

# **ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ ΚΑΙ ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΠΟΣΙΜΟΥ ΝΕΡΟΥ**

---

**Δρ. Γ. Ε. Μηλιάδης**

---

**Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό  
Ινστιτούτο  
Εθνικό Εργαστήριο Αναφοράς**

**[g.miliadis@bpi.gr](mailto:g.miliadis@bpi.gr)**

# Σχεδιασμός αναλυτικών μεθόδων:

---

**Οι παράγοντες που πρέπει να ληφθούν υπ' όψη είναι:**

**1. Οι προς προσδιορισμό ενώσεις (επιλογή βάσει χρήσης & ιδιοτήτων τους, αναλυτικών δυνατοτήτων, προηγούμενων ευρημάτων, κ.ά.).**

# Φυτοφάρμακα «προτεραιότητας» (Decision No 2455/2001/EC)

---

**Alachlor**

**Atrazine**

**Chlorfevinphos**

**Chlorpyrifos**

**Diuron**

**Endosulfan**

**Isoproturon**

**Simazine**

**Trifuralin**

**...αλλά και ορισμένα προϊόντα  
διάσπασης πρέπει να  
προσδιορίζονται για την εκτίμηση  
του κινδύνου**



# Σχεδιασμός αναλυτικών μεθόδων:

---

2. Η δειγματοληψία (σημεία δειγματοληψίας, τρόπος λήψης, συνθήκες μεταφοράς, κ.ά.)
3. Μέθοδος: επιλογή, επικύρωση & διαπίστευσή της

# Προετοιμασία δείγματος για χρωματογραφία:

---

## Εφαρμοζόμενες τεχνικές:

- Εκχύλιση Υ/Υ
- Μικροεκχύλιση στερεής φάσης
- Εκχύλιση στερεής φάσης
- Καμία (απ' ευθείας έγχυση 50μL ως 2mL νερού σε **LC-MS/MS**)

# Η Εκχύλιση στερεής φάσης (SPE):

---

- ✓ Η πλέον ευρέως χρησιμοποιούμενη
- ✓ Συμπυκνώνει ως και 1000 φορές τους αναλύτες
- ✓ Απομακρύνει προσμίξεις
- ✓ Με μικρούς όγκους οργανικών διαλυτών
- ✓ Εκχυλίζει μεγάλο αριθμό φυτοφαρμάκων

# Η Εκχύλιση στερεής φάσης (SPE):

---

- ✓ Αυτοματοποιείται και εξοικονομεί κόστη.
- ✓ Με καλή ορθότητα, πιστότητα και ευαισθησία.
- ✓ Τα το πλέον χρησιμοποιούμενο προσροφητικά: OASIS HLB και C-18.
- ✓ Γίνεται και on-line, σε σύνδεση με LC-MS/MS



## Παράδειγμα SPE με υλικό C-18:

**Ενεργοποίηση φυσιγγίου: 5 mL οξικός  
αιθυλεστέρας, 5 mL μεθανόλη και 10  
mL H<sub>2</sub>O**

**Διαβίβαση δείγματος: 500 mL  
δείγματος με ροή ~15 mL/min (χρόνος  
~30 min)**

**Στέγνωμα φυσιγγίου: με αέρα για  
~30min**

**Έκλουση αναλυτών: με οξικό  
αιθυλεστέρα, σε ογκομετρική φιάλη  
1mL**



# Πριν τη χρωματογραφία:

Επιλογή τελικού διαλύτη δείγματος: να είναι συμβατός με το σύστημα μέτρησης.

- ✓ Οξικός αιθυλεστέρας: κατάλληλος για GC, όχι για LC αντίστροφης φάσης
- ✓ Μεθανόλη: κατάλληλη για LC, όχι η καλύτερη λύση για GC

Η στατική φάση στο GC: DB-5, DB-17

Η κινητή φάση στο LC: μεθανόλη-νερό με 1-5mM  $\text{HCOONH}_4$  για MS/MS ή TOF

# Προσδιορισμός:

---

Ο προσδιορισμός υπολειμμάτων είναι αποτελεσματικός όταν γίνεται με πολυδύναμες μεθόδους. Σε ειδικές περιπτώσεις στοχευμένων ελέγχων, χρησιμοποιούνται μέθοδοι μεμονωμένου υπολείμματος (single residue methods).

