnost je tudi razlog, da smo amitraz izločili iz validacije. Metoda je linearna za vse pesticide z determinacijskimi koeficienti nad 0,999, razen za klorpirifos, kjer je korelacija slabša in pade izven postavljenih kriterijev (poglavje 3.2.6.4), predvsem zaradi neobstoynosti pri sušenju. Pesticidi imajo primerljiva območja linearosti in meje določitve, večina med 0,5 in 2,5 ng/L. Nizke meje določitve so pomembna prednost naše metode, saj na ta način obstaja večja verjetnost, da jih bomo zaznali v realnih vzorcih. Klorpirifos se je izkazal kot neprimeren pesticid za vrednotenje z metodo koncentriranja.

Preglednica 16 Izkoristek, linearnost, meja določitve in območje linearnosti SPE metode z dodatnim koncentriranjem vzorcev s sušenjem

	Izkoristek [%]	Linearnost (R^2)	Meja določitve [ng/L]	Območje linearnosti [n/L]
Karbendazim	89,1	0,9967	5	5 – 400
Simazin	68,7	0,9996	1	1 – 4000
Atrazin	69,0	0,9974	0,6	0,6 – 1000
MCPA	92,1	0,9993	2	2 – 8000
Diuron	91,1	0,9996	2	2 – 8000
Mekoprop	107,1	0,9992	2	0,004 – 8000
Terbutilazin	55,4	0,9993	0,5	0,5 – 200
Rotenon	96,1	0,9997	10	10 – 4000
Alaklor	56,0	1,0000	2,5	2,5 – 4000
Diazinon	21,5	1,0000	2,5	2,5 – 200
Klorpirifos	9,5	0,9707	500	500 – 40000

Preglednica 17 Ponovljivost (RSD) SPE metode z dodatnim koncentriranjem vzorcev s sušenjem pri različnih koncentracijah pesticidov

	0,005 µg/L	0,02 µg/L	0,5 µg/L
Karbendazim	17,8	3,3	6,1
Simazin	17,2	6,5	2,3
Atrazin	15,7	7,9	4,0
MCPA	7,8	1,5	3,1
Diuron	17,6	1,6	2,3
Mekoprop	9,7	1,0	4,6
Terbutilazin	10,4	8,7	5,0
Rotenon	3,2	7,4	4,1
Alaklor	10,9	6,7	10,9
Diazinon	31,4	13,7	18,3
Klorpirifos	17,9	26,0	14,8

Ponovljivost metode je dobra in je znotraj 20 %. Odstopajo predvsem pesticidi, ki so neobstojni v procesu sušenja vzorca, zlasti diazinon in klorpirifos. Nekateri vzorci so se namreč sušili pri povišani temperaturi tudi 10 minut dlje od ostalih, predvidoma zaradi višje vsebnosti vode v eluatu, kar pa lahko bistveno vpliva na ponovljivost. Kot pričakovano, se variabilnost zmanjša pri višji koncentraciji. Pri najvišji koncentraciji presežata 10 % mejo le prej omenjena pesticida.

Na splošno je ponovljivost sicer dobra, vendar je sušenje, zaradi močno podaljšane postopka priprave in izgub nekaterih analitov med sušenjem, v prihodnje najbrž nesmiselno.

4.2.4.2 Vrednotenje SPE metode z neposredno analizo vzorcev

Rezultati validacije brez dodatnega koraka sušenja so predstavljeni v preglednicah 18 in 19. Izkoristki pri tem postopku so boljši in v veliki večini presegajo 94 %. Nekoliko nižje vrednosti so ponovno pri diazinonu (89 %) in klorpirifosu (64 %), ki sta po podatkih proizvajalca nestabilna tudi pri sobni temperaturi. Linearnost metode je odlična za vse pesticide razen klorpirifos, a tudi slednji ima v tem primeru R^2 nad kriterijem sprejemljivosti (86). Meje določitve so zelo različne, a primerljive z metodo sušenja, nekateri pesticidi imajo nižje, drugi pa višje meje določitve. Glede na faktor koncentriranja (10x) bi pričakovali, da bodo meje določitve za ta faktor višje pri postopku neposredne analize eluata, a temu ni tako. Na podlagi teh rezultatov lahko zaključimo, da je primernejša SPE metoda brez dodatnega koncentriranja s sušenjem. To potrjuje tudi ponovljivost metode, saj je variabilnost nižja in praktično ne preseže 10 % (preglednica 19).

