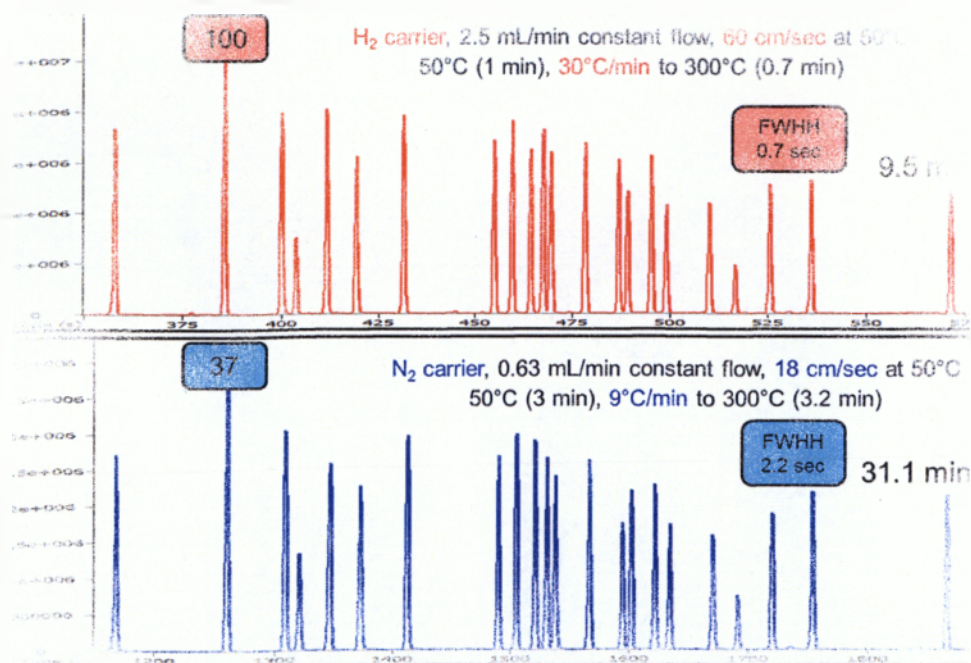




ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ
ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Χρωματογραφικές μέθοδοι για την ανίχνευση υπολειμμάτων
φυτοφαρμάκων σε τρόφιμα»



Μερίκας Ραφαήλ

ΚΑΛΑΜΑΤΑ, 2013

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Εισαγωγή	4
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ	
1.1.Χρωματογραφία	
1.1.1. Αρχές χρωματογραφίας.....	7
1.1.2. Στάδια ανάλυσης υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε τρόφιμα.....	8
1.2.Αέρια Χρωματογραφία	
1.2.1. Γενικά Χαρακτηριστικά.....	8
1.2.2. Οργανολογία.....	9
1.3. Αέρια Χρωματογραφία σε συνδυασμό με Φασματομετρία Μάζας.....	18
1.3.1. Συνηθέστεροι συνδυασμοί GC/MS.....	19
1.4. Υγρή Χρωματογραφία	
1.4.1. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC).....	19
1.4.2. Οργανολογία.....	21
1.4.3. Υγρή Χρωματογραφία Αντίστροφης Φάσης (RPLC).....	26
1.4.4. Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας.....	26
1.5 Υγρή Χρωματογραφία/Φασματομετρία Μάζας (LC/MS).....	28
1.5.1. Ιονισμός με Ηλεκτροδιάχυση (Electron Spray Ionisation).....	28
1.5.2. Χημικός Ιονισμός σε ατμοσφαιρική πίεση (APCI).....	29
1.5.3. Ιοντισμός με laser και υποβοήθηση υποστρώματος	30
1.5.4. Παγίδα Ιόντων (Ion Trap).....	30
1.5.5. Αναλυτής Χρόνου Πτήσης (Time of Flight)	31
1.6. Νέες τάσεις στην Υγρή Χρωματογραφία/ Δίδυμη Φασματομετρία Μαζών.....	33
1.6.1. Απλοποίηση σταδίου εκχύλισης.....	34
1.6.2. Ανάπτυξη των μεθόδων ταυτόχρονης ανίχνευσης πολλών υπό έλεγχο φυτοφαρμάκων	35
1.6.3. Αναγνώριση αγνώστων μη επιλεχθέντων φυτοφαρμάκων.....	37
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ	
2.1. Υγρή Χρωματογραφία Υπερ-Υψηλής Ανάλυσης/ Φασματομετρία μαζών.....	40
2.2.. GC/MS και LC/MS ως μέθοδοι ανάλυσης υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων.....	48
2.3. Μέθοδοι εκχύλισης.....	52
2.3.1. Γενικά.....	52

2.3.2. Εκχύλιση υγρό υγρό.....	55
2.3.3. Εκχύλιση υπερκρίσιμου υγρού.....	58
2.3.4. Εκχύλιση πεπιεσμένου υγρού.....	60
2.3.5. Εκχύλιση με βοήθεια μικροκυμάτων.....	60
2.4. QuEChERS.....	61
2.5. Μέθοδος διασποράς υποστρώματος σε στερά φάση.....	64
2.6. Εκχύλιση στερεάς φάσης.....	67
2.7. Μικροεκχύλιση στερεάς φάσης.....	72
2.8. Εκχύλιση ράβδου ανάδευσης.....	73
Συμπεράσματα.....	74
Ανακεφαλαίωση- Επίλογος.....	75
Βιβλιογραφία.....	81

Εισαγωγή

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, κάθε χρόνο σημειώνονται 1-1,5 εκατομμύριο δηλητηριάσεις λόγω της εκτεταμένης χρήσης φυτοφαρμάκων, από τις οποίες περίπου 20000 περιπτώσεις είναι θανατηφόρες. Μόνο στην Ελλάδα διακινούνται περίπου 1350 εμπορικά σκευάσματα φυτοφαρμάκων.

Τα φυτοφάρμακα εξυπηρετούν διαφορετικούς σκοπούς κατά τη χρήση τους (μυκητοκτόνα, εντομοκτόνα, ζιζανιοκτόνα κτλ), είτε κατά την καλλιέργεια ή/και κατά την αποθήκευση μετά την συγκομιδή, και η παρουσία τους απαντάται από νωρίς στις οργανωμένες κοινωνίες. Χαρακτηριστικά, ο Δημόκριτος πρότεινε τον ψεκάσμό των φυτών με κατσίγαρο (υγρά απόβλητα ελαίων), ενώ ο Κάτων, λίγους αιώνες αργότερα, συνιστούσε τους υποκαπνισμούς της αμπέλου με μίγμα ασφάλτου και θείου.

Το 1650 ο Remnant εισήγαγε την εμβάπτιση σπόρου σίτου σε NaCl και CuSO₄, ενώ από το 1885 άρχισε να χρησιμοποιείται ο βορδιγάλειος πολτός (θειικός χαλκός) για την καταπολέμηση του περονοσπόρου της αμπέλου. Το 1934 ανακαλύφθηκαν οι μυκητοκτόνες ιδιότητες των διθειοκαρβαμιδικών από τους Tisdale και Williams.

Τα φυτοφάρμακα που χρησιμοποιούνται στις μέρες μας τριχοτομούνται σε οργανοχλωριωμένα, οργανοφωσφορικά και καρβαμιδικά.

Οι **οργανοχλωριωμένες ενώσεις** δε χρησιμοποιούνται πλέον στις ανεπτυγμένες χώρες (ούτε στην Ελλάδα), ενώ στις αναπτυσσόμενες γίνεται ακόμη εκτεταμένη χρήση, παρά την υψηλή τοξικότητά τους και την σταθερότητα τους στο περιβάλλον. Πράγματι, τα οργανοχλωριωμένα φυτοφάρμακα (DDT, παράγωγα του Aldrin, HCH-γ κλπ) δεν βιοαποικοδομούνται ή βιοαποικοδομούνται βραδέως (χρόνος ημιζωής 96-116 έτη), συσσωρεύονται στους λιπαρούς ιστούς των οργανισμών, εμφανίζουν μικρή διαλυτότητα στο νερό, προσροφώνται στα αιωρούμενα σωματίδια και τα ιζήματα και αθροίζονται στην τροφική αλυσίδα.

Τα **οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα** (Chlorpyrifos-methyl, μαλαθείο κλπ) δρουν στο ένζυμο ακετυλοχολινεστεράση, το οποίο βρίσκεται στην περιοχή της μετασυναπτικής μεμβράνης που συμβάλλει στη μεταφορά του νευρικού ερεθίσματος μέσω του συναπτικού χάσματος. Μόλις η ακετυλοχολινεστεράση φτάσει στους υποδοχείς (μετασυναπτική μεμβράνη) απελευθερώνεται μία ελάχιστη ποσότητα ενός ενζύμου της ακετυλοχολινεστεράσης, η οποία υδρολύει την ακετυλοχολίνη. Τα οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα προκαλούν φωσφορλίωση της ακετυλοχολινεστεράσης παρεμποδίζοντας τη δράση της, με αποτέλεσμα να

συσσωρεύεται ο χημικός νευροδιαβιβαστής στο ένα άκρο του συναπτικού χάσματος και να παρεμποδίζεται η διαβίβαση του νευρικού ερεθίσματος. Η συγκεκριμένη κατηγορία φυτοφαρμάκων διαθέτει, επίσης, χαρακτηριστικά που την καθιστούν επιβλαβή για το περιβάλλον και τους ζώντες οργανισμούς, μπορούν, όμως, να επιλεχθούν για χρήση ενώσεις με μικρότερη τοξικότητα από άλλες.

Τα **καρβαμιδικά** αποτελούν την νεότερη κατηγορία φυτοφαρμάκων με μυκητοκτόνες και εντομοκτόνες ιδιότητες. Τα καρβαμιδικά χωρίζονται στις εξής υποκατηγορίες: α) αρυλ-N-διμεθυλοκαρβαμιδικούς εστέρες των φαινόλων β) N-μεθυλο και N-διμέθυλο καρβαμιδικούς εστέρες των ετεροκυκλικών φαινόλων και γ) αλδεϋδικά παράγωγα και οι θειόλες τους.

Υδρολύονται αργά σε ουδέτερο και ελαφρώς όξινο υδάτινο περιβάλλον, ενώ στο αλκαλικό περιβάλλον υδρολύονται ταχύτατα. Κατά συνέπεια, ο χρόνος ημιζωής των καρβαμιδικών σε υδάτινο περιβάλλον με pH=7 είναι περίπου 10 ημέρες, και με pH=11 μόνο μερικά λεπτά.

Η τοξικότητα των φυτοφαρμάκων, η αλλοίωση που προκαλούν στο περιβάλλον, καθώς και οι -άμεσες ή μακροχρόνιες- επιπτώσεις στην υγεία των ανθρώπων καθιστούν επιτακτική την ανάγκη ανίχνευσης των υπολειμμάτων των φυτοφαρμάκων. Ειδικά στα τρόφιμα, ο συνεχής έλεγχος της τήρησης των κατώτερων ορίων περιεκτικότητας φυτοφαρμάκων είναι απαραίτητος για την προστασία του καταναλωτή, αναλογιζόμενοι μάλιστα τον όγκο εισαγωγής γεωργικών προϊόντων από αναπτυσσόμενες χώρες, όπου χρησιμοποιούνται ακόμη οργανοχλωριωμένα φυτοφάρμακα και ο έλεγχος της περιεκτικότητας φυτοφαρμάκων στα τρόφιμα είναι μηδαμινός, εντός της Ευρωπαϊκής Ένωσης.

Για τους προαναφερθέντες λόγους, η Ευρωπαϊκή Ένωση^[1] δημοσιεύει κανονισμούς που αποσκοπούν στη δημιουργία ενός πολυετούς προγράμματος ελέγχου των ανωτάτων ορίων υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων στα τρόφιμα για την προστασία των καταναλωτών και, ειδικότερα, των πιο ευπαθών ομάδων πχ βρέφη. Ο πιο πρόσφατος κανονισμός που εξεδόθη (788/12) και ισχύει μέχρι το 2015 προβλέπει τον ανά τριετία έλεγχο των 30-40 τροφίμων που αποτελούν τα κύρια συστατικά του διαιτολογίου των ευρωπαϊκών χωρών λόγω των αλλαγών στη χρήση των φυτοφαρμάκων. Επιπλέον, απαριθμεί, αφενός, τους συνδυασμούς φυτοφαρμάκων/προϊόντων προς παρακολούθηση μέσα/πάνω σε προϊόντα φυτικής προέλευσης, πχ Etherphon στα μήλα το 2013, Nytenpygam στα ροδάκινα το 2013, το 2014 στ' αγγούρια, το 2015 στις γλυκές πιπεριές, αφετέρου, τους συνδυασμούς

φυτοφαρμάκων/τροφίμων σε προϊόντα ζωικής προέλευσης, πχ Etofenprox στο γάλα το 2013 και στο βούτυρο το 2015. Ως ανώτατο όριο υπολείμματος (MRL- maximum residue limit) για την ελαχιστοποίηση της έκθεσης σε φυτοφάρμακα μέσω της διατροφής έχει οριστεί το 0.01 mg kg^{-1} ανά ουσία.

Η επίτευξη ενός αξιόπιστου ελέγχου στα τρόφιμα απαιτεί τη χρήση προχωρημένων μεθόδων και εξελιγμένων τεχνικών, ικανών να συνδυάσουν την ταχύτητα των διαδικασιών με την ακρίβεια των αποτελεσμάτων και το χαμηλό κόστος των οργάνων που χρησιμοποιούνται στα εργαστήρια.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να παραθέσει τις βασικές/κλασικές χρωματογραφικές μεθόδους που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων στα τρόφιμα, τόσο μεμονωμένα όσο και συγκριτικά. Επίσης, αποσκοπεί στην διερεύνηση των νέων τεχνικών που εφαρμόζονται στη χρωματογραφική ανάλυση, καθώς και τις νεότερες τάσεις που ακολουθούνται από τα εργαστήρια.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

1.1 Χρωματογραφία

1.1.1 Αρχές Χρωματογραφίας

Χρωματογραφία καλείται ένα σύνολο μεθόδων διαχωρισμού και καθαρισμού διαφόρων ενώσεων. Ο όρος δόθηκε από τον Ρώσο βοτανολόγο M. Tswett^[2], ο οποίος ήταν ο πρώτος που περιέγραψε το διαχωρισμό φυτικών χρωστικών σε στήλη ανθρακικού ασβεστίου. Κατά τη διέλευση του διαλύτη μέσα από το πληρωτικό υλικό, οι διάφορες χρωστικές διαχωριζόμενες εμφανίστηκαν ως χρωματικές ταινίες. Αποτελεί την προτιμότερη μέθοδο διαχωρισμού πολύπλοκων μειγμάτων, δεδομένης της ανάγκης αύξησης της παραγωγικότητας των εργαστηρίων και μείωσης του κόστους ανίχνευσης.

Η χρωματογραφία βασίζεται στην κατανομή των προς διαχωρισμό ουσιών εντός δύο φάσεων: η μία διατηρείται ακίνητη (στατική φάση), ενώ η δεύτερη βρίσκεται υπό συνεχή ροή (κινητή φάση)^[3]. Το προς διαχωρισμό μίγμα εισάγεται με τη βοήθεια της κινητής φάσης στη στατική φάση. Οι δύο φάσεις επιλέγονται έτσι ώστε τα συστατικά του δείγματος να κατανέμονται μεταξύ της κινητής και της στατικής φάσης σε διαφορετικό βαθμό.

Τα συστατικά τα οποία κατακρατούνται ισχυρότερα από τη στατική φάση κινούνται αργά κατά ροή της κινητής φάσης. Αντίθετα, τα συστατικά τα οποία κατακρατούνται ασθενέστερα από τη στατική φάση, κινούνται ταχύτερα. Ως αποτέλεσμα αυτών των διαφορών στην ευκινησία, τα συστατικά διαχωρίζονται.

Οι διάφορες χρωματικές μέθοδοι διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τη φύση της κινητής φάσης (υγρή ή αέρια) ή της στατικής (στερεό ή υγρό πάνω σε στερεό υπόστρωμα), ως προς το μηχανισμό στον οποίο οφείλεται ο διαχωρισμός (προσρόφηση, ιοντοανταλλαγή, κατανομή) και ως προς το μέσο στο οποίο έχει τοποθετηθεί η στατική φάση (στήλη, λεπτή στοιβάδα πάνω σε γυάλινη πλάκα, χαρτί). Η κατάσταση της κινητής φάσης καθορίζει αν πρόκειται για μέθοδο αέριας χρωματογραφίας (βλ. 1.2) ή υγρής χρωματογραφίας (βλ. 1.4).

1.1.2. Στάδια ανάλυσης υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε τρόφιμα^[2]

- i) Δειγματοληψία και αποθήκευση
- ii) Προετοιμασία δείγματος
- iii) Εκχύλιση του δείγματος
- iv) Καθαρισμός του εκχυλίσματος
- v) Συμπύκνωση του εκχυλίσματος
- vi) Χρωματογραφική ανάλυση (ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός)
- vii) Ποσοστά ανάκτησης της ουσίας για αξιολόγηση της μεθόδου εκχύλισης

1.2 Αέρια Χρωματογραφία

1.2.1. Γενικά Χαρακτηριστικά

Η Αέρια Χρωματογραφία (Gas Chromatography- GC) αποτελεί την πιο δημοφιλή μέθοδο διαχωρισμού λόγω των χαρακτηριστικών που τη διακρίνουν, όπως η υψηλή επιλεκτικότητα, η ακρίβεια και η επαναληψιμότητα. Η τεχνική της αναπτύχθηκε το 1952 από τους Martin και James^[2], ενώ ο πρώτος αεριοχρωματογράφος διατέθηκε στο εμπόριο το 1959. Εφαρμόζεται κυρίως σε αναλυτική κλίμακα, δηλαδή σε ποσότητες δειγμάτων μικρότερες από 10^{-6} g, και οι ενώσεις πρέπει να είναι ή να καθίστανται πτητικές.

Χρησιμοποιείται τόσο για ποσοτική (προσδιορισμός ποσότητας), όσο και για ποιοτική ανάλυση (προσδιορισμός ταυτότητας). Η βάση της εφαρμογής της αέριας^[4] χρωματογραφίας είναι η κατανομή των συστατικών ενός πτητικού δείγματος ανάμεσα σ' ένα μη πτητικό διαλύτη (στατική φάση) και ένα αέριο (κινητή φάση/ φέρον αέριο). Η στατική φάση μπορεί να είναι στέρεα (GSC) ή υγρή (GLC). Στην GSC, ο διαχωρισμός οφείλεται στην προσρόφηση ή το μοριακό αποκλεισμό των συστατικών του μίγματος στη στατική φάση. Στην GLC/ GC, ο διαχωρισμός των συστατικών (αέριων ή πτητικών) βασίζεται στην κατανομή τους μεταξύ ενός μη πτητικού (στατική φάση) που είναι καθηλωμένο στο στέρεο φορέα ή τα τοιχώματα των ανοικτών τριχοειδών στηλών και ενός αερίου (κινητή φάση/φέρον αέριο).

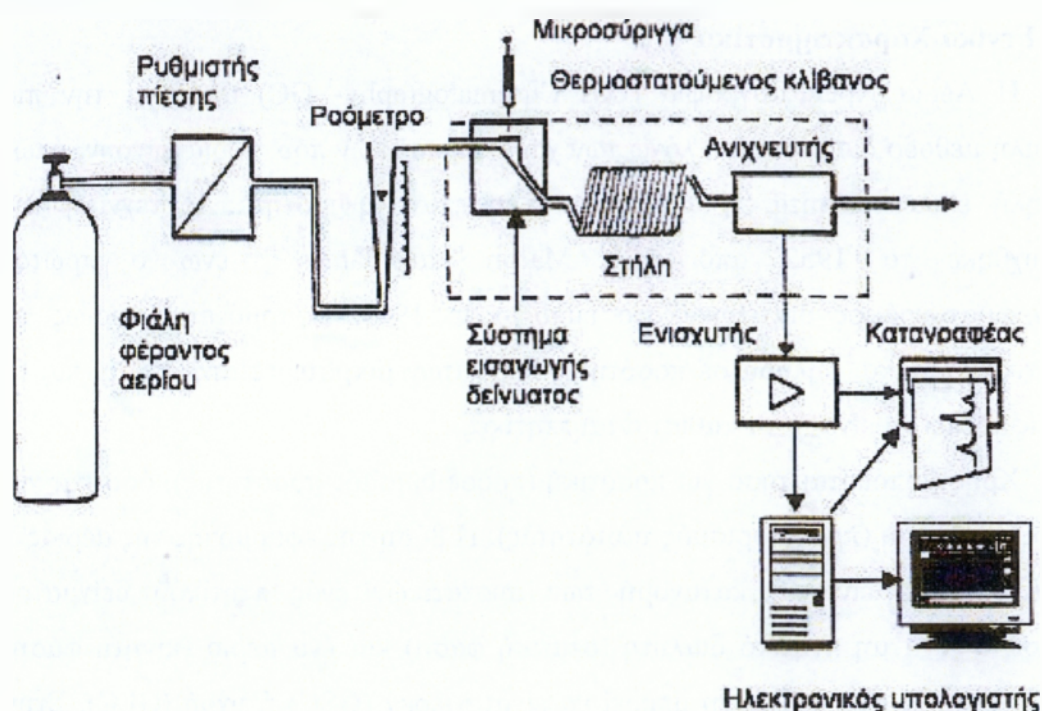
Στα πλεονεκτήματα της αέριας χρωματογραφίας περιλαμβάνονται:

- Αρκεί το δείγμα να έχει μικρό μέγεθος και δεν απαιτείται εκτεταμένη προεργασία

- Είναι αποτελεσματική στο διαχωρισμό πολύπλοκων μιγμάτων στα συστατικά τους ($N \sim 1,3 \times 10^6$)
- Γρήγορα αποτελέσματα
- Υψηλή ακρίβεια (1-5% RSD)
- Κατάλληλη ευαισθησία για τον προσδιορισμό πτητικών οργανικών ενώσεων σε χαμηλές συγκεντρώσεις
- Απλή οργανολογία

1.2.2 Οργανολογία

Ένα τυπικό σύστημα αέρια χρωματογραφίας^[5] αποτελείται από τα ακόλουθα μέρη:



Σχήμα 1. Σχηματική αναπαράσταση ενός τυπικού συστήματος αέριας χρωματογραφίας

Φέρον αέριο

Το φέρον αέριο βρίσκεται σε υψηλή πίεση από 100 έως 200 ατμόσφαιρες σε οβίδες από ανοξείδωτο υλικό. Από τη φιάλη υψηλής πίεσης, οδηγείται μέσα από ρυθμιστές παροχής στη στήλη. Αφού εισαχθεί το δείγμα, το φέρον αέριο συμπαράσφύρει τα συστατικά του κατά μήκος της στήλης, ώσπου αυτά διαχωρίζονται.