# Μέθοδοι μεμονωμένου υπολείμματος:

---

- ✓ οι όξινες ενώσεις
- ✓ οι ενώσεις –quat (chlormequat, meperquat, paraquat)
- ✓ μεμονωμένες περιπτώσεις, π.χ. glyphosate, amitraz
- ✓ οι διθειοκαρβαμιδικές ενώσεις



# Η αέρια χρωματογραφία (GC):

---

επιτυγχάνει τον διαχωρισμό πολλών δεκάδων ενώσεων σε ένα μόνο χρωματογράφημα και με τη χρήση των ευαίσθητων ανιχνευτών NPD και ECD τον προσδιορισμό εξαιρετικά μικρών συγκεντρώσεων.

# Η υγρή χρωματογραφία (LC):

---

έχει ευρύτερο πεδίο σε σχέση με την αέρια, π.χ. για πολικές, μη πτητικές και μεγαλομοριακές ενώσεις.

Υστερούσε μέχρι πρόσφατα γιατί δε διαθέτετε ευαίσθητους ανιχνευτές.

# Η υγρή χρωματογραφία (LC):

---

Η χρήση της με ανιχνευτές UV, DAD, FLD περιορίζεται κυρίως σε ενώσεις:

- ✓ καρβαμιδικές
- ✓ βενδιμιδαζόλες
- ✓ βενζοϋλουρίες
- ✓ φαινυλουρίες



**Η ταυτοποίηση χωρίς τη χρήση φασματομετρίας μάζας (MS),**

---

**αλλά και η διάκριση μεταξύ τους συνεκλουόμενων ενώσεων:**

**απαιτεί 2<sup>ο</sup> χρωματογραφικό σύστημα, π.χ. χρήση 2<sup>ης</sup> στήλης με διαφορετική πολικότητα και/ ή χρήση διαφορετικού ανιχνευτή.**

# Η φασματομετρία μάζας (MS)

---

προσφέρει ταυτοποίηση των  
ευρημάτων με μία μόνο έγχυση με  
ιονισμό:

- ✓ πρόσκρουσης ηλεκτρονίων  
(Electron Impact, EI), ή
- ✓ χημικό (Chemical Ionization,  
CI).

# Τα πλεονεκτήματα της τεχνικής ιονισμού EI είναι:

---

- ✓ η χρησιμοποίηση σε μεγάλο αριθμό ενώσεων
- ✓ το πλούσιο φάσμα που προκύπτει
- ✓ η δυνατότητα χρήσης βιβλιοθηκών φασμάτων για την αναγνώριση αγνώστων ουσιών



# Η τεχνική ιονισμού CI

## χρησιμοποιείται:

---

σε ορισμένες περιπτώσεις που εμφανίζει αυξημένη ευαισθησία, π.χ. οι χλωριωμένες ενώσεις.

Το παραγόμενο φάσμα της όμως είναι φτωχό (περιέχει συνήθως μόνο το μητρικό ιόν).

# Με την παρακολούθηση επιλεγμένων ιόντων (SIM):

---

στο απλό τετράπολο βελτιώνεται σημαντικά η εξειδίκευση και η ευαισθησία.

Χρειάζονται 3 ιόντα με  $m/z > 100$ , στη σωστή αναλογία, για ταυτοποίηση.

Δεν παρέχονται όμως πληροφορίες για το φάσμα.

# Η φασματομετρία μάζας με αναλυτή παγίδας ιόντων (ion trap):

---

- ✓ επιτυγχάνει καλύτερη ευαισθησία σε πλήρη σάρωση (full scan), παρά με SIM.
- ✓ επιτρέπει την ανακατασκευή του χρωματογραφήματος ιόντων (ion extract) αυξάνοντας σημαντικά την εξειδίκευση.

