

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΣΕ ΜΙΚΡΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΜΑΖΑΣ ΥΨΗΛΗΣ ΑΚΡΙΒΕΙΑΣ

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΔΙΑΠΗΣ⁽¹⁾, ΣΟΦΙΑ ΚΟΛΟΚΟΥΡΗ^(1,2), ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΜΗΛΙΑΔΗΣ⁽¹⁾, ΜΙΧΑΗΛ ΚΟΥΠΠΑΡΗΣ⁽²⁾, ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΤΣΙΡΟΠΟΥΛΟΣ⁽³⁾

⁽¹⁾ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ, ΜΠΕΝΑΚΕΙΟ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ, ⁽²⁾ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ, ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ, ⁽³⁾ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

e-mail: K.Liapis@bpi.gr

Περίληψη

Η ακριβής μέτρηση μάζας είναι σχεδόν χαρακτηριστική (specific) και μοναδική για κάθε ουσία «στόχο» ανεξάρτητα του χρησιμοποιούμενου εξοπλισμού. Η μέτρηση της ακριβούς μάζας βασίζεται στις ακριβείς ατομικές μάζες των στοιχείων, π.χ. για το $H=1.007825$, και όχι στις ονομαστικές μάζες, π.χ. για το $H=1$.

Η μέτρηση των απειροελάχιστων διαφορών στη μάζα ενός ιόντος, λαμβανομένης υπόψη και της μάζας του ή των ηλεκτρονίων ($e^- = 0.00055$) και στη συνέχεια ο υπολογισμός της θεωρητικής ακριβούς μάζας και του σφάλματος μεταξύ θεωρητικής και μετρούμενης μάζας σε ppm ή mDa είναι ένα από τα κριτήρια για τον προσδιορισμό της ταυτότητας μιας ουσίας.

Το χρωματογραφικό σύστημα που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη ήταν τύπου LC-TOF/MS/ESI(+) Agilent 6220 (Accurate Mass). Προσδιορίστηκε η ακριβής μάζα των πρωτονιομένων μορίων και/ή των ενώσεων προσθήκης με Na και των ιόντων θραυσματοποίησης που παράγονται εντός της πηγής (in-source CID fragment ions) και υπολογίστηκε η απόκλιση (σφάλμα) από τη θεωρητική τιμή σε ppm. Ο προσδιορισμός της ταυτότητας μιας ουσίας επιτυγχάνεται με ακρίβεια μάζας <5 ppm (και για πολλές ουσίες <2 ppm) σε συνδυασμό με το χρόνο κατακράτησής της και του ισοτοπικού προφίλ της.

Abstract

Accurate mass measurement is almost specific and unique for each “target” substance regardless the equipment being used. Accurate mass measurement is based on elements’ precise atomic masses, e.g. $H=1.007825$ and not $H=1$ due to nominal masses. Infinitesimal differences in an ion’s mass measurement, taking into consideration electron’s mass ($e^- = 0.00055$), the calculation of the exact theoretical mass and the error that comes of the theoretical mass and the mass measured in ppm or mDa, is one of the criterion for the determination of a substance’s identity. The instrument used in this study is liquid chromatography- mass spectrometry-time of flight (LC-TOF/MS/ESI (+) Agilent 6220 (Accurate mass). Exact mass of protonated molecules and/or sodium adducts and in-source CID fragment ions was determined and then the deviation (error), considering the theoretical mass was calculated in ppm. The determination of a substance’s identity is succeeded with mass accuracy < 5 ppm (while for many others <2 ppm) combined with retention time and isotopic profile.

1. Εισαγωγή

Τα συστήματα υγρής χρωματογραφίας, με διασυνδετή ηλεκτροδιάχυσης και αναλυτή μάζας χρόνου πτήσης σε ορθογώνια διάταξη (ESI-orthogonal-TOF/MS) έχουν την ικανότητα να παράγουν δεδομένα με επαρκή ακρίβεια (accuracy) και πιστότητα, επαναληψιμότητα (precision) για να τεκμηριωθεί η στοιχειακή σύνθεση ενός αναλύτη, μικρού μορίου. Ο

συνδυασμός μέτρησης της ακριβούς μάζας με την τεχνική (ESI-orthogonal-TOF/MS) και υγρής χρωματογραφίας χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της ταυτότητας μιας ουσίας σε περίπλοκα μείγματα καθώς και για τον προσδιορισμό μεταβολιτών, προϊόντων διάσπασης και νέων ουσιών (drug discovery) ακόμη και χωρίς χρήση αναλυτικών προτύπων (κάτω από συγκεκριμένες προϋποθέσεις, για την τελευταία των περιπτώσεων).

