

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**Εργαστηριακή άσκηση μαθήματος
«Σύγχρονες Αναλυτικές Τεχνικές»**

**Προσδιορισμός Diuron σε θαλασσινό νερό με υγροχρωματογραφία –
διαδοχική φασματομετρία μαζών (UPLC-MS/MS)**

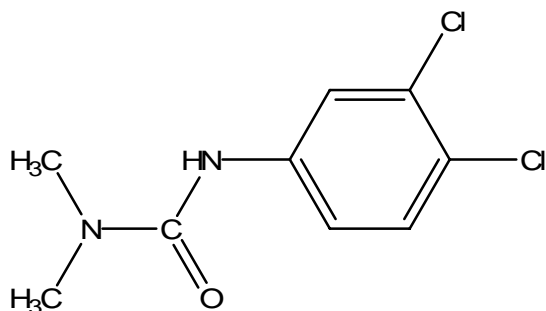
N. Θωμαΐδης

ΑΘΗΝΑ 2008

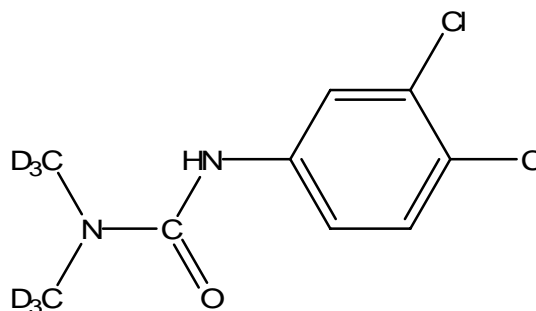
ΣΚΟΠΟΣ ΑΣΚΗΣΗΣ

Σκοπός της παρούσας άσκησης είναι η εξοικείωση των φοιτητών με τη φασματομετρία μαζών καθώς και με τη σύζευξη της φασματομετρίας μαζών με την υγροχρωματογραφία. Η συζευγμένη τεχνική (LC-MS/MS) χαρακτηρίζεται ως ιδιαίτερα εκλεκτική και επιβεβαιωτική – όσον αφορά το βαθμό βεβαιότητας της ύπαρξης ή της απουσίας μιας ουσίας - και ιδιαίτερα ευαίσθητη καθώς με αυτή μπορούν να ανιχνευθούν συγκεντρώσεις της τάξης των ng/L (ppt). Η υγροχρωματογραφία – διαδοχική φασματομετρία μαζών βρίσκει εφαρμογή στον προσδιορισμό πολλών οργανικών ενώσεων, όπως είναι τα κτηνιατρικά κατάλοιπα σε ζωικούς ιστούς και τρόφιμα, οι ουσίες προτεραιότητας σε νερά και ιζήματα και τα φάρμακα και τους μεταβολίτες τους σε βιολογικά υγρά.

Στην παρούσα άσκηση θα προσδιοριστεί η ένωση diuron (Σχήμα 1), η οποία χρησιμοποιείται ως βιοκτόνο και αποτελεί συστατικό πολλών φυτοπροστατευτικών σκευασμάτων. Αποτελεί ρύπο προτεραιότητας ως τοξική ουσία και πρέπει να ελέγχεται η παρουσία της στο περιβάλλον. Για την ποσοτικοποίηση του diuron χρησιμοποιείται η μέθοδος του εσωτερικού προτύπου με χρήση του δευτεριωμένου αναλόγου του, το diuron-D6 (Σχήμα 2).



Σχήμα 1. Diuron
(Ονομαστική Μοριακή Μάζα: 232)



Σχήμα 2. Diuron-D6
(Ονομαστική Μοριακή Μάζα: 238)

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Οργανολογία

Τα πειράματα διεξάγονται με σύστημα υγροχρωματογραφίας εξαιρετικά υψηλής απόδοσης (Ultra Performance Liquid Chromatography) συζευγμένο με φασματόμετρο μαζών με τριπλό τετράπολο (TSQ Quantum Access, Thermo).

Συνθήκες UPLC

- Αναλυτική Στήλη: πληρωτικό υλικό C18 με διάμετρο 1,9 μm, μήκος στήλης 50 mm, διάμετρος στήλης 2,1 mm.
- Κινητή Φάση: Μεθανόλη/Νερό (70/30) – Ισοκρατική έκλυση για 3 min.
- Ροή κινητής φάσης: 0,2 mL/min

Συνθήκες πηγής ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI)

- Θετικός ιοντισμός
- Δυναμικό τριχοειδούς: 4000 V
- Θερμοκρασία : 350 °C
- Ροή εκνεφωτικού αερίου N₂: 35 (αυθαίρετες μονάδες)
- Ροή ξηραντικού αερίου N₂: 5 (αυθαίρετες μονάδες)
- Δυναμικό ιοντικών φακών: 75 V

Συνθήκες κυψελίδας σύγκρουσης

- Πίεση αερίου Ar: 2,1 mTorr
- Ενέργεια σύγκρουσης : από 12 έως 17 eV.

