



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

I. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2015eko maiatzaren 13, 14 eta 15
Durango, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

ZIENTZIA ZEHATZAK ETA NATUR ZIENTZIAK

**Triazol pestiziden
determinaziorako mikroerauzketa
teknika eta banaketa
kromatografikoan oinarritutako
metodoen garapena**

*A. Bordagaray, R. Garcia-Arrona
eta E. Millá*

395-400 or.
<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.i.54>

ANTOLATZAILEA:



udako
euskal unibertsitatea

BABESLEAK:



EUSKO JAURLARITZA
GOBIERNO VASCO



Bizkaiko Foru Aldundia
Diputación Foral de Bizkaia

eman ta zabal zazu



UPV EHU

LAGUNTZAILEAK:



Universidad de Deusto
Deustuko Unibertsitatea



MONDRAGON
UNIBERTSITATEA



UDALBILTZA



upna
Universidad
Pública de Navarra
Nafarroako
Unibertsitate Publikoa

Triazol pestiziden determinaziorako mikroerauzketa teknika eta banaketa kromatografikoan oinarritutako metodoen garapena

Bordagaray A., Garcia-Arrona R., Millán E.

Euskal Herriko Unibertsitatea (EHU/UPV)

Kimika Fakultatea. Manuel de Lardizabal 3, 20018 Donostia
ane.bordagaray@ehu.es

Laburpena

Uzten kalitatea bermatzeko eta onddo eta bestelako organismoek eragin ditzaketen kalteak kontrolatu ahal izateko, pestiziden erabilera oso ohikoa da. Konposatu horiek, ordea, kontsumituz gero kalte ugari sor ditzake gizakion osasunean. Horregatik, triazol konposatuak ahalik eta kontzentrazio txikienetan determinatzeko metodoak garatzea garrantzitsua da. Mikroerauzketa metodo ezberdinen bidez, analitoen prekontzentrazioa eta isolatzea pausu bakar batean ematea ahalbidetzen da, ondoren kromatografia metodo ezberdinez banatu eta determinatzeko. Prozedurak hobetzeko metodo kimimetrokoak erabilgarriak izan daitezke, bai aldagaien optimizaziorako eta baita datuak lortu ondorengo post-tratamenduetarako ere.

Hitz gakoak: triazolak, mikroerauzketa, kromatografia, kimimetria

Abstract

To assure the quality of orchards and to control fungus and other organism diseases is very common the use of pesticides. Nevertheless, these compounds can cause injuries in human health. Therefore, is important to develop methods to determine triazole compounds in a very low concentration. Through microextraction techniques the preconcentration and isolation of analytes is performed in a single step, followed by chromatographic separation and determination. To improve those procedures, chemometric tools can be useful, firstly for optimization of many variables and secondly for the post-treatment of the obtained data.

Keywords: triazoles, microextraction, chromatography, chemometrics

1. Sarrera eta motibazioa

Triazol fungizidak baratzeetako onddo gaixotasunak kontrolatzeko erabili ohi diren konposatuak dira. Konposatu horiek, ordea, animalietan eragin kaltegarriak izan ditzaketela erakutsi dute, hala nola efektu tumoregenikoak eta ugalketa-sisteman kalteak (Allen et al., 2006, Wolf et al., 2006, Taxvig et al., 2007). Gizakiaren kontsumorako diren elikagaien segurtasuna bermatzeko Europar Batasunak konposatuen gehienezko hondakin muga ezarri zituen (MRL) (Regulation EC 396/2005, 16.3.2005) eta ordutik hona, muga horiek eguneratuz joan dira. Lan honetan aztertu diren triazolentzako (dinikonazola, flusilazola, flukinkonazola, miklobutanila, tebukonazola eta tetrakonazola) muga horiek gaur egun 0.01 eta 1 mg kg⁻¹ bitartekoak dira.