Η τεχνική αυτή είναι κατάλληλη για στοχευμένη ανάλυση (target), για μη στοχευμένη ανάλυση (non-target) καθώς και για τον προσδιορισμό αγνώστων ουσιών (unknown compound analysis). Αυτό οφείλεται στο ότι ο αναλυτής μάζας (TOF) λειτουργεί αποκλειστικά σε συνθήκες πλήρους σάρωσης (full scan spectrum) καθ όλη τη διάρκεια του χρωματογραφήματος καθώς και στο ότι είναι παλμικός ανιχνευτής (όπως και τα συστήματα παγίδας ιόντων – ion trap) επιτρέποντας την αποθήκευση μεγάλου όγκου δεδομένων και την ανακατασκευή του χρωματογραφήματος (ή με άλλα λόγια την «εκχύλιση» του χρωματογραφήματος – EIC) για όποιο ιόν (m/z) επιλέξει ο χρήστης. Σε αντίθεση αυτό δε μπορεί να εφαρμοστεί π.χ. στα συστήματα LC/MS/MS που διαθέτει όμως άλλες δυνατότητες.

Η αποτελεσματικότητα και η επικύρωση οιασδήποτε διαδικασίας για τον προσδιορισμό της στοιχειακής σύστασης ενός μορίου εξαρτάται από τον καθορισμό των ορίων του σφάλματος (error) που θα χρησιμοποιηθούν για τον παραπάνω προσδιορισμό. Το σφάλμα σε μια μετρηθείσα μάζα αποτελείται από 2 συστατικά. Το συστηματικό σφάλμα (accuracy) και το στατιστικό ή τυχαίο σφάλμα (precision). Το συστηματικό σφάλμα εξαρτάται από «σταθερούς» παράγοντες όπως οι μαθηματικοί αλγόριθμοι που χρησιμοποιεί το λογισμικό, η σταθερότητα του αναλυτή μάζας κ.α. Η πιστότητα της μέτρησης μιας μάζας μπορεί να υπολογιστεί με τη στατιστική ανάλυση δεδομένων που προκύπτουν από πολλαπλές ανεξάρτητες μετρήσεις.

Ένα παράδειγμα απαίτησης της ακρίβειας μάζας προέρχεται από το πρόσφατο έγγραφο της E.E. (D.G. SANCO, 2009) που αφορά τις προϋποθέσεις για την επικύρωση μεθόδων που αφορούν τους προσδιορισμούς υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων σε τρόφιμα και ζωοτροφές. Σύμφωνα με το παραπάνω έγγραφο τα αποδεκτά όρια σφάλματος είναι +/- 5% ppm για συστήματα υψηλής διακριτικής ικανότητας. Η αποδεκτή τιμή των 5 ppm αναφέρεται ξεκάθαρα στη συμφωνία μεταξύ μετρηθείσας (πειραματικής) και αναμενόμενης (υπολογισθείσας ή θεωρητικής μάζας). Η παραπάνω παράμετρος, σύμφωνα πάντα με το συγκεκριμένο έγγραφο αφορά συστήματα που χαρακτηρίζονται ως high resolution/high mass accuracy και οι απαιτήσεις προσδιορισμού της ταυτότητας είναι εκτός της ακρίβειας μάζας, η ύπαρξη ≥ 2 διαγνωστικών ιόντων (κατά προτίμηση του ψευδομοριακού ιόντος και ενός ιόντος θραυσματοποίησης - fragment ion) καθώς και η αναλογία, με αποδεκτά όρια, μεταξύ των σχετικών εντάσεων αυτών των 2 ιόντων. Η υψηλή διακριτική ικανότητα, $M/\Delta M > 10000$, [high resolution ή resolving power (Sparkman 2006)] παρέχει την εκλεκτικότητα ή επιλεκτικότητα (selectivity) έναντι των παρεμποδίσεων που μπορεί να προέρχονται και από ισοβαρείς ουσίες ενώ η υψηλή ακρίβεια μάζας μας παρέχει την ειδικότητα (specificity) με τον μοριακό τύπο που αντιστοιχεί στην ακρίβεια της μάζας.