A. Λήψη Φάσματος Μαζών θυγατρικών ιόντων (Product Ion Scan)

Ενίεται πρότυπο διάλυμα της προσδιοριζόμενης ουσίας diuron συγκέντρωσης 1 µg/mL στην αναλυτική στήλη μέσω του αυτόματου δειγματολήπτη. Λαμβάνεται το χρωματογράφημα και το φάσμα μαζών των θυγατρικών ιόντων που παράγονται από τη θραυσματοποίηση του μοριακού ιόντος σε εύρος m/z : 30 – 300 (Σχήμα 3).

Ενίεται πρότυπο διάλυμα του εσωτερικού προτύπου diuron-d6 συγκέντρωσης 1 µg/mL στην αναλυτική στήλη μέσω του αυτόματου δειγματολήπτη. Λαμβάνεται το χρωματογράφημα και το φάσμα μαζών των θυγατρικών ιόντων που παράγονται από τη θραυσματοποίηση του μοριακού ιόντος σε εύρος m/z : 30 – 300 (Σχήμα 4).

B. Παρακολούθηση επιλεγμένης αντίδρασης (Selected Reaction Monitoring, SRM). Παρασκευή καμπύλης αναφοράς. Μέτρηση δείγματος θαλασσινού νερού.

Η προσδιοριζόμενη ουσία diuron παρακολουθείται με τις μεταπτώσεις 233 (μητρικό ιόν) → 72 (θυγατρικό ιόν) και 233 → 46, ενώ το εσωτερικό πρότυπο diuron-d6 παρακολουθείται με τις μεταπτώσεις 239 → 78 και 239 → 52. Πρότυπα διαλύματα diuron συγκεντρώσεων 15, 50, 70 και 100 ng/mL ενίονται στην αναλυτική στήλη και μετρώνται με τις προαναφερόμενες επιλεγμένες αντιδράσεις – μεταπτώσεις. Κάθε πρότυπο μετρείται από δύο φορές.

Επίσης άγνωστο δείγμα θαλασσινού νερού μετρείται τρεις φορές με τον ίδιο τρόπο, αφού πρώτα έχει εκχυλιστεί από φυσίγγια εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE), ως εξής:

500 mL θαλασσινού νερού διαβιβάζονται από φυσίγγια SPE με πληρωτικό υλικό C18 (Isolute C18, 500 mg, 3 mL) τα οποία έχουν ενεργοποιηθεί με 10 mL νερό και 10 mL μεθανόλης. Μετά την εκχύλιση, ακολουθεί έκπλυση του φυσιγγίου με 5 mL νερού και έκλουση των ενώσεων με 3×2 mL μεθανόλης. Το μεθανολικό έκλουσμα εξατμίζεται με ρεύμα αζώτου έως τα 0,5 mL και συμπληρώνεται μέχρι το 1,0 mL με κινητή φάση. Μεταφέρεται σε φιαλίδιο των 2 mL του αυτόματου δειγματολήπτη και μετρείται.

Τα πρότυπα διαλύματα και το άγνωστο δείγμα περιέχουν το εσωτερικό πρότυπο σε συγκέντρωση 20 ng/mL. Λαμβάνονται τα χρωματογραφήματα της προσδιοριζόμενης ουσίας και του εσωτερικού προτύπου για κάθε μέτρηση. Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιείται με τη χρήση της μετάπτωσης στο θυγατρικό ιόν που δίνει τη μέγιστη αφθονία, δηλαδή για το diuron χρησιμοποιείται η μετάπτωση 233 → 72 και για το diuron-d6 η μετάπτωση 239 → 78. Ενδεικτικά χρωματογραφήματα πρότυπου διαλύματος συγκέντρωσης 50 ng/mL και του άγνωστου δείγματος δίνονται στα Σχήματα 5 και 6, αντίστοιχα.