Prozedura analitikoetan laginen prestaketa ezinbesteko pausua da, baina baita ere neketsuena eta errore iturburu handiena ere. Analito hauek fruitu eta barazkietan aurki daitezkeen kontzentrazio baxua dela eta, beharrezkoa da prekontzentrazio etapa bat (Zhang et al., 2012). Metodo ezberdinen artean mikroerauzketa teknikek indar handia hartu dute azken urteetan. Fase solidozko mikroerauzketa (SPME) garatzen hasi zenetik (Pawliszyn, 1997) artikulu ugari argitaratu dira. Zuntz polimeriko baten sortzioan oinarritzen da teknika hau, laginarekin kontaktuan jarriz analitoak xurgatu ondoren gas edo likido kromatografiaren (GC, LC) bidez banatu eta detektatzen dira kuantifikatu ahal izateko. Zuntzek zuten desabantaila batzuk gainditzeko fase likidoko mikroerauzketak (LPME) agertu ziren (Jeannot eta Cantwell, 1996). LPME-k kasu bakoitzerako moldakortasun handia erakusten du (Sarafraz-Yazdi eta Amiri, 2010, Spietelun et al., 2014). Besteak beste, ultrasoinuz lagundutako emultsifikazio mikroerauzketan (USAEME) (Regueiro et al., 2008) tanta erauztailearen mikronizazio edo

dispertsioaren ondorioz, gainazal azaleraren handiagotzea eragiten du eta honek aldi berean analitoen masa transferentzia laguntzen du. Ondoren tanta jasotzeko tanta organikoaren solidifikazio bidez egin daiteke (SFO), izotz bainu bat erabiliz. Gainera, likido mikroerauzketa teknikak edozein detekzio-instrumenturi akoplatzeko arazorik ez dakar, ezta interfase bereziren beharrik ere. Teknika horiek, disolbatzaile kantitate minimoak erabiltzen dituztenez kimika berdearen ikuspegiaren alde agertzen dira.

Teknika hauek ordea, hainbat aldagaien menpe daude (erauzketa denbora eta tenperatura, gatz gehikuntza, desortzio baldintzak, etab.). Aldagai hauen balio optimoak lortzea ezinbestekoa da ahalik eta erantzun hoberena lortzeko (Stalikas et al., 2009). Horregatik diseinu esperimentalak eskaintzen dituen erremintak erabili dira, hala nola, miaketa, aldagai garrantzitsuak zein diren ikusteko eta optimizazioa, erantzun maximoa emango duten aldagaien balio optimoak aurkitzeko.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Ikerketaren helburua triazol fungizidak determinatzeko mikroerauzketa tekniken garapena da. SPME eta USAEME teknikekin erauzitako analitoak gas kromatografia (GC) edota bereizmen handiko likido kromatografia (HPLC) bidez emanez eta teknika hauen ezagutza zabalduz. Prozedura horien eraginkortasun maximoa lortzeko, teknikak baldintzatzen dituen aldagai garrantzitsuak identifikatu eta optimizatuko dira miaketa eta optimizazio prozeduren bidez. Analito hauek Euskal Herrian duten erabilerarengatik, prozedurak sagar eta mahats laginetan aplikatu dira metodoen eraginkortasun eta egokitasuna ikusteko.

