

ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΑΙ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΖΕΥΓΟΥΣ ΙΟΝΤΩΝ ΣΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΙΟΝΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ Φ.Π.

Αναγνωστόπουλος Χ., Χαραλάμπους Α., Μπαλαγιάννης Γ.

¹Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο, Εργαστήριο Υπολειμμάτων Γεωργικών Φαρμάκων, Εκάλης 7, Κηφισιά, 14561

²Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο, Εργαστήριο Χημικού Ελέγχου Γεωργικών Φαρμάκων, Εκάλης 7, Κηφισιά, 14561

e-mail: c.anagnostopoulos@bpi.gr

Περίληψη

Η σύζευξη της γρήρης χρωματογραφίας με συστήματα φασματομετρίας μάζας αποτελεί μία από τις πιο διαδεδομένες τεχνικές προσδιορισμού υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων σε τρόφιμα φυτικής προέλευσης. Παρά τη μεγάλη ποικιλία στατικών φάσεων των διαθέσιμων χρωματογραφικών στηλών, οι στήλες αντιστρόφου φάσεως τύπου C₁₈ παραμένουν η πιο διαδεδομένη επιλογή για πολυυπολειμματικές μεθόδους προσδιορισμού πολικών έως μετρίως πολικών μη ιοντικών αναλυτών. Οι ιοντικές ουσίες αποτελούν μια ξεχωριστή κατηγορία αναλυτών, ο προσδιορισμός των οποίων γίνεται συνήθως με χρωματογραφία ιονανταλλαγής, χρωματογραφία με στήλη πορώδη γραφίτη, χρωματογραφία υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων και εναλλακτικά με παραγωγοποίηση πριν ή και μετά την στήλη. Στην παρούσα εργασία έγινε σύγκριση διαφορετικών τεχνικών παραγωγοποίησης, δοκιμάζοντας διαφορετικά αντιδραστήρια παραγωγοποίησης (Dansyl-Cl, FMOCl) και χρωματογραφικό διαχωρισμό σε στήλη τύπου C₁₈ με τις μεθόδους χρωματογραφίας χωρίς παραγωγοποίηση με στήλη ιοντοανταλλαγής και στήλη πορώδους γραφίτη. Οι παράμετροι που μελετήθηκαν είναι η εκλεκτικότητα, ο βαθμός εξειδίκευσης της κάθε τεχνικής, τα επιτυγχανόμενα όρια ανίχνευσης, η πιστότητα των μετρήσεων και η επίδραση του υποστρώματος. Η σύγκριση πραγματοποιήθηκε σε 2 διαφορετικά συστήματα γρήρης χρωματογραφίας σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας χρόνου πτήσης ιόντων (TOF) και τριπλού τετραπόλου (QqQ).

Λέξεις-Κλειδιά: επίδραση υποστρώματος, ιοντικές ενώσεις, παραγωγοποίηση, φασματομετρία μάζας, χρωματογραφία,

Abstract

Liquid chromatography coupled with mass spectrometry is one of the most popular techniques for the determination of pesticide residues in foods of plant origin. Despite the wide variety of available stationary phases of chromatographic columns, reverse phase C₁₈ columns remain the most prevalent choice for Multiresidue Residue Methods (MRM) with

a scope of medium-polar to polar nonionic analytes. For the determination of ionic pesticides, Single Residue Methods (SRM) are employed using ion exchange chromatography, porous graphitic carbon columns and HILIC chromatography. A different approach was used in this work, employing two different derivatization reagents (Dansyl-Cl, FMOC-Cl) for the separation of these analytes in reverse phase C₁₈ columns and comparing the results with methods employing ion exchange and porous graphitic carbon columns without derivatization. The parameters studied are selectivity, the degree of specialization of each technique and the matrix effect. The comparison was made in 2 different systems liquid chromatography coupled with time of flight (TOF) and triple quadrupole (QqQ) mass spectrometry.

Key words: derivatization, chromatography, ionic compounds, mass spectrometry, matrix effect

1. Εισαγωγή

Ο μεγάλος αριθμός των φυτοπροστατευτικών προϊόντων που χρησιμοποιούνται σήμερα έχει οδηγήσει στην υιοθέτηση πολυδύναμων μεθόδων προσδιορισμού υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων σε φυτικά προϊόντα. Παρόλα αυτά, ο προσδιορισμός ορισμένων ουσιών απαιτεί ειδικές συνθήκες επεξεργασίας δείγματος και χρωματογραφικής ανάλυσης λόγω των φυσικοχημικών ιδιοτήτων τους. Μία κατηγορία τέτοιων ενώσεων είναι τα ορμονικά ζιζανιοκτόνα (π.χ. *glyphosate*, *ethephon*, *diquat*, *paraquat* κ.α.). Οι ειδικές συνθήκες που απαιτούνται περιλαμβάνουν την χρήση χρωματογραφίας ανιρανταλλαγής για ιοντικές ενώσεις ζιζανιοκτόνων όπως τα *glyphosate*, *ethephon*, *glufosinate* και *AMPA*, Οι Anastassiades, Kolberg; et al. (2012); Anastassiades, Kolberg; et al. (2013) χρησιμοποίησαν χρωματογραφία υδρόφιλων αλληλεπιδράσεων (Hydrophobic Interaction Chromatography, HILIC) για πολικές ενώσεις ζιζανιοκτόνων όπως *diquat* και *paraquat*, τεχνική η οποία χρησιμοποιήθηκε και από τους Bohm, Stachel et al. (2010) για τον προσδιορισμό του αντιβιοτικού της ομάδας των αμινογλυκοσιδών, *streptomycin*. Εναλλακτικά, η παραγωγοποίηση πριν τη χρωματογραφική στήλη είναι μια τεχνική η οποία είναι επίσης ευρέως διαδεδομένη. Οι Cao et al. (2010) ανέπτυξαν μια αναλυτική μέθοδο προσδιορισμού του *glyphosate* και *AMPA* σε ρύζι χρησιμοποιώντας ως παράγοντα παραγωγοποίησης το 9-fluorenylmethoxycarbonyl (FMOC-Cl) σε ρυθμιστικό δ/μα βορικού οξέος. Ο χρωματογραφικός προσδιορισμός πραγματοποιήθηκε με στήλη αντίστροφης φάσης C₁₈. Ακολουθώντας μια διαφορετική προσέγγιση οι Khlorenko et al. (2005) χρησιμοποίησαν p-toluenesulphonyl ως παράγοντα παραγωγοποίησης σε συνδυασμό με ανιχνευτή UV ενώ οι Colin et al. (2000) χρησιμοποίησαν 4-chloro-7-nitrobenzofurazan σε συνδυασμό με ανιχνευτή φθορισμού.