Είναι χημικά αδρανές και υπερκαθαρό. Συνήθως ως φέροντα αέρια χρησιμοποιούνται τα εξής: ήλιο, άζωτο, υδρογόνο, αργό. Η επιλογή του φέροντος αερίου εξαρτάται από τα συστατικά του προς εξέταση μίγματος. Δε θα πρέπει, παρολαυτά, να χρησιμοποιηθεί αέριο που περιέχει οξυγόνο, γιατί θα οξειδώσει τη στατική φάση και, κατά συνέπεια, θα καταστρέψει τη στήλη.

Ρυθμιστής πίεσης- Ροόμετρο

Το φέρον αέριο διαβιβάζεται από τις οβίδες στο ρυθμιστή πίεσης, ο οποίος με σύστημα βαλβίδων και ενδιάμεσων θαλάμων μειώνει δραστικά την πίεση. Στη συνέχεια, το φέρον αέριο διέρχεται μέσα από ένα ροόμετρο, το οποίο μετρά με ακρίβεια την ταχύτητά του. Η ακριβής μέτρηση της ταχύτητας αποτελεί *conditio sine qua non* για την ταυτοποίηση των ενώσεων, αφού οι χρόνοι κατακράτησης εξαρτώνται από την ταχύτητα.

Θερμοστατούμενο σύστημα εισαγωγής δείγματος

Το δείγμα εισάγεται στο ρεύμα του φέροντος αερίου με μία μικροσύριγγα, διαμέσου ενός ελαστικού διαφράγματος (*septum*) ή βαλβίδας (*sampling valve*). Ο θάλαμος του δείγματος είναι ήδη προθερμασμένος σε υψηλή θερμοκρασία (περίπου 50 °C), ώστε να εξαερωθούν τα υγρά δείγματα, και να μεταφερθεί το προς εξέταση δείγμα στη στήλη σχεδόν ακαριαία. Υφίστανται δύο τρόποι εισαγωγής του δείγματος:

i) Χωρίς διαμοιρασμό (splitless injection)

Σε αυτήν τη μέθοδο ο εγχυτής αποτελείται από ένα θερμαινόμενο θάλαμο που περιέχει στο εσωτερικό του έναν υάλινο σωλήνα εντός του οποίου εγχύεται το δείγμα μέσω ενός διαφράγματος. Συνήθως ο χώρος εισαγωγής του δείγματος θερμαίνεται σε θερμοκρασία ελαφρώς υψηλότερη από την τελική θερμοκρασία έκλουσης του χρωματογράφου.

Εν τέλει, το φέρον αέριο εξέρχεται έχοντας διαχωριστεί σ' ένα μίγμα που το περιέχει, στο διαλύτη και τις διαλυμένες ουσίες.

ii) Προγραμματιζόμενη Θερμοκρασία Εξαέρωσης (PTV injection)

Στην περίπτωση αυτή, χρησιμοποιείται μικρότερος σε μέγεθος εγχυτής. Ο σωλήνας εξαέρωσης περιέχει χαλαζιοβάμβακα, ο οποίος κατακρατεί τα σταγονίδια νερού. Η αρχική θερμοκρασία έκχυσης είναι κατά 10 °C μικρότερη από το σημείο

ζέσης του διαλύτη. Μετά την έξοδο της σύριγγας, η θερμοκρασία αυξάνεται στους 300 °C.

Κλίβανος ισόθερμης ή κυμαινόμενης θερμοκρασίας

Είναι ο χώρος όπου βρίσκεται η στήλη. Η θερμοκρασία διατηρείται σταθερή ή δύναται να μεταβάλλεται με βάση κάποιο καθορισμένο πρόγραμμα, ώστε να εμφανιστούν οι διακριτές κορυφές για τις ενώσεις, των οποίων τα σημεία ζέσεως βρίσκονται σε ευρεία περιοχή θερμοκρασιών.

Στήλη (Column)

Η στήλη αποτελεί ένα από τα βασικότερα εξαρτήματα της χρωματογραφίας, αφού περιέχει τη στατική φάση όπου λαμβάνει χώρα ο διαχωρισμός των συστατικών του δείγματος. Η ποιότητα της χρωματογραφικής στήλης εξαρτάται από τα εξής χαρακτηριστικά:

- Διαχωριστικότητα
- Αριθμός θεωρητικών πλακών
- Απαιτούμενος χρόνος για την ανάλυση
- Διαφυγή υποβάθρου-σταθερότητα στήλης
- Πολικότητα στατικής φάσης
- Γεωμετρικά χαρακτηριστικά στήλης (εσωτερική διάμετρος, μήκος, πάχος στιβάδας στατικής φάσης)

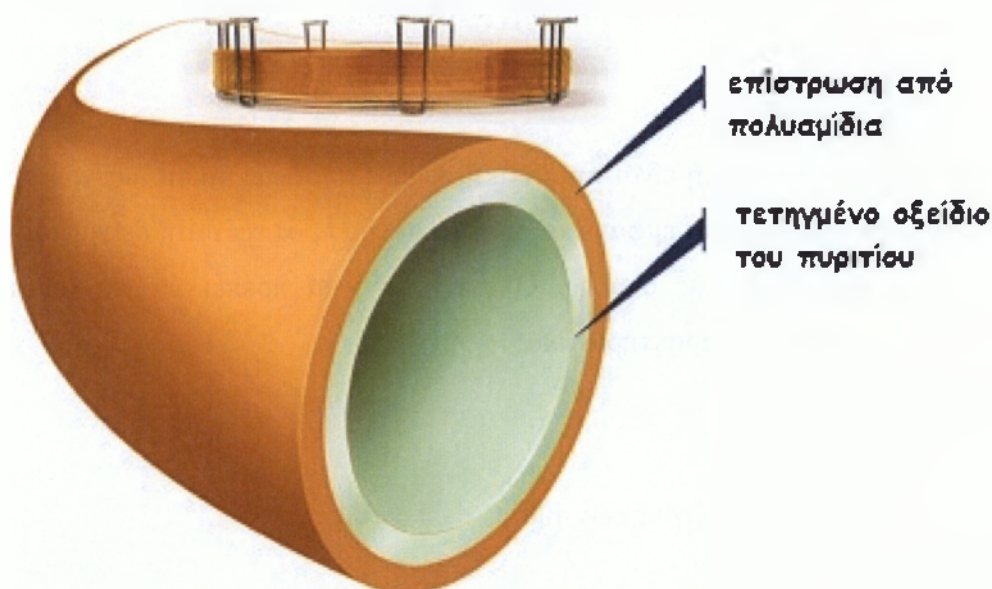
Μία στήλη αποτελείται από το υλικό σωλήνα (tubing material) και τη στατική φάση (στέρεο υπόστρωμα, υγρή φάση, πορώδη πολυμερή ή προσροφητικά υλικά). Οι στήλες διχοτομούνται σε πακεταρισμένες και τριχοειδείς.

Οι **τριχοειδείς στήλες** χαίρουν σήμερα ευρείας εφαρμογής. Έχουν διάμετρο 0,1mm με 0,6mm και το μήκος τους κυμαίνεται από 15 έως 50 μέτρα. Συνήθως έχουν τη μορφή σπείρας, ώστε να μην καταλαμβάνουν πολύ χώρο. Είναι κατασκευασμένες από ύαλο, μέταλλο ή οργανικά πολυμερή και σπανίως από στέρεο υπόστρωμα. Η χωρητικότητά τους είναι μικρή, αλλά δίνουν τη δυνατότητα χρησιμοποίησης εξαιρετικά μικρών δειγμάτων (1μg). Επιπλέον, χαρακτηρίζονται από υψηλή διαχωριστικότητα που οφείλεται στον πολύ μεγάλο αριθμό θεωρητικών πλακών (έως 10^6). Ο σωλήνας παραμένει ανοικτός με αποτέλεσμα να υπάρχει μικρή πτώση πίεσης και να μην εμποδίζεται η κατασκευή μεγάλου μήκους στηλών. Οι κορυφές που

δημιουργούνται είναι οξύληκτες και όχι πεπλατυσμένες, χάρη στην αύξηση της θερμοκρασίας της στήλης, η οποία προκαλεί μείωση του χρόνου κατακράτησης (βλ. παρακάτω) της ουσίας (t_r).

Οι τριχοειδείς στήλες^[4], με κριτήριο τον τρόπο τοποθέτησης της στατικής φάσης διακρίνονται σε:

- ❖ WCOT (wall coated open tubular column) η υγρή στατική φάση προσδένεται απευθείας στο εσωτερικό τοίχωμα της στήλης.
- ❖ SCOT (support coated open tubular column) η υγρή στατική φάση προσδένεται σε στερεό υπόστρωμα, το οποίο καλύπτει το εσωτερικό τοίχωμα της στήλης
- ❖ PLOT (porous layer open tubular column) τα σωματίδια της στερεάς στατικής φάσης προσδένονται απευθείας στο εσωτερικό τοίχωμα της στήλης.



Σχήμα 2. Τριχοειδής στήλη τετηγμένου οξειδίου του πυριτίου, με προστατευτική επίστρωση από πολυαμίδια. Ένας δημοφιλής τύπος WCOT χρωματογραφικής στήλης.

Είναι σημαντικό να μην παραλειφθεί, έστω συνοπτικά, η παράθεση του ορισμού του χρόνου κατακράτησης (ανάσχεσης) και του νεκρού χρόνου.

Νεκρός χρόνος (t_m) είναι ο χρόνος παραμονής των μορίων του δείγματος στην κινητή φάση και είναι ίδιος για όλα τα συστατικά του δείγματος. Ισούται με το

χρόνο που απαιτείται για ένα μη κατακρατούμενο από τη στατική φάση συστατικό να διέλθει τη στήλη.

Ο χρόνος ανάσχεσης (t_r) είναι ο χρόνος μεταξύ της εισαγωγής του δείγματος και της έκλουσης του συστατικού από τη στήλη. Ο χρόνος ανάσχεσης είναι πάντα μεγαλύτερος από το νεκρό χρόνο κατά χρόνο ο οποίος ονομάζεται ανηγμένος χρόνος ανάσχεσης και ισούται με τη διαφορά του χρόνου ανάσχεσης και του νεκρού χρόνου.

Οι **πακεταρισμένες στήλες** περιέχουν στέρεο υπόστρωμα (χημικά αδρανές), συνήθως από γη διατομών ή κονιοποιημένο πυρίμαχο υλικό ή πορώδη οργανικά πολυμερή διαποτισμένα με κατάλληλο υγρό. Η εσωτερική τους διάμετρος κυμαίνεται από 1 έως 4mm και το μήκος τους από 1 έως 4 m. Χρησιμοποιούνται κυρίως στην ανάλυση αερίων και, κατά τη χρήση τους, παρατηρείται διεύρυνση του πλάτους των κορυφών λόγω της διάχυσης κατά ζώνη.

Ανιχνευτής (Detector)

Η επιλογή του ανιχνευτή είναι σημαντική, καθώς αποτελεί το τμήμα του αέριου χρωματογράφου που καθιστά εμφανή τα συστατικά του προς εξέταση δείγματος στην έξοδο της χρωματογραφικής στήλης. Ο ανιχνευτής θα πρέπει να συγκεντρώνει κάποια από τα παρακάτω χαρακτηριστικά:

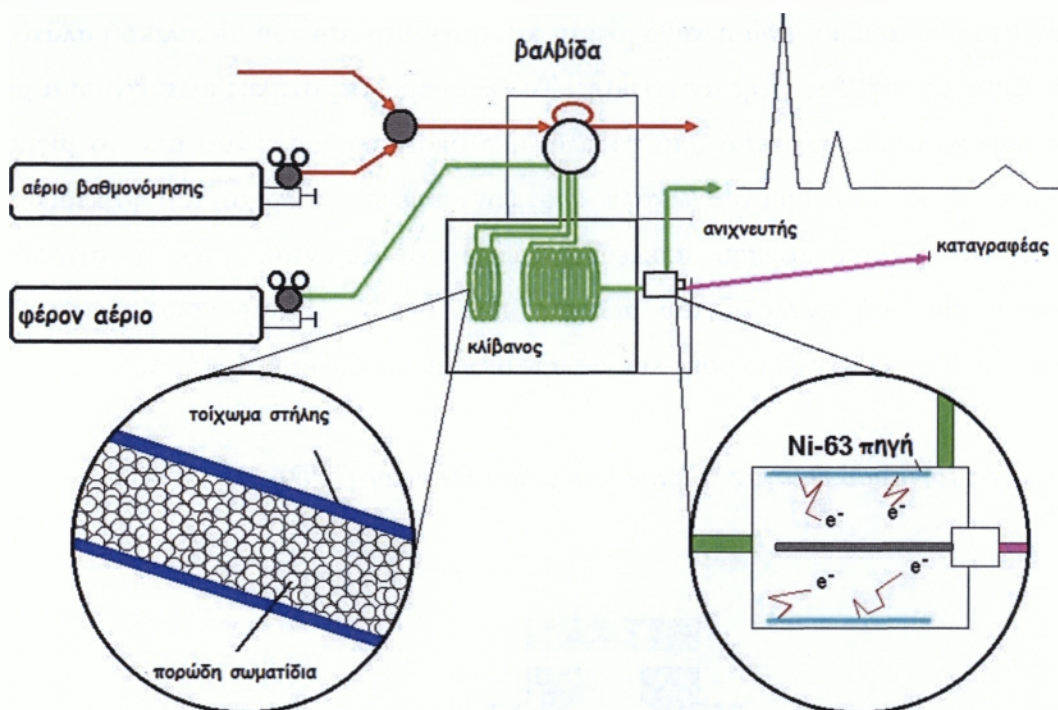
- Ευαισθησία
- Εκλεκτικότητα
- Θερμοκρασία λειτουργίας έως 400° C
- Αξιοπιστία
- Ευχρηστία
- Σταθερότητα και αναπαραγωγιμότητα
- Γραμμικά απόκριση στους αναλυτές, η οποία πρέπει να καλύπτει ευρεία περιοχή συγκεντρώσεων.
- Μικρός χρόνος απόκρισης

Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι ανιχνευτές είναι οι εξής:

Ανιχνευτής δέσμευσης ηλεκτρονίων- Electron Capture Detector (ECD)

Ο ανιχνευτής δέσμευσης ηλεκτρονίων χρησιμοποιείται για την ανίχνευση ενώσεων που στο μόριό τους έχουν N ή O. Είναι ιδιαίτερα εκλεκτικός σε ενώσεις που

περιέχουν αλογόνο-ομάδες (10^{-15} g/s για DDT, PCB κ.α.). Παρουσιάζει, όμως, μικρή ευαισθησία σε αμίνες, αλκοόλες και υδρογονάνθρακες. Τα εκχυλίσματα που θα χρησιμοποιηθούν πρέπει να είναι καθαρά, γιατί ο ανιχνευτής είναι ιδιαίτερα ευαίσθητος.



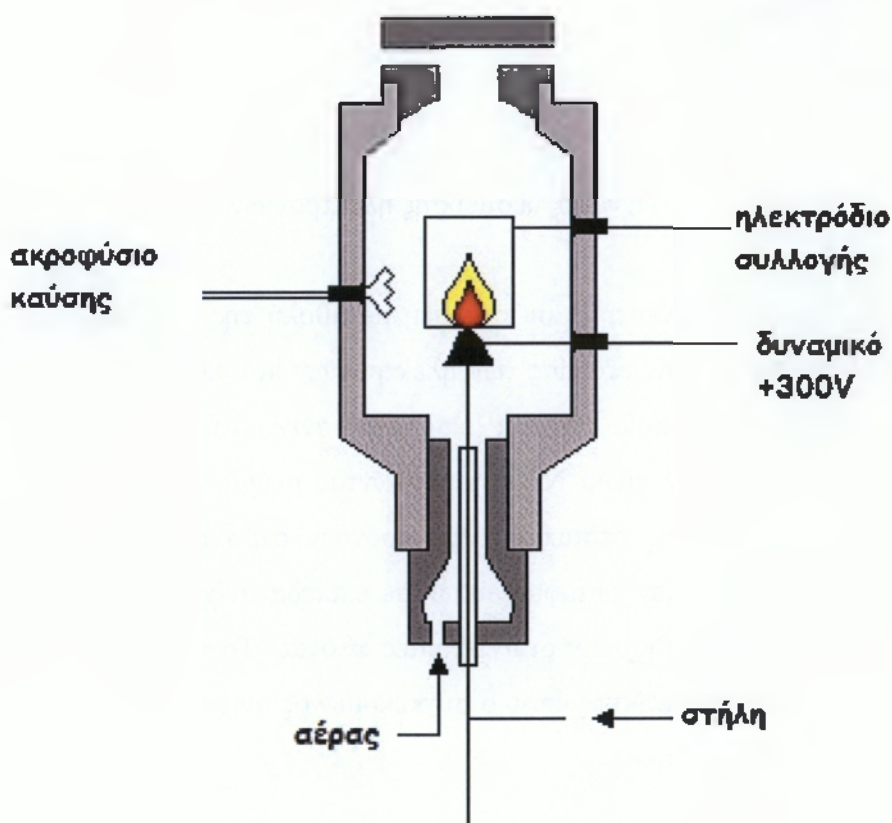
Σχήμα 3. Τα κύρια μέρη ενός ανιχνευτή δέσμευσης ηλεκτρονίων.

Η λειτουργία του ανιχνευτή βασίζεται στη μεταβολή της αγωγιμότητας του αερίου που διέρχεται απ' αυτόν, εξαιτίας των ηλεκτρονίων που παράγονται από μια ραδιενεργή πηγή (Ni-63), η οποία υπάρχει μέσα στον ανιχνευτή. Τα εκπεμπόμενα ηλεκτρόνια ιονίζουν το φέρον αέριο N₂ δημιουργώντας ρεύμα. Από το 1960 που εισήχθη η μέθοδος ανίχνευσης δέσμευσης ηλεκτρονίων επιτράπη η ταυτόχρονη ανάλυση ποικίλων χλωριωμένων φυτοφαρμάκων σε επίπεδα ανίχνευσης 100 φορές μικρότερα από αυτά που επιτύγχαναν οι ανιχνευτές φλόγας. Το πρόβλημα, βέβαια, λύθηκε μερικώς, μόνο για τις ενώσεις όπου ο συγκεκριμένος ανιχνευτής παρουσιάζει ευαισθησία, όπως προαναφέρθηκε.

Ανιχνευτής Αζώτου-Φωσφόρου (N-PD)

Χρησιμοποιείται για τις ενώσεις που στο μόριό τους περιέχουν άζωτο ή/και φώσφορο. Αναφέρεται συχνά και ως θερμοϊονικός ανιχνευτής. Τα βασικά του σημεία είναι ένα ακροφύσιο φλόγας, μία πηγή άλατος αλκάλεως και ένα θερμαινόμενο ηλεκτρόδιο συλλογής. Η χρήση των αλκάλεων κάλιο, ρουβίδιο, καίσιο και νάτριο δημιουργεί τάση περίπου 300V στο συλλεκτικό ηλεκτρόδιο. Η ευαισθησία αυξάνεται με τον ατομικό αριθμό, ενώ η καθαρότητα και συγκέντρωση του αλκαλικού άλατος επηρεάζουν την απόδοση της ανίχνευσης. Το έκλουσμα της στήλης αναμιγνύεται με αέριο υδρογόνο και διέρχεται από τη φλόγα, η οποία δημιουργείται από το μίγμα υδρογόνου-αέρα. Τα άτομα του αλκάλεως ιονίζονται με την επίδραση του ηλεκτρικού πεδίου. Τα ηλεκτρόνια που απελευθερώνονται συλλέγονται, ενώ ταυτόχρονα παράγουν μία ροή ανάλογη του αριθμού των ιόντων. Η παρουσία αζώτου ή φωσφόρου αυξάνει το ρυθμό ροής και, ως αποτέλεσμα, αυξάνεται το σήμα.

Ανιχνευτής Ιονισμού Φλόγας- Flame Ionization Detector (FID)



Σχήμα 4. Βασικά μέρη ενός ανιχνευτή ιονισμού φλόγας.

Ο ανιχνευτής ιονισμού φλόγας είναι εξειδικευμένος για την ανίχνευση ενώσεων υδρογονανθράκων και των παραγώγων τους. Οι περισσότερες οργανικές ενώσεις πυρολύονται σε φλόγα H₂-αέρα παράγοντας ιόντα και ηλεκτρόνια. Μεταξύ του ακροφυσίου καύσης και του ηλεκτροδίου συλλογής εφαρμόζεται δυναμικό μερικών εκατοντάδων volts. Το προκύπτον ρεύμα είναι ανάλογο του αριθμού ατόμων άνθρακα στη φλόγα. Ο συγκεκριμένος ανιχνευτής χρησιμοποιείται ευρέως, αλλά, λόγω της εξειδίκευσης του, δεν παρουσιάζει ευαισθησία σε κάποιες ομάδες (πχ αλογόνο-ομάδες) και στα αδρανή αέρια H₂O, CO₂, SO₂, NO_x.

Φασματομετρικός Ανιχνευτής Μάζας-Mass Spectrometric Detector

Ο Φασματομετρικός Ανιχνευτής Μάζας^[6] χαρακτηρίζεται από μεγάλη εκλεκτικότητα και χρησιμοποιείται ευρέως είτε με αέρια ή με υγρή χρωματογραφία. Αρκετοί κατασκευαστές οργάνων προσφέρουν αεριοχρωματογράφους, που μπορούν να συζευχθούν άμεσα με φασματόμετρα μαζών (MS) ταχείας σάρωσης.

Η μοναδικότητα του MSD έγκειται στο γεγονός ότι χρησιμοποιεί δική του οργανολογία και δική του μέθοδο ως αρχή. Η αρχή λειτουργίας της φασματομετρίας μαζών στηρίζεται στη δημιουργία ιόντων (κυρίως θετικών) μιας ένωσης, το διαχωρισμό τους με βάση το λόγο της μάζας προς φορτίο (m/z) και την καταγραφή τους. Με αυτόν τον τρόπο είναι δυνατό να προσδιοριστεί το μοριακό βάρος (MB) της ένωσης και ο τρόπος σύνδεσης των διαφόρων ομάδων μεταξύ τους. Οι κυριότερες φασματοσκοπικές τεχνικές ανάλυσης είναι οι εξής: UV/VIS, IR, Raman, NMR.

