

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ ΣΥΓΧΡΟΝΗ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ

«Ανάπτυξη, αξιολόγηση και εφαρμογή αναλυτικής μεθοδολογίας για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών ουσιών στο ελαιόλαδο.»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ



Βεράνη Γ. Στυλιανή
Γεωπόνος

ΒΟΛΟΣ 2011

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ ΣΥΓΧΡΟΝΗ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ

«Ανάπτυξη, αξιολόγηση και εφαρμογή αναλυτικής μεθοδολογίας για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών ουσιών στο ελαιόλαδο .»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Βεράνη Γ. Στυλιανή
Γεωπόνος

Εξεταστική επιτροπή:
Τσιρόπουλος Ν. – Καθηγητής (Επιβλέπων)
Αθανασίου Χ. – Επίκουρος Καθηγητής (Μέλος)
Λιαπής Κ. – Ερευνητής Β΄ (Μέλος)

Βόλος, 2011

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα εργασία, στα πλαίσια της υλοποίησης της μεταπτυχιακής μου διατριβής, πραγματοποιήθηκε με σκοπό τη διερεύνηση αναλυτικών μεθόδων για τον προσδιορισμό των υπολειμμάτων δραστικών εντομοκτόνων ουσιών που χρησιμοποιούνται σήμερα ή χρησιμοποιήθηκαν τα τελευταία χρόνια στη φυτοπροστασία της ελιάς και ιδιαίτερα τη διερεύνηση της προτεινόμενης μεθοδολογίας QuEChERS για την προετοιμασία του δείγματος. Η διερεύνηση αυτή αφορούσε τη βελτιστοποίηση των αναλυτικών χαρακτηριστικών, την επικύρωση και την εφαρμογή της για τον προσδιορισμό δέκα φυτοπροστατευτικών ουσιών (Φ.Ο.) – στόχων που ήταν επτά ουσίες της ομάδας των πυρεθρινών (*bifenthrin*, *fenpropathrin*, *L-cyhalothrin*, *permethrin*, *fenvalerate*, *cypermethrin* και *deltamethrin*) και οι ουσίες α - και β -*endosulfan* και ο μεταβολίτης τους *endosulfan sulfate*. Συγκεκριμένα ελέγχθηκαν η γραμμικότητα, η ορθότητα, η ακρίβεια και η ανιχνευσιμότητα της αναλυτικής μεθόδου και ακολούθως αυτή εφαρμόστηκε στην ανάλυση πραγματικών δειγμάτων ελαιολάδου. Η προετοιμασία του δείγματος βασίζεται στη μονή ή διπλή εκχύλιση του ελαιολάδου με ακετονιτρίλιο και καθαρισμό του εκχυλίσματος με μίγμα στερεών προσροφητικών και αλάτων σε τυποποιημένες συσκευασίες. Για την ανάλυση και τον προσδιορισμό των υπολειμμάτων των φ.ο. στόχων χρησιμοποιήθηκε σύστημα αέριας χρωματογραφίας με ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων (GC-ECD), ενώ για την ποσοτικοποίηση των υπολειμμάτων ακολουθήθηκε η τεχνική του εξωτερικού προτύπου με χρήση πρότυπων διαλυμάτων σε εκχύλισμα υποστρώματος ελαιολάδου, αφού παρατηρήθηκε για κάποια εξ αυτών έντονη επίδραση υποστρώματος. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των πειραμάτων ανάκτησης οι δραστικές ουσίες παρουσίασαν σχετικά χαμηλά ποσοστά ανακτήσεων (41–72%) στην περίπτωση της μονής εκχύλισης ελαιολάδου και σχετικά ικανοποιητικά (61–117 %) στην περίπτωση της διπλής εκχύλισης του υποστρώματος με ακετονιτρίλιο), ενώ παρουσίασαν ικανοποιητικά χαρακτηριστικά στο σύνολό τους ως προς την ακρίβεια (επαναληψιμότητα <25%, με ελάχιστες εξαιρέσεις) και στις δύο περιπτώσεις εκχύλισης. Τα όρια ποσοτικού προσδιορισμού που επιτεύχθηκαν υπολογιζόμενα με βάση το θόρυβο των χρωματογραφημάτων κυμαίνονται από 0,01 έως 0,05 mg/Kg για τις πυρεθρίνες και από 0,001 έως 0,003 mg/Kg για τα *endosulfan*, ενώ υπολογιζόμενα με βάση το χαμηλότερο επίπεδο φόρτισης με ικανοποιητική ορθότητα και ακρίβεια είναι στο 0,05 mg/Kg για όλες τις ουσίες στόχους της μελέτης.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	3
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο Ελιά – Ελαιόλαδο.....	7
1.1 Ιστορική Αναδρομή	7
1.2 Συστηματική Κατάταξη – Βοτανικά Χαρακτηριστικά Ελιάς.	9
1.3 Παραγωγή και κατανάλωση ελιάς και ελαιολάδου.	10
1.4 Απόδοση του ελαιόδεντρου	14
1.5 Εξαγωγή ελαιολάδου	14
1.6 Χημική σύσταση ελαιολάδου	15
1.7 Διατροφική αξία ελαιολάδου – Υγεία.....	18
1.8 Κριτήρια προσδιορισμού της ποιότητας του ελαιολάδου.....	19
1.9 Επικίνδυνες προσμίξεις στο ελαιόλαδο.....	21
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο Φυτοπροστατευτικά προϊόντα – Υπολείμματα.....	22
2.1 Ιστορική Αναδρομή	22
2.2 Κατηγορίες – Ταξινόμηση Φυτοπροστατευτικών Προϊόντων.....	24
2.3 Εχθροί – Φ.Π. στην Ελιά.....	26
2.4 Υπολείμματα Φυτοπροστατευτικών Ουσιών.	29
2.5 Η Αναγκαιότητα Παραγωγής Καθαρού Ελαιολάδου.....	30
2.6 Οι Επιπτώσεις από την Αλόγιστη Χρήση των Εντομοκτόνων	31
2.7 Σημαντικότερες συνέπειες των υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων φυτοπροστασίας της ελιάς.....	31
2.8 Υπολείμματα γεωργικών φαρμάκων στον ελαιόκαρπο και το ελαιόλαδο	32
2.9 Ισχύουσα νομοθεσία για τα υπολείμματα γεωργικών φαρμάκων στην ελιά και το ελαιόλαδο.....	33

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο Προσδιορισμός Υπολειμμάτων Φ.Ο.....	34
3. Προσδιορισμός υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών ουσιών	34
3.1 Δειγματοληψία και αποθήκευση δειγμάτων.....	35
3.2 Εκχύλιση του δείγματος	35
3.2.2. Τεχνικές εκχύλισης.....	36
3.2.2.1 Εκχύλιση υγρού/ υγρού (Liquid/ Liquid Extraction -LLE).....	36
3.2.2.2 Εκχύλιση στερεού/υγρού (Solid/Liquid Extraction - SLE)	37
3.2.2.3 Εκχύλιση με μικροκύματα (Microwave Assisted Extraction - MAE).....	38
3.2.2.4 Επιταχυνόμενη εκχύλιση με διαλύτη (Accelerated Solvent Extraction - ASE)	38
3.2.2.5 Εκχύλιση υπερκρίσιμου σημείου (Supercritical Fluid Extraction - SFE)	39
3.2.2.6 Εκχύλιση δια της στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction - SPE)	39
3.2.2.7 Μικροεκχύλιση δια της στερεάς φάσης (Solid Phase Microextraction - SPME)	41
3.2.2.8 Μικροεκχύλιση δια της υγρής φάσης (Liquid Phase Microextraction - LPME)	42
3.2.2.9 Εκχύλιση διασποράς προσροφητικού υλικού στο υπόστρωμα (Matrix Solid Phase Dispersion - MSPD)	42
3.3 Καθαρισμός (clean up)	43
3.3.1 Κατανομή μεταξύ δύο υγρών (liquid-liquid partitioning).....	43
3.3.2 Χρωματογραφία διαπερατότητας πηκτής ή χρωματογραφία αποκλεισμού (Gel Permeation Chromatography-GPC ή size exclusion chromatography).	44
3.3.3 Εκχύλιση στερεής φάσης (Solid Phase Extraction, SPE).	44
3.4 Συμπύκνωση του εκχυλίσματος	45
3.5 Ανίχνευση και ποσοτικός προσδιορισμός υπολειμμάτων	45
3.6 Ανάπτυξη της Μεθόδου QuEChERS.	47
3.7 Μέθοδοι προσδιορισμού υπολειμμάτων στο ελαιόλαδο.	50

3.8 Επικύρωση των μεθόδων προσδιορισμού υπολειμμάτων Φ.Ο.....	53
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο - Σκοπός της μελέτης.....	61
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο - Υλικά και Μέθοδοι.....	66
5.1 Αντιδραστήρια και Διαλύτες	66
5.2 Δραστικές ουσίες και πρότυπα διαλύματα	66
5.3 Υλικά και όργανα – Εξοπλισμός	67
5.4 Εκχύλιση υπολειμμάτων από ελαιόλαδο	68
5.5 Έλεγχος αναλυτικής διαδικασίας - Πειράματα ανάκτησης.....	71
5.6 Δείγματα ελαιολάδου.....	71
5.7 Προσδιορισμός των φυτοπροστατευτικών ουσιών με τη χρήση αέριας χρωματογραφίας και ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων (ECD).....	72
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο - Αποτελέσματα & Συζήτηση	73
6.1 Διαχωρισμός των δραστικών ουσιών.	73
6.2 Καμπύλες αναφοράς.	78
6.3 Αναλυτικά χαρακτηριστικά της μεθόδου, ορθότητα και ακρίβεια.....	84
6.4 Αναλυτικά χαρακτηριστικά της μεθόδου - Όρια Ποσοτικοποίησης	91
6.5 Εφαρμογή της μεθόδου στην ανάλυση δειγμάτων ελαιολάδου.....	93
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7^ο - Συμπεράσματα.....	96
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	98

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο - Ελιά –Ελαιόλαδο

1.1 Ιστορική Αναδρομή

Η εμφάνιση της ελιάς χάνεται στα βάθη των αιώνων. Από φυτά ελιάς, που χρονολογούνται από την ολιγόκαινο περίοδο, συμπεραίνεται ότι η ελιά υπήρχε πολλές χιλιάδες χρόνια πριν από την εμφάνιση του ανθρώπου στη γη. Ως πιθανοί τόποι καταγωγής της αναφέρονται η Συρία, η Μικρά Ασία, η Αβησσυνία και η Αίγυπτος. Από εκεί διαδόθηκε στην Ελλάδα και την Ιταλία και αργότερα στην Ισπανία με τους Έλληνες, τους Ρωμαίους και τους Άραβες. Στη Μεσόγειο η καλλιέργειά της χρονολογείται από το 20 π.χ. αιώνα, λέγεται δε ότι η ελιά υπήρχε ήδη στη λεκάνη της Μεσογείου, όταν ο πρωτόγονος άνθρωπος άρχισε να ασχολείται με τη γεωργία. Στην Ελλάδα η ελιά καλλιεργείται από τα μυκηναϊκά και μινωικά χρόνια, όπως μαρτυρούν τα ευρήματα των ανασκαφών (Fooks, 1995).

Έτσι στην Κύμη της Ευβοίας έχουν βρεθεί απολιθώματα από φύλλα του είδους *Olea noti*. Επίσης ευρήματα αναφέρονται στην Προβηγκία και στη Βόρειο Αφρική. Ήδη από τον 20 π.Χ. αιώνα βρέθηκε γύρη από άνθη ελιάς που μαρτυρά την καλλιέργειά της στον Ελλαδικό χώρο. Έτσι οι γυρεόκοκκοι ελιάς εμφανίζονται γύρω στο 6.000 π.Χ. (Ηπειρος), και το 3.200 π.Χ σε Θεσσαλία και Ανατολική Στερεά. Γονέας της καλλιεργούμενης ελιάς σήμερα σε πολλές περιοχές της Ελλάδος, την Μικρά Ασία κλπ. είναι η *Olea europaea var. oleaster*. Στα προϊστορικά χρόνια οι κάτοικοι των Μεσογειακών χωρών άρχισαν να καλλιεργούν συστηματικά την ελιά, βελτιώνοντας το αυτοφύες ως τότε ελαιόδεντρο. Η συστηματική καλλιέργεια της ελιάς που μπορεί να ξεκίνησε από τους κατοίκους της νεολιθικής Κρήτης, συνέβαλε στην ανάπτυξη του μινωικού πολιτισμού. Ο ρόλος της ελιάς στη διατροφή και λατρεία αναπτύσσονταν στη Μινωική και Μυκηναϊκή τέχνη (Θεριός, 2005).

Από τα πανάρχαια χρόνια θεωρούσαν την ελιά ως ιερό δέντρο και σύμβολο ειρήνης. Οι Αρχαίοι Αιγύπτιοι στεφάνωναν τους νεκρούς τους με κλαδί ελιάς. Οι Εβραίοι χρησιμοποιούσαν το λάδι για τη χρίση των προφητών τους. Η ελληνική μυθολογία αναφέρει ότι την ελιά την έφεραν ο Κέκροπας ή η Αθηνά. Με κλαδί άγριας ελιάς (κότινο) στεφάνωναν οι Αρχαίοι Έλληνες τους νικητές των ολυμπιακών αγώνων και χρησιμοποιούσαν τα κλαδιά της ελιάς στις θρησκευτικές τελετές τους. Αλλά, ακόμη και σήμερα, το λάδι χρησιμοποιείται στις τελετουργίες του χριστιανισμού (Fooks, 1995).

Το λάδι ήταν γνωστό εδώ και μερικές χιλιάδες χρόνια. Πιθανότατα οι Φοίνικες το παρήγαγαν πρώτοι, χρησιμοποιώντας την ίδια μέθοδο, με την οποία οι Αρχαίοι Αιγύπτιοι έβγαζαν λάδι από τους σπόρους. Οι αρχαίοι λαοί θεωρούσαν το λάδι ευγενές προϊόν, τόσο που στα ομηρικά χρόνια το χρησιμοποιούσαν αποκλειστικά ως μέσο καλλωπισμού και ατομικής υγιεινής. Μόνο τον 6ο αιώνα π.χ. το ελαιόλαδο έγινε είδος διατροφής και απέκτησε οικονομική σημασία, έτσι ώστε η βιομηχανία παραγωγής του να αποτελέσει έναν από τους σημαντικότερους πλουτοπαραγωγικούς πόρους (Fooks, 1995).

Στη Μινωική εποχή το ελαιόλαδο χρησιμοποιήθηκε, εκτός από τη μαγειρική, και αρωματισμένο με κορίανδρο, κάρδαμο, σχοίνο, κύμινο, μάραθο, σουσάμι και σέλινο. Το αρωματισμένο ελαιόλαδο χρησιμοποιούνταν ως άρωμα για προσφορά στις θεότητες και πιθανώς και στη μαγειρική.

Το λάδι αποτελούσε βασικό στοιχείο της ελληνικής διατροφής. Τρεις ήταν οι ποιότητες λαδιού. *Ωμοτιβές* ή *ωμωάκινον* ονομαζόταν το αρίστης ποιότητας και εξαγόταν από ελιές αγουρωπές. Το *δεύτερον γεύματος* ήταν καλής ποιότητας λάδι, ενώ *Χυδαίον έλαιον* χαρακτήριζαν το κατώτερης ποιότητας λάδι, από ελιές υπερώριμες ή χτυπημένες (Θερίος, 2005).

Επίσης εκτός από βασική τροφή αποτελούσε απαραίτητη καύσιμη ύλη για φωτισμό, αφού με λάδι έκαιγαν οι λύχνοι.