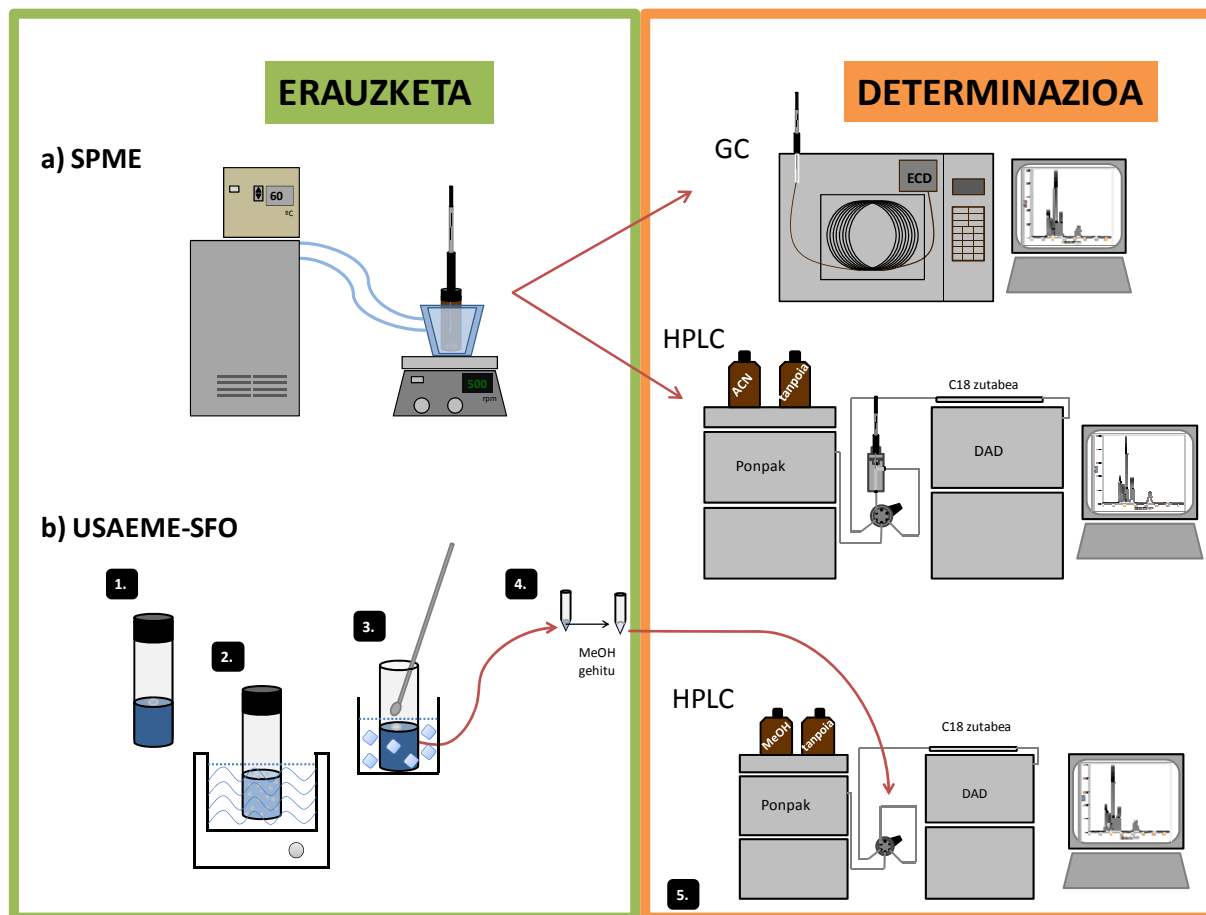
3. Ikerketaren muina

3.1. Metodoen prozedura esperimentalak

SPME erauzketa prozedura zuntz polimerikoa laginean murgiltzean datza (1.a. irudia). Bainu termostatiko batean dagoen bial batean lagina kokatzen da, eta SPME-ren orratzarekin biala ixten duen septa zeharkatzen da. Erauzketa denbora konkretu bat igaro ondoren zuntza jaso eta desortzio etapara eramaten da. Desortzioa GC edo HPLC bidez egin daiteke (Bordagaray et al., 2011, Bordagaray et al., 2013). GC bidez egiten denean desortzio termikoa dela esaten da, eta zuntza injektorean denbora batez mantenduz ematen da. Desortzioa HPLC bidez egin nahi izanez gero, interfase berezi bat erabili behar da, SPME zuntza jasoko duena. Bertan, fase mugikorrez betea dagoen ganbaran murgiltzen da zuntza eta analitoen desortzioa emango da. Edozein desortzio mota dela ere, ondoren banaketa eta determinazioa emango da eta lortutako kromatogramatik azalera integratuz kuantifikazioa egingo da.