Τα κύρια τμήματα ενός φασματόμετρου είναι τα εξής^[7]:

A) σύστημα εισαγωγής δείγματος

B) Χρωματογραφικό σύστημα

Γ) πηγή ιόντων (gc) ή διασύνδεση (lc)

Δ) αναλυτής μαζών

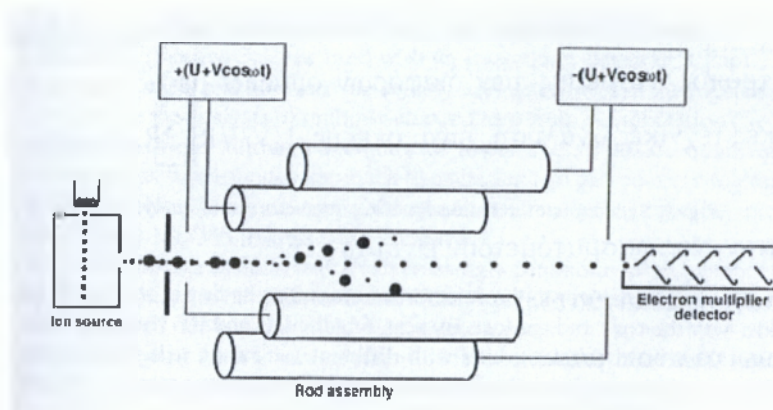
E) ανιχνευτής

Στ) επεξεργαστής σήματος και σύστημα καταγραφής και ανάγνωσης των πληροφοριών.

Εισάγεται μικρό ποσοστό δείγματος, όπου τα συστατικά του μετατρέπονται σε ιόντα σε αέρια κατάσταση. Τα υπάρχοντα μόρια βρίσκονται αρχικά στη θεμελιώδη ενεργειακή στάθμη και όταν προσπέσει επάνω τους ποσότητα ενέργειας

συγκεκριμένης συχνότητας, τα μόρια την απορροφούν και μεταβαίνουν σε υψηλότερες ενεργειακές στάθμες. Σε κάθε περίπτωση, τα μόρια επανέρχονται τελικά στη θεμελιώδη κατάσταση και η διαδικασία μπορεί να επαναληφθεί. Ο χώρος όπου δημιουργούνται και επιταχύνονται τα ιόντα διατηρείται σε κατάσταση υψηλού κενού. Με το υψηλό κενό δημιουργούνται σε χαμηλές θερμοκρασίες θέρμανσης ατμοί της προς προσδιορισμό ουσίας χωρίς τη διάσπασή της, που οδηγούνται στο θάλαμο ιοντισμού. Επίσης, απομακρύνονται τα μόριά της και τα ουδέτερα προϊόντα της διάσπασης από το χώρο της ανάλυσης μετά από κάθε μέτρηση.

Ο αναλυτής μαζών διαχωρίζει τα ιόντα με βάση το λόγο m/z [8]. Ένας ιδανικός αναλυτής μαζών πρέπει να είναι σε θέση να διαχωρίζει μάζες που διαφέρουν ελάχιστα μεταξύ τους και να επιτρέπει τη διέλευση αρκετών ιόντων, ώστε να παραχθεί ένα άμεσα μετρήσιμο ρεύμα ιόντων. Ο αναλυτής αποτελείται από ένα σωλήνα σε σχήμα τόξου, που βρίσκεται μέσα σε ομογενές μαγνητικό πεδίο μεγάλης έντασης (3000-4000 gauss) και σε διεύθυνση κάθετη προς τις δυναμικές γραμμές του μαγνητικού πεδίου. Οι συνηθέστεροι αναλυτές είναι: αναλυτής τομέα, τετραπολικός αναλυτής, παγίδα ιόντων, αναλυτής χρόνου πτήσης. Στο φασματοόμετρο περιλαμβάνεται κι ένας μεταλλάκτης ιόντων που μετατρέπει τη δέσμη των ιόντων σε ηλεκτρικό σήμα.



Σχήμα 5. Τετραπολικός Αναλυτής Μάζας

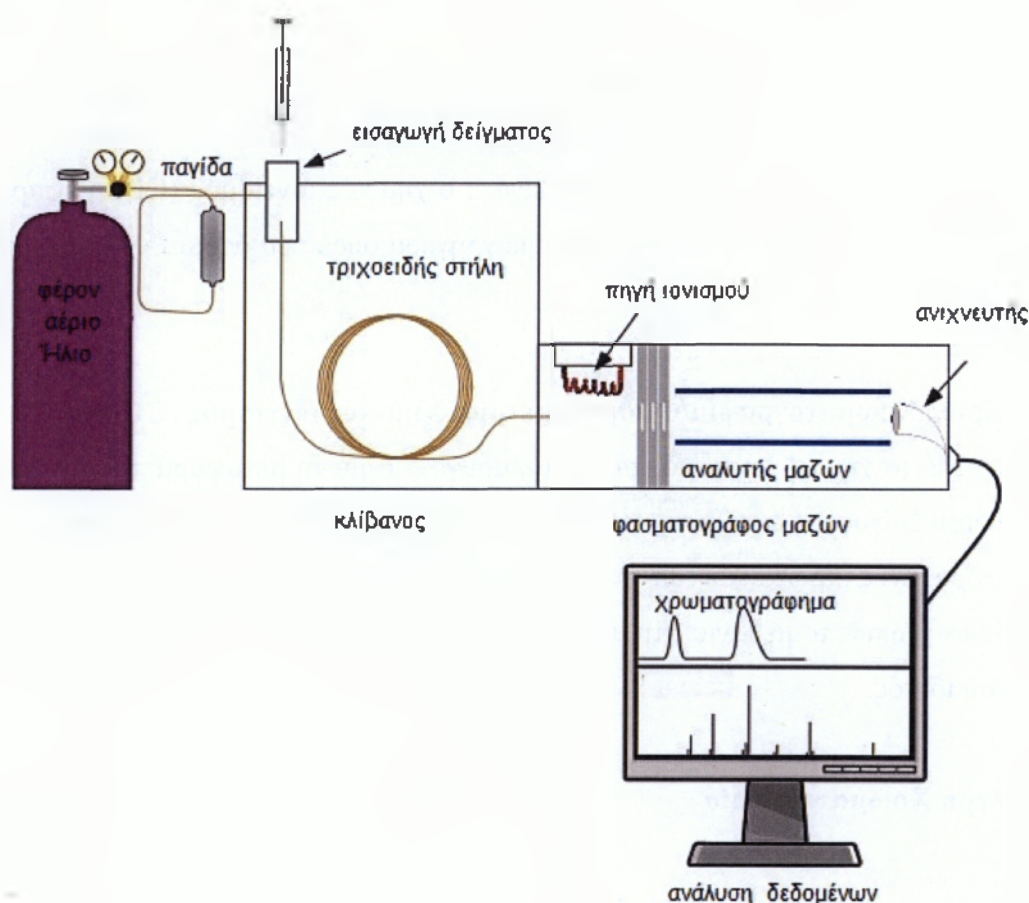
Στην πράξη, προτιμάται ο τετραπολικός ανιχνευτής μαζών (quadrupole), λόγω των ωφέλιμων χαρακτηριστικών του, όπως το μικρό μέγεθος, το χαμηλό κόστος, η ανθεκτικότητα και η δυνατότητα επίτευξης υψηλών ταχυτήτων σάρωσης- το πλήρες φάσμα μαζών λαμβάνεται σε χρόνο μικρότερο των 100ms . Το τετράπολο αποτελείται από τέσσερις παράλληλες κυλινδρικές ράβδους που δρουν ως

ηλεκτρόδια. Οι διαγώνιες συνδέονται ηλεκτρικά μεταξύ τους. Το ένα ζεύγος αποτελεί τον θετικό πόλο, και το άλλο τον αρνητικό. Για να ληφθεί ένα φάσμα, τα ιόντα επιταχύνονται στο χώρο ανάμεσα στις ράβδους με δυναμικό 5-10V. Στην υγρή χρωματογραφία χρησιμοποιείται συνήθως συζευγμένη φασματομετρία μαζών, δηλαδή στο σύστημα βρίσκονται συνδεδεμένοι δύο αναλυτές μαζών (LC-MS/MS ή LC-MS²)

Σύστημα καταγραφής και επεξεργασίας του σήματος

Μετά την ανίχνευση, το ηλεκτρικό σήμα που αντιστοιχεί σε κάθε συστατικό επεξεργάζεται και καταγράφεται είτε σε ολοκληρωτές, είτε σε υπολογιστές με κατάλληλο πρόγραμμα ολοκλήρωσης. Τελικά λαμβάνεται στον καταγραφέα το αεριοχρωματογράφημα, το οποίο είναι μια σειρά κορυφών. Η μέτρηση της επιφάνειας των κορυφών οδηγεί στον ποσοτικό προσδιορισμό του δείγματος.

1.3 Αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με Φασματομετρία Μάζας



Σχήμα 6. Αέριος χρωματογράφος/ φασματογράφος μάζας με τριχοειδή στήλη και ήλιο ως φέρον αέριο.

1.3.1 Συνηθέστεροι συνδυασμοί GC/MS

A) Αέριος χρωματογραφία/ Φασματογραφία/ Βομβαρδισμό με δέσμη ηλεκτρονίων (GC/MS/EI)

Ο συνηθέστερος τρόπος ιοντισμού είναι με βομβαρδισμό των αερίων μορίων της ένωσης με δέσμη ηλεκτρονίων (EI)^[9]. Τα ηλεκτρόνια εκπέμπονται από ένα θερμαινόμενο νήμα βολφραμίου ή ρηνίου και επιταχύνονται με μία τάση περίπου 70V, η οποία εφαρμόζεται μεταξύ νήματος και μίας ανόδου. Οι διαδρομές των ηλεκτρονίων και των μορίων σχηματίζουν μια ορθή γωνία και διασταυρώνονται στο κέντρο της πηγής όπου γίνεται η πρόσκρουση και ο ιοντισμός. Δημιουργείται με απώλεια ενός ηλεκτρονίου από μέρος της ένωσης μια κατιοντική ρίζα, που αντιστοιχεί στο μοριακό ιόν. Οι κατιοντικές αυτές ρίζες επιταχύνονται αρχικά με ηλεκτρικό πεδίο και στη συνέχεια κινούνται μέσα στο μαγνητικό πεδίο, οπότε εκτρέπονται και διαχωρίζονται με βάση το m/z. Η εκτεταμένη θραύση και ο μεγάλος αριθμός κορυφών είναι ένα πλεονέκτημα, επειδή συχνά κάνει δυνατή τη χωρίς αμφιβολία ταυτοποίηση μιας ουσίας. Άλλα πλεονεκτήματα είναι η απλότητα, η ευκολία, η μεγάλη απόδοση του ιοντισμού και η παραγωγή θυγατρικών ιόντων, που βοηθά τα μέγιστα στην ταυτοποίηση ενώσεων με περίπλοκη δομή.

Άλλοι τρόποι σχηματισμού ιόντων είναι : ο χημικός ιοντισμός (CI), η εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου (FI), ο βομβαρδισμό με γρήγορα ουδέτερα άτομα Xe ή Ar ή ιόντα Cs (FIB).

B) Αέριος Χρωματογραφία/Φασματομετρία/ Χημικός ιοντισμός (GC/MS/CI)

Με το χημικό ιοντισμό, τα ιόντα παράγονται με τη μεταφορά πρωτονίων. Τα μόρια του δείγματος εκτίθενται σε περίσσεια ιονισμένου αερίου αντίδρασης. Έτσι, η μεταφορά ενός πρωτονίου σε ένα μόριο δείγματος M από ένα ιονισμένο αέριο αντίδρασης όπως το μεθάνιο στη μορφή CH_5^+ έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό του θετικού ιόντος.

1.4 Υγρή Χρωματογραφία

1.4.1. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography-HPLC)

Στην υγρή χρωματογραφία, ο διαχωρισμός είναι αποτέλεσμα της συνάφειας των ουσιών σε μία στατική φάση είτε στερεή, είτε υγρή ακινητοποιημένη σε αδρανές

υπόστρωμα και σε μία υγρή κινητή φάση. Η υγρή χρωματογραφία^[6] αποδεικνύεται ιδιαίτερα χρήσιμη όταν το προς εξέταση δείγμα περιέχει μεγάλα μόρια ή ιονισμένα σωματίδια με χαμηλές τάσεις ατμών ή όταν πρόκειται για θερμικά ασταθείς ενώσεις που δεν μπορούν να εξαερωθούν χωρίς να διασπαστούν. Οι κύριοι μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι για την εκλεκτική συνάφεια των αναλυτών είναι η κατανομή, η προσρόφηση, η ανταλλαγή ιόντων, η διάλυση σε μία στατική μήτρα ή διαλύτη και η στερεοπαρεμπόδιση.

Είδη και τεχνικές υγρής χρωματογραφίας:

Η **χρωματογραφία προσρόφησης** βασίζεται στο διαφορετικό βαθμό προσρόφησης στη στατική φάση. Οι κυριότερες αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα είναι ηλεκτροστατικής φύσης. Η χρωματογραφία προσρόφησης βρίσκει εφαρμογή στο διαχωρισμό ουσιών με παρόμοια δομή, αλλά με διαφορετική πολικότητα.

Στη **χρωματογραφία κατανομής** ο διαχωρισμός στηρίζεται στη διαφορετική κατανομή των συστατικών ενός μίγματος μεταξύ της κινητής και της υγρής στατικής φάσης και εφαρμόζεται στην ανάλυση ομόλογων μη ιονικών ενώσεων.

Στη **χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής** ο διαχωρισμός οφείλεται στις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αναλυόμενων ιόντων και των φορτισμένων ομάδων της στατικής φάσης. Οι κυριότερες παράμετροι που καθορίζουν τη συγκράτηση στη χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής είναι το αντίθετο ιόν της δραστικής ομάδας της στατικής φάσης, η ιονική ισχύς, το pH, ο τροποποιητής της κινητής φάσης και η θερμοκρασία.

Κατά τη μέθοδο της **χρωματογραφίας συγγένειας**, οι προσδιοριζόμενες ενώσεις δεσμεύονται εκλεκτικά σε υποκατάστατες, οι οποίοι είναι συνδεδεμένοι στην επιφάνεια του διοξειδίου του πυριτίου.

Στη **χρωματογραφία διάχυσης πηκτής**, ο διαχωρισμός γίνεται με βάση το σχήμα και το μέγεθος των μορίων των αναλυόμενων ενώσεων και βρίσκει εφαρμογές στην ανάλυση και τον χαρακτηρισμό των πολυμερών. Τα μεγάλα μόρια εξέρχονται πρώτα απ' τη στήλη, τα μικρά μόρια, καθώς εισέρχονται στους πόρους των σωματιδίων της στατικής φάσης, καθυστερούν και βγαίνουν αργότερα.

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αποτελεί τη σημαντικότερη εξέλιξη στην τεχνική της χρωματογραφικής ανάλυσης. Η ανάπτυξη της τεχνικής HPLC είναι αρκετά πρόσφατη και με ιδιαίτερες εφαρμογές στα ιονικά, μη πτητικά και θερμοδιαλυτά φυτοπροστατευτικά προϊόντα. Η τεχνική της υγρής

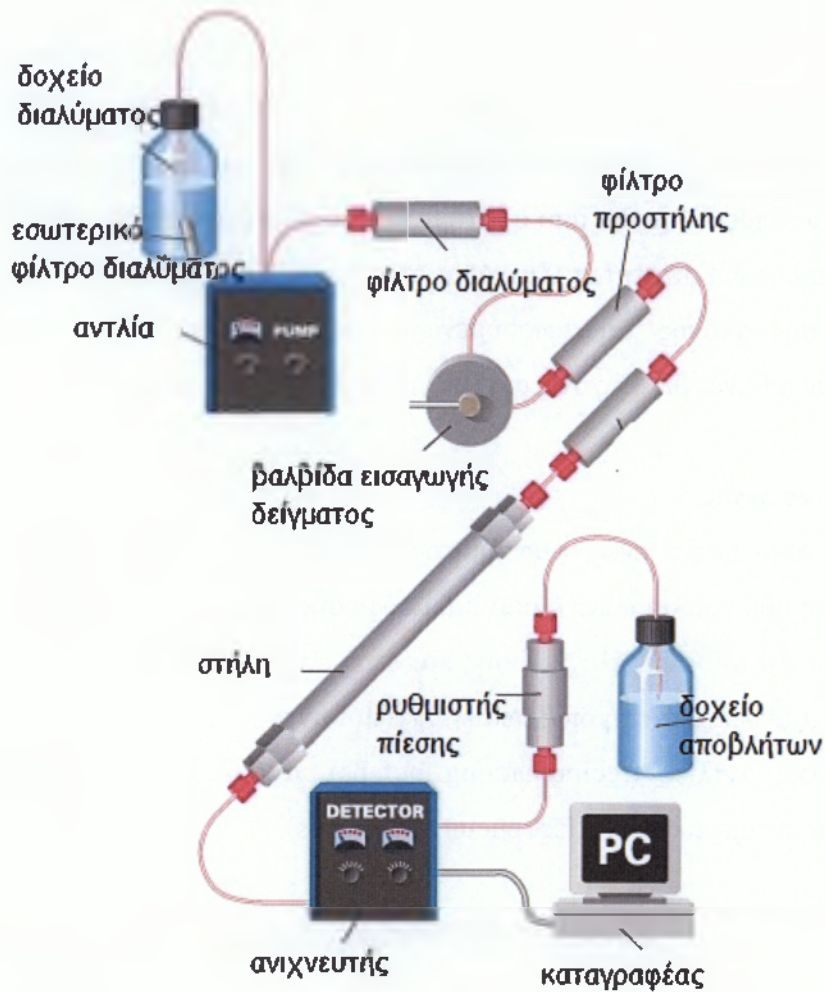
χρωματογραφίας έχει αρκετά κοινά σημεία με την αέρια, όπως για παράδειγμα κατά την έγχυση του δείγματος σε στήλη με κατάλληλο υλικό^[2], αυτό παρασύρεται σε κατάλληλο ανιχνευτή. Η διαφορά της έγκειται στο ότι η ουσία έχει την ίδια κατάσταση που είχε και πριν την έγχυση. Επιπλέον, η κινητή φάση είναι υγρή (διαλύτης, μείγμα διαλυτών, μείγμα διαλυτών και νερού και ρυθμιστικών διαλυμάτων). Το δείγμα εισάγεται στην κορυφή της στήλης με τη βοήθεια της κινητής φάσης, τα συστατικά μετακινούνται με τη μορφή ζωνών και τελικά εκλύονται το ένα μετά το άλλο. Οι αναλυόμενες ουσίες κατανέμονται μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης, με αποτέλεσμα να μετακινούνται με διαφορετικές ταχύτητες κατά μήκος της στήλης.

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης διαθέτει πολλά πλεονεκτήματα που την καθιστούν ελκυστική για την ανάλυση δειγμάτων. Η ανάπτυξη της τεχνολογίας, η οποία επέτρεψε την κατασκευή χαλύβδινων στηλών πολύ μικρής διαμέτρου με υψηλή ανθεκτικότητα σε πιέσεις και ενίσχυσε την εξέλιξη της επιστήμης των πληρωτικών υλικών, τη χρήση αντλιών υψηλής πίεσης, καθώς και την ανάπτυξη διαφόρων τύπων ανιχνευτών, έχει καταστήσει τη μέθοδο αυτή ισχυρό εργαλείο στη σύγχρονη χρωματογραφική ανάλυση. Το κύριο πλεονέκτημα της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης είναι η λειτουργία της σε χαμηλές θερμοκρασίες, γι' αυτό χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό ουσιών ευπαθών στις υψηλές θερμοκρασίες της αέριας χρωματογραφίας, πχ πρωτεΐνες, νουκλεοτίδια κτλ, καθώς και ουσιών που δεν μπορούν να εξαερωθούν. Συν τοις άλλοις, διαθέτει υψηλή ευαισθησία και εύκολη προσαρμογή σε ακριβείς ποσοτικούς διαχωρισμούς μη πτητικών ή θερμικά ευαίσθητων συστατικών. Τέλος, στην HPLC μπορούν να συμπεριληφθούν και να εφαρμοστούν όλα τα είδη που λαμβάνουν χώρα στους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς, με την κατάλληλη χρήση υλικού πληρώσεως της στήλης και του διαλύτη έκλουσης.

1.4.2. Οργανολογία

Η διαβίβαση της υγρής κινητής φάσης μέσα από τη στατική φάση επιτυγχάνεται με τη χρησιμοποίηση αντλιών υψηλής πίεσης, όταν η στατική φάση αποτελείται από πολύ μικρής διαμέτρου (επομένως μεγάλης αντίστασης) σωματίδια υψηλής διαχωριστικής απόδοσης. Η χρησιμοποίηση των υλικών πλήρωσης σωματιδίων μεγέθους 2-10 μm στη σύγχρονη υγρή χρωματογραφία απαιτεί την ανάπτυξη πιέσεων από τις αντλίες της τάξης μερικών χιλιάδων psi για να γίνει δυνατή

η επίτευξη ικανοποιητικών ταχυτήτων ροής του υλικού έκλουσης. Κατ' αποτέλεσμα, η οργανολογία της HPLC είναι πολυπλοκότερη και δαπανηρότερη από το σύνηθες.



Σχήμα 7. Διάγραμμα γυρης χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης

Δοχεία διαλυτών

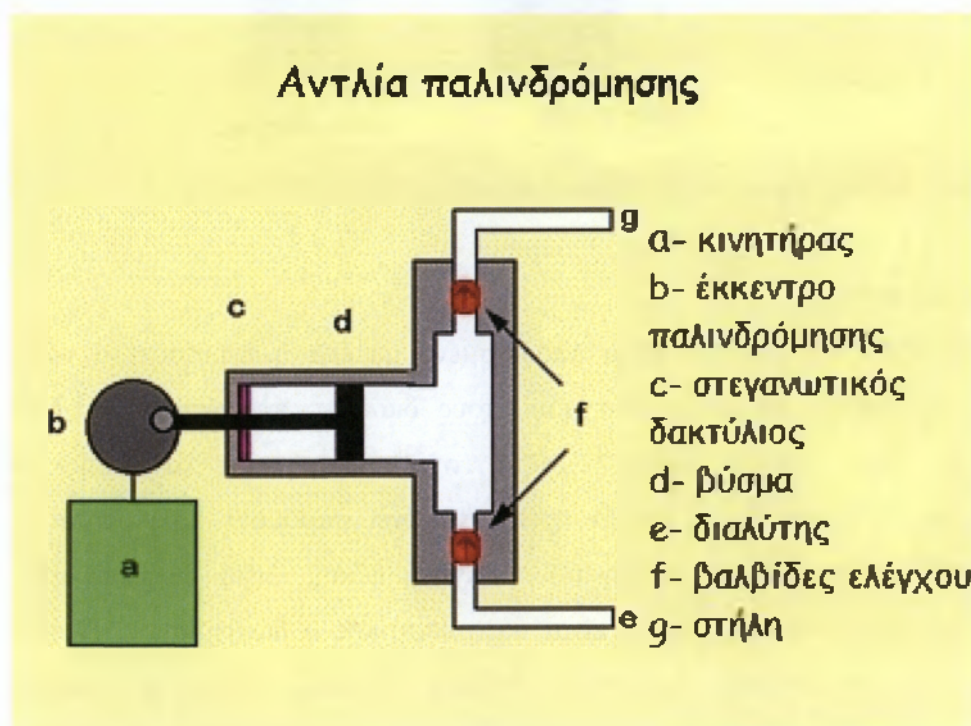
Ένα σύστημα HPLC είναι εφοδιασμένο με ένα ή περισσότερα υάλινα ή ανοξείδωτα δοχεία τα οποία περιέχουν τους διαλύτες έκλουσης. Οι διαλύτες αποτελούν την κινητή φάση.^[2] Μετά την επιλογή της στατικής φάσης (βελτιστοποίηση του N), η οποία πρέπει να έχει παρόμοια πολικότητα με τις προσδιοριζόμενες ενώσεις, επιλέγεται η κινητή φάση, ώστε διαφέρει από την πολικότητα της στατικής, για να είναι ικανοποιητικός ο διαχωρισμός. Η έκλουση γίνεται είτε ισοκρατικά (isocratic elution), δηλαδή, κατά το διαχωρισμό χρησιμοποιείται ένας διαλύτης σταθερής σύστασης, είτε βαθμιαία (gradient elution).

