



ПЛОВДИВСКИ УНИВЕРСИТЕТ
„ПАИСИЙ ХИЛЕНДАРСКИ“
ХИМИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА АНАЛИТИЧНА ХИМИЯ И КОМПЮТЪРНА ХИМИЯ

АСЯ ДИМИТРОВА ХРИСТОЗОВА

РАЗВИВАНЕ ВЪЗМОЖНОСТИТЕ
НА ГАЗОВАТА ХРОМАТОГРАФИЯ С МАССПЕКТРОМЕТРИЧНА ДЕТЕКЦИЯ
ЧРЕЗ КОМБИНИРАНЕ СЪС „ЗЕЛЕНИ“ ПОДХОДИ ЗА
ЕКСТРАКЦИЯ И МОДЕЛИРАНЕ

АВТОРЕФЕРАТ

НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА ОБРАЗОВАТЕЛНАТА И НАУЧНА СТЕПЕН
„ДОКТОР“

Област на висше образование:

4. Природни науки, математика и информатика

Професионално направление: 4.2. Химически науки

Докторска програма: Аналитична химия

Научен ръководител:

доц. д-р Кирил Костов Симитчиев

гр. Пловдив
2025 г.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на заседание на катедрен съвет на катедра „Аналитична химия и компютърна химия“ на Химическия факултет при Пловдивския университет „Паисий Хилендарски“ проведено на 30.05.2025 г.

Дисертационният труд съдържа 165 страници (формат А4), в които са включени 25 фигури, 38 таблици и 4 приложения (съдържащи 1таблица и 8 фигури). Цитирани са 306 източника.

Материалите по защитата са на разположение на интересувашите се в отдел „Развитие на академичния състав и докторантури“ към ПУ „Паисий Хилендарски“, Националния център за информация и документация към Министерството на образованието, младежта и науката и в Централната библиотека на ПУ „Паисий Хилендарски“.

Научно жури:

Проф. д-р Албена Кирилова Дечева-Чакъррова, БАН, Институт по обща и неорганична химия, Област на ВО: 4. Природни науки, математика и информатика; ПН 4.2. Химически науки;

Проф. д-р Стефан Леонидов Цаковски, Софийски университет „Св. Климент Охридски“, Област на ВО: 4. Природни науки, математика и информатика; ПН 4.2. Химически науки;

Доц. д-р Ления-Незавет Де Брито Гонсалвеш, Университет "Проф. д-р Асен Златаров" – Бургас, Област на ВО: 4. Природни науки, математика и информатика; ПН 4.2. Химически науки;

Доц. д-р Виолета Миленкова Стефанова, Пловдивски Университет "Паисий Хилендарски" (пенсионер), Област на ВО: 4. Природни науки, математика и информатика; ПН 4.2. Химически науки;

Доц. д-р Жана Юлиянова Петкова, Пловдивски Университет "Паисий Хилендарски", Област на ВО: 4. Природни науки, математика и информатика; ПН 4.2. Химически науки.

Използвани съкращения и означения

CCD	Централен композиционен план/дизайн
CPE	Екстракция при температура на коагулация
DLLME	Дисперсивна течно-течна микро екстракция
ER	Аналитичен добив
EF	Фактор на обогатяване
Full scan	Сканиране в зададен масов диапазон
GC-MS	Газова хроматография с масспектрометрия
GC-MS/MS	Газова хроматография с tandem-масспектрометрия
LRI	Линеен индекс на задържане
NADES-DLLME	Дисперсивна течно-течна микро екстракция базирана на дълбоко-евтектичен разтворител на природна основа
MLR	Множествена линейна регресия
MNT:DA	Ментол : деканова киселина
MW-CPE	Микровълново подпомогната Екстракция при температура на коагулация
RI	Индекс на задържане
RMSE	Средноквадратична грешка
RTIC	Реконструирани хроматограми на общ йонен ток
SD	Стандартно отклонение
SIM	Мониторинг на единичен/избран йон
SRM	Мониторинг на избрани фрагментирани йони в масспектрометрията
USABE	Ултразвуково подпомогната ре-екстракция
VABE	Вортекс подпомогната ре-екстракция
VIF	Фактор на инфлация на дисперсията
R ²	Коефициент на детерминираност
q ² F1, q ² F2	Коефициенти на предсказваща способност

I. УВОД

Газовата хроматография с масспектрометрична детекция (GC/MS) е най-често използваната аналитична техника за идентифициране и количествено определяне на летливи и полуетливи органични вещества в сложни матрици. Тя представлява комбинация от газов хроматограф и масспектрометър, при която след изпаряване на пробата в инжектора на GC и разделяне на компонентите на сместа, в темпирана колона, освен информация за времената на задържане, може да се получи и качествена спектрална информация за всеки компонент чрез масспектрометърът. Тази информация може да се използва както за качествена структурна идентификация на изследваните компоненти, така и за количествен анализ ¹.

Едни от класовете проби, имащи сравнително сложен състав и подлежащи на анализ чрез газова хроматография, са етеричните масла. Те представляват смес от производни на терпени или фенилпропани, характеризиращи се с подобни мас-спектри. Правилното идентифициране на такива съединения е много сложно, а понякога и невъзможно. За да се повиши надеждността на аналитичните резултати за оценка на състава на компонентите на етеричните масла, може да се използва комбинация от критерии и различни подходи за идентификация, включително методи за разделяне и концентриране, сравнение със спектри от бази данни и изчисляване на индекси на задържане (RI) ^{2,3}. Във всички случаи, обаче, експерименталното определяне на индекси на задържане, които следва да се съпоставят с наличните референтни стойности, е дълъг, сложен и бавен процес. Поради тази причина и в съгласие с принципите на „зелената“ химия много усилия са насочени към разработване на математични модели за прогнозиране на RI в GC-MS, с цел да се улесни и намали времето по процеса на идентификация ^{4,5}.

Газова хроматография в комбинация с масспектрометрия рутинно се използва за анализ на пестициди в хранителни проби и обекти от околната среда. Слабият контрол и широката употребата на пестициди в миналото доведе до негативни последици върху замърсяването на околната среда и опасност за човешкото здраве. Някои пестициди са устойчиви на разграждане в природата за дълъг период от време като имат способността да се натрупват в почви и седименти, да се биоакмулират и притежават потенциала да носят вреда в продължение на години. Такива пестициди са класифицирани от Стокхолмската конвенция през 2001 година, като Устойчиви Органични Замърсители (УОЗ) ⁶. През 2001 година бе прието международно споразумение за ограничаване или премахване на производството и употребата на УОЗ като първоначално бе съставен черен списък, включващ 12 забранени за употреба УОЗ, през 2009 г. към списъка са добавени 9 съединения, а през 2011 г. техният брой достигна 22 съединения.

Органохлорните пестициди са един от често използваните видове УОЗ в миналото, които са забранени или ограничени за употреба поради тяхната устойчивост и невротоксичност ⁷. Поради по-слабата им устойчивост, в сравнение с органохлорните пестициди, едни от най-широко използваните пестициди в световен мащаб са органофосфорните пестициди ⁸. С цел да се постигне устойчива употреба на пестициди, чрез намаляване на рисковете и въздействията върху човешкото здраве и околната среда, в Европейския Съюз е Въведената Директива 2009/128/ЕС, а в България през 2012 г. е подготвен Национален план за действие за намаляване на рисковете и въздействията от употребата на пестициди.

II. ЦЕЛИ И НАУЧНО ИЗСЛЕДОВАТЕЛСКИ ЗАДАЧИ

Целта на настоящата дисертация бе да се изследват възможностите на GC-MS/MS за комбиниране със „зелени“ подходи за качествен и количествен анализ.

Поставени бяха следните задачи за провеждане на **качествен анализ** на летливи компоненти в етерични масла:

Задача 1: Да се оптимизират работните условия на газхроматографска система с тандемна масспектрометрична регистрация (GC-MS/MS) за идентификация на летливи компоненти в розово, лавандулово и ментово етерично масло както при инжектиране на течни проби, така и след предварителна подготовка чрез твърдофазна микроекстракция в газова фаза над пробния разтвор (HS-SPME);

Задача 2: Да бъдат изчислени линейни индекси на задържане на идентифицираните съединения, използвайки получените експериментални данни, и да се състави списък от молекулните им дескриптори;

Задача 3: Да се разработи и валидира алгоритъм на множествена линейна регресия за прогнозиране на линейни индекси на задържане за газхроматографски анализ на летливи компоненти от етерични масла за неполярна стационарна фаза.

Поставени бяха следните задачи за провеждане на **количествен анализ** на пестициди:

Задача 1: Да се проучи възможността за комбиниране на екстракцията при температура на коагулация (CPE) с GC-MS/MS;

Задача 2: Да се проучи възможността за комбиниране на дисперсивната точно-течна микроекстракция (DLLME), базирана на природни дълбоко-евтектични разтворители (NADES), с GC-MS/MS;

Задача 3: Да се оцени селективността на масспектрометричната регистрация при определяне на целевите аналити в режим Full Scan и SRM;

Задача 4: Да се изследват неспектралните матрични ефекти от използваните екстрагенти (повърхностно-активното вещество и NADES) върху GC-MS/MS системата;

Задача 5: Да се оцени екологичната целесъобразност на разработените методи за анализ чрез количествени метрики;

Задача 6: Разработените методи да се приложат за анализ на органохлорни и органофосфорни пестициди във водни и хранителни проби.

III. Експериментална част

III.1. Апаратура и инструментални условия

III.1.1. Газов хроматограф с тандемен масспектрометър GC-MS/MS

В хода на изследванията бе използван газов хроматограф с масспектрометър TSQ 9000 (Thermo Scientific, USA) с йонизационен източник EI (70 eV), оборудван с троен квадрупол мас-филтър, температурно-програмируем инжектор (PTV) и аутосамплер AI1300, снабден със стъклена спринцовка от 10 µl. При всички проведени GC-MS/MS анализи бе използван Хелий (99.999%) като газ-носител и Аргон (99.996%) като колизионен газ. Системата се управлява от софтуер Excalibur 4.1. Изследванията бяха извършени с помощта на стъклен лайнер (PTV Liner with Three Baffles, 1 mm ID, 2.75 mm OD, 120 mm Length, Thermo Fisher Scientific, USA) или метален лайнер (PTV Siltek Metal Liner, 2 mm ID, 2.75 mm OD, 120 mm Length, Thermo Fisher Scientific, USA). За хроматографското разделяне бе използвана колона TG SQC MS (15 m x 0.25 mm x 0.25 µm, Thermo Fisher Scientific, USA). Температурата на трансферна линия бе 250 °C, а на EI 230 °C.

При анализа на етерични масла, чрез инжектиране на течни проби и твърдофазна микроекстракция в газова фаза над пробния разтвор, бяха използвани скорост на подвижна фаза 1.0 mL min⁻¹, инжекционен обем 1 µl, съотношение на разделяне 10:1, температура на PTV инжектора 280 °C и температурна програма на колонна пещ както следва: 40°C за 2 min, 1°C min⁻¹ до 200°C и 30°C min⁻¹ до 280°C за 3 min. Използван бе режим на сканиране в зададен масов обхват (Full scan): 35-500 amu, dwell time 0.2 sec.

Анализът на пестициди чрез MW-CPE-GC-MS/MS и NADES-based-DLLME-GC-MS/MS е извършен при следните работни условия: скорост на подвижна фаза 1.2 mL min⁻¹, инжекционен обем 1 µl, съотношение на разделяне 5:1 (MW-CPE-GC-MS/MS) и 50:1 (NADES-based-DLLME-GC-MS/MS), PTV

градиент от 65 °C при 14.5 °C sec⁻¹ до 260 °C и температурна програма на колонна пещ както следва: 120°C за 1 min, 40°C min⁻¹ до 155°C, 4°C min⁻¹ до 187°C, 1°C min⁻¹ до 194°C и 12°C min⁻¹ до 260°C, задържана за 5 min. Използван бе режим Full scan: 20-700 amu при MW-CPE-GC-MS/MS и 45-500 amu при NADES-based-DLLME-GC-MS/MS. Времето за елуиране на разтворителя бе 5 min, а за анализ 28 min. За всеки пестицид в режим SRM бяха избрани един преход за количествено определяне (Quant transition) и един качествен преход (Qual transition) със съответните колизионни енергии.

III.1.2. Газов хроматограф с маспектрометър GC-MS

Като алтернативна инструментална техника за анализа на пестициди бе използван газов хроматограф с маспектрометър GC-MS Shimadzu 2010 SE, оборудван с единичен квадруполен мас-филтър, EI йонизационен източник при 70 eV и инжектор, позволяващ работа под високо налягане (PSS). Инжектирането се извършваше с помощта на аутосамплер L-PAL3 GC (LECO), снабден със стъклена спринцовка от 10 µl. Хелий (99,999%) бе използван като газ-носител. Системата бе управлявана от софтуер LabSolution. Изследванията бяха извършени с помощта на стъклен лайнер (Glass GC Liner, 5 mm OD, 3.4 mm ID, 95 mm Length, Trajan SGE, Australia). За хроматографското разделяне бе използвана колона TG-5MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm дебелина на филма, Thermo Fisher Scientific, USA). Температурата на трансферна линия бе 250 °C, а на EI 220 °C. Скоростта на подвижната фаза бе 0.9 mL min⁻¹; инжекционния обем 2 µl; съотношението на разделяне 5:1 при PSS 56.9 kPa и 280 °C. Температурната програма на колонна пещ бе както следва: 80°C за 2 min, 8°C min⁻¹ до 280°C и 50°C min⁻¹ до 350°C. Времето за елуиране на разтворителя бе 5 min, а общото време за анализ 28.4 min. В режим SIM за всеки пестицид бяха мониторирани по 3 характеристични йона.

III.1.3. Друга апаратура

Спектрофотометър ONDA UV 30 Scan (Giorgio-Bormac, Italy) бе използван при изследване на разтворимостта на Triton X-100 и Triton X-114 в органични разтворители. UV-VIS спектрите бяха заснети в спектралния диапазон от 200 – 400 nm, при 2 nm стъпка на сканиране.

Микровълнова система MDS-81D (CEM corp.) с максимална мощност 600 W бе използвана като алтернативен източник за внасяне на енергия, спрямо конвенционалното загряване на термична плоча, при провеждане на CPE. Загряването се извърши при максимална мощност за 4 min, последвано от 6 цикъла на нагряване за по 5 min, между които се провеждат паузи от по 1 min.