Το σφάλμα (error) της ακρίβειας μάζας δίνεται είτε σε ppm και είναι η διαφορά μεταξύ μετρηθείσας (measured) και υπολογισθείσας (calculated) μάζας είτε σε ppm και υπολογίζεται από το παρακάτω τύπο:

$$10^6 * (\text{measured} - \text{calculated}) / \text{calculated} \quad (\text{σε ppm}) \quad (\text{Τύπος 1})$$

Σύμφωνα με το ΕΣΥΔ (ΕΣΥΔ, ΚΟ1-ΚΡΙΤΕ, 2007) για τα συστήματα μέτρησης απαιτείται έλεγχος καταλληλότητας ο οποίος εκτελείται συστηματικά και μπορεί να περιλαμβάνει έλεγχο της στήλης (π.χ. για τους χρόνους ανάλυσης), για την επίδοση του ανιχνευτή (απόκριση, θόρυβος, σταθερότητα, πιστότητα κ.α.), tuning του MS και Σήμα/Θόρυβος. Η παραπάνω κατευθυντήρια οδηγία είναι ορθώς γενική και δε μπορεί και δεν πρέπει να θέτει περιορισμούς. Κατά τη μελέτη που πραγματοποιήθηκε επιλέχθηκε ένα σχήμα καθημερινού ελέγχου του συστήματος με τη χρησιμοποίηση της ουσίας atrazine, (φυτοπροστατευτικό προϊόν) προσαρμοσμένου στη λογική, στις απαιτήσεις και στον τρόπο λειτουργίας του συστήματος LC-TOF/MS/ESI(+).

Για την επικύρωση μιας μεθόδου σύμφωνα με το έγγραφο (SANCO 2009) εισάγεται επίσημα για πρώτη φορά σε έγγραφο διεθνούς οργανισμού (εξ όσων γνωρίζουμε) η έννοια της ποιοτικής μεθόδου διαλογής (qualitative screening methods) που ταιριάζει περισσότερο στην τεχνική LC-TOF/MS/ESI(+). Η επικύρωση τέτοιων μεθόδων επικεντρώνεται στην ανιχνευσιμότητα. Η ανίχνευση (detection) είναι το χαμηλότερο επίπεδο φόρτισης (spiking level) για το οποίο τεκμηριώνεται ότι ένας αναλύτης μπορεί να ανιχνευθεί και όχι απαραίτητα να ταυτοποιηθεί κατ' ελάχιστο στο 95% των δειγμάτων (αποδεκτό 5% ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα). Μια βασική επικύρωση μιας τέτοιας μεθόδου τυπικά περιλαμβάνει ανάλυση 10 διαφορετικών δειγμάτων εις διπλούν από κάθε ομάδα προϊόντων (Annex 1, SANCO 2009) στο επίπεδο αναφοράς της διαλογής (Screening Reporting Level – SRL).

Για την επικύρωση μιας τέτοιας μεθόδου σύμφωνα με τις παραπάνω προϋποθέσεις επιλέχθηκε η χημική ομάδα των καρβαμιδικών φυτοπροστατευτικών προϊόντων που παρουσιάζει ενδιαφέρον λόγω της συχνότητας των ευρημάτων από τα εργαστήρια δοκιμών, της μερικής δυσκολίας στον προσδιορισμό αυτών των ουσιών (καθόσον μερικές εξ αυτών είναι θερμοευαίσθητες) και απαιτείται προσεκτική επιλογή των παραμέτρων λειτουργίας του συστήματος αλλά και λόγω του ότι πολλές φορές δείγματα που έχουν σταλεί στο εργαστήριο μας αναφέρουν γενικά ότι ανιχνεύθηκαν καρβαμιδικές ενώσεις χωρίς όμως να γνωρίζουν οι αποστέλλοντες το δείγμα ποια ένωση.

2. Πειραματικό μέρος

2.1 Χημικά αντιδραστήρια-Υλικά-Συσκευές-Βοηθητικά μέσα

Τα αναλυτικά πρότυπα αγοράστηκαν από την Dr. Ehrenstorfer (Ausburg, Germany). Ο μοριακός τύπος της κάθε ουσίας που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη, η μοριακή μάζα, η ακριβής μονοϊσοτοπική μάζα του ψευδομοριακού ιόντος ή της ένωσης προσθήκης με NH_4 ή Na και των θραυσμάτων (fragments) που προέκυψαν από την διαδικασία in-source fragmentation καθώς και ο χρόνος κατακράτησης της κάθε ουσίας με τις συνθήκες λειτουργίας της υγρής χρωματογραφίας όπως αναφέρονται στη συνέχεια, εμφανίζονται στον Πίνακα 1. Τα διαλύματα παρακαταθήκης ξεχωριστά το καθένα (200-250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) παρασκευάστηκαν σε μεθανόλη LC/MS grade και αποθηκεύτηκαν στους -18 έως -22 °C.