Απαερωτές

Τα δοχεία αυτά είναι συχνά εφοδιασμένα με μέσα απομάκρυνσης των διαλυμένων αερίων –συνήθως οξυγόνου και αζώτου-που παρεμποδίζουν το σχηματισμό φυσαλίδων στη στήλη και τον ανιχνευτή των συστημάτων.^[10] Οι φυσαλίδες αυτές προκαλούν τη διεύρυνση των κορυφών ή ακόμα τη φραγή της ροής της κινητής φάσης. Οι απαερωτές αποτελούνται από ένα σύστημα άντλησης κενού, ένα σύστημα απόσταξης και από συστήματα εισαγωγής μικρών φυσαλίδων αδρανούς αερίου χαμηλής διαλυτότητας. Συχνά τα συστήματα αυτά περιλαμβάνουν και φίλτρα απομάκρυνσης σκόνης και αιωρούμενων σωματιδίων από τους διαλύτες για να προληφθούν πιθανές βλάβες στις αντλίες ή στα συστήματα έγχυσης

Σύστημα άντλησης.

Οι απαιτήσεις ενός συστήματος άντλησης περιλαμβάνει την ανάπτυξη πιέσεων έως 600 psi, απαλλαγή από παλμούς ροής, ταχύτητες ροής που κυμαίνονται από 0,1 έως 10 mL/min, έλεγχο ροής και επαναληψιμότητα ροής 0,5% ή καλύτερη και τμήματα ανθεκτικά στη διάβρωση. Οι τύποι αντλιών που χρησιμοποιούνται είναι παλινδρομικές αντλίες (reciprocating pumps), αντλίες εκτόπισης (displacement pumps) και πνευματικές αντλίες (pneumatic pumps).



Σχήμα 8. Αντλία παλινδρόμησης: a-κινητήρας, b- έκκεντρο παλινδρόμησης, c- Στεγανωτικός δακτύλιος, d- βύσμα, e- διαλύτης, f- βαλβίδες ελέγχου, g- στήλη

Το 90% των εμπορικών συστημάτων χρησιμοποιούν παλινδρομικές αντλίες^[10] που συνήθως αποτελούνται από ένα μικρό θάλαμο στον οποίο ο διαλύτης αντλείται παλινδρομικά με ένα μηχανικά κινούμενο έμβολο. Δύο σφαιρικές βαλβίδες ανοίγουν και κλείνουν εκ περιτροπής ελέγχοντας τη ροή του διαλύτη μέσα και έξω από τον κύλινδρο, ενώ ο διαλύτης βρίσκεται σε επαφή με το έμβολο. Εναλλακτικά μπορεί να μεταδίδεται πίεση στο διαλύτη μέσω ενός εύκαμπτου διαφράγματος αντλούμενο πνευματικά από ένα παλινδρομικό έμβολο.

Σύστημα ελέγχου ροής

Πολλά εμπορικά όργανα είναι εφοδιασμένα με συσκευές ελεγχόμενες από υπολογιστή για τη μέτρηση της ταχύτητας ροής, η οποία υπολογίζεται από την πτώση της πίεσης σε ένα αναστολέα τοποθετημένο στην έξοδο της αντλίας. Κάθε παρατηρούμενη διαφορά στο σήμα από μια προκαθορισμένη τιμή χρησιμοποιείται ακολούθως για την αύξηση ή μείωση της ταχύτητας του κινητήρα της αντλίας.

Σύστημα έγχυσης δείγματος

Συχνά ο περιοριστικός παράγοντας στην επαναληψιμότητα των μετρήσεων στην υγρή χρωματογραφία είναι ο τρόπος εισαγωγής των δειγμάτων στη στήλη. Οι όγκοι πρέπει να είναι οι ελάχιστοι δυνατοί-από μερικά έως 500 μL - και η εισαγωγή θα πρέπει να επιτυγχάνεται χωρίς να προκαλείται αποσυμπίεση του συστήματος. Ο παλιότερος και πλέον απλός τρόπος εισαγωγής του δείγματος ήταν η έγχυση με σύριγγα μέσω ενός ελαστικού διαφράγματος. Σήμερα, η πλέον συνηθισμένη μέθοδος εισαγωγής δείγματος βασίζεται στη βαλβίδα δειγματοληψίας που δίνουν δυνατότητα έγχυσης από 0,5-500 μL .

Αναλυτικές στήλες

Οι στήλες της υγρής χρωματογραφίας είναι συνήθως κατασκευασμένες από σωλήνες ανοξειδωτού χάλυβα μικρής διαμέτρου, ευθύγραμμες με μήκος 10 έως 30 cm. Περιστασιακά χρησιμοποιούνται και σπειροειδείς στήλες των οποίων όμως η αποτελεσματικότητα λόγω σχήματος δεν είναι καλή. Η εσωτερική διάμετρος τους είναι συνήθως 4-10 mm και το μέγεθος των σωματιδίων του υλικού πλήρωσης είναι 5 ή 10 μm .

Στην υγρή χρωματογραφία χρησιμοποιούνται δύο βασικοί τύποι υλικών πλήρωσης, τα σφαιροειδή και τα πορώδη. Τα σφαιροειδή αποτελούνται από μη πορώδη σωματίδια από ύαλο ή πολυμερές με διάμετρο 30 έως 40 μm . Στην επιφάνειά τους αποτίθεται ένα λεπτό πορώδες σώμα, όπως SiO_2 , αλουμίνα, συνθετική ρητίνη πολυστυρενίου-διβινυλοβενζολίου ή μία ιονανταλλακτική ρητίνη. Το υλικό πλήρωσης από πορώδη σωματίδια αποτελείται από μικροσωματίδια διαμέτρου 3-10 μm από SiO_2 , αλουμίνα, συνθετική ρητίνη πολυστυρενίου-διβινυλοβενζολίου ή μία ιονανταλλακτική ρητίνη, με το SiO_2 να συναντάται πιο συχνά.

Η επιλογή της στατικής φάσης και της κατάλληλης αναλυτικής στήλης είναι σημαντικά για την ανάπτυξη μιας αναλυτικής μεθόδου και καθορίζεται από τις επιμέρους παραμέτρους:

- i. Το μέγεθος των μορίων του υλικού πληρώσεως και τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά της στήλης.
- ii. Η φύση της ομάδας που είναι δεσμευμένη στο υπόστρωμα, η οποία καθορίζει και την εκλεκτικότητα της στατικής φάσης
- iii. Η διάμετρος των πόρων του υλικού πληρώσεως
- iv. Ο τύπος του υποστρώματος το οποίο πρέπει να είναι χημικά αδρανές.
- v. Η περιεκτικότητα της στήλης σε ελεύθερα σιλανολικά υδροξύλια. Όσο μεγαλύτερο είναι το ποσοστό τους, τόσο πιο πολική (όξινη) είναι η στήλη και τόσο ασθενέστερη είναι η συγκράτηση των μη πολικών ενώσεων.

Ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται στην HPLC

Οι ανιχνευτές που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην HPLC είναι οι παρακάτω: ^[11]

- Ανιχνευτές ορατού-υπεριώδους (UV/VIS)
- Παράταξης φωτοδιόδων
- Αγωγιμομετρικοί
- Δείκτη διάθλασης
- Φασματογράφοι μάζας
- Ηλεκτροχημικοί
- Φθορισμομετρικοί
- Ραδιενέργειας
- Σκεδασμού φωτός
- Φλόγας (ιονισμού φλόγας, εκπομπής, φωτομετρικοί ανιχνευτές)

1.4.3 Υγρή Χρωματογραφία αντίστροφης φάσης- Reversed Phase Liquid Chromatography (RPLC)

Ανάλογα με την πολικότητα της στατικής φάσης, η LC διακρίνεται σε κανονικής φάσης και σε αντίστροφης φάσης. Στην αντίστροφη, η στατική αποτελείται από ένα αλκάνιο με 18 άτομα άνθρακα $R = C_{18}H_{37}$ προσδεδεμένο χημικά στην επιφάνεια του διοξειδίου του πυριτίου ή ODS (octadecylsilane). Η κινητή φάση αποτελείται από υδατικά συστήματα ή υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα με υδατοδιαλυτούς οργανικούς διαλύτες όπως μεθανόλη, ακετονιτρίλιο, ισοπροπανόλη κ.α.

Πολλά από τα πολικά φυτοφάρμακα μπορούν να διαχωριστούν με την RPLC χωρίς να προηγηθεί στάδιο εργαστηριακής παραγωγοποίησης. Γι' αυτό το λόγο, από τότε που η εισαγωγή της RPLC εφοδιάστηκε μ' έναν ανθεκτικό ανιχνευτή UV ή φθορισμού στο πεδίο της ανάλυσης των φυτοφαρμάκων, η υγρή χρωματογραφία υιοθετήθηκε γρήγορα ως μία βιώσιμη συμπληρωματική τεχνική στην GC για τον προσδιορισμό ποικίλων πολικών φυτοφαρμάκων.

1.4.4 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας-Thin Layer Chromatography (TLC)

Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας^[8] αποτελεί μία τεχνική υγρής χρωματογραφίας και εισήχθη από τον Stahl τη δεκαετία του '50. Στην TLC, η πλάκα είναι είτε γυάλινη ή φύλλο από αργίλιο ή πλαστικό επιστρωμένο με ξηρό και λεπτότατα διαμερισμένο προσροφητικό υλικό πχ ενεργοποιημένο διοξείδιο του πυριτίου (silica gel) οξείδιο του αργιλίου (alumina) μικροκρυσταλλική κυτταρίνη (cellulose powder) γη διατομών (kieselguh) κτλ

Ως κινητές φάσεις χρησιμοποιούνται διαλύτες που ανταγωνίζονται τα συστατικά του μείγματος στην κατάληψη των θέσεων προσρόφησης της στατικής φάσης.

Το διάλυμα του υπό εξέταση δείγματος τοποθετείται υπό τη μορφή κηλίδας στην αρχή της πλάκας σε απόσταση περίπου 2 cm. Στη συνέχεια, η πλάκα τοποθετείται όρθια εντός αεροστεγούς θαλάμου, στον οποίο έχει ήδη εισαχθεί κατάλληλο σύστημα διαλυτών σε ύψος κάτω απ' αυτό της κηλίδας. Οι διαλύτες πρέπει να έχουν τοποθετηθεί εντός του θαλάμου τουλάχιστον δέκα λεπτά πριν την τοποθέτηση της πλάκας, ώστε να κορεσθεί ο υπερκείμενος χώρος από τους ατμούς των διαλυτών.

Ακολούθως, ο διαλύτης αφήνεται να ανέλθει με τη βοήθεια τριχοειδών φαινομένων (περίπου 10-20 λεπτά, ανάλογα με το ύψος της πλάκας) μέχρι το μέτωπο

του διαλύτη να φτάσει λίγο πριν το τέλος της πλάκας. Ύστερα, η πλάκα αποσύρεται και στεγνώνεται με ρεύμα αέρα. Οι διάφορες ουσίες που περιέχονται στο υπό εξέταση δείγμα μετακινούνται επί της πλάκας με διαφορετική ταχύτητα, ανάλογα με την πολικότητα τους και εμφανίζονται με τη μορφή διακριτών κηλίδων. Η παρατήρηση των κηλίδων γίνεται με εξέταση στο υπεριώδες φως ή μετά από ψεκασμό με ειδικά αντιδραστήρια. Από το χρώμα των κηλίδων στο ορατό, από την απορρόφηση στο υπεριώδες και ανάλογα με το χρησιμοποιηθέν αντιδραστήριο, μπορεί να εξαχθούν συμπεράσματα για την κατηγορία των ουσιών που παρατηρούμε.

Το όφελος της χρήσης της TLC προσρόφησης είναι ότι η ικανότητα έκλυσης των διαλυτών αυξάνεται με αύξηση της πολικότητάς τους. Αποτελεί ευέλικτη τεχνική και χρησιμοποιείται εύκολα στην εύρεση του αριθμού συστατικών ενός δείγματος. Κατά την εμφάνιση των χρωματογραφημάτων μπορούν να χρησιμοποιηθούν και δραστικά μέτρα που διευκολύνουν την ανίχνευση πχ με ψεκασμό της πλάκας με πυκνό θειικό οξύ ανιχνεύονται οι οργανικές ουσίες που δίνουν μικρές κηλίδες από άνθρακα.

1.5. Υγρή Χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματομετρία μαζών (LC-MS)

Η χρήση της μεθόδου αυτής ξεκίνησε τη δεκαετία του '70 με επιδίωξη την ανάλυση θερμοεναίσθητων ουσιών που δεν αναλύονταν με αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μαζών και την εκμετάλλευση της αυξημένης ευαισθησίας του ανιχνευτή MS. Χαρακτηριστικό της υγρής χρωματογραφίας/ διαδοχικής φασματομετρίας μαζών είναι η εκλεκτικότητα της και η δυνατότητα περαιτέρω εξέλιξης της μεθόδου για ακόμη μεγαλύτερη βελτίωση^[12].

Η πρόσφατη εισαγωγή στην αγορά ανθεκτικών και εύχρηστων οργάνων LC-MS/MS (βλ. 1.6) εξασφαλίζουν ένα νέο τρόπο πιο ολοκληρωμένης ανάλυσης πολικών φυτοφαρμάκων. Χαρακτηριστικά όπως διαχωρισμός, διακριτικότητα και ποσοτικός προσδιορισμός των πολικών αναλυτών την καθιστούν ελκυστική. Συν τοις άλλοις, ο αυτοματοποιημένος έλεγχος των διαδικασιών μέσω υπολογιστή καθιστά εύκολη τη χρήση τους. Αν και η οργανολογία της είναι ιδιαίτερα περίπλοκη και δαπανηρή, όπως προαναφέρθηκε, η ικανότητα της ν' απλοποιεί τις διαδικασίες καθαρισμού, μειώνοντας το χρόνο ανάλυσης και το χρόνο ανάπτυξης της μεθόδου, ελαχιστοποιούν τη σημασία αυτού του μειονεκτήματος της^[13].

Οι τεχνικές που χρησιμοποιεί η LC-MS είναι οι εξής: Ιονισμός πεδίου (FI), Εκρόφηση πεδίου (FD), Ιονισμός με ηλεκτροψεκασμό (ESI), Ιονισμός εκρόφησης με

τη βοήθεια υλικού μήτρας (MALDI), Εκρόφηση πλάσματος (PD), Βομβαρδισμός με άτομα μεγάλης ταχύτητας (FAB), Δευτερογενούς ιόντος (SIMS), Ιονισμός με θερμοψεκασμό. Ο θερμοψεκασμός (Electrospray) έχει πλέον αντικατασταθεί από το χημικό ιονισμό και τον ηλεκτροψεκασμό, προάγοντας την ανάπτυξη της τεχνικής της διαδοχικής φασματομετρίας.

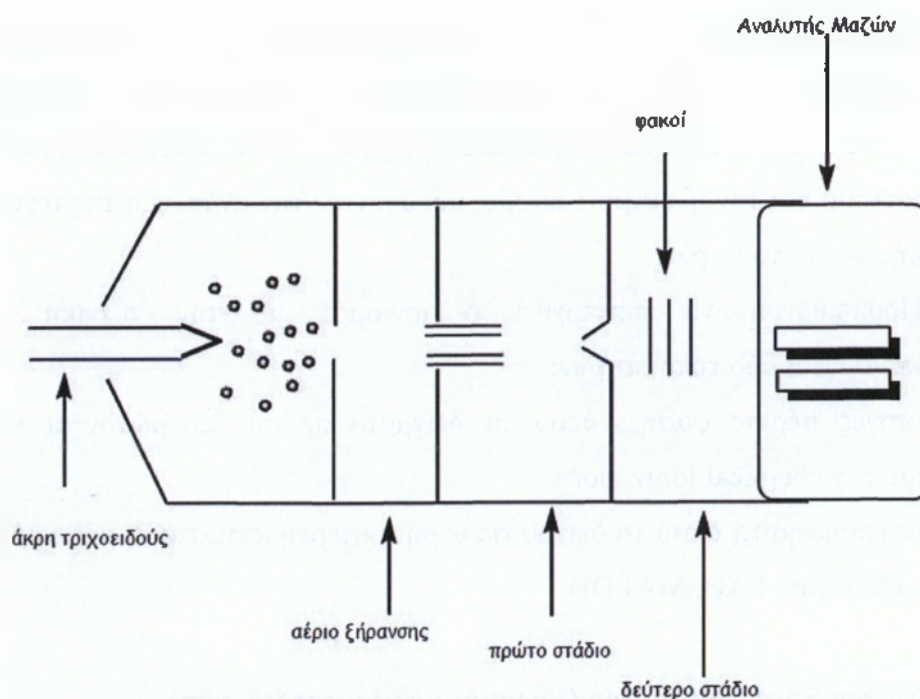
Προκειμένου να επιτευχθεί ο ιονισμός με την τεχνική LC-MS, χρησιμοποιούνται δύο τύποι πηγών:

A) Οι πηγές αέριας φάσης, όπου τα δείγματα πρώτα εξαερώνονται και μετά ιονίζονται. (πχ chemical ionization)

B) Πηγές εκρόφησης, όπου το δείγμα σε υγρή ή στερεή κατάσταση μετατρέπεται σε αεριώδη ιόντα (πχ. FAB, MALDI)

1.5.1 Electron Spray Ionization (Ιονισμός με ηλεκτροδιάχυση)

Η τεχνική του ψεκασμού σε ηλεκτρικό πεδίο χρησιμοποιείται ως η κυριότερη μέθοδος σύζευξης υγρής χρωματογραφίας και φασματομετρίας μαζών. Μετατρέπει τα μόρια ή τα ιόντα που βρίσκονται σε διάλυμα, σε ιόντα σε αέρια φάση, με εξάτμιση των φορτισμένων σταγονιδίων του διαλύματος. Τα φορτισμένα σταγονίδια παράγονται από μια τριχοειδή ακίδα κάτω από την επίδραση ισχυρού ηλεκτρικού πεδίου. Με τη βοήθεια ενός αερίου εκνέφωσης, το οποίο είναι συνήθως το N_2 , επιτυγχάνεται η δημιουργία νέφους σταγονιδίων. Παράλληλα με τον τριχοειδή βρίσκεται εξωτερικός σωλήνας μέσα από τον οποίο διαβιβάζεται αέριο που σκοπό έχει τη δημιουργία εκνεφώματος στην άκρη του τριχοειδούς. Ο τριχοειδής είναι γειωμένος, ενώ στο απέναντι ηλεκτρόδιο εφαρμόζεται δυναμικό της τάξης 3,5-5 KV. Ανάλογα με την πολικότητα του δυναμικού που εφαρμόζεται στο τριχοειδές, η επιφάνεια των σταγόνων που σχηματίζονται στο άκρο του τριχοειδούς και περιέχουν την ιοντιζόμενη ένωση φορτίζεται είτε θετικά είτε αρνητικά. Στη συνέχεια τα σταγονίδια εξατμίζονται. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται εξάτμιση με ιοντισμό (ion evaporation). Η εξάτμιση των σταγονιδίων απαιτεί θέρμανση και ένα αέριο ξήρανσης, το οποίο είναι επίσης το N_2 .



Σχήμα 9. Διάγραμμα Τεχνικής Ηλεκτροψεκασμού

Καθώς το μέγεθος των σταγόνων μειώνεται, αυξάνεται η πυκνότητα των φορτίων στην επιφάνεια της σταγόνας. Τελικά, οι απωστικές δυνάμεις των φορτίων υπερνικούν τις δυνάμεις συνοχής (όριο Rayleigh) και προκαλούν την έκρηξη της σταγόνας (Κουλομπική έκρηξη).

1.5.2. Χημικός ιονισμός σε ατμοσφαιρική πίεση (APCI)

Ο χημικός ιονισμός βασίζεται στις αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στα μόρια του αναλυτή και ενός αντιδραστήριου αερίου, όταν και τα δύο βρίσκονται σε αέρια φάση. Το αντιδραστήριο αέριο είναι το μεθάνιο, η αμμωνία και το ισοβουτάνιο ή η κινητή φάση της υγρής χρωματογραφίας στο χημικό ιονισμό με μεσολάβηση διαλύτη (solvent mediated chemical ionization). Το αντιδραστήριο αέριο βομβαρδίζεται με ηλεκτρόνια, με αποτέλεσμα να σχηματιστούν ιόντα του αερίου. Τα ιόντα αυτά δρουν ως δότες πρωτονίων, αντιδρούν με τα μόρια του αναλυτή M και σχηματίζουν μοριακά ιόντα MH . Ο χημικός ιονισμός κατατάσσεται στις ήπιες τεχνικές ιονισμού με μεγάλη ευαισθησία, η οποία συνήθως δίνει το μοριακό ιόν του αναλυτή. Όταν ο χημικός ιονισμός λαμβάνει χώρα σε ατμοσφαιρική πίεση, η τεχνική ονομάζεται atmospheric pressure chemical ionization). Η νεφελοποίηση και τελικά η εξαέρωση του δείγματος επιτυγχάνεται με το συνδυασμό αερίου αζώτου (nebulizer gas) και θέρμανσης. Στο

άκρο του APCI probe, μεταλλική ακίδα με δυναμικό 2,5-3 KV προκαλεί τον ιονισμό των μορίων. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η δημιουργία πρωτονιομένων μορίων.