III.2. Предварителни процедури за подготовка на проби

III.2.1. Етерични масла

При изследванията на летливи съединения в етерични масла, чрез газова хроматография с маспектрометрия, бяха анализирани следните проби: Розово масло (*Rosa damascena*) (България); Лавандулово масло (*Lavandula angustifolia*) (България); Ментово масло (*Mentha piperita* L.) (България). Пробите бяха анализирани трикратно след подходящо разреждане в дихлорометан (лавандулово масло DF=100, розово масло DF=200 и масло от мента DF=400). GC-MS/MS измерванията бяха проведени съгласно условията в раздел III.1.1. За провеждане на твърдофазната микроекстракция над пробния ратвор (HS-SPME), бе използвано влакно от карбоксен (CAR)/полидиметилсилоксан (PDMS) с дебелина на покритието 85 µm (Supelco, Bellefonte, PA, USA). На дъното на стъклен флакон от 10 mL бе поставено парче филтърна хартия с размери: 0,5 cm x 0,5 cm, върху което бе отпипетиран микролитров обем от анализираното етерично масло (5 µl ментово масло, 10 µl лавандулово масло или розово масло), като флаконът беше затварян с алуминиева капачка с политетрафлуоретиленова (PTFE) запушалка. Всички изследвания бяха извършени при условия на стайна температура 24 ± 2°C и без разбъркване. Флаконите бяха оставяни за определеното време за кондициониране както следва: розово масло и лавандулово масло 45 min; масло от мента - 30 min. След посоченото време SPME влакното бе въвеждано в газовото пространство на флакона за време на сорбция от 10 min за

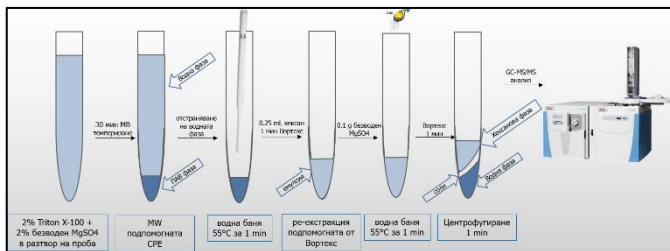
лавандулово масло, 5 min за розово и ментово масло, след което бе въвеждано в GC за десорбция в продължение на 3 min.

III.2.2. Органохлорни и органофосфорни пестициди във водни и хранителни проби

Като аналити бяха избрани представители на органохлорни и органофосфорни пестициди: Pentachlorobenzene, Hexachlorobenzene, alpha-HCH, beta-HCH, gamma-HCH, Chlorpyrifos, Chlorpyrifos-methyl, Aldrin, Endrin, Dieldrin, alpha-Endosulfan, Heptachlor, Heptachlor-endo-epoxide-A, o,p-DDD, p,p-DDD, o,p-DDE, p,p-DDE, o,p-DDT и p,p-DDT (GC-MS/MS) и Dichlorvos, Ethoprophos, Disulfoton, Methyl-Parathion, Fenchlorphos и Prothefos (GC-MS). Част от целевите пестициди бяха изследвани в бутилирани плодови сокове от лимон и червена ябълка, прилагайки екстракция при температура на коагулация в комбинация с ре-екстракция в органичен разтворител (MW-CPE-GC-MS/MS). Също така съдържанието на пестициди бе определено в три търговски марки бутилирана изворна вода, с различни физикохимични характеристики (pH 7.6-9.42 и електропроводимост $62-263 \mu S \text{ cm}^{-1}$), използвайки дисперсивна течно-течна микроекстракция базирана на хидрофобен NADES.

III.2.2.1. Процедура за микровълново подпомогната екстракция при температура на коагулация в комбинация с ре-екстракция в органичен разтворител за анализ на пестициди в бутилирани плодови сокове.

Разработена бе следната процедура (фигура 1): В 12 mL стъклена епруветка се отпипетират 8 mL от ябълков сок или 2 mL лимонов сок разреден с 6 mL вода. Към пробите се прибавят 2 mL 10% m m⁻¹ воден разтвор на Triton X-100 (към разрежения лимонов сок се добавя и 0.2 g MgSO₄). Екстракционните системи се поставят във водна баня и се загряват в микровълнова система (раздел III.1.3.) над температурата на коагулация в продължение на 30 min (алтернативно темперирането може да се извърши на термична плоча) до образуването на две фази: ПАВ-обогатена фаза (долен слой) и водна фаза (горен слой). Епруветките престояват на стайна температура 24°C ± 2°C до охлаждане (~ 10 min) и се поставят в хладилник (30 min) за повишаване на вискозитета на ПАВ-обогатената фаза. Супернатантата се отстранява с Пастър пипета. ПАВ фазата се поставя за 1 min на водна баня при 55°C за понижаване на вискозитета, след което се прибавят 0.25 mL хексан и се реализира ре-екстракция чрез вортекс за 1 min. Към получената емулсия се добавя 0.1 g MgSO₄, темперира се на водна баня за 1 min при температура 55°C, след което се агитира чрез вортекс за 1 min. Пробите се центрофугират в продължение на 1 min при 900 xg, след което аликвотен обем от супернатантата (хексанова фаза) се отпипетира за анализ.



Фигура 1: Оптимизирана процедура MW-CPE-GC-MS/MS за анализ на пестициди.

III.2.2.2. Процедура за дисперсивна течно-течна микро екстракция базирана на хидрофобен природен дълбоко-евтектичен разтворител за анализ на пестициди в бутилирани изворни води.

Разработена бе следната процедура (Фигура 2): Приготвя се хидрофобен дълбоко-евтектичен разтворител от компоненти с природен произход (NADES) чрез смесване на 31.26 g DL-ментол (2 mol) и 17.23 g деканова киселина (1 mol). Сместа се загрява при 60 °C под аргонова атмосфера и се разбърква, чрез магнитна бъркалка при 500 rpm, до образуване на бистра и хомогенна течност (около

30 min). В 12 mL стъклена епруветка се прехвърлят 10 mL от анализираната водна проба от изворна вода, след което се прибавят 45 μ L екстрагент NADES и се провежда вортекс агитация в продължение на 3 min. Пробите се центрофугират при 900 xg в продължение на 5 min за разделяне на органичната и водна фази. 1 μ L от NADES екстракта (горна фаза) се отпипетира с помощта на микро спринцовка и се инжектира в GC-MS/MS без допълнително разреждане.



Фигура 2: Оптимизирана процедура NADES-based-DLME-GC-MS/MS за анализ на пестициди.

IV. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

IV.1. Създаване на QSRR модел за прогнозиране на линейни индекси на задържане

Целта на настоящото изследване бе да създадем „зелен“ подход за предсказване на линейни индекси на задържане на летливи съединения в етерични масла (за неполярна стационарна фаза) чрез разработване на регресионен модел, който да е бърз и лесен за приложение. Използвахме две различни техники за анализ на етеричните масла, а именно i) чрез инжектиране на течни проби след разреждане с органичен разтворител и ii) чрез HS-SPME.

IV.1.1. Анализ на течни проби и изчисляване на линейни индекси на задържане (LRI)

Етеричните масла анализирахме чрез GC-MS/MS, след подходящо разреждане ($n=3$), както е описано в III.1.1. При идентифициране на съединенията използвахме спектралната библиотеката на NIST Mass Spectral (NIST MS Search 2.3) и следните критерии на приемане – интервал на съпадение от ± 20 единици за RI и стойности на Match и RMatch фактори > 800 . Идентифицирахме 49 компонента в маслото от лавандула, 51 съединения в розово масло и 32 съединения в маслото от мента, от които избрахме 103 уникални съединения за създаване на собствена база от данни.

При идентични инструментални условия (раздел III.1.1.) инжектирахме стандартен разтвор на n -алкани C8-C20 ($n=3$). Експериментално получените времена на задържане (t_R) на 103-те идентифицирани съединения от пробите ($n=3$) и t_R на n -алканите от стандартния разтвор C8-C20 ($n=3$) използвахме за изчисляване на стойностите на LRI, съгласно уравнението на van Den Dool и Kratz (ур. 1):

$$LRI = 100 \left[n + \frac{t_x - t_n}{t_{n+1} - t_n} \right] \quad (\text{ур. 1}).$$

IV.1.2. Множествена линейна регресия за прогнозиране на линейни индекси на задържане.

Приложихме алгоритъм на множествена линейна регресия (MLR) (SPSS, IBM, USA (пробна версия)), за да установим статистически значима количествена връзка между определени физико-химични свойства на молекулите - молекулни дескриптори (независими променливи – x) и хроматографския параметър на задържане LRI (зависима променлива y) за създаване на математичен модел (QSRR - Quantitative Structure Retention Relationship).

IV.1.2.1. Избор на значими независими променливи (дескриптори)

Създадохме база данни, съдържаща 2325 молекулни дескриптора (1D, 2D и PubChem Fingerprint) за всяко едно от идентифицираните 103 съединения, използвайки софтуерния продукт с отворен код PaDEL Descriptor 2.21 и SMILES нотациите на съединенията. За първоначален подбор на значимите и независими молекулни дескриптори приложихме стъпкова множествена линейна регресия (Stepwise),

прилагайки критерий за 95% статистическа сигурност. Установихме, че само 16 молекулни дескриптора, показват линейна зависимост ($R^2 = 0,9960$, Adj. $R^2 = 0,9951$) при моделиране на линейните индекси на задържане: MLFER_L, MLFER_S, ATSC5c, ATSC5i, n3HeteroRing, n4Ring, n11Ring, GATS3c, PubChem Fingerprint: PubchemFP143, 147, 553, 582, 639, 672, 688 и TIC3. За доказване липсата на колинеарност на дадена променлива, приложихме фактора на инфлация на дисперсията VIF, като от получените стойности на VIF 1.08-11.37, които бяха по-малки от 15, заключихме, че не се установява значителна колинеарност между изброените променливи. Важно е да се подчертае, че броят на значимите и независими променливи бе относително малък – само 16 молекулни дескриптора, което бе обнадеждаващо с оглед разработването на регресионен модел с ограничен брой включени променливи.

IV.1.2.2. Разработване и валидиране на MLR модел

За създаването и валидирането на регресионен модел с избраните дескриптори, множеството от 103 съединения разделихме на случаен принцип на набор за обучение - 85% от съединенията ($n=87$) и набор за валидиране - останалите 15% от съединенията ($n=16$). Към набора за обучение приложихме Stepwise алгоритъм на множествена линейна регресия. Коефициентите на разработения регресионен модел и тяхната статистическа оценка са представени съответно в Таблица 1.

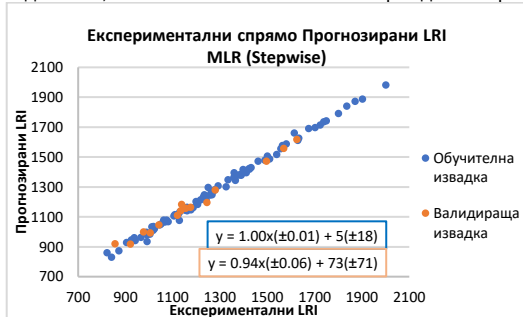
Таблица 1: Коефициенти на регресионен модел и тяхната статистическа оценка, получена чрез стъпкова регресия Stepwise (обучителен набор, $n=87$).

Дескриптор	Коефициент	SD	p-стойност	VIF
Отрез	226	19	<0.001	
MLFER_L	179	3	<0.001	3.73
MLFER_S	126	12	<0.001	2.27
PubchemFP639	-276	29	<0.001	2.21
ATSC5c	-205	67	0.003	1.60
PubchemFP672	52	9	<0.001	1.61
PubchemFP582	-53	12	<0.001	1.10
n4Ring	-58	9	<0.001	1.29
n3HeteroRing	101	21	<0.001	2.41
GATS3c	-40	8	<0.001	1.28
PubchemFP147	-58	20	0.006	1.10
ATSC5i	0.004	0.001	<0.001	5.06
PubchemFP143	-29	7	<0.001	1.53
PubchemFP688	-19	5	0.01	1.45
n11Ring	-70	20	0.001	1.09

Установихме, че създаването на регресионен модел чрез стъпкова регресия (Stepwise), използвайки данни само за обучителния набор от съединения води до намаляване на значимите променливи в уравнението от 16 на 14, поради изключването на дескрипторите PubChemFP 553 и TIC3 ($p\text{-value} > 0.05$). Колинеарността между молекулните дескриптори оценихме чрез изчисляване на съответните фактори на инфлация на дисперсията. Тъй като във всички случаи те заемаха стойности по-малки от 15, заключихме че не се наблюдава колинеарност. Дефинирахме обхват на прогнозиране на LRI от 833 до 1993. За оценка на адекватността на регресионния модел изчислихме: $R^2 = 0.9958$, Adj. $R^2 = 0.9949$ и RMSE = 17. Получените близки до единица стойности на R^2 и Adj. R^2 , както и изчислената ниска стойност на RMSE, ни дадоха основание да считаме, че разработения регресионен модел е адекватен.

Създаденият математичен модел приложихме към набора за валидиране (16 съединения) и оценихме прогнозиращата способност чрез изчисляване на $RMSE_{val} = 26$ и $q^2_{F1} = 0.9886$. Вземайки предвид получените приемливо ниски стойности на $RMSE_{val}$, в комбинация със стойности на q^2_{F1}

близки до единица, с което разработения MLR модел за коректен при прогнозиране на LRI на съединения, които не са използвани за изграждане на регресионната функция.



Този факт потвърдихме допълнително чрез анализ на праволинейните графики, представящи зависимостта между експериментално определените (наблюдавани) спрямо прогнозираните линейни индекси на задържане (Фигура 3). Установихме, че полученият наклон е статистически идентичен на единица, а отрязъкът практически е равен на нула, както за обучителната извадка, така и за валидиращия набор от съединения.

Фигура 3: Диаграма на разпределението на наблюдаваните спрямо прогнозираните стойности на зависимата променлива LRI, използвайки стълкова регресия (неопределеността на наклона и отреза е представена като 95% доверителен интервал).

IV.1.2.3. Тестване на модел за прогнозиране на LRI с външна извадка

Като следваща стъпка решихме да тестваме валидирания MLR модел чрез набор от съединения, външен за модела. Анализирахме етеричните масла, ползвайки експериментално установените оптимални условия за провеждане на HS-SPME (раздел III.2.1.), в резултат на което идентифицирахме общо 19 допълнителни съединения, поради по-ниските методологични граници на откриване при този подход на анализ. За тези 19 съединения определихме стойностите на молекулните дескриптори, ползвайки PaDEL Descriptor 2.21. Като тестов набор избрахме само 12 от 19-те идентифицирани съединения, тъй като молекулните им дескриптори попадаха в обхвата от стойности на дескрипторите, определен от обучителната извадка. Към тестовия набор приложихме моделното уравнение за прогнозиране на LRI (yp. 2), използвайки стойностите на молекулните им дескриптори.

$$LRI_{predicted} = 226 + (179 \times MLFER_L) + (126 \times MLFER_S) + (-276 \times PubchemFP639) + (-205 \times ATSC5c) + (52 \times PubchemFP672) + (-53 \times PubchemFP582) + (-58 \times n4Ring) + (101 \times n3HeteroRing) + (-40 \times GATS3c) + (-58 \times PubchemFP147) + (0.004 \times ATSSi) + (-29 \times PubchemFP143) + (-19 \times PubchemFP688) + (-70 \times n11Ring) \quad (yp. 2)$$

От получените разлики между експериментално определените и прогнозираните стойности на LRI установихме, че за 8 от съединенията отклоненията бяха в рамките на ± 20 от експериментално определените LRI, докато само за 4 от съединенията бяха извън този обхват. Допълнително оценихме прогнозиращата способност на модела, на етап тестване, чрез изчисляване на следните метрики: RMSE = 40, $q^2_{F2} = 0.9521$. Получената стойност на RMSE за тестовия набор от съединения бе по-голяма спрямо тази определена на етап валидиране, но остава сравнително ниска и може да бъде определена като приемлива. Въпреки, че се използва сравнително опростен линеен регресионен модел, включващ само 14 молекулни дескриптора, изчислената стойност за q^2_{F2} бе близка до 1, което е индикация за адекватността на предложения регресионен модел.