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε σύγκριση των διαφόρων πιο διαδεδομένων τεχνικών μέτρησης μίας από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενης, ως φυτοπροστατευτικό προϊόν, ιοντικής ένωσης, του *glyphosate* σε φυτικούς ιστούς. Η σύγκριση αφορά τον προσδιορισμό του αναλύτη με δύο τεχνικές παραγωγοποίησης σε συνδυασμό με χρωματογραφία αντίστροφης φάσης τύπου C₁₈ καθώς και τον προσδιορισμό με χρήση

στηλώνπορώδη γραφίτη και ανιοανταλλαγής χωρίς παραγωγοποίηση. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε 2 διαφορετικά συστήματα φασματομετρίας μαζών (LC-MS/MS και LC-TOF).

2. Μεθοδολογία

2.1. Προετοιμασία φυτικού εκχυλίσματος

Για την παρασκευή του φυτικού εκχυλίσματος εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο προετοιμασίας δείγματος της μεθόδου ανάλυσης υπολειμμάτων ιοντικών φυτοπροστατευτικών προϊόντων σε φυτικά προϊόντα, QuPPE [Anastassiades, Kolberg; et al. (2012)]. Σε φιάλη φυγοκέντρου από Teflon των 50 mL ζυγίζεται μάζα δείγματος $10 \pm 0,1$ g, προστίθενται 10 mL διαλύματος 1% HCOOH σε μεθανόλη. Ακολουθεί έντονη ανακίνηση με το χέρι σε αναδευτήρα Vortex για 1 min. Η φιάλη πωματίζεται και φυγοκεντρείται στις 4000 στροφές/ min για 5 min. Ακολουθεί διήθηση από φίλτρο τύπου syringe filter nylon 0,45μm μέσα σε φιαλίδιο των 8mL πωματίζεται με πόμα PTFE και τοποθετείται στην κατάψυξη μέχρι την παρασκευή των δ/των εργασίας.

2.2. Παρασκευή προτύπων δ/των

Παρασκευάστηκε δ/μα παρακαταθήκης glyphosate σε νερό συγκέντρωσης 500 mg/L. Από αυτό παρασκευάστηκαν δ/τα εργασίας σε οξινομένη μεθανόλη 1% HCOOH, εκχύλιση σταφύλι (όξινο υπόστρωμα) και τομάτας (υψηλή περιεκτικότητα σε νερό) σε συγκέντρωση 2 mg/L. Τα διαλύματα παρασκευάστηκαν σε πλαστικά φιαλίδια και οι εγχύσεις στο χρωματογραφικό σύστημα πραγματοποιήθηκαν την ίδια ημέρα.

2.3. Παραγωγοποίηση glyphosate

Η παραγωγοποίηση του glyphosate πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη συγκεκριμένης ποσότητας του παραγώγου (FMOC-Cl ή Danzyl-Cl) παρουσία ρυθμιστικού δ/τος βορικού οξέος για ρύθμιση του pH στο 9 και παραμονή του τελικού δ/τος για 24h σε συνθήκες δωματίου. Τα διαλύματα παρασκευάστηκαν σε πλαστικά φιαλίδια έτσι ώστε το glyphosate να βρίσκεται σε συγκέντρωση 2mg/L. Τα Οι εγχύσεις στο χρωματογραφικό σύστημα πραγματοποιήθηκαν την ίδια ημέρα και με την ίδια μέθοδο χρωματογραφίας και συλλογής δεδομένων.

2.4. Προσδιορισμός με φασματομετρία μαζών

Για την μέτρηση του αναλύτη χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω δύο συστήματα υγρής χρωματογραφίας – φασματομετρίας μαζών:

Σύστημα υγρής χρωματογραφίας σε συνδυασμό με συζευγμένη φασματομετρία μαζών (LC-MS/MS). Ο ιονισμός των ουσιών έγινε με πηγή ηλεκτροδιάχυσης (ESI, electrospray ionization) σε λειτουργία αρνητικού ιονισμού. Οι παράμετροι του φασματομέτρου μάζας

ρυθμιστήκαν ως έξης: θερμοκρασία αερίου ξήρανσης 300°C, παροχή αερίου ξήρανσης 11 L/min., πίεση αερίου εκνέφωσης 30 psi. κελί θραυσματοποίησης άζωτο υψηλής καθαρότητας, 1,5mTorr, τάση τριχοειδούς 4000V, χρόνος συλλογής μεταπτώσεων 100msec. και τάση ανιχνευτή 1500V. Ο αναλυτής μαζών ήταν σε λειτουργία συλλογής πολλαπλών μεταπτώσεων (MRM). Για την ταυτοποίηση του glyphosate και του παραγώγου του *glyphosate-FMOC* χρησιμοποιήθηκαν 2 μεταπτώσεις.