1.5.3. Ιοντισμός με laser και υποβοήθηση υποστρώματος

Ο Ιοντισμός με laser και υποβοήθηση υποστρώματος (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) είναι μια τεχνική που βοήθησε τα μέγιστα στην ανάλυση μεγαλομορίων, επιτρέποντας τη μέτρηση μαζών πάνω από 10^6 Dalton. Κατά τη μέθοδο αυτή, συνήθως χρησιμοποιείται νικοτινικό οξύ ως υπόστρωμα με το οποίο αναμιγνύεται το προς ανάλυση δείγμα. Μικροποσότητα από το διάλυμα που προκύπτει τοποθετείται σε ειδική πλάκα πολλαπλών θέσεων (96+) όπου και εξατμίζεται. Στη συνέχεια, η πλάκα τοποθετείται στην πηγή ιόντων, όπου το δείγμα ακτινοβολείται με δέσμη laser (N^2 εκπομπής στα 337nm, είτε Nd-YAG). Η εστίαση της δέσμης του laser γίνεται σε ακτίνα 50-500 μ m, και η σκόπευση στην πλάκα γίνεται πλέον αυτόματα με τη βοήθεια μικροσκοπίου. Το υπόστρωμα εξυπηρετεί τρεις σκοπούς: α) την απομάκρυνση των μεγαλομορίων του δείγματος και τη μείωση μοριακών δυνάμεων μεταξύ τους, β) την απορρόφηση της ενέργειας της ακτινοβολίας και γ) τον ιονισμό των μεγαλομορίων.

Ο ιοντισμός των μεγαλομορίων γίνεται κατά την εκτόνωση του νέφους ως αποτέλεσμα αντιδράσεων του νικοτινικού οξέος. Ο ακριβής μηχανισμός ιοντισμού δεν έχει διευκρινιστεί ακόμη και οι δύο επικρατέστερες θεωρίες είναι:

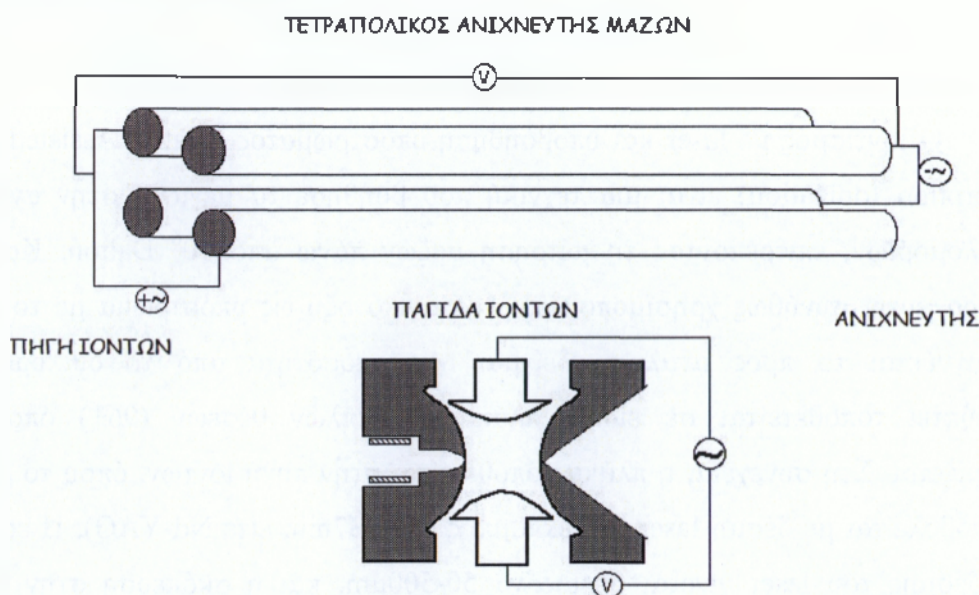
A) του φωτοχημικού ιοντισμού, όπου ο σχηματισμός δραστικότερων ριζών των μορίων του υποστρώματος ακολουθείται από αντιδράσεις των ριζών με τα μόρια του μεγαλομορίου και

B) της μεταβατικής φάσης, όπου τα μόρια του νικοτινικού οξέος διεγείρονται και δρουν ως δότες πρωτονίων προς το μεγαλομόριο.

1.5.4. Παγίδα ιόντων (Ion Trap)

Η παγίδα ιόντων είναι μικρό, συμπαγές όργανο που μπορεί να εφαρμοσθεί άμεσα και να δώσει ικανοποιητικά αποτελέσματα για αναλύσεις μαζών έως 1000 dalton. Η διαχωριστική του ικανότητα περιορίζεται κάτω της τιμής των 10000, είναι, όμως, οικονομικό και αξιόπιστο και λειτουργεί πολύ ικανοποιητικά ως ανιχνευτής αέριας και υγρής χρωματογραφίας. Συν τοις άλλοις, επιτυγχάνει καλύτερη ευαισθησία σε πλήρη σάρωση και επιτρέπει την ανακατασκευή του χρωματογραφήματος ιόντων (ion extract) αυξάνοντας σημαντικά την εξειδίκευση.

Παρέχει, επιπλέον, τη δυνατότητα για δευτερογενή θραυσματοποίηση (MS/MS) που αυξάνει ακόμη περισσότερο την εξειδίκευση.



Σχήμα 10. Παγίδα ιόντων σε συνδυασμό με τετράπολο

Η παγίδα ιόντων λειτουργεί με τη δημιουργία τρισδιάστατου πεδίου στο οποίο παγιδεύονται τα προσδιοριζόμενα ιόντα και εστιάζονται σ' ένα επίπεδο. Τα ιόντα ουσιαστικά περιορίζονται από ηλεκρομαγνητικό πεδίο τεσσάρων πόλων. Τα εισερχόμενα ιόντα κυκλοφορούν στον τρισδιάστατο χώρο που ορίζεται από τα τέσσερα ηλεκτροδια και εστιάζονται στο επίπεδο που ορίζεται από τον ανιχνευτή και το πλέγμα ιοντισμού. Στη συνέχεια, εφαρμόζεται δυναμικό ραδιοσυχνότητας που αυξάνει γραμμικά προσφέροντας αυξανόμενη κινητική ενέργεια στα ιόντα. Όλα τα ιόντα του ίδιου φορτίου λαμβάνουν την ίδια ενέργεια, αλλά ιόντα μικρού λόγου μάζας/φορτίου επιταχύνονται περισσότερο σε σχέση με τα βαρύτερα ιόντα. Ως αποτέλεσμα, τα μικρότερα ιόντα αρχίζουν να ξεφεύγουν από την παγίδα και να οδηγούνται στον ανιχνευτή και ακολουθούν τα μεγαλύτερα ιόντα ανάλογα με τη μάζα τους.

1.5.5. Αναλυτής χρόνου πτήσης (Time Of Flight)

Στον αναλυτή χρόνου πτήσης, ο λόγος μάζας/φορτίου^[9] ενός ιόντος προσδιορίζεται με μέτρηση του χρόνου της πτήσης του. Τα ιόντα σχηματίζονται σε

ακροσωλήνα σε υψηλό δυναμικό ή με βομβαρδισμό με ιόντα ή με το συνδυασμό MALDI.



Σχήμα 11. Τα μέρη ενός αναλυτή χρόνου πτήσης ιόντων: υποδοχή δείγματος, σωλήνας ελεύθερου πεδίου, ιοντισμός, περιοχή επιτάχυνσης, διαχωρισμός, ανιχνευτής ιόντων.

Στη συνέχεια, επιταχύνονται προς γειωμένο μεταλλικό πλέγμα και περνώντας από διατάξεις εστίασης (ion lens) εισέρχονται σε ευθύγραμμο σωλήνα μήκους D . Επειδή τα ιόντα επιταχύνονται κάτω από το ίδιο δυναμικό, θα προσλάβουν την ίδια $E_{κιν}$, η οποία δίνεται από τον τύπο:

$$E_{κιν} = \frac{1}{2} (m/z) U^2$$

όπου U η ταχύτητα με την οποία τα ιόντα κινούνται στον ελεύθερο πεδίου σωλήνα. Κατά την κίνησή τους στο σωλήνα, τα ιόντα διαχωρίζονται στο χώρο σε ομάδες που κινούνται με διαφορετική ταχύτητα χαρακτηριστική του m/z και τελικά ανιχνεύονται στο τέλος της διαδρομής. Η διαφορά του χρόνου από τη στιγμή του ιοντισμού έως την ανίχνευση ενός ιόντος δίνει το χρόνο πτήσης.

Η διαχωριστική ικανότητα γραμμικών αναλυτών χρόνου πτήσης ιόντων είναι σχετικά περιορισμένη, αλλά βελτιώνεται στα όργανα ανάκλασης. Παρέχουν, επιπλέον, τη δυνατότητα ανάλυσης ευπαθών μορίων και μεγαλομορίων χωρίς περιορισμό λόγω του μεγέθους του μορίου. Στην ανάλυση μεταβολιτών, ο αναλυτής χρόνου πτήσης σε συνδυασμό με τετράπολο χαίρει ευρείας αποδοχής. Η υψηλή απόδοση του αναλυτή αυτού, τόσο με πειράματα MS όσο και MS/MS, καθώς και η δυνατότητα χρήσης πηγών ιοντισμού, όπως APCI και ESI, τον κατέστησαν αρκετά δημοφιλής.

Αρχικά, είχε σχεδιαστεί για ανάλυση πεπτιδίων, αλλά γρήγορα χρησιμοποιήθηκε σε ένα μεγάλο εύρος εφαρμογών. Η υψηλή ακρίβεια και ευαισθησία που απέδειξε σε σύνδυασμο με την εύκολη λειτουργία για επιστήμονες με εμπειρία στην ενόργανη ανάλυση με αναλυτές μαζών τριπλού ή απλού τετραπόλου οδήγησαν στη γρήγορη διάδοσή του. Στα πλεονεκτήματά τους συμπεριλαμβάνονται, επιπροσθέτως, το θεωρητικά απεριόριστο εύρος μαζών, η υψηλή ταχύτητα σάρωσης και η έλλειψη ανάγκης σάρωσης της ακτίνας ιόντων, χαρακτηριστικά που υπερνικούν κάποια μειονεκτήματα του, όπως την υψηλή απαίτηση κενού και το κόστος των οργάνων.

1.6. Νέες τάσεις στην υγρή χρωματογραφία / δίδυμη φασματομετρία μαζών

Από τις αρχές του 1970^[14], ο πιο συνήθης τρόπος ανίχνευσης υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων ήταν η αέρια χρωματογραφία σε σύνδυασμό με διάφορους ανιχνευτές, συμπεριλαμβανομένης και της φασματομετρίας μάζας. Οι νέες τάσεις, όμως, έχουν αυξήσει τη χρήση του υγρού χρωματογράφου στην ανάλυση υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων, τόσο για συγκεκριμένο δείγμα, όσο και για πολλαπλή ανάλυση, κυρίως λόγω της εισαγωγής στην αγορά ανθεκτικών και εύχρηστων οργάνων LC-MS, με χαρακτηριστικά όπως ευαισθησία και αποτελεσματικότητα. Όργανα όπως το τριπλό τετράπολο, η τετραπολική παγίδα ιόντων, ο αναλυτής χρόνου πτήσης έχουν συμβάλλει στην επίλυση προβλημάτων ποιοτικού και ποσοτικού προσδιορισμού φυτοφαρμάκων και των μεταβολιτών τους.

Οι στόχοι της συνεχούς βελτίωσης στις μεθόδους ανίχνευσης υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων στα τρόφιμα είναι η τήρηση των ανώτερων ορίων περιεκτικότητας σε φυτοπροστατευτικές ουσίες, η καλύτερη δυνατή ποιότητα των αγροτικών προϊόντων και οι κρατικές και ενωσιακές εγγυήσεις για την ασφάλεια των τροφίμων. Η ταχύτητα και η ακρίβεια, όμως, που απαιτεί η επίτευξη αυτών των στόχων είναι, ως είθισται, δύο παράγοντες αντιστρόφως ανάλογοι. Η δίδυμη φασματομετρία μαζών υπόσχεται τον σημαντικό περιορισμό αυτού του προβλήματος με τρεις καινοτομίες:

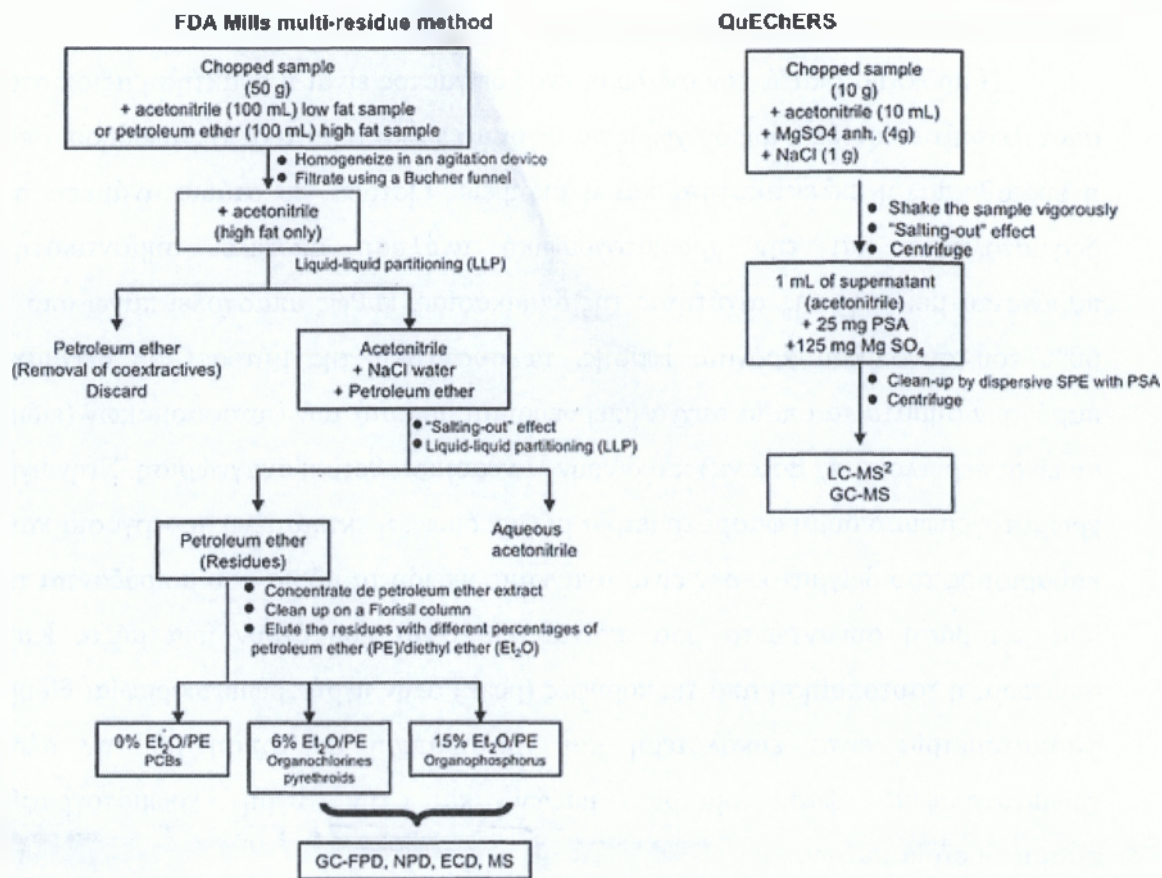
- i) την απλοποίηση του σταδίου προετοιμασίας του δείγματος
- ii) την ταυτόχρονη εξέταση και ποσοτικό προσδιορισμό μεγαλύτερου αριθμού φυτοφαρμάκων
- iii) την ανίχνευση φυτοφαρμάκων και αγνώστων σκευασμάτων, τα οποία δεν αποτελούσαν το στόχο της ανάλυσης.

1.6.1. Απλοποίηση του σταδίου εκχύλισης

Η πρόκληση κατά την ανάλυση ενός δείγματος είναι η ανάκτηση αξιόπιστων αποτελεσμάτων εντός 24ώρου χωρίς να θίγονται χαρακτηριστικά της μεθόδου, όπως η ευαισθησία, η εκλεκτικότητα και η ακρίβεια. Ωστόσο, το στάδιο ανάμεσα στη δειγματοληψία και την χρωματογραφική ανάλυση αποτελεί σημαντικότητα παράγοντα μείωσης της ταχύτητας της διαδικασίας, καθώς απασχολεί πάνω από το 60% του συνολικού χρόνου. Επίσης, τα συστατικά της μήτρας του δείγματος παράγουν σήματα τα οποία συχνά μπερδεύονται με αυτά των φυτοφαρμάκων (ειδικά αν είναι περίπλοκα πχ βότανα) και δίνουν λανθασμένα θετική αναγνώριση. Στην υγρή χρωματογραφία/δίδυμη φασματομετρία μάζας, όμως, η εκτεταμένη προεργασία και ο καθαρισμός του δείγματος δεν είναι αναγκαία, επειδή τα μόρια που μοιράζονται την ίδια μετάβαση συναντώνται πιο σπάνια από αυτά που έχουν ίδια μάζα. Κατά συνέπεια, η ταυτοποίηση από τις κορυφές (peak) στην υγρή χρωματογραφία/ δίδυμη φασματομετρία είναι ευκολότερη και γρηγορότερη σε σχέση με την αέρια χρωματογραφία/ φασματομετρία μαζών και την υγρή χρωματογραφία/ φασματομετρία μαζών.

Η μέθοδος Mill's που χρησιμοποιείται με την αέρια χρωματογραφία αποτελεί σίγουρα την πιο κοινή για την ανάλυση φυτοφαρμάκων σε μη λιπαρά τρόφιμα. Όπως και όλες οι συγγενείς της μέθοδοι, χρησιμοποιεί πολλά βήματα, παραδείγματος χάριν την εκχύλιση, το καθαρισμό με τον υγρό-υγρό διαχωρισμό, τη χρωματογραφία διείσδυσης πηκτώματος. Επιπλέον, η μέθοδος αυτή περιορίζεται αυστηρά στην ανάλυση μη πολικών φυτοφαρμάκων.

Εν αντιθέσει με την πολυπλοκότητα των κλασικών αυτών μεθόδων, οι νέες τάσεις αναζητούν ένα απλό σχέδιο εκχύλισης, κατά προτίμηση χωρίς την ανάγκη σταδίου καθαρισμού του δείγματος. Ενώ ο υγρό-υγρό διαχωρισμός (liquid-liquid partitioning), η εκχύλιση στερεάς φάσης (solid-phase extraction), η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (solid-phase microextraction), η εκχύλιση ράβδου ανάδευσης σε συνδυασμό με θερμική εκρόφηση (stir-bar sorptive extraction) χρησιμοποιούνται ακόμη, τα πολλαπλά βήματα διαχωρισμού του δείγματος και οι περίπλοκοι συνδυασμοί ποικίλων διαδικασιών έχουν εξαφανιστεί. Άλλες εναλλακτικές στην εκχύλιση με διαλύτη είναι η μέθοδος διασποράς υποστρώματος σε στερεά φάση (matrix solid-phase dispersion) και η υγρή εκχύλιση υπό πίεση (pressurized liquid extraction).



Σχήμα 12. Σύγκριση των βημάτων μεταξύ μεθόδου Mill's και μεθόδου QuEChERS

Πηγή: *Recent trends in liquid chromatography- tandem mass spectrometry to determine pesticides and their metabolites*, Carla Soler, Yolanda Pico, 2007

1.6.2. Ανάπτυξη των μεθόδων ταυτόχρονης ανίχνευσης πολλών υπό έλεγχο φυτοφαρμάκων

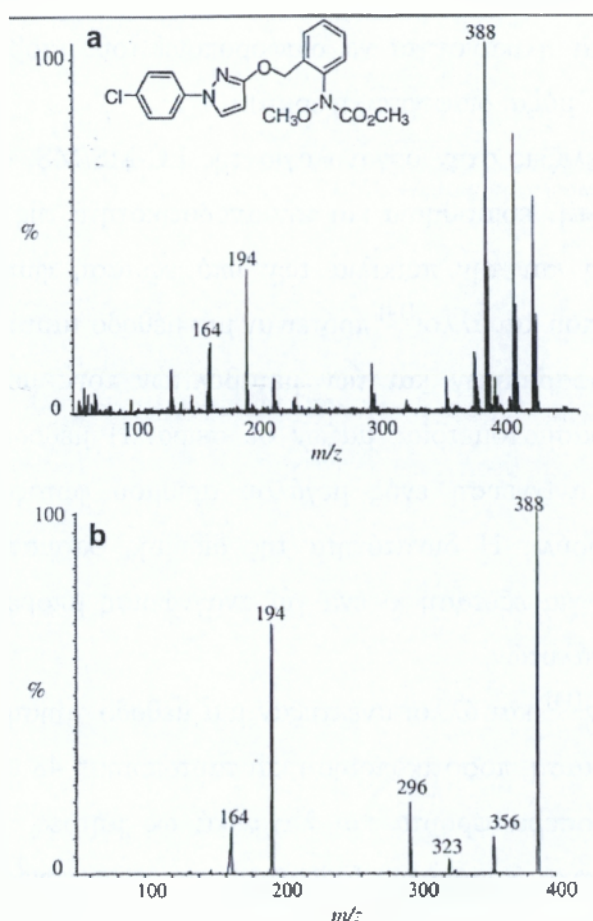
Μία πρόσφατη σύγκριση της ευαισθησίας της GC/MS και της LC-MS/MS υπογράμμισε την καλύτερη απόδοση της LC-MS/MS. Εξαιτίας του μικρού πλάτους της κορυφής στην αέρια/χρωματογραφία, η διάρκεια στις μεθόδους της GC/MS πρέπει να είναι 1s ή λιγότερο. Εφόσον έχει καταγραφεί ότι τα ιόντα χρειάζονται 40 ms, σε μία ανάλυση με αέρια χρωματογραφία μπορούν να εξετασθούν παράλληλα 250 ιόντα ή 83 φυτοφάρμακα με τρία χαρακτηριστικά ιόντα. Στην υγρή χρωματογραφία, το πλάτος είναι μεγαλύτερο επιτρέποντας και χρόνο 2,5 s. Κατά συνέπεια, 312 φυτοφάρμακα μπορούν θεωρητικά να εξετασθούν ταυτόχρονα. Στην πράξη, αυτές οι θεωρητικές στατιστικές δεν είναι πραγματοποιήσιμες, επειδή συνήθως στη μέση των χρωματογραφημάτων εκλούνται περισσότερα φυτοφάρμακα από την αρχή ή το τέλος. Ένα ακόμη χαρακτηριστικό της LC-MS/MS που δύναται να

χρησιμοποιηθεί είναι η ικανότητα να διαφοροποιεί τους ισοβαρείς αναλύτες που συνεκλούνται (ίδια μάζα, διαφορετική δομή).