# Η φασματομετρία μάζας με αναλυτή παγίδας ιόντων (ion trap):

---

- ✓ παρέχει επιπλέον τη δυνατότητα για δευτερογενή θραυσματοποίηση (MS/MS), που επίσης αυξάνει την εξειδίκευση.



# Με την τεχνική MS/MS τριπλού τετραπόλου, σε λειτουργία πολλαπλών μεταπτώσεων MRM

## Προσφέρει:

- ✓ μειωμένη επίδραση του υποστρώματος
- ✓ καλή ευαισθησία και
- ✓ αυξημένη εκλεκτικότητα

# MS/MS σε λειτουργία MRM

→ = επιλεγμένο  $m/z$

→⇨ = θραυσματοποίηση

•Q1	•Q2	•Q3
→	→⇨	→

Δύο μεταπτώσεις ανά ουσία είναι αρκετές για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση της.

# Κατά τη διάρκεια ενός χρωματογραφήματος:

---

μπορούν να καταγραφούν ταυτόχρονες μεταπτώσεις για πολλές ενώσεις.

Αυξάνεται έτσι εξαιρετικά η δυνατότητα ταυτοποίησης τους, αφορώντας όμως μόνο τις προκαθορισμένες ενώσεις.

# Με MS/MS, και με 2 μεταπτώσεις ιόντων ανά ουσία:

---

- ✓ επιτυγχάνονται όρια ποσοτικοποίησης της τάξεως ppt.
- ✓ Ως ~300 ενώσεις μπορούν να ταυτοποιηθούν και προσδιοριστούν σε ένα μόνο χρωματογράφημα.



# Με MS/MS, και με 2 μεταπτώσεις ιόντων ανά ουσία:

---

Αυτό επιτρέπει τη χρήση ενός μίγματος που περιέχει το σύνολο των αναλυτών της μεθόδου για:

- ✓ την επικύρωση της μεθόδου
- ✓ τον έλεγχο ποιότητας
- ✓ τον έλεγχο καταλληλότητας του οργάνου

# Η τεχνική MS/MS συνδυάζεται με LC και με GC, αλλά διαφέρουν:

---

✓ στον τρόπο εισαγωγής και στον εγχυόμενο όγκο του δείγματος\*

\* πλην GC που διαθέτει εγχυτή μεγάλου όγκου

✓ στη χρωματογραφία (θεωρητικές πλάκες) και συνεπώς στο εύρος κορυφής

✓ στον τρόπο ιονισμού (ESI vs EI) και συνεπώς στα παραγόμενα ιόντα

# Πρόσφατη ανακοίνωση (3<sup>ο</sup> συνέδριο μετρολογίας):

---

Οι 2 τεχνικές έχουν την ίδια εφαρμοσιμότητα.