Preglednica 18 Izkoristek, linearnost, meja določitve in območje linearnosti SPE metode z neposredno analizo vzorcev

	Izkoristek [%]	Linearnost (R^2)	Meja določitve [ng/L]	Območje linearnosti [ng/L]
Karbendazim	98,5	0,9999	0,25	0,25 – 40000
Simazin	98,7	0,9999	2,5	2,5 – 40000
Atrazin	96,1	0,9999	1,25	1,25 – 10000
MCPA	98,3	0,9996	10	10 – 80000
Diuron	95,5	0,9997	10	10 – 80000
Mekoprop	95,8	0,9995	10	10 – 80000
Terbutilazin	95,7	0,9999	2,5	2,5 – 2000
Rotenon	96,2	0,9999	5	5 – 40000
Alaklor	94,8	0,9996	5	5 – 40000
Diazinon	88,7	0,9998	0,25	0,25 – 2000
Klorpirifos	63,9	0,9854	50	50 – 400000

Preglednica 19 Ponovljivost (RSD) SPE metode z neposredno analizo vzorcev pri različnih koncentracijah pesticidov

	0,05 µg/L	0,5 µg/L
Karbendazim	4,1	1,8
Simazin	4,3	1,4
Atrazin	6,1	1,9
MCPA	6,9	2,9
Diuron	8,7	2,1
Mekoprop	7,7	3,5
Terbutilazin	9,6	2,5
Rotenon	5,0	2,3
Alaklor	1,6	2,5
Diazinon	2,7	5,4
Klorpirifos	17,3	5,4

Na podlagi rezultatov lahko zaključimo, da je razvita SPE metoda primerna kot metoda za dodatno čiščenje in koncentriranje vzorcev za 10 pesticidov. Iz prvotnega nabora smo izločili amitraz in klorpirifos zaradi nestabilnosti, klorpirifos pa dodatno tudi zaradi slabše občutljivosti.

4.2.5 Aplikacija razvite metode na realne vzorce

SPE metodo smo nato uporabili na realnih vzorcih. Ekstrakcijo pesticidov iz posameznih materialov smo povzeli po literaturi. Večina raziskovalcev je uporabljala acetonitril kot ekstrakcijsko topilo za čaj, riž in bombaž. Za riž in bombaž je potreben tudi dodatek vode. Pesticide iz olj oz. lipofilnih snovi so največkrat ekstrahirali s heksanom, vendar smo mi raje uporabili acetonitril, ker so naši predhodni rezultati pokazali, da heksan ni primeren kot topilo (preglednica 15). (81 – 85)

Celokupno analizno metodo smo vrednotili na posameznem analiziranem materialu. V ta namen smo obogatili vzorce z znano koncentracijo pesticidov (0,5 µg/L) in preverili izkoristek postopka (poglavje 3.2.6.2). Rezultati so zbrani v preglednici 20.

Preglednica 20 Izkoristki analizne metode pri realnih vzorcih

Izkoristek [%]	Zeleni čaj	Bombaž	Riž	Olivno olje	Sončnično olje
Karbendazim	112,9	100,6	96,1	92,4	99,3
Simazin	101,9	95,2	100,6	50,4	72,3
Atrazin	104,6	93,0	100,0	66,6	75,2
MCPA	41,2	91,8	71,5	42,5	40,1
Diuron	80,5	86,2	98,0	92,8	96,1
Mekoprop	50,6	87,6	55,9	82,0	74,3
Terbutilazin	95,4	69,8	53,0	61,9	65,6
Rotenon	66,2	71,7	16,2	54,3	63,3
Alaklor	84,0	77,2	15,3	75,6	66,9
Diazinon	95,2	91,4	21,8	53,9	54,9
Klorpirifos	92,0	73,8	8,6	29,7	13,9

Izkoristki ekstrakcije iz zelenega čaja in bombaža so primerljivi z vodnimi vzorci z enako vsebnostjo organskega topila oz. acetonitrila (preglednica 15), nekoliko nižji pa so za riž ter za olja, kar pomeni, da bi bila v prihodnje potrebna optimizacija izolacije iz teh vzorcev. Pri rižu bi bilo morda smiselno zmleti vzorec in podaljšati čas namakanja z vodo, pri pripravi vzorcev iz olja pa prilagoditi ekstrakcijsko topilo. Pri ekstrakciji pesticidov iz olja se običajno uporablja heksan, ki pa v primeru razvite SPE metode ni primeren. Zato bo v prihodnje treba optimizirati postopek ekstrakcije in/ali poiskati alternativno topilo.

V hladno stiskanem olivnem olju znamke Gea smo odkrili diuron v koncentraciji 6,8 ng/g. Podatka za vsebnost diurona v hrani nismo našli v literaturi. Je pa diuron iskana spojina v okoljskih vzorcih, pogosto ga zaznajo v vodi, morski vodi, sedimentu in v planktonu. Vsebnost diurona v reki Ebro je leta 2010 nihala od 3 do 150 ng/L, leta 2011 pa od 7 do 25 ng/L. Od vzorcev iz morja Seto na Japonskem diuron najboljše privzemajo planktoni, saj so v njih zasledili koncentracije okrog 250 ng/g suhe mase, medtem ko so se v (morski) vodi koncentracije gibale okrog 20 ng/L, v sedimentu pa okrog 20 ng/g suhe mase. (87, 88)

4.3 SPE-DEX METODA

SPE-DEX metoda je bila namenjena vrednotenju pesticidov v odpadnih vodah. Prevezeli smo obstoječo metodo priprave vzorcev za učinkovine, ki se uporablja v laboratorijih Katedre za biofarmacijo in farmakokinetiko. Metode nismo nadalje prilagajali na pesticide, saj smo že predhodno (SPE metoda), prišli do ustreznih zaključkov. Vrednotenje te metode smo izvedli na podoben način, kot za SPE metodo. Prav tako smo pripravili vzorce na dva načina – z in brez dodatnega sušenja.