Πρόσφατες εξελίξεις στην οργανολογία της LC-MS/MS, οι οποίες βελτίωσαν την εκλεκτικότητα, την ευαισθησία και την αποδοτικότητα της μεθόδου, καθιστούν πιθανή την αύξηση και την ποικιλία των υπό εξέταση φυτοφαρμάκων σε μία ανάλυση. Ο Heatherton και άλλοι^[14] πρότειναν μια μέθοδο ταυτόχρονης εξέτασης και ανάλυσης 73 φυτοφαρμάκων και των μεταβολιτών τους με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας/ φασματομετρίας μαζών σε σειρά. Η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε επιτυχώς για την ανίχνευση ενός μεγάλου αριθμού φυτοφαρμάκων σε μήλο, πορτοκάλι και μαρούλι. Η δυνατότητα της δίδυμης φασματομετρίας μαζών να εκπέμπει ένα σήμα για εξέταση κι ένα για αναγνώριση μπορεί να βοηθήσει στην ταυτοποίηση των αναλυτών.

Ο Hernandez^[14] και άλλοι ανέπτυξαν μία μέθοδο χρησιμοποιώντας την LC-MS/MS για την εξέταση, ποσοτικοποίηση και ταυτοποίηση 43 φυτοφαρμάκων και 9 μεταβολιτών σε τέσσερα φρούτα και λαχανικά ως μήτρες, επικεντρώνοντας το ενδιαφέρον στα θετικά ευρήματα. Ειδικότερα, οι συγγραφείς πρότειναν ότι, αν κάποια εκπομπή συγχέεται με ένα συστατικό της μήτρας, η ταυτοποίηση γίνεται προβληματική. Γι' αυτό το λόγο, πρότειναν τη χρήση του ανώτερου αριθμού διαθέσιμων εκπομπών για κάθε χημική ένωση, ώστε να επιτευχθεί η απόλυτη ταυτοποίηση της παρουσίας ενός αναλυτή, πραγματοποιώντας μια δεύτερη, ανεξάρτητη εισαγωγή στο σύστημα.

Μια άλλη σύγκριση μεταξύ LC/MS²/Electron Spray Ionization και GC/MS σε 500 φυτοφάρμακα που πραγματοποιήθηκε από τον Alder κατέδειξε την αποτελεσματικότητα της LC/MS² στην ανάλυση της πλειοψηφίας των επιλεχθέντων προς εξέταση φυτοφαρμάκων. Μόνο στα οργανοχλωριωμένα φυτοφάρμακα η ανίχνευση τους ήταν πιο αποτελεσματική με αέρια χρωματογραφία/ φασματομετρία μαζών.



Σχήμα 13. Για παράδειγμα, στο φάσμα (α) του Σχήματος 13 ενός νέου φυτοφαρμάκου, του pyraclostrobin, από τη δομή του φαίνεται ότι το κυρίαρχο μόριο είναι $[M+H]^+$ με λόγο φορτίου/μάζας 388 και ανταποκρίνεται στο ιόν που αφθονεί και περιέχει το ισότοπο ^{35}Cl .

Στο δεύτερο φάσμα (β) παράχθηκαν ιόντα με λόγο μάζας/ φορτίου 296, 194 και 164. Η μετάβαση $m/z\ 388 \rightarrow 194$ ανταποκρίνεται στη διάσπαση του αιθερικού δεσμού. Το ιόν με $m/z\ 296$ ανταποκρίνεται στην απώλεια 92 Da, τα οποία αποδίδονται στη μεθανόλη και στον μεθανικό μεθυλεστέρα.

Πηγή: *Recent trends in liquid chromatography- tandem mass spectrometry to determine pesticides and their metabolites*, Carla Soler, Yolanda Pico, 2007

1.6.3. Αναγνώριση αγνώστων, μη επιλεχθέντων φυτοφαρμάκων.

Μία άλλη προοπτική που θα πρέπει να διερευνηθεί είναι η ταυτοποίηση φυτοφαρμάκων «αγνώστων», και όχι των εξ αρχής εξεταζομένων, αλλά λίγες προσπάθειες έχουν γίνει μέχρι στιγμής προς αυτήν την κατεύθυνση. Ο Thurman ανέπτυξε ένα πλάνο αναγνώρισης χρησιμοποιώντας ένα συνδυασμό υγρής χρωματογραφίας/χρόνου πτήσης ιόντων/ ανιχνευτή μαζών και υγρής

χρωματογραφίας/τετραπολικής παγίδας ιόντων/ανιχνευτή μαζών (σε σειρά). Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην εύρεση της εμπειρικής φόρμουλας που αποκτάται μέσω της ακριβούς μάζας στα ευρετήρια/βάσεις δεδομένων των χημικών στοιχείων. Αυτό το πρωτόκολλο εφαρμόστηκε για την αναγνώριση αγνώστων φυτοφαρμάκων σε φλούδι ντομάτας, για την ανακάλυψη αγνώστων μεταβολιτών μυκητοκτόνων σε κίτρο και στην ανίχνευση χλωριωμένων φυτοφαρμάκων σε τρόφιμα.

Παρολαυτά, έχουν υπάρξει επιχειρήματα κατά της χρήσης της υγρής χρωματογραφίας/ δίδυμης φασματομετρίας μαζών για την ανίχνευση μη προεπιλεγμένων φυτοφαρμάκων. Αυτό οφείλεται στο χαρακτηριστικό της LC/MS² να ανιχνεύει με ακρίβεια ένα μεγάλο αριθμό αναλυτών, μόνο όταν έχουν προσδιοριστεί εκ των προτέρων, επειδή το πρόδρομο ιόν του αναλυτή πρέπει να έχει προεπιλεγεί. Ωστόσο, αυτό το χαρακτηριστικό της δίδυμης φασματομετρίας αποτελεί επιλογή, και όχι απαραίτητη προϋπόθεση. Τα όργανα που φέρουν εις πέρας μια ανάλυση με δίδυμη φασματομετρία, μπορούν επίσης να επιτύχουν ανάλυση με ένα πλήρες φάσμα μαζών, το οποίο δύναται ν' αναγνωρίσει συστατικά που δεν έχουν προεπιλεγεί της ανάλυσης.

Η ικανότητα του ανιχνευτή χρόνου πτήσης ιόντων να αναγνωρίσει «άγνωστα» συστατικά μελετήθηκε από τον Hernandez και άλλους συγγραφείς σε πολικά φυτοφάρμακα. Οι έρευνες έδειξαν ότι τα όργανα του ανιχνευτή χρόνου πτήσης είναι κατάλληλα και επαρκή να παρέχουν μία μοριακή φόρμουλα και να επιβεβαιώσουν ή να απορρίψουν μια προτεινόμενη δομή.

Καταλήγοντας, οι τεχνολογικές καινοτομίες έχουν καταστήσει τους ανιχνευτές μαζών πιο ευαίσθητους και επιλεκτικούς απ' ότι στο παρελθόν, επιτρέποντάς στην φασματομετρία μαζών να έχει εξελιχθεί σε μία καλή εναλλακτική της αέριας χρωματογραφίας για την εξέταση συγκεκριμένων φυτοφαρμάκων. Στο πεδίο αυτό, το τριπλό τετράπολο είναι ο προτιμότερος ανιχνευτής μαζών, επειδή παρέχει καλύτερα όρια ανίχνευσης, ενώ ταυτόχρονα αναγνωρίζει τον υψηλότερο αριθμό φυτοφαρμάκων με αξιοπιστία κατά τον ποιοτικό προσδιορισμό και αποφυγή του προβλήματος της μήτρας (matrix effect) κατά τον ποσοτικό προσδιορισμό.

Όσον αφορά την LC/MS², εκτός από την υψηλή ευαισθησία της στις περισσότερες ομάδες φυτοφαρμάκων, προσφέρει κι ένα άλλο πλεονέκτημα: την απλοποίηση της διαδικασίας εκχύλισης του δείγματος. Οι παραδοσιακές μέθοδοι εκχύλισης συνοδεύονται από χρονοβόρες διαδικασίες διαχωρισμού και καθαρισμού. Η μείωση

των βημάτων καθαρισμού του δείγματος αποτελεί ρηξικέλευθο επίτευγμα στο πεδίο της ανάλυσης υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων.

Για την αναγνώριση «αγνώστων» φυτοφαρμάκων απαιτείται ακόμη έρευνα, καθώς η υπάρχουσα είναι ανεπαρκής. Μέχρι στιγμής είναι γνωστό ότι δεν αρκεί μόνο ένα όργανο για να επιτευχθεί αυτό το κατόρθωμα, αλλά αρκετά όργανα που αλληλοσυμπληρώνονται. Οι ανιχνευτές μαζών συνδεδεμένοι με τετράπολο φαίνονται ως μια καλή λύση γι' αυτό το πρόβλημα. Τέλος, υπάρχουν και νέοι αναλυτές μαζών, οι οποίοι ελέγχονται ακόμη και θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στο μέλλον.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΥΠΟΛΛΕΙΜΑΤΩΝ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ

2.1 UPLC-MS/MS

Τα τελευταία 30 χρόνια η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) έχει καθιερωθεί ως μια από τις πλέον διαδεδομένες αναλυτικές τεχνικές παγκοσμίως. Το «πάντρεμά» της με την δίδυμη φασματομετρία μαζών την κατέστησε δημοφιλή τεχνική ανάλυσης σ' ένα μεγάλο αριθμό υπολειμμάτων (ημι)πολικών φυτοφαρμάκων σε τρόφιμα.

Οι παράμετροι μια συμβατικής στήλης υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης^[15] είναι οι εξής:

- (i) εύρος μήκους 10-25 cm
- (ii) διάμετρος 2,1-4,6 mm
- (iii) μέγεθος σωματιδίων 3-5 μm

Οι μέθοδοι αντίστροφης φάσης με σταδιακή ανάσχεση αποτελούν την συνήθη επιλογή στην ανάλυση πολλαπλών υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων. Οι πιέσεις που ασκούνται υπό αυτές τις συνθήκες δεν μπορούν να υπερβούν τα 6000 psi, τα οποία αποτελούν το ανώτατο όριο που μπορούν να πραγματοποιήσουν οι κοινές αντλίες υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης στα συνήθως χρησιμοποιούμενα όργανα.

Λόγω της ανάγκης για αύξηση της ταχύτητας του χρωματογραφικού διαχωρισμού, πρέπει να ληφθούν υπόψη τα κάτωθι αναφερόμενα:

(α) Όσον αφορά την αύξηση του ρυθμού ροής της κινητής φάσης, το ισοδύναμο ύψος της θεωρητικής πλάκας (Height Equivalent to Theoretical Plate) αυξάνεται όταν χρησιμοποιούνται στήλες με σωματίδια του συνήθους μεγέθους (3-5 μm), παρά τη μείωση του χρόνου διαχωρισμού. Συν τοις άλλοις, ο υψηλός ρυθμός ροής δεν είναι συμβατός με την τεχνική του Ηλεκτροψεκασμού (ES).

(β) Θεωρητικά, η χρήση μικρών στηλών με δίδυμη φασματομετρία μαζών και τετραπολικό ανιχνευτή θα μπορούσε να αποτελέσει λύση. Στην πράξη, όμως, η χρήση μικρών στηλών έχει ως αποτέλεσμα την συνέκλουση των συστατικών τη μήτρας (matrix effect), ειδικά όταν αναλύονται περίπλοκα δείγματα, όπως ένα τρόφιμο.

(γ) Η χρήση στηλών μετρίου μεγέθους σε συνδυασμό με σωματίδια μικρού μεγέθους (μικρότερα των 2 μm) φαντάζει ως η ιδανική λύση που συνδυάζει και την υψηλή διαχωριστικότητα και την ταχύτητα κατά το διαχωρισμό ακόμη και περίπλοκων

δειγμάτων, όπως τα τρόφιμα. Αυτό, όμως, δεν μπορεί να επιτευχθεί με την οργανολογία της HPLC. Το πρώτο όργανο, ικανό να εκτελέσει διαχωρισμό υπό συνθήκες πίεσης 15000 psi, χρησιμοποιώντας στήλες (100-150 mm, 2,1 mm) με πορώδη σωματίδια μεγέθους 1,7 μm και υψηλό ρυθμό ροής χωρίς επιπτώσεις στην ανάλυση, κυκλοφόρησε στην αγορά πριν λίγα χρόνια.

Πρόκειται για μια δυναμική μέθοδο με αρκετές δυνατότητες. Η υγρή χρωματογραφία υπερ-υψηλής απόδοσης (UPLC) έχει εφαρμοσθεί με επιτυχία σε αναλύσεις διαφορετικής κλίμακας παρέχοντας αποτελέσματα για πολύ μεγάλη ποικιλία χημικών ουσιών και δυνατότητες που έχουν πλέον αναγνωρισθεί από την πλειοψηφία των ερευνητών. Ιστορικά έχει προέλθει από τη σύμπραξη τριών ερευνητικών περιοχών, αυτών της χημικής τεχνολογίας, της τεχνολογίας ανιχνευτών και της διαχείρισης δεδομένων. Σχετικά πρόσφατα δυο ερευνητές, οι J. Jorgensen και M. Lee από τα πανεπιστήμια N. Carolina και Brigham Young^[16] αντίστοιχα, δημοσίευσαν μελέτες όπου φανέρωσαν κάποιες πρόσθετες δυνατότητες της χρωματογραφίας του συγκεκριμένου είδους.

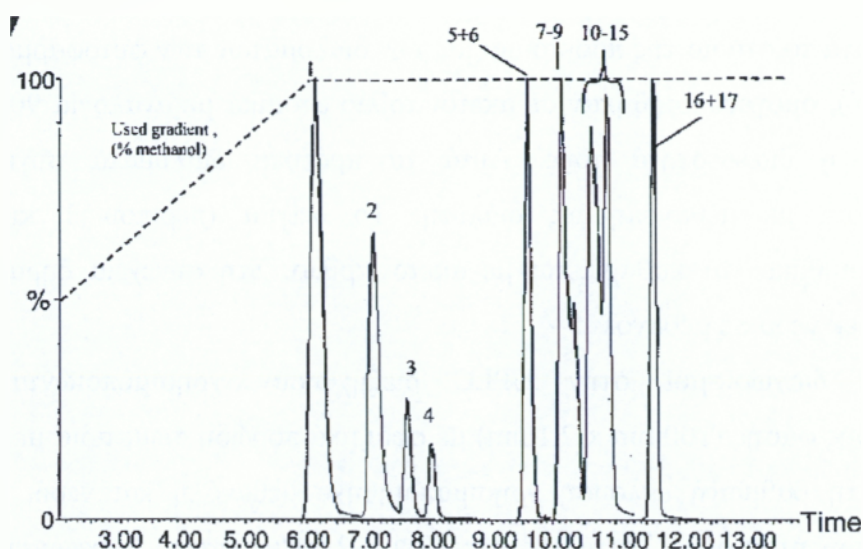
Η βασική τους θεώρηση αναφέρει ότι με τη χρήση μικρότερων σωματιδίων αδρανούς υλικού ως στατική φάση (stationary phase) μπορούν να επεκταθούν σημαντικά τα όρια της ανάλυσης. Οι βασικές αρχές αυτής της προσέγγισης προκύπτουν εύκολα από τη γνωστή εξίσωση van Deemter. Η τελευταία είναι μια εμπειρική φόρμουλα που περιγράφει τη σχέση μεταξύ της γραμμικής ταχύτητας και του HETP (Height Equivalent to a Theoretical Plate, ισοδύναμο ύψος θεωρητικής πλάκας). Το τελευταίο ισούται με L/N , όπου L το μήκος της στήλης και N ο αριθμός των θεωρητικών πλακών που αυτή περιέχει. Όσο μικρότερη η τιμή του HETP τόσο καλύτερη η απόδοση της διάταξης. Από αυτά γίνεται αντιληπτό ότι το μέγεθος των σωματιδίων που χρησιμοποιούνται στη στήλη είναι μια από τις παραμέτρους που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό της θεωρητικής απόδοσης.

Εξυπηρετώντας αυτόν ακριβώς το σκοπό, δηλαδή να δοκιμάσει πειραματικά τις ικανότητες της νέας μεθόδου, της υγρής χρωματογραφίας υπερ-υψηλής απόδοσης (UPLC) και να τις συγκρίνει με αυτές της HPLC, δημοσιεύθηκε το Φεβρουάριο το 2006^[15] το άρθρο των Tomas Kovalczuk, Martin Jech, Jan Poustka, Jana Hajslova. Τα προς εξέταση φυτοφάρμακα ήταν 17 (bitertanol, imazalil, flufenoxuron, thiabendazole, prochloraz κ.α.). Για το **πείραμα**, ως διαλύτες αναλυτικής καθαρότητας χρησιμοποιήθηκε μεθανόλη και ακετονιτρίλιο και τα δείγμα ήταν μήλα οικολογικής καλλιέργειας (golden delicious).

Κατά το στάδιο της προετοιμασίας των διαλυμάτων των φυτοφαρμάκων ($0,3-3 \text{ mg mL}^{-1}$), ομογενοποιήθηκαν σε ακετονιτρίλιο ατομικά με αναλογία 90:10 για να βελτιωθεί η διαλυτότητά τους. Αυτά τα πρότυπα διαλύματα συγκέντρωσης αναμίχθηκαν με μεθανόλη ως διαλύτη. Το δείγμα (περίπου 1 κιλό μήλα) ομογενοποιήθηκε και καθαρίζεται με ακετονιτρίλιο. Στη συνέχεια ξηραίνεται και διαλύεται εκ νέου σε μεθανόλη.

Οι διαχωρισμοί στην UPLC διεξήχθησαν χρησιμοποιώντας στήλες αντίστροφης φάσης ($100\text{mm} \times 2,1\text{mm}$) με σφαιρικά πορώδη σωματίδια μεγέθους $1,7 \mu\text{m}$. Για τη βαθμωτή έκλουση χρησιμοποιήθηκε μεθανόλη και νερό. Ο χρόνος διαχωρισμού ήταν δέκα λεπτά και επιπλέον 2 λεπτά μετά το διαχωρισμό για την ανάκτηση. Ο ρυθμός ροής ήταν $0,3 \text{ mL}^{-1}$, η θερμοκρασία της στήλης και του δείγματος 25°C και η χωρητικότητα της σύριγγας $5 \mu\text{L}$ σε όλα τα πειράματα. Από την άλλη πλευρά, στην HPLC χρησιμοποιήθηκαν στήλες αντίστροφης φάσης ($150\text{mm} \times 3\text{mm}$). Όπως και στην UPLC, στην βαθμωτή έκλουση χρησιμοποιήθηκαν νερό και μεθανόλη. Ο ρυθμός ροής ήταν $0,3 \text{ mL/min}^{-1}$, η θερμοκρασία της στήλης και του δείγματος 25°C και η χωρητικότητα της σύριγγας $5 \mu\text{L}$. Ο χρόνος διαχωρισμού, όμως, ήταν 15 λεπτά και 10 ακόμη για τις ανακτήσεις. Στην δίδυμη φασματομετρία μαζών συνδέθηκε τετραπολικός αναλυτής με την τεχνική του ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI).

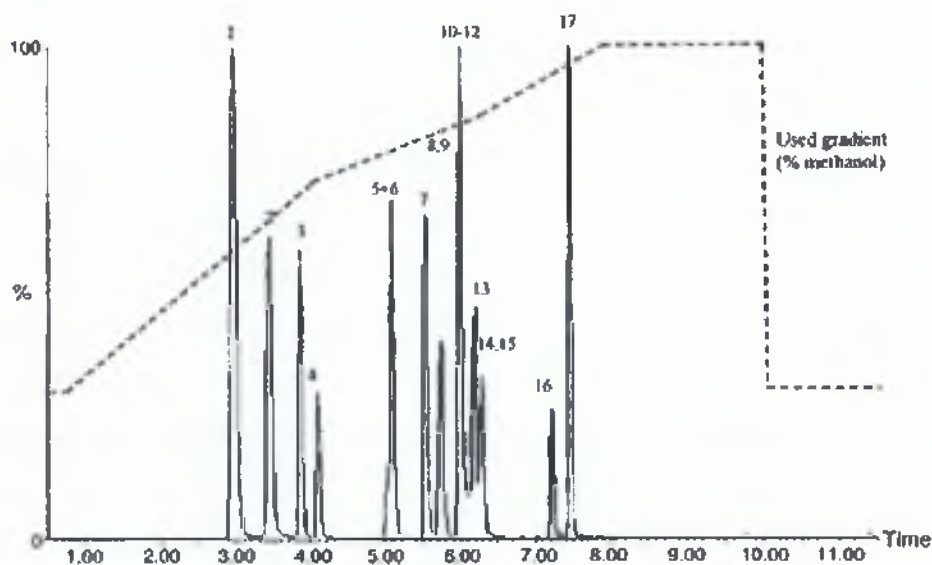
Κατά τον διαχωρισμό με γρήγη χρωματογραφία υψηλής απόδοσης, ο χρόνος της βαθμωτής έκλουσης ξεκίνησε με το 50% της μεθανόλης και στα 6 λεπτά είχα φτάσει στο 100%. Ύστερα οι αναλυτές εκλούστηκαν υπό ισοκρατικές συνθήκες, επιτρέποντας σχετικά γρήγορη έκλουση των αναλυτών με υψηλή k' . Υπό ρεαλιστικές συνθήκες, η ταυτόχρονη εξέταση πολλών υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων επιτυγχάνεται σπανίως. Σε αυτήν την περίπτωση, οι αναλύτες σκανάρονται με παρακολουθήσεις επιλεγμένης αντίδρασης (MRM). Σε κάθε MRM, μόνο συγκεκριμένος αριθμός επιλεγμένων εκπομπών του δίδυμου φασματογράφου ελέγχεται.



Σχήμα 14. HPLC-MS/MS ως μέθοδος ανίχνευσης 17 (ημι)πολικών φυτοφαρμάκων σε μήλα.

Πηγή: *Ultra-performance liquid chromatography- tandem mass spectrometry: A novel challenge in multiresidue pesticide analysis in food*, Institute of Chemical Technology, Department of Food Chemistry and Analysis, Czech Republic, 16 June 2006

Με τη χρήση UPLC, ο χρόνος ανάλυσης μειώθηκε κατά το ήμισυ και, κατά συνέπεια, μειώθηκε και η κατανάλωση οργανικών διαλυτών.



Σχήμα 15. UPLC-MS/MS ως μέθοδος ανίχνευσης 17 (ημι)πολικών φυτοφαρμάκων σε μήλα.