Σύστημα υγρής χρωματογραφίας σε συνδυασμό με φασματομετρία μαζών χρόνου πτήσης ιόντων (LC-TOF). Ο ιονισμός των ουσιών έγινε με πηγή ηλεκτροδιάχυσης (ESI, electrospray ionization) σε λειτουργία αρνητικού ιονισμού. Οι παράμετροι του φασματομέτρου μάζας ρυθμιστήκαν ως έξης: θερμοκρασία αερίου ξήρανσης 300°C, παροχή αερίου ξήρανσης 11 L/min., πίεση αερίου εκνέφωσης 30 psi. τάση τριχοειδούς 4000V, τάση θραυσματοποίησης πηγής 190V. Ο αναλυτής μαζών ήταν σε λειτουργία καταγραφής πλήρους φάσματος με εύρος 100-1000 amu. Για την ταυτοποίηση του *glyphosate* και των παραγώγων του *glyphosate-FMOC* και *glyphosate-danzyl* χρησιμοποιήθηκαν 2 ιόντα με κύριο ιόν το ψευδομοριακό ([M-H]⁻).

Από βιβλιογραφικά και πειραματικά δεδομένα επιλέχθηκαν οι χαρακτηριστικότερες μεταπτώσεις και ιόντα για κάθε σύστημα. Για κάθε μετάπτωση έγιναν πειράματα για τον προσδιορισμό των βέλτιστων ρυθμίσεων ενεργείας τριχοειδούς στην πηγή και θραυσματοποίησης στο 2^ο τετράπολο (μόνο για το LC-MS/MS), με στόχο την επίτευξη της μέγιστης ευαισθησίας.

2.5. Χρωματογραφικός διαχωρισμός

Ο προσδιορισμός του *glyphosate* χωρίς παραγωγοποίηση απαιτεί ειδικές χρωματογραφικές συνθήκες. Οι Anastassiades, Kolberg; et al. (2012) χρησιμοποίησαν στήλη με πορώδη γραφίτη και στήλη ανιοανταλλαγής για τον διαχωρισμό του *glyphosate* σε φυτικό εκχύλισμα μεθανόλης. Οι τεχνικές αυτές χρωματογραφίας δοκιμάστηκαν στα πλαίσια της παρούσας μελέτης ως έξης:

Χρωματογραφία ανιοανταλλαγής. Ο διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε με στήλη ανιοανταλλαγής Dionex IonPacTM, AS11-HC, RFICTM, 250 mm, 2mm, με προστήλη ανιοανταλλαγής 50 mm x 2mm. Για την κινητή φάση, ο διαλύτης A ήταν 100% H₂O και ο διαλύτης B ήταν 100% H₂O με 1mM τριβασικό κιτρικό αμμώνιο. Το πρόγραμμα έκλουσης ήταν ισοκρατικό 50:50. Η ροή του διαλύτη έκλουσης είναι σταθερή 0,3 mL/min. και ο συνολικός χρόνος του προγράμματος είναι 20 min. Ο όγκος έγχυσης ήταν 20 μL.

Χρωματογραφία με πορώδη γραφίτη. Ο διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε με στήλη τύπου Hypercarb με πορώδη γραφίτη, 5μm, 2.1 mm x 100 mm, με προστήλη Hypercarb 3μm, 2.1 mm x 10 mm. Ο διαλύτης έκλουσης A ήταν 100% H₂O που περιέχει 1% οξικό οξύ. Ο διαλύτης έκλουσης B ήταν MeOH που περιέχει 1% οξικό οξύ. Το πρόγραμμα έκλουσης

ήταν ισοκρατικό 50:50. Η ροή του διαλύτη έκλουσης είναι σταθερή 0,3 mL/min. και ο συνολικός χρόνος του προγράμματος είναι 20 min. Ο όγκος έγχυσης ήταν 20 μ L.

Χρωματογραφία αντίστροφης φάσης. Ο διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε σε στήλη Zorbax XDB C₁₈ 150 x 2.1 mm, 3.5 μ m μέγεθος σωματιδίων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος 25 \pm 4°C. Για την κινητή φάση, ο διαλύτης A ήταν μίγμα 100% H₂O με 5 mM HCOONH₄, 0.1% HCOOH, 0.2% ακετονιτρίλιο και ο διαλύτης B 100% μεθανόλη με 5 mM HCOONH₄, 0.1% HCOOH. Η ροή της κινητής φάσης ήταν 0,2 mL/min. Το πρόγραμμα της βαθμωτής έκλουσης ξεκινάει από 20% B, αύξηση σε 90% B ως τα 15 min, ισοκρατικά ως τα 25 min, μείωση εντός 0,06 min στην αρχική σύσταση 20% B και εξισορρόπηση στην αρχική φάση για 10 min.