ACN LC/MS-grade

Φιάλες φυγοκέντρου των 50 ml από Teflon και με βιδωτό πώμα (code No: 3114-0050)

Χωνιά, μικρά γυάλινα

Σιφόνια των 10 ml

Γυάλινα φιαλίδια των 8 ml με πώμα από Teflon (PTFE)

Φίλτρα (syringe filters) PTFE διαμέτρου πόρων 0,45 μ

Φυγόκεντρος τουλάχιστον 4000 στροφών/min

Ομογενοποιητής ultraturrax , τουλάχιστον 14000 στροφές/min

Συσκευή υπερήχων

Συσκευή εξάτμισης με N_2

2.2 Χρωματογραφία

Ο διαχωρισμός των φυτοπροστατευτικών ουσιών από το εκχύλισμα φρούτων και λαχανικών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC), το οποίο αποτελείται από έναν αυτόματο δειγματολήπτη, binary pump (Agilent series 6200) εφοδιασμένο με στήλη υγρής χρωματογραφίας POLARIS C18-A μήκους 15 cm και εσωτερικής διαμέτρου 21 mm και διάμετρο πόρων 5 μ . 10 μl από το εκχύλισμα του δείγματος εγχύονται σε μια χρωματογραφική ανάλυση. Η κινητή φάση που χρησιμοποιήθηκε ήταν A: H_2O (100%), μυρμηκικό οξύ 0,1%, μυρμηκικό αμμώνιο 5 mM και B:MeOH (100%), μυρμηκικό οξύ(0,1%) και μυρμηκικό αμμώνιο 5 mM. Το χρωματογραφικό πρόγραμμα που ακολουθήθηκε είχε ως εξής: για τα 2 πρώτα λεπτά η κινητή φάση ήταν 30% διαλύτης B. Από τα 2 έως τα 12 λεπτά υπήρχε γραμμική αύξηση στο 60% για το διαλύτη B και τέλος από τα 12 έως τα 30 λεπτά ο διαλύτης B αυξήθηκε γραμμικά στο 100% και κρατήθηκε σταθερός μέχρι τα 35 λεπτά όπου ολοκληρώνεται το χρωματογράφημα.

2.3 LC-TOF/MS/ESI(+).

Το σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης συνδέεται με φασματομετρικό αναλυτή χρόνου πτήσης Agilent MSD TOF εφοδιασμένο με πηγή ηλεκτροδιάχυσης, ο οποίος λειτουργεί με θετικό ιονισμό και έχει ρυθμισμένες τις παρακάτω παραμέτρους ως εξής: τάση τριχοειδούς στήλης, 4000 V, πίεση αερίου εκνέφωσης, 40 psig, ροή αερίου ξήρανσης, 9 l/min, θερμοκρασία αερίου ξήρανσης, 325⁰C, τάση αποκορυφωτή, 60V, τάση θραυσματοποιητή, 120. Το φάσμα μάζας είχε ρυθμιστεί να καταγράφει μάζες από 100-1000 m/z.

Πίνακας 1. Ουσίες, m/z ions, μοριακές μάζες, μοριακοί τύποι και χρόνος κατακράτησης (Rt)

Ουσία	Μάζα	Μοριακός Τύπος	Rt	[M+H]	[M+NH ₄]	F1
Carbaryl	201,2	C ₁₂ H ₁₁ NO ₂	14,5	202,0862		145,0647
Chlorpropham	213,7	C ₁₀ H ₁₂ ClNO ₂	20,2	214,0629		172,0160
Methiocarb	225,3	C ₁₁ H ₁₅ NO ₂ S	18,9	226,0896		169,0682
Methiocarb sulfone	257,3	C ₁₁ H ₁₅ NO ₄ S	7,4	258,0795	275,106	201,0580
Methiocarb sulfoxide	241,3	C ₁₁ H ₁₅ NO ₃ S	4,9	242,0845		185,0631
Methomyl	162,2	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₂ S	2,8	163,0536		106,0321
Thiodicarb	354,5	C ₁₀ H ₁₈ N ₄ O ₄ S ₃	15,3	355,0563	377,0382 [M+N _α]	
Oxamyl	219,3	C ₇ H ₁₃ N ₃ O ₃ S	2,3		237,1016	
Aldicarb	190,3	C ₇ H ₁₄ N ₂ O ₂ S	9,5		208,1114	116,0529
Aldicarb sulfone	222,3	C ₇ H ₁₄ N ₂ O ₄ S	2,3	223,0747	240,1013	
Aldicarb sulfoxide	206,3	C ₇ H ₁₄ N ₂ O ₃ S	2,1	207,0798	224,1063	
Carbofuran	221,3	C ₁₂ H ₁₅ NO ₃	12,9	222,1125		165,0910
Hydroxy-carbofuran	237,3	C ₁₂ H ₁₅ NO ₄	5,7	238,1074	255,1339	163,0753