Γ. Επαναληψιμότητα μετρήσεων UPLC-MS/MS με και χωρίς εσωτερικό πρότυπο

Πρότυπο διάλυμα diuron συγκέντρωσης 50 ng/mL ενίεται στην αναλυτική στήλη και μετρείται έξι διαδοχικές φορές με τις προαναφερόμενες συνθήκες. Λαμβάνονται τα χρωματογραφήματα της προσδιοριζόμενης ουσίας και του εσωτερικού προτύπου για κάθε μέτρηση.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ – ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ – ΑΣΚΗΣΕΙΣ

1. Δείξτε ποιο είναι το μοριακό ιόν και ποια τα θυγατρικά ιόντα στο φάσμα προϊόντων του diuron και στο αντίστοιχο φάσμα του diuron-D6 (Σχήματα 3 και 4). Δώστε πιθανές δομές των παρατηρούμενων θυγατρικών ιόντων. (Δίνονται οι ονομαστικές μάζες των στοιχείων C=12, H=1, O=16, N=14, Cl=35).
2. Α) Συμπληρώστε τους λόγους αποκρίσεων (εμβαδόν diuron / εμβαδόν diuron-d6) στον Πίνακα 1.
Β) Υπολογίστε την εξίσωση ευθείας της καμπύλης αναφοράς με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων:
α) με τη μέθοδο του εξωτερικού προτύπου (Αναλυτική παράμετρος: εμβαδόν κορυφής diuron), και
β) με τη μέθοδο του εσωτερικού προτύπου (Αναλυτική παράμετρος: λόγος εμβαδών)
Υπολογίστε τους συντελεστές συσχέτισης (R) των καμπυλών.
Γ) Υπολογίστε τις τρεις μετρούμενες συγκεντρώσεις του άγνωστου δείγματος με τη μέθοδο του εσωτερικού προτύπου και δώστε το μέσο όρο.

Πίνακας 1. Παρασκευή καμπύλης αναφοράς. Προσδιορισμός συγκέντρωσης diuron άγνωστου δείγματος

Δείγμα	Ακριβής συγκέντρωση (ng/mL)	Εμβαδόν κορυφής Diuron	Εμβαδόν κορυφής Diuron-d6	Λόγος αποκρίσεων
Τυφλό_A	-	-	54987	
Τυφλό_B	-	-	49346	
STD_Diuron_15ppb_A	14,9	18096	54160	
STD_Diuron_15ppb_B	14,9	17579	53813	
STD_Diuron_50ppb_A	49,7	68498	51937	
STD_Diuron_50ppb_B	49,7	64455	49751	
STD_Diuron_75ppb_A	69,6	99440	55704	
STD_Diuron_75ppb_B	69,6	94572	52390	
STD_Diuron_100ppb_A	99,4	135319	51204	
STD_Diuron_100ppb_B	99,4	131858	50390	
Άγνωστο_A	-	2142	2239	
Άγνωστο_B	-	2891	1980	
Άγνωστο_C	-	2735	2164	

3. Α) Συμπληρώστε τα κενά κελιά του Πίνακα 2 όπου SD είναι η τυπική απόκλιση και %RSD η εκατοστιαία σχετική τυπική απόκλιση.
 Β) Συγκρίνετε τις τιμές των εκατοστιαίων σχετικών αποκλίσεων των εμβαδών των κορυφών του diuron και diuron-D6 με εκείνη του λόγου των αποκρίσεων.
 Γ) Συγκρίνετε τις τιμές των εκατοστιαίων σχετικών αποκλίσεων των χρόνων ανάσχεσης του diuron και diuron-D6 με εκείνη του σχετικού χρόνου ανάσχεσης.
 Δ) Σχολιάστε την επίδραση του εσωτερικού προτύπου στα αποτελέσματα που βρήκατε.

Πίνακας 2. Επαναληψιμότητα μετρήσεων με και χωρίς εσωτερικό πρότυπο

α/α Μέτρησης	Εμβαδόν κορυφής Diuron	Εμβαδόν κορυφής Diuron-D6	Λόγος αποκρίσεων	Χρόνος ανάσχεσης Diuron (min)	Χρόνος ανάσχεσης Diuron-D6 (min)	Σχετικός χρόνος ανάσχεσης
STD_50ppb001	55190	44854		1.542	1.536	
STD_50ppb002	64803	52500		1.530	1.518	
STD_50ppb003	56626	45580		1.530	1.521	
STD_50ppb004	57519	48062		1.530	1.520	
STD_50ppb005	62693	50975		1.523	1.513	
STD_50ppb006	62360	50506		1.518	1.511	
ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ						
SD						
%RSD						