IV.2. Методи за количествено определяне на пестициди

За реализиране на втората поставена цел относно разработване на „зелени“ методи за количествен GC-MS анализ на пестициди, насочихме нашите усилия както към замяна или минимизиране на използваните количества от органични разтворители, така и към съкращаване на времето за предварителна подготовка на пробите. Вземайки предвид посочените фактори решихме да проучим приложението на два подхода за предварително разделяне и концентриране, а именно екстракция при температура на коагулация (CPE) и дисперсивна точно-течна микроекстракция DLLME. Имайки предвид, че екстракционните процедури ще бъдат комбинирани с GC-MS/MS, първата стъпка

в нашето изследване бе да разработим хроматографски метод за разделяне на целевите аналити и да дефинираме параметрите на MS/MS детекторната система.

IV.2.1. Оптимизиране на инструменталните условия за анализ на органохлорни и органофосфорни пестициди чрез GC-MS/MS

За оптимизиране на хроматографските условия, при разработване на GC-MS/MS метод за анализ, избрахме представители на органохлорни и органофосфорни пестициди, част от които са класифицирани като устойчиви органични замърсители (III.2.2.) Като режим на сканиране на масспектрометъра избрахме мониториране на избрана реакция (SRM), тъй като този подход позволява постигането на високо съотношение S/N. За всеки аналит избрахме по два прехода от литературни данни, един за качествена идентификация (Qual transition) и един, необходим за количествено определяне (Quant transition). Оптимизирахме параметрите на температурно-програмируемият PTV инжектор, целейки да създадем температурна градиентна програма, която да позволи бързо и последователно изпаряване на аналитите, след което поетапно варирахме стъпките на повишаване на температурата на колонната пещ за получаване на адекватно хроматографско разделяне и възможно най-кратко време за анализ. След оптимизиране на температурните програми на инжектора и колонната пещ оценихме влиянието на потока на газа носител върху хроматографското разделяне. Варирахме обемната скорост на газа носител при стойности 1.0, 1.2 и 1.4 mL min⁻¹. Установихме, че промяната на обемната скорост не оказва съществено влияние върху времената на задържане на аналитите и общото време за хроматографиране. Групирахме SRM преходите на пестицидите в различни времеви диапазони за сканиране, вземайки предвид времената на задържане на пестицидите, ширината на хроматографските пикове и използваното време за сканиране. Проведената оптимизация ни позволи да предложим инструменталните условия посочени в раздел III.1.1.

IV.2.2. Микровълново-подпомогната екстракция при температура на коагулация в комбинация с ре-екстракция в органичен разтворител

В настоящото изследване проучихме възможността за адаптиране на CPE към анализът на пестициди чрез GC-MS или GC-MS/MS.

IV.2.2.1. Избор на повърхностно активно вещество за предварително концентриране при провеждане на CPE и органичен разтворител за ре-екстракция

Поради очаквания негативен ефект на повърхностно-активните вещества върху газхроматографската система взехме решение да проведем ре-екстракция на целевите аналити в малък обем органичен разтворител, съвместим с GC системата. Сметохме, че би било подходящо да подберем ПАВ (за провеждане на CPE) и органичен разтворител (за ре-екстракция), които притежават нисък афинитет един към друг, в следствие на което, в крайната фаза, която ще се инжектира в GC да се съдържа възможно най-ниско количество от ПАВ.

В нашето изследване оценихме разтворимостта на най-често използваните повърхностно активни вещества за провеждане на екстракция при температура на коагулация (Triton X-100 и Triton X-114) в органични разтворители - хексан, изооктан, циклохексан и етилацетат. Приготвихме 2% (m m⁻¹) моделни водни разтвори на Triton X-100 и Triton X-114 с обем 10 mL, в стъклени епруветки. Разтворите поставихме на водна баня до достигане на температура (90 °C) над температурата на коагулация на Triton X-100 (64 °C) и Triton X-114 (23 °C), след което темперирахме за 30 min на термична плоча до образуването на две фази: ПАВ-обогатена фаза (долен слой) и водна фаза (горен слой). Охладохме епруветките на стайна температура 24°C ± 2°C за ~10 min, след което ги поставихме в хладилник (4 °C) за 30 min до повишаване на вискозитета на ПАВ-обогатената фаза и отстранихме супернатантата с Пастър пипета. Към ПАВ-обогатената фаза (~1mL) добавихме 2 mL вода за понижаване на вискозитета и получаване на псевдо-хомогенен разтвор, след което прибавихме 2 mL органичен разтворител (един от хексан, изооктан, циклохексан или етил ацетат) за ре-екстракция. Ре-

екстракцията извършихме с помощта на агитация чрез вортекс в продължение на 10 min, центрофугирахме за 15 min при 900 xg и поставихме екстракционните системи във фризер -22 °C за 12 часа, за да се улесни разделянето на двете фази. Аликвотен обем от горната органична фаза бе разреден (DF=12.5) и подложен на UV-VIS анализ при условията посочени в раздел III.1.3. Чрез стандартни разтвори на ПАВ (Triton X-114 или Triton X-100) с концентрация 0,025 и 0,05% установихме, че максималната абсорбция във водна среда и на двете повърхностно-активни вещества е при λ_{max} =276 nm. Поради това количественият анализ на ко-екстрахираните Triton X-100 или Triton X-114 в изследваните разтворители извършихме, чрез измервания на абсорбцията при 276 nm, спрямо съответните органични разтворители като празна проба.

От получените резултати установихме, че съдържанието на ко-екстрахирания Triton X-100, във всеки органичен разтворител, е значително по-ниско от съответната концентрация на Triton X-114. Междувременно, нивото на Triton X-100 в хексан и изооктан е статистически идентично и най-ниско спрямо съдържанието в другите органични разтворители $0.09\% \text{ m m}^{-1}$. Поради тази причина избрахме да използваме комбинацията от Triton X-100 и хексан или изооктан за следващите проучвания на екстракцията при температура на коагулация с последваща ре-екстракция в органичен разтворител.

IV.2.2.2 Изследване толерантността на GC - MS/MS спрямо разтвори, съдържащи Triton X-100

Проведохме поетапни изследвания, за да оценим съвместимостта на инструменталната техника с Triton X-100 като матричен компонент и ефектите, които то оказва върху хроматографската система.

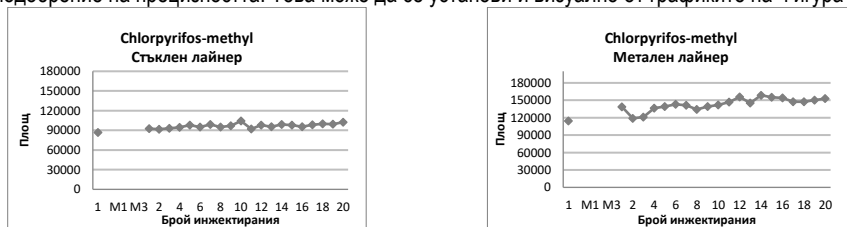
Като първа стъпка оценихме селективността на GC-MS/MS метода, като инжектираме разтворител хексан и празна проба от имитирана матрица (0.09% Triton X-100 в хексан) в режим на сканиране в зададен масов обхват от 20-700 amu (точка III.1.1.). При сравняване на хроматограмите на общия йонен ток (TIC), установихме, че двете хроматограми са идентични и при инжектиране на празната проба не се установяват пикове, дължащи се на Triton X-100, при използваните хроматографски условия. Следователно може да се допусне, че i) поради използваната температурна програма на PTV инжектора Triton X-100 остава в лайнера или ii) количеството на повърхностно активното вещество, преминаващо през хроматографската колона, е твърде ниско поради използваното разделяне на потока при инжектиране.

Проведохме допълнително изследване на селективността в SRM режим (раздел III.1.1.) като анализирахме разтвор на имитирана матрица и празна проба с добавка от $100 \mu\text{g L}^{-1}$ на целевите аналити. При сравняването на реконструирания хроматограми на общия йонен ток (RTIC) на двете проби установихме, че за всеки от преходите на целевите аналити не се наблюдават изобарни пречения, причинени от Triton X-100. Този факт показва, че дори да се приеме, че известно количество от повърхностно активното вещество навлиза в GC колоната, то не оказва влияние върху селективността на измерванията в режим SRM. Трябва да се отбележи, че както beta-HCH и gamma-HCH, така и p,p-DDD и o,p-DDT са само частично хроматографски разделени, тъй като имат много близки времена на задържане, освен това SRM преходите им са идентични. Поради тези причини beta-HCH и gamma-HCH, и съответно p,p-DDD и o,p-DDT са анализирани като сума от техните сигнали.

За първи път, в настоящото проучване, изследвахме стабилността на GC-MS/MS системата при инжектиране на крайната органична фаза, без допълнително пречистване на ко-екстрахирания Triton X-100. Изследването проведохме в SRM режим (раздел III.1.1.), с помощта на стъклен лайнер и алтернативно с използване на метален лайнер, като кондиционирахме GC системата чрез предварително инжектиране на 3 реплики от празната проба (имитирана матрица), последвано от 20 последователни инжекции на разтвор съдържащ $100 \mu\text{g L}^{-1}$ пестициди в имитирана матрица. От анализа на получените времена на задържане (t_R) и техните стандартни отклонения ($t_R \text{ SD}$) установихме, че се наблюдават повторяеми времена на задържане (всички стандартни отклонения ($t_R \text{ SD}$) са по-малки от 0.01 min). Последното може да се обясни с предположението, че повърхностно

активното вещество не преминава или само незначително количество от него преминава към GC колоната, чиято стационарна фаза остава с непроменени свойства.

По отношение на прецизността на регистрираните сигнали установихме, че при употребата на стъклен лайнер, повечето от изчислените RSD% бяха под 2.5%, като най-високата стойност бе 5%. Когато бе използван метален лайнер, стойностите на RSD% бяха по-високи (6 – 9%), но когато изчислим RSD% само на реплики с последователност от 11 до 20, наблюдаваме значително подобрение на прецизността. Това може да се установи и визуално от графиките на Фигура 5.



Фигура 5: Сигнали на Chlorpyrifos-methyl при последователни инжектирания на стандартен разтвор в имитирана матрица (n=20), използвайки стъклен или метален лайнер.

Може да се обобщи, че при последователно инжектиране на проби, съдържащи 0.09% Triton X-100 в хексан, внесеното количество от повърхностно активното вещество се вентилира по време на инжектиране чрез разделянето на потока и/или се задържа върху вътрешната повърхност на лайнера. Установихме, че инжектирането на 3 реплики от празна проба са достатъчни за кондициониране на GC системата при използването на стъклен лайнер, докато при метален лайнер, за постигане на задоволителна прецизност е необходимо да се извършат по-голям брой инжектирания. Това няма да бъде нужно в случай когато продължително време се анализират разтвори, съдържащи Triton X-100.

IV.2.2.3. Изследване на неспектралния матричен ефект от Triton X-100 при GC-MS/MS и GC-MS

Доколкото ни е известно, нито едно предишно проучване не е изследвало неспектралните матрични ефекти при GC-MS или GC-MS/MS анализ, причинени от Triton X-100 като ко-екстрахирано съединение след CPE. За да изследваме влиянието на Triton X-100 върху инструменталната чувствителност при GC-MS/MS анализ сравнихме наклоните на калибрационните прави, получени чрез трикратно измерване на серии от по 5 стандартни разтвора (с концентрации до $15 \mu\text{g L}^{-1}$), приготвени в чист хексан, както и в среда от имитирана матрица, съгласно ур. 3. Калибрационното уравнение бе изведено по метода на претеглена регресия, като за тегловен фактор използвахме $1/c^2$, където „c“ е концентрацията на съответния стандарт. Измерванията извършихме чрез алтернативно използване на стъклен и метален лайнер.

$$\text{Матричен фактор (slope ratio)} = \frac{\text{Площ или Наклон (матрица)}}{\text{Площ или Наклон (разтворител)}} \quad (\text{yp. 3})$$

От получените резултати за съотношенията на наклоните, представени в Таблица 2, установихме, че постигнатата чувствителност за повечето от целевите аналити, използвайки стъклен лайнер, е статистически идентична и в двете изследвани среди – чист хексан и имитирана матрица. За някои съединения (Chlorpyrifos, Endrin, p,p-DDE, o,p-DDD, p,p-DDD и o,p-DDT, p,p-DDT) наблюдавахме слабо повишаване (~10%) на регистрирана чувствителност, а само за Dieldrin установихме 10% намаление в съотношението на наклоните. При употребата на метален лайнер за всички целеви аналити установихме различни резултати, наклоните на калибрационните прави се увеличават в диапазона 1.26 – 2.30 пъти в среда на имитирана матрица, в сравнение с разтворите в чист хексан (Таблица 2). Предположихме, че наблюдаваното увеличение на сигналите на аналитите, в присъствието на Triton X-100, се дължи на процеси, локализирани в лайнера. Вероятно на етапа на изпаряване в инжектора,

Triton X-100 се отлага върху вътрешната повърхност на лайнера, намалява термичния стрес и оказва пасивиращ ефект, докато целевите аналити преминават през лайнера на GC. Действието като „протектор“ на аналитите се засилва особено когато през металния лайнер преминават полярни аналити и такива с относително високи температури на кипене.

Таблица 2: Сравнение на наклоните на калибрационните криви, получени чрез претеглена регресия, в имитирана матрица и в хексан, измерени чрез GC-MS/MS с помощта на стъклен или метален лайнер.

Аналит	Стъклен лайнер	Метален лайнер
	Отношение на наклоните $\pm$ комбинирана неопределеност^a	Отношение на наклоните $\pm$ комбинирана неопределеност^a
Pentachlorobenzene	0.97 $\pm$ 0.02	1.27 $\pm$ 0.07
alpha-HCH	0.96 $\pm$ 0.01	1.26 $\pm$ 0.06
Hexachlorobenzene	0.96 $\pm$ 0.03	1.43 $\pm$ 0.08
beta и gamma-HCH	0.95 $\pm$ 0.01	1.31 $\pm$ 0.07
Chlorpyrifos methyl	1.02 $\pm$ 0.06	2.03 $\pm$ 0.13
Heptachlor	1.03 $\pm$ 0.02	1.66 $\pm$ 0.14
Aldrin	0.96 $\pm$ 0.02	1.61 $\pm$ 0.11
Chlorpyrifos	1.12 $\pm$ 0.02	2.11 $\pm$ 0.15
Heptachlor-endo-epoxide A	0.97 $\pm$ 0.02	1.65 $\pm$ 0.16
o,p-DDE	0.98 $\pm$ 0.02	1.67 $\pm$ 0.11
alpha-Endosulfan	0.99 $\pm$ 0.02	1.64 $\pm$ 0.12
Dieldrin	0.90 $\pm$ 0.04	1.78 $\pm$ 0.13
p,p-DDE	1.14 $\pm$ 0.04	1.86 $\pm$ 0.12
o,p-DDD	1.14 $\pm$ 0.03	1.92 $\pm$ 0.14
Endrin	1.08 $\pm$ 0.03	1.95 $\pm$ 0.31
p,p-DDD и o,p-DDT	1.12 $\pm$ 0.04	2.30 $\pm$ 0.17
p,p-DDT	1.10 $\pm$ 0.03	1.64 $\pm$ 0.21

^aКомбинираната неопределеност беше оценена по закона за пропагиране, използвайки ур. 3.