Διαδεδομένη επίσης ήταν η χρήση του στη σωματική υγιεινή. Επάλειψη του σώματος με λάδι προστάτευε από τον ήλιο ή το ψύχος. Μετά τα λουτρά γινόταν επάλειψη του σώματος και της κόμης με αρωματικό λάδι, καθώς αυτό ήταν βασικό συστατικό πολλών αρωμάτων.

Το λάδι χρησιμοποιούνταν ακόμα στην αρχαιότητα και για τις θεραπευτικές του ιδιότητες. Ήταν κατάλληλο για τη θεραπεία δερματικών παθήσεων, ως επουλωτικό και αντισηπτικό σε τραύματα, εγκαύματα και γυναικολογικές ασθένειες. Ως τροφή βοηθούσε την αντιμετώπιση καρδιακών παθήσεων. Εκτός από το λάδι, για τις θεραπευτικές τους ιδιότητες χρησιμοποιούσαν και τα φύλλα και άνθη της ελιάς από τα οποία παρασκεύαζαν αφένημα που το χρησιμοποιούσαν ως κολλύριο, για την αντιμετώπιση της φλόγωσης των ούλων και του έλκους του στομάχου. Χρησιμοποιούνταν επίσης και ως λιπαντικό.

Ως τον τέταρτο αιώνα, το Άγιο Μύρο ήταν απλό αγιασμένο λάδι πάνω στην Αγία Τράπεζα. Αργότερα το λάδι αυτό εμπλουτίστηκε με διάφορων ειδών αρωματικές

ουσίες εξωτικές και παράξενες, όπως το λάβδανο, το ροδέλαιο, το μοσχοκάρυδο, η μαστίχα, το κύμινο, η κανέλλα, η δάφνη, ο αγριόκρινος κ.ά. Κατά τη διάρκεια της Τουρκοκρατίας πολλοί ελαιώνες καταστράφηκαν ή χρησιμοποιήθηκαν ως καύσιμη ύλη. Το 1861 ψηφίστηκε νόμος που εκχωρούσε την καλλιέργεια των ελαιώνων σε αγρότες, γεγονός που συνετέλεσε σε αύξηση της ποσότητας και βελτίωση της ποιότητας του ελαιολάδου (Θερίος, 2005).

1.2 Συστηματική Κατάταξη – Βοτανικά Χαρακτηριστικά Ελιάς.

Η ελιά είναι αειθαλής, αιωνόβια καρποφόρα δέντρα και ανήκει στη βοτανική οικογένεια *Oleaceae*. Στην ίδια οικογένεια ανήκουν και άλλα είδη, όπως το γιασεμί ή μελιά, το λιγούστρο, η πασχαλιά. Στο γένος *Olea*, μόνον η *Olea europaea* έχει οικονομικό ενδιαφέρον. Υπάρχουν δυο παραλλαγές του γένους η άγρια ελιά (*Olea europaea var. Oleaster*) και η καλλιεργούμενη (*Olea europaea var. sativa*). Φυσικά οι ποικιλίες και οι τύποι ελιάς είναι πάρα πολλοί και δημιουργήθηκαν είτε από την προσαρμογή του δέντρου στις ειδικές κλιματολογικές και εδαφικές συνθήκες του κάθε τόπου είτε σε μεταλλαγές και στο φυσικό πολλαπλασιασμό του είτε στον άνθρωπο (Fooks, 1995).

Το γένος *Olea* περιλαμβάνει τουλάχιστον 30-35 είδη που ανήκουν στην Οικογένεια *Oleaceae*, της υποοικογένειας *Oleoideae* ($\chi=23$). Η καλλιεργούμενη ελιά (*Olea europaea L.*) είναι αείφυλλο δένδρο που προήλθε από τροπικά και υποτροπικά είδη. Παλαιοντολογικά ευρήματα από είδη ελιάς βρέθηκαν στην Ιταλία, Γαλλία κ.ά. χώρες. Η τεταρτογενής Μεσογειακή ζώνη βρίσκονταν μέσα σε τροπική ζώνη, αλλά η ξηρασία και οι παγετώνες στην πλειστόκενο περίοδο απετέλεσαν τρόπους φυσικής επιλογής για σκληρόφυλλα φυτά με ικανότητα αποφυγής των παγετών. Οι παγετώνες πιθανώς μείωσαν τον αρχικό πληθυσμό της ελιάς και μόνο φυτά με ικανότητα επιβίωσης σε -5°C έως -12°C επέζησαν καθώς θερμοκρασίες $< -12^{\circ}\text{C}$ περιορίζουν τη φυσική κατανομή των ειδών ελαιίας.

Η ελιά που προήλθε από την ανατολική λεκάνη είναι μια από τις αρχαιότερες καλλιέργειες. Η οικογένεια *Oleaceae*, που διαθέτει 30 γένη, που περιλαμβάνουν επίσης και καλλωπιστικά είδη διάφορα άλλα φυτά. Οι περισσότερες καλλιέργειες ελιάς ανήκουν στο είδος *Olea europaea L* με $2\chi=46$ χρωμοσώματα.

Το είδος *Olea europaea L* απαρτίζεται από πολλές ομάδες και από 2600 ποικιλίες,

πολλές από τις οποίες μπορεί να είναι μόνο οικότυποι. Η *Olea europaea* L δε φαίνεται να είναι είδος, αλλά μια ομάδα από μορφές, που προήλθαν από μετάλλαξη και υβριδισμό. Τα τροπικά και υποτροπικά Αφροασιατικά είδη όπως *O. chrysophilla* και *O. excelsa* πιθανώς να έχουν λάβει μέρος στην εξέλιξη της καλλιέργειας. Τα είδη αυτά μπορεί να θεωρηθούν ως μέρος της *O. europaea*.

Υποείδη ελιάς κατανέμονται κυρίως στις Μεσογειακές χώρες και επίσης βρίσκονται στη Δυτική Αφρική, την Τανζανία, τα Κανάρια νησιά, τις Αζόρες, τη Ν. Αφρική και τον Άγιο Μαυρίκιο. Τα ελαιόδεντρα έχουν εισαχθεί στις ΗΠΑ, Αυστραλία, Ν. Αφρική και τα τελευταία 30 έτη στην Κίνα.

Η άγρια ελιά *O. oleaster* και η καλλιεργούμενη *O. sativa* διακρίνονται μεταξύ των ειδών ελιάς στη Μεσόγειο. Έτσι το είδος *O. oleaster*, έχει αγκαθωτούς βλαστούς, μικρά ωοειδή, σχεδόν σφαιρικά φύλλα σε νεαρά φυτά και μικρούς, ελλειψοειδείς, μελανέρυθρους καρπούς με χαμηλή ελαιοπεριεκτικότητα. Η *O. sativa*, έχει κυλινδρικούς βλαστούς και μεγάλους ωοειδείς ή ελλειψοειδείς καρπούς με χρώμα πορφυροκυανού, μελανοερυθρό ή σπανίως λευκό, με υψηλή ελαιοπεριεκτικότητα. Το γένος *O. oleaster* βρίσκεται σε μικρό αριθμό περιοχών. Σε μερικές περιοχές κατά λάθος εκλαμβάνεται η *O. europaea* ως *oleaster*, διότι διατηρούνται τα φυτά σε νεανικό στάδιο με βόσκηση. Τα φυτά αυτά δεν ανθίζουν. Μπορούν όμως να εισέλθουν στο στάδιο καρποφορίας με κατάλληλες καλλιεργητικές φροντίδες (Θεριός, 2005).

1.3 Παραγωγή και κατανάλωση ελιάς και ελαιολάδου.

Η ελιά μπορεί να καλλιεργηθεί μόνο στις εύκρατες περιοχές του Βόρειου και Νότιου ημισφαιρίου. Αυτό οφείλεται στις ειδικές κλιματικές της απαιτήσεις.

Καλλιεργείται κυρίως στη λεκάνη της Μεσογείου, από όπου είναι και η καταγωγή της, στο Δέλτα του Νείλου, στις ακτές της Συρίας και του Λιβάνου, στην Κύπρο, στην Τουρκία, στην Ελλάδα, στη Νότια Ιταλία και Γαλλία, στην Ισπανία και στις απέναντι ακτές της Αφρικής.

Στη χώρα μας η ελιά είναι μια από τις σημαντικότερες καλλιέργειες. Καλλιεργείται κυρίως στη Σαμοθράκη, Χαλκιδική, Λήμνο, Μυτιλήνη, Χίο, Σάμο, Ικαρία, Ρόδο, Κρήτη, Πελοπόννησο, Ιόνια Νησιά, Αιτωλοακαρνανία, Αττική, Φθιώτιδα, Εύβοια, Πήλιο. Από αυτές τις περιοχές, οι θερμότερες και ξηρότερες περιοχές παράγουν κυρίως λάδι, οι δροσερότερες επιτραπέζια ελιά.

Η καλλιέργεια της ελιάς στη χώρα μας καλύπτει έκταση 6 εκατ. Στρεμμάτων, δηλαδή το 17% της καλλιεργούμενης γης και απασχολεί 450.000 οικογένειες. Τα ελαιόδεντρα έχουν ξεπεράσει τα 120 εκατομμύρια και από αυτά τα 95 εκατ. προορίζονται για παραγωγή ελαιολάδου, του οποίου η μέση ετήσια παραγωγή φτάνει τους 250.000 τόνους. Η Κρήτη παράγει το 30% του ελαιολάδου, ακολουθεί η Πελοπόννησος (26%), η Λέσβος (10%) και τα Ιόνια Νησιά (8%). Η μέση ετήσια κατανάλωση λαδιού κατ' άτομο είναι 18,5 κιλά για την Ελλάδα, 7,4 για την Ιταλία, 8,2 για την Ισπανία και πολύ λιγότερη για τις άλλες χώρες της Κοινότητας (Fooks, 1995).

Το 98%, περίπου, των ελαιόδενδρων φύονται στη λεκάνη της Μεσογείου και καλύπτουν το 95% της παγκόσμιας παραγωγής ελαιόλαδου. Η παραγωγή αυτή προέρχεται από 7, κυρίως, χώρες οι οποίες κατά σειρά σπουδαιότητας είναι: η Ισπανία, η Ιταλία, η Ελλάδα, η Πορτογαλία, η Τυνησία, η Αλγερία και το Μαρόκο. Η Ισπανία καλύπτει το 1/3 περίπου, του συνόλου της παραγωγής των Μεσογειακών χωρών, ενώ οι Ηνωμένες Πολιτείες και η Αργεντινή καλύπτουν το 1-2% της παγκόσμιας παραγωγής.

Η ποσοστιαία κατανομή, κατά ήπειρο, είναι περίπου η εξής:

Ασία	4,2%
Αφρική	9,2%
Άλλες ήπειροι	5,5%
Ευρώπη	81,1%

Το ελαιόλαδο καταναλώνεται από όλους τους λαούς. Σήμερα η παγκόσμια ελαιοκαλλιέργεια αντιπροσωπεύει 810 εκατομμύρια ελαιόδεντρα. Το 98% των ελαιόδεντρων βρίσκονται στην περιοχή της Μεσογείου και από αυτό, το 70% είναι στις ευρωπαϊκές χώρες της Μεσογείου.

Η Ευρωπαϊκή Ένωση είναι ο μεγαλύτερος καταναλωτής ελαιόλαδου με 1,3 εκατομμύρια τόνους. Σε κάθε χώρα η κατανάλωση ποικίλει. Σε χώρες της Ε.Ε. όπου δεν παράγεται ελαιόλαδο, η κατανάλωσή του περιορίζεται σε 1 μόνο κιλό ανά κάτοικο (www.elais.gr).

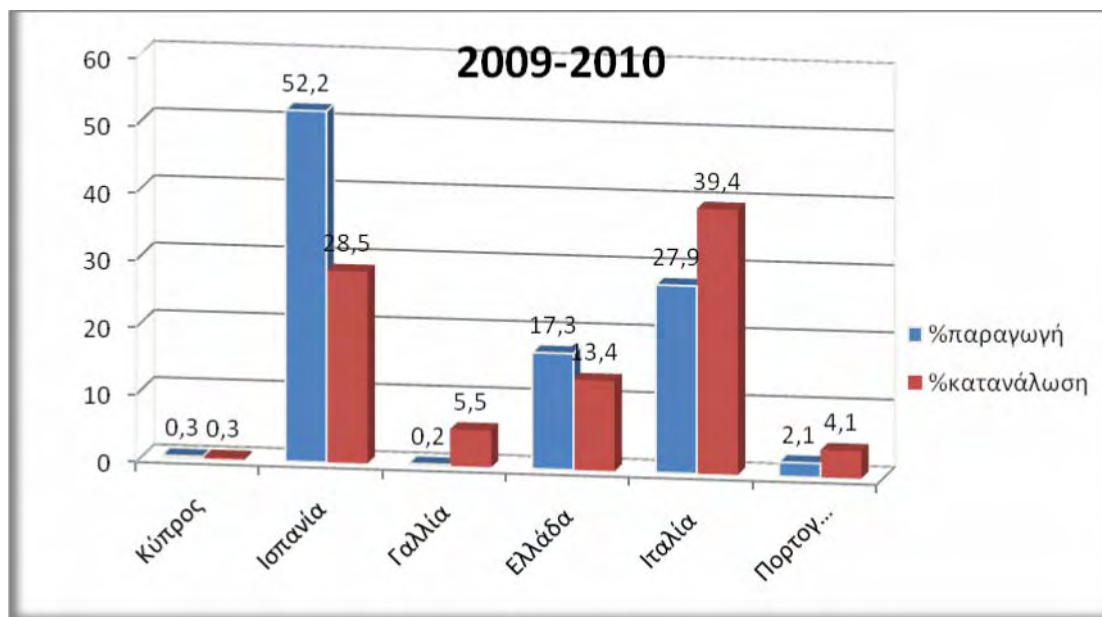
Η Ελλάδα αφιερώνει περίπου το 60% της καλλιεργήσιμης γης της στις ελαιοκαλλιέργειες. Είναι κορυφαία στον κόσμο παραγωγός σε μαύρες ελιές και διαθέτει τις περισσότερες ποικιλίες ελιάς σε σχέση με οποιαδήποτε άλλη χώρα. Η

Ελλάδα κατέχει την τρίτη θέση στην παγκόσμια παραγωγή ελιών με περισσότερα από 132 εκατομμύρια δέντρα, τα οποία παράγουν περίπου 350.000 τόνους ελαιολάδου ετησίως, εκ των οποίων το 82% είναι έξτρα παρθένο. Περίπου το ήμισυ της ετήσιας ελληνικής παραγωγής ελαιολάδου εξάγεται, αλλά μόνο περίπου το 5% αυτού απεικονίζει την προέλευση του εμφιαλωμένου προϊόντος. Η Ελλάδα εξάγει κυρίως εντός της Ευρωπαϊκής Ένωσης (ΕΕ) και κυρίως στην Ιταλία, η οποία λαμβάνει περίπου τα 3/4 του συνόλου των Ελληνικών εξαγωγών. Οι ελιές που καλλιεργούνται για την παραγωγή ελαιολάδου στην Ελλάδα, βρίσκονται κυρίως στις περιοχές της Πελοποννήσου και την Κρήτη καθώς και στα νησιά του Αιγαίου και του Ιονίου (www.oliveandoil.com). Στον Πίνακα 1.1, και στα Γραφήματα 1.1 και 1.2 παρουσιάζονται η παραγωγή, κατανάλωση, οι εξαγωγές και εισαγωγές ελαιολάδου κατά το έτος 2009-10 για τις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης με την μεγαλύτερη παραγωγή ελιάς και ελαιολάδου.