3. Αποτελέσματα και συζήτηση

3.1 LC-TOF/MS/ESI(+), βελτιστοποίηση παραμέτρων

Η επιλογή των τιμών των παραμέτρων που χρησιμοποιήθηκαν στηρίχθηκε σε δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν ώστε να διαπιστωθούν οι βέλτιστες συνθήκες της μεθόδου. Αρχικά, μελετήθηκε η τάση θραυσματοποιητή για τιμές 90, 110, 120, 160 και 200 V, σε συγκεντρώσεις 0,01 µg/mL και 0,1 µg/mL. Επιλέχθηκε η τιμή για την τάση 120 V καθώς σε αυτή την τιμή εμφανίζονται όλες οι ουσίες με την μεγαλύτερη απόκριση του ανιχνευτή. Βέλτιστη κινητή φάση. Έγιναν δοκιμές σε τελικό διαλύτη MeOH- H₂O και κινητή φάση MeOH-H₂O (Διαλύτης A: 100% H₂O, 5 mM HCOONH₄, 0,1% HCOOH, 0,2 % AcN Διαλύτης B: 100% MeOH, 5 mM HCOONH₄, 0,1% HCOOH) και σε τελικό διαλύτη ACN(Διαλύτης A: 90% H₂O, 10% ACN, 5 mM HCOONH₄ Διαλύτης B: 90% ACN, 10% H₂O, 5 mM HCOONH₄). Σε κινητή φάση ACN-H₂O παρατηρήθηκε μείωση της ανιχνευσιμότητας των ουσιών και ειδικά του chlorpropham ενώ ταυτόχρονα χειροτέρευσε η χρωματογραφική ανάλυση. Για να επιβεβαιωθεί η απόρριψη της κινητής φάσης ACN-H₂O προστέθηκε 0,1% HCOOH στο διαλύτη A και B. Το HCOOH

λειτουργεί σαν δότης H⁺ με αποτέλεσμα να σχηματίζονται περισσότερα μητρικά ιόντα M+H και να υπάρχει καλύτερη χρωματογραφική απόκριση. Όμως και σε αυτήν την περίπτωση τα αποτελέσματα δεν ήταν καλύτερα οπότε και επιλέχθηκε ως κινητή φάση της μεθόδου, MeOH-H₂O. Τελευταία παράμετρος που μελετήθηκε είναι η θερμοκρασία του αερίου εκνέφωσης, η οποία παίρνοντας τιμές 300 °C, 325 °C και 350 °C έδειξε καλύτερα αποτελέσματα στους 325 °C. Πιο συγκεκριμένα, στους 350 °C το aldicarb δεν ήταν ανιχνεύσιμο γιατί είναι θερμοευαίσθητο και διασπάται. Στους 325 °C το εμβαδό των κορυφών και το S/N ήταν ελαφρώς βελτιωμένο σε σχέση με τους 300 °C και σε συνδυασμό με τη μεγαλύτερη θερμοκρασία που διατηρεί την πηγή “καθαρή” καταλήξαμε στους 325 °C ως θερμοκρασία του αερίου εκνέφωσης.