От Таблицы 3 и 4, обобщаващи постигнатите характеристики при калибрация чрез претеглена регресия за двата вида среда за разтваряне, прави впечатление, че получените стойности за коефициента на детерминираност (R^2) не се влошават в присъствието на 0.09% Triton X-100, което е валидно и за двата използвани лайнера. Представените граници на количествено определяне (LOQs) изчислихме въз основа на критерия 10s, като за стандартно отклонение приехме стойността на стандартното отклонение на отреза на регресионната права.

От Таблица 3 е видно, че характеристиките на GC-MS/MS системата при употреба на стъклен лайнер не се влияят съществено от присъствието на Triton X-100, докато в случая на анализ с метален лайнер (Таблица 4) за една част от аналитите LOQ намаляват в присъствие на ПАВ.

Въпреки значителното повишаване на чувствителността постигнато с метален лайнер, при сравняване на наклоните на калибрационните прави в имитирана матрица прави впечатление, че чувствителността при стъкления лайнер е по-висока. При сравнение на LOQ също е видно, че при употреба на метален лайнер (Таблица 4) за една част от аналитите стойностите в имитирана матрица се влошават, докато за друга остават непроменени. Всичко това ни доведе до заключението, че използването на стъклен лайнер е за предпочитане.

Таблица 3: Аналитични характеристики на GC-MS/MS (стъклен лайнер), получени чрез претеглена регресия при инжектиране на стандарти в хексан и в имитирана матрица.

Аналит	Хексан			Имитирана матрица		
	Наклон (Площ $L \mu g^{-1}$)	R^2	LOQ ($\mu g L^{-1}$)	Наклон (Площ $L \mu g^{-1}$)	R^2	LOQ ($\mu g L^{-1}$)
Pentachlorobenzene	4847	1.00	0.06	4685	1.00	0.15
alpha-HCH	6177	1.00	0.11	5937	1.00	0.19
Hexachlorobenzene	8055	0.99	0.12	7703	1.00	0.17
beta и gamma-HCH	5665	1.00	0.06	5399	1.00	0.10
Chlorpyrifos methyl	1258	0.98	3.09	1288	0.96	0.88
Heptachlor	2707	1.00	0.18	2785	1.00	0.20
Aldrin	1413	1.00	0.27	1354	1.00	0.24
Chlorpyrifos	4340	1.00	0.83	4846	1.00	0.33
Heptachlor-endo-epoxide A	632	0.99	0.31	616	1.00	0.23
o,p-DDE	9260	0.99	0.41	9095	1.00	0.15
alpha-Endosulfan	1269	1.00	0.25	1256	1.00	0.26
Dieldrin	606	0.98	0.68	548	0.99	0.36
p,p-DDE	7620	0.99	0.32	8684	1.00	0.25
o,p-DDD	17928	1.00	0.16	20430	0.99	0.13
Endrin	731	0.99	0.36	788	0.99	0.30
p,p-DDD и o,p-DDT	22054	0.99	0.52	24606	1.00	0.65
p,p-DDT	2924	1.00	0.25	3221	1.00	0.33

Условия: 5-точкова калибрация в обхвата до $15 \mu g L^{-1}$. Всяко калибрационно ниво е инжектирано трикратно.

Таблица 4: Аналитични характеристики на GC-MS/MS (метален лайнер), получени чрез претеглена регресия при инжектиране на стандарти в хексан и в имитирана матрица.

Аналит	Хексан			Имитирана матрица		
	Наклон (Площ $L \mu g^{-1}$)	R^2	LOQ ($\mu g L^{-1}$)	Наклон (Площ $L \mu g^{-1}$)	R^2	LOQ ($\mu g L^{-1}$)
Pentachlorobenzene	2826	0.96	0.26	3578	0.98	0.18
alpha-HCH	3064	0.99	0.64	3857	0.98	0.17
Hexachlorobenzene	4470	0.96	0.28	6385	0.99	0.15
beta и gamma-HCH	5066	0.98	0.18	6615	0.98	0.20
Chlorpyrifos methyl	621	0.95	1.18	1261	0.98	0.68
Heptachlor	1456	0.85	0.35	2414	0.96	0.28
Aldrin	719	0.97	2.82	1154	0.98	0.71
Chlorpyrifos	1826	0.96	1.79	3856	0.98	0.19
Heptachlor-endo-epoxide A	269	0.96	0.77	444	0.97	1.41
o,p-DDE	4391	0.95	0.32	7340	0.99	0.14
alpha-Endosulfan	603	0.94	0.34	991	0.99	0.62
Dieldrin	298	0.98	5.23	529	0.98	5.39
p,p-DDE	3811	0.95	0.31	7098	0.99	0.58
o,p-DDD	7829	0.95	0.66	15035	0.99	0.14
Endrin	422	0.87	9.37	825	0.98	4.08
p,p-DDD и o,p-DDT	8990	0.95	1.99	20635	0.98	0.19
p,p-DDT	1316	0.91	6.82	2156	0.98	0.41

Условия: 5-точкова калибрация в обхвата до $15 \mu g L^{-1}$. Всяко калибрационно ниво е инжектирано трикратно.

Изследвахме преносимостта на положителния матричен ефект чрез сравнително изследване в режим SIM, използвайки GC-MS система (Shimadzu 2010 SE), при инструменталните параметри посочени в раздел III.1.2. За изследванията подбрахме набор от 7 целеви аналита, стъклен лайнер и алтернативен органичен разтворител изооктан. Сравнихме наклоните на калибрационните прави и техните пропагирани стандартни отклонения, получени чрез трикратно измерване на серии от по 5 стандартни разтвора (с концентрации до $1000 \mu\text{g L}^{-1}$), приготвени в чист изооктан, както и в среда от имитирана матрица ($0.09\% \text{ m m}^{-1}$ Triton X-100 в изооктан), съгласно ур. 3. Установихме, че чувствителността се повишава при калибриране с имитирана матрица в диапазона от 1.26 – 1.57 пъти, а аналитичните характеристики на GC-MS системата не се влияят съществено от присъствието на Triton X-100. Получените резултати допълнително доказват, че CPE с Triton X-100 и ре-екстракция в органични разтворители, като хексан или изооктан, може да се комбинира с GC-MS или GC-MS/MS анализ, чрез инжектиране без допълнителна стъпка на пречистване или разреждане. Последното ни мотивира да продължим изследванията си в това направление.

IV.2.2.4. Оптимизация на екстракцията при температура на коагулация в комбинация с ре-екстракция в органичен разтворител

Като следваща стъпка при разработването на нов аналитичен метод, прилагащ CPE за предварително концентриране на оргохлорни и оргофосфорни пестициди, проведохме серия от експерименти за оптимизиране на процедурата. В хода на проучванията използвахме както еднофакторен, така и многофакторен (централно композиционен план – CCD) подход за оптимизация. Вторият начин на работа бе провокиран от принципите на „зелената“ химия, защото ни позволи да намалим броя на експериментите, потреблението на проби, реагенти и енергия.

IV.2.2.4.1 Оптимизиране на стъпката на екстракция

При първоначалните изследвания използвахме термична плоча за внасянето на енергия в екстракционните системи, съгласно процедурата описана в точка IV.2.2.1. Изследвахме влиянието на изходната концентрация на Triton X-100 във водната фаза и влиянието на pH върху ефективността на екстракция на целевите аналити. При провежданата процедура (точка IV.2.2.1.) към ПАВ-обогатената фаза (~1 mL), добавихме 2 mL вода за понижаване на вискозитета и получаване на псевдо-хомогенен разтвор, след което прибавихме 2 mL хексан. Ре-екстракцията извършихме с помощта на вортекс агитация за 10 min. След това екстракционните системи бяха центрофугирани за 15 min при 900 xg и поставени във фризер за разделяне на фазите.

Относно влиянието на изходната концентрация на Triton X-100 върху миграцията на пестицидите в ПАВ-обогатената фаза може да се заключи, че регистрираните сигнали за изследваните аналити стръмно нарастват при увеличение на съдържанието на ПАВ до $1.5\% \text{ m m}^{-1}$. За повечето пестициди следва плавно повишение на генерираните сигнали при увеличение на концентрацията на Triton X-100 до $3\% \text{ m m}^{-1}$. Въпреки това, като компромисно решение избрахме при следващите експерименти да работим с изходна концентрация на Triton X-100 от $2\% (\text{m m}^{-1})$, тъй като получаването на по-обемиста ПАВ-обогатена фаза водеше до затруднения при следващата стъпка на ре-екстракция. Част от хексана бе остатъчно включен под формата на емулсия в ПАВ-обогатената фаза и нито удължаването на времето за центрофугиране (до 30 min), нито увеличаването на центрофужната сила (до 6000 xg) разрушават получената емулсия. Поради тази причина възникна необходимостта получените емулсионни системи да бъдат поставени във фризер при -22°C , в продължение на 12 часа за пълно разделяне на фазите. Установихме, че факторите благоприятстващи получаването на стабилна емулсия са увеличаване на количеството на Triton X-100 в ПАВ-обогатената фаза и намаляването на обема на използвания хексан като ре-екстрагент. Поради желанието ни да повишим „зеления“ характер на разработваната от нас процедура, чрез миниатюризация на обема на използвания органичен разтворител, счехме че използването на изходна концентрация на Triton X-100 над $2\% (\text{m m}^{-1})$ би възпрепятствало постигането на тази цел при следващи експерименти.

Установихме, че за повечето изследвани пестициди вариацията на рН на водната фаза, в диапазона от 3 до 11, не оказва влияние върху ефективността на екстракция. Само за alpha-HCH, beta и gamma-HCH, Chlorpyrifos-methyl и p,p-DDT бе наблюдавано понижение в степента на екстракция при рН над 9, но извлеченото количество на пестицидите в ПАВ-обогатената фаза бе практически идентично в рН диапазона 3 – 9. Следователно, от гледна точка на груповия анализ на всички целеви аналити заключихме, че не е необходимо настройване на рН на средата, когато нативното рН на изследваната проба е по-голямо от 3 и по-малко от 9.

Съгласно уравнение 4 изчислихме постигнатите аналитични добиви, прилагайки процедурата на екстракция при температура на коагулация и ре-екстракция в хексан, описана в точка IV.2.2.1.

$$ER_i \% = \frac{Q_{\text{крайно},i}}{Q_{\text{изходно},i}} \times 100, \quad (\text{ур. 4}),$$

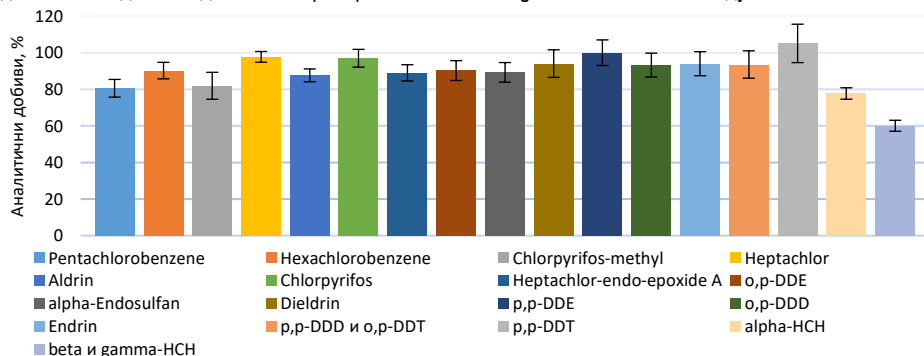
$Q_{\text{изходно},i}$ - количество на i -тия целеви аналит в първоначалния воден разтвор;

$Q_{\text{крайно},i}$ - количество на i -тия аналит, което е преминало в крайната органична фаза.

Може да се заключи, че постигнатите аналитични добиви от 66 до 105%, за всички целеви аналити, са сравнително високи и се характеризират с добра повторваемост 3 - 12% (SD). Въпреки това, като значими недостатъци на използваната процедура могат да се посочат използването на нискоефективен източник за внасяне на енергия в екстракционните системи (термична плоча), продължителното време за провеждане на ре-екстракция (над 12 часа), и сравнително големия обем (2 mL) от хексан, използван за ре-екстракция. Това ни даде основание да проведем следващи експерименти с цел подобрение на посочените характеристики на CPE.

IV.2.2.4.2. Микровълново-подпомогната екстракция при температура на коагулация (MW-CPE).

С цел повишаване на ефективността на преноса на енергия към екстракционните системи, проучихме възможността за замяна на термичната плоча с облъчване чрез микровълново лъчение. Изследвахме влиянието на времето за микровълново инкубиране, чрез еднофакторен експеримент, при времена за микровълново третиране 10, 20 и 30 min, съгласно температурната програма описана в точка III.1.3. След отделянето на ПАВ-обогатената фаза, пристъпихме към ре-екстракция в хексан и последващ анализ чрез GC-MS/MS. От прегледа на данните представени на Фигура 6 установихме, че за по-голяма част от аналитите при време за MW третиране от 20 до 30 min, получените аналитични добиви са над 80%. Единствено при alpha-HCH и beta и gamma-HCH бяха между 60 и 80%.



Фигура 6: Аналитични добиви при време за MW третиране 30 min, придружени със съответните стандартни отклонения (SD (%)).

Условия: CPE – концентрация 2% (m m^{-1}) Triton X-100, изходна концентрация на пестициди $50 \mu\text{g L}^{-1}$; ре-екстракция при добавена 2 mL вода и 2 mL хексан, 10 min агитация на вортекс, 15 min центрофугиране.

Получените аналитични добиви са съпоставими или по-високи, спрямо загряването на термична плоча, но консумацията на енергия бе намалена повече от четирикратно (17 W/проба при MW-CPE спрямо 70 W/проба при конвенционална CPE) и времето за провеждане на процедурата бе значително съкратено, тъй като за загряване на 12 x 80 ml водна баня бяха необходими само 4 min. Поради тази причина в следващите експерименти провеждахме екстракцията при температура на коагулация посредством микровълново нагриване

IV.2.2.4.3. Ефект на изсолване

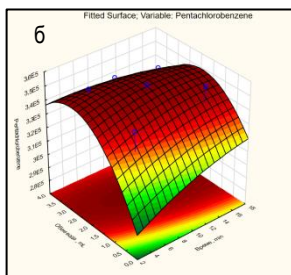
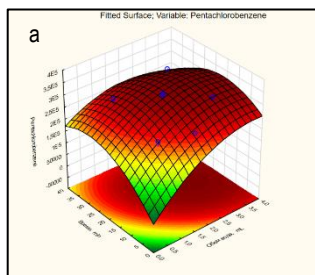
В настоящето изследване проучихме ефекта на добавени соли върху ефективността на CPE, като проведехме процедурата в присъствие на MgSO_4 на нива 1%, 2%, 3%, 4%, 5% или 10% (m v^{-1}). От получените резултати може да се заключи, че за всички аналити сигналите рязко нарастват при увеличение на концентрацията на солта до 2% (m v^{-1}), след което само за някои пестициди се наблюдава много слабо повишение на сигналите, при градиране на съдържанието на MgSO_4 до 5% (m v^{-1}). Гравитационното утаяване на ПАВ-обогатената фаза е силно затруднено при съдържание от 10% MgSO_4 , като на дъното на реакционната епруветка се отделяше фаза с пехтиеста структура и дифузни граници. При следващи експерименти, към екстракционните системи решихме да добавяме MgSO_4 на ниво от 2% (m v^{-1}) поради три причини: i) при по-високи концентрации на MgSO_4 се наблюдаваше дифузна граница между отделената ПАВ-обогатена фаза и водната среда, най-вероятно поради нарастване на плътността на водната среда, ii) не се наблюдаваше или се наблюдаваше сравнително малко нарастване на сигналите на аналитите при работа с концентрации над 2% (m v^{-1}) и iii) за да се намали количеството на използваните реагенти при провеждане на CPE.