Πηγή: *Ultra-performance liquid chromatography- tandem mass spectrometry: A novel challenge in multiresidue pesticide analysis in food*, Institute of Chemical Technology, Department of Food Chemistry and Analysis, Czech Republic, 16 June 2006

Για τον υπολογισμό της αποδοτικότητας της στήλης χρησιμοποιείται σε περίπτωση ισοκρατικής έκλουσης ο εξής τύπος:

$$N_{isocratic} = 5,54 \left(\frac{t_r}{W_{0,5}} \right)^2$$

Για να αποφευχθεί υπερεκτίμηση του N που μπορεί να συμβεί στα δεδομένα που ανακτούν τα συστήματα που χρησιμοποιούν βαθμωτή έκλουση, η προηγούμενη εξίσωση διορθώθηκε από τον Snyder ως εξής:

$$N_{gradient} = \left[\frac{(2,3+1)Gt_0}{2,3b \times 1,699W_{0,5}} \right]^2 \quad (1)$$

όπου G ο παράγοντας συμπίεσης (compression factor) που αποτελεί σταθερά, οι πειραματικές ποσότητες t_0 και $W_{0,5}$ καθορίζονται από το χρωματογράφημα, το b αποτελεί την βαθμωτή κλίση (gradient steepness) και υπολογίζεται με τον εξής τύπο: $b = \Phi' S t_0$.

Μια από τις σημαντικότερες παραμέτρους που χαρακτηρίζει την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης είναι η διαχωριστικότητα των κορυφών (peak capacity), δηλαδή ο μεγαλύτερος αριθμός εκλούσεων που χωράνε σ' ένα χρωματογράφημα με διαλυτότητα $R=1$.

$$PC_{max} = 1 + \frac{t_0}{W} \quad (2)$$

Η εισαγωγή της υγρής χρωματογραφίας υπερ-υψηλής απόδοσης είχε ως αποτέλεσμα όχι μόνο τη μείωση του χρόνου διαχωρισμού, αλλά και την περαιτέρω βελτίωση στην απόδοση των καθοριστικών σταδίων.

Ο λόγος του σήματος προς το θόρυβο (signal to noise ratio- S/N) αποτελεί ένα εξίσου σημαντικό χαρακτηριστικό της ταυτόχρονης ανίχνευσης πολλών φυτοφαρμάκων σε ένα δείγμα. Στην πράξη, ο λόγος σήματος/θορύβου χρησιμοποιείται για την πρόβλεψη του ορίου ποσοτικοποίησης.

Στην παρούσα έρευνα, η χρήση της υγρής χρωματογραφίας υπερ-υψηλής ανάλυσης βελτίωσε τις τιμές S/N της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης και μείωσε το όριο ποσοτικοποίησης, όπως φαίνεται στο παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 1. Το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) στα παρακάτω φυτοφάρμακα με Υγρή Χρωματογραφία Υπερ-υψηλής Απόδοσης (UPLC) και Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC).

ΕΥΤΟΞΕΑΡΜΑΚΑ	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)		[(S/N) _{UPLC}]/[(S/N) _{HPLC}]
	UPLC	HPLC	
Καρβενδάζιμ	0.5	2.0	5
Θιαβενδαζόλη	0.5	2.0	4
Καρμποφουράν	0.5	2.0	5
Καρβαρύλ	0.5	2.0	9
Μεθιοκάρμπ	1.0	2.0	7
Λινουρόν	1.0	2.0	6
Ιμαζαλίλ	8.0	8.0	1
Τεμπουκοναζόλη	2.0	4.0	10
Διφλουβενζουρόν	8.0	8.0	1
Ξλουσιλαζόλη	4.0	4.0	1
Εποξικοναζόλη	1.0	4.0	7
Μπιπερανόλ	8.0	8.0	1
Προπικοναζόλη	4.0	4.0	2
Τριφλουμουρόν	2.0	4.0	7
Προχλωράζ	4.0	8.0	5
Τεφλοβενζουρόν	4.0	8.0	4
Ξλουφενοξουρόν	1.0	4.0	6

Πηγή: *Ultra-performance liquid chromatography- tandem mass spectrometry: A novel challenge in multiresidue pesticide analysis in food*, Institute of Chemical Technology, Department of Food Chemistry and Analysis, Czech Republic, 16 June 2006

Η συγκριτική ανάλυση των 17 φυτοφαρμάκων κατέγραψε τις δυνατότητες της UPLC να αντικαταστήσει την κλασική HPLC.

Τα αποτελέσματα του πειράματος μπορούν να συνοψιστούν στα εξής:

- 1) Ο αριθμός των θεωρητικών πλακών που σκιαγραφεί τη διαχωριστική ικανότητα ήταν για τους περισσότερους αναλυτές υψηλότερος στο σύστημα που χρησιμοποιούσε την HPLC και με μικρότερη μεταβλητότητα σε σύγκριση με την UPLC.
- 2) Οι τιμές του ισοδύναμου ύψους της θεωρητικής πλάκας που συγκρατήθηκαν στην UPLC ήταν, ως επί των πλείστων, υψηλότερες, αλλά η μεταβλητότητα τους ήτο επίσης υψηλή.
- 3) Παρόμοιες τιμές παρατηρούνται και στα δύο συστήματα υγρής χρωματογραφίας/ δίδυμης φασματομετρίας μαζών σε ό,τι αφορά τη

διαχωριστική ικανότητα και τη συμμετρία των κορυφών. Ωστόσο, στην UPLC ο χρόνος μειώθηκε κατά το ήμισυ, καθώς και η κατανάλωση διαλυτών μειώθηκε αισθητά.

- 4) Η UPLC παρείχε βελτιωμένο S/N (signal to noise ratio) με μειωμένα όρια ποσοτικοποίησης (LOQ) για την πλειονότητα των σκευασμάτων. Τα όρια ποσοτικοποίησης των imazalil, bitertanol, flusilazole και propiconazole δεν επηρεάστηκαν από τη χρήση της UPLC χάρη στο παρόμοιο εύρος κορυφής και στα δύο συστήματα διαχωρισμού.

Ουσιαστικά, η χρήση της υγρής χρωματογραφίας υπερ-υψηλής απόδοσης αποκαλύπτει μια δυνατότητα όπου τόσο η διακριτική ικανότητα των κορυφών όσο και η ταχύτητα του διαχωρισμού οδηγούνται σε νέα όρια (ως διακριτική ικανότητα κορυφών ορίζεται ο αριθμός των κορυφών που μπορούν να ανιχνευθούν στη μονάδα του χρόνου). Επιπρόσθετα, η χρήση μικρότερων σωματιδίων φέρνει και μια σειρά από άλλα πλεονεκτήματα όπως ταχύτητα, μικρότερο μήκος στηλών, υψηλότερους ρυθμούς ροής και καλύτερη ανάλυση. Αυτές οι παράμετροι μπορούν ρυθμιστούν έτσι ώστε να βρεθεί ο καλύτερος συνδυασμός ταχύτητας και ανάλυσης για έναν δεδομένο διαχωρισμό.

Ένα επιπλέον χαρακτηριστικό γνώρισμα της νέας αυτής μεθόδου είναι η ευαισθησία της. Λόγω ακριβώς της μειωμένης διασποράς των ζωνών κατά τη διάρκεια του διαχωρισμού τα κατάλοιπα της ανάλυσης βρίσκονται σε υψηλότερη συγκέντρωση στο σημείο της ανίχνευσης. Θα πρέπει, επίσης, να σημειωθεί ότι τα 3 μm αποτελούν το όριο στο μέγεθος των σωματιδίων για τις συμβατικές στήλες μήκους 15 cm, όταν σε αυτές πρόκειται να εφαρμοσθούν οι βέλτιστες τιμές ροής και εντός των ορίων πίεσης, με χρήση οποιασδήποτε αναλογίας μεθανόλης - νερού ως διαλύτη. Αξίζει να σημειωθεί ότι μέχρι σήμερα το μικρότερο μέγεθος σωματιδίων που έχει αναφερθεί ότι χρησιμοποιήθηκε σε εφαρμογές HPLC είναι τα 0,67 μm .

Η ανάπτυξη σωματιδίων με αυτό το μέγεθος και η επανειλημμένη εισαγωγή τους μέσα στις στήλες αποτελούν από μόνα τους μια πρόκληση. Προς το παρόν, μη πορώδη σωματίδια μεγέθους 1,5 μm διατίθενται εμπορικά αν και χαρακτηρίζονται από μικρή επιφάνεια. Αυτό έχει ως συνέπεια μικρή ικανότητα κατακράτησης και φορτίου. Για το λόγο αυτό, προτιμούνται πορώδη σωματίδια τα οποία είναι ανθεκτικά σε υψηλές πιέσεις συνδυασμένα με καλή ομοιομορφία στην κατανομή τους εντός της

στήλης. Επιπλέον, θα πρέπει το εσωτερικό της στήλης να είναι αρκετά λείο, ώστε τα σωματίδια να στοιβάζονται κατά τον καλύτερο δυνατό τρόπο.

Τα φίλτρα που βρίσκονται στην έξοδο της στήλης θα πρέπει να επανασχεδιαστούν, έτσι ώστε να συγκρατούν μικρότερα σωματίδια και ταυτόχρονα να παρεμποδίζουν το φράξιμο της. Έχει υπολογιστεί ότι για να επιτευχθεί η μέγιστη απόδοση σε μια στήλη μήκους 10 cm, η οποία περιέχει σωματίδια 1,7 μm, απαιτείται πίεση ~15000 psi ενώ παράλληλα για επίτευξη σταθερής ροής και αποφυγή τυχόν διακυμάνσεων της θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη και η συμπιεστότητα του διαλύτη.

Με σκοπό τον καλύτερο διαχωρισμό απαιτείται μείωση του λεγόμενου «νεκρού χρόνου». Αυτό έχει ως συνέπεια την ανάγκη χρήσης ανιχνευτή ο οποίος θα είναι σε θέση να λειτουργήσει με ποσότητες έως και 500 nl και συχνότητες έως και 40 σημεία ανά sec, χωρίς καμία παραχώρηση στη γραμμικότητα ή την ευαισθησία του. Και, βέβαια, όλες οι παραπάνω συνθήκες θα πρέπει να εκπληρώνονται σε ένα σύστημα το οποίο να έχει όγκο συγκρίσιμο αν όχι μικρότερο από τα σημερινά συνήθη συστήματα HPLC.

Γίνεται τελικά προφανές ότι μια τέτοια συσκευή δεν μπορεί να κατασκευαστεί απλώς με τη μετατροπή μιας αντίστοιχης HPLC. Η αντιμετώπιση θα πρέπει να περιλαμβάνει επανασχεδιασμό από την αρχή όλων των μερών και εξαρτημάτων τηρουμένων αυτών των προϋποθέσεων.

Όλα αυτά τα βελτιστοποιημένα χαρακτηριστικά λειτουργίας ορίζουν τελικά και τη νέα τεχνική, η οποία είναι πλέον γνωστή ως Υγρή Χρωματογραφία Υπερ-υψηλής Απόδοσης (Ultra-Performance Liquid Chromatography, UPLC). Το σύστημα UPLC που παρουσιάστηκε στις ΗΠΑ^[16] χρησιμοποιεί υβριδικά σωματίδια μεγέθους 1,7 μm τα οποία προέρχονται από συμπύκνωση 1,2-δι(τριεθόξυσιλανο)αιθανίου και τετρα-εθοξυσιλανίου. Το υλικό αυτό έχει επιδείξει σημαντική αντοχή σε ευρεία περιοχή τιμών pH και θερμοκρασίας επιτρέποντας τη χρήση του ακόμη και σε έντονα αλκαλικό περιβάλλον. Οι πρώτες δοκιμές που έχουν γίνει σε φαρμακευτικά προϊόντα με σημαντικές απαιτήσεις είναι ιδιαίτερα ενθαρρυντικές. Σε δείγματα, όπου με την HPLC μπορούσαν να ανιχνευθούν 2000 συστατικά, τώρα διαχωρίζονται ταυτόχρονα περισσότερα από 10000 με παράλληλη αύξηση της ταχύτητας και της διακριτικής ικανότητας.

Στην UPLC, η ευκρίνεια αυξάνει, όχι μόνο λόγω του καλύτερου σχηματισμού των κορυφών, αλλά και λόγω της αυξημένης απόδοσης του ιονισμού. Επίσης η οποιαδήποτε παρεμβολή από τις υπόλοιπες χημικές ουσίες μειώνεται σημαντικά

οπότε λαμβάνονται φάσματα μάζας σημαντικά καλύτερης ποιότητας. Οι όποιες διακυμάνσεις της πίεσης παρατηρούνται λόγω των κύκλων που εφαρμόζονται κατά τη διάρκεια λειτουργίας τη συσκευής δεν φαίνεται να έχουν κάποια επίδραση στην αντοχή των στηλών που χρησιμοποιούνται. Μελέτες αντοχής μέχρι και 1000 κύκλους δεν έδειξαν κανένα ίχνος κόπωσης των υλικών ή της συνδεσμολογίας. Ο κύκλος ζωής των στηλών της UPLC φαίνεται να είναι συγκρίσιμος με τον αντίστοιχο των στηλών της HPLC. Παρολαυτά, αυτήν τη στιγμή εξακολουθούν να υπάρχουν απορίες σχετικά με τα πραγματικά όρια της συγκεκριμένης τεχνικής. Οι ερευνητές που τη δημιούργησαν έχουν χρησιμοποιήσει σε πειραματικό επίπεδο πιέσεις μέχρι και 105000 psi αλλά θεωρείται ότι τέτοιες τιμές δεν είναι δυνατό να ενσωματωθούν αυτήν τη στιγμή σε εμπορικές συσκευές.

2.2 GC/MS και LC/MS ως μέθοδοι ανάλυσης υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων

Τα χημικά και φυσικά συστατικά που συνθέτουν τα φυτοφάρμακα διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους. Κάποια σκευάσματα περιέχουν αλογόνα, άλλα φώσφορο ή θείο ή άζωτο, γεγονός που επηρεάζει τον τρόπο ανίχνευσης του φυτοφαρμάκου. Μεγάλος αριθμός φυτοφαρμάκων είναι πτητικά, ενώ άλλα δεν εξαερώνονται. Αυτή η ποικιλία κωλύει την ανάπτυξη μίας ενιαίας μεθόδου ανάλυσης που θα καλύπτει όλη την γκάμα των φυτοφαρμάκων.

Παρά τη δυσκολία εύρεσης μίας ενιαίας μεθόδου, η συχνότητα θέσπισης νομολογίας με θέμα τα ανώτερα όρια περιεκτικότητας των τροφίμων, του πόσιμου νερού και του καλλιεργήσιμου εδάφους σε φυτοφάρμακα, έχοντας πάντα ως σκοπό την αποτελεσματικότερη προστασία της δημόσιας υγείας, υπογραμμίζει πόσο σπουδαία είναι η χρήση μεθόδων ικανών να ανιχνεύουν πολλές ουσίες ταυτόχρονα. Εξάλλου, μία μέθοδος που ανιχνεύει μόνο μια ουσία τη φορά είναι, εκτός από χρονοβόρα, και ιδιαίτερα κοστοβόρα για τα εργαστήρια.

Από τις αρχές της δεκαετίας του '70, η πιο συχνά επιλεγμένη μέθοδος^[17] ανίχνευσης υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων είναι η αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με ανιχνευτή δέσμωσης ηλεκτρονίων, ανιχνευτή αζώτου-φωσφόρου ή φωτομετρικό ανιχνευτή φλόγας. Στις μέρες μας, με την σύνδεση του αέριου χρωματογράφου με φασματογράφο, ο καθορισμός και η ταυτοποίηση των υπολειμμάτων δύναται να επιτευχθεί ταυτόχρονα με μία μόνο ανάλυση.

Συγκρίνοντας την ευαισθησία του GC/MS με του κλασικού GC, αυτή κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα. Η επιλεκτικότητα, όμως, του GC/MS μπορεί να

προσαρμοστεί επιλέγοντας τα κατάλληλα μόρια ή ιόντα, ώστε ν' αποφευχθεί η σύγχυση με άλλα συστατικά του δείγματος. Κατά συνέπεια, η αξία της χρήσης του GC σε συνδυασμό με ανιχνευτή δέσμευσης ηλεκτρονίων, φωτομετρικό ανιχνευτή φλόγας κλπ στα εργαστήρια έχει υποβαθμιστεί.

Τα τελευταία χρόνια, η εμπορική διαθεσιμότητα του ιονισμού με ατμοσφαιρική πίεση προκάλεσε ριζική αλλαγή στη χρήση της υγρής χρωματογραφίας/ φασματομετρίας, λόγω της υψηλότερης ευαισθησίας της σε σχέση με τους παραδοσιακούς ανιχνευτές, όπως ο ανιχνευτής με ηλεκτροψεκασμό (ESI) ή ο ανιχνευτής χημικού ιονισμού με ατμοσφαιρική πίεση (APCI). Επιπλέον, ο συνδυασμός με τον φασματογράφο σε σειρά και το πρόγραμμα ελεγχόμενης αντίδρασης (SRM) κατέστησε δυνατή την παράβλεψη πολλών βημάτων καθαρισμού του δείγματος.

Στις 3 Ιουνίου 2006, δημοσιεύθη πείραμα^[17] που διεξήχθη από γερμανούς επιστήμονες χρησιμοποιώντας αέριο χρωματογράφο/ φασματογράφο και υγρό χρωματογράφο/ φασματογράφο σε σειρά για την ανίχνευση υπολειμμάτων επιλεγμένων φυτοφαρμάκων. Το πείραμα αποσκοπούσε στο να βρεθούν τα πλεονεκτήματα της κάθε μεθόδου και η συγκριτική μελέτη τους.

Τα προς εξέταση φυτοφάρμακα και οι μεταβολίτες τους επιλέγησαν με κριτήριο την παρουσία τους ως ρυθμιζόμενες ουσίες στην νομοθεσία της ευρωπαϊκής ένωσης, τη συχνότητα της χρήσης τους και την δυνατότητα ανίχνευσής τους με την τεχνική της GC-MS ή/και της LC-MS/MS. Με βάση τα προαναφερθέντα κριτήρια, 458 φυτοφάρμακα και 42 σημαντικοί μεταβολίτες επιλέγησαν: 81 οργανοφωσφορικά, 26 σουλφονυλουρία, 23 τριαζίνες, 19 πυρεθροειδείς ενώσεις κ.α.

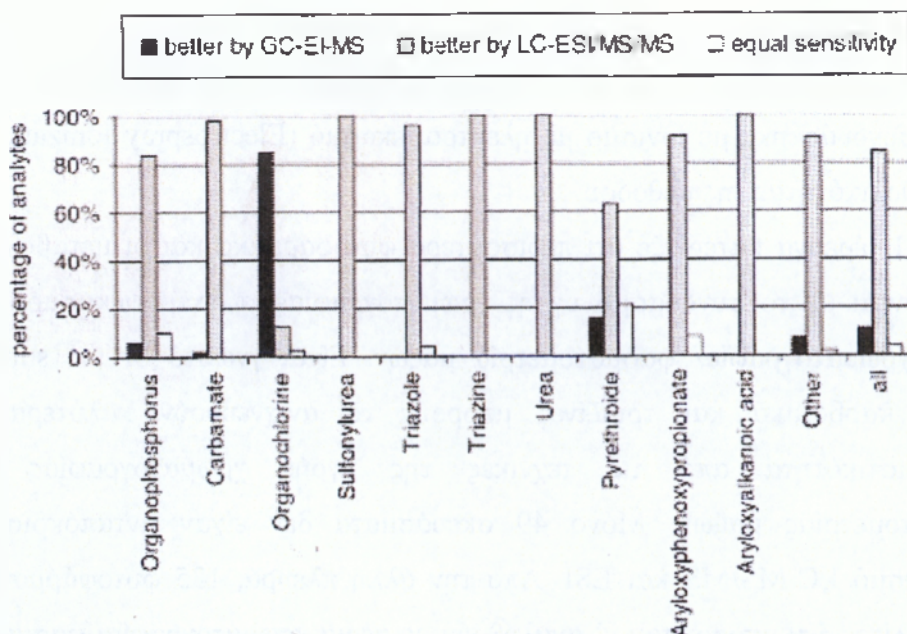
Οι περισσότερες δημοσιευμένες μελέτες για την ανίχνευση φυτοφαρμάκων με GC-MS έλαβαν χώρα με μονό τετράπολο και με βομβαρδισμό με δέσμη ηλεκτρονίων (Electron Impact) . Τα πλεονεκτήματα του βομβαρδισμού με δέσμη ηλεκτρονίων είναι η μικρή επιρροή στη μοριακή δομή και οι καλές ανακτήσεις. Αντιθέτως, ο χημικός ιοντισμός (θετικός ή αρνητικός) χρησιμοποιείται πιο σπάνια, λόγω της εκλεκτικότητας του με συγκεκριμένα μόνο φυτοφάρμακα (πχ οργανοαλογόνα, πυρεθροειδή).

Σε αντίθεση με την αέρια χρωματογραφία, στην **υγρή χρωματογραφία** δε χρησιμοποιείται μονό τετράπολο, λόγω της έντασης των σημάτων (χημικού θορύβου) του πρότυπου διαλύματος του δείγματος. Γι' αυτό το λόγο, ο τριπλός τετραπολικός αναλυτής μαζών σε σύζευξη επιλέγεται λόγω της ευαισθησίας του, της

επιλεκτικότητάς του και της ικανότητάς του να μειώνει την ένταση του χημικού θορύβου στο φόντο. Εν τέλει, η υγρή χρωματογραφία/ φασματομετρία μαζών σε σειρά συνδυάστηκε με ιονισμό με ηλεκτροψεκασμό (Electrospray Ionization), λόγω της καθολικότητας της μεθόδου.

Η έρευνα κατέδειξε ότι περισσότερα φυτοφάρμακα και οι μεταβολίτες τους αναλύονται με το συνδυασμό υγρής χρωματογραφίας/ ηλεκτροψεκασμού παρά με αέρια χρωματογραφία/ φασματομετρία μαζών. Είναι γνωστό ότι το sulfonyl και πολλά καρβαμικά και τριαζίνες μπορούν να ανιχνευθούν καλύτερα ή κατ' αποκλειστικότητα από τις τεχνικές της υγρής χρωματογραφίας/ δίδυμης φασματομετρίας μαζών. Μόνο 49 σκευάσματα δεν είχαν ανταπόκριση με το συνδυασμό LC-MS/MS και ESI. Από την άλλη πλευρά, 135 φυτοφάρμακα και οι μεταβολίτες δεν μπορούσαν ν' αναλυθούν με αέρια χρωματογραφία/ φασματομετρία μαζών και βομβαρδισμό με δέσμη ηλεκτρονίων, κυρίως λόγω της ασυμβατότητας της εξάτμισης του μορίου στον εισαγωγέα της αέριας χρωματογραφίας. Επιπλέον, σύμφωνα με την έρευνα, αρκετά φυτοφάρμακα που αναγνωρίζονται με ανιχνευτή δέσμησης ηλεκτρονίων (ECD) με αέρια χρωματογραφία δεν ανταποκρίνονται με LC-MS/MS. Αυτό συμβαίνει, όπως είναι γνωστό, με τις οργανοχλωριωμένες ενώσεις, αλλά και φυτοφάρμακα, όπως benfluralin, chlozolate, dinobuton, etridiazole, flumethralin, nitrofen και vinclozolin. Στις εξαιρέσεις ανήκουν το fenchlorphos, το οποίο ανιχνεύεται καλύτερα με αέρια χρωματογραφία με φωτομετρικό ανιχνευτή φλόγας και το biphenyl, το οποίο ανιχνεύεται με αέρια χρωματογραφία/φασματομετρία μαζών μόνο.