USAEME-SFO prozeduran lehenik tanta erauztailea laginean isurtzen da (1.b. irudia, 1. pausua) (Bordagaray et al., 2014). Ondoren ultrasoinu (US) bainu batean sartuz tantaren dispertsioa ematen da, horrela kontaktu gainazala areagotuz (1.b. irudia, 2. pausua). Erauzketa denbora pasatu ondoren zentrifugazio bidez, dispertsatutako erauztailea tanta formara eramaten da berriz, eta jasotzeko izotz-bainu batean murgiltzen da (1.b. irudia, 3. pausua). Horrela, tanta solidifikatu eta espatula batez jaso daiteke. Tanta, beste bialtxo batera eramaten da bertan urtu dadin eta metanola gehitzen zaio HPLC-ko fase mugikorrarekin bateragarria izateko (1.b. irudia, 4. pausua). Azkenik, HPLC-n banaketa eta determinazioa emango da (1.b. irudia, 5. pausua).

1. irudia. (a) SPME eta (b) USAEME-SFO erauzketa eta GC eta HPLC bidezko determinazioaren irudikapen eskematikoa.



3.2. Emaitzak

3.2.1. Diseinu esperimentalta

Mikroerauzketa prozesuetan eragiten duten hainbat aldagai egon daitezke. Diseinu esperimentalaren laguntzaz garrantzitsuak diren aldagaiak identifikatu daitezke eta ondoren aldagaien balio optimoak lortu. Horregatik lehenengo lana, miaketa prozeduren bidez (diseinu faktorial zatikatuak erabiliz) adierazgarriak diren aldagaiak aurkitzea izango da. Segidan, diseinu konposatu zentralen laguntzaz, aldagaien balio optimoak bilatuko dira.

Mikroerauzketetan eragin dezaketen aldagaietako batzuk ondorengoak dira: erauztaile mota (zuntz estaldura SPME-n eta disolbatzaile mota eta bolumena USAEME-n) erauzketa denbora eta tenperatura, gatz gehikuntza (NaCl), desortzio denbora eta tenperatura (SPME kasuan), agitazioa eta zentrifugazio eta izozte baldintzak USAEME-SFO kasuan. Horrela bada, metodo bakoitzerako aldagai garrantzitsuak 1. taulan adierazten den bezala finkatu dira.

Garrantzitsuenak diren aldagaiak honela finkatu ziren: SPME kasuan erauzketa denbora luzeak behar izan dira (45 eta 90 min), aldiz USAEME kasuan laburragoa izan da (18 min). Erauzketa tenperaturari dagokionez 60°C eta 30°C izan ziren SPME eta USAEME-arentzat, hurrenez hurren. NaCl gehikuntzak erauzketa laguntzen du, baina kristalizazioaren ondorioz zuntza kaltetzen denez SPME-GC kasuan ez zen gatzik gehitu eta SPME-HPLC kasuan murriztu egin zen (180 g L⁻¹). USAEME-rekin 250 g L⁻¹-ko kontzentrazioa erabili zen.

1.Taula. Diseinu esperimentalaren bidez optimizatutako aldagaien balioak.

| | SPME-GC/ECD | SPME-HPLC/DAD | USAEME-SFO-HPLC/DAD |
|--------------------------------------|-----------------|----------------------------|---------------------|
| Erauztailea | PDMS/DVB zuntza | PDMS/DVB zuntza | Undekanola (50 µL) |
| Erauzketa denbora (min) | 45 | 90 | 18 |
| Erauzketa tenperatura (°C) | 60 | 60 | 30 |
| NaCl gehikuntza (g L ⁻¹) | - | 180 | 250 |
| Desortzio baldintzak | 260°C, 3 min | 2 min, fase mugikorrarekin | - |
| Agitazioa (rpm) | 500 | 500 | - |
| Zentrifugazioa | - | - | 4200 rpm, 10 min |
| Izozte baldintzak | - | - | 3°C, 5 min |

3.2.2. Balidazioa

Optimizazioaren ondoren, kuantifikatu ahal izateko kalibrazioak egin ziren. Metodo bakoitzaren egokitasuna ikusteko linealtasuna, detekzio-muga (LOD), errepikakortasuna (RSD %) eta laginetan egindako berreskuratzeak ikusi ziren. Hauek kalkulatzeko kromatogrametako analitoen gailurren azalerak erabili ziren. Izan ere, azalera hauek analito kontzentrazioarekiko proportzionalak dira. 2. Taulan metodo bakoitzarekin lortutako ezaugarri analitikoak ikus daitezke.