IV.2.2.4.4. Оптимизиране на стъпката на ре-екстракция.

Установихме, че изолираната ПАВ-обогатена фаза, получена след гравитационно седиментиране и отпипетиране на водната фаза, все още бе със значителен вискозитет и е трудно течлива, което води до затрудняване на масовия трансфер при стъпката на ре-екстракция. Поради тази причина решихме да тестваме два подхода за намаляване на вискозитета на ПАВ-обогатената фаза: i) разреждане с вода в комбинация с различни подходи за диспергиране на органичния разтворител в ПАВ-обогатената фаза - ултразвуково третиране (USABE) или агитация чрез вортекс (VABE) или ii) загряване на ПАВ-обогатената фаза преди ре-екстракция.

За изследване на ефекта на добавената вода към ПАВ-обогатената фаза, в комбинация с ултразвукова или вортекс агитация, създадохме два централно композиционни плана, използвайки програмния статистически продукт Statistica 14.1.0.8 (TIBCO Statistica, USA), по един за всеки метод за агитация. Варирахме обема на добавената вода и времето за ре-екстракция, като обемът на хексана за ре-екстракция бе фиксиран на 2 mL. При провеждането на CPE, използвахме темпериране на термична плоча като останалите експериментални параметри бяха настроени съгласно посочените в точка III.2.2.1. След извършването на ре-екстракция, 1 μL от органичната фаза анализирахме чрез GC-MS/MS съгласно оптимизираните инструментални условия (точка III.1.1.). При всички изследвани аналити наблюдавахме сходно поведение както при използването на ултразвуково третиране, така и при агитация чрез вортекс, като на Фигура 7 са представени получените резултати за Pentachlorobenzene.

Разреждането на ПАВ-обогатената фаза води до повишаване на ефективността на ре-екстракция и при двата подхода за диспергиране на органичния разтворител, като ефекта става значим при добавянето на поне 1 mL вода. По отношение на необходимото време за диспергиране на органичния разтворител в ПАВ-обогатената фаза може да се заключи, че при USABE са нужни минимум 20 min, докато при VABE това време се съкращава двукратно до 10 min. От гледна точка на съкращаване на времето за екстракция и повишаване на „зеления“ характер на CPE, в следващите експерименти на етапа на ре-екстракция, прилагаме агитация чрез вортекс.



Фигура 7:

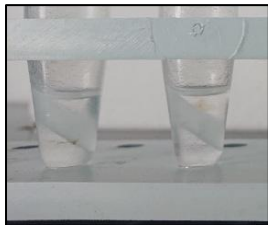
Регистрирани сигнали за *Pentachlorobenzene* в зависимост от количеството добавена вода към ПАВ-обогатената фаза и времето за ре-екстракция чрез а) USABE и б) VABE.

Условия: CPE – 2% (m m^{-1}) Triton X-100, изходна концентрация на пестициди $25 \mu\text{g L}^{-1}$, време за инкубиране 30 min; ре-екстракция при добавен 2 mL хексан, 15 min центрофугиране.

Въпреки благоприятния ефект на добавената вода върху ефективността на масов трансфер, все още бе необходимо продължително охлаждане (~12 часа) във фризер за физическото разделяне на хексана от ПАВ-обогатената фаза. Следователно, желанието ни да минимизираме обема на органичния разтворител би затруднило допълнително разделянето на фазите след ре-екстракция. Поради тази причина решихме да проучим възможността за понижаване на вискозитета на ПАВ-обогатената фаза чрез друг подход, без да е необходимо нейното разреждане, а именно чрез загряване. Температурата на загряване съобразихме, така че да не превишава температурата на коагулация на Triton X-100, като в същото време да бъде възможно най-висока. Установихме, че темперирането от 1 min при 55°C , непосредствено преди внасянето на хексан, води до понижаване на вискозитета на ПАВ-обогатената фаза, в резултат на което получените резултати бяха съпоставими с тези при разреждане на ПАВ-обогатената фаза с 2 mL вода. Допълнително, в следствие на понижения вискозитет на ПАВ-обогатената фаза, постигнахме редуциране на времето за ре-екстракция чрез вортекс до 1 min. При следващи експерименти, при стъпката на ре-екстракция, ПАВ-обогатената фаза бе темперирана за 1 min при 55°C и подложена на ре-екстракция с 2 mL хексан, чрез вортекс за 1 min.

IV.2.2.4.5. Редуциране на обема на органичния разтворител при ре-екстракция.

Поддържайки се към принципите на „зелената“ аналитична химия, проучихме възможностите за минимизиране на обема на използвания органичен разтворител при стъпката на ре-екстракция. За реализиране на тази цел проведохме еднофакторен експеримент, при който варирахме обема на използвания хексан на нива 0.25 mL, 0.5 mL, 1.0 mL и 2.0 mL. Установихме, че въпреки понижения вискозитет на ПАВ-обогатената фаза, при обеми по-малки от 1.0 mL се образува стабилен емулсия, която може да се разруши само при продължително охлаждане във фризер (над 12 часа). Това ни мотивира да потърсим алтернативен подход за разрушаване на емулсията. За тази цел проучихме влиянието на ефекта на изсолване при добавяне на 0.05 g, 0.1 g, 0.2 g безводен MgSO_4 , като за да подпомогнем миграцията на MgSO_4 в емулгираната екстракционна система, отново приложихме темпериране за 1 min при 55°C , последвано от 1 min агитация чрез вортекс. След това екстракционните системи центрофугирахме при 900 xg в продължение на 1 min. От проведените експерименти установихме, че внасянето на 0.1 g от солта води до формирането на ясно обособена горна фаза от хексан, дори когато обема на органичния разтворител е само 0.25 mL (Фигура 8). Вероятна причина за това бе, че внасянето на излишък от твърда сол (MgSO_4) към емулгираната екстракционна система води до получаване на наситен разтвор на солта в ПАВ-обогатената фаза, в следствие на което полярността на включената в нея вода се повишава. Може да се предположи, че от термодинамична гледна точка, това води до тенденция към окупняване и агрегация на диспергираните микро капки от хексан в самостоятелно обособена фаза.



Образуването на междинен слой, от твърд неразтворен MgSO_4 (Фигура 8), улесни допълнително отпипетирането на аликвотен обем от хексановата фаза за последващ анализ. Важно е да отбележим, че в следствие на проведената оптимизация, стъпката на охлаждане на пробите във фризер не бе необходима.

Фигура 8: ПАВ обогатена фаза от моделни водни разтвори на 2% (m mL^{-1}) Triton X-100, с прибавен 0.1 g MgSO_4 и 0.25 mL хексан за ре-екстракция: след темпериране при 55°C за 1 min, вортекс за 1 min и центрофугиране на пробите.

За да оценим повторяемостта на процедурата, разработихме моделни разтвори съгласно оптимизираните параметри на екстракция и ре-екстракция, използвайки паралелно 0.5 mL и 0.25 mL хексан за ре-екстракция. От резултатите за аналитичните добиви, представени в Таблица 5, може да се види, че при използване на 0.25 mL хексан постигнатите аналитични добиви намаляват и значително се влошава тяхната повторяемост в сравнение с тези при употребата на 0.5 mL хексан. За 0.5 mL хексан повечето определени относителни стандартни отклонения попадаха в интервала 2–5%, докато съответните стойности за 0.25 mL хексан бяха в интервала 9 – 14%. Въпреки двукратно по-високия фактор на концентриране при използването на 0.25 mL хексан, методичните граници на количествено определяне не намаляват с фактор две, поради постигнатите по-ниски аналитични добиви. В случая когато анализираните концентрации са ниски (напр. близки до или под границите на определяне), въпреки влошената прецизност, е по-удачно да се работи с по-висок фактор на концентриране поради шансът да се подобрят детекционните възможности на метода. Предвид очакваните сравнително ниски концентрации на пестициди, в повечето анализирани проби (напр. води, храни, напитки и т.н.), препоръчваме на етапа на ре-екстракция да се използва 0.25 mL хексан.

Таблица 5: Аналитични характеристики на разработения MW-CPE-GC-MS/MS метод.

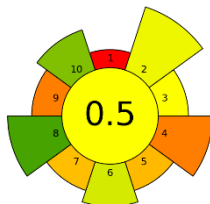
Аналит	0.5 mL хексан			0.25 mL хексан		
	ER (%)	RSD (%)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	ER (%)	RSD (%)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Pentachlorobenzene	87	9	0.009	81	9	0.005
alpha-HCH	56	4	0.017	41	8	0.012
Hexachlorobenzene	92	5	0.009	82	13	0.005
beta-HCH и gamma-HCH	46	2	0.011	38	7	0.007
Chlorpyrifos-methyl	66	2	0.067	47	11	0.047
Heptachlor	89	2	0.011	74	14	0.007
Aldrin	94	2	0.013	83	14	0.007
Chlorpyrifos	86	2	0.019	67	13	0.012
Heptachlor-endo-epoxide A	66	5	0.018	47	10	0.012
o,p-DDE	81	3	0.009	64	13	0.006
alpha-Endosulfan	83	2	0.016	66	13	0.010
Dieldrin	74	3	0.024	52	12	0.017
p,p-DDE	92	2	0.014	74	14	0.008
o,p-DDD	59	5	0.011	40	10	0.008
Endrin	78	6	0.019	58	12	0.013
p,p-DDD и o,p-DDT	62	4	0.052	42	11	0.039
p,p-DDT	80	4	0.021	62	13	0.013

Условия: CPE - концентрация на пестициди $10 \mu\text{g L}^{-1}$, 2% (m mL^{-1}) Triton X - 100, 2% (m mL^{-1}) MgSO_4 във водната фаза, микровълново инкубиране за 30 min; ре-екстракция чрез 10 min Vortex и добавяне на 0.1g MgSO_4 , ($n=3$).

Съкращаването на времето за ре-екстракция (до 5 min) и възможността за намаляване на обема на ре-екстрагента до 0.25 mL бяха последните стъпки от изпълнението на целта за създаване на процедура за предварителна подготовка на проби базирана на екстракция при температура на коагулация. Постигнатите аналитични добиви при тези условия са съответно в интервалите 46 – 94% (за 0.5 mL хексан) и 38-83 (за 0.25 mL хексан) (Таблица 5).

IV.2.2.5. Оценка на „зеления“ характер на MW-CPE-GC-MS/MS метода – AGREEprep

Оценихме „зеления“ характер на разработения метод чрез софтуера AGREE prep, като на Фигура 9 е представена пиктограма на разпределение по съответните критерии за оценка



Легенда:

1. Място на подготовка на пробата;
2. Опасни материали;
3. Устойчивост, възобновяемост и повторна употреба на материали;
4. Отпадък ;
5. Икономия на пробата;
6. Анализирани проби за единица време;
7. Автоматизация;
8. Консумация на енергия;
9. Инструментална техника;
10. Безопасност на оператора.

Фигура 9: Оценка на „зеления“ характер на MW-CPE-GC-MS/MS метода чрез AGREEprep.

Заключихме, че получената оценка от 0.50 предполага, че методът има умерено въздействие върху околната среда, като основни фактори, оказващи негативно влияние върху изчислената метрика са необходимостта от разработване на пробата в лабораторията, обемът на генерираният краен отпадък (включва се и обема на изходната проба) и използваната техника за анализ.

IV.2.2.6. Анализ на хранителни проби чрез разработения MW-CPE-GC-MS/MS метод

Максимално допустимите граници (MRL) за остатъци от пестициди и/или разпадните им продукти в храни от растителен или животински произход са определени в Регламент (ЕО) № 396/2005. За пестициди, които не са изрично упоменати в нормативните документи е приложима MRL от 0.01 mg kg⁻¹ ⁹. Постигането на достатъчно ниски методични граници на определяне, за всички изследвани пестициди (Таблица 5), бе фактор, който ни позволи да приложим разработеният MW-CPE-GC-MS/MS метод за анализ на плодови сокове. В настоящата работа изследвахме концентриран лимонен сок със съдържание на пулпа и пастьоризиран сок от червена ябълка със съдържание на пигменти.

IV.2.2.6.1. Анализ на лимонен сок (концентрат)

Лимоновият сок (концентрат) бе с високото съдържание на пулпа (парченца плод/везикули от ендокарпа на плода). Проведохме екстракцията при температура на коагулация (точка III.2.2.1) при различни фактори на разреждане (DF= 1.25; 1.67; 2.5 и 5), а при стъпката на ре-екстракция използвахме 0.25 mL хексан. Установихме, че при анализа на лимонен сок с DF= 1.25 не се наблюдава формиране на ПАВ обогатена фаза, вероятно поради високата плътност на водната фаза, докато при работа с по-високи фактори на разреждане се наблюдаваше седиментиране на ПАВ-обогатена фаза. Тъй като съдържанието на пестициди в анализирания сок бе под границата на количествено определяне, точността на метода оценихме чрез метода добавено-намерено. Към всяка проба добавихме целевите аналити при концентрация 10 µg L⁻¹. Най-високи аналитични добиви получихме при разреждане на концентрирания лимонен сок с DF = 5, като техните стойности, изчислени чрез калибрационни стандарти в имитирана матрица, бяха в диапазона 72-114% (Таблица 6).

Таблица 6: Аналитични добиви на добавка от 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ пестициди към лимонov сок ($DF=5$), получени чрез комбинацията MW-CPE-GC-MS/MS ($n=3$).

Аналит	ER (%)	RSD (%)	Методични LOQ	MRL ^a ($\mu\text{g L}^{-1}$)
			($\mu\text{g L}^{-1}$)	
Pentachlorobenzene	114	5	0.025	10
alpha-HCH	72	11	0.060	10
Hexachlorobenzene	91	15	0.025	10
beta и gamma-HCH	62	10	0.035	по 10
Chlorpyrifos-methyl	74	14	0.235	10
Heptachlor	76	22	0.035	10 (сума в цитруси)
Aldrin	78	22	0.035	10 (сума Aldrin и Dieldrin)
Chlorpyrifos	88	14	0.060	10
Heptachlor-endo-epoxide A	65	12	0.060	Виж Heptachlor
o,p-DDE	77	16	0.030	Виж p,p-DDT
alpha-Endosulfan	87	13	0.050	50 (сума в цитруси)
Dieldrin	78	15	0.085	Виж Aldrin
p,p-DDE	87	20	0.040	Виж p,p-DDT
o,p-DDD	76	26	0.040	Виж p,p-DDT
Endrin	86	17	0.065	10
p,p-DDD и o,p-DDT	78	26	0.195	Виж p,p-DDT
p,p-DDT	95	26	0.065	Сума 50

^a Максимално допустими концентрации (MRL) на пестицидите ⁹

Прави впечатление, че за повечето от аналитите постигнатите аналитични добиви са статистически идентични на тези, получени за моделни разтвори (Таблица 5). При други пестициди като Pentachlorobenzene, alpha-HCH, beta и gamma-HCH и Chlorpyrifos-methyl се забелязва повишение на аналитичните добиви, когато се екстрахират от матрицата на лимонovия сок. За една част от целевите аналити (Pentachlorobenzene, Hexachlorobenzene, Chlorpyrifos, p,p-DDE, Endrin и p,p-DDT) аналитичните добиви имаха стойности близки до 100%. По-ниски добиви от 70% получихме само за beta и gamma-HCH и Heptachlor-endo-epoxide A, но концентрацията на тези пестициди може лесно да бъде изчислена в реални проби чрез използване на корекционен фактор за частична степен на екстракция. Това ни дава основания да заключим, че предложеният MW-CPE-GC-MS/MS метод може да се прилага за контрол на пестициди в лимонov сок.