3.2 Μέτρηση ακριβούς μάζας και έλεγχος καταλληλότητας του συστήματος

Η ουσία που χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο καταλληλότητας του συστήματος ήταν η atrazine (C₈H₁₄ClN₅). Για κάθε μέρα χρήσης του συστήματος πραγματοποιούταν calibration & tuning. Στη συνέχεια γινόταν έγχυση 10 μL διαλύματος της ουσίας συγκέντρωσης 0,01 μg/mL. Η μέτρηση της ακριβούς μάζας πραγματοποιήθηκε με την εξής διαδικασία. Το m/z ion της ουσίας όπως υπολογίστηκε από το λογισμικό του συστήματος (216,1010 για το M+H ion) «εκχυλίστηκε» από το TIC (total ion current) ώστε να προκύψει το EIC (extracted ion chromatogram). Μετά την αφαίρεση του background εμφανίζεται το φάσμα μάζας της ουσίας. Για την ακριβή μάζα που προέκυψε υπολογίστηκε το σφάλμα βάσει του τύπου 1, καθώς και η ακριβής μάζα του ιόντος θραυσματοποίησης για αυτή την ουσία (atrazine F1, C₅H₉N₅Cl, 174,0541). Υπολογίστηκε η παράμετρος S/N για το ion M+H καθώς και ο χρόνος κατακράτησης. Υπολογίστηκε η αναλογία ιόντων 216,1010 προς 174,0541. Ελήφθησαν 32 ανεξάρτητες μετρήσεις για κάθε εργάσιμη ημέρα στο χρονικό διάστημα από 2 Νοε 2009 έως 17 Δεκ 2009. Η κατανομή των σφαλμάτων εμφανίζεται στον πίνακα 2. Όλες οι τιμές είναι μικρότερες των 5 ppm και οι 22 από τις 32 τιμές είναι μικρότερες από 2 ppm. Μια τιμή είναι αρνητική (-1,85 ppm). Αυτό το γεγονός υποδηλώνει ότι υπάρχει συστηματικό σφάλμα που πιθανόν οφείλεται στους μαθηματικούς αλγορίθμους που χρησιμοποιεί το λογισμικό του κατασκευαστή. Επίσης αυτό το λογισμικό λαμβάνει υπόψη στους υπολογισμούς τη μάζα του e⁻ = 0,00055 ενώ άλλα λογισμικά δεν την λαμβάνουν υπόψη (Ferrer et al, 2007) υπολογίζοντας την ακριβή μάζα αυτής της ουσίας 216,1016 αντί του 216,1010. Εάν χρησιμοποιείτο αυτή η τιμή ως υπολογισθείσα θα είχαμε πολλές τιμές σφάλματος μηδενικές και μεγαλύτερο αριθμό αρνητικών τιμών σε σχέση με τις θετικές τιμές.

Πίνακας 2. Κατανομή των τιμών του σφάλματος για την μάζα 216,1010 της ουσίας atrazine

(-)ve errors	Συχνότητα	(+)ve errors	Συχνότητα	(+)ve errors	Συχνότητα
-1,50 έως -2,00	1	0,00 - 0,50	3	1,50 – 2,00	7
		0,50 - 1,00	4	2,00 – 3,00	5
		1,00 – 1,50	7	3,00 – 5,00	5

Η μέση τιμή για την ακρίβεια μάζας (για N=32 μετρήσεις) υπολογίστηκε 216,10138 και η τιμή του σφάλματος της μέσης τιμής ήταν 1,78. Η τυπική απόκλιση SD ήταν 0,00026 amu ή 0,26 mmu και σε ppm ήταν 1,20 βάσει του τύπου

$$SD(\text{in ppm})=SD(\text{in amu})\cdot 10^6/\text{average}(\text{in amu}) \quad (\text{Τύπος 2})$$

Το χρωματογραφικό σύστημα που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη παρουσίασε εξαιρετική σταθερότητα για μεγάλο χρονικό διάστημα (από 2 Νοεμβρίου έως 17 Δεκεμβρίου 2009) με αποδεκτή τιμή του σφάλματος της μέσης τιμής της ακριβούς μάζας. Η καταγραφή της ακριβούς μάζας και του σφάλματος αυτής καταγράφεται σε καθημερινή βάση τεκμηριώνοντας ότι το σύστημα βρίσκεται υπό στατιστικό έλεγχο. Εάν αντί του σφάλματος της μέσης τιμής της μάζας υπολογισθεί η μέση τιμή των σφαλμάτων τότε η τιμή αυτή είναι συγκρίσιμη καθόσον έδωσε τιμή 1,77 ppm.

Για το fragment ion (atrazine F1-174,0541) η μέση τιμή της μάζας ήταν 174,0543 (N=32) και το σφάλμα της μέσης τιμής 1,33 ppm, ενώ η μέση τιμή των σφαλμάτων ήταν 1,69. Αυτό οφείλεται στο ότι υπήρχαν 4 αρνητικές τιμές όπως φαίνεται και στον πίνακα 3. Συνεπώς δε μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε τη μέση τιμή των σφαλμάτων αντί του σφάλματος της μέσης τιμής.