Μία σύγκριση του μέσου όρου του ορίου ποσοτικοποίησης δείχνει καθαρά τη **μεγαλύτερη ευαισθησία** της υγρής χρωματογραφίας/ δίδυμης φασματομετρίας μαζών. Οι περισσότεροι αναλυτές μπορούν να υπολογιστούν αξιόπιστα με LC-MS/MS σε συγκεντρώσεις μεταξύ 0,1 και 1 ng/mL. Αντιθέτως, ο μέσος όρος του ορίου ποσοτικοποίησης είναι αισθητά υψηλότερος στα 100 ng/mL. 19 φυτοφάρμακα (bromophos-ethyl, chlormephos, chlorobenzilate, cyanofenphos, diphenylamine, fenitrothion, fenvalerate, lambda-cyhalothrin, prothiofos κ.α.) ανιχνεύθηκαν με ίσο όριο ποσοτικοποίησης. Η καλύτερη απόδοση της LC-MS/MS οφείλεται σε πολλούς λόγους. Κάποιοι από αυτούς είναι ο μεγαλύτερος όγκος εισαγωγής (injection volume: 20μL vs 1μL) και η χαμηλότερη ποσότητα θραύσης (fragmentation) κατά τον ιονισμό (ESI vs EI).



Σχήμα 16. Σύγκριση της ευαισθησίας μεταξύ GC-MS και LC-MS/MS σε ορισμένες κατηγορίες φυτοφαρμάκων

Πηγή: *Residue Analysis of 500 High Priority Pesticides: better by GC-MS or LC-MS/MS?*, Lutz Alder, Kerstin Greulich, Gunther Kempe, Barbel Vieth, 3 June 2006

Συμπερασματικά, η σύγκριση των δύο μεθόδων στην πολύ-υπολειμματική ανάλυση έδειξε την καλύτερη απόδοση της υγρής χρωματογραφίας/ δίδυμης φασματομετρίας μαζών. Ένα επιπλέον πλεονέκτημα της LC-MS/MS κατέστη φανερό: εξαιτίας του μικρού πλάτους των κορυφών στην αέρια χρωματογραφία ο χρόνος που χρειάζεται είναι 1sec ή λιγότερο. Εφόσον τα ιόντα χρειάζονται 40msec, δεν μπορούν να καταγραφούν πάνω από 250 χαρακτηριστικά ιόντα ή 83 φυτοφάρμακα με 3 χαρακτηριστικά ιόντα το καθένα θεωρητικά σε μία ανάλυση. Αντίθετα, στην υγρή χρωματογραφία το πλάτος της κορυφής επιτρέπει την ανάλυση, σε θεωρητικό επίπεδο πάντα, 312 φυτοφαρμάκων. Στην πράξη, οι άνω αριθμοί δεν είναι πραγματοποιήσιμοι, επειδή τα περισσότερα φυτοφάρμακα εκλύονται στη μέση παρά στην αρχή ή στο τέλος του χρωματογραφήματος.

Η σύγκριση των δύο τεχνικών θα παραμείνει ανολοκλήρωτη αν δεν ληφθεί υπόψη η επίδραση της μήτρας. Η χρήση προστατευτικών επιφανείας (surface protectants) είναι μια ενδιαφέρουσα εναλλακτική εφαρμόσιμη στην αέρια χρωματογραφία, αλλά όχι στην υγρή χρωματογραφία/ δίδυμη φασματομετρία μαζών. Σε κάποιες περιπτώσεις, η επίδραση των συνεκλουόμενων κορυφών της μήτρας στο ιονισμό με ατμοσφαιρική πίεση μπορεί να μειωθεί με την τεχνική ECHO. Κατά τη

χρήση της LC-MS/MS, μια απλή εναλλακτική είναι η αραίωση των εκχυλισμάτων. Παρολαυτά, η αραίωση των εκχυλισμάτων απαιτεί οι συγκεντρώσεις των υπολειμμάτων να είναι πάνω από το όριο ποσοτικοποίησης.

Συν τοις άλλοις, τα συστατικά των περίπλοκων μίγτρων (πχ βότανα ή τσάι) παράγουν πολλά επιπρόσθετα σήματα στα χρωματογραφήματα. Μια πιθανή συνέπεια είναι η λανθασμένα θετική αναγνώριση φυτοφαρμάκων. Η επίδραση της μήτρας μειώνεται αισθητά με τη χρήση της δίδυμης φασματομετρία μαζών. Γι' αυτό το λόγο, οι μέθοδοι της LC-MS/MS δεν απαιτούν εκτεταμένη προετοιμασία κατά τον καθαρισμό και το διαχωρισμό. Τα μόρια με την ίδια εκπομπή συναντώνται πιο σπάνια από τα μόρια με ίδια μάζα. Κατά συνέπεια, η ταυτοποίηση κορυφών και η εξέταση των δεδομένων είναι ευκολότερη και γρηγορότερη στην LC-MS/MS και απαιτούν λιγότερες διορθώσεις σε σχέση με την GC-MS.

Εν τέλει, καμία από τις δύο τεχνικές δε λύνουν όλα τα προβλήματα, αλλά, αντιθέτως, χρειάζονται και θα χρειαστούν και οι δύο στο μέλλον. Παρολαυτά, τα πλεονεκτήματα της LC-MS/MS, όπως η μεγαλύτερη ευαισθησία, η εκλεκτικότητα και η καλύτερη αποτελεσματικότητα στην πολύ-υπολειμματική ανάλυση, την καθιστούν προτιμητέα τεχνική στην ανίχνευση υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε τρόφιμα.

2.3 Μέθοδοι Εκχύλισης

2.3.1 Γενικά

Τις τελευταίες δεκαετίες έχουν σημειωθεί πολλές εξελίξεις στον τομέα του διαχωρισμού του αναλυτή από τη μήτρα του δείγματος με υψηλή ευαισθησία και επιλεκτικότητα. Οι μέθοδοι εκχύλισης που χρησιμοποιούνται ποικίλλουν. Οι διαλύτες μπορούν να είναι οργανικά, υπερκρίσιμα και υπερθερμασμένα υγρά. Από την άλλη πλευρά, το υγρό μπορεί να συνδέεται με ένα υποστηρικτικό υλικό. Η επιλεκτικότητα μπορεί να επιτευχθεί με την προσαρμογή της θερμοκρασίας και της πίεσης με την επιλογή του διαλύτη και τον έλεγχο του pH.

Ο βασικός στόχος της εκχύλισης είναι να καταστήσει το δείγμα όσο καλύτερα αναλύσιμο γίνεται. Οι πρόσφατες τάσεις του σταδίου προετοιμασίας του δείγματος είναι οι εξής: ^[18]

- Τη δυνατότητα να χρησιμοποιούνται μικρότερα αρχικά δείγματα

- Καλύτερη εκλεκτικότητα και επιλεκτικότητα κατά την εκχύλιση
- Μικρότερη χρήση διαλύτη και λιγότερα οργανικά απόβλητα για φιλοπεριβαλλοντικούς λόγους
- Βελτίωση του αυτοματισμού των μεθόδων.

Η επιτυχία της μεθόδου εκχύλισης εγγυάται και τον επιτυχή διαχωρισμό των ουσιών του προς εξέταση δείγματος. Το ποσοστό κατά το οποίο διαλυτές ουσίες κατανέμονται μεταξύ δύο μη αναμειγνυόμενων διαλυτών διαφέρει σημαντικά για κάθε ουσία. Αυτές οι διαφορές αξιοποιούνται εδώ και δεκαετίες για τον επιτυχή αναλυτικό διαχωρισμό των ουσιών. Για να περιγραφεί η κατανομή μιας ουσίας ανάμεσα σε δύο μη αναμειγνυόμενους διαλύτες, χρησιμοποιούνται δύο όροι: Ο συντελεστής κατανομής και ο λόγος κατανομής. Για την κατανόηση των βασικών αρχών των μεθόδων εκχύλισης πρέπει ν' αναφερθούν τα εξής:

Ο **συντελεστής κατανομής**^[19] είναι μια σταθερά ισορροπίας που περιγράφει την κατανομή μιας διαλυτής ουσίας μεταξύ δύο μη αναμειγνυόμενων διαλυτών. Για παράδειγμα, όταν ένα υδατικό διάλυμα καφεΐνης (*K*) αναμειγνύεται με έναν οργανικό διαλύτη (πχ. Εξάνιο), αποκαθίσταται γρήγορα μια ισορροπία που περιγράφεται από την εξίσωση:



όπου οι δείκτες (υδ.) και (οργ.) αναφέρονται στην υδατική και στην οργανική φάση αντίστοιχα. Ο λόγος των συγκεντρώσεων της καφεΐνης στις δύο φάσεις είναι σταθερός και ανεξάρτητος από την ολική ποσότητα της καφεΐνης. Έτσι, σε δεδομένη θερμοκρασία, έχουμε:

$$K_D = \frac{K_{\text{οργ.}}}{K_{\text{υδ.}}} \quad (4)$$

όπου η σταθερά ισορροπίας K_D είναι ο συντελεστής κατανομής. Συχνά ο όρος K_D είναι σχεδόν ίσος με το λόγο της διαλυτότητας της ουσίας στους δύο διαλύτες.

Ως **λόγος κατανομής** (*D*, από την αγγλική λέξη distribution=κατανομή) μιας ουσίας ορίζεται ο λόγος των αναλυτικών συγκεντρώσεων της σε δύο μη αναμειγνυόμενους διαλύτες. Για πολύπλοκα συστήματα οι δύο όροι μπορεί να είναι σημαντικά διαφορετικοί. Για παράδειγμα, αν έχουμε ένα λιπαρό οξύ (HA) που κατανέμεται μεταξύ νερού και διαιθυλεθέρα, τότε μπορούμε να γράψουμε:

$$D = \frac{C_{org}}{C_{υδ}} \quad (5)$$

όπου C_{org} και $C_{υδ}$ είναι οι μοριακές αναλυτικές συγκεντρώσεις του οξέος HA στις δύο φάσεις. Στην υδατική φάση έχουμε την εξής ισορροπία:



οπότε η αναλυτική συγκέντρωση του οξέος ισούται με το άθροισμα των συγκεντρώσεων του αδιάστατου οξέος (HA) και της συζυγούς του βάσης (A^-), δηλαδή:

$$C_{υδ} = [HA]_{υδ} + [A^-]_{υδ} \quad (7)$$

Σε αντίθεση με την υδατική φάση, στην οργανική φάση δεν έχουμε τέτοια διάσταση του οξέος, οπότε μπορούμε να γράψουμε:

$$C_{org} = [HA]_{org} \quad (8)$$

Αντικαθιστώντας τις δύο τελευταίες εξισώσεις στην βασική εξίσωση, έχουμε:

$$D = \frac{[HA]_{org}}{[HA]_{υδ} + [A^-]_{υδ}} \quad (9)$$

Στην εκχύλιση, η επιλογή του διαλύτη πραγματοποιείται με βάση τα παρακάτω κριτήρια:

- δεν αντιδρά με την εκχυλιζόμενη ουσία, αλλά έχει την ικανότητα να επιδιαλυτώνει τα αφόρτιστα σωματίδια της
- ο συντελεστής κατανομής της εκχυλιζόμενης ουσίας (διαλυτότητα) πρέπει να διαφέρει σημαντικά από αυτούς των παρεμποδίσεων και να έχει τη μέγιστη δυνατή τιμή (ισχύει η βασική αρχή όμοια διαλύουν όμοια)
- μικρή διαλυτότητα του διαλύτη στο ύδωρ (μικρότερη του 5%)
- διαφορετική πυκνότητα από αυτή του ύδατος για πληρέστερο και ταχύτερο διαχωρισμό των φάσεων
- η εκχυλισθείσα ουσία πρέπει να ανακτάται εύκολα (πχ με εξάτμιση του διαλύτη)

Οι τεχνικές εκχύλισης οι οποίες χρησιμοποιούνται επιλέγονται με βάση τους συντελεστές κατανομής των υπό διαχωρισμό ουσιών σε καθορισμένο ζεύγος φάσεων,

τον επιδιωκόμενο βαθμό διαχωρισμού και από το δείγμα το οποίο πρόκειται να εκχυλισθεί.

Είναι προφανές, ότι καθοριστικός παράγοντας στην διαδικασία της εκχύλισης αποτελεί ο χρησιμοποιούμενος διαλύτης. Ένας κατάλληλος διαλύτης θα πρέπει να διαλύει -όσο είναι δυνατόν- εκλεκτικά την οργανική ουσία που πρόκειται να εκχυλιστεί. Συν τοις άλλοις θα πρέπει να μην αντιδρά με αυτήν, να απομακρύνεται εύκολα και να μην είναι εύφλεκτος ή τοξικός. Τα δύο τελευταία κριτήρια παρόλο που είναι επιθυμητά δεν είναι πάντα εύκολο να ικανοποιηθούν και οι εργασίες της εκχύλισης θα πρέπει να γίνονται με την μεγαλύτερη δυνατή προσοχή. Ανάλογα με το είδος και την φυσικοχημική κατάσταση του ακατέργαστου υλικού από όπου θα γίνει η εκχύλιση διακρίνονται δύο κύριες κατηγορίες διαλυτών, οι υδατικοί και οι οργανικοί.

Οι υδατικοί διαλύτες (νερό, αραιά διαλύματα ανόργανων οξέων και βάσεων) χρησιμοποιούνται για την παραλαβή από μια οργανική μη αναμιξιμη με το νερό φάση πολικών ενώσεων, όπως οξέων και βάσεων υπό ιονική μορφή αλλά και άλλων ιονικών ή ιδιαίτερα πολικών ενώσεων. Η χρήση τους θα εξεταστεί στον διαχωρισμό μίγματος όξινων βασικών και ουδετέρων συστατικών.

Οι οργανικοί διαλύτες είναι οι κοινοί μη αναμιξιμοί με το νερό οργανικοί διαλύτες (αιθέρας, χλωροφόρμιο, διχλωρομεθάνιο κλπ), οι οποίοι χρησιμοποιούνται για την παραλαβή ουδετέρων οργανικών ουσιών από υδατικά διαλύματα ή αιωρήματα. Είναι οι κατεξοχήν οργανικοί διαλύτες εκχύλισης, δεδομένου ότι και οι παραπάνω αναφερόμενοι υδατικοί διαλύτες είναι κατά βάση βοηθητικοί διαλύτες, με την έννοια ότι χρησιμοποιούνται στους χημικούς διαχωρισμούς μέσω της εκχύλισης των όξινων και βασικών από τα ουδέτερα συστατικά των μιγμάτων. Και σ' αυτές τις περιπτώσεις, η τελική πράξη της εκχύλισης αφορά παραλαβή των οργανικών συστατικών που γίνεται με κατάλληλο οργανικό διαλύτη.

2.3.2 Εκχύλιση υγρό υγρό (Solvent Extraction)

Το φαγητό είναι ένα περίπλοκο και ανομοιογενές μείγμα χημικών συστατικών, το οποίο είναι δύσκολο διαχωριστεί για να απομονωθεί το συστατικό του ενδιαφέροντός μας.^[18] Αυτό έχει ως συνέπεια την ύπαρξη παρεμβολών της μήτρας. Για να αντιμετωπισθεί αυτό το πρόβλημα πρέπει να επιλεγεί η κατάλληλη μέθοδος εκχύλισης και στάδιο καθαρισμού.

Μεγάλος αριθμός διαλυτών έχει χρησιμοποιηθεί για την εκχύλιση: οξικός αιθυλεστέρας, ακετόνη, ακετονιτρίλιο, μεθανόλη (MeOH), διχλωρομεθάνιο, n-εξάνιο και διαιθανικός αιθέρας. Παρολαυτά, είναι σημαντικό να συμβαδίζει η πολικότητα του διαλύτη με τη διαλυτότητα του αναλυτή, και με την προσθήκη μη πολικών υδατοδιαλυτών διαλυμάτων, όπως διχλωρομεθάνιο (DCM) ή n-εξάνιο, σε διαλύτες με διαφορετική πολικότητα για την εκχύλιση.

Ο Roos πρώτος ανέφερε τη χρήση οξικού αιθυλεστέρα και θειούχου νατρίου στην πολύ-υπολειμματική ανίχνευση φυτοφαρμάκων για τη μείωση του βήματος του υγρού υγρού διαχωρισμού. Από την άλλη πλευρά, ο Holstege μετέτρεψε τη μέθοδο με την προσθήκη ακετόνης, μεθανόλης ή αιθανόλης στον οξικό αιθυλεστέρα για να αυξηθεί η πολικότητα της διαδικασίας. Μελετήθηκε επίσης από τον Jianhua η εφαρμογή αρετών οργανικών διαλυτών, όπως μεθανόλη, χλωροφόρμιο, ακετόνη-n-εξάνιο, για την εκχύλιση τριαζινών από σκώτι προβάτου στους 70° C για 10 λεπτά. Η χρήση χλωροφορμίου μείωσε τις ανακτήσεις, σε αντίθεση με τη μεθανόλη, η χρήση της οποίας είχε ως αποτέλεσμα τις υψηλότερες ανακτήσεις.

Το ακετονιτρίλιο (MeCN) διαθέτει κάποια πλεονεκτήματα σε σύγκριση με τους υπόλοιπους διαλύτες επειδή αποτελεί πολικό διαλύτη, διαλυτό στο νερό. Συν τοις άλλοις, λειτουργεί τόσο με πολικά όσο και με μη πολικά φυτοφάρμακα σε μη λιπαρά φαγητά χάρη στην υδροφοβική του φύση. Το ακετονιτρίλιο, επιπλέον, χρησιμοποιείται πολύ στην υγρή χρωματογραφία/ (δίδυμη) φασματομετρία μαζών στο στάδιο του διαχωρισμού λόγω του μικρού ποσοστού συνεκλούμενων συστατικών της μήτρας. Αντίθετα, στο διχλωρομεθάνιο τα συνεκλούμενα συστατικά της μήτρας είναι πολύ περισσότερα.

Στην πλέον απλή περίπτωση της εκχύλισης υγρού-υγρού, η ουσία κατανέμεται μεταξύ δύο μη μιγνυόμενων φάσεων. Στις περισσότερες των περιπτώσεων μια εκ των δύο φάσεων είναι υδατική, ενώ η άλλη είναι ένας οργανικός διαλύτης. Επειδή τα υγρά είναι μη μιγνυόμενα μεταξύ τους σχηματίζουν δύο στιβάδες με το πυκνότερο υγρό να αποτελεί την κάτω στιβάδα. Η ουσία, ενώ αρχικά ευρίσκεται στη μία φάση, μετά την εκχύλιση υπάρχει και στις δύο φάσεις.

Η κατανομή της ουσίας, δηλαδή ο λόγος των συγκεντρώσεων της στις δύο διαφορετικές στιβάδες, εξαρτάται από τη σχετική διαλυτότητά της στις δύο φάσεις και καθορίζεται από τον συντελεστή ή σταθερά κατανομής K_D . Είναι χρήσιμη τεχνική για το διαχωρισμό των προσδιοριζόμενων ουσιών από τις παρεμποδίζουσες με κατανομή του δείγματος μεταξύ δύο μη μιγνυόμενων υγρών φάσεων. Ουσίες που

εκχυλίζονται στην οργανική φάση εύκολα ανακτώνται με εξάτμιση του διαλύτη. Ουσίες που εκχυλίζονται στην υδατική φάση μπορούν να ενεθούν απευθείας σε μια αντίστροφης φάσης χρωματογραφική στήλη. Η εκχύλιση μπορεί να συνδεθεί με χημικές ισορροπίες μεταβολής του pH, συμπλοκοποίησης, δημιουργίας ιοντικών ζευγών κ.α με σκοπό την αύξηση της ανάκτησης του αναλυτή και την εξάλειψη των παρεμποδιζουσών ουσιών.

Η επιλογή του οργανικού διαλύτη εξαρτάται συνήθως από τα εξής κριτήρια: να έχει μικρή διαλυτότητα στο νερό (<10%), να είναι πτητικός για εύκολη απομάκρυνση και συμπύκνωση μετά την εκχύλιση, να είναι συμβατός με το επιλεγθέν σύστημα ανίχνευσης, ποια είναι η πολικότητα του και οι ιδιότητες δεσμού υδρογόνου, τα οποία αυξάνουν την ανάκτηση του αναλυτή στην οργανική φάση, και να διαθέτει μεγάλη καθαρότητα για την ελαχιστοποίηση της μόλυνσης του δείγματος.

Η τιμή της σταθεράς κατανομής μπορεί ν' αυξηθεί με τους κάτωθι αναφερθέντες τρόπους: αλλαγή του οργανικού διαλύτη, εάν ο αναλυτής είναι ιόν ή ιονίζεται, μείωση του ιοντισμού του για να είναι πιο διαλυτός στην οργανική φάση. Ο αναλυτής μπορεί επίσης να εκχυλιστεί στην οργανική φάση με σχηματισμό ιοντικού ζεύγους, εφόσον ο αναλυτής ιονίζεται, οπότε ένα αντιδραστήριο σχηματισμού ιοντικού ζεύγους προστίθεται στην οργανική φάση. Η εξαλάτωση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να μειώσει τη συγκέντρωση ενός αναλυτή στην υδατική φάση με την προσθήκη ενός αδρανούς ουδέτερου άλατος (πχ θειικού νατρίου) στην υδατική φάση.

Τα βασικά κριτήρια επιλογής διαλυτών εκχύλισης είναι τα εξής:

- Αναμιξιμότητα μεταξύ φάσεων
- Σχετική πολικότητα του εκχυλιστικού μέσου και του αναλυτή
- Η μέγιστη τιμή της σταθεράς κατανομής επιτυγχάνεται όταν η πολικότητα του εκχυλιστικού μέσου ταιριάζει με αυτή του αναλυτή, πχ εκχύλιση ενός πολικού αναλυτή από ένα δείγμα υδατικής μήτρας είναι εφικτή μόνο με ένα πολικότερο οργανικό διαλύτη
- ένας οργανικός διαλύτης βέλτιστης πολικότητας μπορεί να επιλεγεί ως μίγμα δύο διαλυτών διαφορετικής πολικότητας (πχ εξαίνιου-χλωροφορμίου), μετρώντας τις τιμές της σταθεράς κατανομής ως συνάρτηση της σύστασης της οργανικής φάσης. Το μίγμα με τη μέγιστη τιμή σταθεράς κατανομής επιλέγεται για την εκχύλιση.