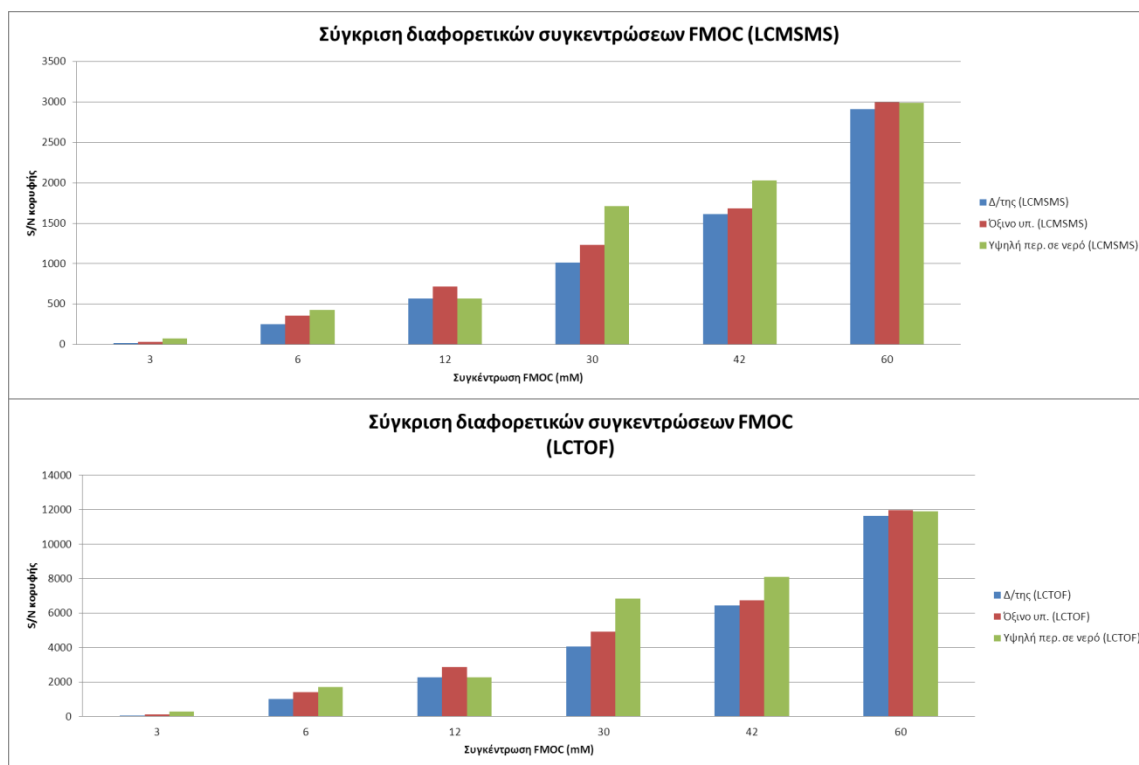
3. Αποτελέσματα και συζήτηση.

3.1. Βελτιστοποίηση συγκέντρωσης παραγωγοποίησης FMOC-Cl

Η παραγωγοποίηση με FMOC-Cl είναι η πιο δημοφιλής τεχνική για τον προσδιορισμό του *glyphosate* με χρωματογραφία αντίστροφης φάσης. Το αντιδραστήριο παραγωγοποίηση προστίθεται στο τελικό προς έγχυση εκχύλισμα. Η συγκέντρωση του αντιδραστηρίου παραγωγοποίησης είναι μία παράμετρος η οποία ποικίλει ανάλογα με την εφαρμογή. Οι Li *et al.* (2007) δοκίμασαν διαφορετικές ποσότητες του παραγώγου μεταξύ 0,1-5 mg με βέλτιστη ποσότητα τα 0,2 mg. Η παραγωγοποίηση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου. Συμφωνά με τους Nedelkoska *et al.* (2004) η συγκέντρωση του FMOC-Cl δεν πρέπει να ξεπερνά τα 0,5mM, η οποία αντιστοιχεί σε αναλογία *glyphosate*: FMOC-Cl αντιστοιχεί με 1:3000. Πάνω από αυτή την συγκέντρωση δεν παρατηρήθηκε αύξηση του σήματος.

Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης FMOC-Cl για την παραγωγοποίηση του *glyphosate*. Παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα σε διαλύτη καθώς και σε εκχυλίσματα σταφυλιού και τομάτας, συγκέντρωσης *glyphosate* 2 mg/L με διαφορετικές συγκεντρώσεις FMOC-Cl εύρους 3-60 mg/L. Όλα τα δ/τα παρασκευάστηκαν εις τριπλούν και κάθε δ/μα εγχύθηκε στο χρωματογραφικό σύστημα εις διπλούν.

Στο Διάγραμμα 1 παρατηρούμε το λόγο S/N της χρωματογραφίας κορυφής του παραγώγου *glyphosate*-FMOC σε δ/μα μεθανόλης, εκχυλίσματος σταφυλιού και εκχυλίσματος τομάτας. Όπως παρατηρείται, η βέλτιστη συγκέντρωση FMOC-Cl για την παραγωγοποίηση του *glyphosate* είναι τα 60 mg/L. Στο σημείο αυτό η αναλογία FMOC-Cl:*glyphosate* ίση με 30:1. Υψηλότερη συγκέντρωση δεν δοκιμάστηκε στην παρούσα μελέτη καθώς ακόμα και με αυτή την αναλογία η ευαισθησία του αναλύτη είναι κατά πολύ υψηλότερη σε σχέση με τις άλλες τεχνικές. Δεν παρατηρείται σημαντική επίδραση της μήτρας σε σχέση με το δ/τη, γεγονός που μπορεί να οφείλεται την εκλεκτικότητα της παραγωγοποίησης.



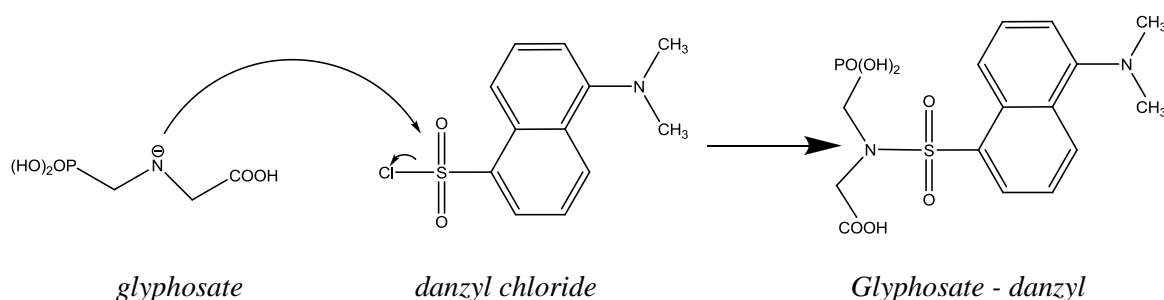
Διάγραμμα 1. Σύγκριση του λόγου S/N της απόκρισης του ανιχνευτή στο παράγωγο glyphosate-FMOC σε διαλύτη, όξινο υπόστρωμα και υπόστρωμα με υψηλή περιεκτικότητα σε νερό. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε 2 διαφορετικά συστήματα σε 6 επαναλήψεις.