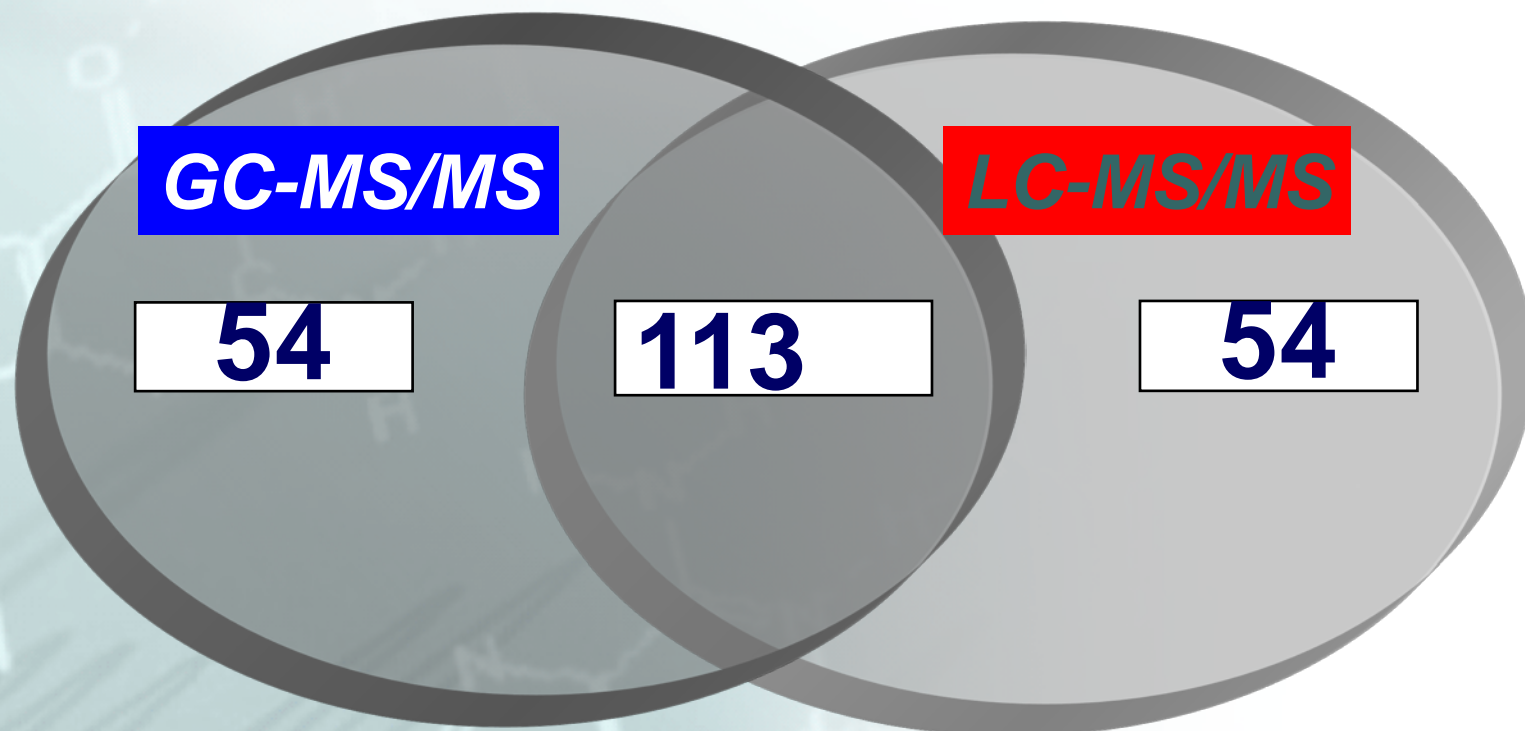
Η τεχνική **GC-MS/MS** έχει καλύτερη:

- ✓ ευαισθησία
- ✓ εκλεκτικότητα
- ✓ επαναληψιμότητα

Η τεχνική **LC-MS/MS** έχει καλύτερη γραμμικότητα.