Πίνακας 2. Κατανομή των τιμών του σφάλματος για την μάζα 174,0541 της ουσίας atrazine

(-)ve errors	Συχνότητα	(+)ve errors	Συχνότητα	(+)ve errors	Συχνότητα
-0,50 έως 0,00	2	0,00 - 0,50	4	1,50 – 2,00	6
-2,50 έως -2,00	2	0,50 - 1,00	3	2,00 – 3,00	7
		1,00 – 1,50	4	3,00 – 5,00	4

Για τη στατιστική επεξεργασία σε αυτή την περίπτωση ταιριάζει καλύτερα η παράμετρος root mean square, RMS ή rms ή x_{rms} , (Sack, 1984) γνωστή επίσης ως quadratic mean (QM). Η παράμετρος αυτή είναι μία στατιστική μέτρηση του μεγέθους μιας μεταβλητής ειδικά όταν αυτή η μεταβλητή λαμβάνει αρνητικές και θετικές τιμές. Η παράμετρος αυτή έχει την τιμή 2,02 ppm (υπολογίστηκε βάσει του τύπου 3) και η τυπική απόκλιση SD ήταν 0,00027 amu ή 0,27 ppm και σε ppm ήταν 1,55 βάσει του τύπου 2. Η τιμή που προκύπτει από τον υπολογισμό βάσει του τύπου 3 είναι σαφώς μεγαλύτερη από την τιμή που προκύπτει από τον τύπο 2.

$$RMS \text{ ή } x_{rms} = \sqrt{(1/N) * \sum (x_i)^2} \quad \text{Τύπος 3}$$

Υπολογίστηκε επίσης το resolution (resolving power @ FWHM, full width at half-maximum height). Η τιμή για τη μάζα 216,1010 @ FWHM ήταν 11530±500 και αντίστοιχα για τη μάζα 174,0541 @ FWHM ήταν 11040±160. Οι τιμές αυτές καλύπτουν την απαίτηση του 10000 ώστε το σύστημα να θεωρηθεί ως high resolution.

Όσο αφορά την ακρίβεια μάζας και τη διακύμανσή της κατά τη διάρκεια μιας χρωματογραφικής κορυφής επιλέχθηκε η μάζα 216,1010 και ελήφθησαν 14 διαφορετικές τιμές κατά τη διάρκεια της έκλουσης. Οι τιμές ήταν average 216,10124, sd in amu 0,00027, rsd in amu 0,00012 και sd in ppm 1,23912. Υπολογίστηκε επίσης η παράμετρος RMS και βρέθηκε 1,62 για N=14. Από τα παραπάνω προκύπτει ότι είναι δυνατή η μέτρηση της ακριβούς μάζας σε οποιοδήποτε σημείο της χρωματογραφικής κορυφής και όχι υποχρεωτικά στο μέγιστο αυτής (@ apex).

Καταγράφηκε επίσης η παράμετρος S/N & Rt για 32 ανεξάρτητες μετρήσεις για το μεγαλύτερο ιόν το $[M+H]^+$ (έγχυση 10 μ L του διαλύματος με C=,01 μ g/mL). Οι τιμές (S/N) ήταν average=321, min=169, max=486, sd=92 & rsd=28 ενώ για το χρόνο κατακράτησης Rt average=15,7 min, sd=0,1 & rsd=0,6.

Η αναλογία των ιόντων $[M+H]^+$ για το Cl-35 & Cl-37, λόγω του ότι το μόριο της atrazine περιέχει ένα άτομο χλωρίου είναι 75,77% & 24,23%. Από την πειραματική μέτρηση προέκυψε η αναλογία 75,77% & 23,93% που βρίσκεται σε άριστη συμφωνία με τη θεωρητική τιμή. Η παράμετρος αυτή είναι σημαντική γιατί το ισοτοπικό προφίλ αποτελεί ένα πρόσθετο στοιχείο επιβεβαίωσης της παρουσίας μιας ουσίας.

Σχετική αναλογία της έντασης δύο ιόντων της ίδιας ουσίας. Για τη μελέτη αυτή οι 32 ανεξάρτητες μετρήσεις σε βάθος χρόνου για τα ιόντα $[M+H]^+/F1$ είχε average=25,9, sd=5,2 & rsd=20 αλλά αυτό δεν αποτελεί πραγματικό πρόβλημα λόγω του ότι οι απαιτήσεις αφορούν σύγκριση με πρότυπο διάλυμα της ίδιας ημέρας.

Επιπρόσθετα μελετήθηκε και η between injection repeatability με 10 εγχύσεις της ίδιας ημέρας. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται στον πίνακα 3.

Πίνακας 3. Επαναληψιμότητα για τις παραμέτρους της ουσίας atrazine (N=10), (*)N=9

	Ion 216,1010	Ion 174,0541	S/N of 216,1010	Ratio F1, [M+H]
average	216,1013	174,05433	299	29 ^(*)
Sd in amu	0,00012	0,00021	49 (sd)	0,8 (sd)
Rsd in ppm	0,58	1,18	16 (rsd)	2,8 (rsd)
error of average in ppm	1,39	1,32	-	-

3.3 Επικύρωση της μεθόδου

Για την επικύρωση της μεθόδου επιλέχθηκαν 11 υποστρώματα που θεωρούνται ως υψηλής περιεκτικότητας σε νερό (SANCO, 2009). Τα υποστρώματα, η κατηγορία που ανήκουν καθώς και πρόσθετες πληροφορίες που αφορούν τις περιεκτικότητες νερό, σάκχαρα κλπ. καθώς & το pH εμφανίζονται στον πίνακα 4.