3.2. Βελτιστοποίηση συγκέντρωσης παραγωγοποίησης Dansyl-Cl

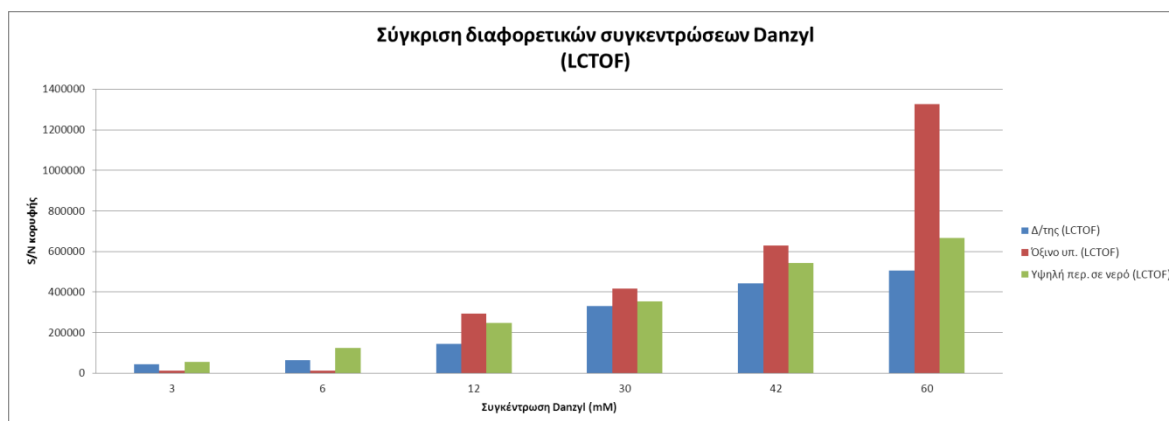
Το Dansyl-Cl είναι από τα πιο διαδεδομένα αντιδραστήρια φθορισμού. Αντιδρά με φαινόλες και πρωτοταγής/δευτεροταγής πρωτοταγείς/δευτεροταγείς αμίνες κάτω από βασικές συνθήκες δημιουργώντας φθορίζον σουλφονικό άλας ή σουλφοναμίδιο. Οι Noestheden *et al.* (2012) ανέπτυξαν μια αναλυτική μέθοδο για τον προσδιορισμό διχλωριωμένων φαινολών σε νερό, χρησιμοποιώντας dansyl-Cl ως αντιδραστήριο παραγωγοποίησης. Συνολικά 2,5 mM dansyl-Cl προστέθηκαν στο δείγμα νερού ακολούθησε ρύθμιση του pH στο 10 και το δείγμα αναλύθηκε χωρίς περαιτέρω επεξεργασία. Οι Chang *et al.* (2010) χρησιμοποίησαν Dansyl-Cl για την παραγωγοποίηση 30 φαινολικών ουσιών αραιωμένων σε υδατικό δ/μα διττανθρακικού νατρίου. Η παραγωγοποίηση πραγματοποιήθηκε στους 60°C για 5min. Οι Lien, Chen *et al.* (2009) δοκίμασαν δύο διαφορετικές συνθήκες παραγωγοποίησης των αναλυτών estrone, 17β-estradiol, estriol, 17β-ethinylestradiol, 4-nonylphenol, 4-tert-octylphenol και bisphenol A με Dansyl-Cl. Οι συνθήκες αυτές περιλάμβαναν την δημιουργία παραγώγου στους 60°C για 30 min. παρουσία 0.1N υδροξειδίου του νατρίου ή στις ίδιες συνθήκες παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος διττανθρακικού νατρίου 10mM (το pH ρυθμίζεται στο 10.5 με NaOH). Σε όλες τις περιπτώσεις ο προσδιορισμός των αναλυτών πραγματοποιήθηκε σε σύστημα υγρής χρωματογραφίας σε συνδυασμό με φασματομετρία μαζών. Σε αντίθεση με

το Fmoc-Cl η εφαρμογή του παραγώγου αυτού στην ανάλυση του *glyphosate* και στις αναλύσεις υπολειμμάτων γενικότερα δεν έχει ακόμα εφαρμογή.

Ομοίως με το Fmoc-Cl πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης Dansyl-Cl για την παραγωγή του *glyphosate*. Παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα με διαφορετικές συγκεντρώσεις Dansyl-Cl εύρους 3-60 mg/L, τόσο σε καθαρό διαλύτη καθώς όσο και σε εκχύλισμα σταφυλιού και τομάτας. Όλα τα δ/τα παρασκευάστηκαν εις τριπλούν και κάθε δ/μα εγχύθηκε στο χρωματογραφικό σύστημα εις διπλούν. Η μέτρηση του προϊόντος παραγωγής του *glyphosate-dansyl* πραγματοποιήθηκε μόνο σε σύστημα LC-TOF με το οποίο ταυτοποιήθηκε ο σχηματισμός του παραγώγου με συντακτικό τύπο ως εξής:



Στο Διάγραμμα 2 παρατηρούμε το λόγο S/N της χρωματογραφικής κορυφής του παραγώγου *glyphosate-danzyl* σε διάλυμα μεθανόλης, εκχυλίσματος σταφυλιού και εκχυλίσματος τομάτας. Ομοίως και εδώ η βέλτιστη συγκέντρωση dansyl-Cl για την παραγωγή του *glyphosate* είναι τα 60 mg/L που αντιστοιχεί σε αναλογία dansyl-Cl:*glyphosate* ίση με 30:1. Σε αντίθεση με το Fmoc-Cl, η επίδραση του υποστρώματος είναι σημαντική. Όταν το παράγωγο βρίσκεται σε φυτικό υπόστρωμα η ευαισθησία ενισχύεται σε σχέση με τον δ/τη. Ειδικότερα σε όξινο υπόστρωμα η ευαισθησία του παραγώγου είναι σημαντικά υψηλότερη σε σχέση με τον διαλύτη και με το υπόστρωμα σε υψηλή περιεκτικότητα σε νερό.

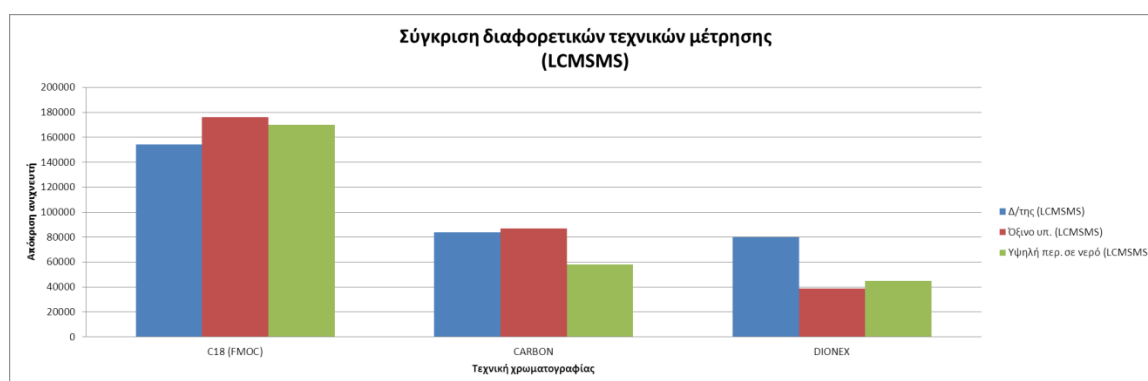


Διάγραμμα 2. Σύγκριση λόγου S/N της απόκρισης του ανιχνευτή του παραγώγου *glyphosate-danzyl* σε δ/τη, όξινο υπόστρωμα και υπόστρωμα με υψηλή περιεκτικότητα σε νερό. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε 6 επαναλήψεις.

3.3. Σύγκριση διαφορετικών τεχνικών μέτρησης

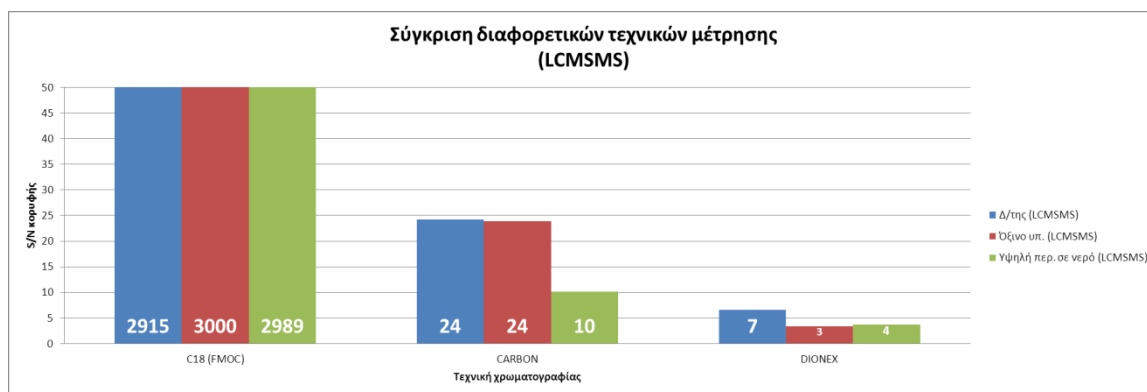
Ως κριτήρια σύγκρισης χρησιμοποιήθηκαν η απόκριση του ανιχνευτή καθώς είναι η περισσότερο χρησιμοποιούμενη παράμετρος για την ποσοτικοποίηση και το S/N για την εκτίμηση της ευαισθησίας του συστήματος. Ενώ η ταυτοποίηση του *glyphosate* πραγματοποιήθηκε με 2 μεταπτώσεις ή ιόντα, οι παράμετροι αυτές εκτιμήθηκαν για την μετάπτωση ποσοτικοποίησης στην περίπτωση του LC-MS/MS και για το μοριακό ιόν [M-H-] (ακρίβεια μαζών $\pm 5\text{ppm}$) για το LC-TOF. Ως προς αυτές τις παραμέτρους συγκρίθηκαν η τεχνική προσδιορισμού του *glyphosate* με χρήση στήλης πορώδη γραφίτη, ανιοανταλλαγής, παραγωγοποίησης με FMOC παραγωγοποίησης με danzyl. Η σύγκριση πραγματοποιήθηκε σε 2 αναλυτικά συστήματα (LC-MSMS και LC-TOF) για τις 3 πρώτες μεθόδους και σε σύστημα LC-TOF για όλες.

Από το Διάγραμμα 3 παρατηρούμε ότι η απόκριση του ανιχνευτή σε σύστημα LC-MS/MS είναι μεγαλύτερη με την μέθοδο παραγωγοποίησης με FMOC σε αντίθεση με τις άλλες 2 μεθόδους είτε ο αναλύτης βρίσκεται σε δ/τη ή υπόστρωμα.



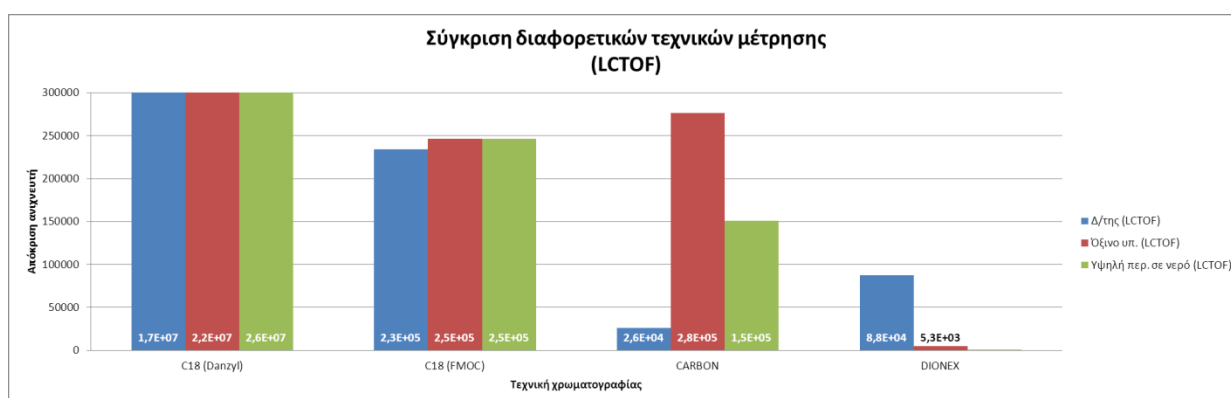
Διάγραμμα 3. Σύγκριση της απόκρισης του ανιχνευτή στο *glyphosate* με στήλη πορώδη γραφίτη και στήλη ανιοανταλλαγής και στο *glyphosate*-FMOC με στήλη αντίστροφης φάσης C₁₈. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε 6 επαναλήψεις σε σύστημα LC-MS/MS.

Η υπεροχή της τεχνικής παραγωγοποίησης με FMOC επιβεβαιώνεται και με την σύγκριση του S/N, όπως αυτή παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 4, στην οποία η ευαισθησία της μεθόδου είναι κατά πολύ μεγαλύτερη σε σχέση με τις υπόλοιπες 2 μεθόδους. Από τα παραπάνω διαγράμματα παρατηρούμε ότι ενώ οι επιφάνειες των χρωματογραφικών κορυφών δεν επηρεάζονται σημαντικά από την παρουσία υποστρώματος, το S/N μπορεί να επηρεαστεί στην περίπτωση της ανιοανταλλακτικής στήλης παρουσιάζοντας μείωση της ευαισθησίας και στις 2 περιπτώσεις που ο αναλύτης βρίσκεται σε υπόστρωμα και στην περίπτωση της στήλης με πορώδη γραφίτη όταν ο αναλύτης βρίσκεται σε φυτικό υπόστρωμα με υψηλή περιεκτικότητα σε νερό.

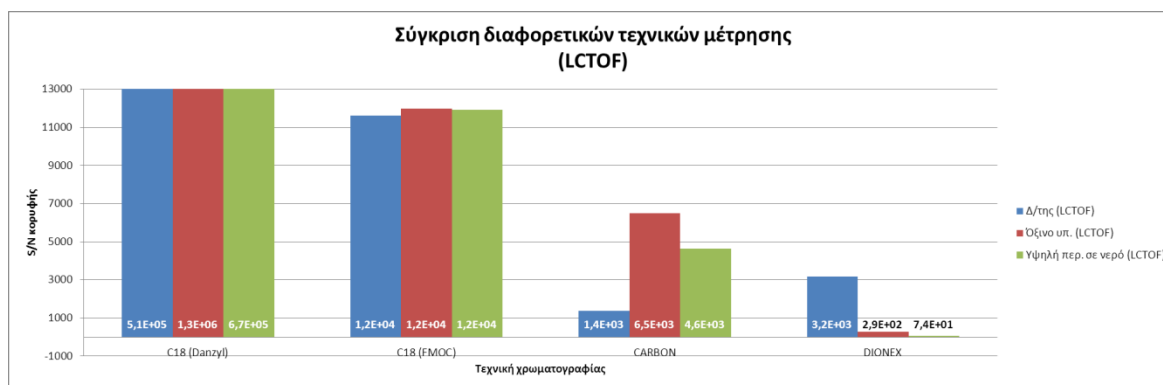


Διάγραμμα 4. Σύγκριση του λόγου S/N της απόκρισης του ανιχνευτή στο glyphosate με στήλη πορώδη γραφίτη και στήλη ανιοανταλλαγής και στο glyphosate-FMOC με στήλη αντίστροφης φάσης C₁₈. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε 2 διαφορετικά συστήματα σε 6 επαναλήψεις σε σύστημα LC-MS/MS.

Παρόμοια αποτελέσματα προκύπτουν όταν οι μετρήσεις αυτές πραγματοποιήθηκαν σε σύστημα LC-TOF. Από το Διάγραμμα 5 παρατηρούμε ότι η απόκριση του ανιχνευτή είναι μεγαλύτερη με τις μεθόδους παραγωγοποίησης (είτε με danzyl είτε με FMOC) είτε ο αναλύτης αναλύτης βρίσκεται σε διαλύτη είτε σε υπόστρωμα. Ειδικότερα η παραγωγοποίηση με danzyl παρουσίασε μεγαλύτερη απόκριση του ανιχνευτή σε αντίθεση με την πιο διαδεδομένη τεχνική με FMOC. Ομοίως στην περίπτωση του FMOC η επίδραση του υποστρώματος δεν είναι σημαντική. Όταν η παραγωγοποίηση γίνεται με danzyl παρατηρείται αύξηση της επιφάνειας της κορυφής με την παρουσία υποστρώματος. Ομοίως και στην περίπτωση ανάλυσης με στήλη πορώδη γραφίτη. Αντίθετα με την χρήση ανιοανταλακτικής στήλης η παρουσία υποστρώματος οδηγεί σε μείωση της επιφάνειας της κορυφής. Παρόμοια συμπεράσματα προκύπτουν με την σύγκριση του S/N, όπως αυτή παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 6.



Διάγραμμα 5. Σύγκριση της απόκρισης του ανιχνευτή στο glyphosate με στήλη πορώδη γραφίτη και στήλη ανιοανταλλαγής και στο glyphosate-FMOC και glyphosate-danzyl με στήλη αντίστροφης φάσης C₁₈. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε 6 επαναλήψεις σε σύστημα LC- LC-TOF.



Διάγραμμα 6. Σύγκριση του λόγου S/N της απόκρισης του ανιχνευτή στο glyphosate με στήλη πορώδη γραφίτη ή στήλη ανιοανταλλαγής και στο glyphosate-FMOC και glyphosate-danzyl με στήλη αντίστροφης φάσης C₁₈. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε 6 επαναλήψεις σε σύστημα LC-TOF.

4. Συζήτηση-Συμπεράσματα

Ο προσδιορισμός του *glyphosate*, όπως και πολλών άλλων ιοντικών αναλυτών με παρόμοια φυσικοχημικά χαρακτηριστικά, αποτελούν ειδική κατηγορία, των οποίων ο προσδιορισμός απαιτεί ειδικές αναλυτικές μεθόδους. Η τεχνική της υγρής χρωματογραφίας σε συνδυασμό με φασματομετρία μαζών αποτελεί την πιο διαδεδομένη τεχνική η οποία προσδίδει υψηλή εξειδίκευση και ευαισθησία. Η χρήση χρωματογραφίας με στήλη πορώδη γραφίτη και στήλη ανιοανταλλαγής παρότι δεν απαιτούν κάποιο στάδιο παραγωγοποίησης, είναι λιγότερο διαδεδομένες, μιας και είναι κατάλληλες για ένα μικρό ποσοστό φυτοπροστατευτικών προϊόντων και επιπλέον παρουσιάζουν έντονο το φαινόμενο της επίδρασης του υποστρώματος, όταν η μέθοδος επεξεργασίας του δείγματος δεν περιλαμβάνει στάδιο καθαρισμού. Αντίθετα οι τεχνικές παραγωγοποίησης παρουσιάζουν υψηλό επίπεδο εξειδίκευσης και υψηλότερη ευαισθησία σε σχέση με τις προηγούμενες ενώ η επίδραση του υποστρώματος δεν είναι έντονη.

5. Βιβλιογραφία

Anastassiades M. Kolberg D.I. Mack D. Barth A. Wildgrube C. Roux D. "Quick Method for the Analysis of Residues of numerous Highly Polar Pesticides in Foods of Plant Origin involving Simultaneous Extraction with Methanol and LC-MS/MS Determination (QuPPE-Method)". E. Commission. Stuttgart, 2012, CVUA Stuttgart.

Anastassiades M. Kolberg D.I. Mack D. Barth A. Wildgrube C. Roux D. "Quick Method for the Analysis of Residues of numerous Highly Polar Pesticides in Food Commodities involving Simultaneous Extraction with Methanol and Determination via LC-MS/MS (QuPPE-AO-Method) II. Food of Animal Origin." E. Commission. Stuttgart, 2013, CVUA Stuttgart.

Bohm D.A. Stachel C.S. Gowik, P. "Confirmatory method for the determination of streptomycin in apples by LC-MS/MS." *Analytica Chimica Acta* **672**(2010): 103-106.

Cao Z. Mou R. Chen M. "Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in rice using liquid chromatography-tandem mass spectrometry." *Se Pu* 28(8) 2010: 743-8.

Chang, H. Wan, Y. Naile, J. Zhang, X. Wiseman, S. Hecker, M. Lam, M. Giesy, J.P. Jones P. D. "Simultaneous quantification of multiple classes of phenolic compounds in blood plasma by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry." *Journal of Chromatography A* 1217(4) (2010): 506-513.

Colin R. Le Fur E. Charreteur C. Dufau C. Peron J.J. "Determination of glyphosate herbicide and (aminomethyl)phosphonic acid (AMPA) in water by liquid chromatography and fluorescence detection. Part II: Direct determination using precolumnderivatization with NBD-Cl." *Analisis* (2000) 28.

Khlorenko M. Wiczorek P. "Determination of glyphosate and its metabolite aminomethylphosphonic acid in fruit juices using supported-liquid membrane preconcentration method with high-performance liquid chromatography and UV detection after derivatization with p-toluenesulphonyl chloride." *Journal of Chromatography A*. 1093 (2005): 111-117.

Li B. Deng X. Guo D. Jin S. "Determination of Glyphosate and Aminomethylphosphonic Acid Residues in Foods Using High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry." *Chinese Journal of Chromatography* 25(4) (2007): 486-490.

Lien G.W. Chen C.Y. Wang G.S. "Comparison of electrospray ionization, atmospheric pressure chemical ionization and atmospheric pressure photoionization for determining estrogenic chemicals in water by liquid chromatography tandem mass spectrometry with chemical derivatizations." *Journal of Chromatography A* 1216(6) (2009): 956-966.

Nedelkoska, T. V. and G. K. C. Low. "High-performance liquid chromatographic determination of glyphosate in water and plant material after pre-column derivatisation with 9-fluorenylmethyl chloroformate." *Analytica Chimica Acta* 511(1) (2004): 145-153.

Noestheden M. Noot D. Hindle, R. "Fast, extraction-free analysis of chlorinated phenols in well water by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry." *Journal of Chromatography A* 1263(0) (2012): 68-73.