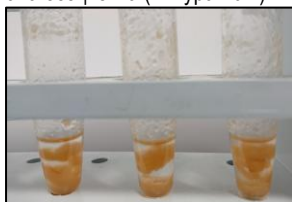
IV.2.2.6.2. Анализ на сок от червена ябълка

За да оценим възможностите на разработения метод за анализ на проби, съдържащи пигменти, избрахме сок от червена ябълка. За да изследваме влиянието на матрицата подготвихме разредени проби от сок при фактори на разреждане $DF=1.25, 1.67, 2.5$ и 5 , използвайки вода като разтворител. Анализирахме пробите чрез процедурата на MW-CPE-GC-MS/MS (точка III.2.2.1), като използвахме 0.25 mL хексан за ре-екстракция. При анализът на проби с $DF=1.67, 2.5$ и 5 получихме съпоставими резултати за аналитичните добиви, докато при $DF=1.25$ не наблюдавахме формиране на ПАВ обогатена фаза. Вероятна причина за това бе повишената плътност на водната фаза. За да проверим предположението ни, проведохме CPE без да добавяме $2\% \text{ MgSO}_4 (\text{m v}^{-1})$. Установихме, че при тези условия формирането на ПАВ-обогатена фаза не бе възпрепятствано (Фигура 10 а), като получените резултати за аналитичните добиви бяха съпоставими с тези при по-разредените проби и статистически идентични с тези получени за моделни разтвори (Таблица 5). Допълнително установихме, че разработеният от нас метод комбинира стъпка на предварително концентриране и стъпка на очистване на пробата. Може да се види, че пигментите се екстрахират в неполярната сърцевина на мицелите при

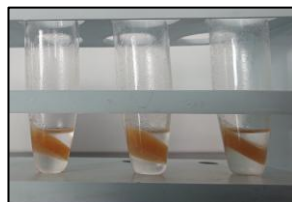
стъпката на екстракция (Фигура 10 б), а при стъпката на ре-екстракция се отлагат в междинния слой от MgSO_4 , като хексановата фаза остава безцветна (Фигура 10 в).



а) ПАВ обогатена фаза при 8 mL сок без добавен MgSO_4



б) след ре-екстракция на вортекс за 1 min при 55°C



в) след центрофугиране

Фигура 10: Етапи на подготовка на проба от сок червена ябълка при $DF = 1.25$ а) ПАВ обогатена фаза, получена без добавяне на MgSO_4 на етап CPE, б) на етап ре-екстракция с 0.25 mL хексан и в) след центрофугиране.

Постигнатите аналитични добиви, изчислени чрез калибрационни стандарти в имитирана матрица, са представени в Таблица 7.

Таблица 7: Аналитични добиви на добавка от $10 \mu\text{g L}^{-1}$ пестициди към сок от червена ябълка ($DF=1.25$), получени чрез комбинацията MW-CPE-GC-MS/MS ($n=3$)

Аналит	ER (%)	RSD (%)	Методични LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Pentachlorobenzene	88	8	0.006
alpha-HCH	51	8	0.015
Hexachlorobenzene	83	6	0.006
beta и gamma-HCH	41	9	0.009
Chlorpyrifos-methyl	60	6	0.059
Heptachlor	79	9	0.009
Aldrin	87	5	0.009
Chlorpyrifos	82	9	0.015
Heptachlor-endo-epoxide A	64	10	0.015
o,p-DDE	73	9	0.008
alpha-Endosulfan	76	7	0.013
Dieldrin	71	8	0.021
p,p-DDE	83	8	0.010
o,p-DDD	57	7	0.010
Endrin	74	9	0.016
p,p-DDD и o,p-DDT	58	8	0.049
p,p-DDT	66	4	0.016

Максимално допустимите концентрации (MRL) за пестицидите са посочени в Таблица 6.

От изследванията проведени с лимонov и ябълков сок може да се заключи, че разработения комбиниран MW-CPE-GC-MS/MS метод може да бъде използван за контрол на съдържанието на пестициди в плодови сокове. Важен акцент, е че предварителната процедура за подготовка на пробите едновременно концентрира целевите аналити и ги разделя от пигментите в пробите. Последното е от съществено значение за успешното реализиране на последващ GC-MS/MS анализ.

IV.2.3. Дисперсивна течно-течна микро екстракция базирана на природен хидрофобен дълбоко-евтектичен разтворител (NADES-based-DLLME) за екстракция на органохлорни и органофосфорни пестициди

Алтернативна процедура за предварително концентриране на органохлорни и органофосфорни пестициди, която проучихме, бе дисперсивната течно-течна микро екстракция (DLLME). От гледна точка на „зелената“ аналитична химия, желанието ни бе напълно да заменим употребата на органични разтворители в хода на подготовка на пробата, като използваме природен дълбоко-евтектичен разтворител (NADES) като екстрагент (точка III.2.2.2.). Допълнително, за постигане на поставената цел взехме решение да заменим диспергиращия разтворител с алтернативен метод за диспергиране на екстрагента, а именно чрез прилагане на агитация чрез вортекс.

IV.2.3.1. Оценка на селективността на GC-MS/MS метод

Проведохме поэтапни изследвания за оценка на съвместимостта на GC-MS/MS с NADES като матричен компонент и ефектите, които той оказва върху хроматографската система. Като първа стъпка инжектирахме екстрагент NADES (без разреждане) в режим на пълно сканиране, съгласно работните условия посочени в точка III.1.1. При анализа на регистрираната хроматограма на общия йонен ток (TIC), установихме наличие на два пика, елуиращи се при 9.54 и 10.77 min, които идентифицирахме като ментил хексил естер на въглеродната киселина и тетрадецилов естер на 3-циклопентилпропионовата киселина. Въпреки наличието на тези два пика, установихме, че при времената на задържане на целевите аналити, не се елуират пикове дължащи се на NADES.

Проведохме допълнително проучване за оценка на селективността в SRM режим, при работните условия описани в точка III.1.1., за да установим дали се наблюдават изобарни пречения, причинени от NADES (MNT:DA). Приготвихме два моделни водни разтвора, празна проба от ултрачиста вода и втори съдържащ пестициди на ниво от $10 \mu\text{g L}^{-1}$, които разработихме съгласно точка III.2.2.2 и инжектирахме аликвотен обем от екстрагентната фаза в GC-MS/MS без допълнително разреждане. Сравнихме реконструирания хроматограми на общия йонен ток (RTIC) на празната проба от NADES с тези на NADES, съдържащ изследваните пестициди, като не установихме наличие на изобарни пречения, причинени от NADES, при преходите на целевите аналити.

IV.2.3.2. Оценка на неспектралните матрични ефекти при GC-MS/MS

Доколкото ни бе известно, матричните ефекти при GC-MS/MS анализ, причинени от NADES (MNT:DA) като матрична среда, не бяха проучвани до момента. Сравнихме наклоните на калибрационните прави (ур. 3), получени чрез измерване на серии от по 3 стандартни разтвора (с концентрации до $2000 \mu\text{g L}^{-1}$ в крайния разтвор), приготвени в ацетонитрил и в среда от NADES. Оценихме допълнително стандартните отклонения на наклоните и пропагираното стандартно отклонение на съответните съотношения на наклоните.

От получените резултати за отношенията на наклоните установихме, че чувствителността за всички целеви аналити се повишава в тестовата среда на MNT:DA в сравнение с ацетонитрил в диапазона от 1.27 – 1.74 пъти (Таблица 8).

Общата тенденция на установения благоприятен ефект на средата MNT:DA бе, че колкото по-дълго е времето на задържане на целевия аналит (по-висока е температурата на кипене) и колкото по-висока е неговата полярност, толкова по-висока чувствителност се постига в сравнение с използването на ацетонитрил. Възможно обяснение на този „ефект на повишаване на сигналите, предизвикан от матрицата“ е аналогично на установеното от нас при анализа на пестициди чрез SPE, а именно намаляването на термичния стрес, когато целевите аналити преминават през лайнера на GC и/или деактивирането на активните центрове по вътрешната повърхност на лайнера, което се отразява в по-голяма степен върху по-полярните аналити.

Таблица 8: Съотношения на наклоните на калибрационните прави в среда на NADES и ацетонитрил за всеки целеви аналит, измерени чрез GC-MS/MS.

Отношение на наклоните $\pm$ комбинирана неопределеност ^a		Отношение на наклоните $\pm$ комбинирана неопределеност ^a	
Аналит		Аналит	
Pentachlorobenzene	1.36 $\pm$ 0.10	o,p-DDE	1.58 $\pm$ 0.21
alpha-HCH	1.33 $\pm$ 0.14	alpha-Endosulfan	1.48 $\pm$ 0.20
Hexachlorobenzene	1.27 $\pm$ 0.12	Dieldrin	1.34 $\pm$ 0.19
beta и gamma-HCH	1.32 $\pm$ 0.15	p,p-DDE	1.58 $\pm$ 0.24
Chlorpyrifos-methyl	1.74 $\pm$ 0.24	o,p-DDD	1.56 $\pm$ 0.23
Heptachlor	1.46 $\pm$ 0.17	Endrin	1.46 $\pm$ 0.27
Aldrin	1.51 $\pm$ 0.23	p,p-DDD и o,p-DDT	1.72 $\pm$ 0.31
Chlorpyrifos	1.69 $\pm$ 0.25	p,p-DDT	1.69 $\pm$ 0.18
Heptachlor-endo-epoxide A	1.41 $\pm$ 0.15		

^aКомбинираната неопределеност беше оценена съгласно закона за пропагирание, използвайки ур.3.

IV.2.3.3. Изследване стабилността на хроматографската система при инжектиране на NADES

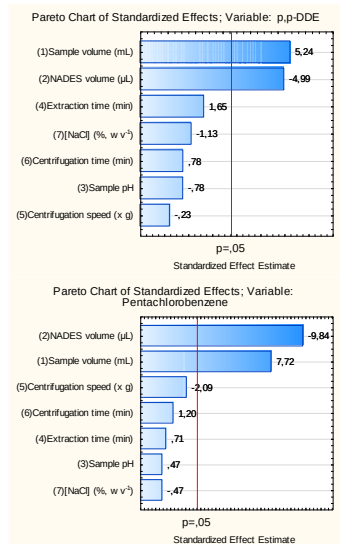
Бе важно да проучим стабилността на сигналите и времената на задържане на изследваните пестициди в присъствие на матрица от NADES (MNT:DA), оказваща неспектрални матрични ефекти. В режим SRM (точка III.1.1.) измерихме по 3 реплики от стандартни разтвори в NADES, съдържащи изследваните пестициди на ниво 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ и 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$. Като мярка за повторемостта изчислихме относителните стандартни отклонения на времената на задържане (t_R RSD (%)) и сигналите на целевите аналити (Площ RSD (%)). От анализа на получените стойности на RSD (%), установихме, че въпреки наличния положителен матричен ефект в среда на екстрагент и по-големия му вискозитет, се наблюдават повторяеми времена на задържане и сигнали на аналитите, и при двете изследвани концентрации на стандартните разтвори, съответно: за сигналите от 5 - 17%, а за t_R от 0.04 – 0.35% при 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ и 3 – 22% за сигналите, а <0.01 – 0.16% за t_R при 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$.

IV.2.3.4. Оптимизиране на дисперсивна течно-течна микроекстракция

При разработването на нов аналитичен метод за едновременно определяне на голям брой аналити, бе важно да проведем серия от експерименти за оптимизиране ефективността на процедурата на екстракция. От гледна точка на „зелената“ аналитична химия, при оптимизиране на основните експериментални фактори влияещи върху процедурата за DLLME, приложихме многофакторен подход за оптимизация на две стъпки. При първата стъпка, като скрининг подход за идентифициране на значимите фактори, използвахме дизайн на Plackett-Burman. При стъпката на оптимизация, за да установим оптималните стойности за значимите фактори, приложихме централно-композиционен план (CCD). Прилагането на дизайн на експеримента, ни позволи да намалим значително броя на експериментите, потреблението на проби, реагенти и енергия.

IV.2.3.4.1. Скрининг за идентифициране на значими фактори – Plackett-Burman дизайн

При скрининг етапа избрахме да проведем Plackett-Burman дизайн, включващ 11 фактора и 12 експеримента. Заложихме седем фактора с потенциално влияние върху DLLME, като за техни ниски (-) и високи (+) нива избрахме съответно: i) обем NADES (50 и 100 μL); ii) обем на пробата (6 и 10 mL); iii) време на екстракция (1 и 3 min); iv) време на центрофугиране (5 и 10 min); v) скорост на центрофугиране (900 xg и 1300 xg); vi) йонна сила, концентрация на NaCl (0 и 3% m v^{-1}) и vii) pH на пробата (5 и 7). Останалите 4 фактора използвахме като фиктивни фактори, с помощта на които да оценим неопределеността на измерването.



Фигура 11: Парето графики на стандартизираните ефекти от Plackett-Burman дизайн за изследваните целеви аналити.

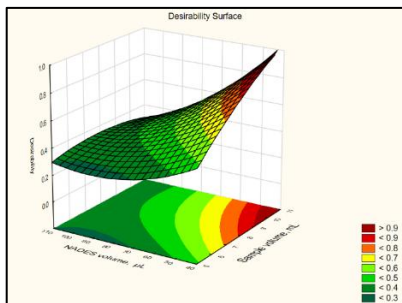
IV.2.3.4.2 Определяне на оптималните стойности на значимите фактори - Централно композиционен план и целева функция

За да оптимизираме стойностите на двата значими фактора създадохме централен композиционен план (CCD), като за централни точки избрахме съответно 8 mL обем на пробата и 75 μL обем на екстрагент NADES. Приготвихме моделни водни разтвори, в съответствие с матрицата на CCD дизайна и NADES-based-DLME процедурата описана в точка III.2.2.2., като всеки изходен разтвор съдържа 10 μg L⁻¹ от изследваните пестициди. Аликвотен обем от екстрагентната фаза след DLLME анализирахме чрез GC-MS/MS (точка III.1.1.). При анализа на получените диаграми на повърхнината на функциите за всеки аналит установихме, че моделните функции за всички изследвани пестициди имат сходни форми – регистрираната площ на пиковите се увеличава, когато обемът на NADES се намали и/или обемът на пробата се увеличи.