2.Taula. Triazolen determinaziorako lan honetan garatutako metodoen ezaugarri analitikoak.

| Metodoa | Matrizea | Analitoak | Linealtasuna (µg L ⁻¹) | LOD (µg L ⁻¹) | RSD (%) | Berreskuratzea (%) |
|---------------------|---------------------------|-----------------|------------------------------------|---------------------------|----------|--------------------|
| SPME-GC/ECD | Mahats-sagar zukuak | D-M-TT-TB | 0.4-2560 | 0.2-162 | 3.3-18.0 | 93.6-112.1 |
| SPME-HPLC/DAD | Ura, fruitu laginak | D-M-FQ-FS-TB-TT | 5.5-50.4 | 1.5-5.9 | 2.8-13.1 | 94.5-123.4 |
| USAEME-SFO-HPLC/DAD | Ura, mahats-sagar laginak | D-M-FQ-FS-TB-TT | 20-890 | 10.9-17.2 | 1.9-10.6 | 82-112 |

D: dinikonazola; M: miklobutanila; FQ: flukinkonazola; FS: flusilazola; TB: tebukonazola; TT: tetrakonazola.

3.2.3. Metodoen aplikazioa laginetan

Metodo horiek sagar eta mahats laginetan aplikatu dira. Horretarako kasu bakoitzerako lagin mota ezberdinak jaso dira eta zatiki ezberdinetan banatu dira, hala nola, zuku, azala eta pulpa. Lagin komertzialak ere aztertu dira: zuku eta muztio komertzialak eta sagardoa esaterako. Triazol arrastoak

aurkitu dira, batez ere azalak aztertzerakoan. Horrek, triazol fungizidak azalean geratzen diren tratamenduak direla erakusten du.

Beraien eraginkortasun egokia erakutsi badute ere, lagin mota batzuek dituzten ezpurutasunengatik prozedura kaltetu daiteke eta gerta liteke kasu batzuetarako ezegokiak izatea.

4. Ondorioak

Ikerketa honetan garatu diren hiru metodoak ondorengoak izan dira: SPME-GC/ECD, SPME-HPLC/DAD eta USAEME-SFO-HPLC/DAD. Metodoentzako lehenik miaketa eta optimizazio prozesuei esker aldagaien balio hoberenak lortu dira. Eta ondoren kuantifikazioari ekin zaio. Lortutako balidazio emaitzak egokiak izan dira jarritako helburuentzat eta laginetan egindako aplikazioak metodoen egokitasuna erakutsi du nahiz eta zenbait salbuespen egon lagin mota batzuetan.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Aipatu den bezala, lagin mota batzuetan mikroerauzketa hauek mugak izan ditzakete. Beraz, hurrengo pausua prozedura hauek lagin mota ezberdinetara zabaltzea litzateke. Prozesuan eragiten duten ezpurutasun eta faktore ezberdinak aztertuz eta analito hauek aurkitu daitezkeen beste lagin mota batzuetara ikerketa zabalduz.

Erabilitako detektagailu motak (ECD eta DAD), ohiko laborategietan aurki daitezkeenak dira, baina tarte lineala zabaltzeko eta kontzentrazio baxuagoak detektatzeko gai diren instrumentuak erabil daitezke, esaterako masa espektrometria (MS).