4.3.1 Vrednotenje SPE-DEX metode pri dodatnem koncentriranju s sušenjem

Rezultati validacije so prikazani v preglednicah 21 in 22. Tudi SPE-DEX metoda je linearna za večino pesticidov, a je linearnost slabša kot pri SPE metodi. Opazimo lahko, da je pri nestabilnih pesticidih ta razlika še bolj izražena. Enak trend je tudi pri izkoristku ekstrakcije. Nekateri pesticidi imajo visoke izkoristke, tudi do 100 %, drugi pa nizke. V primeru SPE-DEX-a je ta razlika še bolj izražena, saj je pri štirih pesticidih izkoristek pod 20 % (pri SPE metodi samo klorpirifos). Razlog za tako velike razlike je v času sušenja. Vzorci, pripravljene na SPE-DEX-u, vsebujejo več vode (spremenljive koncentracije), zato čas sušenja med različnimi vzorci variira tudi za pol ure in več. Tudi pri ponovljivosti je viden enak trend pri SPE metodi, variabilnost pa je bolj izrazita pri nestabilnih analitih.

Glede na rezultate validacije lahko zaključimo, da je SPE-DEX metoda z dodatnim koncentriranjem primerna za karbendazim, simazin, atrazin, MCPA, diuron, mekoprop in rotenon.

Preglednica 21 Izkoristek, linearnost, meja določitve in območje linearnosti SPE-DEX metode z dodatnim koncentriranjem vzorcev s sušenjem

	Izkoristek [%]	Linearnost [R ²]	Meja določitve [ng/L]	Območje linearnosti [ng/L]
Karbendazim	86,9	0,9967	1	1 – 1000
Simazin	79,0	0,9962	10	10 – 10 000
Atrazin	82,6	0,9958	2,5	2,5 – 2500
MCPA	102,5	0,9970	20	20 – 20 000
Diuron	92,8	0,9984	50	50 – 20 000
Mekoprop	103,1	0,9980	20	20 – 20 000
Terbutilazin	16,2	0,9958	1,25	1,25 - 500
Rotenon	73,6	0,9940	25	25 – 10 000
Alaklor	5,5	0,9923	50	50 – 10 000
Diazinon	0,4	0,9883	2,5	2,5 - 500
Klorpirifos	0,7	0,9552	5000	5000 – 100 000

Preglednica 22 Ponovljivost (RSD) SPE-DEX metode z dodatnim koncentriranjem vzorcev s sušenjem pri različnih koncentracijah pesticidov

	0,1 µg/L	1 µg/L	2,5 µg/L
Karbendazim	14,6	6,3	2,2
Simazin	14,4	10,7	5,6
Atrazin	13,0	6,4	4,6
MCPA	6,2	6,2	5,1
Diuron	11,4	5,5	2,2
Mekoprop	2,8	5,3	3,1
Terbutilazin	26,1	24,7	9,2
Rotenon	11,5	12,5	6,6
Alaklor	28,6	24,1	31,4
Diazinon	43,8	31,8	31,7
Klorpirifos	50,4	76,7	33,7

4.3.2 Vrednotenje SPE-DEX metode z neposredno analizo vzorcev

Rezultati validacije so prikazani v preglednici 23 in 24. Neposredna analiza vzorcev brez dodatnega koncentriranja s sušenjem je primerna za vrednotenje vseh pesticidov razen klorpirifosa. Opazni so enaki trendi, kot pri SPE metodi, postopek brez dodatnega koncentriranja je primernejši. Po eni strani so boljši validacijski parametri za metodo z neposredno analizo, hkrati pa lahko v vrednotenje vključimo tudi temperaturno neobstoje ne pesticide – terbutilazin, alaklor in diazinon. Klorpirifos pa tudi v primeru SPE-DEX metode ni primeren za vrednotenje. Razlika v občutljivosti metode z in brez dodatnega sušenja je za temperaturno stabilne pesticide v povprečju le dvakrat boljša. Upoštevati je tudi potrebno, da

sušenje vzorcev traja eno uro ali več. Zato v prihodnje ni smiselna uporaba SPE-DEX metode z dodatnim koncentriranjem.

Preglednica 23 Izkoristek, linearnost, meja določitve in območje linearnosti SPE-DEX metode z neposredno analizo vzorcev

	Izkoristek [%]	R ²	Meja določitve [ng/L]	Območje linearnosti
Karbendazim	84,5	0,9988	2,5	2,5 – 10 000
Simazin	94,4	0,9979	25	25 – 100 000
Atrazin	92,2	0,9970	6,25	6,25 – 20 000
MCPA	89,6	0,9981	50	50 – 200 000
Diuron	86,7	0,9978	100	100 – 200 000
Mekoprop	91,0	0,9984	50	50 – 200 000
Terbutilazin	87,5	0,9983	1,25	1,25 – 5000
Rotenon	73,5	0,9964	50	50 – 100 000
Alaklor	87,2	0,9956	50	50 – 100 000
Diazinon	78,8	0,9961	1,25	1,25 – 5000
Klorpirifos	115,6	0,9536	10000	10 000 – 1 mil.