Πίνακας 4. Υποστρώματα (φυτικά προϊόντα) υψηλής περιεκτικότητας σε νερό

Προϊόν	Κατηγορία προϊόντος	% λίπος	% νερό	% σάκχαρα	pH
Μήλα	μηλοειδή	0,36	83,93	11,5	3,30-4,00
Ροδάκινα	πυρηνόκαρπα	0,09	87,66	8,7	3,30-4,05
Κρεμμύδια	βολβώδη	0,16	89,68	4,1	5,30-5,85
Πιπεριές	Καρποφόρα/ κολοκυνθοειδή	0,19	92,19	2,5	5,20-5,93
Αγγούρια	Καρποφόρα/ κολοκυνθοειδή	0,13	96,05	2,3	5,12-5,78
Κολοκυθάκια	Καρποφόρα/ κολοκυνθοειδή	0,21	93,68	2,2	5,79-6,10
Κουνουπίδι	Κράμβες	0,18	92,26	2,2	5,60
Λάχανο	Κράμβες	0,19	95,89	1,8	5,80-6,15
Σπανάκι	φυλλώδη	0,35	91,58	0,4	5,50-6,80
Καρότο	Ριζωματώδη/ κονδυλώδη	0,19	87,79	6,6	5,88-6,40
Πατάτα	Ριζωματώδη/ κονδυλώδη	0,1	78,96	1,0	5,40-5,90

Στον πίνακα 5 εμφανίζονται τα στοιχεία για κάθε μία από τις ουσίες που έχει μελετηθεί. Ο υπολογισμός της μέσης τιμής είναι ο ολικός, σε όλα τα υποστρώματα και σε 2 επίπεδα συγκεντρώσεων διαφορετικά για την κάθε ουσία αλλά σε αυτά περιλαμβάνεται 2 από τα 4 παρακάτω 0,01 – 0,02 – 0,1 & 0,2 µg/mL τελικού διαλύματος (έγχυση 10 µL). Η παράμετρος λ σε ppm (σε επίπεδο εμπιστοσύνης 95%) υπολογίσθηκε με το τύπο 4

$$\lambda_{\text{ppm}} (95\% \text{ confidence limit}) = 1.96 * \text{SD (in ppm)}$$

Τύπος 4

Πίνακας 6. Στοιχεία επικύρωσης

Ουσία	Θεωρητική τιμή	Μέση πειραματική τιμή	Σφάλμα μέσης πειραματικής τιμής	SD σε amu	SD σε ppm	λ σε ppm (σε επίπεδο εμπιστοσύνης 95%)
Carbaryl	202,0862	202,0864	0,93	0,0003	1,46	2,86
Chlorpropham	214,0629	214,0635	0,72	0,00036	1,66	3,25
Methiocarb	226,0896	226,0893	-1,17	0,0004	1,81	3,54
Methiocarb sulfone	258,0795	258,0777	-6,91	0,0026	10,26	20,18
Methiocarb sulfoxide	242,0845	242,0848	1,23	0,00037	1,53	3,0
Methomyl	163,0536	163,0538	1,4	0,0003	1,92	3,8
Thiodicarb	355,0563	355,0564	0,37	0,0008	2,15	4,2
Oxamyl	237,1016	237,1019	1,26	0,0005	2,03	3,98
Carbofuran	222,1125	222,1129	1,80	0,0004	1,67	3,27
Aldicarb	208,1114	208,1115	0,71	0,0005	2,54	4,98

Βιβλιογραφία

ΕΣΥΔ, ΚΟ1-ΚΡΙΤΕ/01/06/20-06-2007

Blom K. F., "Estimating the Precision of Exact Mass Measurements on an Orthogonal Time-of-Flight Mass Spectrometer", Anal. Chem. 73 (2001), 715

Ferrer I. and Thurman E. M., Letter to the editor, Rapid Communications in Mass Spectrometry, 21 (2007), 2538

Sack T. M., "A Method for Statistical Evaluation of Accurate Mass Measurement Quality", International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes" 61 (1984), 191

SANCO, Document N° SANCO/10684/2009

Sparkman O. D., "Mass Spec – Desk Reference", Global View Publishing 2006