# Εφαρμοσιμότητα των τεχνικών (αριθμός μεταξύ 221 ουσιών)

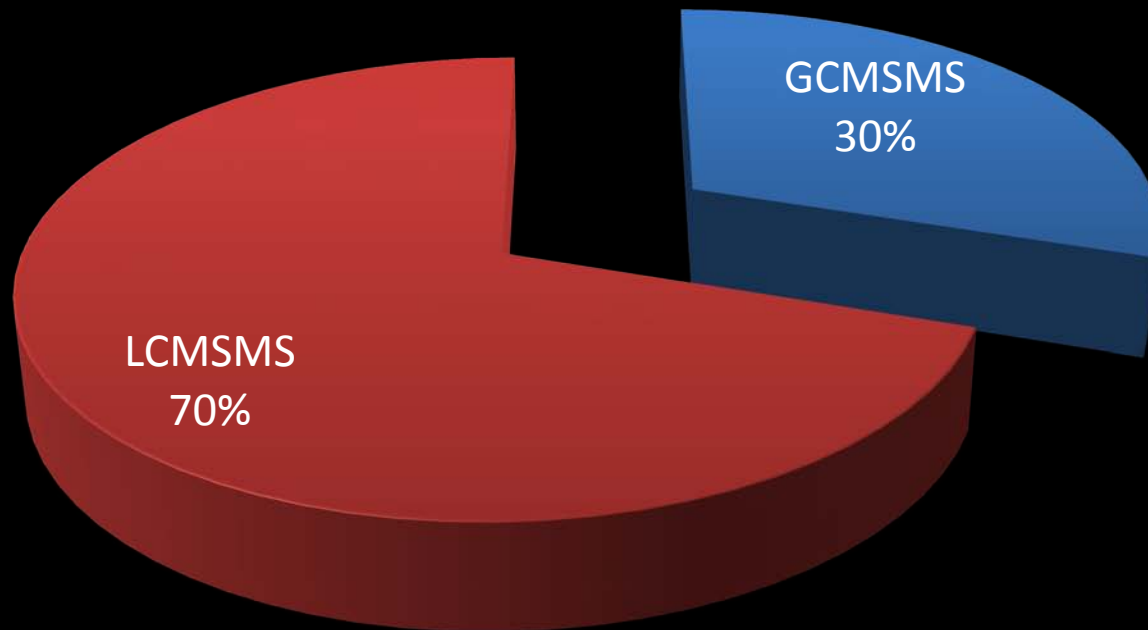
---



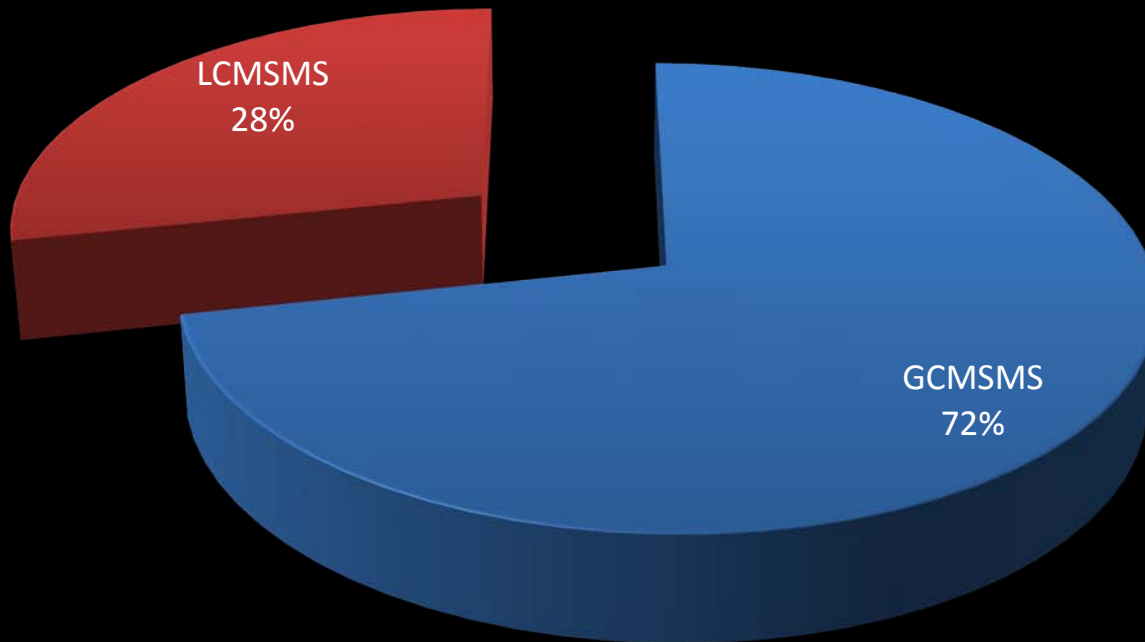


# Γραμμικότητα

---



# Ευαισθησία



# Η τεχνική LC-MS/MS τριπλού τετραπόλου

---

έφερε την LC στο προσκήνιο της ανάλυσης υπολειμμάτων χάρις στους διασυνδεδετές ESI και APCI, που επιτυγχάνουν ιονισμό σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης.