Поради груповата екстракция на голям брой пестициди бе необходимо да намерим компромисни стойности за обема на пробата и обема на NADES, при които да максимизираме сигналите за всички целеви аналити. За тази цел приложихме целева функция (Desirability function), която изчислихме съгласно Уравнение 5 и графично представихме получената диаграма на повърхнината на функцията на Фигура 12.

$$\text{Desirability} = \frac{\sum_{i=1}^n \frac{(\text{Signal}_{i, \text{run}})}{(\text{Signal}_{i, \text{max}})}}{n} \quad (\text{yp. 5}),$$

Signal_{i,run} - сигнал на i - тия пестицид при условията на даден експеримент от CCD матрицата;
Signal_{i,max} - максималният сигнал на i - тия пестицид от всички експерименти на CCD матрицата;
n - броят на анализирания пестициди.



При анализът на резултатите отчетохме висока стойност на коефициента на детерминираност ($R^2 = 0.9501$) на изградения регресионен модел, което показва добро съответствие на регресионното уравнение с експерименталните данни. Въз основа на получената графика за повърхнината на функцията (Фигура 12) заключихме, че постигането на най-добри резултати може да очакваме при 10.8 mL обем на пробата и 40 μL обем на екстрагент NADES.

Фигура 12: Диаграма на повърхнината на целевата функция (Desirability function).

От гледна точка на „зелената“ аналитична химия обаче, целта ни бе да намалим консумацията на проба, а от практическа гледна точка бе необходимо по-лесно да отпипетираме обем от 1 μL екстрагент, намиращ се на повърхността на водната фаза. Поради тези причини взехме решение да сравним регистрираните сигнали при 10.8 mL обем на водна фаза и 40 μL обем на екстрагент с тези при 10 mL обем на водна фаза и 45 μL NADES. Установихме, че сигналите бяха статистически идентични, поради което при последващи експерименти избрахме 10 mL като обем на водната проба и 45 μL NADES за обем на екстрагент.

Допълнително тествахме адекватността на модела чрез сравняване на експериментално получени сигнали за целевите аналити (при оптималните условия) със сигналите прогнозираны чрез целевата функция Desirability. Получените съотношения между прогнозни и експериментално определени стойности, за по-голяма част от аналитите, бяха в обхвата 71% - 87%, което ни позволи да смятаме изградения регресионен модел за целесъобразен. Основавайки се на резултатите от проведения многофакторен подход за оптимизация, определихме оптималните стойности на изследваните фактори за провеждане на процедурата на NADES-based-DLLME-GC-MS/MS (точка III.2.2.2.).

IV.2.3.5. Аналитични характеристики на метода

За да оценим калибрационните характеристики на разработения от нас NADES-based-DLLME-GC-MS/MS метод приготвихме серия от стандартни разтвори с градиращи концентрации на изследваните пестициди, във водна среда, при следните концентрационни нива: 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5 $\mu\text{g L}^{-1}$. Водните стандартни разтвори подложихме на NADES-based-DLLME процедурата (точка III.2.2.2.). (LOQ) изчислихме въз основа на съотношението сигнал/шум от 10. Получените резултати и съответните максимално допустими концентрации (MRL) за всеки пестицид във вода предназначена за консумация от човека¹⁰ са представени в Таблица 9. Може да се види, че за по-голяма част от аналитите методичните граници на количествено определяне са значително под максимално допустимите граници за остатъци от пестициди. Работният обхват на метода бе определен в диапазона от концентриране от LOQ до 12.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ на изходен воден разтвор или 2.78 mg L^{-1} след предварително концентриране чрез NADES-based-DLLME.

Методът допълнително оценихме за повторяемост чрез RSD (%), при две от калибрационните нива 0.05 и 5.0 $\mu\text{g L}^{-1}$. Аналитичните добиви изчислихме съгласно уравнение 4, където в случая Q крайно, i е количеството на аналита в крайната фаза на NADES (оценено чрез калибриране, в имитирана матрица (NADES)) и подложено на инструментален анализ. Аналитичните добиви за пестицидите при концентрация 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ са представени в Таблица 10, в която също така добавихме фактори на обогатяване. За да отчетем влиянието на положителния матричен ефект (точка IV.2.3.2.) изчислихме реалното повишение на сигналите GAIN (Таблица 10), което представя колко пъти регистрираният сигнал за всеки пестицид се усилва чрез комбинацията NADES-DLLME-GC-MS/MS. Изчислението на GAIN-а за даден пестицид извършихме като умножихме фактора на обогатяване (EF) и съотношението на наклоните на калибрационните прави (Таблица 8).

Таблица 9: Аналитични характеристики на метода NADES-DLLME-GC-MS/MS.

Аналит	Наклон ^a , (Площ L μg^{-1})	Отрез ^a (Площ)	R ²	LOQ (ng L ⁻¹)	MRL ^b , (ng L ⁻¹)
Pentachlorobenzene	62863 $\pm$ 1649	802 $\pm$ 9233	0.9938	0.7	100
alpha-HCH	100414 $\pm$ 1978	9477 $\pm$ 11074	0.9965	1.5	100
Hexachlorobenzene	97057 $\pm$ 1266	5181 $\pm$ 7087	0.9985	0.2	100
beta и gamma-HCH	171363 $\pm$ 3357	10659 $\pm$ 18795	0.9966	0.7	100
Chlorpyrifos-methyl	35395 $\pm$ 779	4802 $\pm$ 4574	0.9961	2.8	100
Heptachlor	57499 $\pm$ 578	722 $\pm$ 3235	0.9990	0.6	30
Aldrin	20510 $\pm$ 277	443 $\pm$ 1714	0.9987	10	30
Chlorpyrifos	98911 $\pm$ 1480	4001 $\pm$ 9161	0.9984	18	100
Heptachlor-endo-epoxide-A	10680 $\pm$ 172	1674 $\pm$ 1064	0.9982	9.8	30
o,p-DDE	170473 $\pm$ 2199	-4640 $\pm$ 12310	0.9984	4.1	100
alpha-Endosulfan	23437 $\pm$ 290	1342 $\pm$ 1621	0.9985	2.4	100
Dieldrin	8907 $\pm$ 156	261 $\pm$ 966	0.9979	13	30
p,p-DDE	138221 $\pm$ 2011	-5951 $\pm$ 11809	0.9983	4.1	100
o,p-DDD	323412 $\pm$ 4117	-13164 $\pm$ 24176	0.9987	8.4	100
Endrin	14144 $\pm$ 302	91 $\pm$ 1981	0.9976	69	100
p,p-DDD и o,p-DDT	460714 $\pm$ 7446	-3301 $\pm$ 43719	0.9979	5.1	100
p,p-DDT	164178 $\pm$ 6248	-37452 $\pm$ 41019	0.9914	78	100

^a Стандартно отклонение, изчислено по метода на най-малките квадрати.

^b Максимално допустими концентрации (MRL) ¹⁰

Таблица 10: Аналитични добиви, фактори на обогатяване и повишаване на сигналите на пестицидите GAIN, получени чрез разработения NADES-DLLME-GC-MS/MS метод (5 $\mu\text{g L}^{-1}$ във воден разтвор).

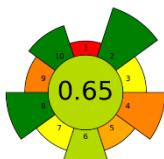
Аналит	ER (%) $\pm$ SD ^a	EF $\pm$ u _c ^b	GAIN ^c $\pm$ u _c ^b
Pentachlorobenzene	94 $\pm$ 9	209 $\pm$ 9	284 $\pm$ 23
alpha-HCH	117 $\pm$ 3	222 $\pm$ 3	347 $\pm$ 37
Hexachlorobenzene	116 $\pm$ 10	222 $\pm$ 10	327 $\pm$ 34
beta и gamma-HCH	112 $\pm$ 3	222 $\pm$ 3	327 $\pm$ 37
Chlorpyrifos-methyl	121 $\pm$ 8	222 $\pm$ 8	465 $\pm$ 67
Heptachlor	118 $\pm$ 6	222 $\pm$ 6	381 $\pm$ 44
Aldrin	114 $\pm$ 7	222 $\pm$ 7	382 $\pm$ 59
Chlorpyrifos	118 $\pm$ 5	222 $\pm$ 5	443 $\pm$ 65
Heptachlor-endo-epoxide A	108 $\pm$ 6	222 $\pm$ 6	339 $\pm$ 36
o,p-DDE	109 $\pm$ 9	222 $\pm$ 9	383 $\pm$ 52
alpha-Endosulfan	121 $\pm$ 6	222 $\pm$ 6	397 $\pm$ 55
Dieldrin	118 $\pm$ 6	222 $\pm$ 6	350 $\pm$ 49
p,p-DDE	110 $\pm$ 10	222 $\pm$ 10	386 $\pm$ 61
o,p-DDD	111 $\pm$ 8	222 $\pm$ 8	385 $\pm$ 57
Endrin	113 $\pm$ 5	222 $\pm$ 5	366 $\pm$ 67
p,p-DDD и o,p-DDT	111 $\pm$ 8	222 $\pm$ 8	425 $\pm$ 64
p,p-DDT	106 $\pm$ 6	222 $\pm$ 6	398 $\pm$ 44

^a Неопределеността е оценена като стандартно отклонение при n=3; ^b Комбинирана неопределеност.

^c Фактор показващ колко пъти регистрираният сигнал (площ) за всеки пестицид е увеличен благодарение на комбинацията NADES-DLLME-GC-MS/MS в сравнение с GC-MS/MS.

От получените резултати установихме, че аналитични добиви за част от целевите аналити са близки до 100% и са съпътствани от относително ниски SD. Безспорно това е важна положителна характеристика на разработения метод.

IV.2.3.6. Оценка на „зеления“ характер чрез метод AGREErep



Фигура 13: Оценка на „зеления“ характер на NADES-DLLME-GC-MS/MS метода чрез AGREErep софтуер. (Легенда е представена на Фигура 9).

За да оценим „зеления“ характер на разработения от нас метод, приложихме методологията AGREErep. Крайната оценка за „зеления“ характер на метода 0.65 показва, че методът е относително зелен и има умерено до добро ниво на екологичност. От анализът на получената пиктограма, представена на Фигура 13, установихме, че най-високо оценените критерии в предложението от нас метод са критерий 2, критерий 8 и критерий 10. Оборудването, използвано в процеса на екстракция (8-позиционна центрофуга и вортекс), в комбинация с краткото време на екстракция води до консумация на малко количество енергия за разработване на една проба (2.9 W/проба).

IV.2.3.7. Анализ на реални проби чрез разработения метод

Постигнатите методични LOQ, за всички изследвани пестициди (Таблица 9) са под съответните максимално допустими концентрации, посочени в Директивата на ЕС за качеството на водата, предназначена за консумация от човека. Това ни даде основание, да приложим разработеният NADES-based-DLLME-GC-MS/MS метод за анализ на бутилирани изворни води. Избрахме три търговски марки бутилирана изворна вода с различни показатели за електропроводимост и pH.

При анализът на водите установихме, че съдържанието на пестициди в анализираниите проби бе под границата на количествено определяне. Поради тази причина точността на метода, устойчивостта и прецизността на получените аналитични добиви оценихме по метода добавено-намерено. Всяка проба бутилирана изворна вода анализирахме трикратно чрез добавяне на пестициди при три концентрационни нива (0.1, 1 и 5 $\mu\text{g L}^{-1}$). Постигнатите резултати за аналитичните добиви (изчислени чрез калибрационните стандарти подложени на процедура NADES-DLLME), в зависимост от матриците изворна вода, са представени в Таблица 11.

Таблица 11: Аналитични добиви (ER) за изследваните пестициди в бутилирани изворни води.

Аналит	ER (%) $\pm$ SD ^a					
	Проба 1, добавка ($\mu\text{g L}^{-1}$)		Проба 2, добавка ($\mu\text{g L}^{-1}$)		Проба 3, добавка ($\mu\text{g L}^{-1}$)	
	0.1	1	0.1	1	0.1	1
Pentachlorobenzene	113 $\pm$ 11	90 $\pm$ 8	97 $\pm$ 3	99 $\pm$ 6	110 $\pm$ 15	100 $\pm$ 5
alpha-HCH	100 $\pm$ 4	91 $\pm$ 1	102 $\pm$ 9	100 $\pm$ 2	124 $\pm$ 11	101 $\pm$ 1
Hexachlorobenzene	100 $\pm$ 6	91 $\pm$ 9	96 $\pm$ 1	99 $\pm$ 5	98 $\pm$ 3	102 $\pm$ 6
beta & gamma-HCH	95 $\pm$ 2	98 $\pm$ 2	98 $\pm$ 3	100 $\pm$ 1	97 $\pm$ 1	99 $\pm$ 2
Chlorpyrifos-methyl	84 $\pm$ 3	77 $\pm$ 4	86 $\pm$ 10	80 $\pm$ 1	85 $\pm$ 5	75 $\pm$ 2
Heptachlor	112 $\pm$ 7	97 $\pm$ 3	105 $\pm$ 5	99 $\pm$ 3	109 $\pm$ 12	94 $\pm$ 3
Aldrin	100 $\pm$ 5	101 $\pm$ 4	100 $\pm$ 2	102 $\pm$ 4	103 $\pm$ 5	96 $\pm$ 6
Chlorpyrifos	98 $\pm$ 5	94 $\pm$ 7	92 $\pm$ 4	98 $\pm$ 1	101 $\pm$ 5	95 $\pm$ 2
Heptachlor-endo-epoxide-A	72 $\pm$ 14	93 $\pm$ 6	90 $\pm$ 2	92 $\pm$ 2	66 $\pm$ 8	97 $\pm$ 1
o,p-DDE	113 $\pm$ 1	111 $\pm$ 6	110 $\pm$ 12	108 $\pm$ 5	109 $\pm$ 8	99 $\pm$ 4
alpha-Endosulfan	100 $\pm$ 4	105 $\pm$ 7	100 $\pm$ 2	99 $\pm$ 1	100 $\pm$ 4	98 $\pm$ 1

Таблица 11: продължение

Аналит	ER (%) $\pm$ SD ^a					
	Проба 1, добавка ($\mu\text{g L}^{-1}$)		Проба 2, добавка ($\mu\text{g L}^{-1}$)		Проба 3, добавка ($\mu\text{g L}^{-1}$)	
	0.1	1	0.1	1	0.1	1
Dieldrin	121 $\pm$ 20	90 $\pm$ 7	95 $\pm$ 5	93 $\pm$ 2	95 $\pm$ 6	89 $\pm$ 3
p,p-DDE	105 $\pm$ 6	104 $\pm$ 2	118 $\pm$ 11	107 $\pm$ 7	100 $\pm$ 7	100 $\pm$ 7
o,p-DDD	99 $\pm$ 4	101 $\pm$ 10	110 $\pm$ 9	103 $\pm$ 7	106 $\pm$ 6	99 $\pm$ 3
Endrin	108 $\pm$ 8	91 $\pm$ 9	101 $\pm$ 5	96 $\pm$ 5	106 $\pm$ 10	94 $\pm$ 6
p,p-DDD & o,p-DDT	97 $\pm$ 4	101 $\pm$ 11	104 $\pm$ 1	110 $\pm$ 2	93 $\pm$ 0	96 $\pm$ 4
p,p-DDT	77 $\pm$ 13	64 $\pm$ 12	100 $\pm$ 16	93 $\pm$ 5	72 $\pm$ 2	68 $\pm$ 8

^a Стандартното отклонение е изчислено на три индивидуално приготвени проби съгласно оптимизираната процедура.