Preglednica 24 Ponovljivost (RSD) SPE-DEX metode z neposredno analizo vzorcev pesticidov

	0,1 µg/L	1 µg/L	2,5 µg/L
Karbendazim	9,3	6,9	4,6
Simazin	4,6	2,8	3,3
Atrazin	10,1	2,6	1,4
MCPA	5,0	2,2	4,7
Diuron	4,4	1,4	4,2
Mekoprop	5,6	1,8	2,9
Terbutilazin	6,3	2,4	4,5
Rotenon	8,9	7,6	3,2
Alaklor	6,2	5,0	2,7
Diazinon	3,1	2,4	2,6
Klorpirifos	36,8	27,4	4,4

Še kratka primerjava klasične SPE in SPE-DEX metode za analizo vzorcev odpadnih vod. SPE-DEX izkazuje primerljive validacijske parametre, razen za mejo določitve. Vzorec pri SPE-DEX postopku je 2,5-krat manj skoncentriran, kar se posledično kaže v manjši občutljivosti te metode. Kljub temu smo raje uporabili SPE-DEX metodo zaradi enostavnejšega rokovanja. Metoda je po eni strani avtomatizirana, hkrati pa ne zahteva predpriprave vzorca – filtriranje. To pa je nujen korak pri SPE metodi, saj se drugače kartuša zamaši. Glede na literaturne podatke so dosežene meje določitve s SPE-DEX metodo dovolj nizke, da bi lahko zaznali pesticide.

4.3.3 Realni vzorci

Vzorci smo pripravili po postopku, opisanem v poglavju 3.2.7.3. S tem smo preverili, ali je razvita metoda ustrezna tudi za realne vzorce. Izkoristke smo izračunali po enačbi 1, rezultati pa so predstavljeni v preglednicah 25 in 26.

Preglednica 25 Izkoristki (%) SPE-DEX metode pri vzorcih odpadnih vod z dodatnim koncentriranjem s sušenjem

	0,5 µg/L	2,5 µg/L
Karbendazim	78,3	81,9
Simazin	77,2	74,8
Atrazin	67,3	70,9
MCPA	77,0	80,0
Diuron	81,0	85,0
Mekoprop	68,5	74,8
Terbutilazin	16,0	13,0
Rotenon	53,9	53,8
Alaklor	4,0	3,4
Diazinon	3,0	2,7
Klorpirifos	1,5	0,3

Preglednica 26 Izkoristki (%) SPE-DEX metode pri vzorcih odpadnih vod z neposredno analizo vzorcev

	0,5 µg/L	2,5 µg/L
Karbendazim	80,0	87,1
Simazin	82,3	87,7
Atrazin	77,8	82,5
MCPA	86,7	91,0
Diuron	88,3	96,2
Mekoprop	86,1	92,6
Terbutilazin	74,1	74,1
Rotenon	64,5	72,0
Alaklor	71,3	78,6
Diazinon	65,9	70,2
Klorpirifos	82,9	85,9

Izkoristki so v realnih vzorcih nekoliko nižji kot v ultra čisti vodi, verjetno zaradi vezave na sediment, vendar pa še vedno velja, da so precej boljši izkoristki pri vzorcih, ki smo jih vzorčili neposredno.

Prisotnost pesticidov smo ugotavljali v štirih odpadnih vodah neposredno po čistilni napravi. Našli smo le atrazin v koncentraciji 10,2 ng/L v odpadni vodi iz prekmurske čistilne naprave; to področje zaradi obsega kmetijske dejavnosti spada med bolj obremenjena okolja. V času, ko je bil atrazin še dovoljen, je bil pogosto najdeno fitofarmacevtsko sredstvo v vodah; pri vzorčenju površinskih voda v Grčiji v devetdesetih letih prejšnjega stoletja so koncentracije

variirale od 2 do kar 5900 ng/L v rekah, 20 do kar 8500 ng/L v jezerih, medtem ko so se koncentracije v nekaterih evropskih rekah gibale med 10 in 1300 ng/L. (89)

V kasnejših raziskavah so vzorčili podtalnico v državah EU, kjer so zaznali v povprečju 8 ng/L atrazina, kar je primerljivo z našim rezultatom. (90)

Glede na to, da ima atrazin v vodi zelo dolgo razpolovno dobo (po nekaterih podatkih tudi do 1200 dni) (89), lahko sklepamo, da se je v preteklosti uporabljal zelo veliko oziroma v zelo visokih koncentracijah, obstaja pa tudi majhna verjetnost, da ga posamezniki nelegalno še vedno uporabljajo na manjših območjih. Slednje bi lahko opazovali tako, da bi spremljali nihanja koncentracije atrazina v tekočih vodah skozi vse leto – v spomladanskih mesecih bi v primeru uporabe opazili rahlo povišanje koncentracije, v zimskih pa upad.

5 SKLEP

V diplomski nalogi smo se osredotočili na razvoj in optimizacijo preproste metode za detekcijo izbranih pesticidov v okoljskih vzorcih. Z metodo SPE-DEX smo se osredotočili na vzorce odpadnih voda, s SPE metodo pa na bombaž in nekatere potencialne naravne sestavine za kozmetiko.