6. Erreferentziak

- Allen, J.W., Wolf, D.C., George, M.H., Hester, S.D., Sun, G., Thai, S., Delker, D.A., Moore, T., Jones, C., Nelson, G., Roop, B.C., Leavitt, S., Winkfield, E., Ward, W.O., Nesnow, S. (2006). Toxicity Profiles in Mice Treated with Hepatotumorigenic and Non-Hepatotumorigenic Triazole Conazole Fungicides: Propiconazole, Triadimefon, and Myclobutanil, *Toxic. Pathology* 34, 853-862.
- Bordagaray, A., García-Arrona, R., Millán, E. (2011). Optimization of Solid-Phase Microextraction Procedure Coupled to GC-ECD for Triazole Fungicides Determination in Juice Samples, *Food Anal. Methods* 4, 293-299.
- Bordagaray, A., García-Arrona, R., Millán, E. (2014). Determination of Triazole Fungicides in Liquid Samples Using Ultrasound-Assisted Emulsification Microextraction with Solidification of Floating Organic Droplet Followed by High-Performance Liquid Chromatography, *Food Analytical Methods* 7, 1195-1203.
- Bordagaray, A., García-Arrona, R., Millán, E. (2013). Development and application of a screening method for triazole fungicide determination in liquid and fruit samples using solid-phase microextraction and HPLC-DAD, *Anal. Methods* 5, 2565-2571.
- Jeannot, M.A. eta Cantwell, F.F. (1996). Solvent Microextraction into a Single Drop, *Anal. Chem.* 68, 2236-2240.
- Pawliszyn, J. (1997). *Solid Phase Microextraction. Theory and Practice*, 1st edn, Wiley-VCH, New York (USA).
- Regueiro, J., Llompарт, M., Garcia-Jares, C., Garcia-Montegudo, J.C., Cela, R. (2008). Ultrasound-assisted emulsification-microextraction of emergent contaminants and pesticides in environmental waters, *Journal of Chromatography A* 1190, 27-38.

Regulation EC 396/2005 (16.3.2005) 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.

Sarafraz-Yazdi, A. eta Amiri, A. (2010). Liquid-phase microextraction, *TrAC Trend Anal. Chem.* 29, 1-14.

Spietelun, A., Marcinkowski, Ł, de la Guardia, M.Namieśnik, J. (2014). Green aspects, developments and perspectives of liquid phase microextraction techniques, *Talanta* 119, 34-45.

Stalikas, C., Fiamegos, Y., Sakkas, V.Albanis, T. (2009). Developments on chemometric approaches to optimize and evaluate microextraction, *Journal of Chromatography A* 1216, 175-189.

Taxvig, C., Hass, U., Axelstad, M., Dalgaard, M., Boberg, J., Andeasen, H.R.Vinggaard, A.M. (2007). Endocrine-Disrupting Activities *In Vivo* of the Fungicides Tebuconazole and Epoxiconazole, *Toxic. Sci.* 100, 464-473.

Wolf, D.C., Allen, J.W., George, M.H., Hester, S.D., Sun, G., Moore, T., Thai, S., Delker, D.A., Winkfield, E., Leavitt, S., Nelson, G., Roop, B.C., Jones, C., Thibodeaux, J.Nesnow, S. (2006). Toxicity profiles in rats treated with tumorigenic and nontumorigenic triazole conazole fungicides: propiconazole, tridimefon and myclobutanil, *Toxicologic Pathology* 34, 895-902.

Zhang, L., Liu, S., Cui, X., Pan, C., Zhang, A.Chen, F. (2012). A review of sample preparation methods for pesticide residue analysis, *Central European Journal of Chemistry* 10, 900-925.

7. Eskerrak eta oharrak

Lan hau “Mikroerauzketa teknika eta banaketa kromatografikoan oinarritutako prozeduren garapena triazol fungiziden determinaziorako fruitu eta likido laginetan” tesian oinarritu da, 2015 urtean zehar defendatzea aurreikusten da.

Eskerrik beroenak ikerketa hau aurrera eramateko ezinbestekoa izan den EHU bekari eta Gipuzkoako Foru Aldundiari eta baita Rosa Garcia Arrona eta Esmeralda Millán zuzendariei ere.