# Οι παράμετροι λειτουργίας της χρωματογραφίας LC:

Στήλη i.d. (mm)	Βέλτιστη ροή (mL/min)	Βέλτιστος $V_{\text{έγχυσης}}$ (μL)
4,6	1,25	30
3,0	0,50	10
2,1	0,25	5
1,0	0,05	1
0,1	0,0005	0,015



# Ο διασυνδετής ηλεκτροδιάχυσης (Electrospray Ionization, ESI):

---

- ✓ είναι κατάλληλος για μεγαλομοριακές και μικρομοριακές ενώσεις.
- ✓ ιονίζει πολικές και ιοντικές ενώσεις.
- ✓ παράγει με ήπιο ιονισμό τα μητρικά ιόντα  $M+1$  ή  $M-1$ .

# Ο διασυνδετής χημικού ιονισμού σε ατμοσφαιρική πίεση (APCI):

---

- ✓ παράγει επίσης με ήπιο ιονισμό τα μητρικά ιόντα  $M+1$  ή  $M-1$ .
- ✓ δρα συμπληρωματικά στον ιονισμό με ESI, αφού είναι κατάλληλος για ιονισμό ενώσεων μικρής ή μεσαίας πολικότητας.
- ✓ έχει λιγότερες εφαρμογές.

# Κριτήρια ταυτοποίησης για το χρόνο κατακράτησης:

---

Οι σχετικοί χρόνοι κατακράτησης μεταξύ προτύπου και δείγματος πρέπει να μη διαφέρουν περισσότερο από:

- ✓ 0,5% για GC
- ✓ 2,5% για LC

# Κριτήρια ταυτοποίησης για τα διαγνωστικά ιόντα:

Σχετική ένταση ιόντος (% της βασικής κορυφής)	EI-GC-MS (επιτρεπόμενη απόκλιση % )	GC-CI-MS, GC- MS-MS, LC-MS, LC-MS-MS (επιτρεπόμενη απόκλιση % )
>50%	+/- 10%	+/- 20%
>20% ως 50%	+/- 15%	+/- 25%
>10% ως 20%	+/- 20%	+/- 30%
<10%	+/- 50%	+/- 50%



# Με τον αναλυτή χρόνου πτήσης ιόντων (TOF/MS):

---

δεν περιορίζεται η αναζήτηση μόνο σε προεπιλεγμένες ουσίες-στόχους, αλλά επεκτείνεται και σε άγνωστες ενώσεις, μεταξύ των οποίων μπορεί να υπάρχουν μεταβολίτες ή προϊόντα διάσπασης της μητρικής ένωσης.

**Με υψηλή ταχύτητα  
λαμβάνονται φάσματα μάζας με:**

---

✓ **υψηλή διακριτική ικανότητα  
(resolution) και με**

✓ **μεγάλη ακρίβεια μάζας**

**Έτσι είναι δυνατή η διάκριση  
ιόντων που η διαφορά μάζας τους  
βρίσκεται στο 4 δεκαδικό ψηφίο.**

# Είναι δυνατή η ανακατασκευή (ion extract)

---

του χρωματογραφήματος σε πολύ μικρές περιοχές μαζών, που αυξάνει σημαντικά την εξειδίκευση.

Η τεχνική TOF/MS συνδυάζεται τόσο με GC όσο και με LC.

# Αναλύσεις νερών στη χώρα μας:

---

Στη διάρκεια 1997-1999 αναλύθηκαν **252** δείγματα νερών απ' όλη τη χώρα για:

- ✓ **118** φυτοφάρμακα
- ✓ **27** ανιχνεύθηκαν

Από αυτά που δεν προορίζονταν για πόσιμα:

- ✓ **51%** περιείχαν υπολείμματα



# Αναλύσεις νερών στη χώρα μας:

Από αυτά που προορίζονταν για πόσιμα:

✓ **7%** περιείχαν υπολείμματα, όλα εντός ορίων, δηλαδή  $< 0,1 \mu\text{g/L}$

		Δείγματα με ευρήματα
Λίμνες	15	32%
Ποτάμια	18	24%
Γεωτρήσεις	9	6%