Metodo, ki je bila razvita za odkrivanje ostankov zdravilnih učinkovin v okoljskih vzorcih, smo prenesli na pesticide, jo optimizirali, nato pa uporabili na vzorcih, ki so vsaj deloma povezani s kozmetično industrijo; bombažna vata se na primer uporablja za odstranjevanje ličil, rižev škrob je zaželena sestavina v pudrih, saj zaradi majhnih zrn omogoča dober razmaz in pušča mehak občutek na koži, izvlečki zelenega čaja so pogost antioksidativen dodatek v 'naravni' kozmetiki, olja pa so najpogostejša sestavina emulzij (krem, losjonov, balzamov ...). Metodo smo uspešno validirali za 10 pesticidov, pri čemer je treba upoštevati, da je dodatno koncentriranje vzorcev s sušenjem pri povišani temperaturi manj primerno.

V rižu, bombažu in zelenem čaju nismo zaznali nobenega od izbranih pesticidov. Za riž in za bombaž je bil rezultat pričakovan, saj je večino riža, ki je na voljo v trgovinah, poliranega; prav tako je sanitetna bombažna vata beljena in očiščena, večja verjetnost za prisotnost pesticidov pa je značilna za zelen čaj, saj je kot plantažna rastlina znan po obremenjenosti s fitofarmacevtskimi sredstvi.

Zaradi bolj problematične priprave vzorca so bila pričakovanja za detekcije kateregakoli od izbranih pesticidov v oljih manjša. Vendar smo zaznali diuron v hladno stiskanem olivnem olju. To ni posebno problematično, saj iz embalaže tega olja ni razvidno, da bi šlo za ekološko pridelavo, diuron je v EU dovoljeno fitofarmacevtsko sredstvo, poleg tega pa je malo verjetno, da bi z vnosom olivnega olja, ki vsebuje tako koncentracijo sredstva, kot smo jo določili, presegel odmerek, ki povzroči akutne učinke (Acute Reference dose, ARfD), ki je 0,016 mg/kg/dan ali sploh sprejemljiv dnevni vnos (Acceptable Daily Intake, ADI), ki je 0,007 mg/kg/dan. (91)

Metodo SPE-DEX smo uspešno validirali za 10 pesticidov, pri čemer moramo upoštevati, da je dodatno koncentriranje vzorcev s sušenjem pri povišani temperaturi popolnoma neprimerno. Odpadno vodo iz čistilnih naprav smo vzorčili štirikrat, zaznali smo prisotnost atrazina v vzorcu iz področja z intenzivno kmetijsko dejavnostjo. Atrazin je v EU sicer prepovedano fitofarmacevtsko sredstvo že od leta 2004. Njegova razpolovna doba v površinskih vodah je lahko tudi do 1200 dni, zato torej obstaja možnost, da smo zaznali

ostanke pesticida še iz časa, ko je bil dovoljen; druga možnost pa je, da ga posamezniki še vedno uporabljajo na manjših področjih; to bi lahko preverili s sezonskim vzorčenjem površinskih voda.

Zaradi samega načina, kako izbrani pesticidi prehajajo v vodo, bi bilo smiselno vzorčenje površinskih voda in podtalnice, saj se pesticidi vnašajo neposredno v okolje, kjer jih nato spira dež in torej (razen v primeru vlivanja v odtoke) v okolje ne pridejo skozi kanalizacijski sistem.

Če primerjamo metodi SPE in SPE-DEX, lahko ocenimo, da je prva bolj primerna za analizo izbranih pesticidov, saj je bolj natančna, potrebujemo manjše količine vzorca, dosegamo veliko nižje meje določitve, poleg tega pa samo delo poteka veliko hitreje, saj lahko pripravljamo več paralelk vzorcev vzporedno. Kljub temu je za vzorce odpadnih voda bolj praktična metoda SPE-DEX, saj je delno avtomatizirana in ne potrebuje stalne pozornosti operaterja, poleg tega pa ne zahteva posebne predpriprave vzorca; za SPE metodo bi namreč morali odpadne vode pred nanosom na kartuše filtrirati, sicer bi se te prehitro zamašile. Dodatno koncentriranje vzorcev ni primerno za nobeno od metod, vendar je veliko bolj izraženo pri metodi SPE-DEX, saj se zaradi večje količine vode v eluatu, bistveno podaljša čas izpostavljenosti povišani temperaturi.

V okviru diplomske naloge smo postavili izhodišče za nadaljevanje dela na tej aktualni problematiki. V prihodnje bo potrebno za celovito oceno prisotnosti pesticidov v potencialnih sestavinah za kozmetične, pa tudi za nekatere prehrabne izdelke, razširiti nabor pesticidov. Poleg tega bi bilo pametno preverjati stabilnejša fitofarmacevtska sredstva ali stabilne razgradne produkte manj stabilnih pesticidov, smiselno pa bi jih bilo tudi razdeliti po kategorijah, npr. herbicidi, insekticidi, fungicidi / lipofilni, hidrofilni / dovoljeni, nedovoljeni in drugo.

6 LITERATURA

- 1 New South Wales Environmental Protection Agency: <http://www.epa.nsw.gov.au/pesticides/pestwhatrhow.htm>, zadnji dostop 19.7.16
- 2 USDA: http://www.ars.usda.gov/sp2UserFiles/Place/20360500/pdf_pubs/P1222.pdf, zadnji dostop 27.8.16
- 3 USGS: <http://water.usgs.gov/nawqa/pnsp/pubs/fs09200/fs09200.pdf>, zadnji dostop 27.8.16
- 4 <http://imgur.com/a/pY5cL>, zadnji dostop 27.8.16
- 5 C.R.M. Alavanja: Pesticides Use and Exposure Extensive Worldwide. *Reviews on Environmental Health*, 2009, 24 (4), 303–309
- 6 D. Arnab, R. Bose, K. Ajeet, M. Subho: Targeted Delivery of Pesticides Using Biodegradable Polymeric Nanoparticles. Springer, New York, 2014, strani 5 – 6
- 7 Toxipedia: <http://www.toxipedia.org/display/toxipedia/Pesticide+Use+Statistics>, zadnji dostop 19.7.16
- 8 European Commission, Facts and Figures on Organic Agriculture in the European Union, 2013
- 9 W. Aktar, D. Sengupta, A. Chowdhury: Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisciplinary Toxicology*, 2009, 2, 1-12
- 10 World Health Organisation: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs387/en/>, zadnji dostop 19.7.16
- 11 WHO: Global Insecticide Use for Vector – Borne Disease Control: a 10 – Year Assessment (2000 – 2009), 5th edition, 2011
- 12 IDRC Digital Library: <https://idl-bnc.idrc.ca/dspace/bitstream/10625/18585/1/IDL-18585.pdf>, zadnji dostop 19.7.16
- 13 A. Brouwer, M.P. Longnecker, L.S. Birnbaum, J. Coglianò, P. Kostyniak, S. Schantz, G. Winneke: Characterization of Potential Endocrine-Related Health Effects at Low-Dose Levels of Exposure to PCBs. *Environmental Health Perspectives*, 1999, 107 (4), 639 – 649
- 14 S.K. Gupta, J.P. Jani, H.N. Saiyed, S.K. Kashyap: Health Hazards in Pesticide Formulators Exposed to a Combination of Pesticides. *The Indian Journal of Medical Research*, 1984, 79, 666 – 672
- 15 WHO: Public Health Impact of Pesticides Used in Agriculture. World Health Organisation, Geneva, Switzerland, 1990
- 16 Researchgate: https://www.researchgate.net/publication/303539805_Ecological_Demographic_and_Economic_Impact_of_Agent_Orange_on_Vietnam_-Oindrila_Ghosh, zadnji dostop 19.7.16
- 17 European Food Safety Authority: The 2013 European Union Safety Report on Pesticide Residues in Food. *EFSA Journal*, vol. 13, issue 3, 2015
- 18 M. Al-Wabel, M.H. El-Saeid, A.H. El-Naggar, et al: Spatial Distribution of Pesticide Residues in the Groundwater of a Condensed Agricultural Area. *Arabian Journal of Geosciences*, 2016, 9 (2), 120 – 130

- 19 S. Hussain, T. Siddique, M. Saleem, Safraz Hussain, M. Arshad, A. Khalid: Chapter 5: Impact of Pesticides on Soil Microbial Diversity, Enzymes, and Biochemical Reactions. *Advances in Agronomy*, 2009, 102, 159-200
- 20 Pravilnik o pravilni rabi fitofarmaceutskih sredstev, 2014, Uradni list RS, št. 83/12, stran 7814
- 21 Uprava RS za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin: http://www.uvhvvr.gov.si/si/zakonodaja_in_dokumenti/fitofarmaceutska_sredstva/evropska_zakonodaja/direktiva_2009128es/, zadnji dostop 19.8.16
- 22 New South Wales Environmental Protection Agency: <http://www.epa.nsw.gov.au/pesticides/pestmisuse.htm>, zadnji dostop 19.8.16
- 23 The Malay Mail Online: <http://www.themalaymailonline.com/malaysia/article/banned-pesticides-found-in-cameron-highlands-water>, zadnji dostop 19.8.16
- 24 European Commission: DG Health and Food Safety: Ad – hoc Study on the Trade of Illegal and Counterfeit Pesticides in the EU. European Commission, Brussels, 2015
- 25 E. Thruman, I. Ferrer, A. Fernandez – Alba, O. Malato: Feasibility of LC/TOFMS and Elemental Database Searching As a Spectral Library for Pesticides in Food. *Food Additives and Contaminants*, 2006, 23(11), 1169 - 1178
- 26 European Commission: http://ec.europa.eu/food/animals/live_animals/bees/pesticides/index_en.htm, zadnji dostop 15.8.16
- 27 V. Turusov, V. Rakitsky, L. Tomatis: Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT): Ubiquity, Persistence, and Risks. *Environmental Health Prospects*, 2002, 110 (2), 125 - 128
- 28 Slovensko zdravniško društvo – Sekcija za klinično toksikologijo in Univerzitetni klinični center Ljubljana – Center za klinično toksikologijo in farmakologijo (uredil Miran Brvar): 4. srečanje o kemijski varnosti – Izpostavljenost pesticidom pri delu in doma (zbornik prispevkov). Narodna in univerzitetna knjižnica Ljubljana, Ljubljana, 2015, str. 18-27
- 29 NATRUE, verzija 3.4, 2016, strani 5 - 6
- 30 <https://cosmos-standard.org/>, zadnji dostop 24.7.16
- 31 COSMOS – standard, verzija 2.0, Cosmetic organic and natural standard, 2013, strani 6 in 18
- 32 WHO: Alachlor in drinking water. Guidelines for drinking water quality, vol. 2, Health criteria and other supporting information, World Health Organisation, Geneva, Switzerland, 1996
- 33 European commission: <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticidesdatabase/public/?event=activesubstance.detail&language=EN&selectedID=923>, zadnji dostop 23.7.2016
- 34 Ramesh C. Gupta: *Veterinary Toxicology Basic and Clinical Principles*. Elsevier, New York, 2007, 514 – 519
- 35 PubChem: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/amitraz>, zadnji dostop 19.5.16
- 36 EPA: R.E.D. FACTS: Amitraz. United States Environmental Protection Agency, 1996, strani 2 – 5
- 37 EMA: Amitraz (Bees) Summary Report. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, 1999

- 38 European commission: <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.detail&language=EN&selectedID=950>, zadnji dostop 13.8.16
- 39 Australian Government: <http://apvma.gov.au/node/12371>, zadnji dostop 15.8.16
- 40 PubChem: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/atrazine>, zadnji dostop 15.5.16
- 41 WHO: Atrazine in drinking water. Guidelines for drinking water quality, vol. 2, Health criteria and other supporting information, World Health Organisation, Geneva, Switzerland, 1996
- 42 U.S. Department of Health and Human Services Public Health Service Agency for Toxic Substances and Disease Registry: ToxGuide™ for Atrazine. ATSDR, Atlanta, 2003
- 43 Center for Biological Diversity, Nathan Donley: http://www.biologicaldiversity.org/news/press_releases/2016/atrazine-05-03-2016.html, zadnji dostop 22.7.2016
- 44 J. Bethsass, A. Colangelo: European Union Bans Atrazine, While the United States Negotiates Continued Use. International Journal of Occupational and Environmental Health, 2006, 12(3), 260-267
- 45 European commission: <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.detail&language=EN&selectedID=972>, zadnji dostop 14.8.16
- 46 PubChem: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Carbendazim>, zadnji dostop 14.8.16
- 47 Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority, Australia: Human Health Risk Assessment of Carbendazim. Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority, Canberra, 2008, strani 8 - 10
- 48 SinoHarvest: <http://www.sinoharvest.com/products/b-Carbendazim.shtml>, zadnji dostop 15.8.16
- 49 Victoria State Government: <http://agriculture.vic.gov.au/agriculture/farm-management/chemical-use/publications/carbendazim-use-on-pome-fruit-banned>, zadnji dostop 15.8.16
- 50 Food Standards Australia New Zealand: <http://www.foodstandards.gov.au/consumer/generalissues/Pages/Carbendazim.aspx>, zadnji dostop 15.8.16
- 51 US Food and Drug Administration: <http://www.fda.gov/Food/FoodborneIllnessContaminants/Pesticides/ucm288048.htm>, zadnji dostop 20.7.16
- 52 European commission: <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.detail&language=EN&selectedID=1080>, zadnji dostop 14.8.16
- 53 European Food Safety Authority: Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance carbendazim, vol.8, issue 5, 2010, strani 5 -12
- 54 PubChem: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/chlorpyrifos>, zadnji dostop 22.5.16
- 55 US Environmental Protection Agency: <https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/chlorpyrifos>, zadnji dostop 20.7.16
- 56 European commission: <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticidesdatabase/public/?event=activesubstance.detail&language=EN&selectedID=1130>, zadnji dostop 14.8.16

- 57 PubChem: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/diazinon>, zadnji dostop 14.8.16
- 58 Toxipedia: <http://www.toxipedia.org/display/toxipedia/Diazinon>, zadnji dostop 14.8.16
- 59 European commission: <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticidesdatabase/public/?event=activesubstance.detail&language=EN&selectedID=1208>, zadnji dostop 14.8.16
- 60 PubChem: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/diuron>, zadnji dostop 22.5.16
- 61 Oregon State University and Intertox, Inc.: Diuron – Roadside Vegetation Management Herbicide Fact Sheet. Washington State Department of Transportation, 2006
- 62 California Department of Pesticide Regulation: <http://www.cdpr.ca.gov/docs/emon/pubs/fatememo/diuron.pdf>, zadnji dostop 14.8.16
- 63 European commission: <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.detail&language=EN&selectedID=1271>, zadnji dostop 14.8.16
- 64 PubChem: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5216>, zadnji dostop 22.5.16
- 65 Nufarm: http://www.nufarm.com/assets/21104/1/SIMAZINE900_DF_label.pdf, zadnji dostop 14.8.16
- 66 WHO: Simazine in drinking water. Guidelines for drinking water quality, vol. 2, Health criteria and other supporting information, World Health Organisation, Geneva, Switzerland, 1996
- 67 European commission: <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.detail&language=EN&selecthttp://www.epa.nsw.gov.au/pesticides/pestmisuse.htmID=1853>, zadnji dostop 14.8.16
- 68 Toxipedia: <http://www.toxipedia.org/display/toxipedia/MCPA>, zadnji dostop 14.8.16
- 69 WHO: MCPA in drinking water. Guidelines for drinking water quality, vol. 2, Health criteria and other supporting information, World Health Organisation, Geneva, Switzerland, 1996
- 70 European commission: <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.detail&language=EN&selectedID=1535>, zadnji dostop 14.8.16
- 71 PubChem: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/mecoprop>, zadnji dostop 22.5.16
- 72 Toxipedia: <http://www.toxipedia.org/display/toxipedia/Mecoprop-p>, zadnji dostop 14.8.16
- 73 European commission: <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.detail&language=EN&selectedID=1538>, zadnji dostop 14.8.16
- 74 PubChem: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6758>, zadnji dostop 22.5.16
- 75 H. Mehlhorn (Ed.): Encyclopedic Reference of Parasitology – Diseases – Treatment – Therapy. 2. izdaja, Springer – Verlag, Berlin; Heidelberg, 2001, str. 204
- 76 European commission: <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.detail&language=EN&selectedID=1838>, zadnji dostop 14.8.16
- 77 European chemicals agency: <http://echa.europa.eu/documents/10162/6b6662e2-b3a6-41d7-a50c-a061b7dddc79>, zadnji dostop 14.8.16
- 78 PubChem: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Terbuthylazine>, zadnji dostop 21.5.16

- 79 WHO: Terbutylazine in drinking water. Guidelines for drinking water quality, dodatek k vol. 2, Health criteria and other supporting information, World Health Organisation, Geneva, Switzerland, 1998
- 80 European commission: <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.detail&language=EN&selectedID=1925>, zadnji dostop 14.8.16
- 81 L. Pareja, A.R. Fernández-Alba, V. Cesio, H. Heinzen: Analytical Methods for Pesticide Residues in Rice. Trends in Analytical Chemistry, 2011, 30(2), 270 - 291
- 82 G. Chen, P. Cao, R. Liu: A multi – residue Method for Fast Determination of Pesticides in Tea by Ultra Performance Liquid Chromatography – Electrospray Tandem Mass Spectrometry Combined With Modified QuEChERS Sample Preparation Procedure. Food chemistry, 2011, 125, 1406 – 1411
- 83 X. Qin, Y. Xu, Y. Sn, L. Zhao, L. Wang, Y. Sun, X. Llang: Determination od Carbendazim and Diethofencarb in Cotton and Soil by High – Performance Liquid Chromatography. Analytical Letters, 2016, 49(10), 1631 – 1639
- 84 T.D. Nguyen, E.M. Han, M.S. Seo, S.R. Kim, M.Y. Yun, D.M. Lee, G.H. Lee: A Multi – residue Method for Determination of 203 Pesticides in Rice Paddies Using Gas Chromatography/Mass Spectrometry. Analytica Chimica Acta, 2008, 619, 67 – 74
- 85 L. Li, Y. Xu, C. Pan, Z. Zhou, S. Jiang, F. Liu: Simplified Pesticide Multiresidue Analysis of Soybean Oil by Low Temperature Cleanup and Dispersive Solid – Phase Extraction Coupled With Gas Chromatography/Mass Spectrometry. Journal of AOAC International, 2007, 90(5), 1387 – 1394
- 86 Food and Drug Administration: Guidance for Industry – Bioanalytical Method Validation, 2001 (<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidance/ucm070107.pdf>, zadnji dostop 25.8.16)
- 87 A. Ccancapa, A. Masiá, A. Navarro – Ortega, Y. Picó: Pesticides in Ebro River Basin: Occurrence and Risk Assessment. Environmental Pollution, 2016, 211, 414 – 424
- 88 S. Balakrishnan, K. Takeda, H. Sakugawa: Occurrence of Diuron and Irgarol in Seawater, Sediments and Planktons of Seto Inland Sea, Japan. Geochemical Journal, 2012, 46, 169 – 177
- 89 I.K. Konstantinou, D.G. Hela, T.A. Albanis: The Status of Pesticide Pollution in Surface Waters (Rivers and Lakes) of Greece, Part 1- Review on Occurrence and Levels. Environmental Pollution, 2006, 141, 555 – 570
- 90 R. Loss, G. Locoro, S. Comero, S. Contini, D. Schweisiq, F. Werres, P. Balsaa, O. Gans, S. Weiss, L. Blaha, M. Bolchi, B.M. Gawlik: Pan – European Survey on the Occurrence of Selected Polar Organic Persistent Pollutants in Ground Water. Water Research, 2010, 44, 4115 – 4126
- 91 Wiley Online Library: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2011.2324/epdf>, zadnji dostop 23.8.16