Повечето от представените аналитични добиви имаха стойности статистически идентични на 100%. Последното бе доказателство, че не са наблюдавани значителни матрични ефекти, когато прилагаме процедурата NADES-based-DLLME за екстракция на тези пестициди от изворна вода. Само за p,p-DDT получихме по-ниски добиви, вероятно поради различното общо съдържание на разтворени вещества (оценено чрез проводимост). Тенденцията която може да се забележи при p,p-DDT, е че колкото по-висока е проводимостта толкова по-ниски са аналитичните добиви.

V. Изводи и заключения

V.1. Разработен и валидиран е подход за качествен анализ на летливи компоненти в етерични масла, базиран на моделиране на линейни индекси на задържане

- Успешно са разработени два подхода за качествен анализ на летливи съединения в масло от роза, лавандула и мента чрез инжектиране на течни проби и предварително концентриране чрез HS-SPME в комбинация с газова хроматография с маспектрометрия;
- Успешно е разработен QSRR модел за прогнозиране на линейни индекси на задържане (LRI) чрез множествена линейна регресия (MLR), включващ само 14 независими променливи (молекулни дескриптори), базиран на експериментални данни;
- Предложеният QSRR модел е валидиран ($q^2_{F1} = 0.9886$, RMSE = 26) и успешно тестван чрез външен набор от съединения ($q^2_{F2} = 0.9521$, RMSE = 40);
- Моделът предоставя ценен инструмент за целите на „зелената“ химия при идентифициране на компоненти в етерични масла за неполярна стационарна фаза чрез прогнозиране на LRI.

V.2. Разработени са две нови процедури с изразен „зелен“ характер за груповото разделяне и концентриране на общо 19 органохлорни и органофосфорни пестициди: MW-CPE-GC-MS/MS и NADES-DLLME-GC-MS/MS, които са успешно комбинирани с GC-MS/MS анализ

- За първи път е реализирана микровълново подпомогната CPE, използваща Triton X-100 като ПАВ, в комбинация с ре-екстракция в хексан или изооктан за групово разделяне и концентриране на пестициди (органохлорни и органофосфорни) в комбинация с GC-MS/MS. За MW-CPE-GC-MS/MS е приложена успешно калибрация в имитирана матрица.
- За първи път е разработена DLLME процедура за групово разделяне и концентриране на пестициди (органохлорни и органофосфорни), подпомогната от вортекс, при която екстрагент е хидрофобен дълбоко - евтектичен разтворител, приготвен от компоненти с природен произход. За комбинацията NADES-DLLME-GC-MS/MS успешно е приложена калибрация чрез използването на стандарти, преминали през процедурата на екстракция;
- За първи път използваните екстрагентни фази, съдържащи 0.09% m m⁻¹ Triton X-100 или NADES – ментол/деканова киселина, бяха инжектирани в GC-MS/MS без допълнителна стъпка на очистване;
- За първи път е постигнато селективно определяне на пестицидите в матрица съдържаща 0.09% m m⁻¹ Triton X-100 или NADES – ментол/деканова киселина, използвайки режим SRM.

Демонстрирано, е че въвеждането на 0.09% m m⁻¹ Triton X-100 и NADES (ментол: деканова киселина) в газхроматографската система не оказва негативен ефект върху инструменталния анализ;

- v. За първи път е изследвана стабилността на хроматографската система в присъствие на Triton X-100 или NADES – ментол/деканова киселина при GC-MS/MS анализ;
- vi. За първи път са изследвани матричните ефекти от използваните екстрагенти (Triton X-100 / NADES – ментол/деканова киселина) при GC-MS/MS анализ, като за първи път е изследвана и отчетена зависимостта на матричните ефекти от използваните лайнери. Установените положителни ефекти водят до увеличение на инструменталната чувствителност при MW-CPE-GC-MS/MS (метален лайнер: 1.26 – 2.30 пъти; стъклен лайнер: до 1.14 пъти) и NADES-DLLME-GC-MS/MS (стъклен лайнер: 1.27 – 1.74 пъти);
- vii. Постигнатите аналитични добиви за по-голяма част от изследваните пестициди и при двете процедури са в интервала 70 – 120%, характеризиращи се със задоволителна прецизност;
- viii. Доказано, е че разработените методи притежават силно изразен „зелен“ характер;
 - MW-CPE-GC-MS/MS: AGREEprep оценка 0.50;
 - NADES-DLLME-GC-MS/MS: AGREEprep оценка 0.65;
- ix. Предложените аналитични методи притежават значително по-ниски методични граници на количествено определяне от регламентираните нормативни стойности за хранителни проби и питейни води;
- x. Разработените комбинирани методи бяха успешно приложени за анализ на реални проби:
 - плодови сокове чрез MW-CPE-GC-MS/MS;
 - изворни води чрез NADES-DLLME-GC-MS/MS.

В заключение може да се обобщи, че е постигнато развитие на газхроматографския качествен и количествен анализ чрез приложение на математично моделиране и успешно комбиниране на инструменталната техника със „зелени“ процедури за предварителна подготовка на проби.

VI. Приноси в дисертационния труд

- i. Създадена е база данни от експериментално определени линейни индекси на задържане на неполарна газохроматографска колона за 122 съединения, влизащи в състава на етерични масла;
- ii. Предложен е нов лесено приложим регресионен модел за прогнозиране на линейни индекси на задържане, който може да се използва при идентифициране на летливи компоненти в етерични масла чрез GC-MS и GC-MS/MS;
- iii. Създаден е протокол за извършването на GC-MS/MS анализ на 19 органохлорни и органофосфорни пестицида – извършена е оптимизация както на параметрите, влияещи на газохроматографското разделяне, така и на масспектрометричната регистрация на анализиранияте вещества.
- iv. Разширено е приложението на екстракцията при температура на коагулация за предварително разделяне и концентриране на органохлорни и органофосфорни пестициди. Предложена е процедура, чийто „зелен“ характер се подсилва от използването на микровълново лъчение като средство за внасяне на енергия в екстракционните системи. Процедурата е приложена при анализ на реални проби - плодови сокове.
- v. Обогатени са познанията за комбиниране на екстракцията при температура на коагулация с газохроматографски анализ. Предоставени са доказателства, че въвеждането на повърхностно-активно вещество в газохроматографската система не само няма негативно влияние върху инструменталния анализ, но обратно може да доведе до повишаване на чувствителността и понижаване на границите на откриване. Важно предимство при реализирането на комбинацията

от екстракция при температура на коагулация и газовохроматографски анализ е възможността за провеждане на калибрация чрез стандарти в имитирана матрица;

- vi. Предложен е иновативен подход за дисперсивна течно-течна екстракция, базирана на използването на дълбоко евтектичен разтворител с природен произход като метод за предварителна подготовка на проби при анализ на органохлорни и органофосфорни пестициди. Установени са работни условия, осигуряващи едновременно екстракция на 19 целеви аналита като изцяло е елиминирано използването на токсични органични разтворители. Процедурата е приложена при анализ на реални проби – бутилирани изворни води за питейни нужди.
- vii. Проучени са възможностите за комбиниране на дисперсивната течно-течна микроекстракция, ползваща като екстрагент дълбоко евтектичен разтворител с газовохроматографски анализ. Установено е, че крайната фаза получена след екстракция може да се инжектира директно в GC-MS/MS. При анализа на органохлорни и органофосфорни пестициди е наблюдавано, че дълбоко евтектичният разтворител (ментол : деканова киселина) се проявява като „протектор“ на аналитите, което води до повишаване на чувствителността на инструменталната детекция и понижаване на границите на откриване.

Бих искала да благодаря за финансовата подкрепа по Проект ФНИ Проект КП-06 Австрия/3 (2021) Предизвикателства и развитие на GC-MS/MS аналитични методи – академично партньорство.

Проект BG05M2OP001-2.016-0018 “МОДЕРН-А: Модернизация в партньорство чрез дигитализация на Академичната екосистема” (Магистърска програма „Интелигентна аналитика”) и Проект BG-RRP-2.004-0001-C01, „Дигитални устойчиви екосистеми – технологични решения и социални модели за устойчивост на екосистеми (ДУЕкоС).

Научни съобщения по темата на дисертацията

Публикации в специализирани издания:

- I. A. Hristozova, K. Simitchiev, V. Kmetov, E. Rosenberg. Compatibility of cloud point extraction with gas chromatography: Matrix effects of Triton X-100 on GC-MS and GC-MS/MS analysis of organochlorine and organophosphorus pesticides, *Talanta*, **2024**, 269, 125445. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2023.125445>, (**Scopus**, **SJR 2023=0.956, Q1**).
- II. A. Hristozova, M. Batmazyan, K. Simitchiev, S. Tsoneva, V. Kmetov, E. Rosenberg. Headspace – Solid phase microextraction vs liquid injection GC-MS analysis of essential oils: Prediction of linear retention indices by multiple linear regression, *Acta Chromatographica*, **2025**, 37, 76–86. <https://doi.org/10.1556/1326.2024.01207>, (**Scopus**, **SJR 2023=0.344, Q2**).

Участия в Научни конференции:

- III. A. Hristozova, K. Simitchiev, V. Kmetov, E. Rosenberg, „Оптимизиране на GC - MS/MS метод за анализ на органохлорни и органофосфорни пестициди след екстракция при температура на коагулация и ре - екстракция в хексан“, „Дни на науката 2021“ на СУБ – Пловдив, 25 - 27 Ноември 2021 г. , ПЛОВДИВ, БЪЛГРИЯ. (постер);
- IV. A. Hristozova, K. Simitchiev, V. Kmetov, E. Rosenberg, „Адаптиране на екстракция при температура на коагулация към GC - MS/MS анализи“, Семинар „Инструментални техники за химичен анализ“, 02 Юни 2022 г., ПЛОВДИВ, БЪЛГРИЯ. (устен доклад);
- V. A. Hristozova, K. Simitchiev, V. Kmetov, E. Rosenberg, “Studying the effect of Triton X-100 as a matrix component on the GC-MS/MS analysis of the pesticides HCB and o,p-DDD”, ANAKON2023, 10-14 Април 2023 г., ВИЕНА, АВСТРИЯ. (постер);
- VI. A. Hristozova, Lorena Vidal, Miguel Ángel Aguirre, Kiril Simitchiev, Antonio Canals, "Natural deep eutectic solvent-based dispersive liquid-liquid micro extraction of pesticides in water samples", 12-th Chemistry Conference, 13-14 Октомври 2023 г., ПЛОВДИВ, БЪЛГРИЯ. (постер);
- VII. A. Hristozova, M. Batmazian, K. Simitchiev, E. Rosenberg, „Development and validation of regression models for predicting linear retention indices of volatile components from essential oils analyzed by gas

- chromatography with tandem mass spectrometry", 12-th Chemistry Conference, 13-14 Октомври 2023 г., ПЛОВДИВ, БЪЛГРИЯ. (постер);
- VIII. A. Hristozova, K. Simitchiev, V. Kmetov, E. Rosenberg, „Effect of co-extracted TRITON X-100 on the instrumental measurements of pesticide analysis by GC-MS/MS with cloud point extraction as sample preparation technique“, 18-th HTC , 28-31 Май 2024 – ЛЮБЕН, БЕЛГИЯ. (постер);
- IX. A. Hristozova, M. Batmazian, S. Tsoneva, K. Simitchiev, E. Rosenberg, "Multiple linear regression models for predicting linear retention indices of volatile compounds in essential oils analyzed by gas chromatography with tandem mass spectrometry - development and validation", 18-th HTC , 28-31 Май 2024 – ЛЮБЕН, БЕЛГИЯ. (постер);
- X. A. Hristozova, L. Vidal, M. Ángel Aguirre, K. Simitchiev, A. Canals, "DISPERSIVE LIQUID-LIQUID MICROEXTRACTION BASED ON NATURAL DEEP EUTECTIC SOLVENT COMBINED WITH GC-MS/MS FOR ANALYSIS OF PESTICIDES IN BOTTLED SPRING DRINKING WATER", „Инструментални техники и методи за химичен анализ - ПРЕДИЗВИКАТЕЛСТВА И НОВИ РЕШЕНИЯ“, 05 Юни 2024 г., ПЛОВДИВ, БЪЛГРИЯ. (постер);
- XI. K. Simitchiev, A. Hristozova, V. Kmetov, E. Rosenberg, L. Vidal, M. Ángel Aguirre, A. Canals, „Положителни матрични ефекти при газово-хроматографски анализ предимство или недостатък?“, „Инструментални техники и методи за химичен анализ - ПРЕДИЗВИКАТЕЛСТВА И НОВИ РЕШЕНИЯ“, 05 Юни 2024 г., ПЛОВДИВ, БЪЛГРИЯ. (устен доклад);
- XII. A. Hristozova, L. Vidal, M. Ángel Aguirre, K. Simitchiev, A. Canals, „Natural Deep Eutectic Solvent – based Dispersive Liquid-Liquid Microextraction of pesticides in drinking water combined with GC-MS/MS“, 24 th ЕМЕС, 26 – 29. Ноември 2024, АЛИКАНТЕ, ИСПАНИЯ. (постер);

Литературни източници

- [1] O. D. (Orrin D. Sparkman, Zelda. Penton, and F. G. Kitson, Gas chromatography and mass spectrometry : a practical guide. Academic Press, 2011.
- [2] H. van Den Dool and P. Dec. Kratz, "A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography," J Chromatogr A, vol. 11, pp. 463–471, 1963, doi: 10.1016/S0021-9673(01)80947-X.
- [3] Baser K. H. C. and G., Buchbauer, "Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications, Eds.; 3rd ed., CRC Press," 2021.
- [4] Y. Marrero-Ponce, S. J. Barigye, M. E. Jorge-Rodríguez, and T. Tran-Thi-Thu, "QSRR prediction of gas chromatography retention indices of essential oil components," Chemical Papers, vol. 72, no. 1, pp. 57–69, Jan. 2018, doi: 10.1007/s11696-017-0257-x.
- [5] T. Rizky Novianidy Graha Primera Saintifika et al., "THE PREDICTION OF KOVATS RETENTION INDICES OF ESSENTIAL OILS AT GAS CHROMATOGRAPHY USING GENETIC ALGORITHM-MULTIPLE LINEAR REGRESSION AND SUPPORT VECTOR REGRESSION," 2022. [Online]. Available: <https://www.researchgate.net/publication/358428320>
- [6] "The Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants. 2001." Accessed: Jun. 17, 2023. [Online]. Available: <https://chm.pops.int/TheConvention/Overview/tabid/3351/Default.aspx>
- [7] V. L. Loro and B. E. Clasen, "Agrochemicals: Ecotoxicology and management in aquaculture," in Aquaculture Toxicology, Elsevier, 2021, pp. 79–106. doi: 10.1016/B978-0-12-821337-7.00010-4.
- [8] R. Mahajan, S. Verma, S. Chandel, and S. Chatterjee, "Organophosphate pesticide: usage, environmental exposure, health effects, and microbial bioremediation," in Microbial Biodegradation and Bioremediation, Elsevier, 2022, pp. 473–490. doi: 10.1016/B978-0-323-85455-9.00013-8.
- [9] "Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC." Accessed: Jan. 27, 2025. [Online]. Available: https://publications.europa.eu/resource/ellar/dbb0741d-b722-11ef-91ed-01aa75ed71a1.0002.02/DOC_1
- [10] 16 December 2020 on the quality of water intended for human consumption DIRECTIVE (EU) 2020/2184 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL