



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ:**

**“ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ  
ΠΟΙΟΤΗΤΑ-ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ”**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΤΙΤΛΟ:**

**«Ανάπτυξη της αναλυτικής  
μεθοδολογίας προσδιορισμού οργανοφωσφορικών  
φυτοφαρμάκων και μεταβολιτών τους με αέρια  
χρωματογραφία-φασματοσκοπία μαζών»**

**ΠΑΠΑΓΕΩΡΓΙΟΥ ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ του ΑΠΟΣΤΟΛΟΥ, Χημικός**

**ΛΑΡΙΣΑ, 2010**

Η τριμελής επιτροπή της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτελείται από τους:

- **κ. Ανδρέα Τσακάλωφ**, Αναπληρωτή Καθηγητή Ιατρικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- **κ. Ζαχαριάδη Γιώργο**, Αναπληρωτή Καθηγητή Αναλυτικής Χημείας του Τμήματος Χημείας της Σχολής Θετικών Επιστημών του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης
- **κ. Τσιρόπουλο Νικόλαο**, Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

*Στην μνήμη της Καλυψώς Παπαστεργίου,  
για όλη την αγάπη που μου προσέφερε.*

## Περίληψη

Στην παρούσα εργασία έγιναν βήματα προς την ανάπτυξη μεθόδου απομόνωσης και προσδιορισμού των διαλυτών φωσφορικών μεταβολιτών οργανοφωσφορικών φυτοφαρμάκων από υδατικά διαλύματα και εμβολιασμένα δείγματα ούρων με την συνδυασμένη τεχνική της αέριας χρωματογραφίας με φασματογραφία μαζών (GC/MS). Συγκεκριμένα, προσδιορίστηκαν οι διμεθυλ (dimethyl phosphate, DMP), διαιθυλ (diethyl phosphate, DEP), διμεθυλ θειο (dimethyl thiophosphate, DMTP) και διαιθυλ θειο (diethyl thiophosphate, DETP) οργανοφωσφορικοί μεταβολίτες οργανοφωσφορικών φυτοφαρμάκων, χρησιμοποιώντας σε όλες τις αναλύσεις ως εσωτερικό πρότυπο τον διβουτυλ οργανοφωσφορικό μεταβολίτη (dibutyl phosphate, DBP).

Κατά την προκατεργασία του δείγματος έγινε παραγωγοποίηση των δειγμάτων προς παραγωγή πτητικών παραγώγων με παραγωγοποιητή το πενταφθοροβενζυλο βρωμίδιο (PFBB<sub>r</sub>).

Ο διαχωρισμός των μεταβολιτών από το δείγμα και στην συνέχεια ο προσδιορισμός τους έγινε με την συνδυασμένη τεχνική της αέριας χρωματογραφίας - φασματοσκοπίας μαζών (GC/MS). Ως μέθοδος ιονισμού των δειγμάτων επιλέχθηκε ο ιονισμός με πρόσκρουση ηλεκτρονίων (electron ionization, EI) και ως τύπος αναλυτή μάζας η παγίδα ιόντων (Ion Trap).

Η συγκέντρωση των μεταβολιτών ήταν αρχικά της τάξεως μερικών mg/L ή ppm (parts per million) και τελικά επιτεύχθηκε απομόνωση και προσδιορισμός των οργανοφωσφορικών μεταβολιτών ως και το επίπεδο των μg/L ή ppb (parts per billion).

Οι επιλεγμένες παράμετροι εισαγωγής δείγματος, χρωματογραφικού διαχωρισμού και ανίχνευσης με φασματοσκοπία μαζών επέτρεψαν να επιτευχθεί πλήρης διαχωρισμός των προς μελέτη αναλυτών.

## **Περιεχόμενα**

### **Θεωρητικό μέρος**

#### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>ο</sup>: ΟΡΓΑΝΟΦΩΣΦΟΡΙΚΑ ΠΑΡΑΣΙΤΟΚΤΟΝΑ ΚΑΙ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΤΗΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΥΓΕΙΑ**

<i>1.1.Παρασιτοκτόνα – Γενικές πληροφορίες</i>	<i>-2-</i>
<i>1.2.Οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα (ΟΡ) – Ιστορική αναδρομή – Ταξινόμηση – Πηγές έκθεσης</i>	<i>-4-</i>
<i>1.2.1.Ιστορική αναδρομή</i>	<i>-4-</i>
<i>1.2.2.Ταξινόμηση των οργανοφωσφορικών φυτοφαρμάκων</i>	<i>-5-</i>
<i>1.2.3.Πηγές έκθεσης στα οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα.</i>	<i>-7-</i>
<i>1.3.Τοξικότητα των οργανοφωσφορικών φυτοφαρμάκων και επικινδυνότητα για την ανθρώπινη υγεία</i>	<i>-7-</i>

#### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2<sup>ο</sup>: ΒΙΟΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΣΤΗΝ ΠΡΟΑΣΠΙΣΗ ΤΗΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΥΓΕΙΑΣ ΑΠΕΝΑΝΤΙ ΣΤΑ ΟΡΓΑΝΟΦΩΣΦΟΡΙΚΑ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ**

<i>2.1.Εισαγωγή</i>	<i>-12-</i>
<i>2.1.1.Ιστορική αναδρομή</i>	<i>-12-</i>
<i>2.1.2.Εφαρμογές της βιοπαρακολούθησης στην μελέτη της έκθεσης του πληθυσμού σε περιβαλλοντικούς μολυντές</i>	<i>-13-</i>
<i>2.2.Βιοδείκτες και βιοπαρακολούθηση</i>	<i>-14-</i>
<i>2.3.Αναλυτικές μέθοδοι βιοπαρακολούθησης για την έκθεση σε οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα</i>	<i>-18-</i>

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3<sup>ο</sup>: ΘΕΩΡΗΤΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΕΡΙΑΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ (GC) - ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ ΜΑΖΩΝ (MS)

3.1.Χρωματογραφικές μέθοδοι διαχωρισμού	-23-
3.1.1.Θεωρητική βάση της χρωματογραφίας	-24-
3.1.2.Απόδοση διαχωρισμού – Θεωρητικές πλάκες	-27-
3.1.3.Η θεωρία της ταχύτητας	-28-
3.2.Οργανολογία αέριου χρωματογράφου	-30-
3.2.1.Στήλες αέριας χρωματογραφίας	-31-
3.2.2.Εγχυτές δείγματος	-34-
3.3.Φασματοσκοπία μαζών	-43-
3.3.1.Θεωρητική βάση της φασματοσκοπίας μαζών	-43-
3.3.2.Ερμηνεία φασμάτων μάζας	-44-
3.4.Οργανολογία φασματογράφου μαζών	-46-
3.4.1.Τεχνικές ιονισμού	-48-
3.4.2.Ιονισμός με πρόσκρουση ηλεκτρονίων ( <i>Electron Ionization, EI</i> )	-49-
3.4.3.Αναλυτές μάζας στην φασματοσκοπία μαζών	-52-
3.4.4.Αρχή λειτουργίας και διάταξη τετραπολικού φίλτρου μαζών	-52-
3.4.5.Διάταξη και αρχή λειτουργίας τετραπολικής παγίδας ιόντων	-54-
3.4.6.Θεωρία της παγίδας ιόντων	-58-
3.4.7.Διαδοχική φασματοσκοπία μαζών ( <i>Tandem Mass Spectrometry, MS/MS</i> )	-60-
3.5.Παραγωγποίηση δειγμάτων προς ανάλυση με αέρια χρωματογραφία	-64-
3.5.1.Σιλυλίωση	-65-
3.5.2.Αλκυλίωση	-66-
3.5.3.Αλκυλίωση	-66-

## Πειραματικό μέρος

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4<sup>ο</sup>: ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΟΡΓΑΝΟΦΩΣΦΟΡΙΚΩΝ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ

<i>4.1. Προκατεργασία δειγμάτων</i>	<i>-69-</i>
<i>4.1.1. Απομόνωση διαδλυτ φωσφορικών μεταβολιτών από πρότυπα υδατικά διαλύματα</i>	<i>-69-</i>
<i>4.1.2. Παραγωγοποίηση των διαλυτ φωσφορικών μεταβολιτών προς πτητικά παράγωγα.</i>	<i>-70-</i>
<i>4.2. Ανάπτυξη μεθοδολογίας ενόργανης ανάλυσης των δειγμάτων με αέρια χρωματογραφία – φασματοσκοπία μαζών (GC/MS)</i>	<i>-73-</i>
<i>4.2.1. Επιλογή παραμέτρων εισαγωγής δείγματος</i>	<i>-73-</i>
<i>4.2.2. Επιλογή παραμέτρων χρωματογραφικού διαχωρισμού</i>	<i>-76-</i>
<i>4.2.3. Επιλογή συνθηκών ανίχνευσης των χημικών ενώσεων με φασματογράφο μαζών</i>	<i>-77-</i>
<i>4.3. Εξαγωγή αποτελεσμάτων</i>	<i>-79-</i>
<i>Συμπεράσματα – Συζήτηση</i>	<i>-87-</i>
<i>Παράρτημα</i>	<i>-94-</i>
<i>Βιβλιογραφία</i>	<i>-101-</i>

## *Ευχαριστίες*

Θα ήθελα ειλικρινά να ευχαριστήσω το προσωπικό, διοικητικό και επιστημονικό, του Εργαστηρίου Υγιεινής και Επιδημιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (στους χώρους του οποίου εκπονήθηκε το πειραματικό μέρος της παρούσας διπλωματικής εργασίας) και κυρίως τον υποψήφιο διδάκτορα Κουρέα Μιχάλη, δίχως τις συμβουλές, τις παρατηρήσεις και την ανιδιοτελή βοήθεια που μου προσέφεραν, θα ήταν αδύνατη η ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας.



## ***Κατάσταση πινάκων***

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>ο</sup>: ΟΡΓΑΝΟΦΩΣΦΟΡΙΚΑ ΠΑΡΑΣΙΤΟΚΤΟΝΑ ΚΑΙ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΤΗΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΥΓΕΙΑ

**Πίνακας 1.1.** *Τοξικότητα οργανοφωσφορικών φυτοφαρμάκων σε θηλαστικά. Οι τιμές LD<sub>50</sub> δίνονται σε mg/kg σωματικού βάρους.* -8-

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2<sup>ο</sup>: ΒΙΟΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΣΤΗΝ ΠΡΟΑΣΠΙΣΗ ΤΗΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΥΓΕΙΑΣ ΑΠΕΝΑΝΤΙ ΣΤΑ ΟΡΓΑΝΟΦΩΣΦΟΡΙΚΑ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ

**Πίνακας 2.1.** *Παραδείγματα βιοδεικτών έκθεσης σε συγκεκριμένα φυτοφάρμακα* -16-

**Πίνακας 2.2.** *Αναλυτικές μέθοδοι προσδιορισμού οργανοφωσφορικών φυτοφαρμάκων και/ή μεταβολιτών τους σε βιολογικά δείγματα.* -22-

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3<sup>ο</sup>: ΘΕΩΡΗΤΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΕΡΙΑΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ (GC) - ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ ΜΑΖΩΝ (MS)

**Πίνακας 3.1.** *Φυσική αφθονία ισοτόπων κοινώς απαντούμενων χημικών στοιχείων.* - 45-

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4<sup>ο</sup>: ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΟΡΓΑΝΟΦΩΣΦΟΡΙΚΩΝ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ

**Πίνακας 4.1.** *Χημική δομή, μοριακά ιόντα και χρόνοι έκλυσης των διαλυτών φωσφορικών μεταβολιτών (DMP, DEP, DMTP και DETP) και του εσωτερικού προτύπου (DBP).* -88-

## **Κατάσταση σχημάτων**

### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>ο</sup>: ΟΡΓΑΝΟΦΩΦΩΣΦΟΡΙΚΑ ΠΑΡΑΣΙΤΟΚΤΟΝΑ ΚΑΙ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΤΗΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΥΓΕΙΑ**

**Σχήμα 1.1.** Χημικές δομές των διαφόρων ομάδων ενώσεων των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων.

-6-

**Σχήμα 1.2.** Μηχανισμός δράσης οργανικών φωσφορικών αλάτων, όπου φαίνεται το σύμπλοκο που σχηματίζουν τα οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα με την ακετυλχολινεστεράση (AChE) μέσω φωσφορυλίωσης του ενεργού κέντρου του ενζύμου.

-9-

### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2<sup>ο</sup>: ΒΙΟΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΣΤΗΝ ΠΡΟΑΣΠΙΣΗ ΤΗΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΥΓΕΙΑΣ ΑΠΕΝΑΝΤΙ ΣΤΑ ΟΡΓΑΝΟΦΩΣΦΟΡΙΚΑ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ**

**Σχήμα 2.1.** Υδρόλυση οργανοφωσφορικών φυτοφαρμάκων με διάσπαση του εστερικού δεσμού και σχηματισμό μιας υδροξυλομάδας στην θέση του.

-17-

**Σχήμα 2.2.** Γενική χημική δομή των οργανοφωσφορικών φυτοφαρμάκων και των διαλυτών φωσφορικών μεταβολιτών τους, που χρησιμοποιούνται ως βιοδείκτες έκθεσης σε αυτά.

-21-

### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3<sup>ο</sup>: ΘΕΩΡΗΤΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΕΡΙΑΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ (GC) - ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ ΜΑΖΩΝ (MS)**

**Σχήμα 3.1.** Βασική αρχή λειτουργίας της χρωματογραφίας, όπου φαίνεται ο διαχωρισμός των ουσιών από το αρχικό δείγμα λόγω της διαφορετικής τους κατανομής ανάμεσα στην κινητή και την στατική φάση.

-23-

**Σχήμα 3.2.** Αποκατάσταση δυναμικής ισορροπίας μετά την προσθήκη της ουσίας Α στο σύστημα των δύο μη αναμειγνυόμενων φάσεων.

-25-

**Σχήμα 3.3.** Τυπικό χρωματογράφημα.

-27-

**Σχήμα 3.4.** Γραφική παράσταση της εξίσωσης Van Deemter στην οποία απεικονίζεται η σχετική συνεισφορά του κάθε όρου σε συνάρτηση της ταχύτητας της κινητής φάσης.

-29-

**Σχήμα 3.5.** Βασικά τμήματα συστήματος αέριας χρωματογραφίας.

-31-

**Σχήμα 3.6.** Επίδραση της εσωτερικής διαμέτρου (I.D.) της στήλης.

-32-

<b>Σχήμα 3.7.</b> Επίδραση του μήκους της στήλης.	-33-
<b>Σχήμα 3.8.</b> Η χημική δομή της στατικής φάσης της στήλης αέριας χρωματογραφίας. Αποτελείται από 5% φαινυλο - 95% μεθυλοπολυσιλοξάνιο.	-33-
<b>Σχήμα 3.9.</b> Αποψη της διατομής της στήλης αέριας χρωματογραφίας. Διακρίνονται καθαρά τα υποστρώματα που αποτελούν την στήλη, δηλαδή η προστατευτική επικάλυψη (protective coating), η σωλήνωση τετηγμένου πυριτίου (fused silica tubing) και η στατική φάση (stationary phase)	-33-
<b>Σχήμα 3.10.</b> Split/Splitless Injector.	-34-
<b>Σχήμα 3.11.</b> On-column Injector (OCI).	-35-
<b>Σχήμα 3.12.</b> High Oven Temperature On-column Injector (HOT OCI)	-37-
<b>Σχήμα 3.13.</b> Large Volume On-column Injector (LVOCI)	-38-
<b>Σχήμα 3.14.</b> Packed Column Injector (PCI)	-39-
<b>Σχήμα 3.15.</b> Purged Packed Column Injector (PCI)	-40-
<b>Σχήμα 3.16.</b> Programmable Temperature Vaporizing Injector (PTV)	-41-
<b>Σχήμα 3.17.</b> Θερμοκρασίες και χρόνοι στην μέθοδο PTV Splitless	-42-
<b>Σχήμα 3.18.</b> Φάσμα μαζών οργανικής ένωσης, όπου διακρίνονται το μοριακό ιόν και η βασική κορυφή.	-45-
<b>Σχήμα 3.19.</b> Φάσμα μαζών του 2-χλωροπροπανίου. Διακρίνονται οι κορυφές $M^+$ και $M^+ + 2$ , που αντιστοιχούν στην ύπαρξη φυσικών ισοτόπων του ατόμου του χλωρίου ( $^{35}Cl$ και $^{37}Cl$ ).	-46-
<b>Σχήμα 3.20.</b> Βασικά τμήματα οργανολογίας φασματοσκοπίας μαζών.	-47-
<b>Σχήμα 3.21.</b> Διάταξη φασματογράφου μαζών. Διακρίνεται η πηγή ιόντων, όπου το δείγμα ιονίζεται και παράγονται ιόντα, τα οποία οδηγούνται στην συνέχεια στον αναλυτή μάζας. Εκεί διαχωρίζονται ανάλογα με τον λόγο της μάζας προς το φορτίο τους ( $m/z$ ) υπό την επίδραση μαγνητικού πεδίου και οδηγούνται στον ανιχνευτή.	-48-
<b>Σχήμα 3.22.</b> Σχηματικό διάγραμμα πηγής ιονισμού με πρόσκρουση ηλεκτρονίων, EI.	-49-
<b>Σχήμα 3.23.</b> Αριθμός ιόντων που παράγονται συναρτηθεί της ηλεκτρονιακής ενέργειας. Ένα πλατό μέγιστο εμφανίζεται περίπου στα 70eV.	-50-
<b>Σχήμα 3.24.</b> Λειτουργία τετραπόλου.	-54-
<b>Σχήμα 3.25.</b> Το πρώτο φάσμα μαζών που λήφθηκε με αναλυτή παγίδας ιόντων από τον Paul.	-54-

- Σχήμα 3.26.** Σχηματική αναπαράσταση ενός αναλυτή παγίδα ιόντων. -55-
- Σχήμα 3.27.** Γραφική αναπαράσταση της τροχιάς σχήματος δ των ιόντων μέσα υπό την επίδραση δυναμικού μέσα σε μια παγίδα ιόντων. -56-
- Σχήμα 3.28.** Τετραπολική παγίδα ιόντων. Δυο πλευρικά ηλεκτρόδια γειωμένα και ένα δακτυλιοειδές, στο οποίο εφαρμόζεται ένα αυξανόμενο rf δυναμικό. -56-
- Σχήμα 3.29.** Επεξεργασμένες σε υπολογιστή τροχιές κίνησης ιόντων με  $m/z=69$  μέσα στην παγίδα ιόντων με και χωρίς την επίδραση του φέροντος αερίου (ήλιο). -57-
- Σχήμα 3.30.** Σταθερή τροχιά (αριστερά), που αντιστοιχεί σε φανταστική λύση της εξίσωσης Mathieu, όπου  $a=0$  και  $0<\beta<1$ . Δεξιά, μια συνεχώς αμβλυνόμενη κίνηση των ιόντων, που αντιστοιχεί σε μια πραγματική λύση της εξίσωσης Mathieu. Στην περίπτωση αυτή, τα ιόντα θα αποφορτιστούν κατά μήκος του άξονα  $r$  και κατά μήκος του άξονα  $z$  θα εκδιωχθούν κατά 50% προς την κατεύθυνση του ανιχνευτή, ενώ τα υπόλοιπα θα εκδιωχθούν προς την αντίθετη κατεύθυνση. -59-
- Σχήμα 3.31.** Περιοχές σταθερότητας κατά μήκος των αξόνων  $r$  και  $z$  σε μια παγίδα ιόντων. Οι περιοχές μέσα σε αυτά τα όρια αναπαριστούν σταθερές τροχιές για την κάθε συντεταγμένη και αντιστοιχούν σε φανταστικές λύσεις της εξίσωσης Mathieu. Η κοινή περιοχή σταθερότητας κατά μήκος των αξόνων  $r$  και  $z$  παρατίθεται μεγεθυμένη δεξιά. -60-
- Σχήμα 3.32.** Εφαρμογή μιας ακολουθίας φασματοσκοπίας μαζών ( $MS^n$ ) για ένα σύμπλεγμα του ολεανολικού οξέος χρησιμοποιώντας παγίδα ιόντων Finnigan LCQ. Λαμβάνει χώρα σταδιακή απώλεια μορίων γλυκόζης και επιτυγχάνεται τελικά προσδιορισμός της χημικής δομής της αναλυόμενης ένωσης. -61-
- Σχήμα 3.33.** Σχηματική αναπαράσταση ενός τριπλού τετραπόλου. -62-
- Σχήμα 3.34.** Χημική δομή και ιδιότητες του πενταφθορο βενζυλοβρωμιδίου ( $PF_5Br$ ). -67-

#### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4<sup>ο</sup>: ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΟΡΓΑΝΟΦΩΣΦΟΡΙΚΩΝ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ

- Σχήμα 4.1.** Διάγραμμα ροής για την απομόνωση των διαλυτών φωσφορικών μεταβολιτών. -70-
- Σχήμα 4.2.** Διάγραμμα ροής για την παραγωγοποίηση, τον καθαρισμό και την εισαγωγή του δείγματος των οργανοφωσφορικών μεταβολιτών στον αναλυτή GC/MS. -72-
- Σχήμα 4.3.** Χρωματογραφικός διαχωρισμός και χρόνοι έκλουσης των παραγωγοποιημένων οργανοφωσφορικών μεταβολιτών. -87-



## ***ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ***

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>ο</sup>:**

### **ΟΡΓΑΝΟΦΩΣΦΟΡΙΚΑ ΠΑΡΑΣΙΤΟΚΤΟΝΑ ΚΑΙ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΤΗΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΥΓΕΙΑ**

#### 1.1.Παρασιτοκτόνα – Γενικές πληροφορίες

Ως παράσιτο ορίζεται οποιοσδήποτε ζωντανός οργανισμός, ο οποίος είτε εμφανίζεται εκεί όπου δεν είναι επιθυμητός, είτε προκαλεί βλάβες σε καλλιέργειες, ανθρώπους ή ζώα. Στην κατηγορία αυτή κατατάσσονται έντομα, τρωκτικά και άλλα ζώα, ανεπιθύμητα φυτά (ζιζάνια), μύκητες, μικροοργανισμοί όπως βακτήρια και ιοί, έως και prions – πρωτεϊνικά μόρια μικρού μεγέθους, η συμπεριφορά των οποίων σε βιολογικά συστήματα ομοιάζει αυτή των ιών. Ως παρασιτοκτόνο ορίζεται μία ουσία ή ένα μίγμα ουσιών, ένας βιολογικός, αντιμικροβιακός ή απολυμαντικός παράγοντας ή μία συσκευή, που χρησιμοποιείται για την πρόληψη, εξόντωση, απώθηση ή έλεγχο κάθε είδους παρασίτου. Η σημειολογία διαφέρει από χώρα σε χώρα: στην αμερικανική νομοθεσία, για παράδειγμα, συμπεριλαμβάνονται στα παρασιτοκτόνα οι ουσίες που χρησιμοποιούνται ως ρυθμιστές φυτικής ανάπτυξης, αποξήρανσης ή απομάκρυνσης των φύλλων <sup>[1]</sup>.

Η χρήση φυτοφαρμάκων στη γεωργία έχει αναπτυχθεί τα τελευταία περίπου 60 χρόνια. Η προστασία της γεωργικής παραγωγής και η εξόντωση βλαβερών παραγόντων και ζιζανίων γινόταν εδώ και αιώνες με τη χρήση ουσιών όπως το θειάφι, η νικοτίνη, το αρσενικό, ο θειικός χαλκός, ενώσεις υδραργύρου και διάφορες άλλες απλές ενώσεις. Κατά το μεσοπόλεμο και το δεύτερο παγκόσμιο πόλεμο, η ανάπτυξη της οργανικής χημείας είχε ως αποτέλεσμα τη σύνθεση καινούριων ουσιών με παρασιτοκτόνο δράση που χρησιμοποιήθηκαν στη γεωργία. Παράλληλα, η αλματώδης αύξηση του πληθυσμού της γης έκανε ουσιώδη την ανάγκη προστασίας της γεωργικής παραγωγής από τους εχθρούς της. Η επανάσταση όμως έγινε με την ανακάλυψη και στη συνέχεια χρήση των συνθετικών οργανοχλωριωμένων υδρογονανθράκων και ειδικότερα του DDT (dichlorodiphenyltrichloroethane) (Εικόνα 1.1)<sup>[2]</sup>. Η επιτυχής χρήση του DDT στην

καταπολέμηση των κουνουπιών και στην εξάλειψη της ελονοσίας που μεταδίδουν οδήγησε τους επιστήμονες σε διαρκή αγώνα δρόμου για την ανακάλυψη όλο και περισσότερων ουσιών, όλο και περισσότερο δραστικών. Το επόμενο βήμα των χλωριωμένων ουσιών ήταν τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα όπως το παραθεϊό. Με την πάροδο του χρόνου προστέθηκαν και άλλες κατηγορίες εντομοκτόνων όπως τα καρβαμιδικά και τα πυρεθρινοειδή.



**Εικόνα 1.1.** Τον Ιούλιο του 1945, το DDT θεωρήθηκε ευρέως (και λανθασμένα) ως ένα επαναστατικό μέσο για την εξάλειψη των μεταδοτικών ασθενειών από τα κουνούπια, δίχως να συνυπολογιστεί ο κίνδυνος που ενείχε για την ανθρώπινη υγεία. Στη φωτογραφία, γίνεται επίδειξη με ψεκασμό του νέου φυτοφαρμάκου σε παραλία της Νέας Υόρκης για να αποδειχθεί ότι δεν αποτελεί κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία.



## 1.2.Οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα (OP): Ιστορική αναδρομή – Ταξινόμηση- Πηγές έκθεσης

### 1.2.1 Ιστορική αναδρομή

Τα οργανοφωσφορικά συνετέθησαν για πρώτη φορά τον 19<sup>ο</sup> αιώνα αλλά στις αρχές της δεκαετίας του 1930 ο Γερμανός χημικός Gerhard Schrader παρατήρησε ότι μερικές αυτές τις ουσίες ήταν θανατηφόρες για τα έντομα και έτσι ξεκίνησε έρευνα για την ανάπτυξη και χρησιμοποίηση των ουσιών αυτών ως εντομοκτόνα. Η δυναμική της χρήσης των ουσιών αυτών και για άλλους σκοπούς αναγνωρίστηκε γρήγορα από τον γερμανικό στρατό και παράλληλα με τις έρευνες του Schrader για τα εντομοκτόνα, λάμβανε επίσης χώρα έρευνα για την ανάπτυξη και χρησιμοποίηση των ουσιών αυτών ως πολεμικά αέρια νεύρων <sup>[3]</sup>.

Μετά το τέλος του Β' Παγκοσμίου Πολέμου, τα χημικά αυτά χρησιμοποιήθηκαν ως φυτοφάρμακα στην αγροτική παραγωγή, για ψεκάσμο απέναντι στα κουνούπια, καθώς και για οικιακή χρήση. Τις δεκαετίες του '60 και του '70 οι επιδημιολόγοι στις Η.Π.Α. παρατήρησαν μια αύξηση στην επίπτωση του non-Hodgkin's lymphoma (NHL). Όταν αναπαρέστησαν τα περιστατικά στον χάρτη, ήταν ξεκάθαρο πως προερχόταν από αγροτικές περιοχές. Η αύξηση στην επίπτωση του NHL που παρατηρήθηκε ταυτόχρονα με την αύξηση της χρήσης των OP, παρακίνησε του επιδημιολόγους να θεωρήσουν ότι υπήρχε σύνδεση ανάμεσα στα δυο αυτά γεγονότα. Το βιβλίο της Rachel Carson *Silent Spring*<sup>[4]</sup> ξεκίνησε την αργή διαδικασία του να εγείρει πολιτικούς και δημόσιους προβληματισμούς για τους κινδύνους στην άγρια ζωή, στους ανθρώπους και στα οικοσυστήματα από την χρήση των OP <sup>[5]</sup>.

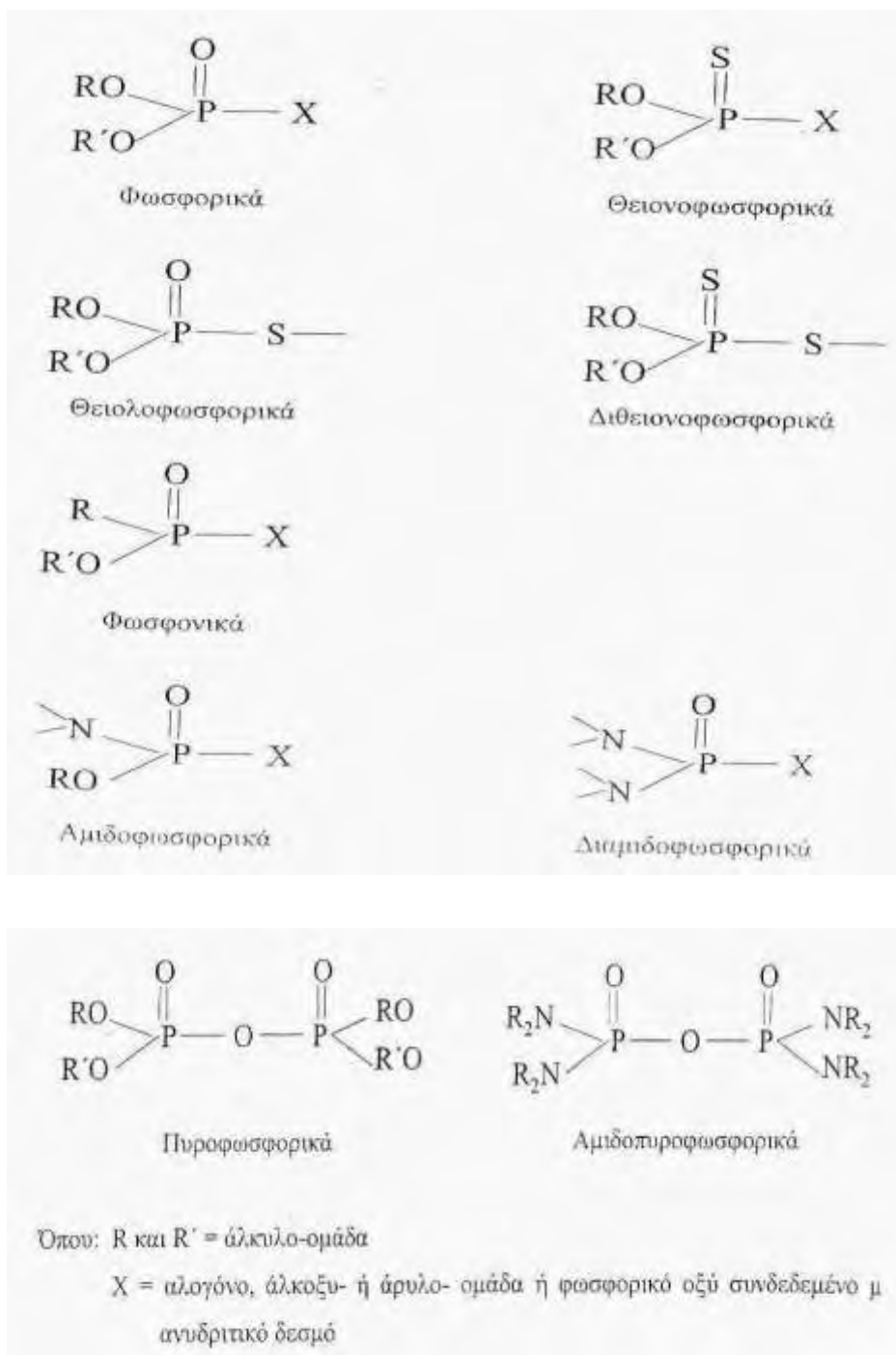
Από την δεκαετία του '60 άρχισε να γίνεται μείωση της χρήσης των οργανοχλωριωμένων παρασιτοκτόνων, λόγω του υψηλού χρόνου παραμονής τους στο περιβάλλον.

Αντικαταστάθηκαν από ενώσεις που μπορούσαν εύκολα να βιοαποικοδομηθούν σε λιγότερο τοξικά προϊόντα. Έτσι, εφόσον η συνολική διαχείριση των παρασιτοκτόνων συμπεριλαμβάνει την χρήση ενώσεων με την μικρότερη δυνατή παραμονή στο περιβάλλον και με όσο γίνεται πιο εξειδικευμένη δράση, τα οργανοφωσφορικά παρασιτοκτόνα ήταν η πρώτη επιλογή για τις συγκεκριμένες χρήσεις. Αργότερα αντικαταστάθηκαν από τα καρβαμιδικά, ωστόσο λόγω της γρήγορης βιοαποικοδόμησης τους, αποφασίστηκε η παράλληλη χρήση των καρβαμιδικών με τα οργανοφωσφορικά, έχοντας ως εφεδρεία τα οργανοχλωριωμένα παρασιτοκτόνα για ιδιαίτερες περιπτώσεις.

### 1.2.2. Ταξινόμηση των οργανοφωσφορικών φυτοφαρμάκων

Η πλειοψηφία των οργανοφωσφορικών ενώσεων είναι εστέρες του φωσφορικού, θειονοφωσφορικού και φωσφονικού οξέος ή ανυδριτικά αλογονούχα και αμιδικά παράγωγα των παραπάνω οξέων. Η ταξινόμηση τους μπορεί να γίνει στις παρακάτω κατηγορίες:

- i. Φωσφορικά (*phosphates*)
- ii. Θειονοφωσφορικά (*phosphorothiates*)
- iii. Θειολοφωσφορικά (*phosphorothiolates*)
- iv. Διθειονοφωσφορικά (*phosphorodithionates*)
- v. Φωσφονικά (*phosphonates*)
- vi. Αμιδοφωσφορικά (*phosphoramidates*)
- vii. Διαμιδοφωσφορικά (*phosphorodiamidates*)
- viii. Πυροφωσφορικά (*pyrophosphates*)
- ix. Αμιδοπυροφωσφορικά (*pyrophosphoramides*)



**Σχήμα 1.1.** Χημικές δομές των διαφόρων ομάδων ενώσεων των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων.

### 1.2.3. Πηγές έκθεσης του ανθρώπου στα οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα

Υπάρχουν αρκετές πηγές έκθεσης στα φυτοφάρμακα. Οι τρεις οδοί έκθεσης είναι μέσω του στόματος, μέσω του δέρματος και μέσω της αναπνοής. Φυτοφάρμακα που χρησιμοποιούνται για το γρασίδι ή τους κήπους σε οικίες, αθλητικές εγκαταστάσεις ή δημόσια πάρκα, εκθέτουν τους ανθρώπους και με τους τρεις παραπάνω τρόπους. Επίσης, μπορούν να μεταφερθούν στις οικίες από τον χώρο εργασίας μέσω της ένδυσης ή των μέσων μετακίνησης και να εκθέσουν τον ίδιο και τα μέλη της οικογένειας. Χρησιμοποιούνται επίσης στις φάρμες, στα θερμοκήπια και στους αγρούς από τα οποία παράγονται τρόφιμα που καταναλώνονται από τον πληθυσμό. Τέλος, τα ΟΡ που χρησιμοποιούνται στην αγροτική παραγωγή ή οικιακά, εισρέουν στα κατώτερα στρώματα του υπεδάφους και μολύνουν τα επιφανειακά ύδατα, εκθέτοντας έτσι ολόκληρο τον πληθυσμό σε αυτά.

#### 1.3. Τοξικότητα των οργανοφωσφορικών φυτοφαρμάκων και επικινδυνότητα για την ανθρώπινη υγεία

Η χρήση των παρασιτοκτόνων έχει χαρακτηριστεί «απαραίτητη» στην παραγωγή των προϊόντων διατροφής, ενώ μπορεί να εγκυμονεί βασικούς κινδύνους στην υγεία τόσο από τις επαγγελματικές όσο και από τις μη επαγγελματικές εκθέσεις σε αυτά. Τα τελευταία χρόνια πολυάριθμες μελέτες συσχετίζουν διάφορες δραστικές ουσίες παρασιτοκτόνου δράσης με παθήσεις χρόνιας νευροτοξικότητας, ενδοκρινικών διαταραχών, διαταραχών του ανοσοποιητικού, καρκινογένεσεων και μεταλλαξιογένεσεων διαμέσου διαφόρων οδών έκθεσης συμπεριλαμβανομένης της διατροφικής<sup>[6,7]</sup>.

Οι τοξικές αλληλεπιδράσεις των φυτοφαρμάκων με οποιοδήποτε βιολογικό σύστημα έχουν άμεση σχέση με την δόση τους. Η τοξικότητα εκφράζεται ως η δόση που προκαλεί τον θάνατο (*lethal dose, LD*) στο 50% του πληθυσμού που εξετάζεται (*LD<sub>50</sub>*). Οι τιμές

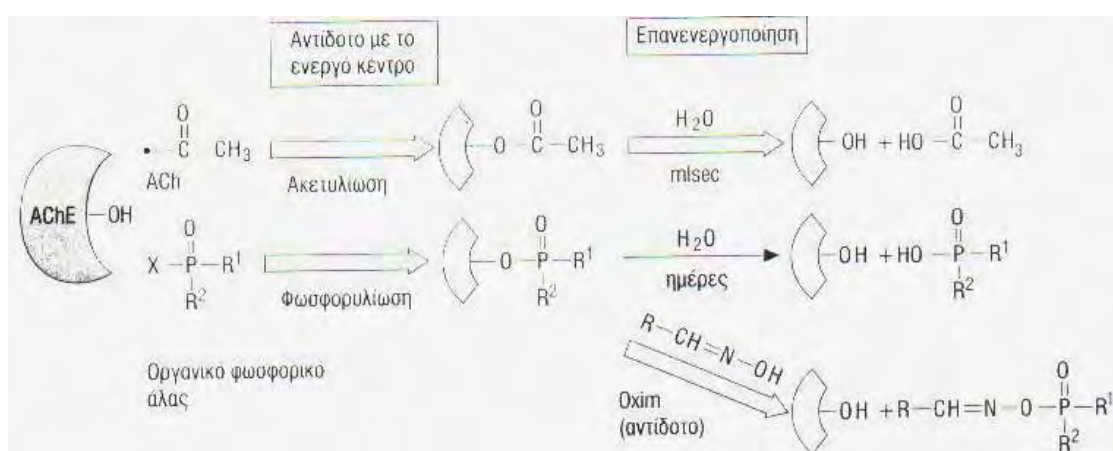
LD<sub>50</sub> εκφράζονται συνήθως σαν ποσότητα ανά μονάδα βάρους, π.χ. mg/kg. Στον Πίνακα 1 εμφανίζονται οι τιμές LD<sub>50</sub> οργανοφωσφορικών φυτοφαρμάκων για ποντίκια και κουνέλια, όπου έγινε λήψη των φυτοφαρμάκων μέσω της στοματικής και δερματικής οδού αντίστοιχα<sup>[8]</sup>.

**Πίνακας 1.1.** Τοξικότητα οργανοφωσφορικών φυτοφαρμάκων σε θηλαστικά. Οι τιμές LD<sub>50</sub> δίνονται σε mg/kg σωματικού βάρους.

Common name	Rat oral LD <sub>50</sub>	Rabbit dermal LD <sub>50</sub>
Acephate	1,030 – 1,447	>10,250
Azinphos-methyl	4	150 – 200 (rat)
Chlorpyrifos	96 – 270	2,000
Diazinon	1,250	2,020
Dimethoate	235	400
Disulfoton	2-12	3.6 – 15.9
Ethoprop	61.5	2.4
Fenamiphos	10.6 – 24.8	71.5 – 75.7
Malathion	5,500	>2,000
Methamidophos	13 (female only)	122
Methidathion	25 – 44	200
Methyl parathion	6	45
Naled	191	360
Oxydemeton-methyl	50	1,350
Phorate	2-4	20 – 30 (guinea pig)
Phosmet	147 – 316	>4,640
Profenofos	358	472

Τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα ασκούν την εντομοκτόνο δράση τους παρεμποδίζοντας το ένζυμο ακετυλοχολινεστεράση (*acetylcholinesterase, AchE*), το οποίο είναι απαραίτητο για την μεταβίβαση των νευρικών παλμών τόσο των εντόμων όσο και των θηλαστικών. Η ακετυλοχολίνη (*acetylcholine, Ach*), ένας νευρικός διαβιβαστής, διεξάγει την χημική μεταφορά του ενεργού δυναμικού στην νευρική σύναψη και απομακρύνεται ενζυμικά μέσω υδρόλυσης από την ακετυλοχολινεστεράση (*AchE*). Τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα είναι ικανά να σχηματίσουν ένα σταθερό σύμπλοκο-παρεμποδιστή του ενζύμου, φωσφορυλιώνοντας το ενεργό κέντρο του ενζύμου, καθώς εμγανίζουν ομοιότητα με το υπόστρωμα της ακετυλοχολίνης (*Ach*). Με

την παρεμπόδιση της ενζυμικής αυτής δράσης, οι νευρικοί παλμοί συνεχίζονται λόγω της παρατεταμένης παραμονής της ακετυλοχολίνης (ACh) στην νευρική σύναψη. Από την άλλη μεριά, τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα εστεροποιούνται από την υδροξυλομάδα του μορίου της ακετυλχολινεστεράσης. Κλινική σημειολογία οξείας δηλητηρίασης εμφανίζεται όταν η αναστολή της AChE υπερβαίνει το 50%, ενώ θάνατος επέρχεται όταν η αναστολή είναι πάνω από 90% και δεν προσφερθεί η κατάλληλη ιατρική υποστήριξη [7]. Κατά καιρούς έχουν αναφερθεί χιλιάδες οξείες δηλητηριάσεις από chlorpyrifos, η πλειονότητά των οποίων σχετιζόταν με αυτοκτονίες ή ατυχήματα, ενώ λιγότερες ήταν επαγγελματικές [9].



**Σχήμα 1.2.** Μηχανισμός δράσης οργανικών φωσφορικών αλάτων, όπου φαίνεται το σύμπλοκο που σχηματίζουν τα οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα με την ακετυλχολινεστεράση (AChE) μέσω φωσφορυλίωσης του ενεργού κέντρου του ενζύμου.

Όσον αφορά τη χρόνια τοξικότητα, οι ανησυχίες που εκφράζονται σήμερα έχουν σχέση με τις μακροχρόνιες δυσμενείς επιπτώσεις στο οικοσύστημα από τη συσσώρευση μικροποσοτήτων που μένουν σε αυτό μετά από κάθε εφαρμογή, και επιπλέον με τις επίσης μακροχρόνιες επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία από τη συνεχή και σε μικροποσότητες λήψη φυτοφαρμάκων κυρίως μέσω της κατανάλωσης τροφίμων και νερού.

Άτομα που εκτέθηκαν επανειλημμένα σε χαμηλές δόσεις OP, χωρίς να εκδηλώσουν χολινεργικά συμπτώματα, εμφάνισαν ύστερα από κάποιο χρονικό διάστημα, διαταραχές στην ικανότητα συγκέντρωσης, επίλυσης προβλημάτων, οπτικής προσοχής, αλλά και γνωστικές διαταραχές όπως εξασθένιση μνήμης, μείωση της ταχύτητας εκτέλεσης

εργασιών, μεταβολές της διάθεσης και συμπεριφοράς, όπως αϋπνία, κατάθλιψη, απώλεια προσανατολισμού κ.ά. . Οι παραπάνω διαταραχές οφείλονται κατά κύριο λόγο στο ότι τα οργανοφωσφορικά προκαλούν μόνιμη εκφύλιση του σεροτονεργικού συστήματος των πυρήνων του ραβδωτού σώματος του εγκεφάλου, ακόμα και σε υποτοξικές δόσεις . Η μειωμένη λειτουργία του σεροτονεργικού συστήματος αποτελεί το ορόσημο της κατάθλιψης καθώς και της εμφάνισης καταναγκαστικών και παρορμητικών συμπεριφορών<sup>[10]</sup>.

Η έκθεση στα οργανοφωσφορικά έχει επίσης σχετιστεί με συμπτώματα Παρκινσονισμού ή ακόμα με την εμφάνιση της νόσου αυτής, γιατί έχει βρεθεί ότι ασκούν κυτταροτοξικότητα στους δοπαμινεργικούς νευρώνες του εγκεφάλου και υπερρυθμίζουν την μεταφορά της δοπαμίνης από τους νευρώνες αυτούς της μέλαινας ουσίας στα συναπτικά κυστίδια στο ραβδωτό σώμα, ακόμα και σε σχετικά χαμηλές δόσεις . Η νόσος Parkinson (PD) άλλωστε είναι κυρίως αποτέλεσμα της εκφύλισης των δοπαμινεργικών ινών που συνιστούν μελαινοραβδωτή νευρική οδό του εγκεφάλου. Ο ακριβής μηχανισμός πρόκλησης βλαβών στο ντοπαμινεργικό σύστημα του εγκεφάλου δεν έχει ακόμα τεκμηριωθεί<sup>[11]</sup>.

Τα παιδιά είναι ευρέως εκτεθειμένα σε χαμηλά επίπεδα OP μέσω της τροφής και του περιβάλλοντος τους. Πολλά φυτοφάρμακα που παραμένουν στο περιβάλλον, συχνά μεταφέρονται σε μεγάλες αποστάσεις από τον τόπο εφαρμογής τους, ανιχνεύονται σε ανθρώπινους ιστούς και μεταφέρονται στα παιδιά μέσω του πλακούντα και του μητρικού γάλακτος. Σε σχέση με τους ενήλικες, τα παιδιά καταναλώνουν περισσότερη τροφή σε αναλογία με το σωματικό τους βάρος, με αποτέλεσμα να δέχονται μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Η είσοδος των τεσσάρων βασικών OP (chlorpyrifos, malathion, diazinon and atrazine) φαίνεται να γίνεται πρωταρχικά από την στερεή τροφή. Τα παιδιά παρουσιάζουν κάποια μοναδικά χαρακτηριστικά σε σχέση με τους κίνδυνους από την έκθεση σε OP. Η πιο ευαίσθητη περίοδος είναι κατά την ανάπτυξη του εμβρύου, όπου ο εγκέφαλος μπορεί να επηρεαστεί από το περιβάλλον του καθ' όλες τις φάσεις ανάπτυξής του. Όσον αφορά τις γυναίκες, είναι πιθανόν η επόμενη γενιά που θα γεννηθεί να επηρεαστεί από την έκθεση της προ-προηγούμενης. Ένα τέτοιο νεογέννητο παιδί θα έχει χαμηλά επίπεδα του ενζύμου paraoxanase-1, το οποίο αποτοξινώνει τα οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα. Τέλος, Οι περιβαλλοντικοί μολυντές ίσως αποτελούν

έναν ακόμα μεγαλύτερο κίνδυνο για την υγεία των παιδιών απ'ότι για τους ενήλικες για τον λόγο ότι τα παιδιά έχουν μεγαλύτερο προσδόκιμο επιβίωσης για να αναπτύξουν ασθένειες με μεγάλο χρόνο επώασης<sup>[12]</sup>. Οι έγκυες, επίσης, αποτελούν μια ομάδα του πληθυσμού με ξεχωριστό κίνδυνο. Τα στοιχεία δείχνουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης οξείας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας όταν χρησιμοποιούνται ΟΡ για οικιακή χρήση κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης. Γυναίκες οι οποίες προσπαθούν να συλλάβουν παιδί χρειάζονται ειδική ενημέρωση για την αποφυγή χρήσης ή έκθεσης σε οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα στον χώρο εργασίας ή σε οικιακούς χώρους. Από τα παραπάνω γίνεται σαφές ότι οργανοφωσφορικά ενέχουν πολύ περισσότερους κινδύνους για την ανθρώπινη υγεία από αυτούς που πιστευόταν αρχικά, όπως η οξεία τοξίνωση. Μάλιστα οι κίνδυνοι δεν φαίνεται να είναι τόσο σπάνιοι αφού ελλοχεύουν ακόμα και σε χαμηλές δόσεις, αν και μακροχρόνια έκθεσης. Λαμβάνοντας υπόψη την εκτεταμένη χρήση των οργανοφωσφορικών και την αύξηση του προσδόκιμου επιβίωσης στο σύγχρονο κόσμο, η εκτίμηση της επικινδυνότητας ενός παρασιτοκτόνου παράγοντα πρέπει να λαμβάνει υπόψη τη μακροχρόνια επίδρασή του στον πληθυσμό, ακόμα και αν δε βιοσυσσωρεύεται.

Έτσι, για την προάσπιση της ανθρώπινης υγείας από την τοξική δράση των παρασιτοκτόνων ακολουθούνται σήμερα αυστηρές διαδικασίες εκτίμησης της οξείας και χρόνιας τοξικότητας των παρασιτοκτόνων. Επίσης, έχουν αναπτυχθεί διαδικασίες εκτίμησης της έκθεσης του πληθυσμού στα παρασιτοκτόνα και άλλους περιβαλλοντικούς μολυντές με παρακολούθηση των συγκεντρώσεων τους στα βιολογικά δείγματα, με μεθοδολογία γνωστή και ως βιοπαρακολούθηση.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2<sup>ο</sup>:

### ***ΒΙΟΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΣΤΗΝ ΠΡΟΑΣΠΙΣΗ ΤΗΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΥΓΕΙΑΣ ΑΠΕΝΑΝΤΙ ΣΤΑ ΟΡΓΑΝΟΦΩΣΦΟΡΙΚΑ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ***

#### 2.1.Εισαγωγή

*Η βιοπαρακολούθηση ορίζεται ως μια μέθοδος αποτίμησης της ανθρώπινης έκθεσης σε χημικές ουσίες μετρώντας τις ουσίες αυτές καθαυτές ή τους μεταβολίτες τους σε αντιπροσωπευτικά δείγματα, όπως το αίμα ή τα ούρα<sup>[13]</sup>.*

Ο προσδιορισμός χημικών ουσιών στα ανθρώπινα υγρά ή ιστούς χρησιμοποιήθηκε αρχικά στο πεδίο της επαγγελματικής ιατρικής για την προστασία της υγείας των εκτιθέμενων εργαζομένων. Ο προσδιορισμός μολύβδου ή μεταβολιτών του βενζολίου στο αίμα ή στην ουρία είναι πρώιμα παραδείγματα της βιοπαρακολούθησης (biomonitoring). Την δεκαετία του '60 αναπτύχθηκαν αναλυτικές τεχνικές οι οποίες επέτρεπαν την μέτρηση πολύ χαμηλών συγκεντρώσεων χημικών ουσιών στο αίμα και την ουρία, προκαλούμενες από περιβαλλοντική έκθεση σε αυτές.

Τα δεδομένα από τις μελέτες βιοπαρακολούθησης αρχίζουν να γίνονται ευρέως διαθέσιμα και αυξάνεται συνεχώς η χρήση τους για την κατανόηση της επίδρασης χημικών ουσιών στην ανθρώπινη υγεία. Την ίδια ώρα, επιστήμονες, αξιωματούχοι της δημόσιας υγείας και το κοινό εγείρουν ερωτήματα όσον αφορά την ποιότητα των δεδομένων αυτών, τι στοιχεία μας δίνουν για τον εν δυνάμει κίνδυνο της ανθρώπινης υγείας και πως μπορούν μελλοντικές μελέτες να απαντήσουν σε αυτά τα ερωτήματα <sup>[14]</sup>.

#### ***2.1.1.Ιστορική αναδρομή***

Η βιοπαρακολούθηση έχει τις ρίζες της στην ανάλυση βιολογικών δειγμάτων για δείκτες διάφορων φαρμακευτικών ουσιών ή χημικών που χρησιμοποιούνταν επαγγελματικά, το οποίο αποσκοπούσε στην πρόληψη της συσσώρευσης στο ανθρώπινο σώμα βλαβερών ουσιών.

Παρ'ότι είχε διαφορετικό όνομα κατά καιρούς, η γενική ιδέα πρωτοεμφανίστηκε πριν από περίπου 130 χρόνια, όταν ιατροί παρακολούθησαν τα επίπεδα του σαλικυλικού οξέος σε δείγματα ούρων ασθενών με ρευματοπάθειες, στους οποίους χορηγούνταν θεραπεία με υψηλές δόσεις σαλικυλικού οξέος (πρόδρομος της ασπιρίνης). Στια αρχές της δεκαετίας του 1890, σε βιομηχανικούς εργάτες οι οποίοι εκτίθεντο σε μόλυβδο άρχισαν να παρακολουθούνται δείγματα αίματος και ουρίας αυτών, με σκοπό να προληφθούν υψηλά επίπεδα μολύβδου που μπορούν να προκαλέσουν οξεία δηλητηρίαση. Γρήγορα οι ειδικοί της έρευνας αυτής συνειδητοποίησαν ότι ο βαθμός επαφής με μια συγκεκριμένη ουσία δεν προσδιορίζει απαραίτητα την βιολογική σχετική έκθεση σε αυτή την ουσία. Ως αποτέλεσμα, η μέτρηση αυτή δεν βοήθησε πολύ στην πρόληψη του κινδύνου για δηλητηρίαση από μόλυβδο. Παρ'όλα αυτά, βρήκαν ότι το ποσό μιας ουσίας που διασχίζει τον οργανισμό (καλείται εσωτερική ή απορροφούμενη δόση ή μερικές φορές σωματικό φορτίο) έχει σημαντική αξία για την εκτίμηση του κινδύνου για την υγεία <sup>[15]</sup>.

### ***2.1.2.Εφαρμογές της βιοπαρακολούθησης στην μελέτη της έκθεσης του πληθυσμού σε περιβαλλοντικούς μολοντές***

Η βιοπαρακολούθηση παρουσιάζει μεγάλη χρησιμότητα, καθώς παρέχει ένα αποτελεσματικό και οικονομικά αποδοτικό μέσο μέτρησης της έκθεσης. Τα δεδομένα αυτά-όταν συνδυάζονται με επιδημιολογικά, τοξικολογικά ή δεδομένα φαρμακοκινητικής-μπορούν να εκτιμήσουν την ποσότητα που έχει απορροφηθεί από τον οργανισμό και να παράσχουν μια μέτρηση του κινδύνου που ενέχει για την υγεία. Όταν συναθροίζονται για ολόκληρο τον πληθυσμό, τα δεδομένα αυτά μπορούν να βοηθήσουν στο να ταυτοποιηθούν νέα χημικά που βρίσκονται σε περιβαλλοντικά και/ή ανθρώπινα δείγματα και στο να καθοριστεί η κατανομή της έκθεσης ανάμεσα στον γενικό πληθυσμό. Επίσης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ταυτοποίηση πληθυσμών, όπως τα βρέφη και τα παιδιά, οι οποίοι ίσως έχουν υψηλότερη έκθεση απ'ότι ο γενικός πληθυσμός. Οι αρμόδιοι φορείς μπορούν να αποτιμήσουν του περιβαλλοντικούς κινδύνους για συγκεκριμένα μέρη ή ομάδες του πληθυσμού. Στην επαγγελματική και κλινική ιατρική, η βιοπαρακολούθηση μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο επίβλεψης

για την ερμηνεία ενός κλινικού προβλήματος ή για την παρακολούθηση μιας τάσης έκθεσης.

Αρκετά αξιοπρόσεκτα παραδείγματα τονίζουν την συνεισφορά των δεδομένων βιοπαρακολούθησης στην λήψη αποφάσεων και επιβολή κανονισμών δημόσιας υγείας. Ένα από αυτά ήρθε στα μέσα της δεκαετίας του '70 , όταν οι Η.Π.Α. αποφάσισαν την σταδιακή απόσυρση της βενζίνης με μόλυβδο . Πριν από την απόφαση αυτή, παραδοσιακά μοντέλα πρότειναν ότι ο περιορισμός του μολύβδου στην βενζίνη θα είχε ένα ασήμαντο αποτέλεσμα στην λαμβανόμενη ποσότητα του μετάλλου αυτού από τον πληθυσμό. Παρ'όλα αυτά, τα δεδομένα βιοπαρακολούθησης που συλλέχθηκαν από το 1976 ως το 1980 (καθώς εισήχθη για πρώτη φορά η χρήση της αμόλυβδης βενζίνης και ο μόλυβδος της βενζίνης ελαττώθηκε κατά 55%) έδειξαν ότι υπήρχε μια παράλληλη μείωση του ποσού του μολύβδου που υπήρχε και στο αίμα του πληθυσμού των Η.Π.Α. Συνολικά, ο μέσος όρος συγκέντρωσης του μολύβδου ελαττώθηκε από τα 16 σε λιγότερο από 10  $\mu\text{g Pb/dl}$  αίματος <sup>[16]</sup>. Τα δεδομένα αυτά απέδειξαν την αποτελεσματικότητα της απόσυρσης της βενζίνης με μόλυβδο και ήταν ο κυρίαρχος παράγοντας στην απόφαση της Υπηρεσίας Περιβαλλοντικής Προστασίας (EPA) των Η.Π.Α. να επιταχύνει την απόσυρση αυτή, η οποία ολοκληρώθηκε το 1991. Πλέον, τα επίπεδα μολύβδου στο αίμα κατά μέσο όρο στις Η.Π.Α. δεν ξεπερνούν τα 2  $\mu\text{g Pb/dl}$  αίματος<sup>[17]</sup>.

## 2.2.Βιοδείκτες και βιοπαρακολούθηση

*Βιολογικός δείκτης ή βιοδείκτης (biomarker) είναι ένας δείκτης που μετράει την κατάσταση σε ένα βιολογικό σύστημα ή δείγμα. Ο βιολογικός δείκτης μετράει τη έκθεση ενός οργανισμού σε συγκεκριμένες ουσίες ή τις αλλαγές στην βιολογική δομή αυτού και τις βιολογικές διεργασίες που δύναται να προκύψουν από την έκθεση.*

Οι βιοδείκτες έχουν κατηγοριοποιηθεί ως βιοδείκτες έκθεσης, αποτελέσματος και επιδεκτικότητας:

● **Βιοδείκτες έκθεσης:**

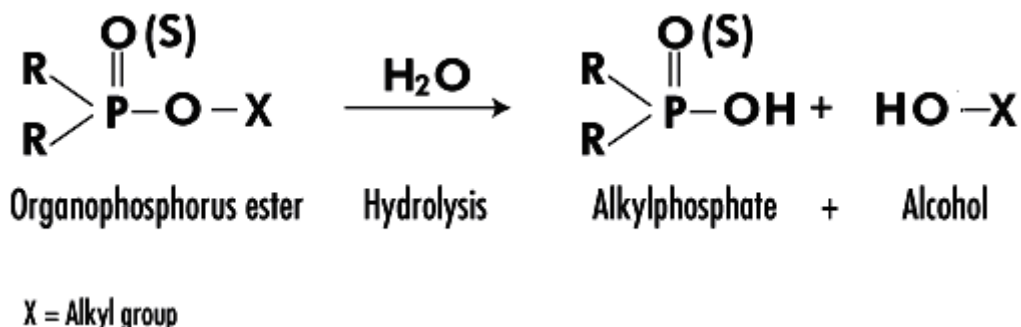
*Ένας βιολογικός δείκτης έκθεσης είναι μια χημική ουσία της οποίας οι μεταβολίτες ή το προϊόν αλληλεπίδρασης της με ένα μόριο-στόχο ή κύτταρο μετρώνται μέσα στον οργανισμό.*

Οι βιοδείκτες έκθεσης σε χημικές ουσίες αποτιμούνται με την μέτρηση της συγκέντρωσης τους σε κατάλληλα δείγματα, όπως αίμα, ορός αίματος ή ουρία<sup>[18]</sup>(Πίνακας 2.1). Η συγκέντρωση μιας πτητικής ουσίας μπορεί να μετρηθεί στον εκπνεόμενο αέρα. Αν η χημική ουσία μεταβολίζεται μέσα στον οργανισμό, ένας ή περισσότεροι μεταβολίτες μπορούν να προσδιοριστούν σε ένα δείγμα, π.χ. ουρίας. Τυπικά παραδείγματα είναι η μέτρηση διοξινών στο αίμα ή στον λιπώδη ιστό, υδραργύρου στις τρίχες της κεφαλής, βενζόλιο στον εκπνεόμενο αέρα και καδμίου στα ούρα. Η μέτρηση από μόνη της ενός βιοδείκτη σε ένα βιολογικό υπόστρωμα αποδεικνύει μόνο ότι το χημικό αυτό βρίσκεται στον οργανισμό. Αν είναι γνωστό ότι η παρουσία της ουσίας δεν είναι ενδογενής, τότε μπορεί να συμπεραθεί ότι μεταφέρθηκε στον οργανισμό από το εξωτερικό του περιβάλλον. Όποια περεταίρω ερμηνεία της συγκέντρωσης του βιοδείκτη έκθεσης απαιτεί επιπλέον πληροφορίες.

**Πίνακας 2.1.** Παραδείγματα βιοδεικτών έκθεσης σε συγκεκριμένα φυτοφάρμακα [19]

<b>Βιοδείκτης</b>	<b>Φυτοφάρμακο</b>
Κατάλοιπα φυτοφαρμάκων ή μεταβολιτών τους σε δείγματα ουρίας	Chlordane-Heptachlor DDT Deltamethrin Dichlorvos Permethrin Pentachlorophenol Atrazine
Κατάλοιπα στον λιπώδη ιστό	Chlordane-Heptachlor DDT
Κατάλοιπα στο αίμα	Aldicarb Chlordane-Heptachlor DDT Dichlorvos Pentachlorophenol
Κατάλοιπα στο δέρμα	Aldicarb
Προσδιορισμός γλυκεσταράσης	Aldicarb Dichlorvos

Όσον αφορά τα οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα, μέσω υδρόλυσης (Σχήμα 2.1) μεταβολίζονται σε κάποιους από τους ακόλουθους μη-χαρακτηριστικούς (κοινούς) διαλκυλ φωσφορικούς μεταβολίτες (*dialkyl phosphate, DAP*) : διμεθυλο φωσφορικός μεταβολίτης (*dimethyl phosphate, DMP*), διαιθυλο φωσφορικός μεταβολίτης (*diethyl phosphate, DEP*), διμεθυλο θειοφωσφορικός μεταβολίτης (*dimethyl thiophosphate, DMTP*), διαιθυλο θειοφωσφορικός μεταβολίτης (*diethyl thiophosphate, DETP*), διμεθυλο διεθειοφωσφορικός μεταβολίτης (*dimethyl dithiophosphate, DMDTP*) και διαιθυλο διεθειοφωσφορικός μεταβολίτης (*diethyl dithiophosphate, DEDTP*). Οι μεταβολίτες αυτοί μετρώνται ως δείκτες της έκθεσης του ανθρώπου στα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα.



**Σχήμα 2.1.** Υδρόλυση οργανοφωσφορικών φυτοφαρμάκων με διάσπαση του εστερικού δεσμού και σχηματισμό μιας υδροξυλομάδας στην θέση του.

• **Βιοδείκτες αποτελέσματος:**

Μια μετρήσιμη βιοχημική, φυσιολογική, συμπεριφορολογική ή άλλη διαφοροποίηση σε έναν οργανισμό η οποία, ανάλογα με το μέγεθος, μπορεί να συσχετιστεί με μια υπάρχουσα ή πιθανή βλάβη στην υγεία ή ασθένεια.

Οι βιοδείκτες αποτελέσματος χρησιμοποιούνται για να εκτιμήσουν αλλαγές που έχουν συμβεί σε βιοχημικό ή φυσιολογικό επίπεδο του οργανισμού ενός ατόμου. Μια ασυνήθιστη τιμή ενός βιοδείκτη αποτελέσματος ίσως να μην δείχνει κάποια επιζήμια επίδραση την υγεία του ατόμου ή του συνόλου του πληθυσμού, αν, για παράδειγμα, η διατάραξη είναι αναστρέψιμη και ληφθούν μέτρα που να βεβαιώνουν ότι η έκθεση που την προκάλεσε θα σταματήσει. Ωστόσο, η ασυνήθιστη αυτή τιμή μπορεί να αποτελέσει το έναυσμα για κάποια διορθωτική ενέργεια.

Παραδείγματα βιοδεικτών αποτελέσματος είναι η ενεργότητα της χολινεστεράσης του πλάσματος, η μικρογλουβίνη γ-2 της ουρίας και ο όγκος των ερυθρών κυττάρων (αιματοκρίτης) . Επίσης, πρόσφατες δημοσιεύσεις κατατάσσουν και τα παρακάτω ως παραδείγματα βιοδεικτών αποτελέσματος<sup>[20]</sup>: νέκρωση ηπατικών κυττάρων, μειωμένη πνευμονική λειτουργία, χαμηλό βάρος γέννησης και νοητική καθυστέρηση.

● **Βιοδείκτες επιδεκτικότητας:**

*Ο δείκτης μιας ενυπάρχουσας ή επίκτητης ικανότητας του οργανισμού να ανταποκρίνεται στην έκθεση σε μια συγκεκριμένη χημική ουσία.*

Ένας δείκτης επιδεκτικότητας, επίκτητος ή όχι, υποδεικνύει ότι ο συγκεκριμένος οργανισμός είναι ευαίσθητος στην επίδραση ενός ξενοβιοτικού παράγοντα ή στην επίδραση ενός συνδυασμού τέτοιων παραγόντων. Μια πολλά υποσχόμενη οπτική συσχετίζει την αυξημένη επιδεκτικότητα (υπερεπιδεκτικότητα) με την ελάττωση της ικανότητας αυτοπροστασίας του οργανισμού<sup>[21]</sup>. Το ανθρώπινο σώμα φαίνεται να έχει μια ιδιαίτερη ικανότητα να αντισταθμίζει τυχόν βλαβερές για αυτό επιδράσεις από χημικές ουσίες. Παρ'όλα αυτά, η αντίσταση αυτή απέναντι σε τοξικές χημικές ουσίες μπορεί να ελαττωθεί λόγω μιας προϋπάρχουσας ασθένειας ή λόγω επίδρασης διαφόρων περιβαλλοντικών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένου και της διατροφής ή του τρόπου ζωής του ατόμου. Έτσι, μια προηγούμενη έκθεση σε έναν ξενοβιοτικό παράγοντα δεν έχει επιφέρει απαραίτητα κάποιο τοξικό αποτέλεσμα αλλά μπορεί να προκάλεσε την εξασθένηση της άμυνας του οργανισμού. Παραδείγματα αυτού του τύπου βιοδεικτών είναι η εύρυθμη λειτουργία του ανοσοποιητικού και του αιμοποιητικού συστήματος ή η λειτουργία των νεφρών μετά φυσικά από έκθεση σε έναν ή περισσότερους ξενοβιοτικούς παράγοντες.

2.3. Αναλυτικές μέθοδοι βιοπαρακολούθησης για την έκθεση σε οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα

Μια ποικιλία τεχνικών έχουν εφαρμοστεί για την ανάλυση φυτοφαρμάκων και των κυριότερων μεταβολιτών τους σε βιολογικά δείγματα. Γενικά, όλες οι μέθοδοι μοιράζονται ένα κοινό σχήμα, το οποίο αποτελείται από τα εξής βήματα: α) Προεργασία του δείγματος που περιλαμβάνει διαχωρισμό, προσυγκέντρωση και ορισμένες φορές και παραγωγοποίηση του συστατικού ή των συστατικών, β) Ενόργανη ανάλυση του επεξεργασμένου δείγματος και γ) Κατάλληλη επεξεργασία των χρωματογραφικών

δεδομένων και εξαγωγή συμπερασμάτων. Η μεγάλη πλειοψηφία των τεχνικών αυτών αναπτύχθηκαν για κλινικές εφαρμογές ή για βιολογική παρακολούθηση υψηλών επιπέδων επαγγελματικής έκθεσης σε φυτοφάρμακα, όπως επίσης και για επιδημιολογικές μελέτες σε μη-επαγγελματικά εκτιθέμενα άτομα. Οι μεθοδολογίες αυτές έχουν εφαρμοστεί σε διάφορα βιολογικά δείγματα, όπως ορός αίματος, πλάσμα αίματος, αίμα, ομφάλιος λώρος, ούρα, μηκόνιο και αμνιακό υγρό.

Οι σύγχρονες μέθοδοι ανάλυσης φυτοφαρμάκων και των μεταβολιτών τους σε βιολογικά δείγματα έχουν ενσωματώσει νέες τεχνολογίες, οι οποίες βοηθούν στο να αναπτυχθούν και να εφαρμοστούν ποιο αποτελεσματικές διαδικασίες, έτσι ώστε να αυξηθεί η ακρίβεια και να ελαττωθεί ο απαιτούμενος χρόνος, το κόστος, η περιβαλλοντική επιβάρυνση και η έκθεση του επιστημονικού προσωπικού σε τοξικά χημικά. Για αυτόν τον λόγο, εφαρμόζονται διάφορες αναλυτικές τεχνικές, οι κυριότερες από τις οποίες είναι η αέρια χρωματογραφία- διαδοχική φασματοσκοπία μαζών σε σειρά (GC-MS/MS) και η υγρή χρωματογραφία- διαδοχική φασματοσκοπία μαζών (LC-MS/MS). Συνήθως, το σημείο κλειδί στις αναλυτικές αυτές διαδικασίες δεν είναι αυτή καθαυτή η ενόργανη ανάλυση αλλά η προεργασία για την απομόνωση των προς μελέτη συστατικών από το δείγμα. Με την πάροδο του χρόνου, πολλές τεχνικές αναπτύχθηκαν προς αυτήν την κατεύθυνση, όπως η εκχύλιση υγρού-υγρού, η εκχύλιση στερεής φάσης και η μικροεκχύλιση. Στις αναλυτικές μεθόδους που βασίζονται στις προαναφερθείσες τεχνικές, δόθηκε η δέουσα προσοχή στην απλοποίηση, ελάττωση και βελτίωση της εκχύλισης του δείγματος και των σταδίων καθαρισμού, τα οποία συνήθως είναι τα πιο χρονοβόρα και πολυέξοδα στάδια της ανάλυσης.

Μεταξύ των πιο πρόσφατων τεχνικών για την μέτρηση φυτοφαρμάκων σε βιολογικά δείγματα, η ταυτόχρονη ανάλυση πολλαπλών τάξεων φυτοφαρμάκων είναι η πιο κοινή από αυτές. Παρ'όλα αυτά, η ανάπτυξη της μεθόδου αυτής είναι μια πρόκληση, καθώς εκχυλίζονται και αναλύονται ταυτόχρονα συστατικά με διαφορετική πολικότητα, διαλυτότητα, πτητικότητα και τιμή  $pK_a$ <sup>[22]</sup>.

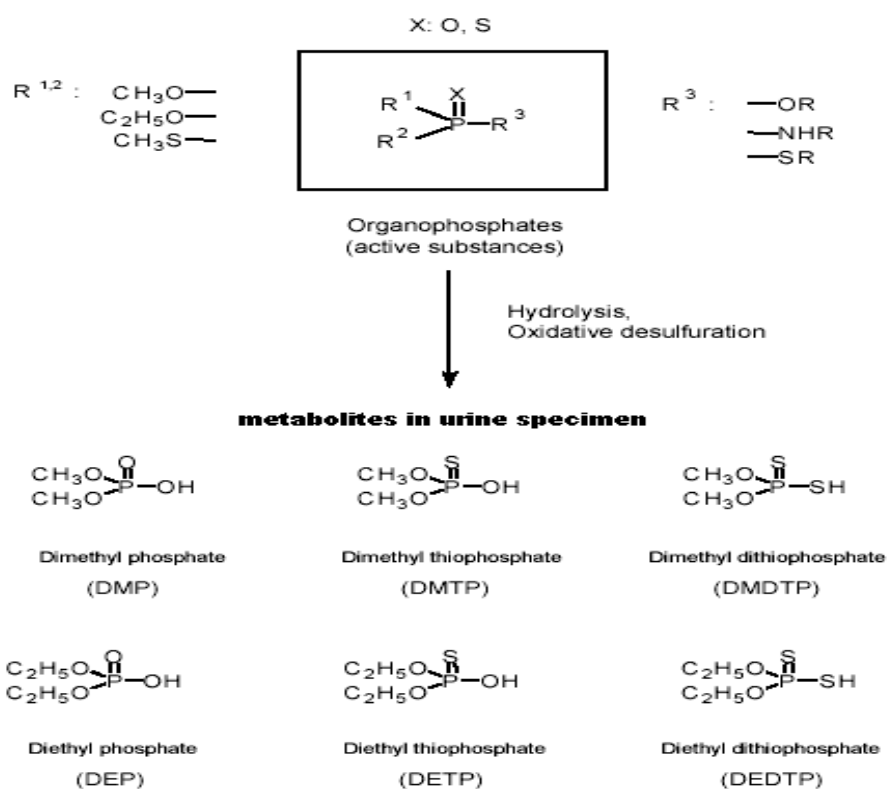
Χρονολογικά, οι στην αέρια χρωματογραφία- φασματοσκοπία μαζών (GC-MS) βασιζόμενες μέθοδοι ήταν μεταξύ των πρώτων ενόργανων τεχνικών για την παρακολούθηση της έκθεσης στα φυτοφάρμακα, ακολουθούμενες από την αέρια χρωματογραφία- διαδοχική φασματοσκοπία μαζών (GC-MS/MS). Η διαδοχική φασματοσκοπία μαζών (MS/MS) επιτρέπει υψηλής ειδικότητας ανάλυση



φασματοσκοπίας μαζών (MS) <sup>[23,24]</sup> και ως εκ τούτου μπορεί να βελτιώσει τα όρια ανίχνευσης της αποφεύγοντας τις περισσότερες από τις παρεμποδίσεις, ειδικά όταν αναλύονται πολύπλοκα βιολογικά δείγματα. Ωστόσο, ο αριθμός των συστατικών ή των προϊόντων αποσύνθεσης που εγείρουν την ανησυχία των επιστημόνων και δεν μπορούν να αναλυθούν άμεσα με την αέρια χρωματογραφία (GC) λόγω της χαμηλής τους πτητικότητας, της υψηλής τους πολικότητας και/ή της χαμηλής θερμικής τους σταθερότητας, έχει αυξηθεί δραματικά τα τελευταία χρόνια.

Ανάμεσα στις διάφορες τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση φυτοφαρμάκων, η υγρή χρωματογραφία (LC) είναι αποτελεσματική όσον αφορά τον διαχωρισμό μη-πτητικών και θερμικά ασταθών συστατικών<sup>[25]</sup>. Η χρήση της σε συνδυασμό με την φασματοσκοπία μαζών (MS) στην ανάλυση βιοδεικτών έκθεσης έχει αυξηθεί σημαντικά. Αναλυτικές τεχνικές που περιλαμβάνουν υγρή χρωματογραφία- διαδοχική φασματοσκοπία μαζών (LC-MS/MS) σε συνδυασμό με ιονισμό ατμοσφαιρικής πίεσης (API), ηλεκτροψεκασμό (ESI) και –κυρίως– χημικό ιονισμό ατμοσφαιρικής πίεσης (APCI), αν και είναι σχετικά ακριβές, φαίνεται να προσφέρουν υψηλή εκλεκτικότητα και ευαισθησία, κάτι το οποίο είναι επιθυμητό για ιχνοανάλυση βιολογικών δειγμάτων<sup>[26,27,28,29]</sup>. Οι τεχνικές αυτές έχουν την ευκολία, σε ορισμένες περιπτώσεις, για άμεση ανάλυση χωρίς την εκτεταμένη προεργασία του δείγματος και των σταδίων καθαρισμού<sup>[26,27]</sup>.

Τα οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα μεταβολίζονται γρήγορα στο ανθρώπινο σώμα, καθιστώντας αδύνατη τις περισσότερες φορές την μέτρηση αυτών καθαυτών των ουσιών στο αίμα ή τα ούρα. Τα θειούχα οργανοφωσφορικά, με το που εισέλθουν στο σώμα ενζυματικά μετατρέπονται στην οξο μορφή τους, η οποία στην συνέχεια αντιδράει με την διαθέσιμη χολινεστεράση<sup>[30]</sup>. Η οξο μορφή μπορεί στην συνέχεια ενζυματικά ή αυθόρμητα να υδρολυθεί και να σχηματίσει ένα χαρακτηριστικό μεταβολικό τμήμα και έναν μη-χαρακτηριστικό μεταβολίτη (DAP), ο οποίος είναι ένας κοινός μεταβολίτης αυτής της ομάδας ενώσεων. Αν δεν μετατραπούν στην οξο μορφή τους, μπορεί να υποστούν υδρόλυση και να δώσουν έναν χαρακτηριστικό μεταβολίτη και μη-χαρακτηριστικούς διακυκλο φωσφορικούς μεταβολίτες (διακυκλο θειοφωσφορικούς και/ή διακυκλο διθειοφωσφορικούς) (Σχήμα 2.2). Οι μεταβολίτες αυτοί και/ή τα γλυκουρονικά ή θειικά τους παράγωγα εκκρίνονται στην ουρία <sup>[30]</sup> και μετρούνται ως βιοδείκτες έκθεσης σε οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα.



**Σχήμα 2.2.** Γενική χημική δομή των οργανοφωσφορικών φυτοφαρμάκων και των διακυκλωσφωρικών μεταβολιτών τους<sup>[31]</sup>, που χρησιμοποιούνται ως βιοδείκτες έκθεσης σε αυτά.

Στις περισσότερες περιπτώσεις, οι πιο πρόσφατες αναλυτικές μέθοδοι που έχουν αναπτυχθεί εμπεριέχουν τον ταυτόχρονο προσδιορισμό και των έξι μεταβολιτών (DAP). Κάποιες από αυτές εμφανίζονται στον Πίνακα 3.1. Η εφαρμογή τεχνικών βασισμένων στην αέρια χρωματογραφία-φασματοσκοπία μαζών (GC-MS) συνήθως απαιτεί απομόνωση του μεταβολίτη από το δείγμα, ακολουθούμενη από την χημική παραγωγοποίηση του πριν την ενόργανη ανάλυση. Η απομόνωση των μεταβολιτών από το δείγμα αποτελεί το πιο απαιτητικό τμήμα της όλης διαδικασίας. Η τυπικές τεχνικές απομόνωσης που αναφέρονται στην βιβλιογραφία περιλαμβάνουν εκχύλιση υγρού-υγρού με την χρήση πολικών διαλυτών<sup>[32,33]</sup>, αζεοτροπική απόσταξη με την χρήση ακετονιτριλίου και εκχύλιση στερεού-υγρού με λυοφιλωμένα δείγματα ούρων.

**Πίνακας 2.2.** Αναλυτικές μέθοδοι προσδιορισμού οργανοφωσφορικών φυτοφαρμάκων και/ή μεταβολιτών τους σε βιολογικά δείγματα<sup>(34)</sup>.

Αναλύτες	Δείγμα	Επεξεργασία δείγματος	Αναλυτική μέθοδος	Ανάκτηση (%)	LOD δείγματος
*1-6	Ούρα	LLE, παραγωγή	GC-EI-MS	68-114	1-5 µg/L
1-6	Ψύρα	Άμεση από χλωρορροπιλική προσυγκέντρωση	GC-PCI-MS	60-80	0.1-1.2 µg/L
1-6	Ούρα	Διαφύλαξη, εκχύλιση με ακετονηρίδιο, διαιβυλαίθιρα, χλωρορροπιλική προσυγκέντρωση	GC-PSI-MS	**	ng/ml-range
1-6	Μηκόνιο	Διαφύλαξη, εκχύλιση με μεθανόλη, χλωρορροπιλική προσυγκέντρωση	GC-PSI-MS	18-66	0.05-0.51 µg/g
1-6 κ.ά.	Αμυντικά	Άμεση από χλωρορροπιλική προσυγκέντρωση	GC-PSI-MS	81-96	0.20 µg/L
1,2,4,5	Ούρα	LLE, έκλυση σε Florisil/PSA	GC-EI-MS	56.7-103.9	0.1-0.3 µg/L
1-6	Ούρα	LLE	LC(-TIS)-MS/MS	>15	0.5-1.3 µg/L
2,4,5,6	Ούρα	Άμεση έγχυση	LC(-EIS)-MS/MS	78-119	1-2 µg/L
1,2 κ.ά.	Ούρα	Άμεση έγχυση	LC(-EIS)-MS/MS	37-116	5-20 µg/L
13	Ούρα	Ενζυμική υδρόλυση, διαλυτική ξήρανση οργανικής φάσης με άνυδρο θειικό νάτριο, προσυγκέντρωση	LC(-APCI)-MS/MS	70-85	25 µg/L
7,15	Ορός	Πρωτεϊνική καθίζηση	LC/LC(-ESI)-MS/MS	87-113	1.5 ng/ml
7,15	Ούρα	Άμεση έγχυση	LC/LC(-ESI)-MS/MS	98-109	0.5 ng/ml
7-14	Ούρα	Ενζυμική υδρόλυση SPE, έκλυση με μεθανόλη, εξάτμιση	LC(-ESI)-MS/MS	>70	0.1-8.0 mg/L

**LOD:** limit of detection, **GC-MS:** gas chromatography–mass spectrometry, **GC-MS/MS:** gas chromatography–tandem mass spectrometry, **LC-ESI-MS/MS:** liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry, **LC-APCI-MS/MS:** liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization–tandem mass spectrometry, **LC-TIS-MS/MS:** liquid chromatography–turbo ion spray–tandem mass spectrometry, **LC/LC-ESI-MS/MS:** coupled-column liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry; **LLE:** liquid–liquid extraction, **SPE:** solid-phase extraction, **EI:** electron impact ionization; **PCI:** positive ion chemical ionization.\***1:** dimethylphosphate (DMP), **2:** dimethylthiophosphate (DMTP), **3:** dimethyldithiophosphate (DMDTP), **4:** diethylphosphate (DEP), **5:** diethylthiophosphate (DETP), **6:** diethyldithiophosphate (DEDTP), **7:** 3,5,6-trichloro-2-pyridinol (TCPY, methyl/ethyl chlorpyrifos metabolite), **8:** 5-chloro-1,2-dihydro-1-isopropyl-[3H]-1,2,4-triazol-3-one (isazofos methyl/ethyl metabolite), **9:** 3-chloro-4-methyl-7-hydroxycoumarin (coumaphos metabolite), **10:** 2-diethylamino-6-methyl-4-pyrimidinol (pirimiphos methyl metabolite), **11:** 1,2,3-benzotriazin-4-one (azinphos methyl metabolite), **12:** malathion dicarboxylic acid (MDA, malathion metabolite), **13:** para-nitrophenol (PNP, methyl/ethyl parathion metabolite), **14:** 2-isopropyl-4-methyl-6-hydroxypyrimidine (IMPY, diazinon metabolite), **15:** chlorpyrifos. \*\*Not specified.

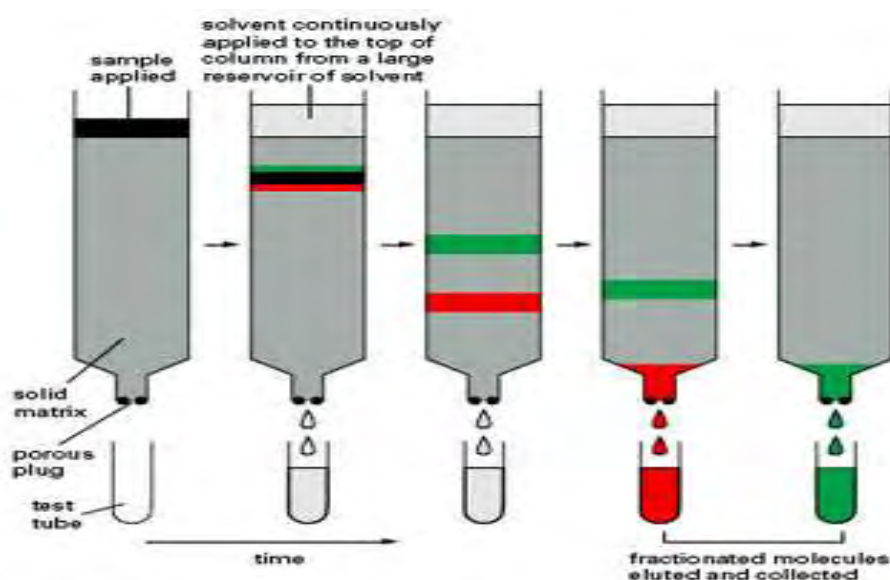
## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3<sup>ο</sup>:

### ΘΕΩΡΗΤΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΕΡΙΑΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ (GC) ΚΑΙ ΤΗΣ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ ΜΑΖΩΝ (MS)

#### 3.1. Χρωματογραφικές μέθοδοι διαχωρισμού

Η χρωματογραφική ανάλυση περιλαμβάνει μια σειρά μεθόδων διαχωρισμού μιγμάτων ανόργανων ή οργανικών ουσιών στις επιμέρους ενώσεις που συναποτελούν το μίγμα. Ο διαχωρισμός αυτός επιτυγχάνεται με την κατανομή των συστατικών του μίγματος μεταξύ δυο φάσεων, μιας *κινητής* και μιας *στατικής*.

Το προς διαχωρισμό μίγμα εισάγεται με την βοήθεια μιας ρευστής φάσης (κινητή) σε μια προσροφητική φάση (στατική) με μεγάλη ειδική επιφάνεια και τα συστατικά του διαπερνούν με διαφορετική ταχύτητα την στατική φάση, λόγω της διαφορετικής τους κατανομής μεταξύ της κινητής και της στατικής φάσης (Σχήμα 3.1). Το σήμα καταγράφεται ως συνάρτηση του χρόνου από την έναρξη της ροής του δείγματος στην χρωματογραφική στήλη.



**Σχήμα 3.1.** Βασική αρχή λειτουργίας της χρωματογραφίας, όπου φαίνεται ο διαχωρισμός των ουσιών από το αρχικό δείγμα λόγω της διαφορετικής τους κατανομής ανάμεσα στην κινητή και την στατική φάση.

Οι διάφορες χρωματογραφικές μέθοδοι διαφέρουν μεταξύ τους ως προς την φύση της κινητής φάσης (*υγρή ή αέρια*) ή της στατικής (*στερεό ή υγρό πάνω σε στερεό υπόστρωμα*), ως προς τον μηχανισμό στον οποίο οφείλεται ο διαχωρισμός (*προσρόφηση, ιονανταλλαγή, κατανομή, μέγεθος μορίων*) και ως προς το μέσο στο οποίο έχει τοποθετηθεί η στατική φάση (*στήλη, λεπτή στοιβάδα πάνω σε γυάλινη πλάκα, χαρτί*).

Ιστορικά, η χρωματογραφία ως τεχνική επινοήθηκε στις αρχές του εικοστού αιώνα (1906) από τον ρώσο βοτανολόγο Michael Tswett. Στον πετυχημένο διαχωρισμό της χλωροφύλλης και των άλλων φυσικών χρωστικών με την καινούργια αυτή τεχνική, αποδίδεται και το όνομα χρωματογραφία που της έδωσε ο ρώσος βοτανολόγος. Μια άλλη ερμηνεία συνδυάζει την ονομασία που δόθηκε με το όνομα του Tswett, που στην ρώσικη γλώσσα σημαίνει χρώμα.

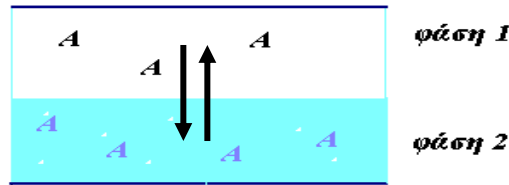
Η θεωρητική ερμηνεία του χρωματογραφικού διαχωρισμού έγινε αργότερα στις εργασίες των Martin A. και Synge R. στους οποίους και απονεμήθηκε το βραβείο Nobel το 1952 ως αναγνώριση της συμβολής τους στην ταχεία ανάπτυξη και ευρεία χρήση της χρωματογραφίας.

### 3.1.1. Θεωρητική βάση της χρωματογραφίας

Ας θεωρήσουμε ένα σύστημα το οποίο αποτελείται από δυο μη αναμειγνυόμενες φάσεις (Σχήμα 3.2). Εάν σε αυτό το σύστημα προσθέσουμε μια ουσία A, αυτή θα κατανεμηθεί μεταξύ των δύο φάσεων. Η κατανομή αυτή εξαρτάται από τη φυσικοχημική συγγένεια της ουσίας ως προς την κάθε φάση και περιγράφεται με μια σταθερά που ονομάζεται συντελεστής κατανομής K:

$$K = \frac{C_2}{C_1} \quad (1)$$

όπου  $C_1$  και  $C_2$  είναι οι συγκεντρώσεις της ουσίας στη φάση 1 και στη φάση 2 αντίστοιχα, μετά την αποκατάσταση της ισορροπίας.



**Σχήμα 3.2.** Αποκατάσταση δυναμικής ισορροπίας μετά την προσθήκη της ουσίας A στο σύστημα των δύο μη αναμειγνυόμενων φάσεων

Η ισορροπία που αποκαθίσταται στο σύστημα είναι δυναμική το οποίο σημαίνει ότι οι συγκεντρώσεις  $C_1$  και  $C_2$  παραμένουν σταθερές μολονότι τα μόρια της ουσίας μετακινούνται γρήγορα από τη μια φάση στην άλλη και αντίστροφα. Σε αυτή την περίπτωση το κάθε μόριο της ουσίας A θα παραμείνει σε μια φάση κατά κάποιο κλάσμα του ολικού χρόνου το οποίο δίδεται από τον επόμενο τύπο:

$$\begin{aligned} \text{Κλάσμα του χρόνου στη φάση 1} &= \frac{\text{Αριθμός των μορίων στην φάση 1}}{\text{Ολικός αριθμός των μορίων}} = \frac{C_1 V_1}{C_1 V_1 + C_2 V_2} = \\ &= \frac{1}{1 + K V_2 / V_1} = \frac{1}{1 + k'} \end{aligned} \quad (2)$$

όπου  $V_1$  και  $V_2$  είναι οι όγκοι των φάσεων,

$k' = K V_2 / V_1$  ονομάζεται παράγοντας χωρητικότητας (*capacity factor*) και η σημασία του θα γίνει κατανοητή στη συνέχεια.

Η χρωματογραφική διαδικασία αρχίζει από τη στιγμή που τίθεται σε κίνηση μια εκ των δύο φάσεων, π.χ. η φάση 1. Μαζί με την κινητή φάση θα μετακινηθούν και τα μόρια της ουσίας, με ταχύτητα ανάλογη προς το κλάσμα του χρόνου που τα μόρια αυτά βρίσκονται στην κινητή φάση, της οποίας η γραμμική ταχύτητα  $u$  είναι:

$$\text{ταχύτητα} = u \frac{1}{1 + k'} \quad (3)$$

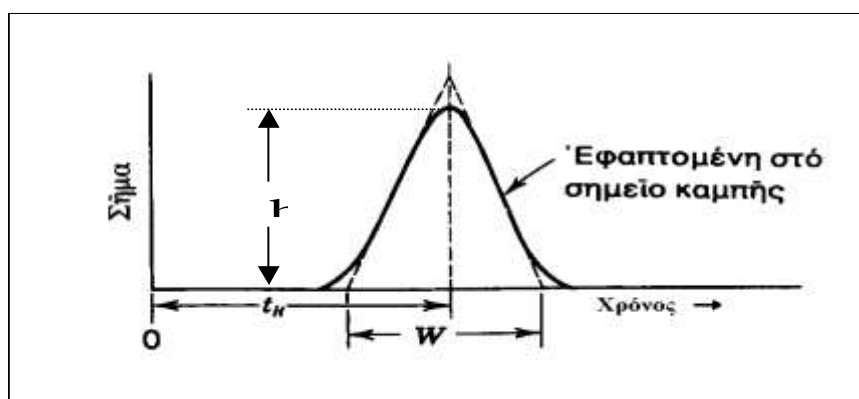
Συνεπώς η ταχύτητα μετακίνησης της ουσίας κατά μήκος του σωλήνα που περιέχει την κινητή και την στατική φάση (και σύμφωνα με την ορολογία της χρωματογραφίας ονομάζεται χρωματογραφική στήλη) εξαρτάται από τη φυσικοχημική συγγένειά της προς την κινητή και την στατική φάση. Η ιδιότητα αυτή της ουσίας περιλαμβάνεται στην σταθερά κατανομής  $K$  και επομένως και στην σταθερά χωρητικότητας  $k'$ . Εάν η ουσία έχει μεγαλύτερη συγγένεια ως προς την κινητή φάση η διέλευσή της από την στήλη χρωματογραφίας επιταχύνεται, ενώ στην αντίθετη περίπτωση επιβραδύνεται. Ο χρόνος που χρειάζεται η ουσία προκειμένου να διατρέξει όλο το μήκος ( $L$ ) της χρωματογραφικής στήλης ονομάζεται χρόνος συγκράτησης (retention time) και συμβολίζεται με  $t_R$ :

$$t_R = \frac{\text{μήκος}}{\text{ταχύτητα}} = \frac{L}{u} (1+k') = t_M (1+k') \quad (4)$$

Ο χρόνος συγκράτησης είναι χαρακτηριστικός για κάθε ουσία σε δεδομένο χρωματογραφικό σύστημα ( με δεδομένα τα  $L$ ,  $u$ , φύση και όγκοι  $V_S$  στατικής και  $V_M$  κινητής φάσης) και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίησή της. Η διαδικασία διέλευσης του συστατικού από την χρωματογραφική στήλη καλείται έκλουση. Το  $t_M$  – είναι ο χρόνος που χρειάζεται η κινητή φάση για να διατρέξει τη χρωματογραφική στήλη. Από τη σχέση (4) συνεπάγεται ότι εάν στην αρχή της χρωματογραφικής στήλης εισαχθεί μίγμα ουσιών, τότε οι ουσίες με μικρότερη  $k'$  (μεγαλύτερη συγγένεια προς κινητή φάση) θα εξέλθουν πρώτες από τη στήλη ενώ οι ουσίες με μεγαλύτερη  $k'$  (μεγαλύτερη συγγένεια προς την στατική φάση) θα καθυστερήσουν. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται ο χρωματογραφικός διαχωρισμός. Η επιτυχία του χρωματογραφικού διαχωρισμού εξαρτάται από την ορθότητα επιλογής των παραμέτρων του χρωματογραφικού συστήματος για συγκεκριμένο μίγμα και από τη σωστή επιλογή της κινητής και της στατικής φάσης.

Οι ουσίες οι οποίες εκλύονται από τη χρωματογραφική στήλη κατευθύνονται στον ανιχνευτή –συσκευή η οποία αποκρίνεται υπό μορφή αναλογικού σήματος το οποίο συνδέεται άμεσα με τη συγκέντρωση ή την ποσότητα ενός συστατικού που περνά μέσα από αυτόν. Η γραφική παράσταση της απόκρισης του ανιχνευτή προς το χρόνο έκλουσης αποτελεί το χρωματογράφημα (Σχήμα 3.3). Τα σήματα των συστατικών που

ανιχνεύονται από τους ανιχνευτές απεικονίζονται στα χρωματογραφήματα με τη μορφή κορυφών έκλυσης (*peaks*) που μοιάζουν με καμπύλες Gauss. Οι ζώνες των συστατικών, που στην είσοδο της στήλης είναι οξείες, διευρύνονται καθώς διέρχονται μέσα από τη στήλη και κατά συνέπεια γειτονικές κορυφές έκλυσης δεν διαχωρίζονται τέλεια γιατί αλληλεπικαλύπτονται.



**Σχήμα 3.3.** Τυπικό χρωματογράφημα.

### 3.1.2. Απόδοση διαχωρισμού – Θεωρητικές πλάκες

Υποθέτουμε ότι μια χρωματογραφική στήλη αποτελείται από ένα μεγάλο αριθμό παρόμοιων τμημάτων ή *θεωρητικών πλακών*, σε καθένα από τα οποία αποκαθίσταται ισορροπία στην κατανομή μιας ουσίας μεταξύ της στατικής και κινητής φάσης. Η κίνηση δηλαδή της ουσίας στη στήλη μπορεί να θεωρηθεί ως ένα σύνολο διαδοχικών κινήσεων δια μέσου  $N$  ζωνών ισορροπίας συνδεδεμένων σε σειρά:

$$N = 16 \left( \frac{t_R}{W} \right)^2 = 5,54 \left( \frac{t_R}{W_{1/2}} \right)^2$$



, όπου  $W$  το εύρος της κορυφής έκλυσης, το οποίο μετρείται μεταξύ των τομών των εφαπτομένων με τη γραμμή βάσης και  $W_{1/2}$ , το εύρος της κορυφής έκλυσης στο ήμισυ του ύψους της. Επειδή το  $N$  είναι αδιάστατο, τα  $t_R$  και  $W$  πρέπει να μετρηθούν στις ίδιες μονάδες.

Όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός  $N$  τόσο στενότερες είναι οι κορυφές και τόσο αποτελεσματικότερη είναι η στήλη για το διαχωρισμό μιγμάτων ουσιών με παραπλήσιους όγκους συγκράτησης. Σε μια δεδομένη στήλη, το εύρος της κορυφής είναι ανάλογο του χρόνου (όγκου) συγκράτησης, και γι' αυτό οι κορυφές διευρύνονται από την αρχή μέχρι το τέλος του χρωματογραφήματος.

Το μήκος της στήλης το οποίο αντιστοιχεί σε μια θεωρητική πλάκα καλείται *ισοδύναμο ύψος προς θεωρητική πλάκα* και δίνεται από το λόγο του μήκους της στήλης προς τον αριθμό των θεωρητικών πλακών:

$$H = \frac{L}{N}$$

Όσο πιο μικρή είναι η τιμή του  $H$  τόσο πιο καλός είναι ο διαχωρισμός.

Με σκοπό να εξηγηθεί η επίδραση της ταχύτητας ροής του φέροντος συστατικού και διαφόρων χαρακτηριστικών της στήλης στο εύρος της κορυφής μιας ουσίας αναπτύχθηκε η θεωρία της ταχύτητας.

### 3.1.3. Η θεωρία της ταχύτητας

Το ισοδύναμο ύψος προς θεωρητική πλάκα  $H$  και η ταχύτητα ροής του φέροντος συστατικού (κινητή φάση) σχετίζονται σύμφωνα με με την παρακάτω μαθηματική σχέση που είναι γνωστή σαν Εξίσωση Van Deemter:

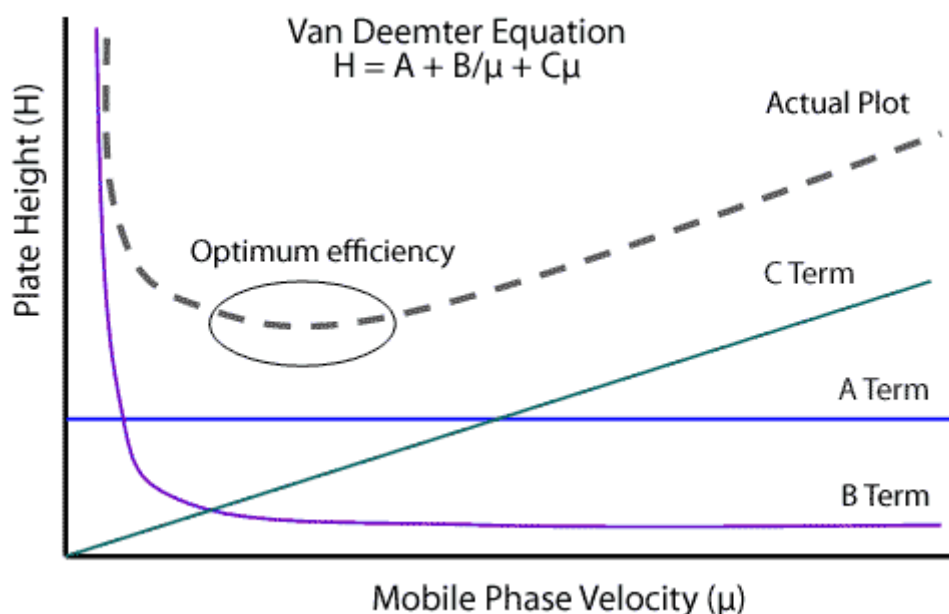
$$H=A+B/u+Cu$$

Οι τρεις όροι του δεξιού μέλους είναι περισσότερο περίπλοκοι από ότι φαίνονται εδώ. Τα  $A$ ,  $B$  και  $C$  μπορούν να θεωρηθούν σταθερές για μια ορισμένη στήλη, αλλά κάθε σταθερά περιέχει διάφορες πειραματικές παραμέτρους, οι οποίες είναι εξειδικευμένες για κάθε τύπο χρωματογραφίας.

Ο όρος  $A$  είναι συνάρτηση του μεγέθους και της ομοιομορφίας των σωματιδίων πλήρωσης της στήλης. Οι “σφιχτά” γεμισμένες στήλες με μικρά σωματίδια δίνουν μικρές τιμές του  $A$ , ενώ σε πολύ καλά πληρωμένες στήλες (πχ. τριχοειδείς) οι τιμές του  $A$  τείνουν προς το μηδέν και μπορούν να παραλειφθούν.

Ο όρος  $B$  σχετίζεται με τη διάχυση κατά μήκος της στήλης. Ο όρος  $B$  είναι αντιστρόφως ανάλογος προς την ταχύτητα ροής του φέροντος συστατικού.

Ο όρος  $C$  σχετίζεται πρώτον με την αντίσταση μεταφοράς μάζας εντός της στήλης που εμποδίζει την ακαριαία αποκατάσταση της ισορροπίας μεταξύ των δύο φάσεων και δεύτερον με την εγκάρσια διάχυση μέσα στην κινητή φάση.



**Σχήμα 3.4.** Γραφική παράσταση της εξίσωσης Van Deemter στην οποία απεικονίζεται η σχετική συνεισφορά του κάθε όρου σε συνάρτηση της ταχύτητας της κινητής φάσης.

Το σπουδαιότερο χαρακτηριστικό μιας χρωματογραφικής στήλης είναι η ικανότητά της να διαχωρίζει τα συστατικά ενός μείγματος με παρόμοια φυσικοχημικά χαρακτηριστικά. Μέτρο του διαχωρισμού δύο κορυφών Α και Β αποτελεί η διαχωριστικότητα ή αλλιώς διαχωριστική ικανότητα (*resolution*).

Η διαχωριστική ικανότητα,  $R$ , δύο κορυφών που έχουν χρόνους συγκράτησης  $t_{RA}$  και  $t_{RB}$  και πλάτη  $W_A$  και  $W_B$ , δίνεται από τη σχέση:

$$R = \frac{2[(t_R)_B - (t_R)_A]}{W_A + W_B}$$

Αν  $R > 1.5$ , έχουμε τη διαχωριστικότητα γραμμής βάσης (*baseline resolution*), που αντιστοιχεί στον τέλει διαχωρισμό δύο κορυφών ίδιου μεγέθους. Αν  $R = 1.0$ , οι κορυφές αλληλεπικαλύπτονται σε ποσοστό 2% και ο διαχωρισμός θεωρείται επαρκής για αναλυτικούς σκοπούς.

Για να βελτιώσουμε τη διαχωριστική ικανότητα μπορούμε

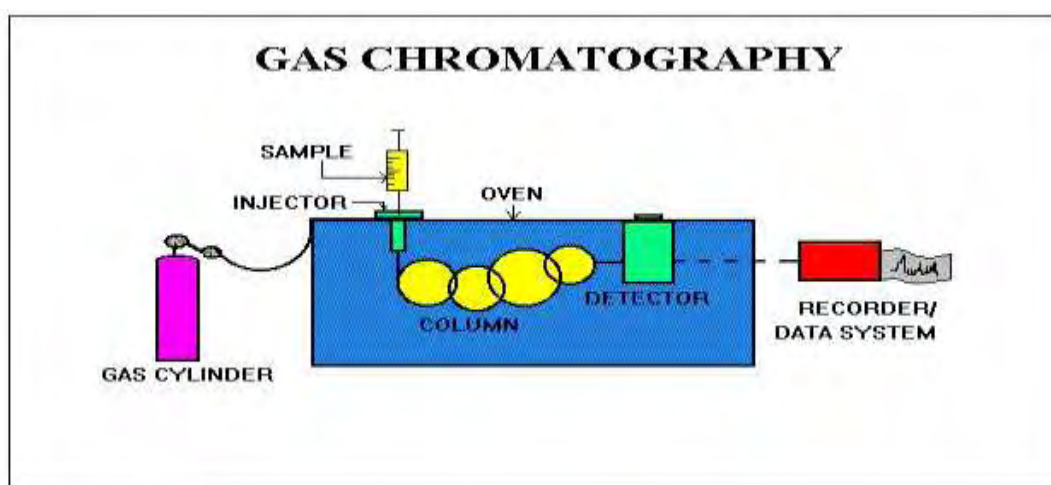
- να μεταβάλουμε τη θερμοκρασία ή τη φύση των φάσεων ώστε να έχουμε μεγαλύτερη απόσταση μεταξύ των δύο κορυφών
- να ελαττώσουμε το πλάτος των κορυφών βελτιώνοντας την απόδοση της στήλης (αύξηση του  $n$ , ελάττωση του  $H$ , π.χ με ρύθμιση της ταχύτητας ροής του φέροντος συστατικού, με ελάττωση του μεγέθους του δείγματος, της διαμέτρου της στήλης κλπ.),
- να συνδυάσουμε τις περιπτώσεις (α) και (β), οπότε ο διαχωρισμός γίνεται περισσότερο ικανοποιητικός

### 3.2. Οργανολογία αέριου χρωματογράφου

Η αέρια χρωματογραφία είναι μια τεχνική που βρίσκει εφαρμογή στην ανάλυση του συνόλου σχεδόν των οργανικών ρύπων, όπως φυτοφάρμακα, διαλύτες, πολυαρωματικοί υδρογονάνθρακες, πολυχλωριωμένα διφαινύλια, διοξίνες και τριαλομεθάνια.

Τα βασικά χαρακτηριστικά ενός συστήματος αέριας χρωματογραφίας φαίνονται στο Σχήμα 3.5. Το φέρον αέριο περιέχεται σε χαλύβδινους κλύβδρους με μεγάλη πίεση και παρέχεται στην συσκευή με έναν ή περισσότερους ρυθμιστές πίεσης, που ρυθμίζουν την

ταχύτητα ροής. Το δείγμα εισάγεται σε έναν θερμαινόμενο θάλαμο (εισαγωγέας) όπου βρίσκεται η αρχή της στήλης είτε με μια σύριγγα που τρυπάει έναν λεπτό ελαστικό δίσκο, είτε με μια ειδική βαλβίδα εισαγωγής. Το φέρον αέριο μεταφέρει τα συστατικά του δείγματος μέσα στην στήλη, όπου διαχωρίζονται και το ένα μετά το άλλο διέρχονται από τον ανιχνευτή, ο οποίος στέλνει ένα σήμα στον καταγραφέα για κάθε ένωση που ανιχνεύει. Η στήλη, το σύστημα εισαγωγής του δείγματος και ο ανιχνευτής βρίσκονται μέσα σε ένα θερμοστατούμενο φούρνο, αν και τα δυο τελευταία μπορούν αν θερμανθούν ξεχωριστά.



Σχήμα 3.5. Βασικά τμήματα συστήματος αέριας χρωματογραφίας

### 3.2.1. Στήλες αέριας χρωματογραφίας

Για την επίτευξη ενός βέλτιστου χρωματογραφικού διαχωρισμού απαιτείται η κατάλληλη επιλογή της στήλης. Οι σημαντικότεροι παράγοντες που επηρεάζουν την επιλογή της στήλης είναι οι εξής<sup>[35]</sup>:

#### 1. Στατική φάση (*stationary phase*)

Η επιλογή της στατικής φάσης είναι το πιο καθοριστικό βήμα για των σωστή επιλογή της στήλης στην αέρια χρωματογραφία. Η στατική φάση αποτελεί το στρώμα που επικαλύπτει τα εσωτερικά τοιχώματα της στήλης και θα πρέπει να επιλέγεται σε σχέση με την εκάστοτε εφαρμογή της. Οι διαφορές στις φυσικές και χημικές ιδιότητες των

εισαγόμενων οργανικών δειγμάτων και οι αλληλεπιδράσεις τους με την στατική φάση, αποτελούν την βάση της διαδικασίας διαχωρισμού.

### 2.Εσωτερική διάμετρος της στήλης (I.D.)

Η σωστή επιλογή της εσωτερικής διαμέτρου της στήλης απαιτεί μια ισορροπία ανάμεσα σε δυο παράγοντες: την απόδοση (αριθμός θεωρητικών πλακών) και την χωρητικότητα του δείγματος. Η βελτίωση ενός από τους δυο παράγοντες γίνεται σε βάρος του άλλου. Η κατάλληλη εσωτερική διάμετρος της στήλης εξαρτάται κάθε φορά από τις ανάγκες της ανάλυσης.

Internal Diameter (mm)	Efficiency: Plates/Meter (N/m)	Efficiency: Total Plates (N)	Capacity Each Analyte (ng)
0.53	1,300	39,000	1000-2000
0.32	2,300	69,000	400-500
0.25	2,925	87,750	50-100
0.20	3,650	109,500	<50
0.18	4,050	121,500	<50
0.10	7,300	219,000	<10

Theoretical values for 30 m long columns, calculated @ a k' = 6.00 and 85% coating efficiency

Σχήμα 3.6. Επίδραση της εσωτερικής διαμέτρου (I.D.) της στήλης.

### 3.Πάχος του στρώματος επικάλυψης (film thickness)

Τα πλεονεκτήματα από την μείωση του πάχους του στρώματος επικάλυψης είναι ο καλύτερος διαχωρισμός των ουσιών (λόγω ελάττωσης του εύρους  $W$  της κορυφής) και μικρότερη επιβάρυνση της στήλης. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση του λόγου σήμα/θόρυβο (*signal-to-noise*). Επιπρόσθετα, αυξάνεται η μέγιστη θερμοκρασία λειτουργίας της στήλης. Τα μειονεκτήματα είναι η αυξημένη αλληλεπίδραση του αναλύτη με τα τοιχώματα του σωλήνα και ελάττωση της χωρητικότητας αυτού. Τέλος, η μείωση του στρώματος του πάχους επιτρέπει να εκλύονται οι ουσίες σε χαμηλότερους χρόνους έκλυσης και σε χαμηλότερες θερμοκρασίες. Αυτό μπορεί να είναι επιθυμητό ή όχι, ανάλογα με τις απαιτήσεις της ανάλυσης.

### 4.Μήκος της στήλης (column length)

Είναι ο τελευταίος και λιγότερο σημαντικός από τους παράγοντες επιλογής μιας στήλης αέριας χρωματογραφίας. Μεγαλύτερο μήκος στήλης μπορεί να παράσχει καλύτερο διαχωρισμό (λόγω μεγαλύτερου αριθμού θεωρητικών πλακών) από ότι μια στήλη

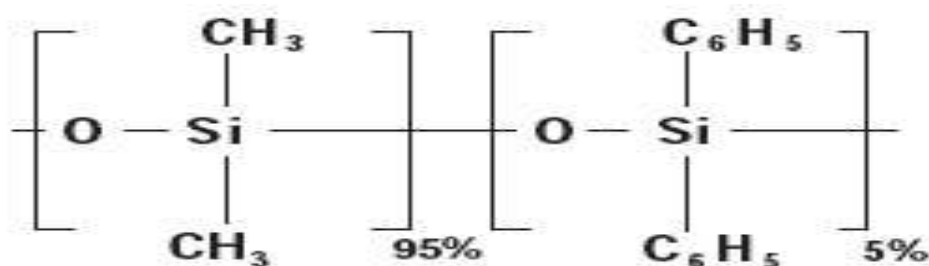
μικρότερου μήκους. Παρ'όλα αυτά, υπάρχουν πρακτικοί περιορισμοί στην αύξηση του μήκους μιας στήλης. Με μια ισοθερμική ανάλυση μπορούμε να δούμε ότι μια στήλη μήκους 60m αυξάνει την ανάλυση περίπου κατά 40% σε σχέση με μια στήλη μήκους 30m. Όμως, θα αυξηθεί ο χρόνος ανάλυσης και η πίεση που πρέπει να ασκηθεί για να κινηθούν τα συστατικά μέσα στην στήλη. Στο επόμενο σχήμα φαίνονται τα αποτελέσματα της μήκους της στήλης στην αναλυτική διαδικασία.

Column Length (m)	Inlet Pressure (psi)	Peak 1 Retention (min)	Peak 1/2 Resolution (R)	Efficiency: Total Plates (N)
15	5.9	8.33	0.8	43,875
30	12.0	16.68	1.2	87,750
60	24.9	33.37	1.7	175,500

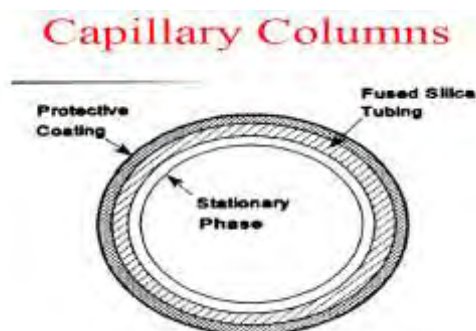
Theoretical values for 0.25 mm I.D. columns with 85% coating efficiency, 145 °C Isothermal analyses, helium at 21 cm/sec,  $k'(\text{peak 1}) = 6.00$

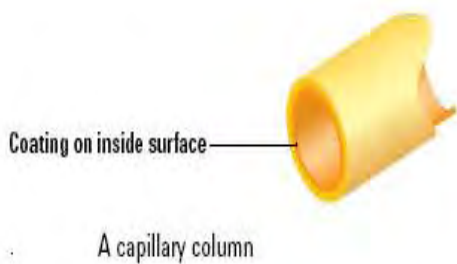
Σχήμα 3.7. Επίδραση του μήκους της στήλης.

Η στήλη αέριας χρωματογραφίας που χρησιμοποιήθηκε στην εργασία αυτή ήταν η AT-5MS 30m x 0.25mm column with 0.25μm thickness of 5% phenyl – 95% methylpolysiloxane stationary phase. Το μήκος της στήλης (length) είναι 30m, η εσωτερική διάμετρος (I.D.) είναι 0.25mm και το πάχος της στατικής φάσης (thickness) είναι 0.25μm. Η στατική φάση αποτελείται από 5% φαινυλο – 95% μεθυλοπολυσιλοξάνιο.



Σχήμα 3.8. Η χημική δομή της στατικής φάσης της στήλης αέριας χρωματογραφίας. Αποτελείται από 5% φαινυλο - 95% μεθυλοπολυσιλοξάνιο.





**Σχήμα 3.9.** Αποψη της διατομής της στήλης αέριας χρωματογραφίας. Διακρίνονται καθαρά τα υποστρώματα που αποτελούν την στήλη, δηλαδή η προστατευτική επικάλυψη (*protective coating*), η σωλήνωση τετηγμένου πυριτίου (*fused silica tubing*) και η στατική φάση (*stationary phase*).

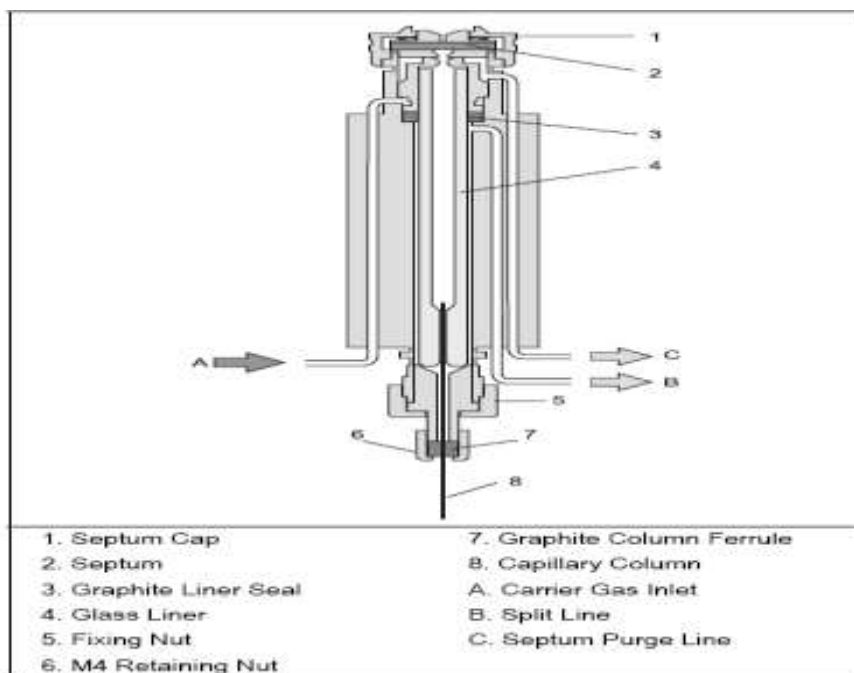
### 3.2.2. Εγχυτές δείγματος

Οι διάφοροι εγχυτές δείγματος (*injectors*) που χρησιμοποιούνται στην αέρια χρωματογραφία παρατίθενται παρακάτω<sup>[36]</sup>.

#### Split/Splitless (S/SL) Injector

Ο εγχυτής δείγματος αυτός έχει σχεδιαστεί τόσο για εφαρμογές με διαχωρισμό (*split*), όσο και για χωρίς διαχωρισμό (*splitless*), ώστε να πετυχαίνει αποτελεσματική μεταφορά του δείγματος μέσα στην στήλη. Για οποιαδήποτε από τις δυο εφαρμογές, το δείγμα εισάγεται με ένα γυάλινο κάλυμμα μέσα στον θάλαμο εξάτμισης, μέσω ενός διαφράγματος. Η τεχνική η οποία θα χρησιμοποιηθεί, θα καθορίσει και τον τύπο του γυάλινου καλύμματος, καθώς και το μήκος της βελόνας του εγχυτή. Η θερμοκρασία του εγχυτή μπορεί να οριστεί ανάμεσα στην θερμοκρασία περιβάλλοντος ως και τους 400°C αλλά στην ουσία η πραγματική θερμοκρασία εξαρτάται από την επιλογή του διαλύτη και την θερμική σταθερότητα των δειγμάτων.

Στο παρακάτω σχήμα αποδίδεται σχηματικά η διατάξη του συγκεκριμένου τύπου εγχυτή δείγματος.



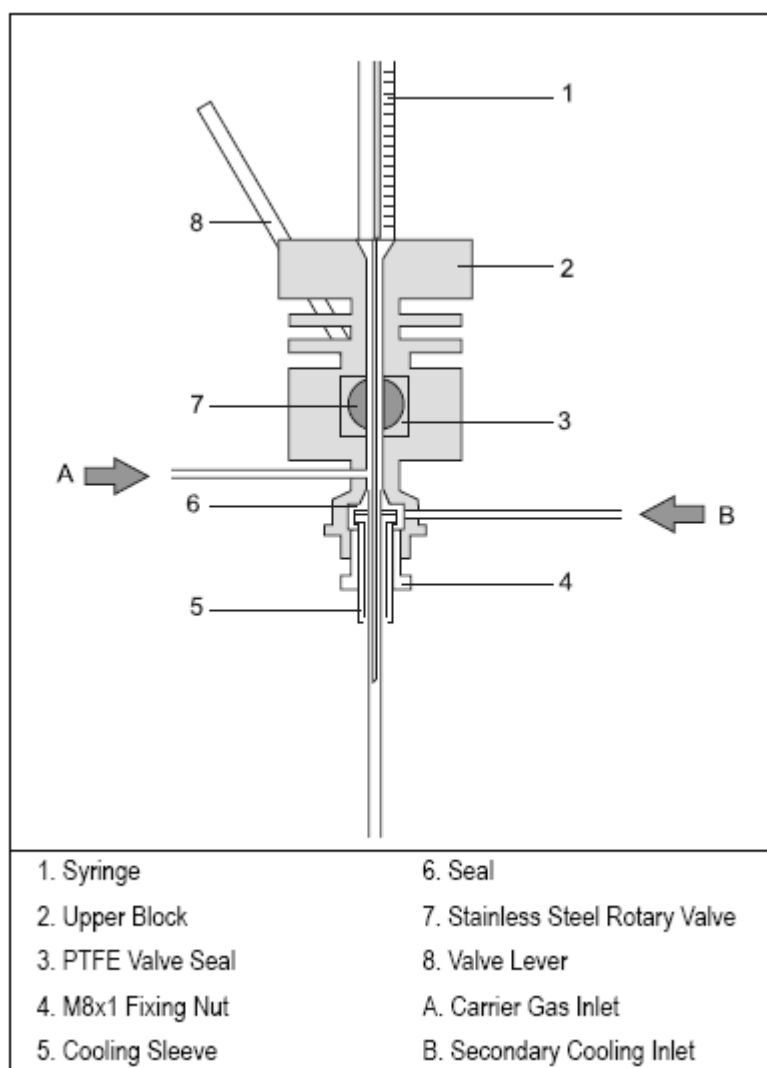
**Σχήμα 3.10.** *Split/Splitless Injector.*

### **On-column Injector (OCI)**

Ο τύπος αυτός εγχυτή δείγματος χρησιμοποιεί μια σύριγγα για να εισάγει ένα υγρό δείγμα απευθείας μέσα στην στήλη.

Το άνω μέρος του αποτελείται από μια βελόνα και μια περιστροφική βαλβίδα. Το κάτω μέρος έρχεται σε επαφή με την στήλη, χωρίς να μεσολαβεί κάποιο διάφραγμα.





**Σχήμα 3.11.** *On-column Injector (OCI).*

Η On-column εισαγωγή δείγματος είναι μια άμεση, ψυχρή μέθοδος εισαγωγής δείγματος μέσα στην στήλη. Η θερμοκρασία του φούρνου καθορίζει στην πραγματικότητα την θερμοκρασία έγχυσης. Ο εγχυτής από μόνος του δεν είναι θερμαινόμενος και προσφέρεται μόνο ως μια βαλβίδα με την οποία εισάγεται η βελόνα μέσα στην στήλη, χωρίς η τελευταία να αποσυμπιέζεται. Η βελόνα εισέρχεται στον εγχυτή μέσω μιας υποδοχής και περνάει στην στήλη μέσω μιας περιστρεφόμενης βαλβίδας. Όταν η βαλβίδα είναι κλειστή, η πίεση στην στήλη διατηρείται σταθερή. Όταν είναι ανοιχτή και η βελόνα εισάγεται στην στήλη, τότε η πίεση διατηρείται σταθερή διότι η βελόνα αποτρέπει το αέριο από το να αποδράσει από την στήλη.

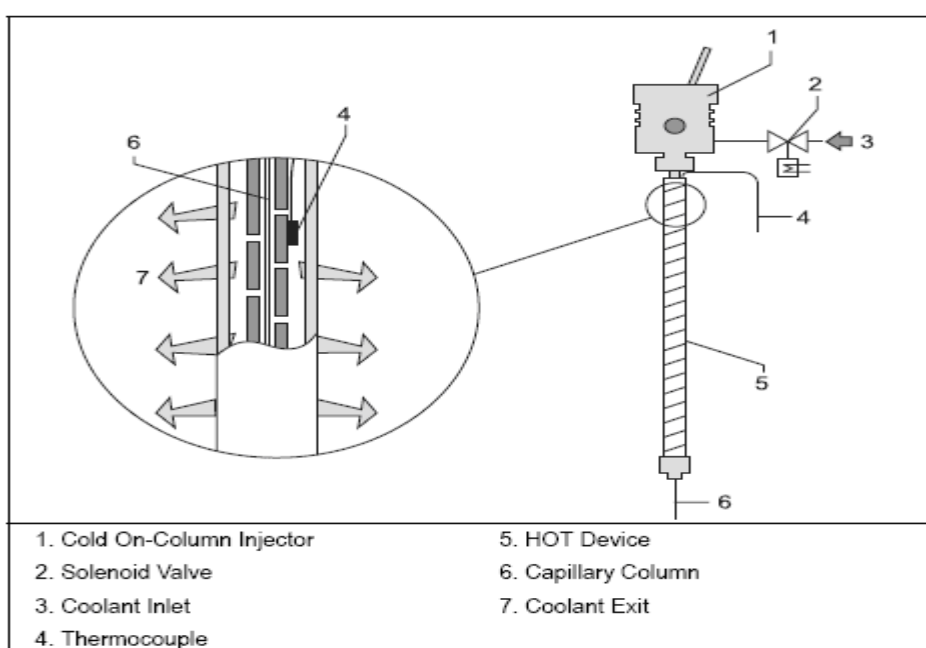
Ανάμεσα στις διαθέσιμες τεχνικές, η *On-column* προσφέρει τα πιο ακριβή και αξιόπιστα αποτελέσματα, καθιστώντας την προτιμώμενη μέθοδο για τις περιπτώσεις όπου το δείγμα δεν είναι υπερβολικά βρώμικο. Επίσης, είναι η καταλληλότερη τεχνική για την ανάλυση πτητικών ενώσεων σε εκχυλισμένα διαλύματα, λόγω των μικρών απωλειών πτητικών συστατικών.

### High Oven Temperature On-column Injector (HOT OC)

Η μέθοδος αυτή επιτρέπει την εισαγωγή δείγματος με την τεχνική *On-column*, ακόμα και όταν η θερμοκρασία του φούρνου διατηρείται σε υψηλά επίπεδα. Έτσι, μπορεί να μειωθεί σημαντικά ο χρόνος ανάλυσης.

Πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι ο μικρός χρόνος ανάλυσης, γιατί δεν υπάρχει ανάγκη ψύξης του φούρνου για να γίνει εισαγωγή δείγματος, η ισοθερμική ανάλυση συστατικών με υψηλό σημείο ζέσεως και τέλος οι μειωμένες φθορές της στήλης και οι ακαθαρσίες του φέροντος αερίου.

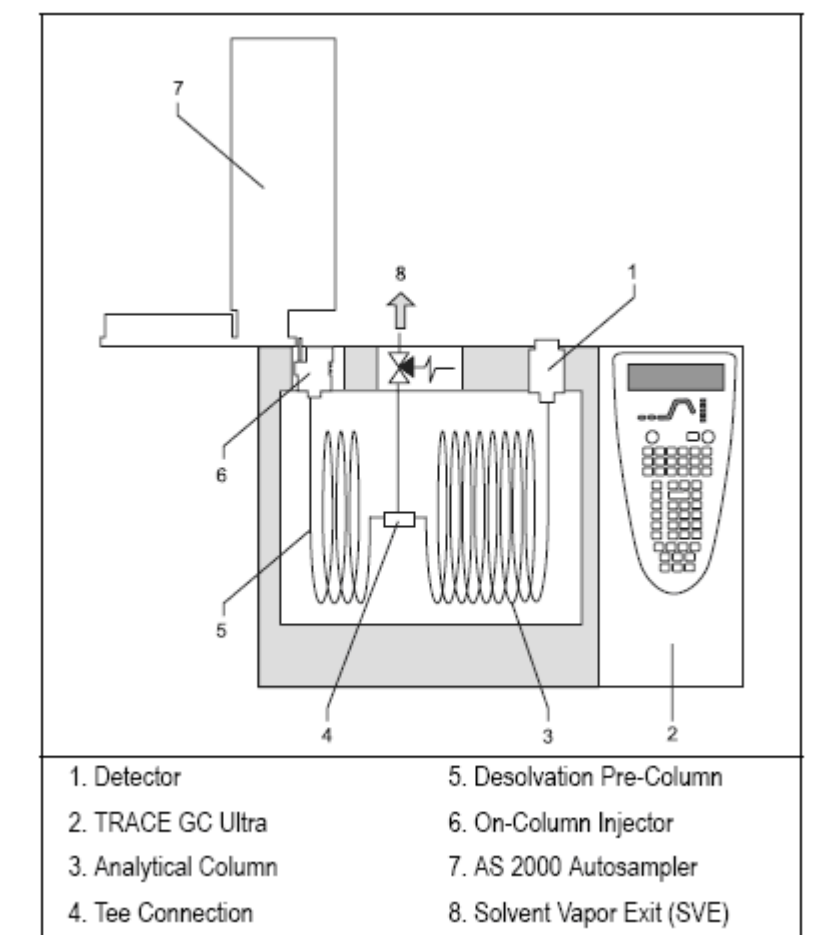
Στα μειονεκτήματα καταγράφεται το ότι η μέθοδος αυτή περιορίζεται σε δείγματα όγκου 1μl ή λιγότερου.



Σχήμα 3.12. High Oven Temperature On-column Injector (HOT OCI)

## Large Volume On-column Injector (LVOCI)

Η μέθοδος αυτή είναι μια ειδική παραλλαγή της μεθόδου *On-column* που περιγράφηκε παραπάνω, στην οποία εισάγονται αυτόματα στην στήλη μεγάλες ποσότητες υγρού δείγματος με τον αυτόματο δειγματολήπτη. Ο τελευταίος εισάγει το δείγμα κατευθείαν με σε ένα σύστημα τριχοειδούς στήλης πυριτίου, όπως φαίνεται και στο παρακάτω σχήμα.

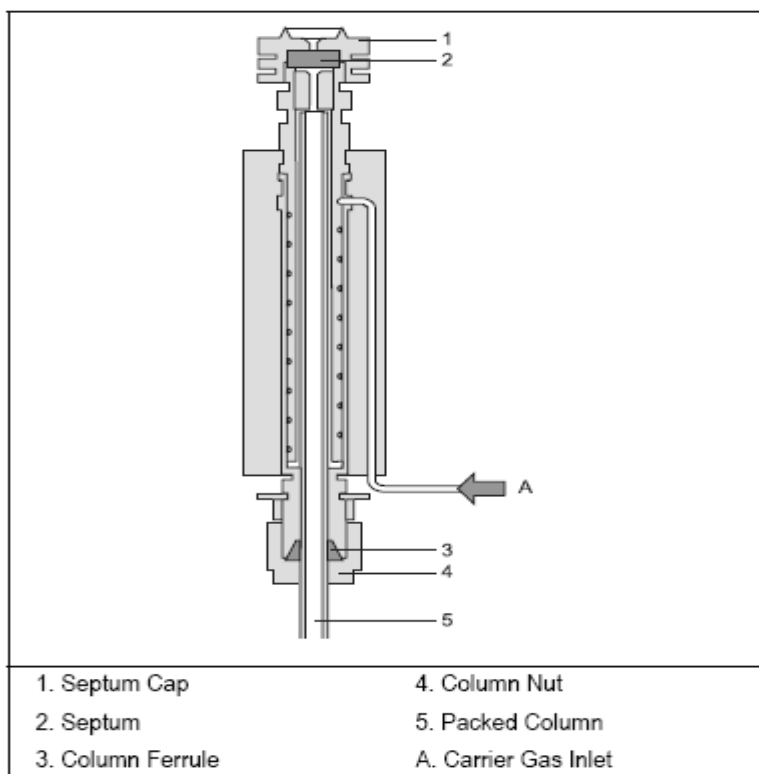


**Σχήμα 3.13.** *Large Volume On-column Injector  
(LVOCI)*

### **Packed Column Injector (PCI)**

Ο εγχυτής αυτός χρησιμοποιείται για εισαγωγές δείγματος, όπου το δείγμα εξατμίζεται μέσα στην στήλη. Μπορεί να δεχθεί μεταλλικές ή γυάλινες στήλες. Η θερμοκρασία του μπορεί να κυμανθεί από αυτήν του περιβάλλοντος μέχρι τους 400°C.

Το δείγμα εισάγεται στη κορυφή της στήλης. Η θερμοκρασία εισαγωγής θα πρέπει να είναι αρκούντως υψηλή, ώστε να εγγυηθεί την πλήρη εξάτμιση του δείγματος αποφεύγοντας παράλληλα την πιθανή αποσύνθεση των συστατικών του δείγματος.

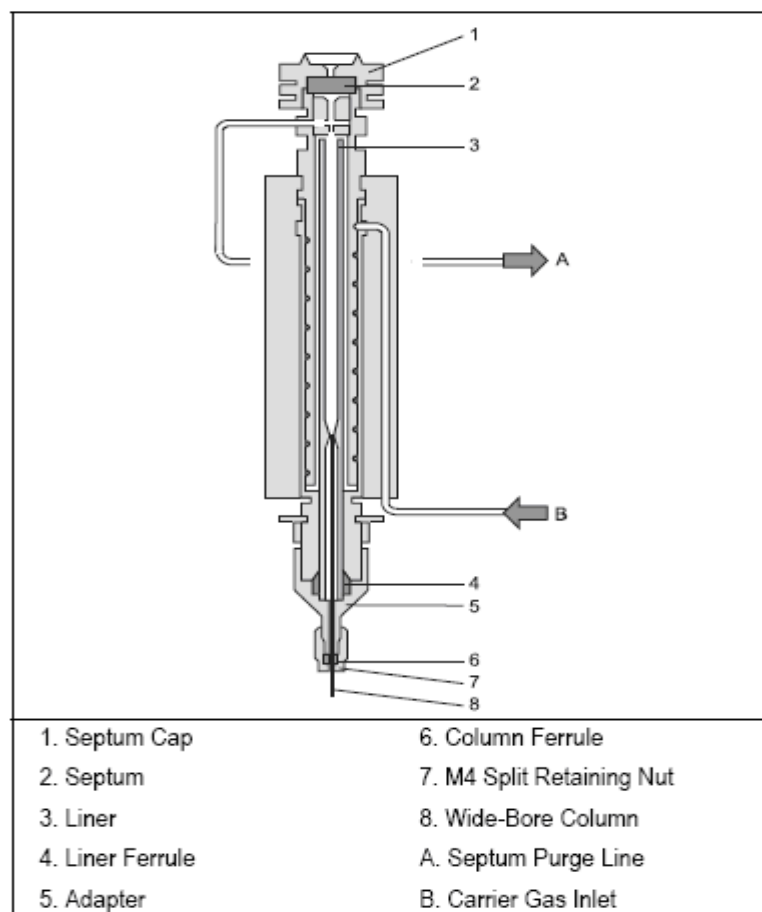


**Σχήμα 3.14.** *Packed Column Injector (PCI)*

### **Purged Packed Column Injector (PCI)**

Ο εγχυτής αυτός είναι μια παραλλαγή του *Packed Column* εγχυτή. Αποτελείται επιπλέον από ένα διάφραγμα καθαρισμού (*septum purge*). Το δείγμα εξατμίζεται σε ένα γυάλινο

κάλυμμα (*liner*) και εισέρχεται στην τριχοειδή στήλη. Η θερμοκρασία είναι ελεγχόμενη ανάμεσα στους 50 και τους 400°C.

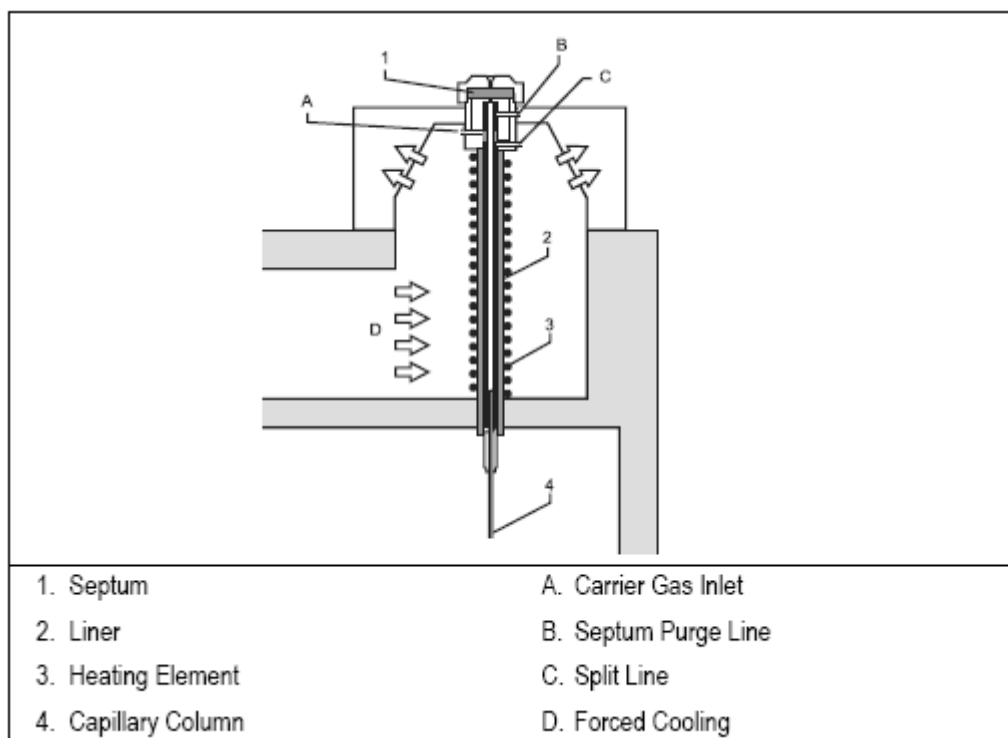


**Σχήμα 3.15.** *Purged Packed Column Injector (PCI)*

### **Programmable Temperature Vaporizing Injector (PTV)**

Με αυτήν την μέθοδο έγχυσης, την οποία χρησιμοποιήσαμε στην παρούσα εργασία, είναι δυνατή η μεταβολή της θερμοκρασίας κατά την διάρκεια της έγχυσης του δείγματος, κάτι που δεν είναι δυνατό σε καμμία άλλη μέθοδο. Η προγραμματιζόμενη αυτή διακύμανση της θερμοκρασίας μπορεί να περιορίσει πολλά από τα ανεπιθύμητα αποτελέσματα που μπορεί να εμφανιστούν με τις παραδοσιακές τεχνικές εισαγωγής δείγματος, όπως η απόσταξη του δείγματος μέσα στην βελόνα και η δημιουργία ατμών εξάτμισης μέσα στον θάλαμο

εισαγωγής. Είναι κατάλληλη για μη-πολικές ενώσεις και αποτελεί μια μέθοδο πολύ ευέλικτη, καθώς επιτρέπει περεταίρω κλασματοποίηση του δείγματος. Επίσης, στα πλεονεκτήματα αυτού του εισαγωγέα περιλαμβάνεται και η δυνατότητα έγχυσης μεγάλων όγκων δειγμάτων (έως 100μL) με αποτέλεσμα την αύξηση της ευαισθησίας της μεθόδου.



**Σχήμα 3.16.** *Programmable Temperature Vaporizing Injector (PTV)*

Η τεχνική αυτή μπορεί να εφαρμοστεί σε 6 διαφορετικές παραλλαγές:

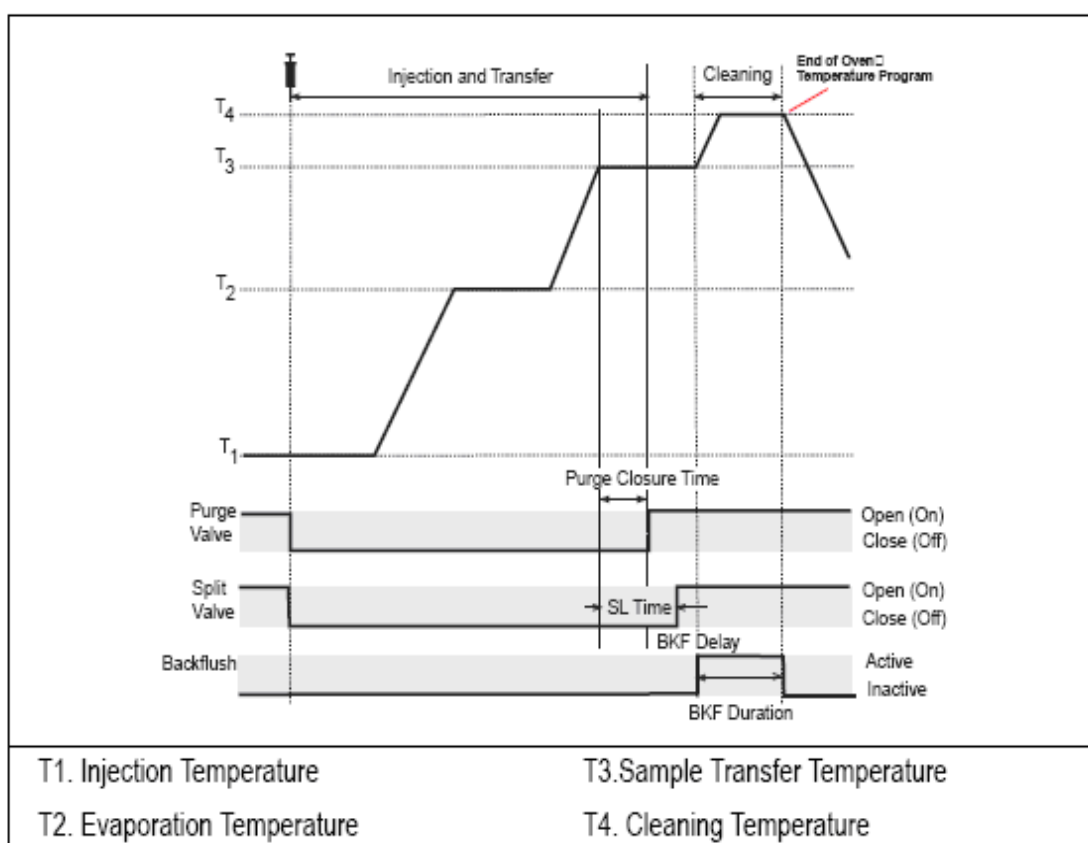
1. *PTV Split*: Χρησιμοποιείται για δείγματα όταν η ευαισθησία δεν αποτελεί πρόβλημα.
2. *PTV Splitless*: Χρησιμοποιείται για ιχνοανάλυση.
3. *PTV Solvent Split*: Χρησιμοποιείται για να αερίζεται ο διαλύτης ή το αντιδραστήριο όταν μπορεί να προκληθεί πρόβλημα στον ανιχνευτή ή την στήλη.
4. *PTV Large Volume*: Χρησιμοποιείται για να αυξήσει την ευαισθησία της ανάλυσης μέσω της εισαγωγής μεγάλων ποσοτήτων δείγματος.
5. *Constant Temp Split*: Χρησιμοποιείται για μικρές ποσότητες δείγματος και μικρά εύρη πτητικότητας.
6. *Constant Temp Splitless*: Χρησιμοποιείται για μικρές ποσότητες δείγματος και ιχνοανάλυση.

Η *PTV Splitless*, την οποία επιλέξαμε ως μέθοδο εισαγωγής δείγματος, χρησιμοποιείται για να αναλύσει ουσίες σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις.

Η διαχωριστική βαλβίδα (*splitting valve*) παραμένει κλειστή κατά την εισαγωγή του δείγματος και την μεταφορά του στην στήλη. Ο χρόνος που παραμένει κλειστή ονομάζεται *splitless time*. Στο τέλος της μεταφοράς του δείγματος, η βαλβίδα ανοίγει για να καθαρίσει ο θάλαμος εξάτμισης από τα κατάλοιπα συστατικών, κυρίως του διαλύτη.

Ο χρόνος αυτός καθορίζει και την ποσότητα του δείγματος που θα εισέλθει στην στήλη. Θα πρέπει να κυμαίνεται περίπου στα 30-60sec αφότου ο εγχυτής έχει φθάσει την ανώτερη θερμοκρασία.

Η ροή του φέροντος αερίου κατά την διάρκεια της εισαγωγής δείγματος, προκαλεί την πλήρωση του θαλάμου εξάτμισης με ατμούς του δείγματος.



**Σχήμα 3.17.** Θερμοκρασίες και χρόνοι στην μέθοδο *PTV Splitless*.

### 3.3. Φασματοσκοπία Μαζών

#### **3.3.1. Θεωρητική βάση της φασματοσκοπίας μαζών**

Η φασματοσκοπία μαζών είναι μια ομάδα τεχνικών για τον ποιοτικό (ταυτοποίηση και προσδιορισμός δομής) και ποσοτικό προσδιορισμό χημικών ενώσεων σε διάφορα υποστρώματα. Βασίζεται στον ιονισμό των μορίων και την παραγωγή μοριακών και/ή θυγατρικών ιόντων, τον διαχωρισμό των ιόντων (συνήθως κατιόντων) σύμφωνα με τον λόγο της μάζας προς το φορτίο τους ( $m/z$ ) με την βοήθεια κατάλληλης διάταξης (μαγνητικού τομέα, τετραπόλου, χρόνου πτήσης κ.τ.λ.) και τέλος την καταγραφή της σχετικής έντασης του ιονικού ρεύματος και της εύρεσης της αντιστοιχίας των μαζών των λαμβανόμενων ιόντων με την δομή της πρόδρομης ένωσης. Η αντιστοιχία αυτή προϋποθέτει την γνώση των διαδικασιών ιονισμού και επιπλέον του μηχανισμού της πιθανής θραυσματοποίησης των ιόντων.

Το φάσμα που λαμβάνεται από ένα όργανο φασματοσκοπίας μαζών είναι η γραφική απεικόνιση της έντασης (αφθονίας) των ιόντων συναρτήσει του λόγου μάζας προς φορτίο αυτών ( $m/z$ ). Οι κορυφές μαζών αντιστοιχούν σε συγκεκριμένο λόγο  $m/z$ , ενώ το ύψος τους (ένταση ή αφθονία) εκφράζει το σχετικό ποσοστό του ιόντος σε σχέση με τα υπόλοιπα ιόντα που παράγονται κατά τον ιονισμό. Η κορυφή με την μεγαλύτερη ένταση καλείται βασική κορυφή. Το φάσμα κανονικοποιείται σε σχέση με την ένταση της βασικής κορυφής, η οποία παρουσιάζεται με ένταση 100% και έτσι καταγράφεται το φάσμα των σχετικών εντάσεων. Με τον ιονισμό του μορίου και ανάλογα με την μέθοδο ιονισμού (ενέργεια ιονισμού) παράγεται το μοριακό ιόν  $[M^+]$  με απώλεια ενός ηλεκτρονίου και άλλα ιόντα θραύσματα, τα οποία δημιουργούνται από την διάσπαση του μοριακού ιόντος με διάφορους μηχανισμούς που είναι χαρακτηριστικοί της αναλυόμενης ένωσης και επιτρέπουν την ταυτοποίηση της. Η έκταση με την οποία λαμβάνει χώρα η



θραυσματοποίηση εξαρτάται από την ποσότητα της ενέργειας που προσδίδεται στην ένωση (πηγή ιονισμού) και επίσης από την δομή της.

Τα πλεονεκτήματα της τεχνικής αυτής, όπως η μεγάλη εκλεκτικότητα, η δυνατότητα χρήσης ως ένας καθολικός ανιχνευτής (απόκριση σε όλες τις ενώσεις ανεξάρτητα της δομής τους) και η πολύ υψηλή ευαισθησία της σε συνδυασμό με την εξέλιξη της μικροηλεκτρονικής και των συστημάτων σύζευξης με την αέρια και την υγρή χρωματογραφία (συνδυάζοντας έτσι την μεγάλη διαχωριστική ικανότητα των χρωματογραφικών μεθόδων με την σημαντικότερη ικανότητα ταυτοποίησης και προσδιορισμού της ένωσης), την καθιστούν μια από τις τεχνολογίες αιχμής στην χημική ανάλυση με ικανότητα προσδιορισμού πολύ χαμηλών τάξεων συγκεντρώσεων. Έτσι, εφαρμόζεται σε μεγάλο εύρος ποιοτικών και ποσοτικών προσδιορισμών χημικών ενώσεων όλων των κατηγοριών (φυσικών συστατικών, χημικών ρύπων, βιομορίων, πολυμερών, κ.τ.λ.). Συνεπώς, βρίσκει ευρύτατη χρήση σε πολλά επιστημονικά πεδία τόσο στην βασική και εφαρμοσμένη έρευνα όσο και σε αναλύσεις παρακολούθησης και ρουτίνας από χημικά εργαστήρια με ιδιαίτερα σημαντικές εφαρμογές στην περιβαλλοντική ανάλυση.

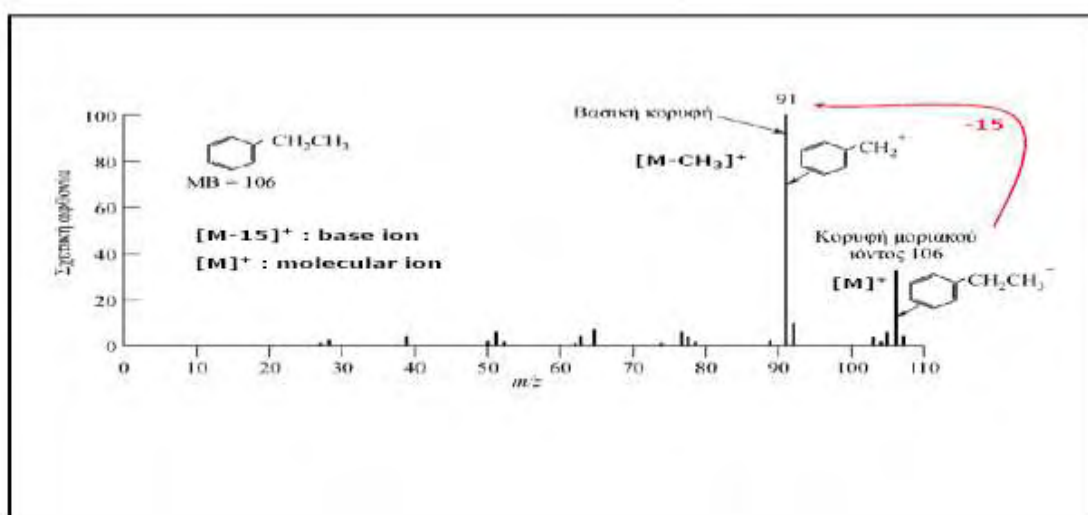
### 3.3.2. Ερμηνεία φασμάτων μάζας

Το πιο σημαντικό ιόν σε ένα φάσμα μάζας είναι σίγουρα το μοριακό ιόν, γιατί η παρουσία του παρέχει την πολύ σημαντική πληροφορία για το μοριακό βάρος της ένωσης. Η σταθερότητα του μοριακού ιόντος και η ένταση της φασματικής κορυφής του εξαρτάται από την δομή της ένωσης, π.χ. η σειρά με την οποία οι διάφορες ομάδες οργανικών ενώσεων παρουσιάζουν σταθερότητα του μοριακού ιόντος και φθίνουσα % σχετική αφθονία είναι: αρωματικοί υδρογονάνθρακες, συζυγή αλκένια>αδεύδες, κετόνες, καρβοξυλικά οξέα>ακυλαλογονίδια,αλκοόλες. Οι διάφορες ομόλογες σειρές οργανικών μορίων, π.χ. αλκοόλες, κετόνες, κορεσμένοι και ακόρεστοι αρωματικοί υδρογονάνθρακες κ.τ.λ., έχουν χαρακτηριστικούς μηχανισμούς θραύσης λόγω των συγκεκριμένων χαρακτηριστικών ομάδων που περιλαμβάνουν στο μόριο τους και συνεπώς και ενεργειών των δεσμών τους. Για παράδειγμα, το ιόν  $[M-18]^+$  προκύπτει από την απομάκρυνση  $H_2O$

στις αλκοόλες (αφυδάτωση) και το ιόν  $[M-44]^+$  προκύπτει από την απομάκρυνση  $CO_2$  (αποκαρβοξυλίωση) στα οργανικά οξέα.

**Πίνακας 3.1.** Φυσική αφθονία ισοτόπων κοινώς απαντούμενων χημικών στοιχείων <sup>[37]</sup>.

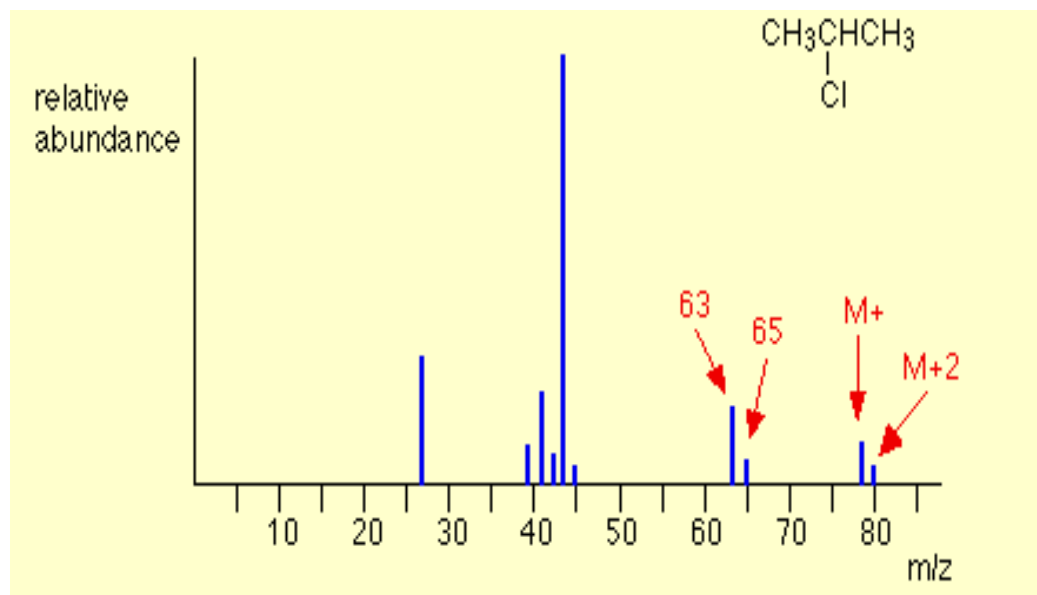
Στοιχείο	Φυσική αφθονία ισοτόπων					
	Μάζα	%	Μάζα	%	Μάζα	%
Υδρογόνο	1	99.98	2	0.02		
Άνθρακας	12	98.93	13	1.07		
Άζωτο	14	99.63	15	0.37		
Οξυγόνο	16	99.76	17	0.04	18	0.20
Φθόριο	19	100.00				
Φωσφόρος	31	100.00				
Θείο	32	95.03	33	0.75	34	4.22
Χλώριο	35	75.53			37	24.47



**Σχήμα 3.18.** Φάσμα μαζών οργανικής ένωσης, όπου διακρίνονται το μοριακό ιόν και η βασική κορυφή.

Ένα άλλο σημαντικό χαρακτηριστικό είναι η παρουσία ισοτοπικών κορυφών, κάτι που οφείλεται στην φυσική αφθονία ισοτόπων, όπως το Cl που στην φύση βρίσκεται κατά 75% ως  $^{35}Cl$  και κατά 25% ως  $^{37}Cl$  με αποτέλεσμα η παρουσία του σε μια ένωση να μπορεί εύκολα να διαπιστωθεί από την συστάδα των ιόντων  $M^+$  και  $[M+2]^+$  με αναλογία 3:1 αντίστοιχα (Σχήμα 3.19). Φάσματα ενώσεων που περιέχουν στοιχεία με ισότοπα μεγάλης φυσικής αφθονίας παρουσιάζουν μοριακές και θραυσματικές κορυφές κατά συστάδες. Για τις ενώσεις που περιλαμβάνουν  $C, H, O$  και ετεροάτομα το μοριακό τους βάρος θα πρέπει να αντιστοιχεί σε ζυγό αριθμό. Τέλος, αν μια ένωση περιέχει περιττό

αριθμό ατόμων N, τότε το μοριακό της βάρος θα πρέπει να είναι περιττός αριθμός (Κανόνας Αζώτου).

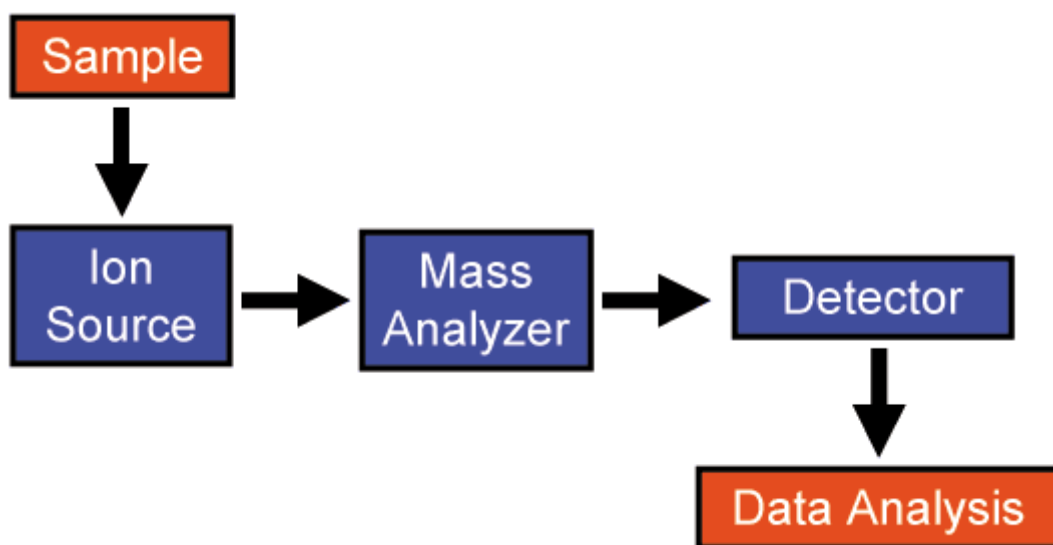


**Σχήμα 3.19.** Φάσμα μαζών του 2-χλωροπροπανίου. Διακρίνονται οι κορυφές  $M^+$  και  $M^+ + 2$ , που αντιστοιχούν στην ύπαρξη φυσικών ισοτόπων του ατόμου του χλωρίου ( $\text{Cl}^{35}$  και  $\text{Cl}^{37}$ ).

#### 3.4. Οργανολογία φασματογράφου μαζών

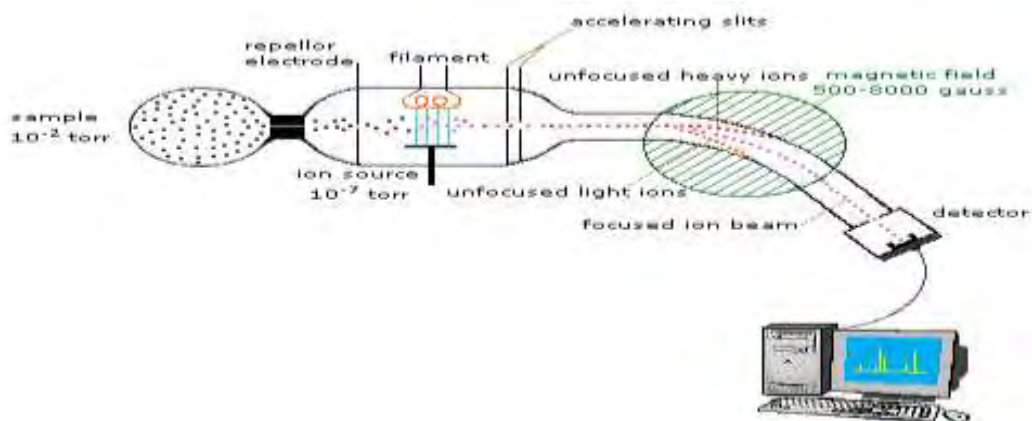
Ο φασματογράφος μάζας αποτελείται από τα ακόλουθα βασικά τμήματα (Σχήμα 3.20):

- i) Σύστημα εισαγωγής δείγματος
- ii) Πηγή ιονισμού
- iii) Αναλυτής μαζών
- iv) Ανιχνευτής ιόντων
- v) Σύστημα καταγραφής δεδομένων



**Σχήμα 3.20.** Βασικά τμήματα οργανολογίας φασματοσκοπίας μαζών.

Το σύστημα εισαγωγής δείγματος χρησιμοποιείται για την εισαγωγή μικρών ποσοτήτων δείγματος συνήθως στην αέρια φάση. Η πηγή ιονισμού είναι ο χώρος στον οποίο ένα μέρος του δείγματος ιονίζεται και τα παραγόμενα ιόντα οδηγούνται στον αναλυτή μαζών. Σκοπός του αναλυτή μαζών είναι ο διαχωρισμός των ιόντων σύμφωνα με τον λόγο της μάζας προς το φορτίο τους ( $m/z$ ). Η μάζα εκφράζεται σε μονάδες ατομικής μάζας (amu) ή αλλιώς Dalton (Da), που ορίζονται ως ο λόγος της μάζας του ατόμου σε σχέση με την μάζα του  $1/12$  της μάζας του ισότοπου  $^{12}\text{C}$ , η οποία θεωρείται ως 12 amu ( $1\text{amu}=1\text{Da}=1.66054 \times 10^{-27}$  kg/ άτομο  $^{12}\text{C}$ ). Η ακριβής μάζα προσδιορίζεται συσχετίζοντας την μάζα του ιόντος με την μάζα του  $^{12}\text{C}$ . Ο λόγος  $m/z$  λαμβάνεται με διαίρεση της μοριακής μάζας ( $m$ ) ενός ιόντος με φορτίο ( $z$ ) που αυτό φέρει. Εν συνεχεία, τα ιόντα συλλαμβάνονται στον ανιχνευτή, ο οποίος ενισχύει το λαμβανόμενο σήμα που οδηγείται στο κεντρικό σύστημα έλεγχου και καταγραφής δεδομένων. Η πηγή ιονισμού, ο αναλυτής μαζών και ο ανιχνευτής των ιόντων βρίσκονται υπό συνθήκες κενού που προκαλείται από διαφραγματικές ( $10^{-3}$ - $10^{-4}$  Torr) και στροβιλομοριακές (ως  $10^{-9}$ Torr) αντλίες κενού.



**Σχήμα 3.21.** Διάταξη φασματογράφου μαζών. Διακρίνεται η πηγή ιόντων, όπου το δείγμα ιονίζεται και παράγονται ιόντα, τα οποία οδηγούνται στην συνέχεια στον αναλυτή μάζας. Εκεί διαχωρίζονται ανάλογα με τον λόγο της μάζας προς το φορτίο τους ( $m/z$ ) υπό την επίδραση μαγνητικού πεδίου και οδηγούνται στον ανιχνευτή.

### 3.4.1. Τεχνικές ιονισμού

Το πρώτο βήμα για την καταγραφή ενός φάσματος είναι η μετατροπή των μορίων ή των ατόμων της προς ανάλυση ένωσης σε ιόντα σε αέρια φάση. Οι τεχνικές ιονισμού που χρησιμοποιούνται στην αέρια χρωματογραφία χωρίζονται στις εξής κατηγορίες<sup>[38]</sup>:

α) *Μέθοδοι παραγωγής μοριακών ιόντων από πτητικά δείγματα:* ιονισμός πρόσκρουσης ηλεκτρονίων (EI), χημικός ιονισμός (CI), φωτοϊονισμός (PI) και ιονισμός πεδίου (FI).

β) *Μέθοδοι παραγωγής ιόντων από μη-πτητικά δείγματα*

i) *Τεχνικές ψεκασμού:* θερμοψεκασμός (TSP), ηλεκτροψεκασμός (ESI) και χημικός ιονισμός υπό ατμοσφαιρική πίεση (APCI).

ii) *Τεχνικές εκρόφησης που επάγονται από πρόσκρουση σωματιδίων:* ιονισμός με ροή ατόμων υψηλής ταχύτητας (FAB), ιονισμός μέσω πρόσκρουσης σωματιδίων χαμηλής ενέργειας με υγρές επιφάνειες, εκρόφηση από επιφάνειες, ιονισμός μέσω πρόσκρουσης με σωματίδια υψηλής ενέργειας, ιονισμός εκρόφησης υποβοηθούμενος από πλάσμα (PD), ιονισμός εκρόφησης υποβοηθούμενος από υλικό μήτρας και laser (MALDI), ιονισμός εκρόφησης υποβοηθούμενος από υλικό μήτρας και laser υπεριώδους (IR MALDI) και ιονισμός με επιβραδυμένη εξαγωγή.

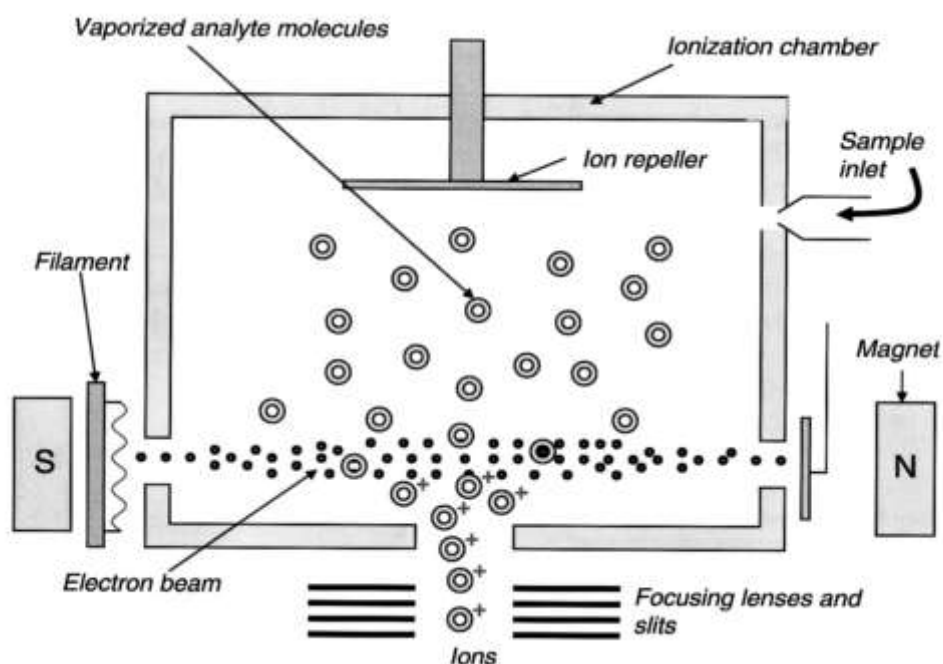
γ) Μέθοδοι παραγωγής ατομικών ιόντων:

θερμικός ιονισμός, ιονισμός μέσω πηγής σπινθήρα, ιονισμός με πηγές πλάσματος, ιονισμός μέσω εκκένωσης υπό πυράκτωση και ιονισμός μέσω επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (ICP).

### 3.4.2. Ιονισμός με πρόσκρουση ηλεκτρονίων (*Electron Ionization, EI*)

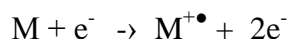
Η πηγή ιονισμού μέσω πρόσκρουσης ηλεκτρονίων (*Electron Ionization, EI*), επινοήθηκε από τον Dempster<sup>[39]</sup>, βελτιώθηκε από τον Blackney<sup>[40]</sup>, ενώ οι περισσότερες εμπορικά διαθέσιμες πηγές *EI* βασίζονται στον σχεδιασμό του Nier<sup>[41]</sup>. Στις πηγές αυτές, μια δέσμη ηλεκτρονίων προσκρούει στους μοριακούς ατμούς μιας ουσίας υπό ελαττωμένη πίεση, οπότε ένα ή περισσότερα ηλεκτρόνια αποβάλλονται από τα μόρια και τελικά παράγονται σχετικά ασταθή θετικά ιόντα μονών ηλεκτρονίων ή πολλαπλά φορισμένα ιόντα. Είναι δε δυνατόν να παραχθούν αρνητικά φορτισμένα ιόντα, στην περίπτωση που τα μόρια έχουν υψηλή ηλεκτρονιακή ενέργεια. Για να είναι δυνατή η σύλληψη του ηλεκτρονίου, θα πρέπει η ενέργεια που συνδέεται με το ηλεκτρόνιο να είναι περίπου 1eV.

Μια πηγή ιόντων τύπου Nier φαίνεται στο παρακάτω σχήμα. Τα ηλεκτρόνια παράγονται μετά από θέρμανση ενός μεταλλικού νήματος, το οποίο συνήθως αποτελείται από βολφραϊμίο (tungsten) ή ρήνιο (rhenium). Τα ηλεκτρόνια αυτά επιταχύνονται από μια διαφορά δυναμικού που εφαρμόζεται μεταξύ του νήματος και της πηγής των ιόντων, περνούν μέσω των οπών εισόδου και εξόδου και συλλέγονται από ένα ηλεκτρόδιο παγίδα. Το δυναμικό εφαρμόζεται σε ένα ηλεκτρόδιο απώθησης που βρίσκεται μέσα στην πηγή και επιταχύνει τα ιόντα προς την έξοδο. Ένα μαγνητικό πεδίο εφαρμόζεται παράλληλα προς τον άξονα της δέσμης των ηλεκτρονίων και η ένταση του πεδίου επιλέγεται έτσι, ώστε να παρέχει μέγιστη μεταφορά και ελάχιστη εκτροπή της δέσμης της δέσμης. Τα δείγματα εισάγονται απευθείας από την πηγή και για τις περισσότερες αναλυτικές εφαρμογές ο ρυθμός εισόδου των ατμών και οι οπές της πηγής επιλέγονται με τέτοιο τρόπο, ώστε να ελαχιστοποιείται η πιθανότητα αντιδράσεων μεταξύ ιόντων και μορίων. Για την λήψη αμιγών φασμάτων *EI* απαιτείται η διατήρηση της πίεσης στην πηγή κάτω από 0.1mTorr.

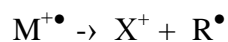


Σχήμα 3.22. Σχηματικό διάγραμμα πηγής ιονισμού με πρόσκρουση ηλεκτρονίων, EI.

Ο ιονισμός μέσω EI ακολουθεί την αντίδραση:



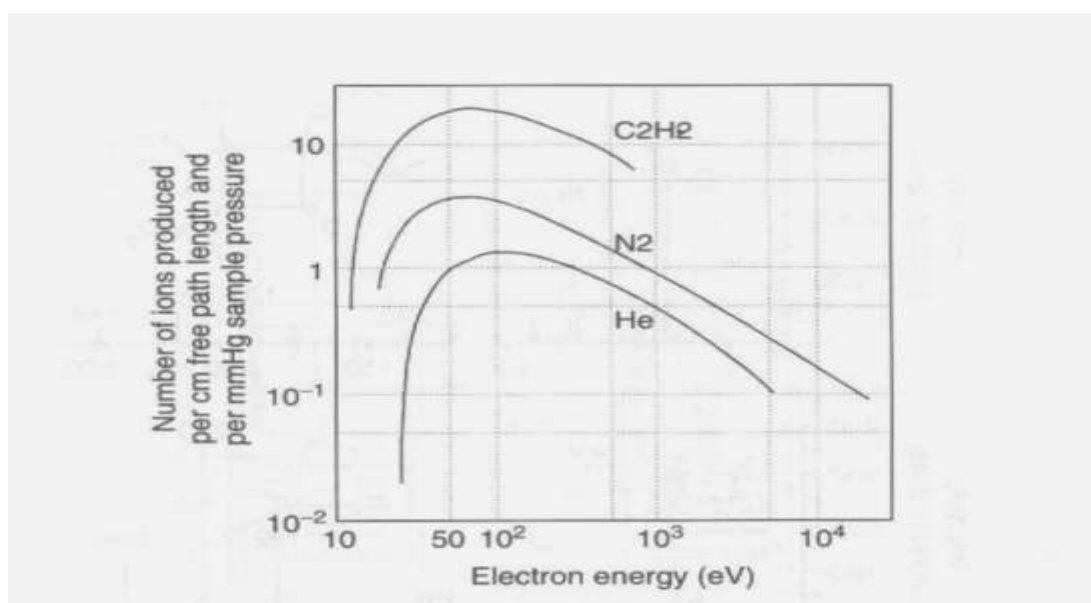
Το μοριακό ιόν ( $M^{+\bullet}$ ) που έχει διεγερθεί υφίσταται θραυσματοποιήσεις. Ως κατιονική ρίζα με περιττό αριθμό ηλεκτρονίων, μπορεί να διασπαστεί είτε προς μια ρίζα ( $R^\bullet$ ) και ένα ιόν με άρτιο αριθμό ηλεκτρονίων ( $X^+$ ), είτε προς ένα ουδέτερο μόριο (N) και μια νέα κατιονική ρίζα ( $Y^{+\bullet}$ ).



Αυτοί οι δυο τύποι ιόντων έχουν διαφορετικές χημικές ιδιότητες. Κάθε ηλεκτρόνιο σχετίζεται με ένα κύμα, του οποίου το μήκος κύματος  $\lambda$  δίνεται από την εξίσωση<sup>[42]</sup>:

$$\lambda = h/mv$$

όπου  $m$  είναι η μάζα του,  $u$  η ταχύτητά του και  $h$  η σταθερά του Planck. Το  $\lambda$  ισούται με  $2.7\text{\AA}$  όταν η κινητική ενέργεια είναι  $20\text{eV}$  και  $1.4\text{\AA}$  όταν η κινητική ενέργεια είναι ίση με  $70\text{eV}$ . Αν κάποια από τις συχνότητες έχει ενέργεια  $hu$ , που αντιστοιχεί σε μια μετάπτωση στις εσωτερικές στοιβάδες του μορίου, τότε μπορεί να συμβεί μεταφορά ενέργειας σε αυτό, η οποία αν είναι επαρκής, μπορεί να οδηγήσει τελικά στην απώλεια ενός ηλεκτρονίου από το μόριο. Σε χαμηλές τιμές δυναμικού, η κινητική ενέργεια του μορίου ( $E_{κιν}$ ) είναι χαμηλότερη από την ενέργεια ιονισμού του, ( $E_{ιον}$ ). Στην περίπτωση οργανικών μορίων εμφανίζεται ένα ευρύ μέγιστο περίπου στα  $70\text{eV}$  (Σχήμα 3.23).



**Σχήμα 3.23.** Αριθμός ιόντων που παράγονται συναρτήσει της ηλεκτρονιακής ενέργειας. Ένα πλατύ μέγιστο εμφανίζεται περίπου στα  $70\text{eV}$ .

Για δεδομένο δυναμικό και σταθερή θερμοκρασία, ο αριθμός των ιόντων  $I$  που παράγονται ανά μονάδα χρόνου σε έναν όγκο  $V$  συνδέεται με την πίεση  $p$  και το ηλεκτρονιακό ρεύμα  $i$  σύμφωνα με την εξίσωση:

$$I = NpiV$$

όπου  $N$  είναι ένας συντελεστής σταθερής αναλογίας. Η εξίσωση αυτή δείχνει ότι η πίεση του δείγματος συνδέεται άμεσα με το παραγόμενο ιοντικό ρεύμα, κάτι το οποίο επιτρέπει την χρήση της πηγής αυτής σε ποσοτικές αναλύσεις. Κατά μέσο όρο παράγεται ένα ιόν για κάθε 1000 μόρια που μπαίνουν στην πηγή υπό κανονικές ατμοσφαιρικές συνθήκες,



στα 70eV. Το κρίσιμο σημείο για τον ιονισμό των μορίων συνάρτηση της ηλεκτρονιακής ενέργειας,  $E_{ηλ}$ . Τα ιόντα αρχικά ανιχνεύονται σε ένα "δυναμικό εμφάνισης" ("*appearance potential*") και το ιοντικό ρεύμα αυξάνεται με την  $E_{ηλ}$  μέχρι ένα μέγιστο που κυμαίνεται από 50-100eV. Για αναλυτικές εφαρμογές, υιοθετήθηκε ως τυπική τιμή  $E_{ηλ}=70eV$ , υπό την έννοια ότι αντιστοιχεί στο μέγιστο σημείο τομής για τα περισσότερα μόρια και παρέχει σχεδόν την μέγιστη απόλυτη ένταση για τα μοριακά ιόντα, ενώ παράλληλα παρέχει θραύσματα με σχετικά μεγάλη ένταση, τα οποία προσφέρουν πληροφορίες για την δομή.

Τα φάσματα που λαμβάνονται κάτω από τις ίδιες συνθήκες είναι επαναλήψιμα και ανεξάρτητα από το όργανο που χρησιμοποιείται. Επίσης, τα φάσματα είναι στενά συνδεδεμένα με την μοριακή δομή, ακόμα και όταν σε μερικές περιπτώσεις συμβαίνει ταχεία ισομερείωση πριν την θραυσματοποίηση. Έτσι, συχνά παρατηρούνται ιόντα θραυσματοποίησης που προκύπτουν μετά από μετάθεση του ουδέτερου μορίου που ιονίστηκε. Για τον λόγο αυτό, το φάσμα EI συχνά αναφέρεται και ως μοριακό αποτύπωμα, το οποίο χρησιμοποιείται σε βιβλιοθήκες αναζήτησης για την εύρεση συστατικών με μεγάλο βαθμό ομοιότητας με το άγνωστο δείγμα που αναλύεται<sup>[43]</sup>.

Το μεγάλο πλεονέκτημα της τεχνικής αυτής ιονισμού είναι χωρίς αμφιβολία η υψηλή αναπαραγωγιμότητα που εμφανίζει όσον αφορά την θραυσματοποίηση, με αποτέλεσμα να είναι δυνατή η δημιουργία βιβλιοθηκών με φάσματα EI για την ταυτοποίηση άγνωστων ουσιών. Επίσης, λαμβάνει χώρα εκτεταμένη θραυσματοποίηση, έχει υψηλή απόδοση ιονισμού και τέλος ο ιονισμός είναι μη-εκλεκτικός, κάτι που σημαίνει ότι όλα τα μόρια που εξατμίστηκαν μπορούν να ιονιστούν.

Στα μειονεκτήματα της τεχνικής αυτής καταγράφεται το γεγονός ότι τα προς ανάλυση δείγματα θα πρέπει να είναι πτητικά, άρα περιορίζεται στην ανάλυση μορίων με  $MB \leq 600Da$ . Το ότι είναι μη-εκλεκτική μέθοδος σημαίνει ότι όλα τα μόρια που βρίσκονται στην αέρια φάση συνεισφέρουν στο φάσμα μαζών και το καθιστούν πιο περίπλοκο. Τέλος, σχηματίζονται μόνο θετικά ιόντα και αυτό δεν ευνοεί κάποιες τάξεις ουσιών.

### 3.4.3. Αναλυτές μάζας στην φασματοσκοπία μαζών

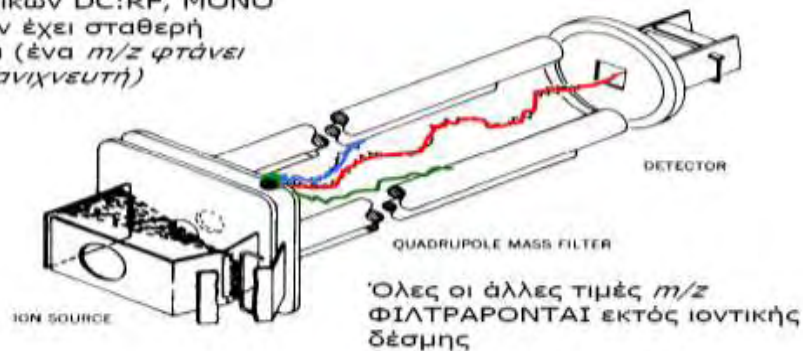
Όλα τα ατομικά και μοριακά ιόντα μπορούν να αναλυθούν με την φασματοσκοπία μαζών, καθιστώντας την μια καθολική μέθοδο χημικής ανάλυσης. Η εφαρμογή της απαιτεί κατάλληλες μεθόδους παραγωγής, ανάλυσης και ανίχνευσης ιόντων.

Αφού ιονιστούν επιτυχώς, τα δείγματα θα πρέπει στην συνέχεια να αναλυθούν. Αυτό γίνεται με τον αναλυτή μάζας, ο οποίος διαχωρίζει τα ιόντα ανάλογα με τον λόγο της μάζας προς το φορτίο τους ( $m/z$ ). Υπάρχουν διάφοροι τύποι αναλυτών μάζας και διακρίνονται σε συνεχείς (τετραπολικό φίλτρο μαζών,  $Q$  – μαγνητικού ή ηλεκτρικού πεδίου,  $B$  ή  $E$ ) και παλμικούς (τετραπολική παγίδα ιόντων,  $QITMS$  – αναλυτές χρόνου πτήσης,  $TOF$  – αναλυτές κυκλοτρονιακού συντονισμού ιόντων μετασχηματισμού Fourier,  $FT-ICR$ ). Η φύση του δείγματος μαζί με τις απαιτήσεις της ανάλυσης θα καταδείξουν τον καταλληλότερο αναλυτή μάζας κάθε φορά.

### 3.4.4. Αρχή λειτουργίας και διάταξη τετραπολικού φίλτρου μαζών

Το τετραπολικό φίλτρο μαζών ή γραμμικό τετράπολο αποτελείται από μια γραμμική διάταξη τεσσάρων συμμετρικά παρατεταγμένων ράβδων στις οποίες εφαρμόζονται δυναμικά rf (radio frequency) και dc (direct current) (Σχήμα 3.24). Οι δυνάμεις ασκούνται στο επίπεδο όπου κινείται ο άξονας  $z$ , κατά μήκος του οποίου κινούνται τα ιόντα κατά την διαδρομή τους από την πηγή ιόντων ως τον ανιχνευτή. Τα ιόντα, κατά την διαδρομή τους αυτή, ταλαντώνονται στα επίπεδα των αξόνων  $x$  και  $y$  με συχνότητες εξαρτώμενες από τον λόγο τους  $m/z$  και με διαδρομές που εξαρτώνται από το πλάτος του εφαρμοζόμενου δυναμικού και τις αρχικές θέσεις των ίδιων των ιόντων. Αν η ταλάντωση ενός ιόντος στο επίπεδο αυτό είναι σταθερή, τότε το ιόν διασχίζει την διάταξη εως ότου προσεγγίσει τον ανιχνευτή. Σταθερές ταλαντώσεις επιτυγχάνονται μόνο για ιόντα δεδομένου λόγου  $m/z$  και για συγκεκριμένη διάταξη, συχνότητα ταλάντωσης και δυναμικά rf και dc<sup>[45]</sup>.

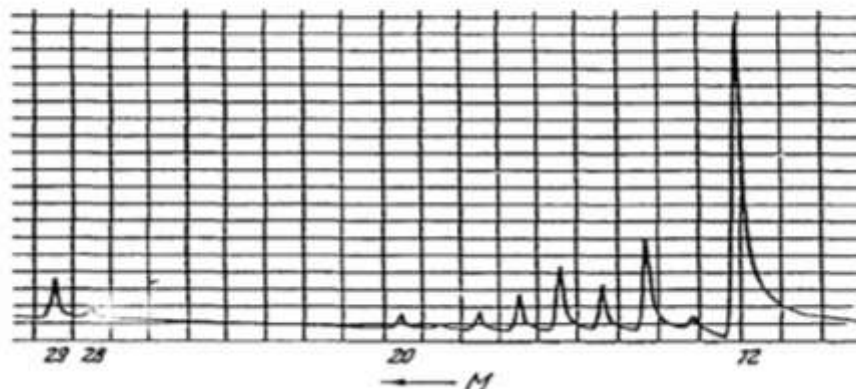
Σε συγκεκριμένο λόγο δυναμικών DC:RF, ΜΟΝΟ ένα ιόν έχει σταθερή τροχιά (ένα  $m/z$  φτάνει στον ανιχνευτή)



Σχήμα 3.24. Λειτουργία τετραπόλου.

### 3.4.5. Διάταξη και αρχή λειτουργίας τετραπολικής παγίδας ιόντων

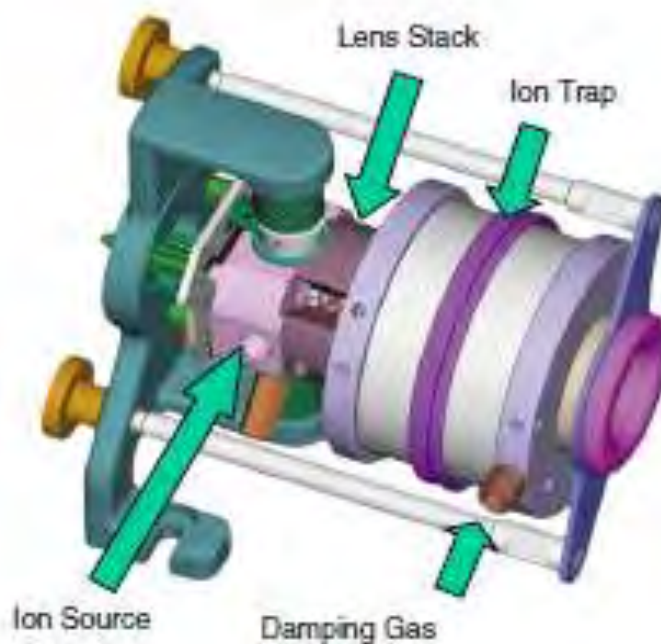
Ο Paul και ο Steinwedel περιέγραψαν τον αναλυτή παγίδας ιόντων το 1960. Ωστόσο, τα σχέδια αυτά απλοποιήθηκαν από τον Stanford και τους συνεργάτες του.



Σχήμα 3.25. Το πρώτο φάσμα μαζών που λήφθηκε με αναλυτή παγίδας ιόντων από τον Paul.

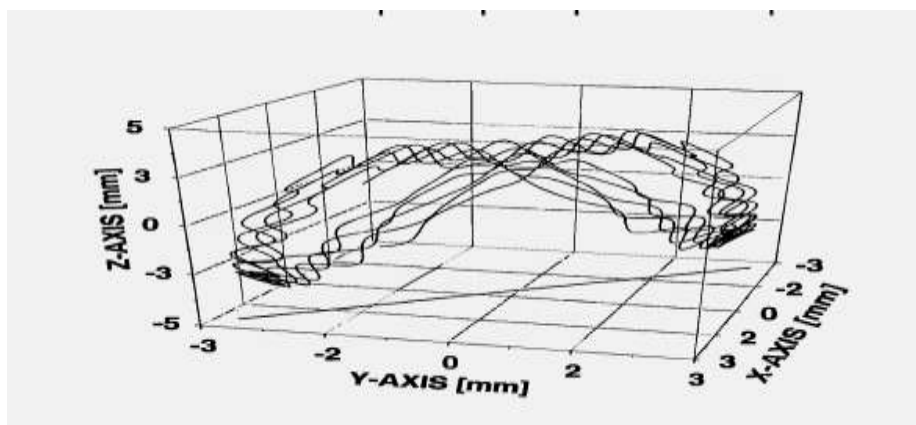
Η τετραπολική παγίδα ιόντων είναι το τρισδιάστατο ανάλογο του γραμμικού τετραπολικού φίλτρου μαζών<sup>[46]</sup>. Σε αυτήν την διάταξη επίσης τα ιόντα εκτίθενται σε δυνάμεις που ασκούνται από δυναμικό rf αλλά αυτήν την φορά και στις τρεις, αντί των δυο, διαστάσεων. Στην γραμμική διάταξη που εξετάσαμε προηγουμένως, η σταθερή

κίνηση των ιόντων τους δίνει ελευθερία κίνησης σε μια διάσταση (άξονας  $z$ ). Στην παγίδα ιόντων, όμως, δεν υπάρχει ελευθερία κίνησης των ιόντων σε καμία διάσταση. Για αυτό, τα ιόντα παγιδεύονται μέσα στο σύστημα των τριών ηλεκτροδίων (Σχήμα 3.26).



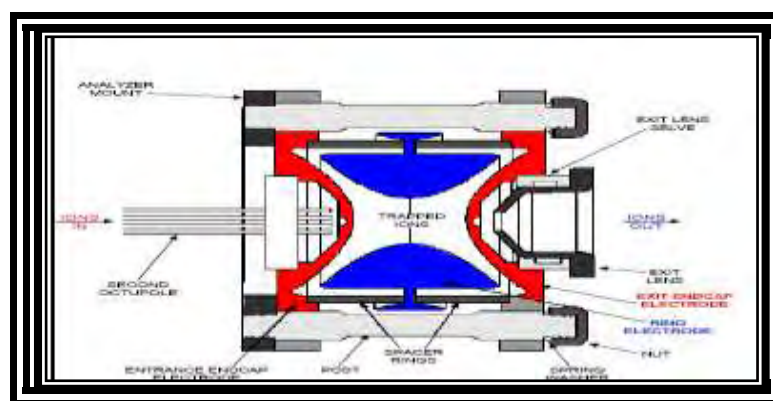
**Σχήμα 3.26.** Σχηματική αναπαράσταση ενός αναλυτή παγίδας ιόντων.

Αναλυτικότερα, η τετραπολική παγίδα ιόντων αποτελείται από ένα δακτυλιοειδές ηλεκτρόδιο (*ring electrode*) και δυο πλευρικά ηλεκτρόδια (*endcap electrode*), τα οποία είναι τοποθετημένα στην βάση και στην κορυφή του δακτυλιοειδούς ηλεκτροδίου. Όλα τα ηλεκτρόδια έχουν γεωμετρικό σχήμα υπερβολής. Από την αλληλεπικάλυψη ενός συνεχούς και ενός εναλασσόμενου δυναμικού, προκαλείται η εμφάνιση μιας πηγής ψευδο-δυναμικού παγίδευσης (*trapping pseudo-potential well*), έτσι ώστε τα φορτισμένα σωματίδια ή τα ιόντα στην αέρια φάση να εγκλωβίζονται στην παγίδα ιόντων διαγράφοντας τροχιές σχήματος 8 (Σχήμα 3.27).



**Σχήμα 3.27.** Γραφική αναπαράσταση της τροχιάς σχήματος 8 των ιόντων μέσα υπό την επίδραση δυναμικού μέσα σε μια παγίδα ιόντων.

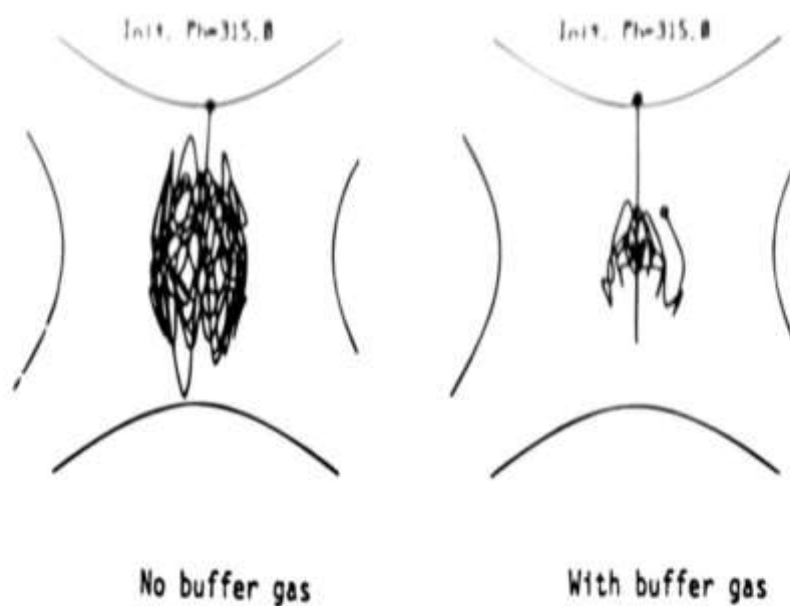
Η παγίδα ιόντων αυτή καθεαυτή λειτουργεί σαν φασματόμετρο μάζας όταν οι συνθήκες παγίδευσης των ιόντων τροποποιηθούν κατά τέτοιον τρόπο, ώστε τα ιόντα να εξέρχονται εκλεκτικά ανάλογα με τον λόγο τους μάζα/φορτίο ( $m/z$ ) από την πηγή αυτή του ψευδο-δυναμικού. Καθώς τα ιόντα με συνεχόμενο λόγο  $m/z$  εξέρχονται με την σειρά τους από την παγίδα ιόντων, προσεγγίζουν έναν εξωτερικό ανιχνευτή δια μεσου του οποίου καταγράφεται ένα σήμα έντασης ανάλογης του αριθμού των ιόντων κάθε είδους. Κατά αυτήν την έννοια, ένα φάσμα μαζών έχει πλέον δημιουργηθεί.



**Σχήμα 3.28.** Τετραπολική παγίδα ιόντων. Δοο πλευρικά ηλεκτρόδια γειωμένα και ένα δακτυλιοειδές, στο οποίο εφαρμόζεται ένα αυξανόμενο  $rf$  δυναμικό.

Το τετραπολικό φασματόμετρο μάζας παγίδας ιόντων είναι ένα όργανο αρκετά μικρό σε μέγεθος σε σύγκριση με άλλα όργανα, είναι σχετικά μη-ακριβό, αποτελεί ένα από τα πιο αν όχι το πιο-ευαίσθητα φασματόμετρα μάζας και αφού μπορούν να λάβουν χώρα πολλοί

εκλεκτικοί ως προς την μάζα διαχωρισμοί, η παγίδα ιόντων μπορεί να λειτουργήσει και σαν φασματόμετρο διαδοχικής φασματοσκοπίας μαζών (*tandem mass spectrometry*). Μοιράζεται πολλά κοινά στοιχεία με τον αναλυτή κυκλοτρονιακού συντονισμού ιόντων (ICR), μόνο που το κόστος του τελευταίου είναι περίπου το δεκαπλάσιο του QITMS. Επίσης, άλλη μια σημαντική διαφορά από τα υπόλοιπα φασματόμετρα μάζας είναι ότι το QITMS λειτουργεί σε πίεση της τάξης των  $10^{-3}$  Torr, την στιγμή που όλα τα υπόλοιπα λειτουργούν σε πίεση  $10^{-6}$ - $10^{-9}$  Torr. Τα ιόντα συγκεντρώνονται στο κέντρο της παγίδας ιόντων, αφού λόγω της σύγκρουσης με τα άτομα του φέροντος αερίου ελαττώνεται η κινητική τους ενέργεια και δεν μπορούν πλέον να κινούνται σε όλο τον χώρο της παγίδας. Αυτό φαίνεται καθαρά στο Σχήμα 3.29, όπου οι τροχιές των ιόντων, υπό την επίδραση του φέροντος αερίου, περιορίζονται στο κέντρο της παγίδας ιόντων.



**Σχήμα 3.29.** Επεξεργασμένες σε υπολογιστή τροχιές κίνησης ιόντων με  $m/z=69$  μέσα στην παγίδα ιόντων με και χωρίς την επίδραση του φέροντος αερίου (ήλιο).

Συγκεντρωτικά, τα κυριότερα πλεονεκτήματα της τετραπολικής παγίδας ιόντων μπορούν να συνοψιστούν στα εξής:

- i) Υψηλή ευαισθησία

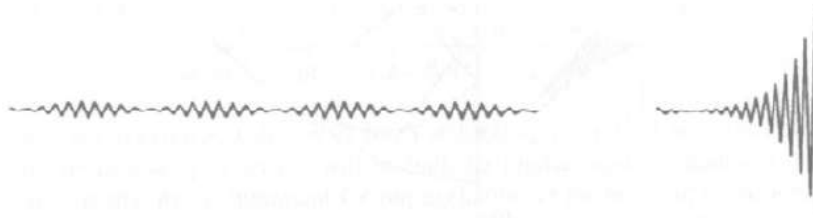
- ii) Κατάληψη ελάχιστου χώρου και μηχανική απλότητα από μια συσκευή που παρ'όλα αυτά έχει υψηλή απόδοση
- iii) Η διαδοχική φασματοσκοπία μαζών (tandem mass spectrometry) είναι δυνατή εφαρμόζοντας διαδοχικές μετρήσεις ανάλυσης μάζας
- iv) Μπορούν να μελετηθούν αντιδράσεις μορίων/ιόντων για ιόντα επιλεγμένης μάζας
- v) Είναι δυνατή η επίτευξη υψηλής ανάλυσης ( $>10^6$  για λόγο  $m/z > 1000$ ) μέσω αργών σαρώσεων αλλά η ακρίβεια μέτρησης της μάζας είναι σχετική χαμηλή
- vi) Ιόντα με υψηλό λόγο  $m/z$  είναι δυνατόν να αναλυθούν χρησιμοποιώντας πειράματα συντονισμού
- vii) Είναι δυνατή η μη-καταστροφική ανίχνευση χρησιμοποιώντας τεχνικές μετασχηματισμού Fourier.

### 3.4.6. Θεωρία της παγίδας ιόντων

Η μαθηματική ανάλυση με την χρήση των εξισώσεων του Mathieu επέτρεψε τον προσδιορισμό των περιοχών σταθερότητας ιόντων δεδομένης μάζας. Οι εξισώσεις που χρησιμοποιούνται είναι ίδιες με αυτές για τους τετραπολικούς ανιχνευτές, με την διαφορά ότι στην παγίδα ιόντων η κίνηση των ιόντων υπό την επίδραση του εφαρμοζόμενου δυναμικού λαμβάνει χώρα σε τρεις διαστάσεις ( $x, y$  και  $z$ ) και αντί για δυο στους τετραπολικούς ανιχνευτές. Οπότε, η αλλαγή των μεταβλητών στην γενική εξίσωση του Mathieu, λαμβάνοντας υπόψιν και την κυλινδρική συμμετρία ( $x^2 + y^2 = z^2$ ), επιτρέπει την εξαγωγή των παρακάτω εξισώσεων κίνησης: , όπου  $u$  είναι είτε η συντεταγμένη  $z$  είτε η  $r$ .

$$a_u = a_z = -2a_r = \frac{-16zeU}{m(v_0^2 + 2z_0^2)\omega^2}$$

$$q_u = q_z = -2q_r = \frac{8zeV}{m(v_0^2 + 2z_0^2)\omega^2}$$



**Σχήμα 3.30.** Σταθερή τροχιά (αριστερά), που αντιστοιχεί σε φανταστική λύση της εξίσωσης Mathieu, όπου  $\alpha=0$  και  $0<\beta<1$ . Δεξιά, μια συνεχώς αμβλυνόμενη κίνηση των ιόντων, που αντιστοιχεί σε μια πραγματική λύση της εξίσωσης Mathieu. Στην περίπτωση αυτή, τα ιόντα θα αποφορτιστούν κατά μήκος του άξονα  $r$  και κατά μήκος του άξονα  $z$  θα εκδιωχθούν κατά 50% προς την κατεύθυνση του ανιχνευτή, ενώ τα υπόλοιπα θα εκδιωχθούν προς την αντίθετη κατεύθυνση.

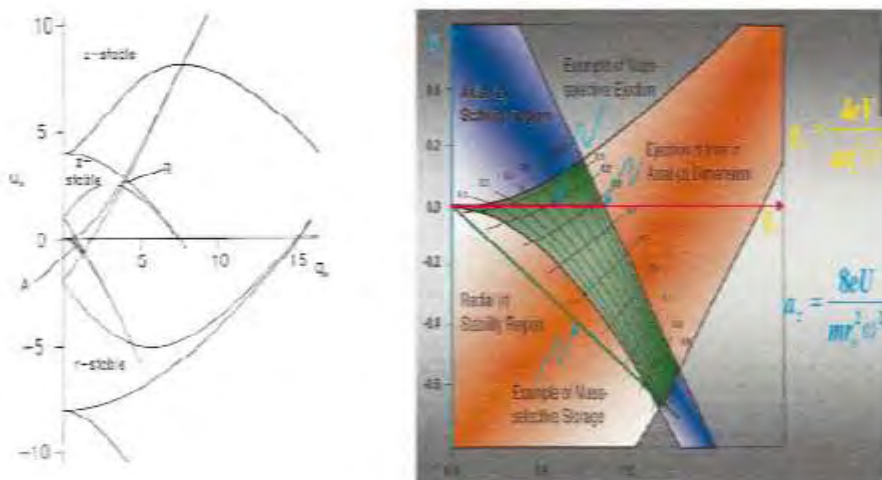
Για να διατηρείται σταθερή η τροχιά, η κίνηση των ιόντων πρέπει να είναι τέτοια ώστε οι συντεταγμένες τους με τον χρόνο να μην προσεγγίζουν τα  $z_0$  και  $r_0$ . Η πλήρης ολοκλήρωση της εξίσωσης Mathieu με την μέθοδο των Floquet και Fourier και την χρησιμοποίηση της παρακάτω σχέσης:

$$e^{(a + i\beta)}$$

, δίνει πραγματικές λύσεις οι οποίες αντιστοιχούν σε μια συνεχώς αυξανόμενη και συνεπώς ασταθή τροχιά και φανταστικές λύσεις που αντιστοιχούν σε σταθερή τροχιά, όπως φαίνεται και στο παραπάνω σχήμα..

Στο Σχήμα 3.31 παριστάνονται οι iso- $\beta$  γραμμές για  $\beta=0$  και  $\beta=1$ , αντίστοιχα. Το διάγραμμα αναφέρεται στις συντεταγμένες  $z$  και  $r$  της παγίδας ιόντων. Για να έχει όμως ένα ιόν σταθερή τροχιά μέσα στην παγίδα ιόντων, θα πρέπει η τροχιά του να διατηρείται σταθερή τόσο κατα τον άξονα  $z$ , όσο και κατά τον άξονα  $r$ . Μια τέτοια κατάσταση αντιστοιχεί σε αλληλεπικάλυψη των περιοχών σταθερότητας των δυο διαγραμμάτων. Οι εμπορικά διαθέσιμες παγίδες ιόντων χρησιμοποιούν την πρώτη περιοχή σταθερότητας (μεγεθυνημένη), στην οποία το  $\beta$  παίρνει τιμές μεταξύ 0 και 1.





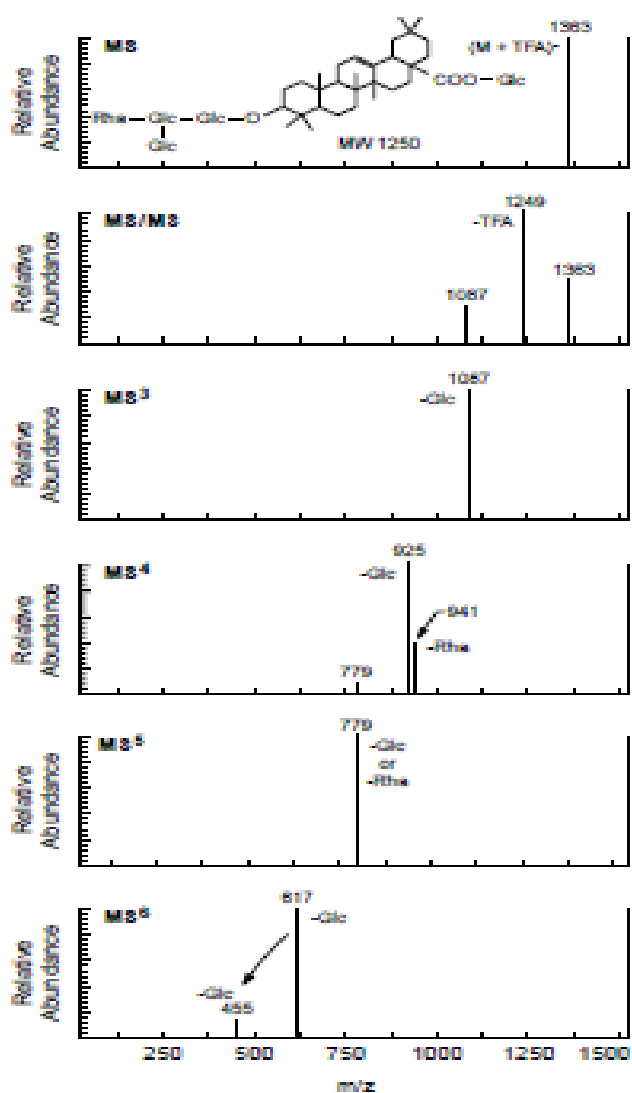
**Σχήμα 3.31.** Περιοχές σταθερότητας κατά μήκος των αξόνων  $r$  και  $z$  σε μια παγίδα ιόντων. Οι περιοχές μέσα σε αυτά τα όρια αναπαριστούν σταθερές τροχιές για την κάθε συντεταγμένη και αντιστοιχούν σε φανταστικές λύσεις της εξίσωσης Mathieu. Η κοινή περιοχή σταθερότητας κατά μήκος των αξόνων  $r$  και  $z$  παρατίθεται μεγεθυνημένη δεξιά.

### 3.4.7. Διαδοχική φασματοσκοπία μαζών (*Tandem Mass Spectrometry, MS/MS*)

Η διαδοχική φασματοσκοπία μαζών περιλαμβάνει τουλάχιστον δυο στάδια ανάλυσης ιόντων με σκοπό την εξέταση της θραυσματοποίησης συγκεκριμένων ιόντων μέσα από ένα μίγμα ιόντων. Οι βάσεις της ανάπτυξης της τεχνικής αυτής τέθηκαν από τις πρωτοποριακές εργασίες των Beyon, Cook και των συνεργατών τους <sup>[47]</sup> πάνω στις μαγνητικές διατάξεις αντίστροφης γεωμετρίας, από την ανάπτυξη του διαχωρισμού με ενεργοποίηση με σύγκρουση από τον McLaffery και τους συνεργάτες του <sup>[48]</sup> και από τον Jeggins <sup>[49]</sup> και τέλος από την παρουσίαση του τριπλού τετραπόλου από τους Yost και Enke <sup>[50]</sup>.

Η τεχνική αυτή παρουσιάζει το μεγάλο πλεονέκτημα της υψηλής εκλεκτικότητας, το οποίο σημαίνει ότι μια ένωση μπορεί να θραυσματοποιηθεί και τα παραγόμενα θραύσματα να απομονωθούν και να αναλυθούν περεταίρω. Έτσι, παράσχονται δομικές

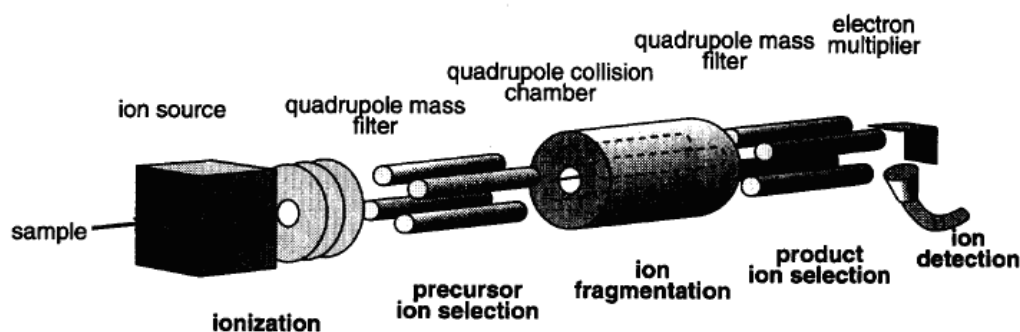
πληροφορίες για μια ένωση μέσα από ένα μίγμα ενώσεων. Αυτή η εξειδίκευση είναι χρήσιμη στην διάκριση ισομερών, στην ταυτοποίηση της ακολουθίας βιοπολυμερών και πιο συγκεκριμένα στην ανάλυση πολύπλοκων δειγμάτων. Το Σχήμα 3.32 δείχνει την εφαρμογή μιας ακολουθίας φασματοσκοπίας μαζών ( $MS^6$ ) για ένα σύμπλεγμα του ολεανολικού οξέος. Λαμβάνει χώρα σταδιακή απώλεια μορίων γλυκόζης και επιτυγχάνεται τελικά προσδιορισμός της χημικής δομής της αναλυόμενης ένωσης.



**Σχήμα 3.32.** Εφαρμογή μιας ακολουθίας φασματοσκοπίας μαζών ( $MS^6$ ) για ένα σύμπλεγμα του ολεανολικού οξέος χρησιμοποιώντας παγίδα ιόντων Finnigan LCQ. Λαμβάνει χώρα σταδιακή απώλεια μορίων γλυκόζης και επιτυγχάνεται τελικά προσδιορισμός της χημικής δομής της αναλυόμενης ένωσης<sup>[51]</sup>.

Υπάρχουν δυο βασικές κατηγορίες διατάξεων διαδοχικής φασματοσκοπίας μαζών<sup>[52]</sup>:

Η διαδοχική στον χώρο φασματοσκοπία μαζών (*MS/MS in space*), όπου συγκεκριμένο μητρικό ή πρόδρομο ιόν (*parent or precursor ion*) επιλέγεται από τον πρώτο αναλυτή σε συγκεκριμένο λόγο  $m/z$  και οδηγείται στον δεύτερο αναλυτή που λειτουργεί ως κυψελίδα συγκρούσεων. Εκεί συγκρούεται με περίσσεια ενός αδρανούς αερίου (αργό, ξένο ή ήλιο) παράγοντας θυγατρικά ιόντα (*daughter or product ions*). Ο διαχωρισμός και η μέτρηση των θυγατρικών ιόντων γίνεται στον τρίτο αναλυτή (Σχήμα 3.33). Διατάξεις διαδοχικής φασματοσκοπίας μαζών στον χώρο είναι όργανα με τριπλούς τετραπολικούς ή μαγνητικούς αναλυτές ή συνδυασμός αυτών.



Σχήμα 3.33. Σχηματική αναπαράσταση ενός τριπλού τετραπόλου.

Ενώ η πρώτη κατηγορία χρησιμοποιεί φασματόμετρα μάζας διατεταγμένα διαδοχικά στον χώρο, η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει ένα φασματόμετρο μάζας με ικανότητα αποθήκευσης ιόντων για την τέλεση μιας διαδοχικών γεγονότων στον χρόνο (*MS/MS in time*). Πιο συγκεκριμένα, περιλαμβάνει αναλυτές με ικανότητα αποθήκευσης ιόντων, όπως τον κυκλοτρονιακό συντονισμό ιόντων (*ICR*) και την τετραπολική παγίδα ιόντων (*QITMS*). Στο πρώτο βήμα επιλέγεται το μητρικό ιόν, ενώ όλα τα υπόλοιπα ιόντα απομακρύνονται από τον αναλυτή. Εν συνεχεία, το επιλεγμένο ιόν επιταχύνεται και συγκρούεται με μόρια αδρανούς αερίου (αργό, ξένο ή ήλιο) και διασπάται σε θυγατρικά ιόντα, τα οποία σε ένα τρίτο στάδιο σαρώνονται και καταγράφεται το φάσμα μαζών.

Οι κυριότερες επιλογές σάρωσης στην διαδοχική φασματοσκοπία μαζών είναι<sup>[53]</sup>:

- i) Σάρωση θυγατρικών ιόντων (*product ion scanning*)
- ii) Σάρωση επιλεγμένου μητρικού ιόντος (*parent or precursor ion scanning*)
- iii) Σάρωση ουδέτερου θραύσματος (*neutral loss scanning*)
- iv) Παρακολούθηση επιλεγμένης αντίδρασης (*selected or single / multiple reaction monitoring, SRM/MRM*).

Η πιο συχνή διαδικασία στην διαδοχική φασματοσκοπία μαζών είναι η σάρωση του θυγατρικού ιόντος. Ιόντα ενός δεδομένου λόγου  $m/z$  επιλέγονται με τον πρώτο φασματογράφο μάζας και περνούν μέσα στην κυψελίδα συγκρούσεων, στην οποία συγκρούονται με ρεύμα αδρανούς αερίου (He, Ar ή Xe). Τα ιόντα ενεργοποιούνται μέσω συγκρούσεων και παράγουν τα θυγατρικά τους ιόντα. Αυτά, στην συνέχεια, αναλύονται από το δεύτερο φασματογράφο μάζας, ο οποίος είναι ρυθμισμένος να σαρώνει ένα συγκεκριμένο εύρος μάζας. Έτσι, λαμβάνεται ένα φάσμα θυγατρικών ιόντων. Το φάσμα αυτό επιτρέπει την καταγραφή θραυσμάτων προερχόμενων από το μοριακό ιόν μιας συγκεκριμένης ένωσης που βρίσκεται μέσα σε ένα μίγμα ενώσεων. Παρέχει με τον τρόπο αυτό πληροφορίες για την δομή της μητρικής ένωσης. Το μειονέκτημα είναι ότι έχουμε αργή σάρωση και μη-ικανοποιητικά αποτελέσματα ποσοτικοποίησης.

Στη μέθοδο σάρωσης επιλεγμένου μητρικού ιόντος το δεύτερο φασματόμετρο μάζας ρυθμίζεται κατά τέτοιο τρόπο, ώστε να επιτρέπει την διέλευση μόνο ιόντων με συγκεκριμένο λόγο  $m/z$ . Ο πρώτος αναλυτής σαρώνει ένα επιλεγμένο εύρος μάζας του μητρικού ιόντος. Ιόντα που περνούν από τον πρώτο αναλυτή θα ανιχνευθούν από τον δεύτερο αναλυτή, αν και μόνο αν, μετά την θραυσματοποίηση στην κυψελίδα συγκρούσεων, παράξουν το προεπιλεγμένο θυγατρικό ιόν. Αυτό το προεπιλεγμένο ιόν είναι το μοναδικό που μπορεί να μεταφέρει στον ανιχνευτή ο δεύτερος αναλυτής. Για παράδειγμα, αν ο δεύτερος αναλυτής είναι ρυθμισμένος στον λόγο  $m/z=77$  ( $[C_6H_5]^+$ ), η σάρωση επιλεγμένου μητρικού ιόντος θα καταγράψει τις ενώσεις που περιέχουν φαινύλιο. Διαφορετικοί σχηματισμοί θραυσμάτων με λόγο  $m/z=77$  από άλλους τύπους θραυσματοποίησης μπορούν φυσικά να επηρεάσουν τον προσδιορισμό. Σημειώνεται ότι η μέθοδος σάρωσης αυτή είναι εκλεκτική για ιόντα που δίνουν ένα συγκεκριμένο

θυγατρικό ιόν (π.χ.  $\text{PO}_3^-$  από τα φωσφοπεπτίδια) και καταγράφει το φάσμα όλων των ιόντων που ικανοποιούν αυτό το κριτήριο.

Στην σάρωση ουδέτερου θραύσματος, ο πρώτος αναλυτής σαρώνει το φάσμα μαζών των μητρικών ιόντων και ο δεύτερος των θυγατρικών ιόντων. Ο δεύτερος αναλυτής έχει ρυθμιστεί να σαρώνει ένα συγκεκριμένο λόγο  $m/z$ , που αντιστοιχεί σε ένα ουδέτερο θραύσμα. Με τον τρόπο αυτόν, ταυτοποιούνται όλα τα ιόντα που χάνουν το ίδιο ουδέτερο θραύσμα (π.χ.  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{C}_2\text{O}$ ).

Στην παρακολούθηση επιλεγμένης αντίδρασης ο πρώτος αναλυτής επιλέγει ένα συγκεκριμένο ιόν με λόγο  $m/z$ , το οποίο θραυσατοποιείται στην συνέχεια στην κυψελίδα σύγκρουσης. Ο δεύτερος αναλυτής επιλέγει ένα συγκεκριμένο ιόν-θραύσμα.

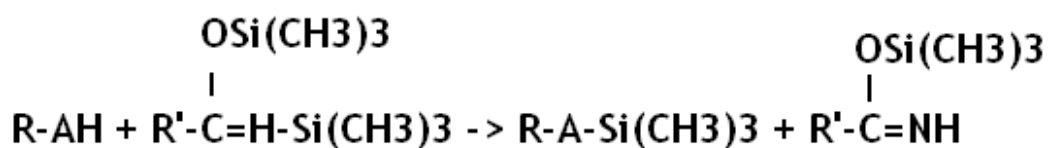
### 3.5. Παραγωγοποίηση δειγμάτων προς ανάλυση με αέρια χρωματογραφία

Παραγωγοποίηση είναι η διαδικασία χημικής μετατροπής μιας ουσίας σε μια άλλη, η οποία έχει πλέον τις κατάλληλες ιδιότητες για να αναλυθεί στον αέριο χρωματογράφο. Η κύρια χρησιμότητα της διαδικασίας αυτής είναι η αύξηση της πτητικότητας οργανικών ουσιών. Η χαμηλή πτητικότητα μπορεί να προκύπτει από το μέγεθος του μορίου και τις επακόλουθες ισχυρές δυνάμεις διασποράς που συγκρατούν το μόριο ενωμένο. Μικρότερα σε μέγεθος μόρια ίσως έχουν χαμηλότερη πτητικότητα λόγω των ελκτικών διαμοριακών δυνάμεων μεταξύ πολικών ομάδων. Η παραγωγοποίηση αυξάνει επίσης την σταθερότητα και αυτό είναι σημαντικό για ορισμένες ενώσεις, οι οποίες υφίστανται θερμική διάσπαση στον από τις συνθήκες που επικρατούν στον αέριο χρωματογράφο.

Οι κύριες μέθοδοι παραγωγοποίησης είναι η σιλυλίωση, η ακυλίωση και η αλκυλίωση.

### 3.5.1. Σιλυλίωση

Η σιλυλίωση παράγει θειικά παράγωγα που είναι πιο πτητικά, λιγότερο σταθερά και περισσότερο θερμικά σταθερά. Αντικαθίστανται τα ενεργά υδρογόνα με μια ομάδα τριμεθυλοσιλανίου (TMS). Ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος διαλύτης είναι η πυριδίνη αλλά σε πολλές περιπτώσεις η ανάγκη χρησιμοποίησης διαλύτη ελαχιστοποιείται με τα αντιδραστήρια σιλυλίωση (όταν ένα δείγμα διαλύεται εύκολα στα αντιδραστήρια σιλυλίωση, τότε αυτό είναι δείγμα ότι η παραγωγοποίηση ολοκληρώθηκε). Η σιλυλίωση συμβαίνει με μια πυρηνόφιλη αντίδραση τύπου  $S_N2$ , όπως φαίνεται και στον γενικό μηχανισμό αντίδρασης παρακάτω:



Στα πλεονεκτήματα της τεχνικής αυτής καταγράφεται το ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μια ευρεία ομάδα ενώσεων και ότι είναι διαθέσιμος ένας μεγάλος αριθμός αντιδραστηρίων. Μείονεκτήματα είναι η ευαισθησία που δείχνουν τα αντιδραστήρια της μεθόδου αυτής απέναντι στην υγρασία, καθώς και η χρήση απρωτικών (χωρίς διαθέσιμα υδρογόνα) οργανικών διαλυτών.

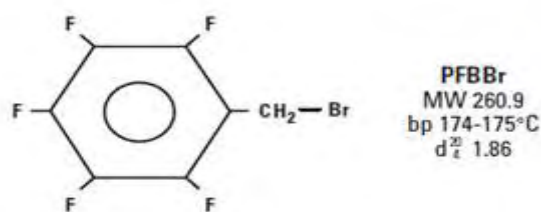
### 3.5.2.Ακυλίωση

Με την μέθοδο της ακυλίωσης ελαττώνεται η πολικότητα των αμινο-, υδροξυλ- και θειολικών ομάδων. Σε σύγκριση με την προηγούμενη μέθοδο, τα αντιδραστήρια ακυλίωσης στοχεύουν σε υψηλής πολικότητας, πολύπλοκες ενώσεις, όπως οι υδρογονάνθρακες και τα αμινοξέα.

Πλεονεκτήματα της τεχνικής αυτής είναι: Η αύξηση της ανιχνευσιμότητας με την προσθήκη αλογονοανθράκων, η υδρολυτική σταθερότητα που παρουσιάζουν τα παράγωγα, η αύξηση της ευαισθησίας με την αύξηση του μοριακού βάρους και τέλος η ακυλίωση μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένα πρώιμο στάδιο ενεργοποίησης καρβοξυλικών οξέων πριν την εστεροποίηση (αλκυλίωση). Τα μειονεκτήματα είναι: Η δύσκολη προετοιμασία των παραγώγων ακυλίωσης, ορισμένα προϊόντα της αντίδρασης είναι αναγκαίο να απομακρυνθούν πριν την ανάλυση, τα αντιδραστήρια ακυλίωσης είναι ευαίσθητα στην υγρασία και επίσης είναι επικύνδυνα και αναδύουν έντονη μυρωδιά.

### 3.5.3.Αλκυλίωση

Στο παρόν πείραμα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αλκυλίωσης με παραγωγοποιητή το πεντα φθορο βενζυλοβρωμίδιο (PF<sub>5</sub>Br). Με την αλκυλίωση ελαττώνεται η πολικότητα του μορίου με την αντικατάσταση ενός ενεργού υδρογόνου από μια αλκυλομάδα μέσω μιας αντίδρασης πυρηνόφιλης υποκατάστασης. Εφαρμόζεται σε ενώσεις που περιέχουν όξινα υδρογόνα, όπως καρβοξυλικά οξέα και φαινόλες και μετατρέπονται σε αιθέρες, εστέρες, αλκυλαμίνες ή αλκυλαμίδια. Άλλοι παραγωγοποιητές που χρησιμοποιούνται στην μέθοδο της αλκυλίωσης είναι οι διαλκυλακετάλες (DMF), το υδροξείδιο του τετραβουτυλο αμμωνίου (TBH) και το τριφθοριούχο βόριο (BF<sub>3</sub>) σε μεθανόλη ή βουτανόλη.

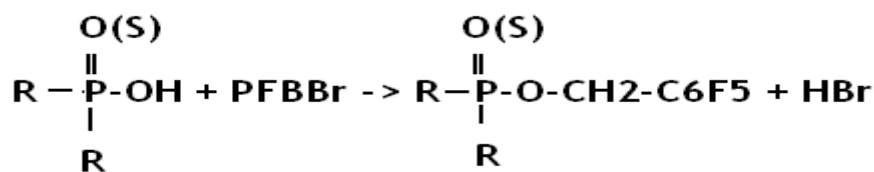


**Σχήμα 3.34.** Χημική δομή και ιδιότητες του πενταφθορο βενζυλοβρωμιδίου (PFBBr).

Τα πλεονεκτήματα της παραγωγοποίησης με την μέθοδο της αλκυλίωσης είναι:

- i) Υπάρχουν διαθέσιμα πολλά αντιδραστήρια αλκυλίωσης
- ii) Οι συνθήκες αντίδρασης μπορούν να ποικίλουν από ισχυρά όξινα ως μέχρι ισχυρά βασικά
- iii) Κάποιες αντιδράσεις μπορούν να λάβουν χώρα και σε υδατικά διαλύματα
- iv) Τα παράγωγα είναι γενικά σταθερά

Η αντίδραση παραγωγοποίησης των διαλκυλ φωσφορικών μεταβολιτών είναι η εξής:



, όπου R=CH<sub>2</sub>- ή CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-.



## ***ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ***

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4<sup>ο</sup>:**

### **ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ**

### **ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ**

### **ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ**

### **ΟΡΓΑΝΟΦΩΣΦΟΡΙΚΩΝ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ**

#### 4.1. Προκατεργασία δειγμάτων

##### **4.1.1. Απομόνωση διαλυτών φωσφορικών μεταβολιτών από πρότυπα υδατικά διαλύματα**

Σε δοκιμαστικό σωλήνα αναμιγνύουμε μικρή ποσότητα νερού μαζί με διάλυμα εσωτερικού προτύπου (I.S. solution), NaCl, HCl, NaHSO<sub>3</sub> και διάλυμα διαιθυλεθέρα-ακετονιτριλίου 1:1 v/v.

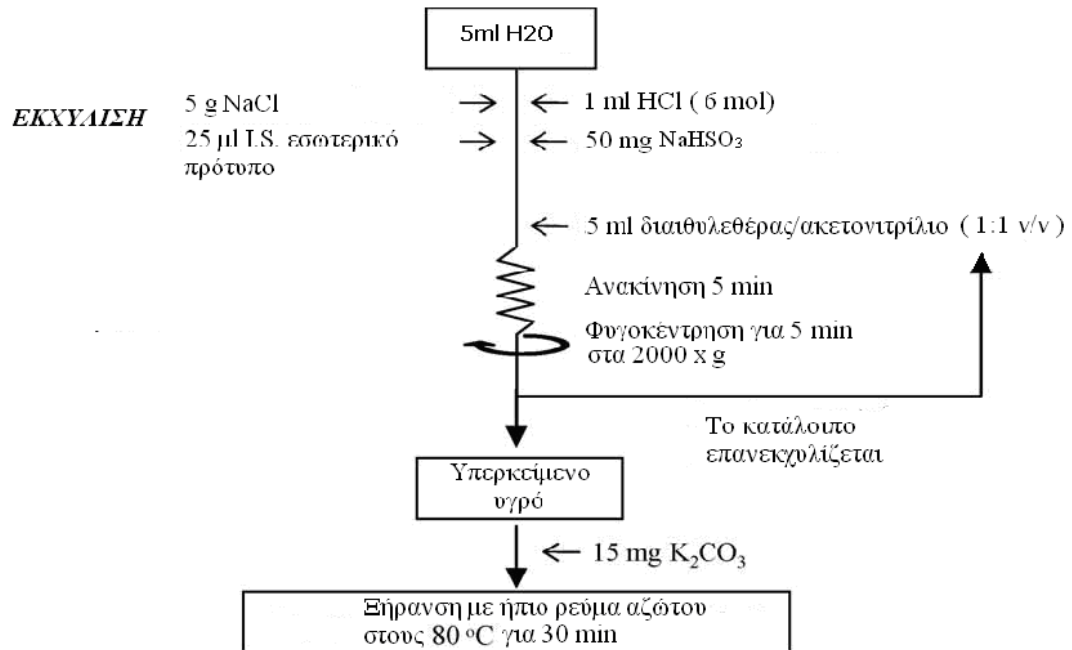
Το HCl προστίθεται για να ελαττωθεί η τιμή του pH του διαλύματος και αυτό γιατί σε ουδέτερο pH οι μεταβολίτες βρίσκονται σε ιονισμένη και όχι σε ουδέτερη μορφή. Επίσης, προστίθεται για να υδρολύσει υπολείμματα οργανοφωσφορικών φυτοφαρμάκων που έχουν παραμείνει στο δείγμα.

Το NaCl βοηθάει σημαντικά στην παραλαβή των οργανικών ουσιών από την υδατική φάση μέσω της διαδικασίας της εξαλάτωσης, δηλαδή της δραματικής μείωσης της διαλυτότητας της οργανικής ουσίας στην υδατική φάση και την διευκόλυνση παραλαβής της από τον οργανικό διαλύτη.

Το NaHSO<sub>3</sub> συνεισφέρει στην αποφυγή οξειδώσεων. Αυτό είναι σημαντικό, γιατί τα θειικά παράγωγα των μεταβολιτών οξειδώνονται εύκολα και είναι δύσκολη στην συνέχεια η ταυτοποίηση τους.

Έπειτα από έντονη μηχανική ανάδευση το δείγμα φυγοκεντρείται για 5 min στους 4°C. Η οργανική φάση (υπερκείμενη στοιβάδα) που περιέχει τους οργανοφωσφορικούς μεταβολίτες (DAPs) μεταφέρεται σε νέο δοκιμαστικό σωλήνα και αναμιγνύεται με K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (προστίθεται προς ανιστάθμιση του όξινου περιβάλλοντος που δημιουργήθηκε από το HCl). Η υδατική φάση επανεκχυλίζεται με διάλυμα διαιθυλεθέρα-ακετονιτριλίου 1:1 v/v και φυγοκεντρείται. Στην συνέχεια, η νέα υπερκείμενη στοιβάδα αναμιγνύεται με

την πρώτη. Οι εκχυλιζόμενες στοιβάδες υπόκεινται ξήρανση με την διέλευση ήπιου ρεύματος αζώτου στους 45°C. Το στερεό υπόλειμμα προωθείται προς παραγωγοποίηση.



**Σχήμα 4.1.** Διάγραμμα ροής για την απομόνωση των διαλυτών φωσφορικών μεταβολιτών.

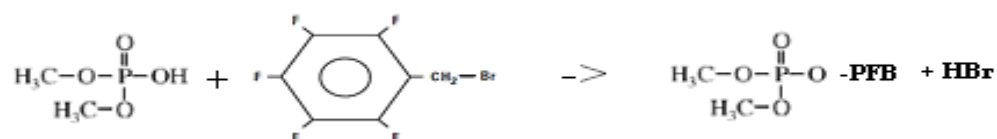
#### 4.1.2. Παραγωγοποίηση των διαλυτών φωσφορικών μεταβολιτών προς πτητικά παράγωγα

Στην συνέχεια προστίθεται στο στερεό υπόλειμμα που παρήχθη από την απομόνωση των μεταβολιτών K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, ακετονιτρίλιο και πενταφθορο βενζυλο βρωμίδιο (PFBBBr) ως παραγωγοποιητής και στην συνέχεια ο δοκιμαστικός σωλήνας τοποθετείται σε υδρόλουτρο στους 80°C για 30 min με περιοδική ανάδευση. Η προσθήκη του K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> είναι αναγκαία για την δημιουργία βασικού περιβάλλοντος, έτσι ώστε να επιτευχθεί η βέλτιστη δραστηριότητα του αντιδραστηρίου παραγωγοποίησης.

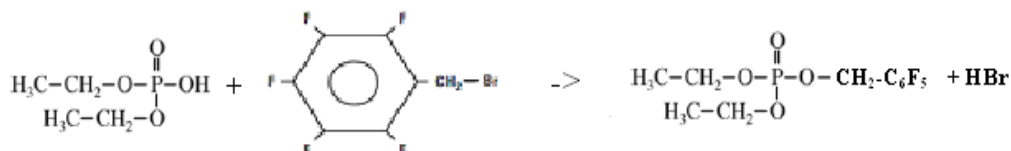
Στο παρόν πείραμα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αλκυλίωσης με παραγωγοποιητή το PFBBr, με την οποία ελαττώνεται η πολικότητα του μορίου με την αντικατάσταση ενός ενεργού υδρογόνου από μια αλκυλομάδα μέσω μιας αντίδρασης πυρηνόφιλης υποκατάστασης.

Οι αντιδράσεις για την παρασκευή των παραγωγοποιημένων διαλκυλ φωσφορικών μεταβολιτών φαίνονται παρακάτω:

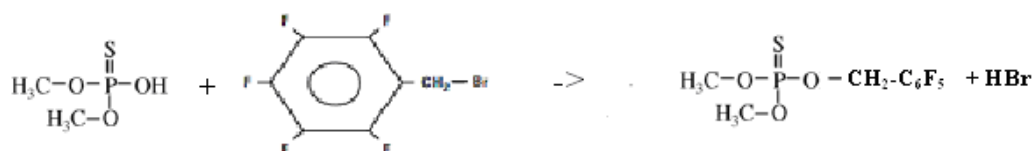
#### DMP



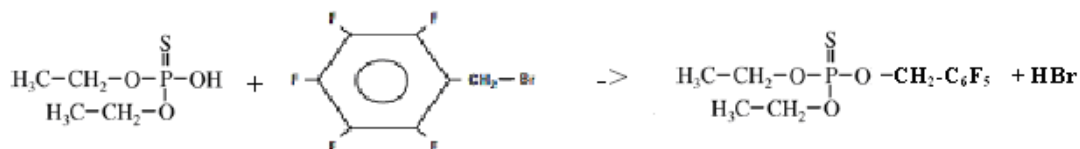
#### DEP



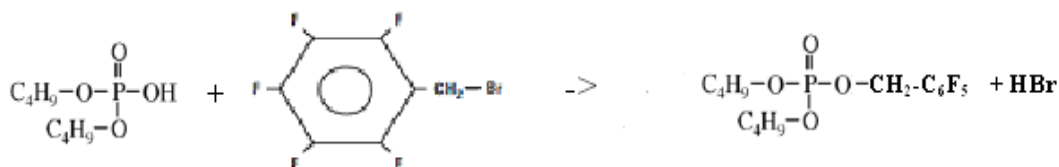
#### DMTP



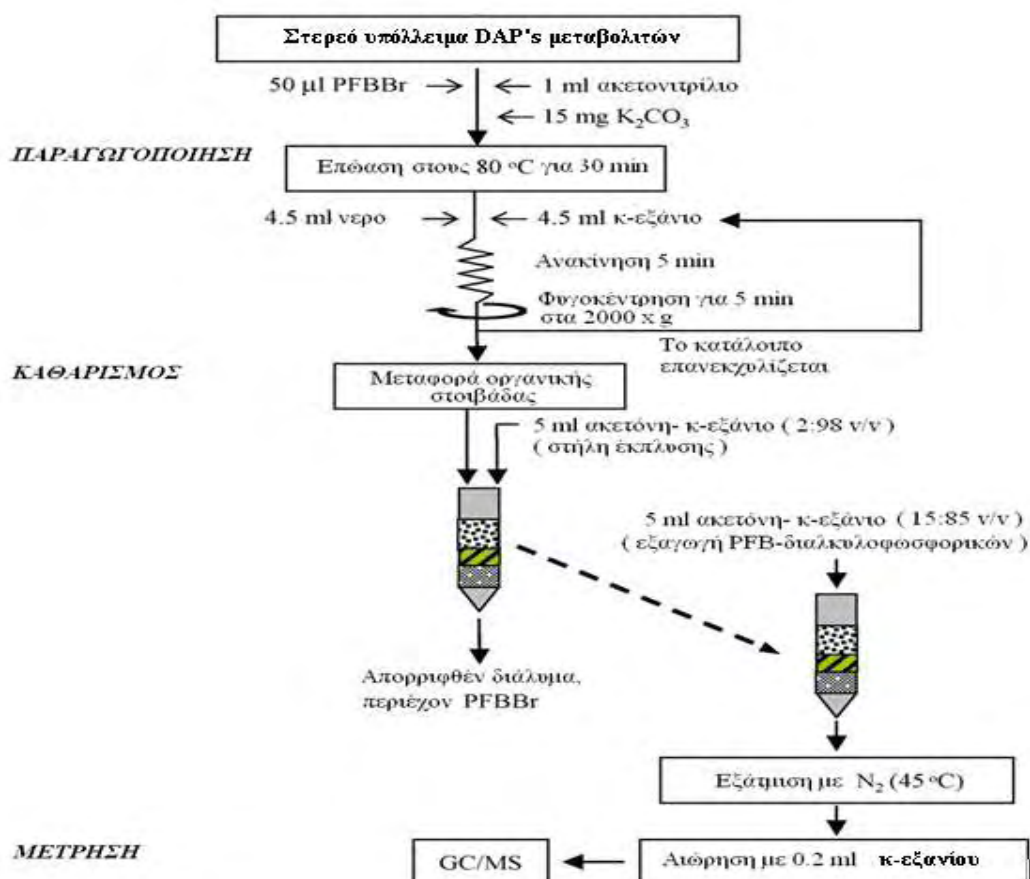
#### DETP



#### DBP



Αφού προστίθεται νερό και n-εξάνιο, το δείγμα υπόκειται έντονη ανάδευση και φυγοκέντριση. Η υπερκείμενη στοιβάδα που περιέχει τους PFB-DAPs μεταφέρεται σε νέο δοκιμαστικό σωλήνα. Ακολουθεί νέα εκχύλιση με n-εξάνιο και οι οργανικές φάσεις αναμιγνύονται εκ νέου. Το δείγμα τοποθετείται σε στήλη τριών στοιβάδων ( Florisil, Bondesil και άνυδρο  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  ) και ακολουθεί πλύσιμο με διάλυμα ακετόνης- n-εξανίου 2:98 v/v προς απομάκρυνση του PFBBr που δεν αντέδρασε, για τον λόγο ότι η περίσσεια του PFBBr σε εγχυόμενα δείγματα θα έβλαπτε το σύστημα GC/MS, συμπεριλαμβανομένης της στήλης (αντιδράει με τα υλικά της στήλης GC και προκαλεί διεύρυνση των κορυφών του χρωματογραφήματος, με αποτέλεσμα να ελαττώνεται η ευαισθησία) και του ανιχνευτή <sup>[54]</sup>. Οι PFB-DAPs εξάγονται με διάλυμα ακετόνης- n-εξανίου 15:85 v/v και ξηραίνονται με την διέλευση ήπιου ρεύματος αζώτου στους 45°C. Το δείγμα διαλύεται σε κ-εξάνιο και εισάγεται στον αναλυτή GC/MS.



**Σχήμα 4.2.** Διάγραμμα ροής για την παραγωγή, τον καθαρισμό και την εισαγωγή του δείγματος των οργανοφωσφορικών μεταβολιτών στον αναλυτή GC/MS.

Στην τελευταία σειρά πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε επίσης μια παραλλαγή αυτού, όπου έχει προστεθεί ένα στάδιο επεξεργασίας πριν από την ξήρανση με ήπιο ρεύμα αζώτου, με πέρασμα του δείγματος από στήλη άνυδρου θειικού νατρίου και στην συνέχεια συλλογή του σε δοκιμαστικό σωλήνα με  $K_2CO_3$ .

#### 4.2. Ανάπτυξη μεθοδολογίας ενόργανης ανάλυσης των δειγμάτων με αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μαζών (GC/MS).

Η ανάπτυξη της μεθόδου ενόργανης ανάλυσης με αέρια χρωματογραφία – φασματομετρία μαζών αποτελείται από πειραματική επιλογή παραμέτρων εισαγωγής δείγματος, χρωματογραφικού διαχωρισμού και ανίχνευσης των εκλουόμενων ενώσεων με τον φασματογράφο μαζών. Οι βέλτιστοι αυτή παράμετροι εξασφαλίζουν μεγαλύτερη ειδικότητα, ευαισθησία, ακρίβεια, ορθότητα και πιστότητα της μεθόδου<sup>[55]</sup>.

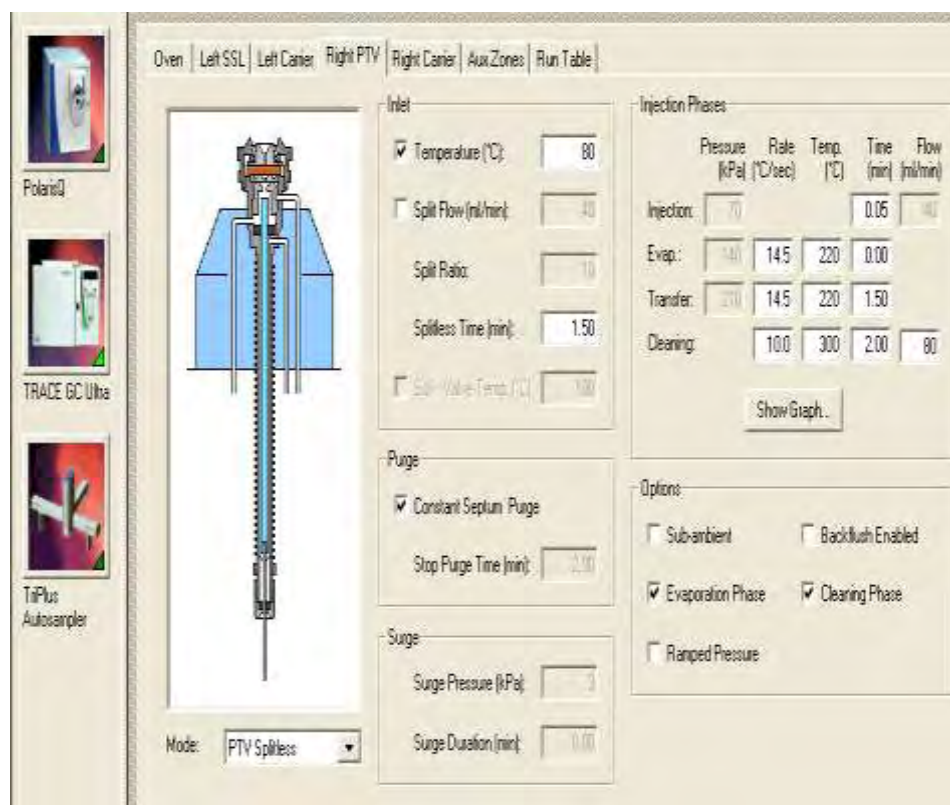
Τα δείγματα ακολούθησαν την πορεία προκατεργασίας που φαίνεται στο παραπάνω διαγράμμα ροής. Ως εσωτερικό πρότυπο χρησιμοποιήθηκε ο φωσφορικός διβουτυλεστέρας (*dibutyl phosphate, DBP*).

Οι επιλογές παραμέτρων (αυτόματος δειγματολήπτης, αέριος χρωματογράφος και φασματομέτρο μαζών) παρουσιάζονται αναλυτικά παρακάτω.

##### **4.2.1.Επιλογή παραμέτρων εισαγωγής δείγματος**

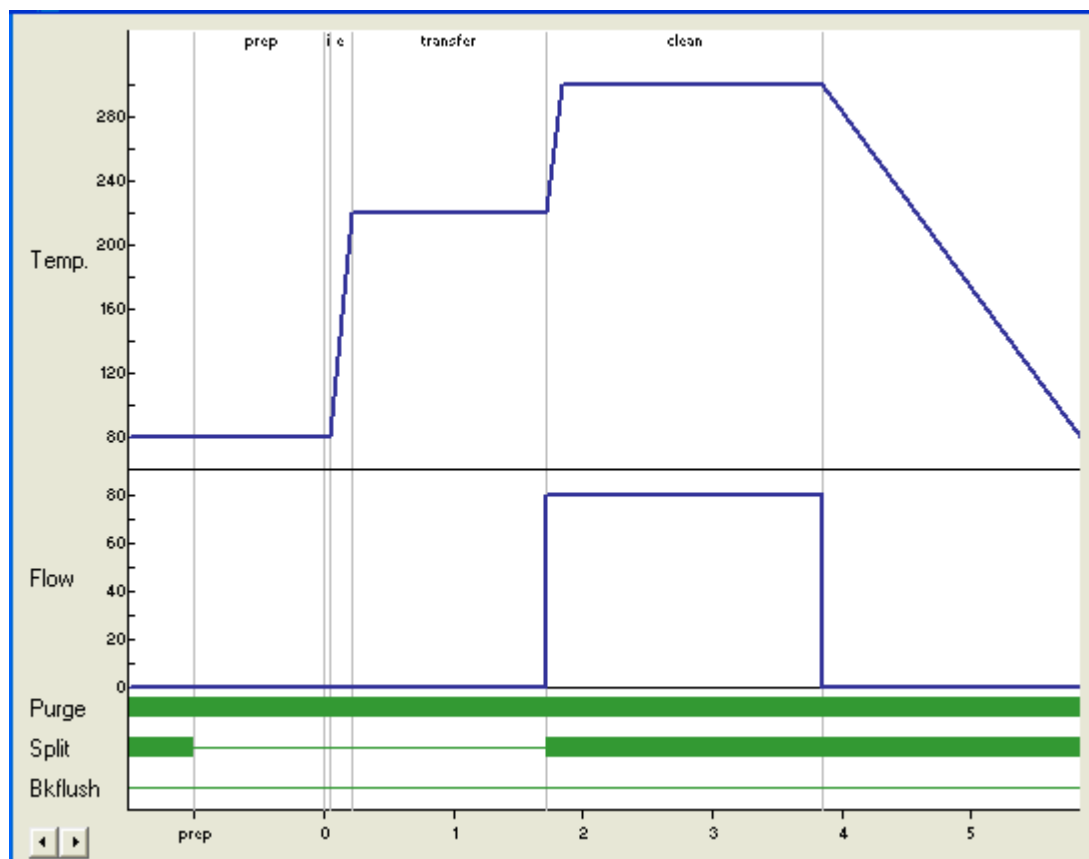
Στην παρούσα εργασία επιλέχθηκε ο εισαγωγέας δείγματος προγραμματιζόμενης θερμοκρασίας εξαέρωσης (*Programmable Temperature Vaporizing Injector, PTV*), που όπως αναφέρθηκε και στο θεωρητικό μέρος, είναι ο πιο ευέλικτος για την αέρια χρωματογραφία. Επιτρέπει την εισαγωγή μεγάλων όγκων δείγματος με ταυτόχρονη απομάκρυνση του διαλύτη, ήπια διαδικασία εξαέρωσης με εκλεκτικό προδιαχωρισμό της προς προσδιορισμό ουσίας από τα υπόλοιπα συστατικά του δείγματος<sup>[56]</sup>. Αυτές οι δυνατότητες εξασφαλίζουν την μείωση των ορίων ανίχνευσης με την εισαγωγή στην

στήλη αυξημένων ποσοτήτων αναλύτη, προλαμβάνουν την θερμική διάσπαση των προς ανάλυση ουσιών και μειώνουν τον θόρυβο υποβάθρου, καθώς και την φθορά της στήλης με την εκλεκτική μεταφορά των ουσιών στην στήλη.



Επιλογή παραμέτρων εισαγωγής δείγματος (εγχυτής δείγματος).

Η θερμοκρασία εισαγωγής (*inlet temperature*) ορίστηκε στους 80°C προκειμένου να επιτευχθεί απομάκρυνση του διαλύτη (διαιθυλαιθέρας/ακετονιτρίλιο 1:1 v/v) και προσυγκέντρωση των προσδιοριζόμενων ουσιών. Ο χρόνος που ο εγχυτής επιτρέπει την εισαγωγή δείγματος στον αέριο χρωματογράφο (*splitless time*) ρυθμίστηκε στο 1.50min. Επίσης, επιλέχθηκε να υπάρχει συνεχόμενο ρεύμα αερίου προς καθαρισμό του σημείου στο οποίο η βελόνα του εγχυτή εισέρχεται στον αέριο χρωματογράφο (*constant septum purge*). Οι ρυθμίσεις των φάσεων έγχυσης (*injection phases*) φαίνονται στο παρακάτω γράφημα.



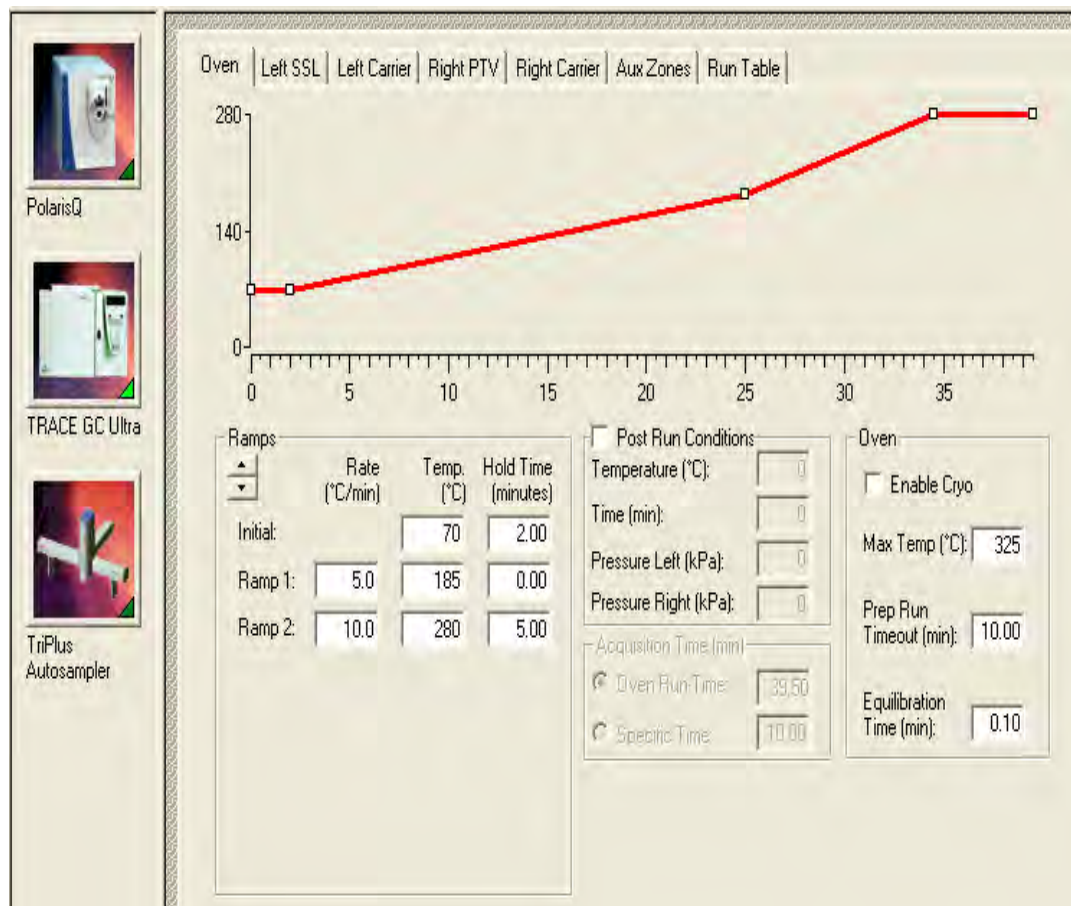
Φάσεις έγχυσης (*injection phases*).

Αναλυτικότερα, ο χρόνος έγχυσης (*injection time*) ήταν 0.05min. Στην συνέχεια, έγινε αύξηση της θερμοκρασίας με ρυθμό 14.5°C.min μέχρι τους 220°C προς εξάτμιση (*evaporation*) του διαλύτη και ακολούθησε μεταφορά (*transfer*) του δείγματος στον αέριο χρωματογράφο για 1.5min. Ακολούθως έγινε νέα αύξηση της θερμοκρασίας με ρυθμό 10.00°C/min μέχρι τους 300°C και έγινε καθαρισμός (*cleaning*) για 2.00min προς απομάκρυνση οποιωνδήποτε ανεπιθύμητων ουσιών είχαν παραμείνει και μετά την φάση της εξάτμισης. Η ροή του φέροντος αερίου (ήλιον) (*flow*) ήταν 80ml/min και παρέμεινε ανοιχτή μόνο κατά την φάση του καθαρισμού.

Για την εισαγωγή των δειγμάτων επιλέχθηκε εισαγωγέας δείγματος με προγραμματιζόμενη θερμοκρασία εξαέρωσης του δείγματος (*Programmable Temperature Vaporizing Injector, PTV*). Τα πλεονεκτήματα αυτού του εισαγωγέα περιλαμβάνουν και την δυνατότητα έγχυσης μεγάλων όγκων δειγμάτων (έως 100μL) με αποτέλεσμα την αύξηση της ευαισθησίας της μεθόδου.



#### 4.2.2. Επιλογή παραμέτρων χρωματογραφικού διαχωρισμού

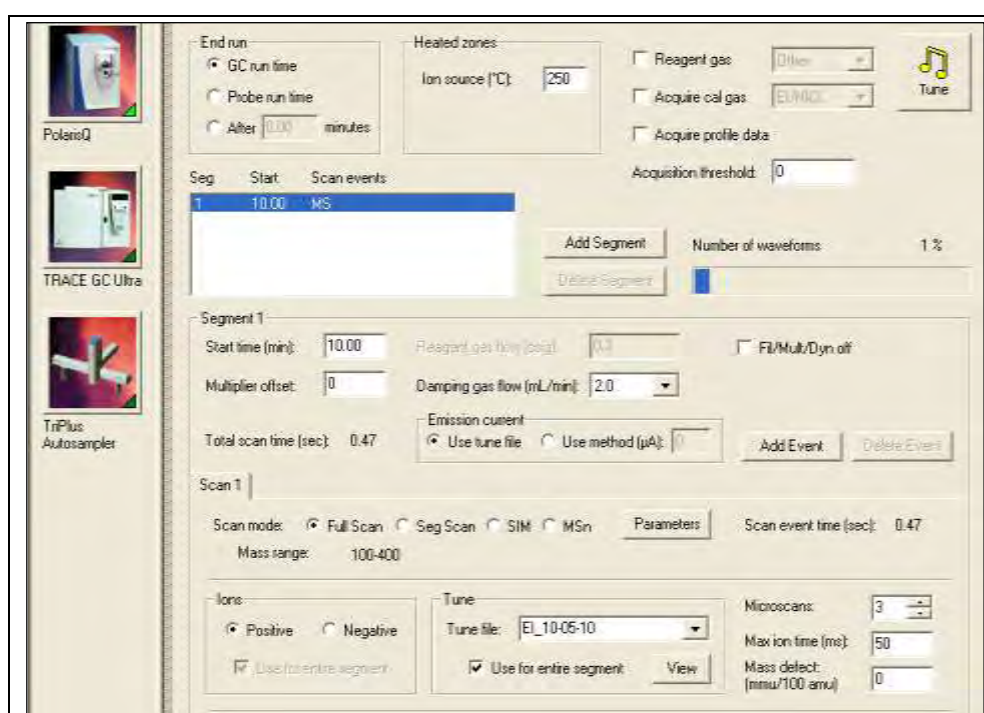


Επιλογή παραμέτρων αέριου χρωματογράφου (φούρνος).

Όσον αφορά τις συνθήκες λειτουργίας του αέριου χρωματογράφου και πιο συγκεκριμένα του φούρνου (*oven*), ως αρχική θερμοκρασία (*initial temperature*) ορίστηκαν οι 70°C και ο χρόνος παραμονής στην συγκεκριμένη θερμοκρασία (*hold time*) ήταν 2.00min. Στην συνέχεια έγινε αύξηση της θερμοκρασία (*ramp.1*) με ρυθμό (*rate*) 5°C/min μέχρι τους 185°C και άμεσα (*hold time 0min*) έγινε νέα αύξηση (*ramp.2*) με ρυθμό (*rate*) 10°C/min μέχρι τους 280°C και παραμονή στην θερμοκρασία αυτή (*hold time*) για 5.00min. Οι αλλαγές στην θερμοκρασία του φούρνου αντιστοιχούν στις κλίσεις του παραπάνω διαγράμματος (*ramp 1.* και *ramp.2*).

### 4.2.3. Επιλογή συνθηκών ανίχνευσης των χημικών ενώσεων με φασματογράφο μαζών

Οι παράμετροι διαχωρισμού που επιτεύχθηκαν μας επέτρεψαν να αυξήσουμε του ρυθμό αύξησης της θερμοκρασίας του φούρνου από 5°C σε 14°C και να μειώσουμε σημαντικά το χρόνο ανάλυσης (από 40min σε 20min ) δίχως να χειροτερεύσει ο χρωματογραφικός διαχωρισμός.



*Επιλογή παραμέτρων φασματογράφου μαζών.*

Η θερμοκρασία της πηγής ιόντων (*ion source*) ρυθμίστηκε στους 250°C. Ο χρόνος έναρξης (*start time*), δηλαδή το χρονικό σημείο έναρξης καταγραφής του φάσματος από την στιγμή που το δείγμα εισέρχεται στον αναλυτή, ορίστηκε στα 10.00min, διότι γνωρίζουμε ότι μέχρι εκείνο το χρονικό σημείο δεν εκλύεται καμία από τις προς ανίχνευση ουσίες. Ο χρόνος διακοπής (*end time*), δηλαδή το χρονικό σημείο στο οποίο διακόπτεται η παροχή ιόντων στον αναλυτή μάζας προς ανάλυση, ορίστηκε ταυτόχρονα με την ολοκλήρωση παραγωγής ιόντων από τον αέριο χρωματογράφο (*GC run time*). Ως μέθοδο σάρωσης (*scan mode*) επιλέχθηκε η πλήρης σάρωση (*full scan*) με εύρος μάζας

(*mass range*) από 100 ως 400, δηλαδή καταγραφή του φάσματος όλων των ιόντων που διέρχονται από τον αναλυτή μάζας και έχουν  $MB=100-400$ . Επιλέχθηκε να γίνουν 3 μικρομετρήσεις (*microscans*), το οποίο σημαίνει ότι κάθε σημείο μιας κορυφής του φάσματος είναι ο μέσος όρος τριών διαδοχικών μετρήσεων. Ως μέγιστος χρόνος ιόντων (*max ion time*) ορίστηκαν τα 50msec, δηλαδή ως ο χρόνος που η παγίδα ιόντων παραμένει ανοιχτή για να συλλέξει τα ιόντα που προέρχονται από την πηγή ιόντων. Τέλος, τα επιθυμητά ιόντα (*ions*) ανίχνευσης ήταν τα θετικά (*positive*).

Για τα τρία πρώτα πειράματα ισχύουν οι παραπάνω συνθήκες λειτουργίας του οργάνου. Στο τελευταίο πείραμα άλλαξε ο ρυθμός αύξησης της θερμοκρασίας στον αέριο χρωματογράφο ( $14^{\circ}\text{C}/\text{min}$  από  $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) και η τελική θερμοκρασία ορίστηκε στους  $280^{\circ}\text{C}$  από τους  $185^{\circ}\text{C}$  που ίσχυε στα τρία πρώτα πειράματα. Τέλος, ο όγκος έγχυσης του δείγματος στον αυτόματο δειγματολήπτη μεταβλήθηκε στα 5μl από το 1μl.

#### 4.3. Εξαγωγή αποτελεσμάτων

#### **Ανάλυση δειγμάτων διαλυκλ φωσφορικών μεταβολιτών φυτοφαρμάκων συγκέντρωσης 1, 5 και 10ppm**

Στο πείραμα της αυτό χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα των διαλυκλφωσφορικών μεταβολιτών (DMP, DMTP, DEP και DETP) συγκεντρώσεων 1, 5 και 10ppm. Ως εσωτερικό πρότυπο χρησιμοποιήθηκε το DBP σε συγκεντρώσεις 1, 5 και 10ppm.

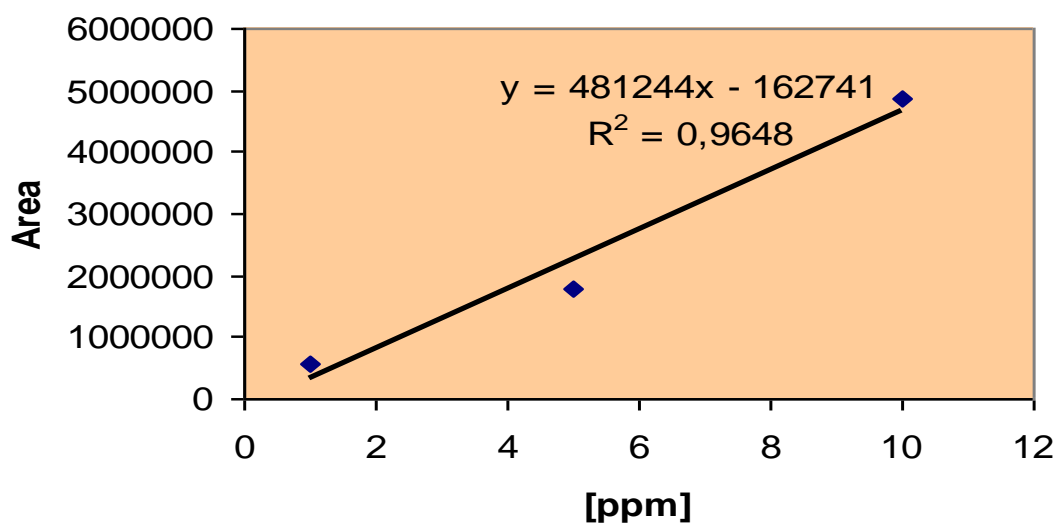
Ως βασικά ιόντα επιλέχθηκαν αυτά που αντιστοιχούν στο MB των προς ανάλυση μεταβολιτών, καθώς και του εσωτερικού προτύπου ( $m/z=306, 322, 334, 350$  και  $335$ ).

Από τα αποτελέσματα της ανάλυσης συλλέγουμε τις εξής πληροφορίες για του διαλυκλφωσφορικούς μεταβολίτες.

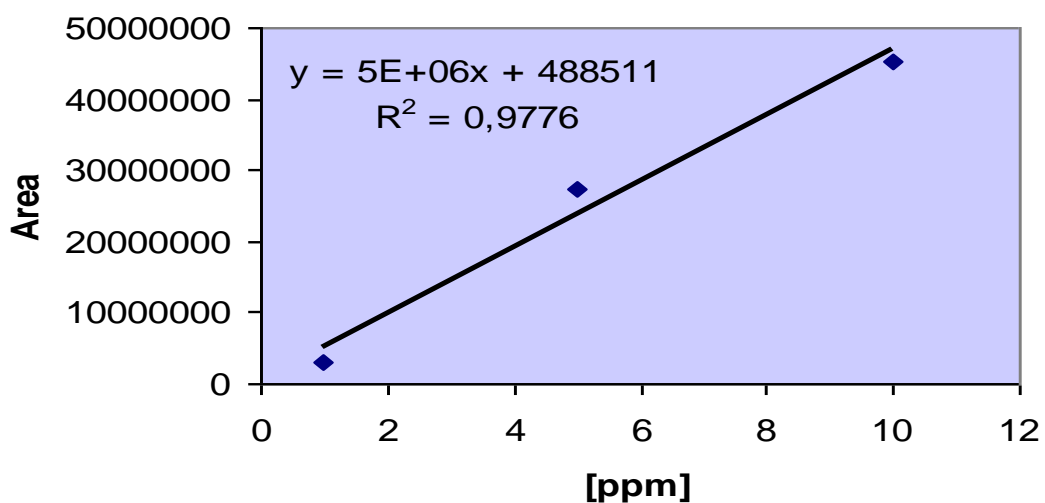
<b>DAP</b>	<b>Concentration (ppm)</b>	<b>Retention Time,RT (sec)</b>	<b>Selective Ion</b>	<b>Area</b>	<b>Signal/ Noise</b>	<b>Area/ I.S.</b>
<b>Sample No1</b>						
<b>DMP</b>	1	17.39	306	220797	844	0.01
<b>DMTP</b>	1	21.28	322	583714	2504	0.04
<b>DEP</b>	1	19.95	334	1257026	4970	0.08
<b>DETP</b>	1	23.49	350	3111465	12446	0.20
<b>Sample No2</b>						
<b>DMP</b>	5	17.36	306	46991	214	0.01
<b>DMTP</b>	5	21.26	322	1766099	8480	0.27
<b>DEP</b>	5	19.91	334	5631130	2771	0.86
<b>DETP</b>	5	23.50	350	27432561	145511	4.17
<b>Sample No3</b>						
<b>DMP</b>	10	17.40	306	948420	4471	0.03
<b>DMTP</b>	10	21.29	322	4861866	20892	0.17
<b>DEP</b>	10	19.97	334	6256914	30318	0.21
<b>DETP</b>	10	23.54	350	45428252	190988	1.54

Από τα δεδομένα του παραπάνω πίνακα σχηματίζουμε τις καμπύλες βαθμονόμησης της κάθε ουσίας, δηλαδή την γραφική παράσταση της σχέσης της συγκέντρωσης κάθε ουσίας με το εμβαδόν που περικλείει η κορυφή( Area,AA) που δίνει η συγκεκριμένη ουσία στο φάσμα GG.

### Καμπύλη βαθμονόμησης DMTP



### Καμπύλη βαθμονόμησης DETP



**Ανάλυση δειγμάτων διαλκυλ φωσφορικών μεταβολιτών φυτοφαρμάκων συγκέντρωσης 1, 10 και 15ppm**

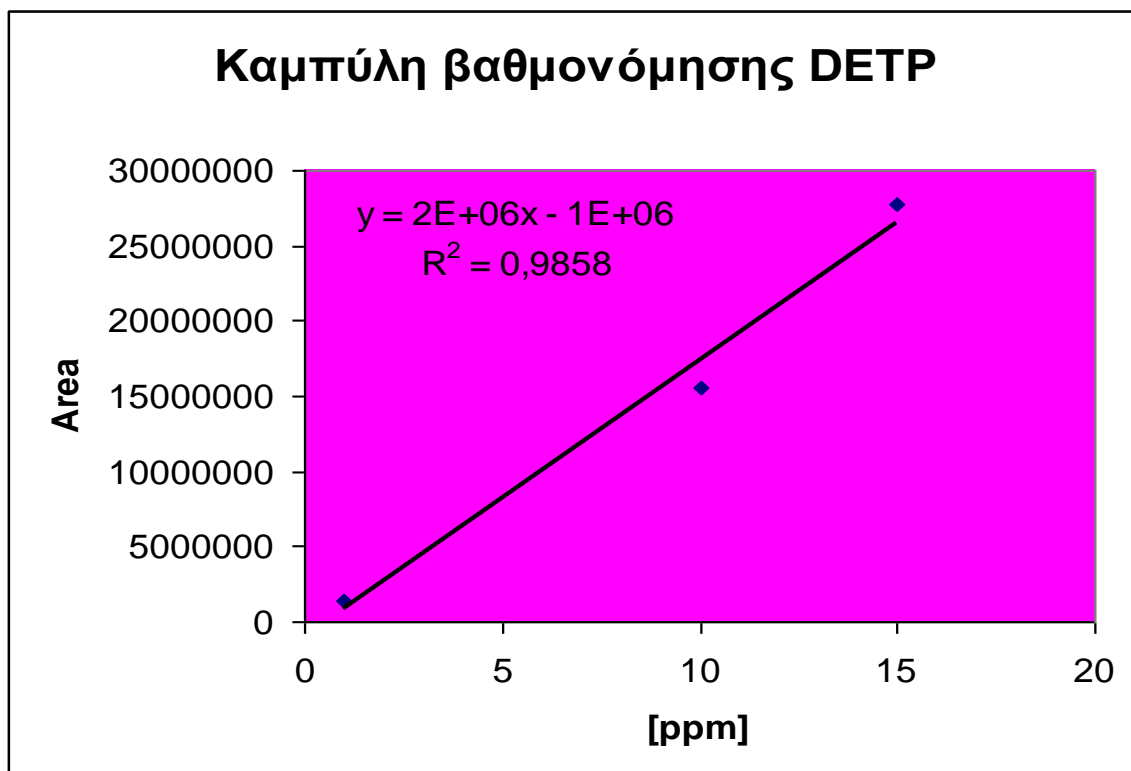
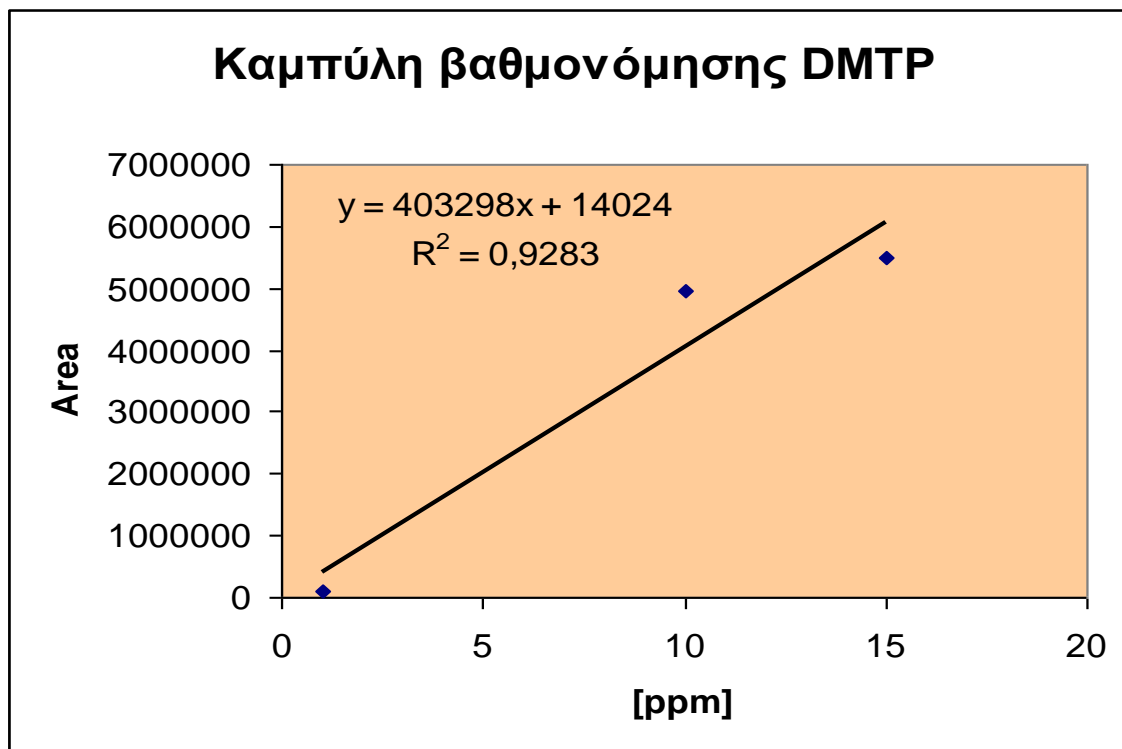
Στο πείραμα αυτό χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα των διαλκυλφωσφορικών μεταβολιτών (DMP, DMTP, DEP και DETP) συγκεντρώσεων 1, 10 και 15ppm. Ως εσωτερικό πρότυπο χρησιμοποιήθηκε το DBP σε συγκεντρώσεις 1, 10 και 15ppm.

Ως βασικά ιόντα επιλέχθηκαν αυτά που αντιστοιχούν στο MB των προς ανάλυση μεταβολιτών, καθώς και του εσωτερικού προτύπου ( $m/z=306, 322, 334, 350$  και 335).

Από τα αποτελέσματα της ανάλυσης συλλέγουμε τις εξής πληροφορίες για του διαλκυλφωσφορικούς μεταβολίτες.

<b>DAP</b>	<b>Concentration (ppm)</b>	<b>Retention Time, RT (sec)</b>	<b>Selective Ion</b>	<b>Area</b>	<b>Signal/ Noise</b>	<b>Area/ I.S.</b>
<b>Sample No1</b>						
<b>DMP</b>	1	17.40	306	36892	182	0.01
<b>DMTP</b>	1	21.29	322	93692	478	0.01
<b>DEP</b>	1	19.94	334	360752	2079	0.05
<b>DETP</b>	1	23.49	350	1450364	8420	0.2
<b>Sample No2</b>						
<b>DMP</b>	10	17.40	306	153038	661	0.01
<b>DMTP</b>	10	21.33	322	4953168	22607	0.35
<b>DEP</b>	10	19.97	334	1624369	7758	0.11
<b>DETP</b>	10	23.54	350	15577061	70188	1.10
<b>Sample No3</b>						
<b>DMP</b>	15	17.40	306	86880	358	0.03
<b>DMTP</b>	15	21.30	322	5480958	30219	2.15
<b>DEP</b>	15	19.94	334	1130562	6368	0.44
<b>DETP</b>	15	23.52	350	27696476	183694	10.87

Από τα δεδομένα του παραπάνω πίνακα σχηματίζουμε τις καμπύλες βαθμονόμησης της κάθε ουσίας, δηλαδή την γραφική παράσταση της σχέσης της συγκέντρωσης κάθε ουσίας με το εμβαδόν που περικλείει η κορυφή( Area,AA) που δίνει η συγκεκριμένη ουσία στο φάσμα GG.



**Ανάλυση δειγμάτων διαιθυλ θειοφωσφορικού μεταβολίτη (DETP) συγκέντρωσης 1, 10 και 15ppm**

Στο πείραμα αυτό αναλύθηκαν διαλύματα που περιείχαν μόνο DBP (I.S.) και DETP συγκέντρωσης 1,10 και 20ppm.

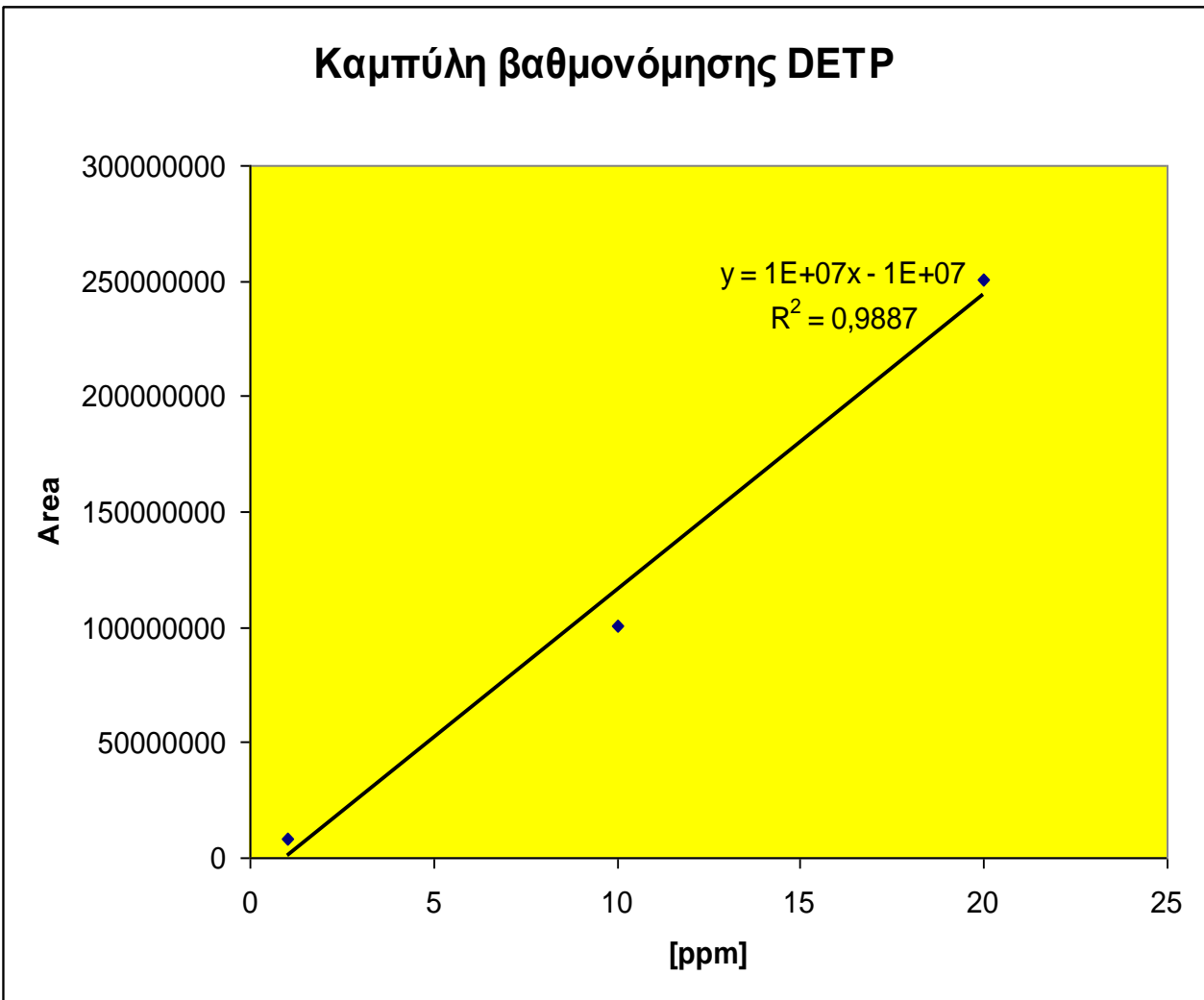
Η αναλυτική διαδικασία ακολούθησε το Διάγραμμα Ροής 1, όπως και τα πειράματα 1 και 2.

Ως βασικά ιόντα επιλέχθηκαν αυτά που αντιστοιχούν στο MB του προς ανάλυση μεταβολίτη, καθώς και του εσωτερικού προτύπου ( $m/z=350$  και 335 αντίστοιχα).

DAP	Concentration (ppm)	Retention Time,RT (sec)	Selective Ion	Area	Signal/ Noise	Area/ I.S.
<b>Sample No1</b>						
<b>DETP</b>	1	23.45	350	8485245	22310	8.21
<b>Sample No2</b>						
<b>DETP</b>	10	23.48	350	100691839	134825	4.3
<b>Sample No3</b>						
<b>DETP</b>	20	23.50	350	250768589	264901	3.97



### Καμπύλη βαθμονόμησης DETP

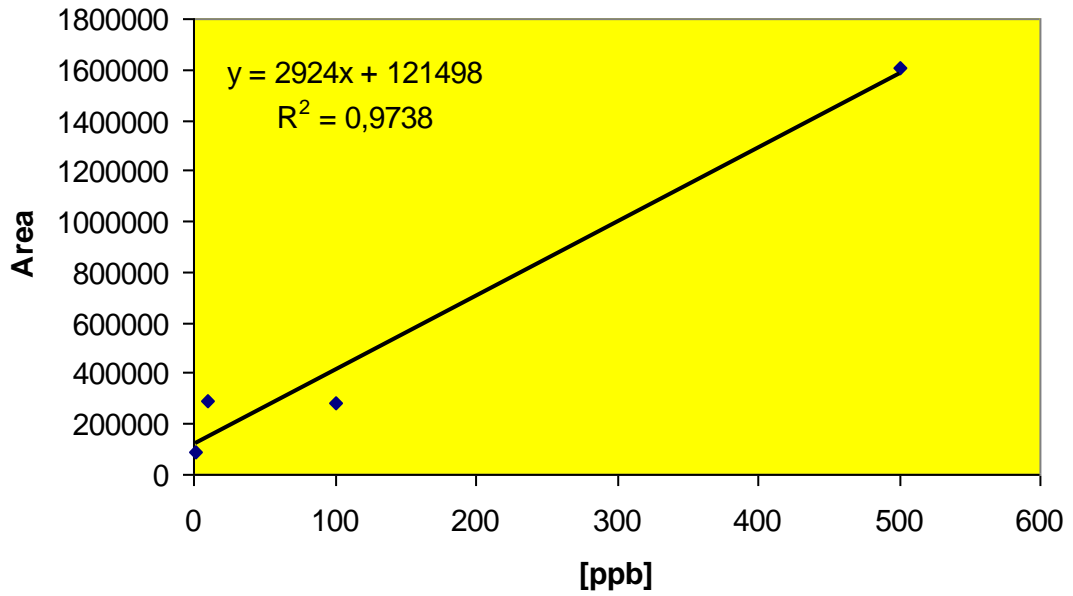


**Ανάλυση δειγμάτων διαλυτών φωσφορικών μεταβολιτών φυτοφαρμάκων συγκέντρωσης 1, 100 και 500ppb**

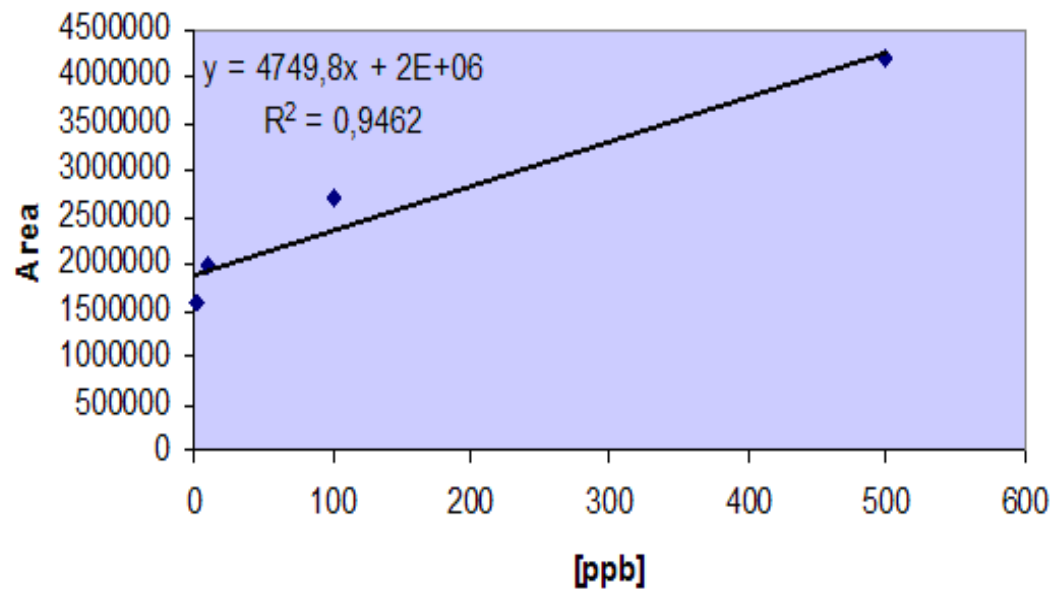
Στο πείραμα αυτό αναλύονται όλοι οι διαλυόμενοι μεταβολίτες με το στάδιο της ζπιπλίζον στήλης στην προκατεργασία του δείγματος. Η τάξη συγκέντρωσης των μεταβολιτών κατεβαίνει σε επίπεδο μg/l (ppb), από mg/l (ppm) που βρισκόταν στα προηγούμενα πειράματα.

<b>DAP</b>	<b>Concentration (ppm)</b>	<b>Retention Time,RT (sec)</b>	<b>Selective Ion</b>	<b>Area</b>	<b>Signal/ Noise</b>	<b>Area/ I.S.</b>
<b>Sample No1</b>						
<b>DMP</b>	1	<b>NOT DETECTED</b>	306	-	-	-
<b>DMTP</b>	1	<b>NOT DETECTED</b>	322	-	-	-
<b>DEP</b>	1	12.95	334	90957	661	0.001
<b>DETP</b>	1	14.30	350	1586051	10100	0.005
<b>Sample No2</b>						
<b>DMP</b>	10	<b>NOT DETECTED</b>	306	-	-	-
<b>DMTP</b>	10	<b>NOT DETECTED</b>	322	-	-	-
<b>DEP</b>	10	12.95	334	291060	2011	0.02
<b>DETP</b>	10	14.31	350	1983776	12856	0.11
<b>Sample No3</b>						
<b>DMP</b>	100	11.99	306	15693	61	0.001
<b>DMTP</b>	100	13.52	322	145022	872	0.008
<b>DEP</b>	100	12.95	334	283755	1637	0.02
<b>DETP</b>	100	14.31	350	2699997	15997	0.14
<b>Sample No3</b>						
<b>DMP</b>	500	12.02	306	145254	953	0.01
<b>DMTP</b>	500	13.51	322	1754860	10928	0.10
<b>DEP</b>	500	12.95	334	1606798	10080	0.10
<b>DETP</b>	500	14.31	350	4199893	566	0.25

**Καμπύλη βαθμονόμησης DEP**



**Καμπύλη βαθμονόμησης DETP**

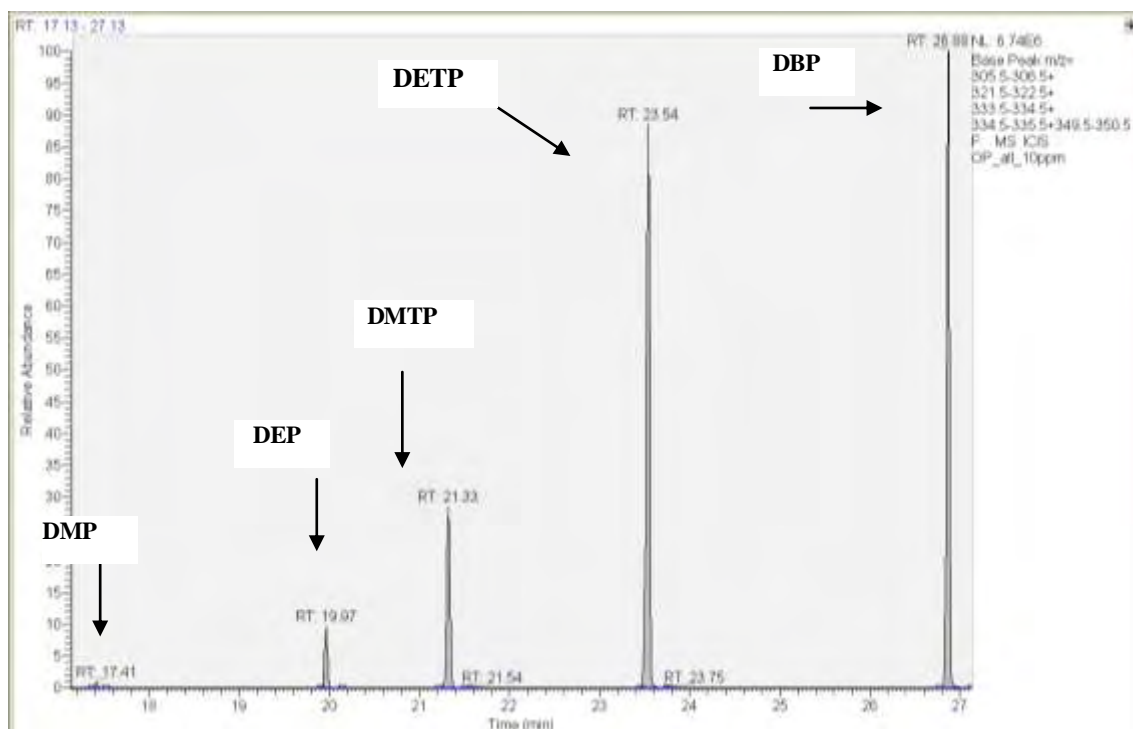


## **Συμπεράσματα - Συζήτηση**

Στην παρούσα εργασία έγιναν βήματα προς την ανάπτυξη αναλυτικής μεθοδολογίας για την ανίχνευση και τον προσδιορισμό των μεταβολικών οργανοφωσφορικών φυτοφαρμάκων. Εφαρμόστηκε πειραματική διαδικασία απομόνωσης και παραγωγοποίησης των μεταβολικών. Επίσης, επιλέχθηκαν κατάλληλες συνθήκες διαχωρισμού με την τεχνική της αέριας χρωματογραφίας και ανίχνευσης των μεταβολικών με την τεχνική της φασματοσκοπίας μαζών.

Οι επιλεγμένες παράμετροι επέτρεψαν να επιτευχθεί πλήρης διαχωρισμός των παραγωγοποιημένων μεταβολικών, όπως παρουσιάζεται στο παρακάτω χρωματογράφημα με τους χαρακτηριστικούς χρόνους έκλουσης για κάθε μεταβολίτη. Επίσης, παρελήφθησαν φάσματα μαζών των παραγωγοποιημένων οργανοφωσφορικών ενώσεων. Οι παράμετροι διαχωρισμού που επιλέχθηκαν, επέτρεψαν την άνοδο του ρυθμού αύξησης της θερμοκρασίας του φούρνου από 5° σε 14°C/min και την σημαντική ελάττωση του χρόνου ανάλυσης (από 40min σε 20min ) δίχως να επηρεαστεί ο χρωματογραφικός διαχωρισμός.

Με βάση τα παραπάνω, διαμορφώθηκαν συνθήκες για την περαιτέρω ανάπτυξη πιο εκλεκτικών μεθόδων παρακολούθησης της έκθεσης σε οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα, όπως η παρακολούθηση επιλεγμένης αντίδρασης (*selected or single / multiple reaction monitoring, SRM/MRM*).



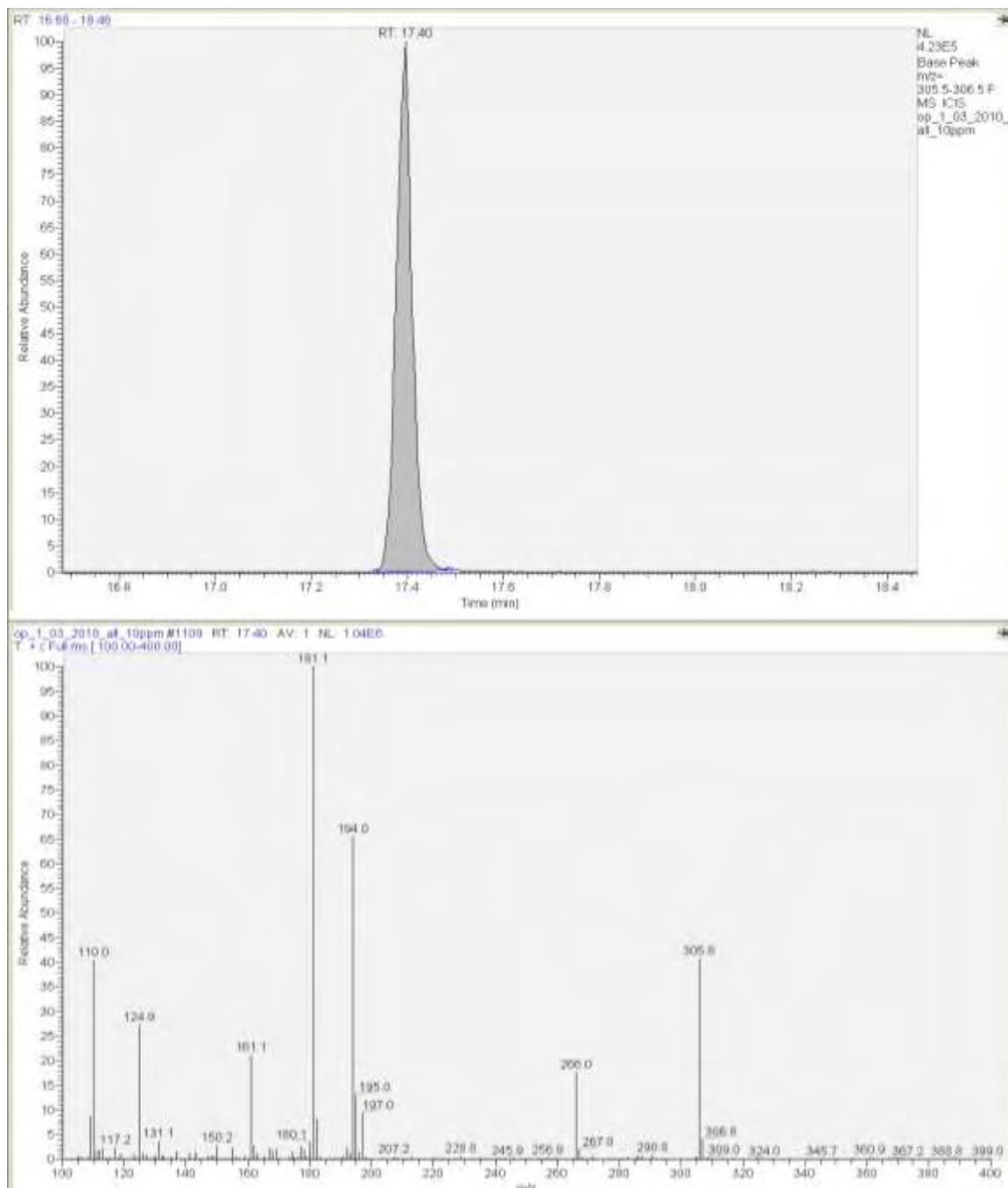
**Σχήμα 4.3.** Χρωματογραφικός διαχωρισμός και χρόνοι έκλουσης των παραγωγοποιημένων οργανοφωσφορικών μεταβολιτών.

**Πίνακας 4.1.** Χημική δομή, μοριακά ιόντα και χρόνοι έκλουσης των διαλκυλ φωσφορικών μεταβολιτών (DMP, DEP, DMTP και DETP) και του εσωτερικού προτύπου (DBP).

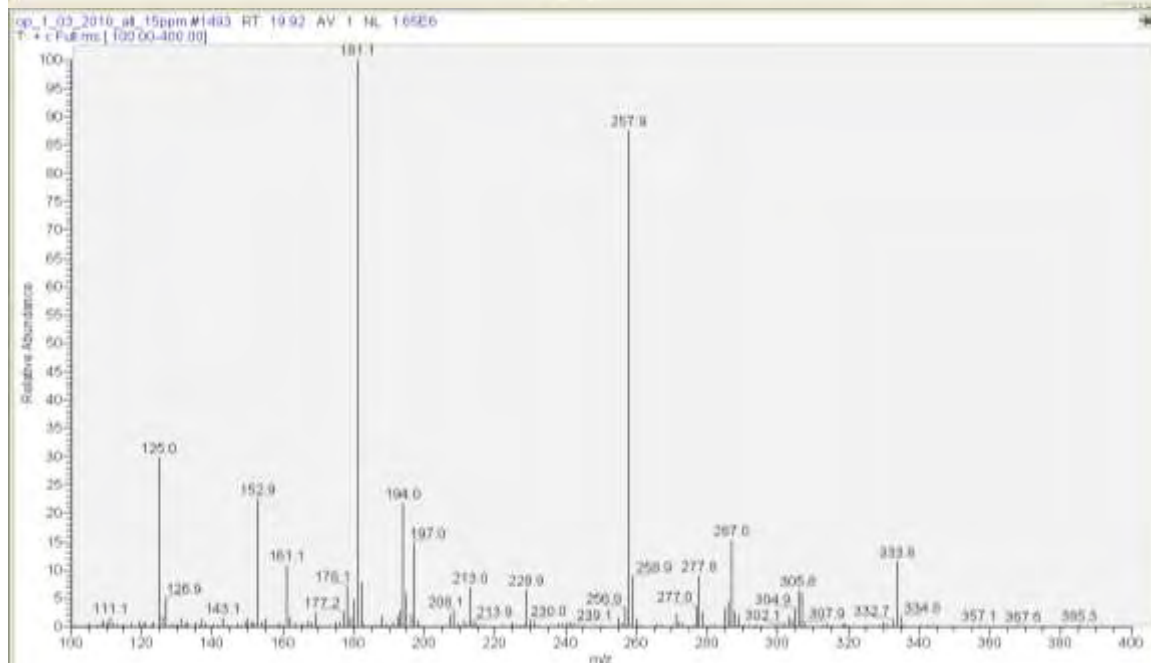
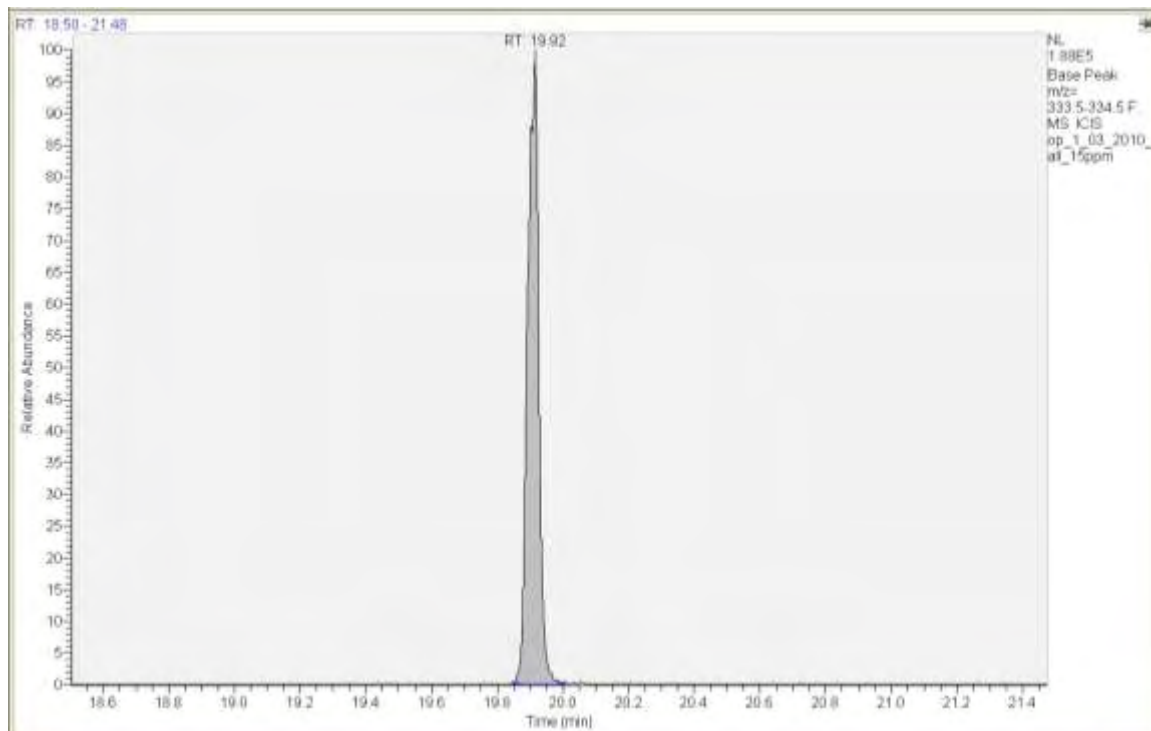
Μεταβολίτης	Δομή	Μοριακό ιόν ( $M^+$ )	Χρόνος έκλουσης (retention time)
DMP	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_3\text{C}-\text{O}-\text{P}-\text{OH} \\   \\ \text{H}_3\text{C}-\text{O} \end{array}$	306	17.41
DEP	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{P}-\text{OH} \\   \\ \text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{O} \end{array}$	334	19.97
DMTP	$\begin{array}{c} \text{S} \\ \parallel \\ \text{H}_3\text{C}-\text{O}-\text{P}-\text{OH} \\   \\ \text{H}_3\text{C}-\text{O} \end{array}$	322	21.33
DETP	$\begin{array}{c} \text{S} \\ \parallel \\ \text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{P}-\text{OH} \\   \\ \text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{O} \end{array}$	350	23.54
DBP	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C}_4\text{H}_9-\text{O}-\text{P}-\text{OH} \\   \\ \text{C}_4\text{H}_9-\text{O} \end{array}$	335	26.88

Στην συνέχεια παρατίθενται τα χρωματογραφήματα που αντιστοιχούν στις χαρακτηριστικές κορυφές με τους αντίστοιχους χρόνους έκλουσης για κάθε έναν από τους μεταβολίτες, μαζί με τα φάσματα μαζών των συγκεκριμένων ενώσεων

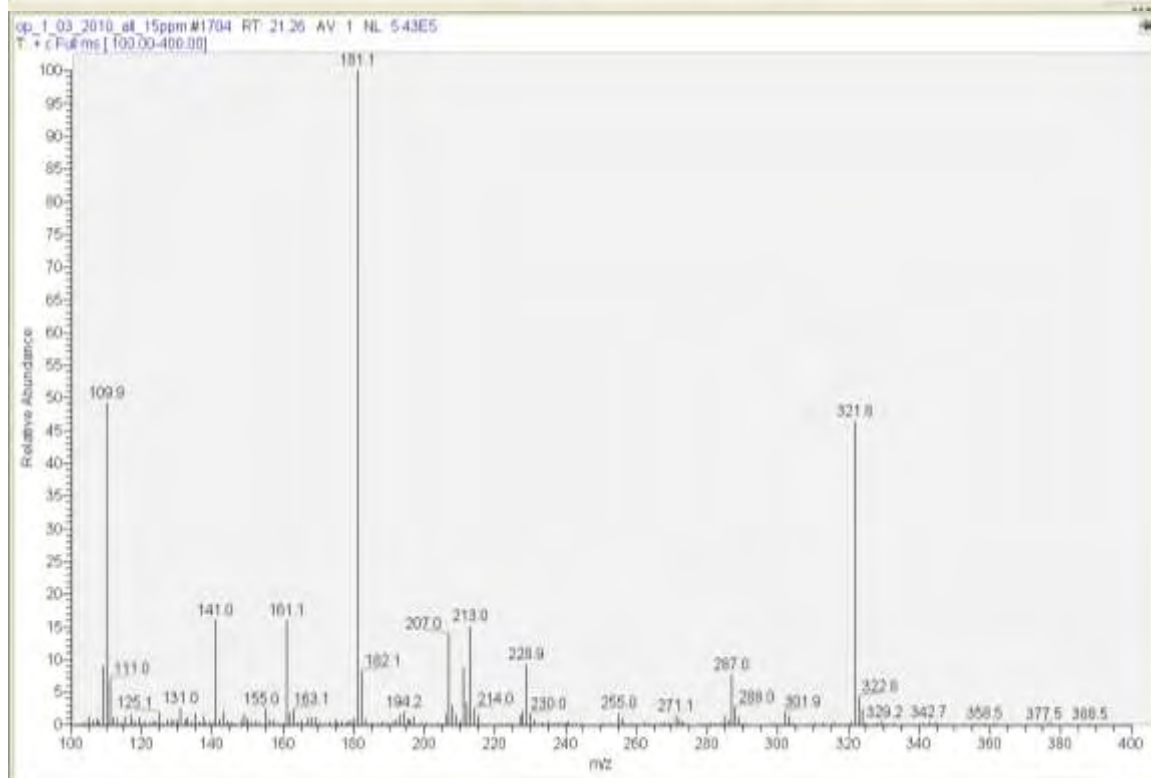
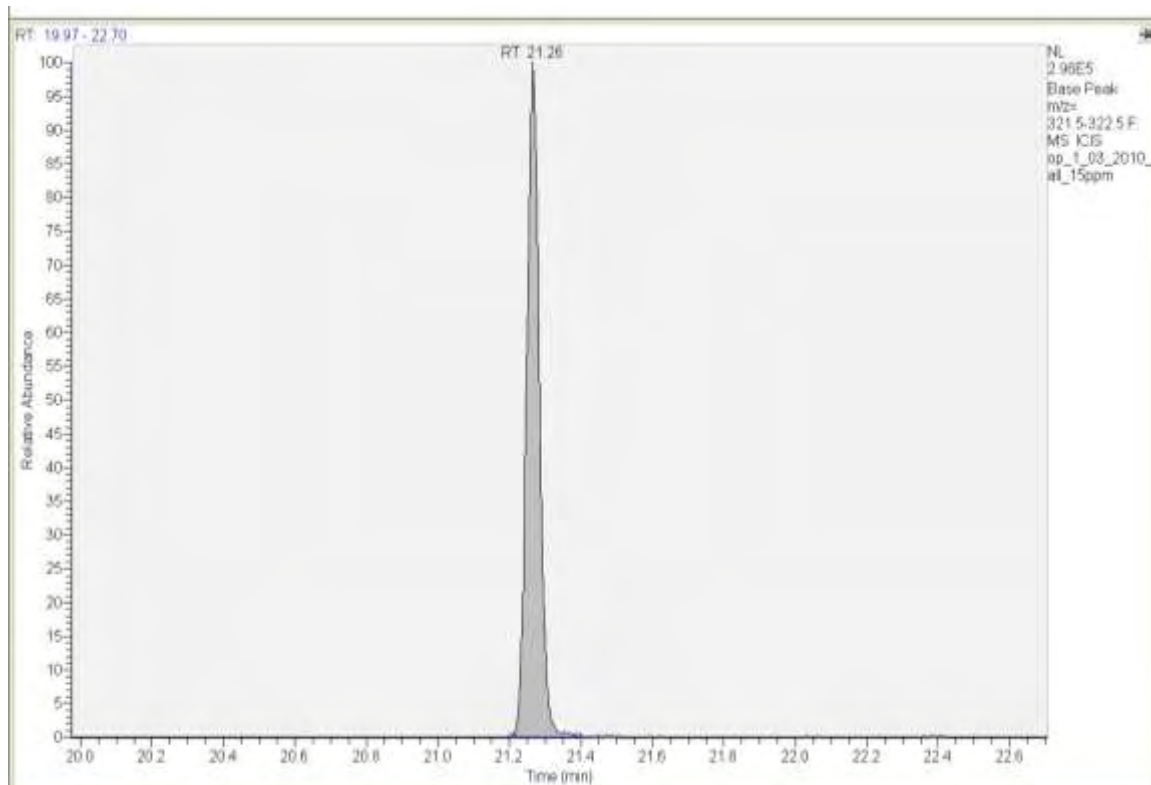
Διμεθυλ φωσφορικός μεταβολίτης (DMP) MB=306



Διαιθυλ φωσφορικός μεταβολίτης (DEP) MB=334

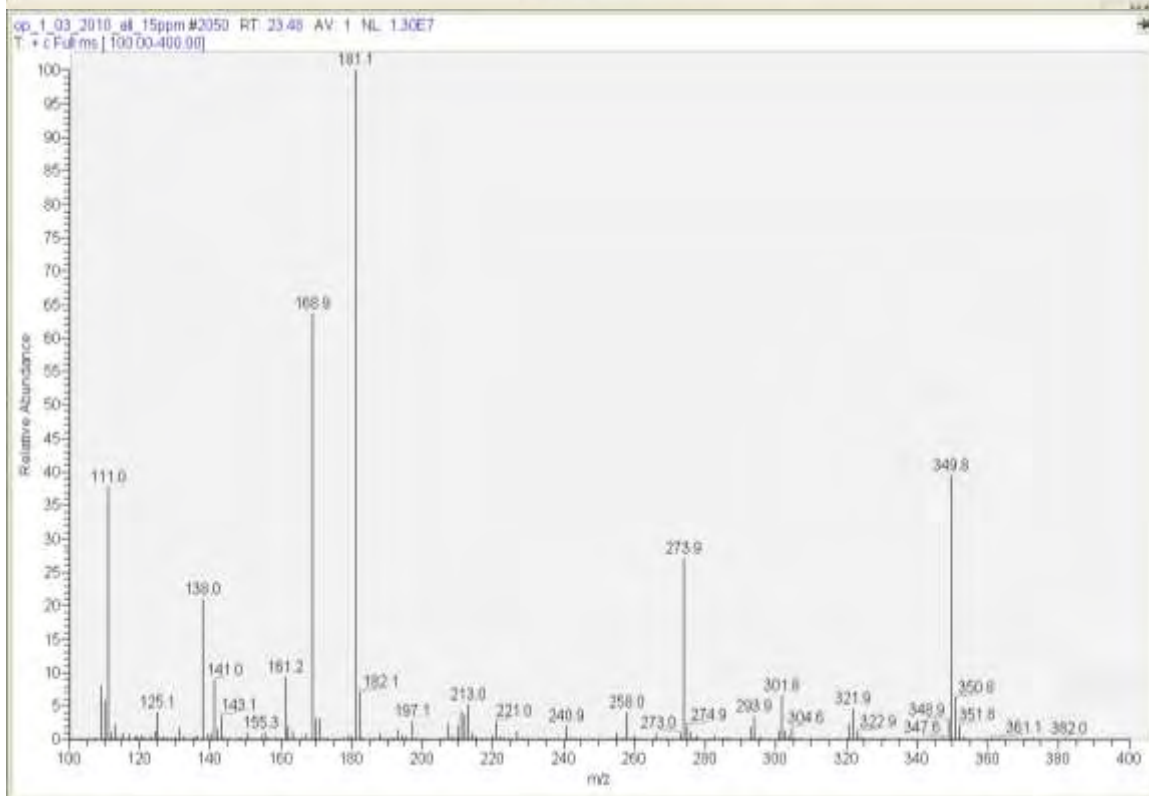
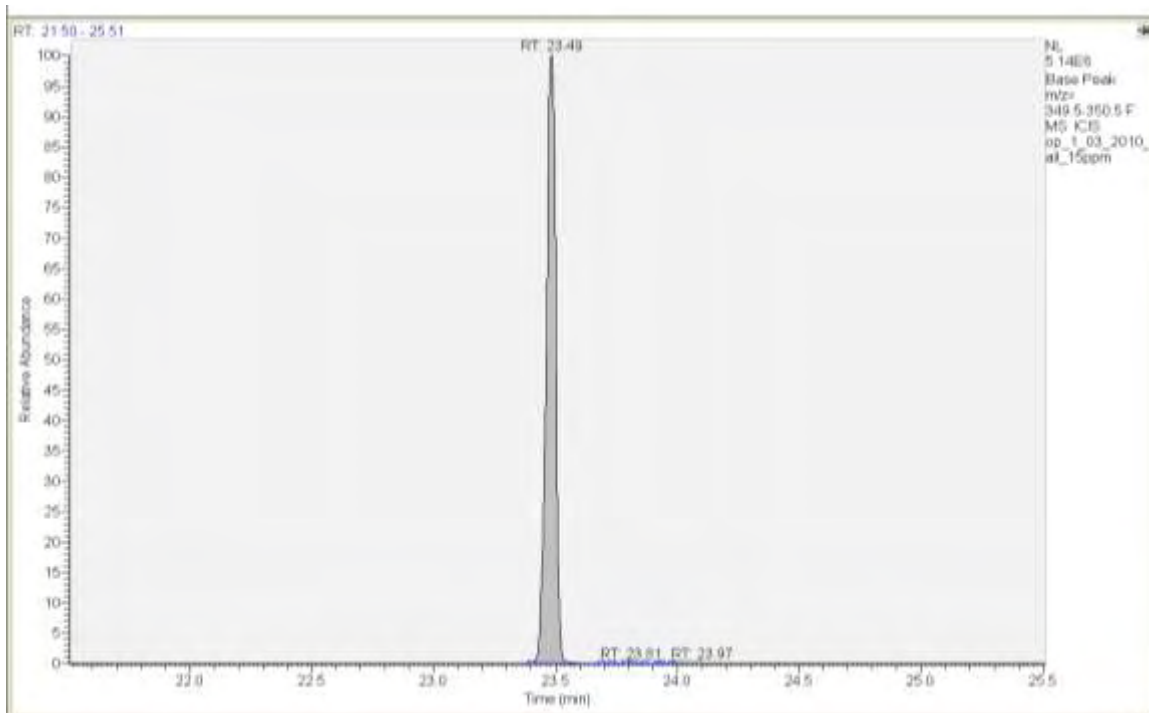


Διμεθυλ θειοφωσφορικός μεταβολίτης (DMTP) MB=322

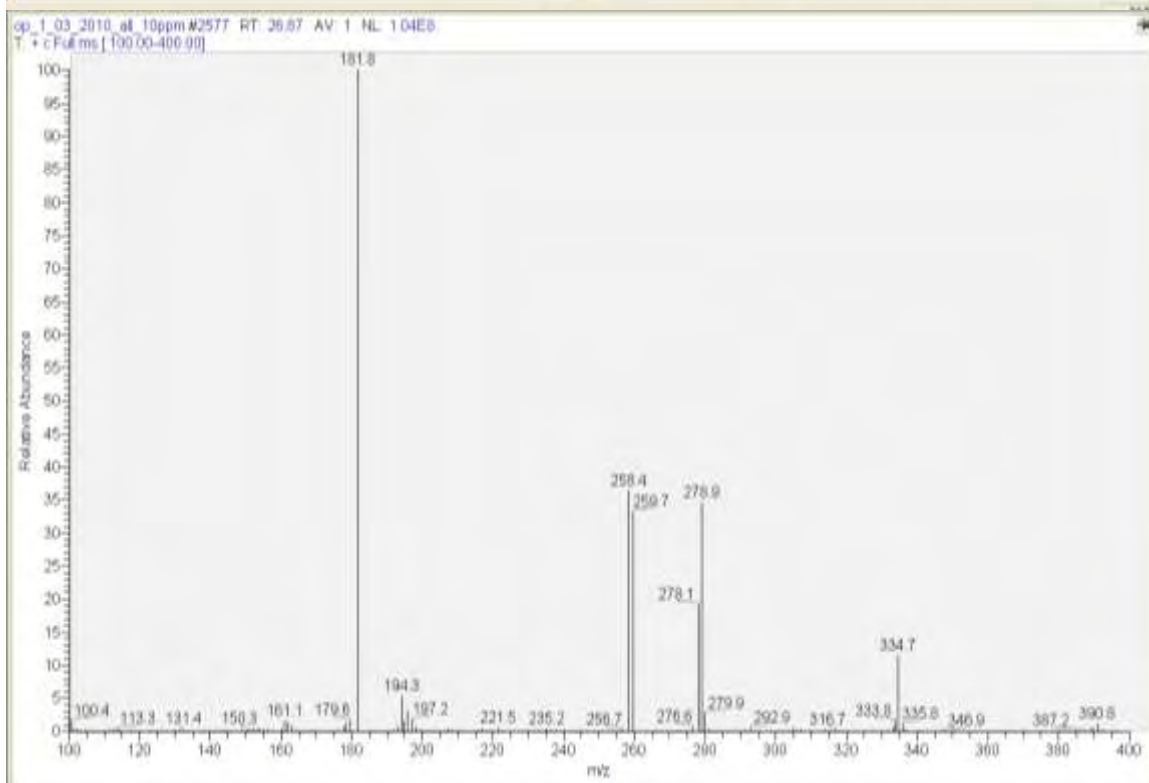
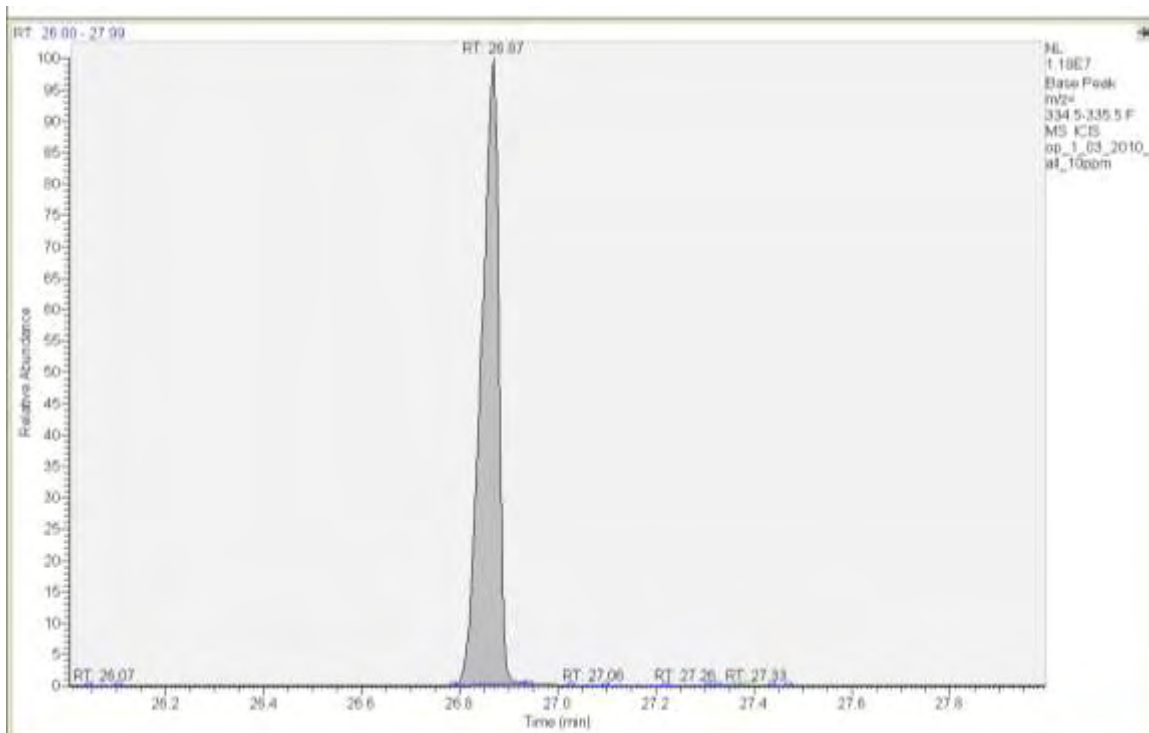




Διαθλ θειοφωσφορικός μεταβολίτης (DETP) MB=350



Διβουτυλ φωσφορικός μεταβολίτης (DBP) MB=335

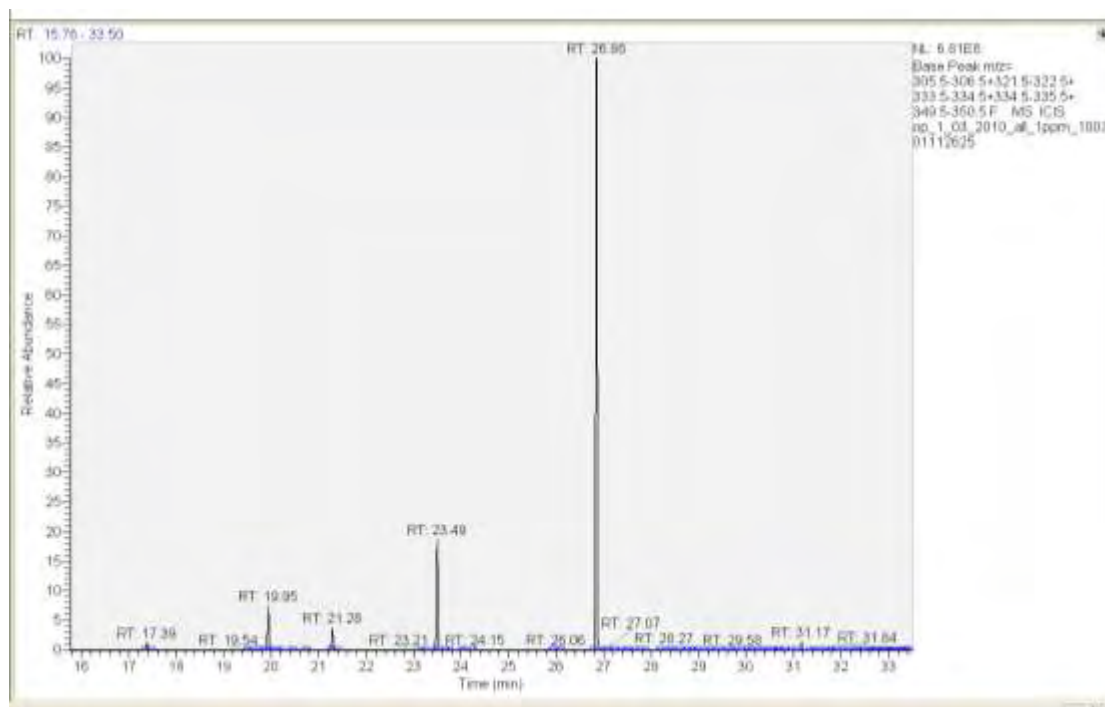


## Παράρτημα

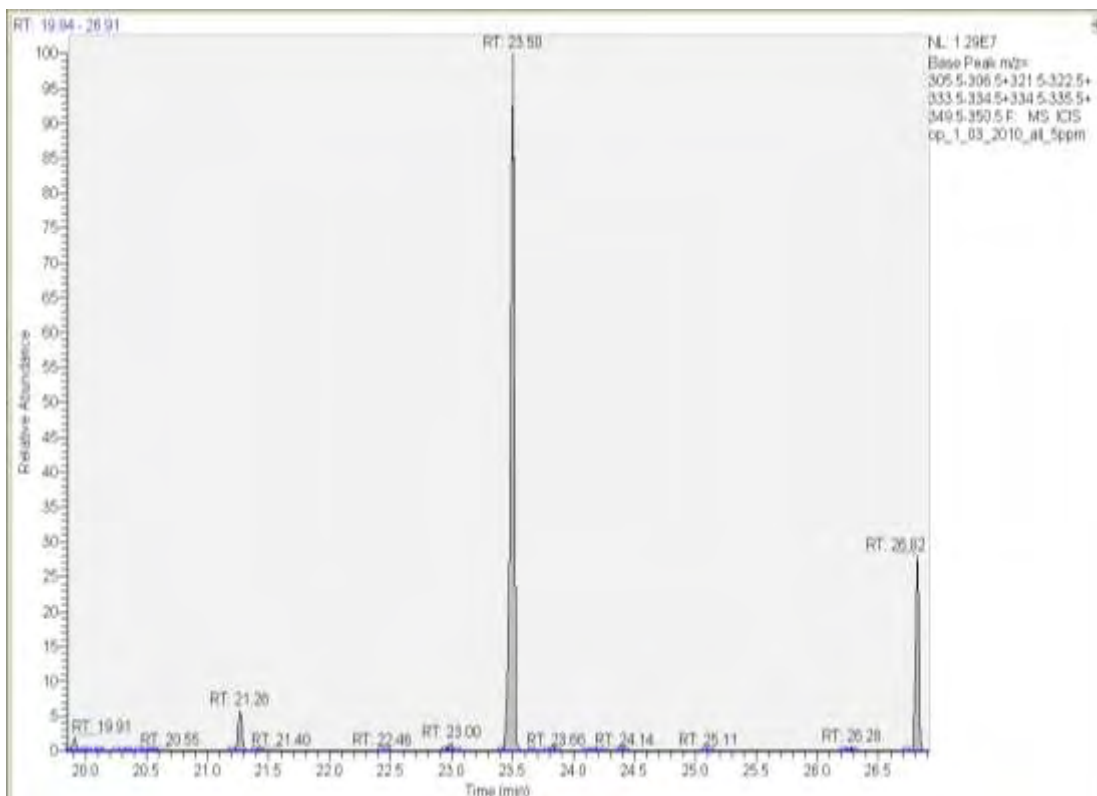
Στο παράρτημα παρατίθενται αναλυτικά τα χρωματογραφήματα που ελήφθησαν για τα δείγματα των οργανοφωσφορικών μεταβολιτών διαφορετικών συγκεντρώσεων.

Τα χρωματογραφήματα ελήφθησαν με τις ρυθμίσεις της λογισμικής διαδικασίας βασικών ιόντων (base peak).

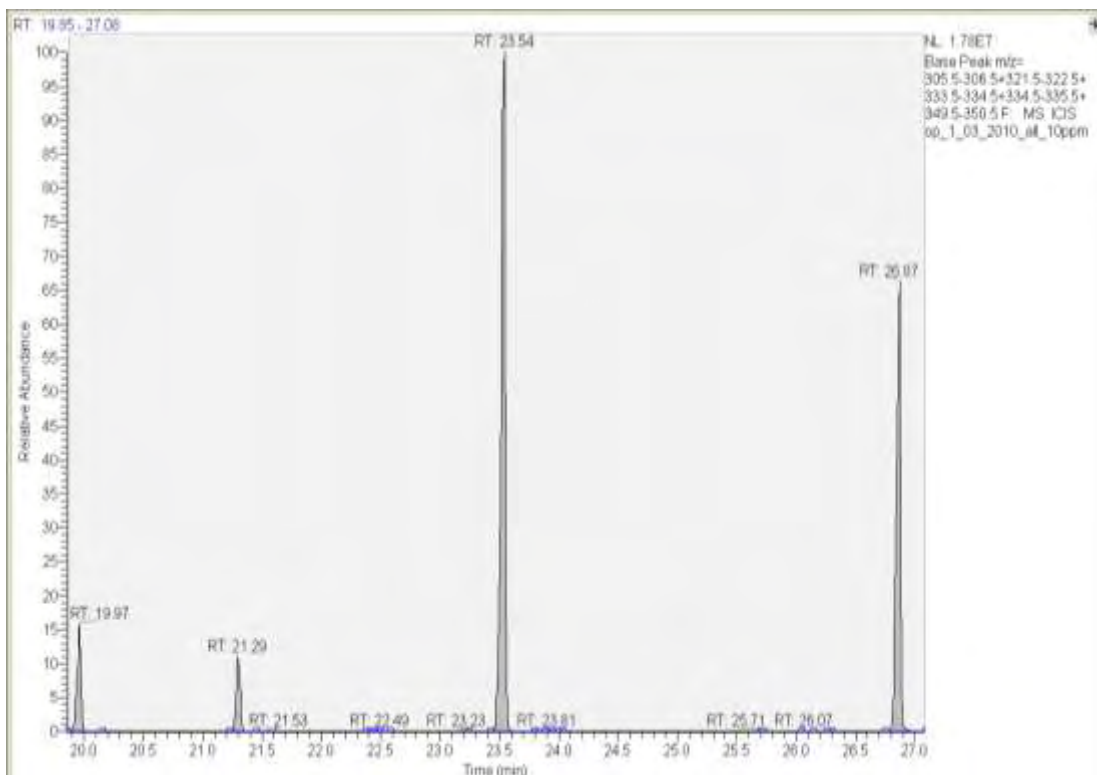
**Χρωματογραφήματα δειγμάτων διαλυκλ φωσφορικών μεταβολιτών φυτοφαρμάκων συγκέντρωσης 1, 5 και 10ppm**



**Φάσμα GC 1.1.** Ανάλυση διαλύματος DMP, DMTP, DEP, DETP και DBP συγκέντρωσης 1ppm.(base peak)

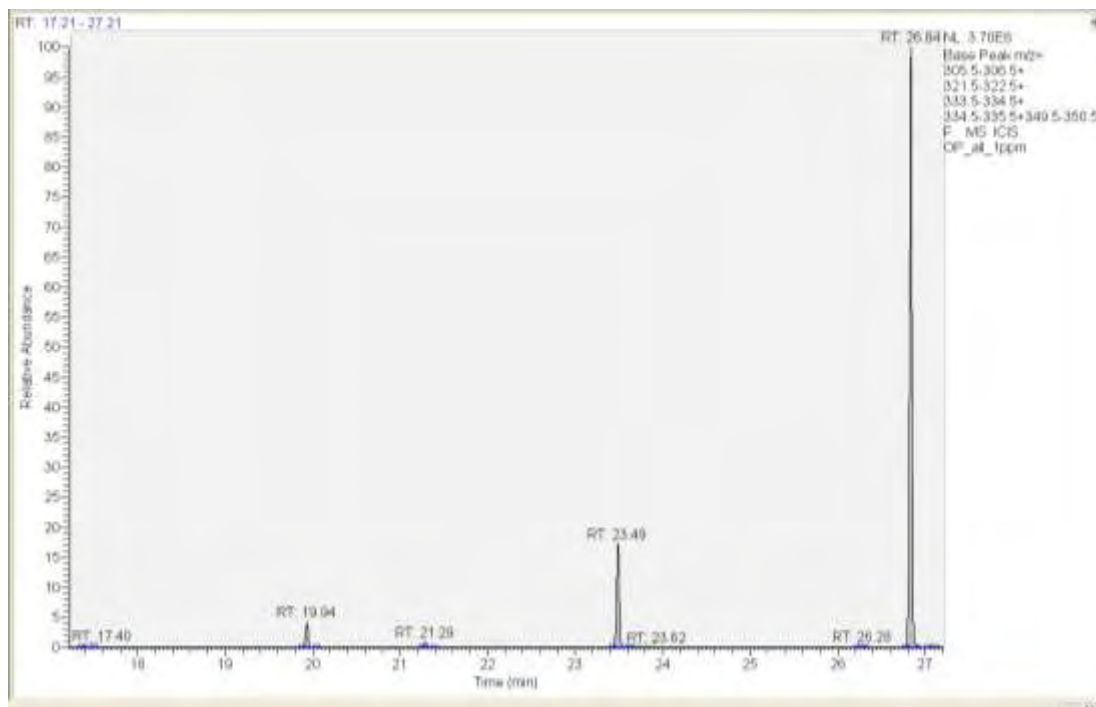


**Φάσμα GC 1.2.** Ανάλυση διαλύματος DMP, DMTP, DEP, DETP και DBP συγκέντρωσης 5ppm.(base peak)

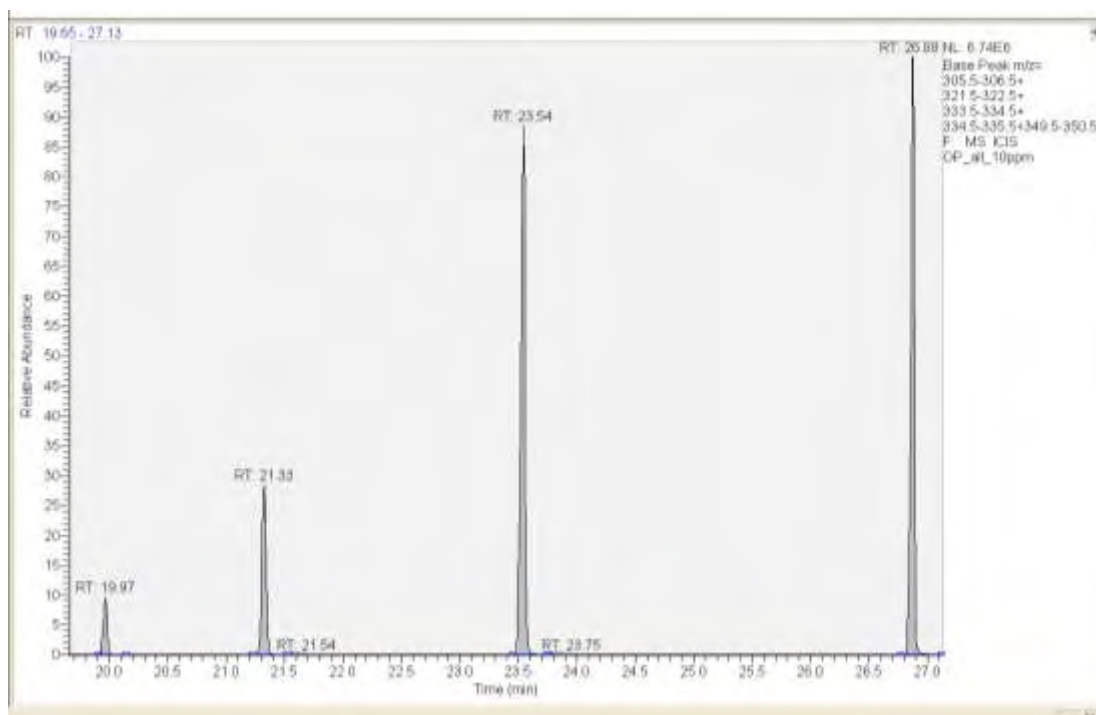


**Φάσμα GC 1.3.** Ανάλυση διαλύματος DMP, DMTP, DEP, DETP και DBP συγκέντρωσης 10ppm.(base peak)

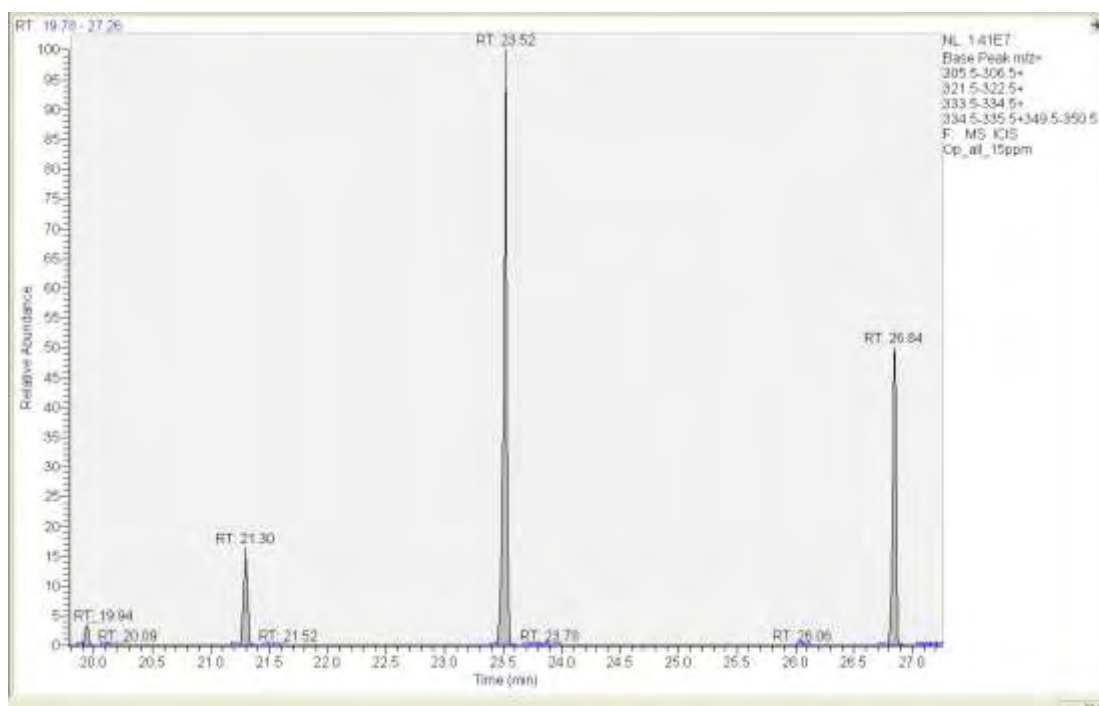
**Χρωματογραφήματα δειγμάτων διαλυκλ φωσφορικών μεταβολιτών φυτοφαρμάκων συγκέντρωσης 1, 10 και 15ppm**



**Φάσμα GC 2.1.** Ανάλυση διαλύματος DMP, DMTP, DEP, DETP και DBP συγκέντρωσης 1ppm.(base peak)

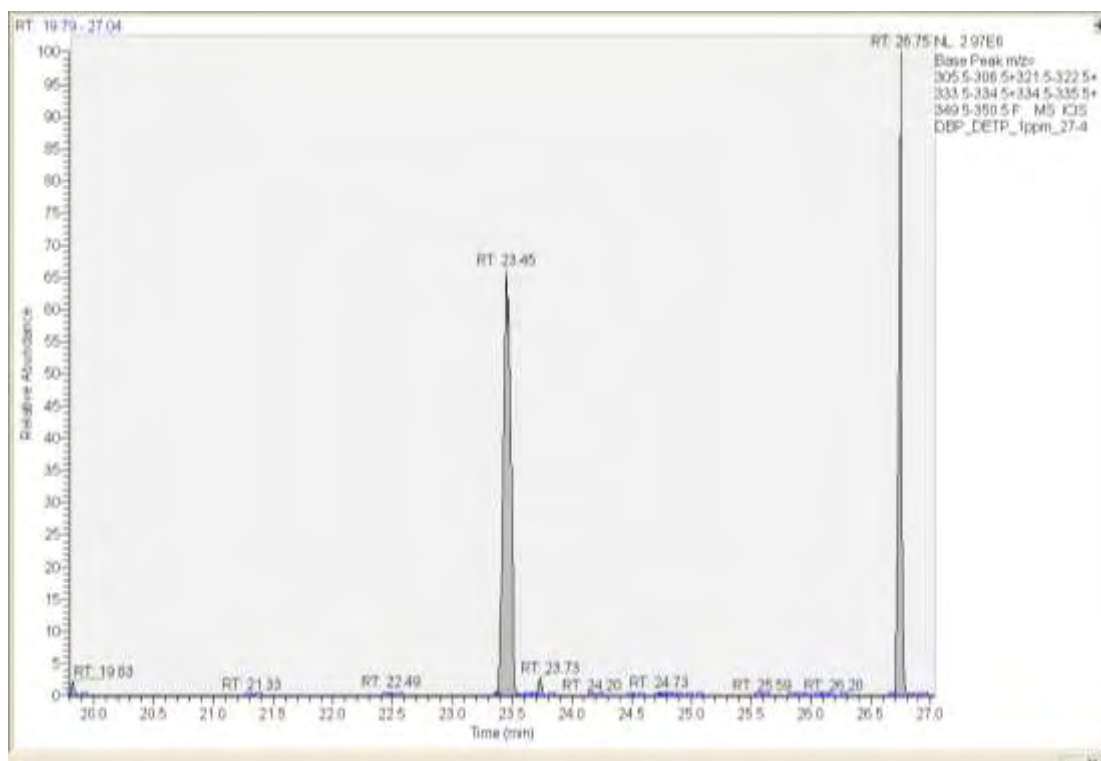


**Φάσμα GC 2.2.** Ανάλυση διαλύματος DMP, DMTP, DEP, DETP και DBP συγκέντρωσης 10ppm.(base peak)

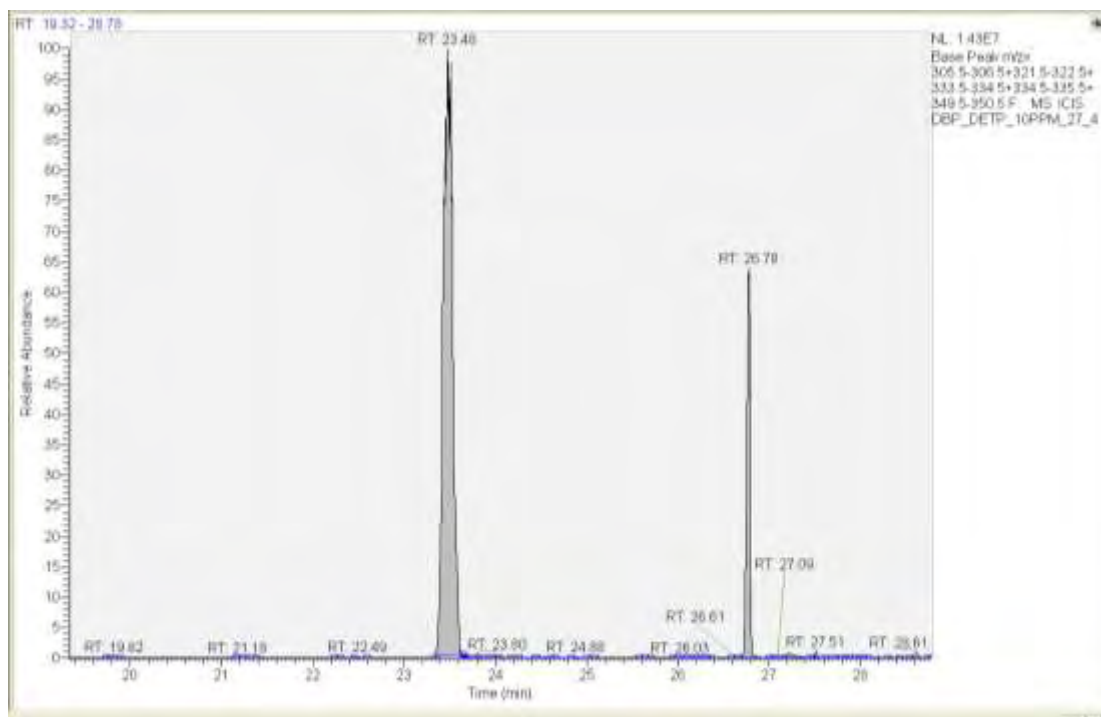


**Φάσμα GC 2.3.** Ανάλυση διαλύματος DMP, DMTP, DEP, DETP και DBP συγκέντρωσης 15ppm.(base peak)

Ανάλυση δείγματος διαιθυλ θειο φωσφορικού μεταβολίτη (DETP) φυτοφαρμάκων συγκέντρωσης 1, 10 και 20ppm

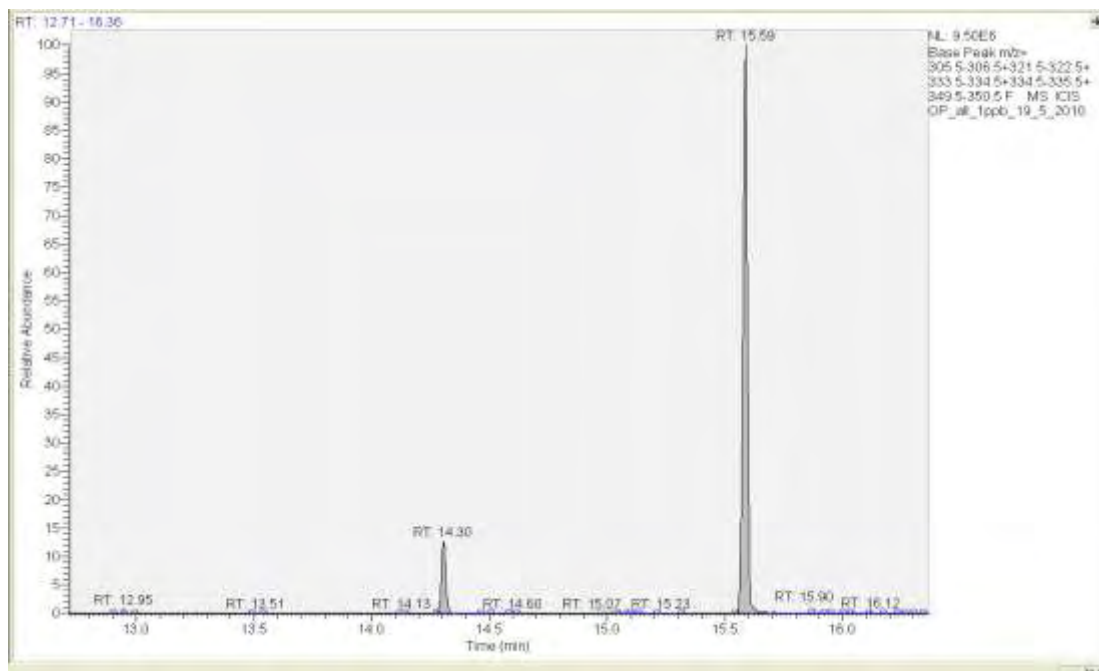


Φάσμα GC 3.1. Ανάλυση διαλύματος DETP και DBP συγκέντρωσης 1ppm.(base peak)

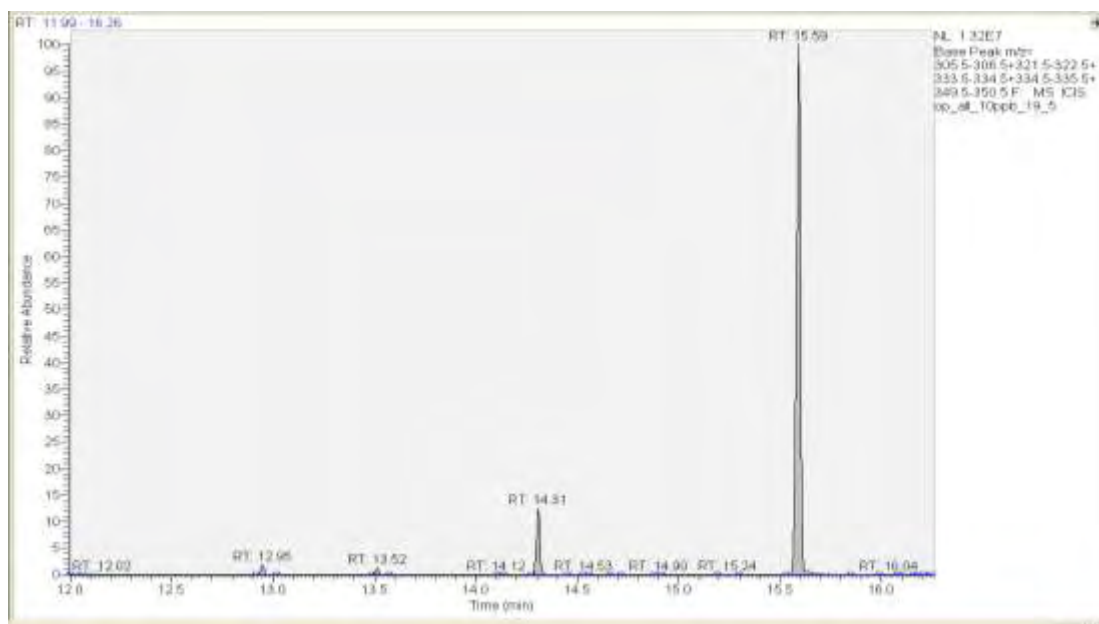


Φάσμα GC 3.2. Ανάλυση διαλύματος DETP και DBP συγκέντρωσης 10ppm.(base peak)

Ανάλυση δειγμάτων διαλυκyl φωσφορικών μεταβολιτών φυτοφαρμάκων συγκέντρωσης 1,100 και 500ppb

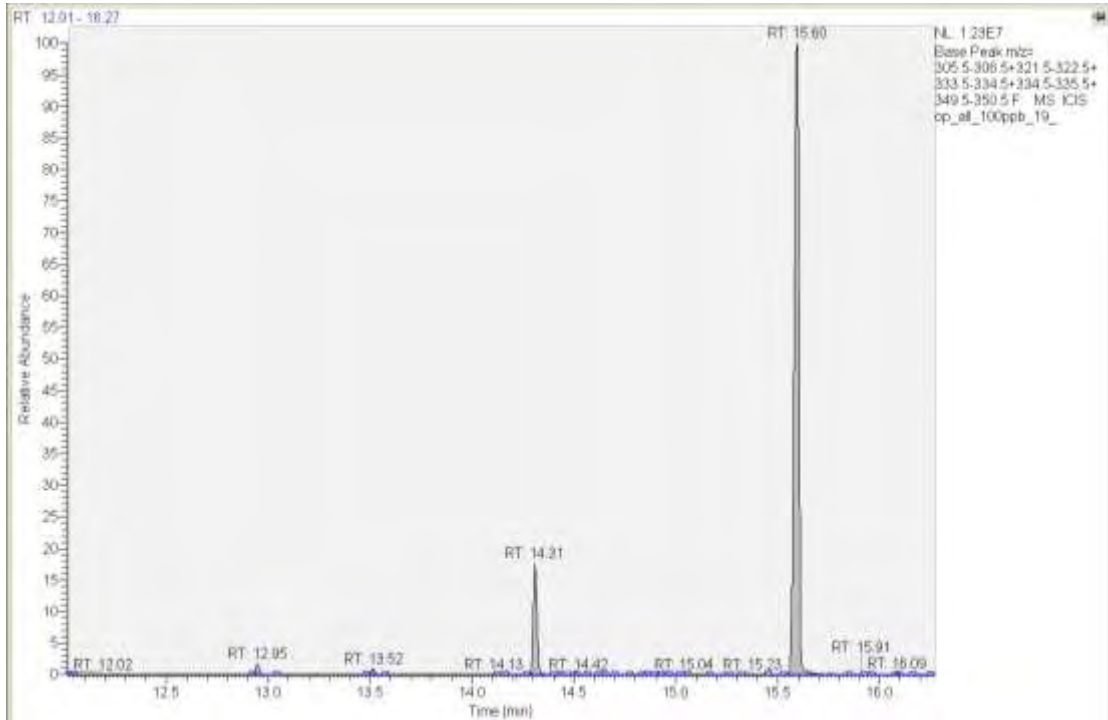


**Φάσμα GC 4.1.** Ανάλυση διαλύματος όλων των DAP μεταβολιτών με DBP ως I.S. σε συγκέντρωση 1ppb.(base peak)

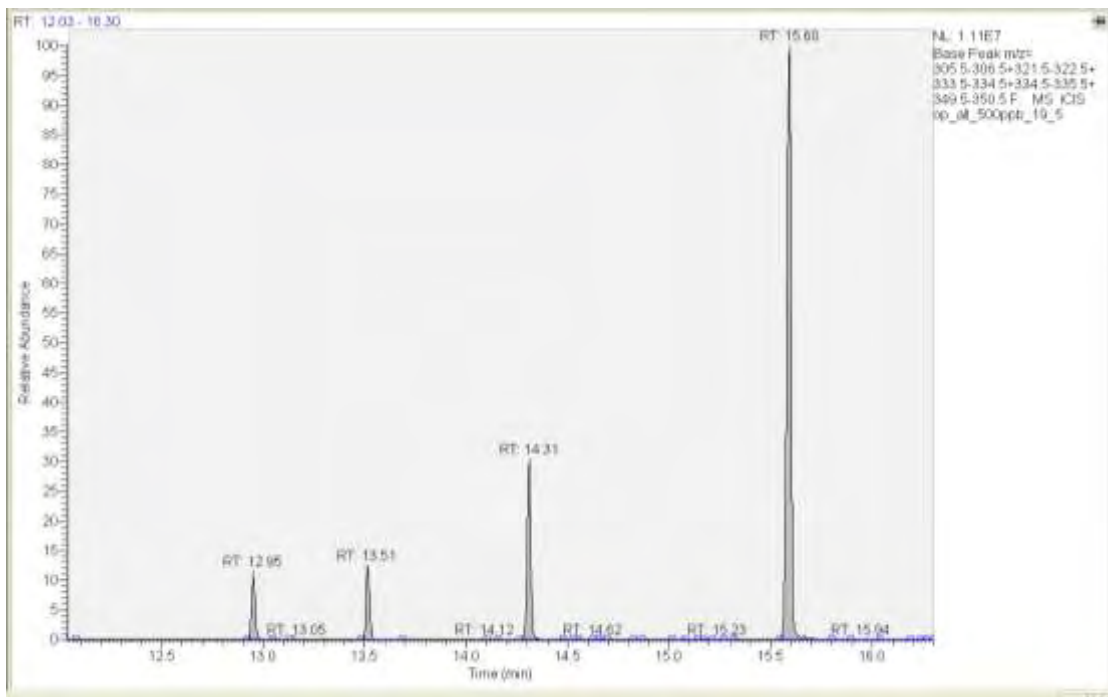


**Φάσμα GC 4.2.** Ανάλυση διαλύματος όλων των μεταβολιτών με DBP ως I.S.σε συγκέντρωση 10ppb.(base peak)





**Φάσμα GC 4.3.** Ανάλυση διαλύματος όλων των μεταβολιτών με DBP ως I.S. σε συγκέντρωση 100ppb. (base peak)



**Φάσμα GC 4.4.** Ανάλυση διαλύματος όλων των μεταβολιτών με DBP ως I.S. σε συγκέντρωση 500ppb. (base peak)

## **BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

- [1]. **US Environmental Protection Agency**, *What is a pesticide?*, July 24, 2007.
- [2]. **K.Sexton, Needham, L.L. and J.L.Pirkle**, «*Human Biomonitoring of Environmental Chemicals: Measuring chemicals in human tissues is the “gold standard” for assessing people’s exposure to pollution*», **American Scientist**, volume 92, January-February 2004
- [3]. **Robert Davies, Ghouse Ahmed and Tegwedd Freer**, «*Chronic exposure to organophosphates: background and clinical picture*», **Advances in Psychiatric Treatment** (2000), vol. 6, pp. 187–192.
- [4]. **Rachel Carson**, *Silent Spring*, Houghton Mifflin, September 1962.
- [5]. **M.Sanborn, D.Cole, K.Kerr, C.Vakil, H.Sanin, K.Bassil**, *Pesticides Literature Review*, The Ontario College of Family Physicians, April 23, 2004.
- [6]. **Richard H. Handy, Tamara S. Galloway and Michael H Depledge**, «*A Proposal for the Use of Biomarkers for the Assessment of Chronic Pollution and in Regulatory Toxicology*», **Ecotoxicology**,12, 331-343, 2003.
- [7]. **Lotti M.**, «*The pathogenesis of organophosphate polyneuropathy*», **Clinical Reviews in Toxicology**, 21, 465-487.
- [8]. **Frederick M. Fishel**, *Pesticide Toxicity Profile: Organophosphate Pesticides*, Agronomy Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, June 2005.
- [9]. **Moretto A., Lotti M.**, «*Poisoning by organophosphorus insecticides and sensory neuropathy*», **Journal of neurology, neurosurgery and psychiatry**, 1998, 64:463-468 (1998).

- [10]. **Manthripragada A.D., Costello S., Cockburn M.G., Bronstein J.M., Ritz B.**, «*Paraoxonase 1, agricultural organophosphate exposure, and Parkinson disease*», **Epidemiology**, January 2010; 21 (1):87-94.
- [12]. **Joanne Hughes, Alexander Capleton and Carol Courage**, *A review of the effects of low-level exposure to organophosphate pesticides on fetal and childhood health*, 2002
- [13]. <http://www.cdc.gov/nceh/tracking/trackbiomon.htm>
- [14]. **Rick Becker, Sarah Brozena and Darrell Smith**, *What is biomonitoring?*, “Inside EPA’s Risk Policy Report.” The changes are solely the authors” , June 2003.
- [15]. **K.Sexton, Needham, L.L. and J.L.Pirkle**, «*Human Biomonitoring of Environmental Chemicals: Measuring chemicals in human tissues is the “gold standard” for assessing people’s exposure to pollution*», **American Scientist**, volume 92, January-February 2004
- [16]. <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00000071.htm>
- [17]. **Philippe Grandjean**, «*Biomarkers in Epidemiology*», **Clinical Chemistry**, Vol 41, No 12, 1995.
- [18]. **Wagida A. Anwar**, «*Biomarkers of Human Exposure to Pesticides*», **Environmental Health Perspectives**, Vol 105, Supplement 4, June 1997.
- [19]. **Μαργαρίτη, Μ.** , «*Δείκτες έκθεσης σε φυτοφάρμακα. Μελέτη εναπόθεσης μεταβολιτών οργανοφωσφορικών φυτοφαρμάκων σε τρίχες πειραματόζωων και επέκταση αυτής στον άνθρωπο*», Διδακτορική διατριβή, Ηράκλειο, 2009.
- [20]. **International Programme on Chemical Safety**, *Biomarkers and Risk Assessment: Concepts and Principles (Environmental Health Criteria)*, Geneva: WHO, 1993:82pp.
- [21]. **Grandjean P.**, «*Individual susceptibility to toxicity*», **Toxicol Lett**, 1992;64/65:43-51.
- [22]. **Stajnbaher D., Zupancic-Kralj L.**, «*Multiresidue method for determination of 90 pesticides in fresh fruits and vegetables using solid-phase extraction and gas-chromatography-mass spectrometry*», **J.Chromatogr A**.2003,1015:185-198.

- [23]. **Hoffmann E.**, «*Tandem mass spectrometry: a primer*», **J. Mass Spectrom** 1996,31:129-137.
- [24]. **Frias M.M., Frenich A.G. Martinez Vidal J.L. et al.**, «*Analysis of lindane, vinclozolin, aldrin, p,p'-DDE, o,p'-DDT and p,p'-DDT in human serum using gas chromatography with electron capture detection and tandem mass spectrometry*», **J.Chromatogr B**.2001,760:1-15.
- [25]. **Hogendoorn E., Zoonen P.**, «*Recent and future developments of liquid chromatography in pesticide trace analysis*», **J.Chromatogr A**.2000,892:435-453.
- [26]. **Hernandez F., Sancho J.V., Pozo O.J.**, «*An estimation of the exposure to organophosphorus pesticides through the simultaneous determination of their main metabolites in urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*», **J.Chromatogr B**.2004,808:229-239.
- [27]. **Hernandez F., Sancho J.V., Pozo O.J.**, «*Direct determination of alkyl phosphates in human urine by liquid chromatography/electrospray- tandem mass spectrometry*», **Rapid Commun Mass Spectrom**, 2002,16:1766-1773.
- [28]. **Barr D.B., Turner W.E. Di Pietro E. et al.**, «*Measurement of p-nitrophenol in the urine of residents whose homes were contaminated with methyl parathion*», **Environmental Health Perspectives**, 2002, 110(Suppl. 6):1085-1091.
- [29]. **Sancho J.V., Pozo O.J., Hernandez F.**, «*Direct determination of chlorpyrifos and its main metabolite 3,5,6-trichloro-2-pyridinol in human serum and urine by coupled-column liquid chromatography/electrospray-tandem mass spectrometry*», **Rapid Commun Mass Spectrom**, 2000, 14:1485-1490.
- [30]. **Barr D.B., Bravo R., Weerasekera G. et al.**, «*Concentrations of dialkyl phosphate metabolites of organophosphorus pesticides in the U.S. population*», **Environmental Health Perspectives**, 2004, 112:186-200.
- [31]. **Heudorf U, Angerer J**, «*Metabolites of organophosphorous insecticides in urine specimens from inhabitants of a residential area*», **Environmental Research**, 2001; 86: 80-7.

- [32]. Ueyama J., Saito I., Kamijima M. et al., «Simultaneous determination of urinary dialkylphosphate metabolites of organophosphorus pesticides using gas chromatography-mass spectrometry», **J. Chromatogr. B**, 2006.
- [33]. Dulaurent S., Saint-Marcoux F., Marquet P. et al., «Simultaneous determination of six dialkylphosphates in urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry», **J. Chromatogr. B**, 2006, 831:223-239
- [34]. Maria G. Margariti, Andreas K. Tsakalof and Aristidis M. Tsatsakis, «Analytical Methods of Biological Monitoring for Exposure to Pesticides: Recent Update», **The Drug Monit**, 2007;0:000-000
- [35]. Supelco Analytical GC column selection guide
- [36]. Finnigan Trace GC Ultra Operating Manual, p.125-272
- [37]. Αθ. Βαλαβανίδης, Βασικές αρχές μοριακής φασματοσκοπίας και εφαρμογές στην οργανική χημεία, Εκδόσεις Σύγχρονα Θέματα, 2<sup>η</sup> Έκδοση, Αθήνα, 2008
- [38]. Φωτεινή Ν. Μπαζώτη, «Ανάπτυξη αναλυτικών μεθόδων για την μελέτη βιοδραστικών συστατικών του είδους *Olea europaea* και των αλληλεπιδράσεων αυτών των ουσιών με πεπτίδια», Διδακτορική διατριβή, Πανεπιστήμιο Πατρών, Πάτρα, 2006
- [39]. Dempster, A.J., «Positive Ray Analysis of Lithium and Magnesium», **Phys. Rev.** 1921, 18, 415-422
- [40]. Blakney, W., «A New Method of Positive Ray Analysis and Its Application to the Measurement of Ionization Potentials in Mercury Vapor», **Phys. Rev.** 1929, 34, 157-160
- [41]. Nier, A.O., «A Mass Spectrometer for Isotope and Gas Analysis», **Rev. Sci. Instrum.** 1947, 18, 398-411.

- [42]. **De Hoffman, E. and Stroobant, V.**, *Mass Spectrometry: Principles and Applications*, Wiley & Sons Eds., 3rd Ed., West Sussex, England, 2002
- [43]. **Stein, S.E.**, «*An integrated method for spectrum extraction and compound identification from GC/MS data.*», **J. Am. Soc. Mass Spectrom.** 1999, 10, 770-781
- [44]. **R.G. Cooks, G.Chen, P.Wong and H Wollnik**, *Encl. Appl. Phys.*, 19 (1997) 289
- [45]. **Philip S.H. Wong, R. Graham Cooks**, *Ion Trap Mass Spectrometry*
- [46]. **R.E. March and R.J. Hughes**, *Quadrupole Storage Mass Spectrometry*, Willey, New York, 1989
- [47]. **R.G. Cooks, J.H. Beyon, R.M. Caprioli and G.R. Lester**, «*Metastable Ions*», Elsevier, Amsterdam, 1973
- [48]. **F.W. McLafferty, R.F. Bente, R. Kornfeld, S.C. Tsai and I. Howe**, *J. Am. Chem. Soc.*, 95,2120 (1973)
- [49]. **K.R. Jennigs**, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.*, 1,227 (1968)
- [50]. **R.A. Yost and C.G. Enke**, *J. Am. Chem. Soc.*, 100, 2274 (1978)
- [51]. *Finnigan LCQ Catalog*, 1996.
- [52]. **Hoffmann E.**, «*Tandem mass spectrometry: a primer*», **J. Mass Spectrom** 1996,31:129-137
- [53]. **Ιωάννης Δεληγιαννάκης, Δήμητρα Χελά, Ιωάννης Κωνσταντίνου**, *Ενόργανη Περιβαλλοντική Ανάλυση*, Εκδόσεις Τζιόλα, Ιωάννινα, 2010
- [54]. **C. Aprea, C. Colosio, T. Mammone, C. Minoia, M. Maroni**, *J. Chromatogr.*, B 769 (2002) 191.

[55]. *Thermofinnigan manual or application note.*

[56]. *Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων, L 221/8*