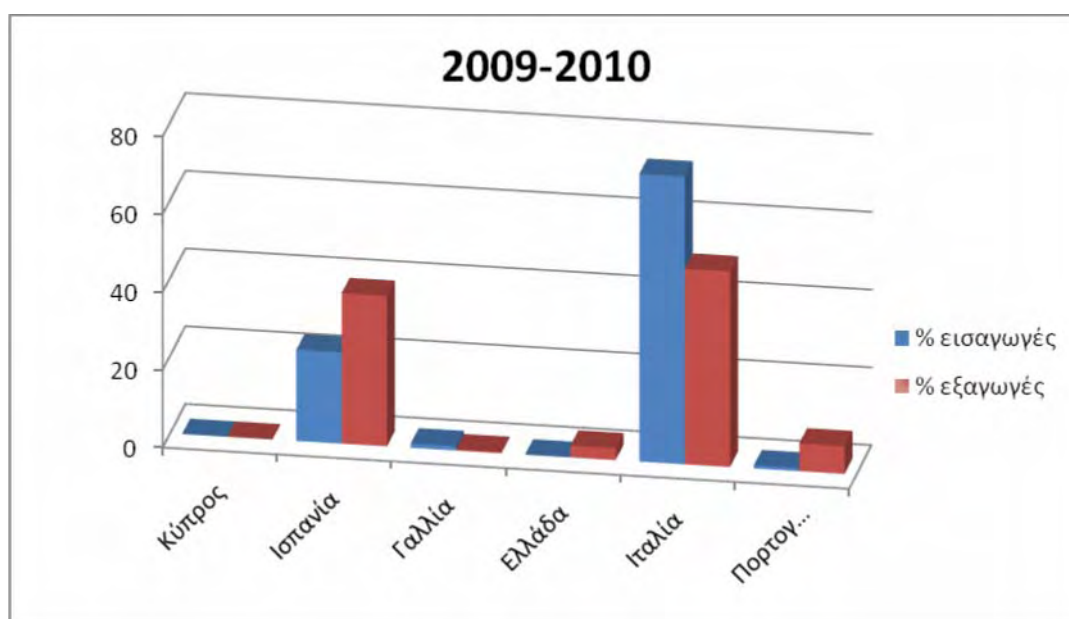
Πίνακας 1.1: Παραγωγή, κατανάλωση, εξαγωγές και εισαγωγές ελαιολάδου κατά το έτος 2009-10.

2009-10	κατανάλωση		παραγωγή		εξαγωγές		εισαγωγές	
	(1000)τόνοι	%	(1000)τόνοι	%	(1000)τόνοι	%	(1000)τόνοι	%
Χώρες Ε.Ε.								
Κύπρος	4,9	0,3	4,2	0,3	0	0	0	0
Ισπανία	550	28,5	1396,3	52,2	210	38,7	13,6	23,5
Γαλλία	113,7	5,5	5,7	0,2	1,5	0,3	4,5	1,1
Ελλάδα	225	13,4	320	17,3	10	3	0	0
Ιταλία	675	39,4	460	27,9	165	50,3	90	74
Πορτογαλία	87,5	4,1	58,7	2,1	35,4	7,1	0	0,8
Σύνολο	1656,1	91,2	2244,9	100	421,9	99,4	108,1	99,4

(Πηγή: INTERNATIONAL OLIVE OIL COUNCIL (November 2010))



Γράφημα 1.1: Παραγωγή και κατανάλωση ελαιολάδου σε χώρες της Ε.Ε. για το έτος 2009-10. (Πηγή: INTERNATIONAL OLIVE OIL COUNCIL (November 2010))



Γράφημα 1.2: Εισαγωγές και εξαγωγές ελαιολάδου σε χώρες της Ε.Ε. για το έτος 2009-10. (Πηγή: INTERNATIONAL OLIVE OIL COUNCIL (November 2010))

Το λάδι υφίσταται ανταγωνισμό από τα διάφορα σπορέλαια, που διαφημίζονται ως πιο υγιεινά για νοπή κατανάλωση και για μαγείρεμα, ενώ στην ουσία αυτό ισχύει μόνο για άτομα που είναι υποχρεωμένα να τηρούν μια ειδική δίαιτα για λόγους υγείας. Σε ότι αφορά το μαγείρεμα, καλό είναι να έχουμε υπόψη μας ότι το ελαιόλαδο

διασπάται σε υψηλότερη θερμοκρασία από τα σπορέλαια, έτσι είναι πιο ασφαλές. Το λάδι είναι ιδιαίτερα ωφέλιμο, μάλιστα η αντικατάσταση του βουτύρου με λάδι έχει ιδιαίτερα ευνοϊκές επιπτώσεις στην υγεία, ιδιαίτερα όταν το λάδι καταναλώνεται νωπό. Η Ευρωπαϊκή Ένωση στηρίζει μέχρι ενός σημείου το λάδι, αν μην ξεχνάμε όμως ότι στα θέματα διατροφής ο κάθε λαός έχει τις συνήθειές του, που διαμορφώθηκαν από πολύ παλιά. Σ' αυτές συντέλεσαν οι κλιματικές συνθήκες, κάτω από τις οποίες ζούσε και ζει. Δεν θα πρέπει να μας παραξενεύει λοιπόν που οι Βόρειοι Λαοί, για παράδειγμα, προτιμούν το βούτυρο αντί το λάδι (Fooks, 1995).

1.4 Απόδοση του ελαιόδεντρου

Η αξιολογή παραγωγή του ελαιόδεντρου, κάτω από ευνοϊκές συνθήκες, αρχίζει τον 6^ο χρόνο από τη φύτευση του στην οριστική του θέση. Φυσικά, υπάρχουν σοβαρές αποκλίσεις από αυτό τον αριθμό, που οφείλονται όχι μόνο στην ποικιλία, αλλά στον τρόπο πολλαπλασιασμού από τον οποίο προήρθε το δέντρο και στις συνθήκες καλλιέργειας. Για παράδειγμα, σε άγονα εδάφη και με στοιχειώδεις καλλιεργητικές φροντίδες μπορεί να περιμένουμε αρκετά χρόνια για να δούμε το δέντρο να μπαίνει στην παραγωγική του φάση. Οι αποδόσεις του σ' αυτή την περίπτωση δεν θα μπορούν να συγκριθούν με αποδόσεις δέντρων που καλλιεργούνται σε σχετικά γόνιμα εδάφη και φροντίζονται με επιμέλεια.

Στους ίδιους λόγους οφείλονται και οι αποκλίσεις της παραγωγής. Θα συναντήσουμε ελαιόδεντρα, που η απόδοσή τους δεν ξεπερνά τα 10 κιλά καρπού και άλλα που φτάνουν τα 100. Μια μέση όμως παραγωγή είναι τα 20 κιλά καρπού. Η απόδοση σε λάδι, για τις ελαιοποιήσιμες ποικιλίες, μπορεί να φτάσει και το 28% (Fooks, 1995).

1.5 Εξαγωγή ελαιολάδου

Ο ελαιόκαρπος από ελαιοποιήσιμες ή επιτραπέζιες ποικιλίες μεταφέρεται σε σάκους στα ελαιοτριβεία, όπου μετατρέπεται σε πολτό. Κατόπιν, από τον πολτό διαχωρίζεται το λάδι με διάφορες μεθόδους όπως, 1) *Υδραυλική πίεση*, 2) *Φυγοκέντρωση* με μηχανήματα που ονομάζονται Decanters.

Με την πρώτη μέθοδο, πιέζονται οι ελιές με υδραυλική πίεση για να συνθλιβούν και διαχωρίζεται το ελαιόλαδο και το νερό από το στερεό υπόλοιπο, που αποκαλείται

ελαιοπυρήνας. Ακολουθεί ο διαχωρισμός του ελαιολάδου από το νερό και τις ξένες ύλες, με τους κάθετους διαχωριστήρες.

Οι παράγοντες που ασκούν σημαντική επίδραση στην εξαγωγή του ελαιολάδου είναι:

- α. Το νερό % του ελαιοκάρπου
- β. Το μέγεθος των τεμαχιδίων της ελιάς, μετά τη σύνθλιψη
- γ. Τα φυσικά χαρακτηριστικά του ελαιολάδου
- δ. Η θερμοκρασία εκχύλισης

Γενικά τα στάδια επεξεργασίας για την παραλαβή ελαιολάδου είναι τα εξής: Παραλαβή - αποφύλλωση - πλύσιμο καρπών - μάλαξη - πίεση - παραλαβή ελαιολάδου - διαχωρισμός ελαιοπυρήνα - καθαρισμός ελαιολάδου. Όταν ο διαχωρισμός γίνεται με φυγοκέντρωση, τότε διαχωρίζεται το λάδι από τον ελαιοπυρήνα και το νερό, λόγω του διαφορετικού ειδικού βάρους των (Θεριός, 2005).

1.6 Χημική σύσταση ελαιολάδου

Το ελαιόλαδο, όπως όλα τα φυτικά έλαια αποτελείται από **σαπωνοποιήσιμο κλάσμα** (τριγλυκερίδια) και ένα **μη σαπωνοποιήσιμο κλάσμα**. (δευτερεύοντα συστατικά).

Το σαπωνοποιήσιμο κλάσμα αντιστοιχεί στο 99% του ελαίου. Τα λιπαρά οξέα που χρησιμοποιούνται στη σύνθεση των τριγλυκεριδίων του ελαιολάδου ποικίλουν, και εν μέρει εξαρτώνται από την περιοχή από την οποία προέρχεται. Στον Πίνακα 1.2 παρουσιάζεται η περιεκτικότητα του ελαιολάδου σε λιπαρά οξέα (%).

Πίνακας 1.2: Περιεκτικότητα του ελαιολάδου σε λιπαρά οξέα (%)

Τα λιπαρά οξέα του ελαιολάδου	Περιεκτικότητα %
Ελαϊκό οξύ	56,0 - 83,0
Παλμιτικό οξύ	7,5 - 20,0
Λινελαϊκό οξύ	3,5 - 20,0
Στεατικό οξύ	0,5 - 5,0
Παλμιτολεϊκό οξύ	0,3 - 3,5
Λινολενικό οξύ	0,0 - 1,5

Μυριστικό οξύ	0,0 - 0,1
Αραχιδικό οξύ	0,8

Όπως είναι φανερό, επικρατεί σαφώς το μονοακόρεστο ελαιϊκό οξύ, υπάρχει ένα μικρό ποσοστό κορεσμένων λιπαρών οξέων (παλμιτικό οξύ και στεατικό οξύ) και ένα μέτριο ποσοστό πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (λιγελαϊκό οξύ και λινολενικό οξύ). Η βιολογική σημασία των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων είναι μεγάλη και επειδή δεν μπορεί να τα συνθέσει ο οργανισμός πρέπει να τα παίρνει με την καθημερινή διατροφή. Επομένως το ελαιόλαδο αποτελεί καλή πηγή για τη λήψη αυτών των ουσιωδών λιπαρών οξέων.

Περιέχει λιπαρά οξέα, τα οποία διακρίνονται σε τρία είδη: κεκορεσμένα, μονοακόρεστα και πολυακόρεστα. Τα ζωικά λίπη περιέχουν κυρίως κεκορεσμένα λιπαρά οξέα, τα σπορέλαια πολυακόρεστα κυρίως λιπαρά οξέα, ενώ το ελαιόλαδο διαφοροποιείται, γιατί περιέχει κυρίως μονοακόρεστα λιπαρά οξέα σε ποσοστό μέχρι και 83%. Το ελαιϊκό οξύ, βασικό συστατικό του ελαιόλαδου, αποτελεί ένα τέτοιο μονοακόρεστο λιπαρό οξύ. Τα υπόλοιπα λιπαρά οξέα του ελαιόλαδου είναι ελάχιστα κεκορεσμένα και κάποια πολύ βασικά πολυακόρεστα, όπως το λινολικό οξύ και το λινολενικό. Η συνύπαρξη του ελαιϊκού οξέος με το λινολικό και το λινολενικό δίνει στο ελαιόλαδο τη μοναδική βιολογική αξία του (oliveoil.eu | the world of european olive oil © 2007).

Η ύπαρξη ακόρεστων δεσμών στα λιπαρά οξέα τους προσδίδει συγκεκριμένες βιολογικές ιδιότητες, αλλά, ταυτόχρονα, τα καθιστά ευαίσθητα στο οξυγόνο, προκαλώντας το φαινόμενο της αυτοοξειδωσης. Η ταχύτητα της αυτοοξειδωσης είναι ανάλογη του αριθμού των διπλών δεσμών, ενώ παρεμποδίζεται από το είδος και την ποσότητα αντιοξειδωτικών ουσιών. Από αυτή την άποψη, στη σύνθεση του ελαιόλαδου δεν είναι πολύ μεγάλος ο αριθμός των ακόρεστων οξέων, ενώ περιέχει αρκετές αντιοξειδωτικές ουσίες, που το καθιστούν ιδιαίτερα σταθερό.

Οι αντιοξειδωτικές ουσίες ανήκουν, σε συνδυασμό με άλλα δευτερεύοντα συστατικά, στο μη σαπωνοποιήσιμο κλάσμα του ελαιόλαδου.

Οι τοκοφερόλες, των οποίων το 90% βρίσκεται στη μορφή α- είναι η περισσότερο ενεργή βιολογικά. Η περιεκτικότητα των τοκοφερολών στο ελαιόλαδο είναι περίπου 150-170mg/kg. Οι τοκοφερόλες, παράλληλα με το σημαντικό ρόλο τους στη

σταθεροποίηση των διαδικασιών αυτοοξειδωσης, αποτελούν και σημαντική πηγή βιταμινών στη διατροφή του ανθρώπου.

Οι φαινολικές ενώσεις (φαινόλες, φαινολικά οξέα, πολυφαινόλες) έχουν επίσης σημαντική αντιοξειδωτική επίδραση. Το σύνολο των ουσιών αυτών αυξάνει την αντιοξειδωτική σταθερότητα του ελαιολάδου, ενώ ορισμένα από τα φαινολικά οξέα, που περιέχει το ελαιόλαδο, έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν μεταλλικά σύμπλοκα και για το λόγο αυτό το ελαιόλαδο έχει τη μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στην οξείδωση, τόσο στη θερμοκρασία του περιβάλλοντος όσο και όταν θερμαίνεται.

Το ελαιόλαδο περιέχει επίσης στερόλες, υδρογονάνθρακες, τερπενικές αλκοόλες, φωσφολιπίδια ή φωσφατίδια ή λεκιθίνες, χρωστικές και αρωματικές ουσίες.

Το ελαιόλαδο είναι ουσιαστικά το μόνο λάδι που περιέχει ιδιαίτερα υψηλό ποσοστό β-σιτοστερόλης (89,5%), ουσίας που εμποδίζει την απορρόφηση της χοληστερίνης από το έντερο. Επίσης περιέχει και άλλες στερόλες, όπως χοληστερόλη (ίχνη), καμπεστερόλη (2,0%), σιγμαστερόλη (0,5%) και Δ5-ανεμαστερόλη (8,0%).

Ο προσδιορισμός του στερολικού κλάσματος μπορεί να βοηθήσει στον έλεγχο νοθείας του ελαιολάδου με άλλα φυτικά λάδια. Μεγάλη ποσότητα σιγμαστερόλης στο ελαιόλαδο δείχνει την παρουσία σογιέλαιου σε αυτό. Κατά του Gutfinger et al (1974) δεν υπάρχει σημαντική διαφορά στη σύνθεση του στερολικού κλάσματος του ελαιολάδου και του πυρηνέλαιου.

Οι υδρογονάνθρακες που είναι μερικώς κορεσμένοι και ακόρεστοι, αποτελούν το 2,8-3,5% στο λάδι, δημιουργούνται μάλλον ως παραπροϊόντα της σύνθεσης των λιπαρών οξέων. Ανάμεσα στους υδρογονάνθρακες, που έχουν βρεθεί στο ελαιόλαδο, είναι το σκουαλένιο (32-50%), οι αλειφατικές αλκοόλες (0,5%), οι τερπενικές αλκοόλες (20-26%), οι τερπενικές στερόλες (20-30%) και το β-καροτένιο (0,3-3,7 mg/kg), το οποίο περιέχει βιταμίνη Α και έχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες.

Οι τερπενικές αλκοόλες απαντούν στο ελαιόλαδο, τόσο σε ελεύθερη μορφή όσο και σε εστεροποιημένη με τα λιπαρά οξέα. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η κυκλο-αρτενόλη, η οποία διαμέσου της αύξησης των εκκρίσεων της χολής βοηθά στην απέκκριση της χοληστερίνης με τα κόπρανα.

Τα φωσφολιπίδια ή φωσφατίδια απαντούν σε μικρές ποσότητες στο ελαιόλαδο με τη μορφή φωσφοδυλοχολίνης και φωσφατιδοαιθυλαμίνης. Είναι κηρώδη, άμορφα, υγροσκοπικά σώματα τα οποία αλλοιώνονται γρήγορα στον αέρα, διογκώνονται μέσα στο νερό, διαλύονται προς οπαλίζοντα διαλύματα, είναι ευδιάλυτα στον αιθέρα, ενώ

στην αλκοόλη διαλύονται μόνο οι λεκιθίνες. Από χημικής πλευράς, είναι οργανικοί εστέρες του γλυκερινοφωσφορικού οξέος που περιέχουν εστεροειδώς ενωμένη αμιναλκοόλη με το φωσφορικό οξύ. Οι λεκιθίνες διαφέρουν από τα φωσφατίδια διότι στο μόριό τους περιέχουν χολίνη.

Οι χρωστικές ουσίες απαντούν στο ελαιόλαδο υπό μορφή καροτινοειδών και κυρίως χλωροφύλλης. Η χλωροφύλλη, της οποίας η ποσότητα εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, διεγείρει βιολογικά το μεταβολισμό, την ανάπτυξη των κυττάρων και την αιματοποίηση, ενώ επιταχύνει την επούλωση.

Τέλος, οι αρωματικές ουσίες, που εμφανίζονται με τη μορφή πολλών ενώσεων, στο σύνολό τους συνεισφέρουν στη διαμόρφωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών και συμβάλλουν στην ποιοτική αναβάθμιση του ελαιολάδου. Επίσης, τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, επηρεάζουν θετικά την πέψη. Και αυτό συμβαίνει διότι όταν είναι ευχάριστη η οσμή και η γεύση της τροφής, τροποποιείται η σύνθεση του γαστρικού υγρού, λόγω της αυξημένης περιεκτικότητας σε πεψίνη, γεγονός που διευκολύνει την πέψη. Στο ελαιόλαδο έχουν απομονωθεί και ανιχνευθεί σαράντα αρωματικά συστατικά. Μερικά από αυτά είναι το ισοπεντάνιο, το 2-μεθυλοπεντάνιο, το εξάνιο, το οκτάνιο, το εννεάνιο, το ναφθαλένιο και το αιθυλ-ναφθαλίνιο (Γαμβριάς, 1998).

1.7 Διατροφική αξία ελαιολάδου – Υγεία.

Ο κυριότερος προορισμός του λαδιού, μη καθαρή λιπαρή ουσία αλλά χυμός ρευστός κι αδιάλυτος στο νερό, είναι η διατροφή του ανθρώπου. Σαν είδος διατροφής αποτελεί σημαντική πηγή ενέργειας και θρεπτικών ουσιών που παίζουν σπουδαίο ρόλο στην υγεία. Ένα γραμμάριο λαδιού παράγει 9,3 Kcal (χιλιοθερμίδες). Κύριο συστατικό της μεσογειακής διατροφής είναι το ελαιόλαδο η θρεπτική αξία του οποίου είναι πλέον αναμφισβήτητη. Πολλές έρευνες έχουν δείξει ότι η κατανάλωση ελαιολάδου σαν μέρος μίας υγιεινής διατροφής και ενός υγιεινού τρόπου ζωής γενικότερα μπορεί να συμβάλλει στην πρόληψη ή και αντιμετώπιση διαφόρων νοσημάτων.

Καρδιοπροστατευτική δράση : Συμβάλλει στη μείωση της κακής (LDL) χοληστερόλης στο αίμα χωρίς να μειώνει την καλή (HDL) χοληστερόλη, έχει αντιθρομβωτική δράση, ενώ πρόσφατες έρευνες δείχνουν ότι μπορεί να συμβάλλει

και στη μείωση της αρτηριακής πίεσης. Ο οργανισμός Food and Drug Administration (FDA) των ΗΠΑ έχει εκδώσει ανακοίνωση με την οποία υποστηρίζει ότι η ημερήσια κατανάλωση 2 κουταλιών της σούπας ελαιόλαδο μπορεί να συμβάλλει στη μείωση των πιθανοτήτων για εμφάνιση στεφανιαίας νόσου.

Πρόληψη για εμφάνιση καρκίνου : Η αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδης δράση του ελαιολάδου φαίνεται να προστατεύει από διάφορες μορφές καρκίνου όπως του μαστού και του παχέως εντέρου μέσα από διάφορους μηχανισμούς. Πολλές έρευνες πραγματοποιούνται πάνω στο θέμα αυτό και τα επόμενα χρόνια αναμένεται να μάθουμε περισσότερα σχετικά με τον τρόπο που μπορεί το ελαιόλαδο να προστατεύσει ή και να συμβάλλει στη θεραπεία διαφόρων μορφών καρκίνου.

Αντιγηραντικές ιδιότητες και προστασία από χρόνιες παθήσεις : Το ελαιόλαδο χάρη στην πλούσια αντιοξειδωτική του δράση συμβάλλει στη μείωση της δημιουργίας ελεύθερων ριζών, οι οποίες εμπλέκονται στην εξέλιξη διάφορων χρόνιων ασθενειών και στην γήρανση.

Ομαλή λειτουργία του πεπτικού συστήματος: Η κατανάλωση ελαιολάδου συμβάλλει στην ομαλή λειτουργία του πεπτικού συστήματος με διάφορους μηχανισμούς.

Τέλος το ελαιόλαδο βοηθά στο μεταβολισμό της γλυκόζης στους διαβητικούς. Έρευνες σε ασθενείς με διαβήτη έχουν δείξει ότι υγιεινά γεύματα τα οποία περιείχαν ελαιόλαδο είχαν καλύτερη επίδραση στα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα από γεύματα που περιείχαν άλλα λίπη ή ήταν πολύ χαμηλά σε λιπαρά (www.fitdiet.gr, Θεριός, 2005 , Wikipedia).

1.8 Κριτήρια προσδιορισμού της ποιότητας του ελαιολάδου

Το Διεθνές Συμβούλιο Ελαιολάδου έχει θεσπίσει τα κριτήρια για τον προσδιορισμό της ποιότητας του ελαιολάδου και τα οποία είναι η οξύτητα, η οξείδωση, το χρώμα και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά.

- *Οξύτητα.* Αποτελεί το βασικότερο κριτήριο ποιοτικής αξιολόγησης του ελαιολάδου. Με βάση την οξύτητα το ελαιόλαδο διακρίνεται σε βρώσιμο και σε βιομηχανικό.
- *Οξείδωση.* Ο προσδιορισμός της γίνεται κυρίως με τη μέτρηση των υπεροξειδίων ή την απορρόφηση στο υπεριώδες φάσμα ή με άλλες τεχνικές.

- ο *Χρώμα*. Το είδος των λιποδιαλυτών χρωστικών, οι οποίες επικρατούν στο ελαιόλαδο στο στάδιο της συγκομιδής, καθορίζει το χρώμα του ελαιολάδου και αποτελεί βασικό κριτήριο ποιοτικής αξιολόγησης. Η γεύση εξαρτάται από την παρουσία των πτητικών συστατικών, καθώς επίσης από τα λιπαρά οξέα, κυρίως το ελαϊκό και το λινελαϊκό, καθώς και από τις πολυφαινόλες.

Τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του ελαιολάδου εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από το μικροκλίμα της περιοχής αλλά και από ανθρώπινους παράγοντες. Τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (γεύση και άρωμα), καθώς και το (χρώμα), εξαρτώνται εκτός από τις εδαφοκλιματικές συνθήκες, σε μεγάλο βαθμό και από την ποικιλία της ελιάς. Σε κάθε περιοχή, η ποικιλία της ελιάς έχει επιλεγθεί εμπειρικά από τους παραγωγούς, μετά από μακροχρόνια παρατήρηση.

Ένας από τους πιο σημαντικούς παράγοντες που επιδρά στην ποιότητα του ελαιολάδου είναι η κατάλληλη χρονική στιγμή της συγκομιδής, που όμως εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα των εργατικών χεριών, τη δακοπροσβολή, που επιβάλλει τη συγκομιδή του καρπού το γρηγορότερο δυνατό και την ταχύτητα και τον τρόπο επεξεργασίας του ελαιοκάρπου στο ελαιουργείο. Η συγκομιδή του ελαιοκάρπου στην Ελλάδα γίνεται συνήθως χειρωνακτικά, με τη χρήση ραβδιών ή και δονητών και σε μερικές περιπτώσεις μετά από φυσιολογική πτώση. Τα τελευταία χρόνια, η εκτεταμένη χρήση των μηχανικών μεθόδων συλλογής του καρπού βελτίωσε τις μεθόδους συλλογής και μείωσε τις αντίστοιχες δαπάνες. Επίσης, επιτεύχθηκαν σημαντικές βελτιώσεις στις καλλιεργητικές τεχνικές (άρδευση, κλάδεμα, λίπανση κλπ), που είχαν ως αποτέλεσμα την αύξηση των αποδόσεων και τη βελτίωση της ποιότητας του προϊόντος. Ο περιορισμός της χρήσης φυτοφαρμάκων, με σταδιακή αντικατάσταση των αεροψεκασμών με βιολογικές μεθόδους, βελτιώνει την ποιότητα του ελληνικού ελαιολάδου. Τέλος, σημαντική βελτίωση, με ιδιαίτερα θετικές επιπτώσεις στην ποιότητα του ελαιολάδου, επιτεύχθηκε στο χρόνο και στα μέσα μεταφοράς του ελαιοκάρπου από το χωράφι στο ελαιοτριβείο.

Συνεπώς, παράγοντες όπως το μικρό μέγεθος της καλλιεργούμενης έκτασης, οι ποικιλίες, η σύσταση του εδάφους, το ήπιο μεσογειακό κλίμα, η μεγάλη ηλιοφάνεια, ο παραδοσιακός τρόπος παραγωγής, η συλλογή, η επεξεργασία και ο τρόπος διατήρησής του συμβάλλουν στην ποιότητα του ελαιολάδου (Θερίος, 2005).

1.9 Επικίνδυνες προσμίξεις στο ελαιόλαδο

Το ελαιόλαδο είναι προϊόν με υψηλή θρεπτική αξία που μπορεί όμως να μολυνθεί με επικίνδυνες για την ανθρώπινη υγεία ενώσεις κατά τα διάφορα στάδια παραγωγής, εξευγενισμού, τυποποίησης και εμπορίας του. Τέτοιες ενώσεις είναι:

1. *Υπολείμματα γεωργικών φαρμάκων*: Οφείλονται στη μη ορθή εφαρμογή της φυτοπροστασίας και ιδιαίτερα στο στάδιο προ της ωρίμανσης του ελαιοκάρπου.
2. *Οι πτητικοί αλογονωμένοι διαλύτες* (τετραχλωροαιθυλένιο, FREON, τριχλωροαιθάνιο και τριχλωροαιθυλένιο). Η παρουσία FREON σε ελαιόλαδο οφείλεται σε διαρροές ψυγείων που βρίσκονται κοντά σε ελαιουργεία ή τυποποιητήρια ελαιολάδου.
3. *Τα βαρέα μέταλλα*, η παρουσία των οποίων στο λάδι οφείλεται στην επαφή τους με τα μεταλλικά μέρη των μηχανημάτων ή των δεξαμενών κατά τα στάδια της παραγωγής ή αποθήκευσης του ελαιολάδου.
4. *Η παρουσία πολυκυκλικών και αρωματικών υδρογονανθράκων* κυρίως στα πυρηνέλαια, έχει σχέση με τον τρόπο παραγωγής τους.
5. *Οι περιβαλλοντικοί ρυπαντές* όπως διοξίνες, πολυχλωριωμένα διφαινύλια και αρωματικοί υδρογονάνθρακες (βενζόλιο, τολουόλιο κ.λπ.).
6. *Επιβλαβείς ενώσεις* προστίθενται στα λάδια από τις φιάλες από ακατάλληλο υλικό όπως βενζυλοχλωρίδιο.
7. *Παρουσία ξένων σωμάτων* όπως τεμάχια γυαλιού, πλαστικών, μετάλλων και ρύπων(Θερίος,2005).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο - Φυτοπροστατευτικά προϊόντα –Υπολείμματα.

2.1 Ιστορική Αναδρομή

Τα φυτά, η πηγή της τροφής του ανθρώπου και των ζώων προσβάλλονται από ένα μεγάλο αριθμό παρασίτων διαφόρων κατηγοριών. Περίπου 100.000 ασθένειες προκαλούνται από παθογόνους μικροοργανισμούς και άλλα παθογόνα αίτια, όπως οι μύκητες, τα βακτήρια, τα ιοειδή και τα φυτοπλάσματα. Από τα 30.000 είδη ζιζανίων που υπάρχουν τα 1.800 ανταγωνίζονται με τα φυτά των καλλιεργειών για φως, νερό και θρεπτικά στοιχεία, με αποτέλεσμα να παρατηρούνται σημαντικές απώλειες στην απόδοση των καλλιεργειών. Στην περίπτωση των ζωντανών οργανισμών 1.500 είδη νηματωδών από το σύνολο των 15.000 ειδών προσβάλλουν τα καλλιεργούμενα φυτά προκαλώντας σοβαρές απώλειες στη γεωργική παραγωγή και 10.000 είδη εντόμων είναι σοβαρά φυτοπαράσιτα, από τα περίπου 1.000.000 είδη (Ζιώγας & Μαρκόγλου, 2007).

Για τους προαναφερθέντες λόγους, η αντιμετώπιση των παρασίτων με φυτοπροστατευτικά προϊόντα αποτέλεσε σημαντικό επίτευγμα στην ανάπτυξη της γεωργικής παραγωγής. **Φυτοπροστατευτικό Προϊόν (Φ.Π)** είναι κάθε ουσία ή μίγμα ουσιών συμπεριλαμβανομένων και επεξεργασμένων ή μη φυτικών προϊόντων, που μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μέσον καταπολέμησης των εχθρών και των ασθενειών των φυτών ή να βελτιώσει την αποτελεσματικότητα των εν λόγω ουσιών (Νόμος 721/1977). Κάθε Φ.Π περιέχει την ενεργή ουσία (**Φυτοπροστατευτική Ουσία (Φ.Ο.)**) που είναι υπεύθυνη για τη δράση του, η οποία όμως σπάνια χρησιμοποιείται αυτή καθ' αυτή. Η δραστική ουσία αναμιγνύεται και επεξεργάζεται με τις βοηθητικές ουσίες. Γίνεται δηλαδή τυποποίηση του Φ.Π. που οδηγεί στην παραγωγή του σκευάσματος που εφαρμόζεται στο χωράφι (Καρπούζας, 2003).

Τα σοβαρά προβλήματα που δημιουργήθηκαν με τη χρήση των συνθετικών Φ.Ο. άρχισαν να διαπιστώνονται στα μέσα της δεκαετίας του '50 και στα μέσα της επόμενης δεκαετίας άρχισε να γίνεται μελέτη αυτών των προβλημάτων και προσπάθεια εύρεσης λύσεων καθώς και συστηματική έρευνα για την ανάπτυξη εναλλακτικών μεθόδων καταπολέμησης.

Στις σύγχρονες καλλιεργητικές τεχνικές γίνεται προσπάθεια περιορισμού της χρήσης των Φ.Π. όπου αυτό είναι δυνατόν και συμφέρον. Βασική προϋπόθεση για τον περιορισμό αυτό είναι η καλή γνώση της βιολογίας και οικολογίας του προς

καταπολέμηση φυτοπαράσιτου. Επίσης η χρησιμοποίηση τους πρέπει να γίνεται με τρόπο που να εξασφαλίζεται η προστασία της γεωργικής παραγωγής με τις λιγότερο δυσμενείς επιπτώσεις στο περιβάλλον (Μπρούμας, 1998).

Η αλόγιστη χρήση των Φ.Π. σε σύντομο χρονικό διάστημα ανέδειξε ανεπιθύμητες επιπτώσεις της τοξικής τους δράσης στους ζωντανούς οργανισμούς, καθώς επίσης και την ανάπτυξη ανθεκτικότητας από τα παράσιτα. Η διαπίστωση αυτών των αρνητικών συνεπειών είχε ως αποτέλεσμα τη σύσταση αρμόδιων φορέων για τη ρύθμιση και τον έλεγχο των υπολειμμάτων Φ.Ο., καθώς επίσης και τη θέσπιση νομοθετικών μέτρων με σκοπό τον πλήρη έλεγχο της παραγωγής και της χρήσης τους. Έτσι λοιπόν, για να μη δημιουργούνται προβλήματα στο εμπόριο, διεθνείς οργανισμοί έχουν αναλάβει τον εναρμονισμό των MRL_s, ώστε να εξυπηρετείται το εμπόριο χωρίς να αποβαίνει εις βάρος του λαού ενός κράτους. Τέτοιοι οργανισμοί είναι: ο Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας των Ηνωμένων Εθνών (FAO), η Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας (WHO) και η Codex Committee on Pesticide Residues (CCPR). Τα θέματα που αφορούν τα Φ.Π. εντός της Ευρωπαϊκής Ένωσης ρυθμίζονται βάσει της οδηγίας 91/414/EEC περί φυτοπροστατευτικών προϊόντων. Στην Ελλάδα οι αρμοδιότητες του ελέγχου είναι καταμερισμένες σε πολλές υπηρεσίες. Το Γενικό Χημείο του Κράτους έχει αναλάβει ένα μεγάλο μέρος των ελέγχων αυτών. Επίσης, έλεγχος υπολειμμάτων γίνεται από τη Διεύθυνση Φυτοπροστασίας, τα Περιφερειακά Κέντρα Προστασίας Φυτών και το Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο.

Το Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο και Συμβούλιο θέσπισε το 6^ο Πρόγραμμα Δράσης για το περιβάλλον, το οποίο προβλέπει την ανάπτυξη επτά Θεματικών στρατηγικών για τα κύρια περιβαλλοντικά προβλήματα. Ανάμεσα σε αυτές τις επτά Στρατηγικές είναι και η *Θεματική Στρατηγική για την Αειφορία στη Χρήση των Φυτοφαρμάκων*. Ο κύριος στόχος αυτής της στρατηγικής είναι η μείωση των επιπτώσεων των Φ.Π. στην υγεία του ανθρώπου και στο περιβάλλον, δηλαδή ελαχιστοποίηση των κινδύνων - αύξηση της αειφορίας στη χρήση τους, εξασφαλίζοντας όμως παράλληλα και την αναγκαία προστασία των καλλιεργειών. Έτσι με βάση αυτά θεωρήθηκε αναγκαίο να εκτιμηθεί η αποτελεσματικότητα και αναθεώρηση της ισχύουσας νομοθεσίας για τα Φ.Π., προκειμένου να εξασφαλιστεί το υψηλό επίπεδο προστασίας της υγείας τού καταναλωτή.

Μέχρι σήμερα το μεγαλύτερο μέρος της Κοινοτικής νομοθεσίας έχει εστιασθεί

στο αρχικό και στο τελικό στάδιο του κύκλου ζωής των Φ.Π. Το αρχικό στάδιο του κύκλου ζωής των Φ.Π. είναι η έγκριση των χημικών ουσιών που χρησιμοποιούνται στα Φ.Π πριν από τη διάθεσή τους στην αγορά και το τελικό στάδιο αυτού του κύκλου είναι τα ανώτατα όρια υπολειμμάτων (MRLs) στα τρόφιμα και στις ζωοτροφές. Συνεπώς, η επισκόπηση της σχετικής Κοινοτικής νομοθεσίας προς την κατεύθυνση της αειφορίας περιλαμβάνει την τροποποίηση της οδηγίας 91/414/ΕΟΚ για την έγκριση, τη διάθεση στην αγορά και τον έλεγχο των Φ.Π. και των οδηγιών που σχετίζονται με τον καθορισμό των MRLs στα τρόφιμα και τις ζωοτροφές.

Η οδηγία 91/414/ΕΟΚ θεσπίζει ένα εναρμονισμένο σύστημα εγκρίσεων των δραστικών ουσιών' σε επίπεδο Ε.Ε. Η επιτροπή της Ε.Ε. αποφασίζει κεντρικά την εγγραφή των ουσιών στο Παράρτημα Ι της οδηγίας (θετική λίστα) και στη συνέχεια τα κράτη - μέλη αξιολογούν και εγκρίνουν στη χώρα τους με το ίδιο ενιαίο και εναρμονισμένο σύστημα αξιολόγησης (ενιαίες αρχές), τα Φ.Π. Με τη διαδικασία αυτή επαναξιολογούνται όλες οι παλιές δραστικές ουσίες, δηλαδή ουσίες που κυκλοφορούσαν αγορά της Ε.Ε. μέχρι 25-7-1993, και ταυτόχρονα εγκρίνονται και νέες δραστικές ουσίες (Καλαμαράκη, 2004).

2.2 Κατηγορίες – Ταξινόμηση Φυτοπροστατευτικών Προϊόντων

Η ταξινόμηση των Φ.Π. μπορεί να γίνει ανάλογα με τη βιολογική τους δράση ή τη χημική τους δομή. Στην πρώτη περίπτωση, ταξινομούνται σε *Μυκητοκτόνα*, *Εντομοκτόνα*, *Ζιζανιοκτόνα*, *Νηματωδοκτόνα*, *Τρωκτικοκτόνα*, *Βακτηριοκτόνα*, *Ακαρεοκτόνα*, *Μαλακιοκτόνα*, *Φερομόνες* και *Ρυθμιστές Ανάπτυξης*. Οι δραστικές ουσίες των Φ.Π. κάθε ομάδας ταξινομούνται σε ομάδες σύμφωνα με τη χημική τους δομή, τον τρόπο χρήσης τους και την εξειδικευμένη βιολογική τους δράση. Σύμφωνα με τη χημική τους δομή τα οργανικά Φ.Π. ταξινομούνται σε τέσσερις γενικές ομάδες, οι οποίες είναι τα *Οργανοχλωριωμένα*, τα *Οργανοφωσφορικά*, τα *Καρβαμιδικά* και τα *Ποικίλης Χημικής Σύστασης*. Στα ποικίλης χημικής σύστασης Φ.Π. περιλαμβάνονται τα Φαινολικά, τα όξινα ζιζανιοκτόνα και τα παράγωγα της ουρίας, οι Δινιτροανιλίνες, τα Πυρεθρινοειδή ή Συνθετικές Πυρεθρίνες, τα Μερκαπτοϊμικά μυκητοκτόνα και τα μυκητοκτόνα Ιμιδαζολίου και Τριαζολίου.

Τα οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα είναι από τις παλαιότερες συνθετικές οργανικές ενώσεις, οι οποίες έπαιξαν σημαντικό ρόλο στην προστασία της γεωργικής

παραγωγής και της δημόσιας υγείας μετά το Β' Παγκόσμιο Πόλεμο. Το πιο γνωστό εντομοκτόνο αυτής της κατηγορίας είναι το *DDT*. Λόγω όμως της μεγάλης τους σταθερότητας και του φαινομένου της βιοσυσσωρεύσης που παρουσιάζουν, με την πάροδο του χρόνου άρχισαν να διαπιστώνονται δυσμενείς επιπτώσεις στο περιβάλλον. Το κύριο μειονέκτημα αυτών των ενώσεων είναι ότι δεν αποδομούνται εύκολα, συσσωρεύονται στο λιπώδη ιστό, περνούν στο γάλα και τα αυγά, με αποτέλεσμα να εισέρχονται στην τροφική αλυσίδα των ζώων και του ανθρώπου. Έτσι, τη δεκαετία του '70 απαγορεύεται η χρήση των περισσότερων οργανοχλωριωμένων εντομοκτόνων. Όσον αφορά την εντομοτοξική δράση των οργανοχλωριωμένων έχει διαπιστωθεί ότι παρεμποδίζουν την αξονική μετάδοση των νευρικών σημάτων, προκαλώντας έτσι νευρική διέγερση, σπασμούς και τελικά το θάνατο των εντόμων (Ζιώγας & Μαρκόγλου, 2007).

Τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα είναι μια πολυπληθής ομάδα συνθετικών οργανικών εντομοκτόνων με ευρύ φάσμα δράσης. Οι φυσικοχημικές και βιολογικές τους ιδιότητες τα κατέστησαν ικανά να υποκαταστήσουν σχεδόν πλήρως τα οργανοχλωριωμένα. Οι βασικές τους ιδιότητες είναι ότι χαρακτηρίζονται από υψηλή εντομοκτόνο και ακαρεοκτόνο δράση, έχουν ευρύ φάσμα δράσης, μικρή υπολειμματική διάρκεια και σχετικά γρήγορη αποδόμηση σε μεταβολικά προϊόντα μη τοξικά για τον άνθρωπο και τα ζώα. Η κίνησή τους στο περιβάλλον είναι πρακτικά αμελητέα, αφού προσροφούνται ισχυρά στα εδαφικά κolloειδή. Σχετικά με το βιοχημικό μηχανισμό δράσης τους, δρουν στις χολινεργικές συνάψεις ως ισχυροί αναστολείς των χολινεστερασών, δεσμεύοντας τη σερίνη της ενεργού περιοχής της *Ache*, παρεμποδίζοντας έτσι το μεταβολισμό της ακετυλοχολίνης.

Οι καρβαμιδικές ενώσεις είναι νεότερης γενιάς εντομοκτόνα σε σχέση με τα οργανοχλωριωμένα και τα οργανοφωσφορικά. Έχουν τον ίδιο μηχανισμό δράσης με τα οργανοφωσφορικά, χωρίς όμως δέσμευση της χολινεστεράσης, αλλά με επιβράδυνση της δράσης της και ως συνέπεια την υδρόλυση της ακετυλοχολίνης. Επίσης, δεν έχουν ευρύ φάσμα δράσης. Τα περισσότερα από αυτά έχουν υψηλή οξεία τοξικότητα στα θηλαστικά, τα ψάρια και τα πουλιά. Το πιο γνωστό καρβαμιδικό εντομοκτόνο είναι το *carbaryl* (*Sevin*), το οποίο ήταν το πρώτο καρβαμιδικό εντομοκτόνο που εφαρμόστηκε στη γεωργική πράξη στα μέσα της δεκαετίας του '50.

Τα πυρεθρινοειδή εντομοκτόνα ή συνθετικές πυρεθρίνες αποτελούν την τέταρτη γενιά συνθετικών οργανικών εντομοκτόνων. Είναι παράγωγα της φυσικής

πυρεθρίνης I, που παραλαμβάνεται από τις ταξιανθίες του φυτού *Tanacetum* (*Chrysanthemum*, *Pyrethrum*), το οποίο είναι γνωστό ως «πύρεθρο». Οι συνθετικές πυρεθρίνες παρουσιάζουν φωτοσταθερότητα, ιδιότητα που τους προσδίδει μεγαλύτερη υπολειμματική διάρκεια. Επίσης, έχουν μεγαλύτερη εντομοτοξική δράση, μια ιδιότητα που επιτρέπει τη μείωση των δόσεων και του αριθμού των επεμβάσεων. Στον άνθρωπο διασπώνται πολύ σύντομα προς μη τοξικά παράγωγα, γεγονός που τα καθιστά πρακτικά ακίνδυνα. Αν και παρουσιάζουν υψηλή λιποδιαλυτότητα και σχεδόν μηδενική υδατοδιαλυτότητα δεν παρουσιάζουν πρόβλημα βιοσυσώρευσης, σε αντίθεση με τα οργανοχλωριωμένα. Παρά τα πλεονεκτήματά τους, είναι ενώσεις οι οποίες είναι επικίνδυνες για τα ψάρια, είναι ισχυρά μελισσοτοξικές και οι περισσότερες από αυτές επηρεάζουν την ωφέλιμη εντομοπανίδα. Ο βιοχημικός μηχανισμός δράσης των πυρεθρινών είναι παρόμοιος με αυτόν των οργανοχλωριωμένων. Παρεμποδίζουν τη μετάδοση των νευρικών σημάτων προσυναπτικά (Ζιώγας & Μαρκόγλου, 2007).

2.3 Εχθροί – Φ.Π. στην Ελιά.

Η ελιά έχει πολλούς εχθρούς. Στην περιοχή της Μεσογείου αναγνωρίζονται οι ακόλουθες τέσσερις κατηγορίες παρασίτων.

1. Παράσιτα μείζονος οικονομικής σημασίας τα οποία προκαλούν ζημιές μεγάλης οικονομικής σημασίας και απαιτούν ετήσια καταπολέμηση, περιλαμβάνουν μόνο ένα είδος το Δάκο (*Bactrocera oleae*).
2. Παράσιτα δευτερεύουσας μείζονος σημασίας στα οποία περιλαμβάνονται ο Πυρηνοτήτης (*Prays oleae*) και το Λεκάνιο (*Saisetia oleae*).
3. Παράσιτα περιορισμένης οικονομικής σημασίας
4. Παράσιτα χωρίς οικονομική σημασία.

Δάκος (*Bactrocera oleae*)

Είναι ο σημαντικότερος εντομολογικός εχθρός της ελιάς. Προσβάλλει μόνο τον καρπό της καλλιεργουμένης ή της άγριας ελιάς.

Το ενήλικο έχει μήκος περίπου 5mm. Ο θώρακας είναι στα νώτα σκοτεινότερος και έχει κατά μήκος 3 σκοτεινότερες γραμμές και υπόλευκο και υποκίτρινο scutellum και επίσης υπόλευκες ή υποκίτρινες κηλίδες στα πλάγια. Οι πτέρυγες είναι διαφανείς ιριδίζουσες με ένα σκοτεινό στίγμα στην άκρη. Ο ωοθέτης είναι ευδιάκριτος. Είναι

είδος μονοφάγο. Στη φύση το θηλυκό ωοτοκεί και η προνύμφη αναπτύσσεται μόνο στο ζωντανό μεσοκάρπιο της ελιάς και της αγριελιάς.



Εικόνα 2.1: Ενήλικο έντομο *Bactrocera oleae*

Έχει 3-4 γενεές το έτος. Αρχίζει την ωοτοκία συνήθως τον Ιούλιο και κατά κανόνα εισάγει ένα αυγό ανά καρπό. Η προνύμφη ορύσσει στοά στο μεσοκάρπιο και όταν συμπληρώνει την ανάπτυξή της νυμφώνεται το μεν θέρος μέσα στον καρπό, το δε φθινόπωρο και τον χειμώνα στο έδαφος σε μικρό βάθος. Με ευνοϊκές συνθήκες ο βιολογικός κύκλος συμπληρώνεται σε ένα μήνα. Ο πληθυσμός του δάκου επηρεάζεται θετικά το φθινόπωρο ιδιαίτερα όταν ο καιρός είναι υγρός και σχετικά ζεστός. Αντίθετα, οι υψηλές θερμοκρασίες του θέρους και η χαμηλή ατμοσφαιρική υγρασία δεν ευνοούν το δάκο της ελιάς.

Για την καταπολέμηση του δάκου εφαρμόζονται με επιτυχία από χρόνια τόσο από το κράτος όσο και από τους παραγωγούς, χημική καταπολέμηση που περιλαμβάνει δολωματικούς ψεκασμούς και ψεκασμούς καλύψεως φυλλώματος. Εκτός των ψεκασμών με εντομοκτόνα, πολύ αποτελεσματική αποδείχτηκε ως τώρα η μαζική παγίδευση των ενηλίκων με διάφορους τύπους παγίδων (τροφικών, χρωματικών, φερομονικών, ή συνδυασμούς αυτών).

Στους Πίνακες 2.1, 2.2, και 2.3 παρουσιάζονται οι φυτοπροστατευτικές ουσίες και μικροβιακά σκευάσματα που χρησιμοποιούνται στην καλλιέργεια της ελιάς για την καταπολέμηση του δάκου και του πυρηνοτρήτη αντίστοιχα όπως δίνονται από το υπουργείο για το 2010.

Πίνακας 2.1: Κατάλογος δραστικών ουσιών που χρησιμοποιούνται στην καλλιέργεια της ελιάς.

Εντομοκτόνα	Μυκητοκτόνα	Ζιζανιοκτόνα
<u>Alpha-cypermethrin</u>	<u>Calcium copper sulfate</u>	<u>Oxyfluorfen</u>
<u>Bacillus thuringiensis var. aizawai</u>	<u>Copper hydroxide</u>	<u>Flumioxazine</u>
<u>Bacillus thuringiensis var. kurstaki</u>	<u>Copper oxide</u>	<u>Glufosinate-ammonium</u>
<u>Beauveria bassiana</u>	<u>Copper oxychloride</u>	<u>Glyphosate</u>
<u>Beta-cyfluthrin</u>	<u>Copper sulfate, tri-basic</u>	
<u>Chlorpyrifos-methyl</u>	<u>Mancozeb</u>	
<u>Hydrolysed proteins</u>	<u>Dodine</u>	
<u>Dimethoate</u>		
<u>Fenoxycarb</u>		
<u>paraffin oil</u>		
<u>Pirimicarb</u>		
<u>Pyrethrins</u>		
<u>Pyriproxyfen</u>		
<u>Spinosad</u>		
<u>Teflubenzuron</u>		
<u>Urea</u>		
<u>Lambda cyhalothrin</u>		
<u>Cypermethrin</u>		
<u>Deltamethrin</u>		
<u>Diflubenzuron</u>		

(Πηγή: www.minagric.gr)

Πίνακας 2.2: Κατάλογος Δραστικών Ουσιών που καταπολεμούν τον Δάκο.

Δραστική Ουσία
<u>Alpha-cypermethrin</u>
<u>Beauveria bassiana</u>
<u>Beta-cyfluthrin</u>
<u>Deltamethrin</u>
<u>Dimethoate</u>
<u>Hydrolysed proteins</u>
<u>Lambda cyhalothrin</u>
<u>Pyrethrins</u>
<u>Spinosad</u>
<u>Urea</u>

(Πηγή: www.minagric.gr)

Πίνακας 2.3: Κατάλογος Δραστικών Ουσιών που καταπολεμούν τον Πυρηνотρήτη.

Δραστική Ουσία
<u>Bacillus thuringiensis var. aizawai</u>
<u>Bacillus thuringiensis var. kurstaki (ABTS-351)</u>
<u>Bacillus thuringiensis var. kurstaki (EG-2348)</u>

<u>Bacillus thuringiensis var. kurstaki (GC-91)</u>
<u>Bacillus thuringiensis var. kurstaki (PB-54)</u>
<u>Bacillus Thuringiensis var. Kurstaki (SA-11)</u>
<u>Chlorpyrifos-methyl</u>
<u>Deltamethrin</u>
<u>Diflubenzuron</u>
<u>Dimethoate</u>
<u>Lambda cyhalothrin</u>
<u>Pyrethrins</u>
<u>Teflubenzuron</u>

(Πηγή: www.minagric.gr)

2.4 Υπολείμματα Φυτοπροστατευτικών Ουσιών.

Τα *υπολείμματα φυτοπροστατευτικών προϊόντων (Pesticides residues)* είναι ουσίες ή μίγματα ουσιών που βρίσκονται στην τροφή των ανθρώπων ή των ζώων, ως αποτέλεσμα της χρήσης των Φ.Π. Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται και οι ουσίες που είναι προϊόντα διάσπασης, μεταβολισμού ή χημικής αντίδρασης εφόσον είναι τοξικολογικά σημαντικές (FAO, 1981).

Η έκθεση των ανθρώπων σε Φ.Ο. υπολογίζεται από την ακόλουθη σχέση:

$$\text{Έκθεση (Exposure) (mg δ.Ο./ Kg σ.β./ d)} = \text{Κατανάλωση (Consumption) (mg/ Kg σ.β./d)} * \text{Υπολείμματα (Residues) (mg δ.Ο/ Kg)}$$

Το πρώτο βήμα ελέγχου της έκθεσης είναι η σύγκριση των ανιχνεύσιμων υπολειμμάτων του Φ.Ο. με το *Μέγιστο Επιτρεπτό Όριο Υπολειμμάτων (Maximum Residues Level MRL)*, που έχει εγκριθεί για τη υπό έλεγχο Φ.Ο. και τρόφιμο, ενώ η Γενική Αρχή είναι ότι η μέση πρόσληψη μέσω της διατροφής δεν πρέπει να υπερβαίνει την ADI κατά τη διάρκεια μιας χρονικής περιόδου, ενώ σε συχνές εκθέσεις δεν πρέπει να ξεπερνά την ARfD. Το Μέγιστο Επιτρεπτό Όριο Υπολειμμάτων, είναι η μέγιστη συγκέντρωση υπολειμμάτων (mg/Kg) η οποία είναι νόμιμα αποδεκτή σε φυτικά και ζωϊκά προϊόντα. Η καθιέρωση των MRLs βασίζεται σε *Κανόνες Ορθής Γεωργικής Πρακτικής (Good Agricultural Practice - GAP)* και υπέρβασή τους σημαίνει παραβίαση αυτών των αρχών. Δεν είναι τοξικολογικά όρια, αλλά θα πρέπει να είναι τοξικολογικά αποδεκτά. Προκύπτουν από στοιχεία εποπτευόμενων πειραμάτων αγρού (Nastreddine et al, 2002).

Για τον καθορισμό του MRL μιας Φ.Ο. σε κάποιο γεωργικό προϊόν λαμβάνεται υπόψη η τιμή της ADI, το βάρος του ανθρώπου και το ποσοστό συμμετοχής του προϊόντος στην καθημερινή διαίτα ενός λαού ή μιας ομάδας του πληθυσμού,

θεωρώντας ότι ο μέσος όρος ισχύει για το κάθε άτομο. Λαμβάνοντας υπόψη το ποσοστό συμμετοχής της τομάτας π.χ. στη διαίτα των Ελλήνων και των Γερμανών, τα MRLs θα έπρεπε να καθοριστούν σε διαφορετικό ύψος, αφού ο ελληνικός λαός καταναλώνει πολύ μεγαλύτερες ποσότητες τομάτας και μάλιστα καθ' όλη τη διάρκεια του έτους.

2.5 Η Αναγκαιότητα Παραγωγής Καθαρού Ελαιόλαδου

Η μεγάλη σημασία που έχει, για τη διατροφή του ανθρώπου, το ελαιόλαδο, κάνει επιτακτικότερη την ανάγκη παραγωγής όσο το δυνατόν ποιοτικώς ανώτερου προϊόντος και επομένως καθαρού και απαλλαγμένου από τοξικά υπολείμματα φυτοφαρμάκων. Δεδομένου μάλιστα, ότι μεγάλες ποσότητες εξάγονται στο εξωτερικό και σε πολλά κράτη υπάρχουν αυστηρές προδιαγραφές ως προς τα τυχόν υπολείμματα γεωργικών φαρμάκων, κυρίως εντομοκτόνων, δημιουργούνται σοβαρές υποχρεώσεις των ελαιοπαραγωγών όσον αφορά στη χρησιμοποίηση εντομοκτόνων που είναι δυνατόν να αφήσουν υπολείμματα στο ελαιόλαδο και να δημιουργήσουν προβλήματα στην υγεία των καταναλωτών. Ας μη ξεχνούμε ότι τα τελευταία χρόνια έχουν παγκοσμίως αυξηθεί οι ευαισθησίες των καταναλωτών και έχουν θεσπισθεί νόμοι με αρκετά αυστηρές διατάξεις ως προς τα θέματα αυτά. Έτσι και η Ειδική Επιτροπή των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων έχει θεσπίσει διατάξεις (Οδηγίες) που καθορίζουν τα Ανώτατα Όρια Υπολειμμάτων (MRLs) στα προϊόντα που διακινούνται στις χώρες μέλη. Όπως αναφέρει η Χ. Λέντζα-Ρίζου (1994) «Η εναρμόνιση συνεπάγεται και τη βασική υποχρέωση για κάθε κράτος να διενεργεί τακτικούς δειγματοληπτικούς ελέγχους στα γεωργικά προϊόντα της αγοράς, με τους οποίους να διαπιστώνεται εάν η περιεκτικότητα των τροφίμων που προσφέρονται στον καταναλωτή ανταποκρίνεται στις κοινοτικές προδιαγραφές από πλευράς υπολειμμάτων».

Ως προς το παραγόμενο στην Ελλάδα ελαιόλαδο, έλεγχοι που έγιναν κατά τα έτη 1988-1989 και 1989-1990 σε 630 δείγματα, έδειξαν ότι σε ένα μικρό ποσοστό 4% και 6%, αντίστοιχα δειγμάτων, βρέθηκαν υπολείμματα του εντομοκτόνου Lebaycid (fenthion) και μεταβολιτών του, πάνω από το όριο του Κώδικα Τροφίμων των *FAO/WHO* (1mg/kg) (Λέντζα-Ρίζου, 1994). Το πιο πάνω εντομοκτόνο, ως γνωστόν, χρησιμοποιήθηκε για την καταπολέμηση του δάκου, αλλά μόνο νωρίς το καλοκαίρι (Ιούνιο-Ιούλιο) προτού ο ελαιόκαρπος συνθέσει λάδι, διότι είναι ελαιοδιαλυτό

διασυστηματικό σκεύασμα. Όταν λοιπόν ανιχνεύονται υπολείμματα του εντομοκτόνου αυτού, σημαίνει ότι ορισμένοι παραγωγοί δεν τηρούν τις οδηγίες χρήσεως του φυτοφάρμακου και ψεκάζουν τα ελαιόδεντρα τους το φθινόπωρο (Γαμβριάς, 1998).

2.6 Οι Επιπτώσεις από την Αλόγιστη Χρήση των Εντομοκτόνων

Εκτός όμως από το θέμα της παραγωγής καθαρού ελαιολάδου, η αλόγιστη χρήση εντομοκτόνων στις ελιές για την καταπολέμηση των εντομολογικών εχθρών, έχει και άλλη σημασία με πολλές παραμέτρους.

Οι κυριότερες από αυτές είναι:

- Τοξικές επιπτώσεις στον άνθρωπο, κυρίως στον ελαιοκαλλιεργητή, ο οποίος ψεκάζει τις ελιές του με εντομοκτόνα μεγάλης τοξικότητας.
- Τοξικές επιπτώσεις στα ζώα εκτροφής (αιγοπρόβατα) που πηγαίνουν για βόσκηση στους ελαιώνες μετά από ψεκασμό.
- Καταστροφή της ωφέλιμης πανίδας. Πολλά παράσιτα και αρπακτικά έντομα ωφέλιμα, εξοντώνονται κατά τους ψεκασμούς με τοξικά εντομοκτόνα και καταστρέφεται έτσι η βιολογική ισορροπία.
- Ρύπανση του περιβάλλοντος γενικότερα, μετά από επανειλημμένες επεμβάσεις, με εντομοκτόνα μεγάλης τοξικότητας (Γαμβριάς, 1998).

2.7 Σημαντικότερες συνέπειες των υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων φυτοπροστασίας της ελιάς

Η εφαρμογή της χημικής καταπολέμησης των παρασίτων στις ελαιοκαλλιέργειες είναι η πιο φθηνή μέθοδος φυτοπροστασίας και σε συνδυασμό με την συνολική ισχύουσα πολιτική αγρονομίας και αγροοικολογίας, πολλοί ελαιοκαλλιεργητές κάνουν κατάχρηση των φυτοφαρμάκων για να διασφαλίσουν την παραγωγή τους. Η αλόγιστη αυτή χρήση των παρασιτοκτόνων στις καλλιέργειες συμβάλει δυναμικά στην σταδιακή μείωση της βιοποικιλότητας των ελαιώνων, στην ρύπανση των επιφανειακών υδάτων και ρύπανση των προϊόντων της ελιάς, ενώ πιθανολογείται και η σημαντική επιμόλυνση των υπόγειων υδάτων (Beaufy, 2002).

Οι εντατικές εφαρμογές των τεχνικών χημικής φυτοπροστασίας προκάλεσαν καταστροφικές συνέπειες στην γενική χλωρίδα και πανίδα των οικοσυστημάτων των

ελαιώνων (Beaufy, 2002, Najmanova et al. 2003), με την σταδιακή μείωση του είδους των αρθροπόδων και των μυκήτων τα οποία αποτελούν και τη βάση της. Έχει αναφερθεί ότι η βιοποικιλότητα είναι πολύ υψηλότερη στους παραδοσιακούς ελαιώνες όπου δεν χρησιμοποιούνται φυτοφάρμακα (Beaufy, 2002).

Ένα άλλο σημαντικό περιβαλλοντικό πρόβλημα που προκύπτει από την χρήση φυτοφαρμάκων στους ελαιώνες είναι η ρύπανση των επιφανειακών υδάτων αφού οι εντατικές φυτείες στις οποίες και χρησιμοποιούνται οι μεγαλύτερες ποσότητες φυτοφαρμάκων αρδεύονται με αποτέλεσμα την έκπλυση μεγαλύτερων ποσοτήτων φυτοφαρμάκων. Ο έλεγχος των υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων των ελαιοκαλλιέργειών στα υπόγεια και επιφανειακά φυσικά ύδατα δεν έχει μελετηθεί αρκετά. Ωστόσο οι υπάρχοντες μελέτες υποδεικνύουν ότι η μεγαλύτερη ρύπανση είναι αυτή των επιφανειακών φυσικών υδάτων (Beaufy, 2002).

Το σημαντικότερο ίσως κεφάλαιο της χρήσης των φυτοφαρμάκων στις ελαιοκαλλιέργειες αποτελεί η ύπαρξη των υπολειμμάτων τους στον καρπό των ελαιοποιήσιμων ποικιλιών και η πιθανότητα συγκέντρωσής τους στο ελαιόλαδο, το οποίο εξορισμού παράγεται με φυσικές διεργασίες από τον καρπό της ελιάς και η οργανική λιπαρή φύση του προσφέρεται στην συσσώρευση πολλών τοξικών οργανικών ουσιών. Τα υπολείμματα των ψεκασμών καλύπτει στον ελαιόκαρπο, η επιμόλυνση του ελαιοκάρπου από τη διασπορά των φυτοφαρμάκων στον ελαιώνα, η επαφή του καρπού με το έδαφος αν συγκομιδή γίνεται από το έδαφος, αλλά και η τυχόν επιμόλυνση του ελαιοκάρπου από όμβρια ύδατα, νερό και εγκαταστάσεις ελαιοτριβείων οδηγεί σε πιθανή συγκέντρωσή του στο ελαιόλαδο αφού κατά μέσο όρο 1 kg ελαιολάδου παράγεται από 4-7 kg ελαιοκάρπου (Αμβράζη, 2007).

2.8 Υπολείμματα γεωργικών φαρμάκων στον ελαιόκαρπο και το ελαιόλαδο

Οι περισσότερες έρευνες στην υπολειμματικότητα των γεωργικών φαρμάκων της ελιάς αναφέρονται στα υπολείμματα των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων (ιδιαίτερα των fenthion και dimethoate) λόγω της ευρείας χρήσης τους στις ελαιοκαλλιέργειες και περιλαμβάνουν είτε την καταγραφή των υπολειμμάτων στον ελαιόκαρπο και στο ελαιόλαδο μετά από ελεγχόμενες εφαρμογές (supervised trials) φυτοφαρμάκων για την εύρεση των κατάλληλων μεσοδιαστημάτων πριν την συγκομιδή, είτε την καταγραφή των υπολειμμάτων στα προς κατανάλωση προϊόντα

στο εμπόριο (ελαιόκαρπος και ελαιόλαδο) για την διασφάλιση της υγείας του καταναλωτή (Αμβράζη 2007).

2.9 Ισχύουσα νομοθεσία για τα υπολείμματα γεωργικών φαρμάκων στην ελιά και το ελαιόλαδο

Με σκοπό την προστασία της υγείας του καταναλωτή από την πρόσληψη υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων πάνω από τις αποδεκτές δόσεις με τη διατροφή, Ευρωπαϊκή Ένωση έχει θεσπίσει ανώτατα όρια υπολειμμάτων στα πρωτογενή εδώδιμα αγροτικά προϊόντα όπου συμπεριλαμβάνεται και η ελιά (European Communities, Council Directive 76/895, L340, 9.12.76). Για τα επεξεργασμένα τρόφιμα, όπου ανήκει και το ελαιόλαδο, η Ευρωπαϊκή Ένωση δεν έχει καθορίσει MRLs και η πρακτική που συνήθως χρησιμοποιείται είναι η αποδοχή για αυτά των ορίων των πρωτογενών προϊόντων από τα οποία προέρχονται. Εξαιρέσεις υπάρχουν στις περιπτώσεις εκείνες όπου κατά τη διαδικασία μεταποίησης συμβαίνει συμπύκνωση ή αραίωση των υπολειμμάτων, όπως για τα υπολείμματα λιποδιαλυτών δραστικών ουσιών που χρησιμοποιούνται στην καλλιέργεια της ελιάς και που με την ελαιοποίηση συγκεντρώνονται στο ελαιόλαδο.

Για τη διευκόλυνση των εμπορικών συναλλαγών μεταξύ των διαφόρων χωρών με διαφορετικές νομοθεσίες σχετικά με τα υπολείμματα οι οργανισμοί FAO/WHO, έχουν θεσπίσει ανώτατα επιτρεπτά όρια φυτοφαρμάκων στις ελιές και το ελαιόλαδο. Ωστόσο, τα MRLs που έχουν θεσπιστεί για το ελαιόλαδο από την Codex Alimentarius Commission (Codex Alimentarius Commission-FAO/WHO, 1996) περιορίζονται στον αριθμό των έξι δραστικών ουσιών.

Έτσι, παρά το γεγονός ότι οι FAO/WHO, έχει θεωρήσει κάποια MRLs για τα μεταποιημένα τρόφιμα, η επιτροπή Codex Alimentarius πρόσφατα επισημαίνει την αναγκαιότητα υιοθέτησης ενιαίας και θεμελιώδους πολιτικής για τον ορισμό και την αντιμετώπιση των ανώτατων ορίων υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων στα επεξεργασμένα τρόφιμα, προτείνει την αποδοχή των ορίων των πρωτογενών προϊόντων και για τα επεξεργασμένα τρόφιμα για τις περιπτώσεις όπου δεν λαμβάνει χώρα συμπύκνωση των υπολειμμάτων κατά την διεργασία επεξεργασίας τους και αιτείται στοιχεία για την τελευταία περίπτωση επεξεργασμένων τροφίμων, στα οποία ανήκει και το ελαιόλαδο (Codex Alimentarius Commission-FAO/WHO, CL 2006/20, 2006).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο – Προσδιορισμός Υπολειμμάτων Φ.Ο.

3. Προσδιορισμός υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών ουσιών

Η ανίχνευση και ο ποσοτικός προσδιορισμός υπολειμμάτων Φ.Π. στα τρόφιμα, γνώρισε αλματώδη ανάπτυξη κατά τα τελευταία είκοσι χρόνια. Η καλύτερη γνώση της τοξικότητας των διαφόρων ουσιών και οι πιέσεις των καταναλωτών και των οικολογικών οργανώσεων προς τις κυβερνήσεις των ανεπτυγμένων χωρών και τους αρμόδιους φορείς ελέγχου, είχαν ως αποτέλεσμα την υποστήριξη της έρευνας με στόχο την ανάπτυξη των αναλυτικών δυνατοτήτων και τη μείωση των ορίων προσδιορισμού των παρασιτοκτόνων σε πολύ χαμηλότερα επίπεδα από ότι παλαιότερα.

Ο προσδιορισμός των υπολειμμάτων, ως μέρος της αναλυτικής χημείας διέπεται από την αξιόπιστη και ευαίσθητη ανάλυση. Επιπλέον, έχει τις εξής ιδιαιτερότητες

- Οι συγκεντρώσεις των υπολειμμάτων είναι πολύ μικρές, της τάξεως $\mu\text{g}/\text{Kg}$ έως αρχές mg/Kg ή ng/L έως $\mu\text{g}/\text{L}$, και βρίσκονται σε συνάρτηση με τα αποδεκτά όρια υπολειμμάτων, που θεσπίζουν οι διεθνείς οργανισμοί ή η νομοθεσία κάθε χώρας, και τα οποία τα τελευταία χρόνια έχουν συνεχώς καθοδική τάση.
- Το υπόστρωμα του δείγματος που αποτελείται από πολλά συστατικά με ποικίλες ιδιότητες, συνυπάρχει στο τελικό εκχύλισμα και συνήθως παρεμποδίζει τη μέτρηση.
- Το ιστορικό των δειγμάτων που αναλύονται είναι πολλές φορές άγνωστο.

Οι μέθοδοι υπολειμμάτων διακρίνονται σε ειδικές (specific), όταν προσδιορίζουν ένα γεωργικό φάρμακο, και σε πολύ-υπολειμματικές (multiresidue) όταν προσδιορίζουν σύγχρονος πολλά γεωργικά φάρμακα.

Τα στάδια των εργασιών για τον προσδιορισμό των υπολειμμάτων των Φ.Ο. είναι τα ακόλουθα:

- Δειγματοληψία.
- Επεξεργασία και αποθήκευση.
- Προετοιμασία αναλυτικού δείγματος.
- Επιλογή αναλυτικής μεθόδου.

- Εφαρμογή αναλυτικής μεθόδου.
- Διασφάλιση ποιότητας των αναλυτικών μετρήσεων.

3.1 Δειγματοληψία και αποθήκευση δειγμάτων.

Τα πειράματα υπολειμμάτων γίνονται με χρησιμοποίηση σκευασμάτων και όχι εργαστηριακών παρασκευασμάτων, γιατί η μορφή του σκευάσματος επηρεάζει την υποβάθμιση του γεωργικού φαρμάκου.

3.2 Εκχύλιση του δείγματος

Η εκχύλιση είναι η φάση κατά την οποία οι Φ.Ο. λαμβάνονται από τους φυτικούς ιστούς με κατάλληλα εκχυλιστικά διαλύματα. Η επιλογή των εκχυλιστικών μέσων είναι καθοριστικής σημασίας για την επιτυχία της ανάλυσης. Επιδίωξη είναι, το εκχυλιστικό μέσο που θα χρησιμοποιηθεί να διαθέτει μεγάλη εκχυλιστική ικανότητα, ώστε να μπορεί να εξάγει τα μόρια των δραστικών ουσιών από τους ιστούς, παράλληλα όμως να είναι αρκετά εκλεκτικό για να αποφεύγεται η εκχύλιση ανεπιθύμητων ουσιών από το υπό μελέτη υπόστρωμα (το προς ανάλυση προϊόν), ώστε το εκχύλισμα να είναι όσο το δυνατόν πιο καθαρό. Έτσι, η επιλογή της διεργασίας εκχύλισης των ξενοβιοτικών παρασιτοκτόνων ουσιών στα διάφορα υποστρώματα απαιτεί την προσεκτική μελέτη των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των αναλυτών, σε συνδυασμό με τη σύσταση του υποστρώματος. Οι περισσότερες φυτικές ουσίες είναι πολικές, με εξαίρεση τους κηρούς και τα έλαια. Ο κατάλληλος διαλύτης που θα χρησιμοποιηθεί, είναι εκείνος που θα έχει συγγενείς ιδιότητες και κυρίως παρόμοια πολικότητα με την υπό μελέτη Φ.Ο.. Ισχύει η γενίκευση «όμοια ομοίως διαλύονται» (*Like dissolves likes*).

Ιδιαίτερη σημασία έχει η επιλογή του κατάλληλου εκχυλιστικού μέσου στις πολύ- υπολειμματικές μεθόδους. Από τις Φ.Ο. στόχους, που μπορεί να έχουν χρησιμοποιηθεί στην παραγωγική διαδικασία ή μετασυλλεκτικά ή να περιέχονται στο δείγμα ως συνέπεια προγενέστερων χρήσεων ή/ και ρύπανσης του περιβάλλοντος, άλλα είναι πολικά, άλλα μη πολικά και άλλα μέσης πολικότητας μόρια. Επομένως, το εκχυλιστικό μέσο πρέπει να έχει την κατάλληλη σύνθεση ώστε να μπορεί να εκχυλίσει ουσίες με διαφορετική πολικότητα.

Γενικά, για την εκχύλιση υδρόφιλων Φ.Ο. χρησιμοποιούνται υδρόφιλοι διαλύτες και, αντίστοιχα, λιπόφιλοι διαλύτες για τις λιπόφιλες Φ.Ο. Οι πλέον

χρησιμοποιούμενοι διαλύτες είναι η ακετόνη, ο οξικός αιθυλεστέρας, το διχλωρομεθάνιο, η μεθανόλη, το ακετονιτρίλιο και το εξάνιο. Το ακετονιτρίλιο δίνει καθαρότερα εκχυλίσματα (περισσότερο πολικό), είναι όμως περισσότερο τοξικό και για το λόγο αυτό αντικαθίσταται από την ακετόνη. Η ακετόνη εξατμίζεται ευκολότερα (περισσότερο πτητική), είναι λιγότερο τοξική και σχετικά φθηνή αλλά έχει μεγάλη συνεκχυλιστική ικανότητα. Ο οξικός αιθυλεστέρας είναι κατάλληλος για εκχύλιση πολικών και μη πολικών Φ.Ο. και γενικά δίνει καθαρότερα εκχυλίσματα από την ακετόνη. Συχνά χρησιμοποιούνται ως εκχυλιστικά μέσα μίγματα διαλυτών όπως οξικός αιθυλεστέρας με εξάνιο, ισοπροπανόλη με τολουόλιο, διχλωρομεθάνιο με ακετόνη, κ.α.

Συμπερασματικά, τα κριτήρια που λαμβάνονται υπόψη για την επιλογή του διαλύτη εκχύλισης είναι:

- Έλλειψη αντίδρασης μεταξύ του διαλύτη και των προς εκχύλισης δειγμάτων
- Η πολικότητα των προς προσδιορισμό δραστικών ουσιών
- Η διαλυτότητα των δραστικών ουσιών στους διάφορους διαλύτες
- Ο τύπος του προς ανάλυση δείγματος
- Η τοξικότητα του διαλύτη
- Η πτητικότητα του διαλύτη
- Η καθαρότητα του διαλύτη
- Ο τύπος της μεθόδου (ειδική ή πολύ-υπολειμματική)

3.2.2. Τεχνικές εκχύλισης

3.2.2.1 Εκχύλιση υγρού/ υγρού (*Liquid/ Liquid Extraction -LLE*)

Η εκχύλιση αυτού του τύπου είναι μια από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους παραλαβής των υπολειμμάτων από τα διάφορα περιβαλλοντικά και διατροφικά υποστρώματα. Αποτελεί την επίσημη μέθοδο εκχύλισης σε πολλά πρωτόκολλα αναλυτικών εργαστηρίων. Στηρίζεται στην κατανομή των χημικών ουσιών με βάση τη διαφορετική διαλυτότητά τους σε ένα σύστημα δύο πρακτικά μη αναμιγνυόμενων υγρών. Διακρίνεται σε συνεχή εκχύλιση, όπου το δείγμα εκχυλίζεται με τη συσκευή *Soxhlet*, και σε ασυνεχή εκχύλιση, όπου το δείγμα εκχυλίζεται με επαναληπτικές δόσεις διαλύτη με μηχανική ανάδευση ή συσκευή υπερήχων. Η υψηλή

εκλεκτικότητά της και η ευρεία χρήση της στην απομόνωση διαφορετικών Φ.Ο. με μεγάλο εύρος φυσικοχημικών ιδιοτήτων, την κάνουν να βρίσκει ευρεία εφαρμογή παρά τα μειονεκτήματά της, τα οποία είναι το σχετικά υψηλό της κόστος λόγω της χρήσης μεγάλων όγκων δείγματος και διαλυτών και το ότι είναι χρονοβόρα. Το μειονέκτημα όμως του υψηλού κόστους και του επακόλουθου κινδύνου επιμολύνσεων οδήγησε σε βελτιωμένη έκδοση της τεχνικής, την μικροεκχύλιση υγρού/υγρού (*Liquid/Liquid Microextraction - LLME*), η οποία είναι και πιο φιλική στο περιβάλλον, αφού χρησιμοποιούνται μικρότερες ποσότητες οργανικών διαλυτών (μL ή mL) και δείγματος (1,5 - 10 mL) (Αμβράζη, 2007).

3.2.2.2 Εκχύλιση στερεού/υγρού (*Solid/Liquid Extraction - SLE*)

Η εκχύλιση αυτού του τύπου περιλαμβάνει την εκχύλιση του ομογενοποιημένου στερεού δείγματος με τον οργανικό διαλύτη και όπως η LLE διακρίνεται και αυτή σε συνεχή και ασυνεχή. Στην περίπτωση της συνεχούς εκχύλισης το δείγμα εκχυλίζεται με τη συσκευή *Soxhlet*, όπου το προς εκχύλιση δείγμα (5,0 - 50 g) τοποθετείται στον εκχυλιστήρα της συσκευής και εκχυλίζεται με οργανικό διαλύτη (100 - 200 mL) για 4 έως 18 ώρες. Στην ασυνεχή εκχύλιση το εξεταζόμενο δείγμα εκχυλίζεται διαδοχικά έως την ποσοτική λήψη των Φ.Ο. Παρά το ότι είναι μια χρονοβόρα διαδικασία εκχύλισης, βρίσκει ευρεία εφαρμογή διότι επιτυγχάνονται υψηλές ανακτήσεις (Pensado et al., 2005).

Η πιο εξελιγμένη τεχνική της εκχύλισης στερεού/υγρού είναι η εκχύλιση με μηχανική ανάμιξη σε υψηλές ταχύτητες (*Blending*) ή με τη χρήση υπερήχων (*Sonication*), που βρίσκει ευρεία εφαρμογή στην ανάλυση υπολειμμάτων στα στερεά τρόφιμα και τα εδαφικά δείγματα. Η εκχύλιση περιλαμβάνει ομογενοποίηση του δείγματος με οργανικό διαλύτη (συνήθως ακετόνη ή ακετονιτρίλιο) και μηχανική ανάδευση σε αναμκτήρα (*Mixer*) υψηλών ταχυτήτων ή χρήση υπερήχων. Για να πετύχουμε ικανοποιητική εκχύλιση χρησιμοποιούμε ομογενοποιητή μεγάλων ταχυτήτων (4000 - 5000 στροφές/ λεπτό), ενώ το δοχείο εκχύλισης (που είναι συνήθως μεταλλικό) βρίσκεται μέσα σε υδατόλουτρο ψύξης για την αποφυγή υψηλών θερμοκρασιών. Η εκχύλιση των φυτικών ιστών πραγματοποιείται είτε σε κλειστά δοχεία τύπου «*Omni mixer*» είτε σε ανοικτά, τύπου «*Ultra turax*». Σε αυτή την τεχνική χρησιμοποιούνται 50-100 g ομογενοποιημένου δείγματος και 100-200 mL

διαλύτη (ακετονιτρίλιο ή ακετόνη ή άλλο μίγμα διαλυτών). Σήμερα, η τεχνική εφαρμόζεται με μικρότερες ποσότητες δείγματος και οργανικών διαλυτών επιβαρύνοντας έτσι λιγότερο και το περιβάλλον. Επειδή η ακετόνη, όπως και το ακετονιτρίλιο είναι διαλύτες οι οποίοι αναμιγνύονται με το νερό, στην πράξη ο πραγματικός διαλύτης εκχύλισης είναι το μίγμα ακετόνης-νερού ή ακετονιτριλίου-νερού. Στη συνέχεια, οι προς ανάλυση ενώσεις κατανέμονται σε άπολο διαλύτη με εκχύλιση υγρού/ υγρού.

Οι υψηλές ταχύτητες που χρησιμοποιούνται στη διαδικασία της ομογενοποίησης συμβάλλουν στην απελευθέρωση των αναλυτών που βρίσκονται παγιδευμένοι στα σωματίδια του στερεού υποστρώματος, με αποτέλεσμα η μέθοδος αυτή να παρουσιάζει υψηλές ανακτήσεις. Έτσι, βρίσκει ευρεία εφαρμογή στην ανάλυση υπολειμμάτων Φ.Ο. σε φρούτα, λαχανικά, δημητριακά, αλλά και σε ζωικά δείγματα.

3.2.2.3 Εκχύλιση με μικροκύματα (*Microwave Assisted Extraction - MAE*)

Σε αυτή τη μέθοδο εκχύλισης το προς ανάλυση δείγμα αναμιγνύεται με τον οργανικό διαλύτη και ακτινοβολείται σε συμβατικό φούρνο μικροκυμάτων, χωρίς όμως το αιώρημα να φτάσει στο σημείο βρασμού του. Η ακτινοβολία συνήθως γίνεται για 30sec και επαναλαμβάνεται μερικές φορές για να επιτευχθούν οι μέγιστες ανακτήσεις της εκχυλιζόμενης ουσίας. Το πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ο μικρός χρόνος εκχύλισης με αποδόσεις ανάλογες των κλασικών μεθόδων εκχύλισης με οργανικούς διαλύτες (CameI, 2000). Η τεχνική αυτή έχει χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων από οργανοφωσφορικά φυτοπροστατευτικά σε ελαιόλαδο (Fuentes et al. 2008). Επίσης εξέλιξη της τεχνικής αυτής είναι η εκχύλιση με μικροκύματα σε ατμοσφαιρική πίεση (*Microwave Assisted Extraction at atmospheric pressure- APMAE* (Fuentes et al., 2009).

3.2.2.4 Επιταχυνόμενη εκχύλιση με διαλύτη (*Accelerated Solvent Extraction - ASE*)

Η επιταχυνόμενη εκχύλιση με διαλύτη ή εκχύλιση με διαλύτη υπό πίεση (*Pressurized Solvent Extraction - PSE*) εφαρμόζεται από το 1995. Το κύριο χαρακτηριστικό αυτής της μεθόδου είναι οι συνθήκες υψηλής πίεσης και θερμοκρασίας που επικρατούν κατά την εκχύλιση. Οι υψηλές πιέσεις εξασφαλίζουν την αποτελεσματική διείσδυση του διαλύτη στους πόρους του δείγματος, ενώ οι

υψηλές θερμοκρασίες αυξάνουν το ρυθμό διάχυσης, τη μεταφορά μάζας και τη διαλυτότητα των υπό εξέταση ενώσεων και μειώνουν το ιξώδες και την επιφανειακή τάση των διαλυτών, μειώνοντας έτσι κατά πολύ τους όγκους εκχύλισης των διαλυτών (Ahmed, 2001).

Χρησιμοποιούνται διαλύτες μεγάλου εύρους πολικότητας, καθώς και μίγματα αυτών, και παρέχεται η δυνατότητα χρήσης μεγάλου εύρους πιέσεων (5,0 - 200 Atm) και θερμοκρασιών (από θερμοκρασίες δωματίου έως 200°C). Η ASE έχει χρησιμοποιηθεί για ταυτόχρονη εκχύλιση και καθαρισμό (*Clean-up*) του δείγματος, χρησιμοποιώντας ως υλικό καθαρισμού το γραφίτη (*Graphitized carbon*), στον προσδιορισμό Φ.Ο. σε φυλλώδη λαχανικά με τη χρήση αέριας χρωματογραφίας και φασματομετρίας μάζας (Tanaka et al., 2007).

3.2.2.5 Εκχύλιση υπερκρίσιμου σημείου (*Supercritical Fluid Extraction - SFE*)

Μια διαχρονική τεχνική η οποία συγκεντρώνει όλο και περισσότερο το ενδιαφέρον των αναλυτών υπολειμμάτων, λόγω της υψηλής εκλεκτικότητας που παρουσιάζει και της χρήσης πολύ μικρών όγκων διαλυτών. Στην εκχύλιση αυτού του τύπου χρησιμοποιούνται ρευστά σε υπερκρίσιμη κατάσταση, συνήθως διοξείδιο του άνθρακα (CO₂) λόγω της χαμηλής θερμοκρασίας (31°C) και πίεσης (72,8 Atm) κρίσιμου σημείου, τα οποία παρουσιάζουν παρόμοια πυκνότητα με τους υγρούς διαλύτες, αλλά έχουν χαμηλότερο ιξώδες και υψηλότερους συντελεστές διάχυσης. Ο συνδυασμός των προαναφερθέντων ιδιοτήτων οδηγούν στην αποτελεσματικότερη και ταχύτερη εκχύλιση των αναλυτών σε σχέση με την εκχύλιση που γίνεται με τους υγρούς διαλύτες. Σε σύγκριση με την εκχύλιση σε στερεά προσροφητικά υλικά έχει το πλεονέκτημα του ενός βήματος στην πειραματική πορεία εκχύλισης. Τα εκχυλίσματα τα οποία λαμβάνονται είναι σχετικά καθαρά και το πλεονέκτημα του μικρού εκχυλιστικού όγκου μπορεί να θεωρηθεί και μειονέκτημα στην περίπτωση που απαιτείται να αναλυθούν μεγαλύτερες ποσότητες δείγματος (Camel, 1998)

3.2.2.6 Εκχύλιση δια της στερεάς φάσης (*Solid Phase Extraction - SPE*)

Η εκχύλιση δια της στερεάς φάσης βασίζεται στη θεωρία της χρωματογραφίας και χρησιμοποιείται για την άμεση εκχύλιση των οργανικών ενώσεων από υγρά δείγματα, αλλά και ως βασική τεχνική καθαρισμού (*Clean-up*) των εκχυλισμάτων

οργανικού διαλύτη πριν από τον ποσοτικό προσδιορισμό των αναλυτών.

Το χρωματογραφικό σύστημα αποτελείται από μια στατική φάση (προσροφητικό), η οποία είναι ένα στερεό υλικό επιφανειακά ενεργό, και μια κινητή φάση (διαλύτης έκλουσης), που αποτελείται από οργανικό διαλύτη ή μίγμα αυτών. Ο διαχωρισμός των ενώσεων στηρίζεται στη διαφορετική ικανότητα κατακράτησης των ουσιών πάνω στην επιφάνεια του προσροφητικού. Τα υλικά που χρησιμοποιούνται στη SPE είναι είτε μικροστίλεις, οι οποίες περιέχουν κατάλληλο χρωματογραφικό υλικό (*C-18, Diol, Silica, Florisil*), είτε δίσκοι εκχύλισης στους οποίους το χρωματογραφικό υλικό είναι με μορφή μεμβράνης ενσωματωμένης πάνω σε ένα δίκτυο μικροϊνιδίων πολυτετραφθοροαιθυλενίου (*PTFE*).

Η κατακράτηση των ενώσεων επιτυγχάνεται με ισχυρές, ωστόσο αντιστρεπτές αλληλεπιδράσεις, εφόσον μετά την εκχύλιση οι ενώσεις μεταφέρονται σε κάποιο οργανικό διαλύτη για τον οποίο ο συντελεστής έκλουσης της προς εκχύλιση ένωσης είναι μεγαλύτερος. Τέτοιες αλληλεπιδράσεις είναι οι *υδρόφοβες* (μη πολικές αλληλεπιδράσεις, δυνάμεις διασποράς), οι οποίες λαμβάνουν χώρα στα συστήματα SPE αντίστροφης φάσης, οι *υδρόφιλες* (πολικές αλληλεπιδράσεις, δεσμοί υδρογόνου, αλληλεπιδράσεις διπόλου-διπόλου), που συνήθως παρατηρούνται στα συστήματα SPE κανονικής φάσης, και τέλος οι αλληλεπιδράσεις *ηλεκτροστατικής φύσεως* μεταξύ φορτισμένων ομάδων της ένωσης και της επιφάνειας του προσροφητικού υλικού, οι οποίες εντοπίζονται στα συστήματα SPE ιοντανταλλαγής.

Η εκχύλιση είναι το αποτέλεσμα ανταγωνιστικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των δυνάμεων που συγκρατούν τις οργανικές ενώσεις στο υγρό δείγμα ή οργανικό εκχύλισμα και των δυνάμεων διάχυσης που προάγουν τη μεταφορά των ενώσεων από το δείγμα στα προσδεδεμένα οργανικά μόρια που εντοπίζονται στην προσροφητική επιφάνεια.

Για τη σωστή επιλογή του προσροφητικού υλικού θα πρέπει να γίνεται μελέτη της φυσικοχημείας του συστήματος και να λαμβάνονται υπόψη διάφοροι παράμετροι, όπως οι χαρακτηριστικές ομάδες των αναλυτών, η φύση του προσροφητικού υλικού, οι ενέργειες των σχηματιζόμενων δεσμών, οι δευτερεύουσες επιδράσεις και η αλληλεπίδραση του προσροφητικού και των προς ανάλυση ενώσεων με τα υπόλοιπα συστατικά του υποστρώματος (Masque et al., 1998).

Τα στάδια της εκχύλισης δια της στερεάς φάσης είναι τα ακόλουθα:

Προετοιμασία του προσροφητικού υλικού (Conditioning). Μικρή ποσότητα οργανικού διαλύτη διέρχεται μέσω της μικροστήλης ή του δίσκου εκχύλισης. Ένα μέρος αυτής της ποσότητας προσροφάται στην επιφάνεια του προσροφητικού υλικού και την καθιστά πιο συμβατή με το διάλυμα του δείγματος, έτσι ώστε να επιτυγχάνεται καλύτερη επιφανειακή επαφή. Με αυτή τη διαδικασία απομακρύνονται και ξένες προς την ανάλυση οργανικές ουσίες οι οποίες βρίσκονται προσροφημένες στο στρώμα του προσροφητικού

- **Εκχύλιση.** Το προς ανάλυση δείγμα διέρχεται από τη μικροστήλη ή το δίσκο εκχύλισης, με εφαρμογή πίεσης ή κενού. Στο στάδιο αυτό θα πρέπει ο ρυθμός της ροής να διατηρείται κατά το δυνατό σταθερός.

-**Έκπλυση.** Σκοπός αυτής της διαδικασίας είναι η απομάκρυνση των παρεμποδιστικών ουσιών, που πιθανόν να υπάρχουν, χωρίς όμως να γίνει έκλυση των αναλυτών.

-**Έκλυση.** Κατάλληλος όγκος οργανικού διαλύτη ή μίγμα διαλυτών διέρχεται από τη μικροστήλη ή το δίσκο εκχύλισης με σκοπό την ποσοτική εκρόφηση των αναλυτών και τη μεταφορά τους στην υγρή φάση. Η επιλογή του διαλύτη έκλυσης καθορίζεται από τη φύση του ίδιου του διαλύτη και της προς εκρόφηση ένωσης. Ο συντελεστής κατανομής θα πρέπει να ευνοεί τη μεταφορά του αναλύτη στο διαλύτη έκλυσης. Οι κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν την απόδοση της εκχύλισης δια της στερεάς φάσης είναι η φύση του δείγματος, ο όγκος και το pH του δείγματος. Όταν αναφερόμαστε στη φύση του δείγματος εννοούμε τα ποσοστά του διαλυμένου οργανικού άνθρακα στο δείγμα, στον οποίο οφείλονται μερικές από τις μειωμένες ανακτήσεις, και την παρουσία αιωρούμενων στερεών, όπως οι χουμικές και φουλβικές ενώσεις στο νερό. Όσον αφορά τον όγκο του δείγματος, όταν πρόκειται για περιβαλλοντικά δείγματα, η εκχύλιση μεγάλου όγκου είναι απαραίτητη προκειμένου να είναι εφικτή η ανίχνευση ενώσεων που βρίσκονται σε ίχνη (Pichon, 2000).

3.2.2.7 Μικροεκχύλιση δια της στερεάς φάσης (Solid Phase Microextraction - SPME)

Τα βασικά βήματα της συγκεκριμένης τεχνικής είναι τα ακόλουθα:

- Προσρόφηση των Φ.Ο. στο υλικό ενός πολυμερικού υμενίου με τη μορφή ίνας, το οποίο είτε εμβαπτίζεται μέσα στο διάλυμα (*Direct SPME*), είτε κρατείται στον

υπερκεείμενο του διαλύματος χώρο, οπότε αναφερόμαστε σε μικροεκχύλιση δια της στερεάς φάσης στον υπερκεείμενο χώρο (*Headspace Solid Phase Microextraction - HS-SPME*).

- Εκρόφηση των ενώσεων. Για ενώσεις που είναι θερμικά σταθερές η εκρόφηση γίνεται θερμικά με την εισαγωγή της ίνας απευθείας στον αέριο χρωματογράφο, ενώ για τις άλλες ακολουθεί έκλυση σε ειδικό σύστημα.

Το υλικό (πάχος, πολικότητα) της ίνας, ο χρόνος εκχύλισης, η φύση του προς εκχύλιση δείγματος (pH, περιεχόμενες παρεμποδίζουσες πτητικές ενώσεις, ιοντική ισχύς του δείγματος), ο ρυθμός ανάδευσης και η θερμοκρασία του δείγματος, είναι οι παράγοντες που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της εν λόγω τεχνικής (Dean, 1998).

3.2.2.8 Μικροεκχύλιση δια της υγρής φάσης (*Liquid Phase Microextraction - LPME*)

Η LPME, που είναι επίσης γνωστή ως *Single Drop Microextraction - SDME*, αποτελεί μια εναλλακτική τεχνική, η οποία ενσωματώνει τη δειγματοληψία, την εκχύλιση και την προσυγκέντρωση σε ένα στάδιο. Η χρησιμοποίηση πολύ μικρότερων ποσοτήτων οργανικών διαλυτών είναι το βασικό πλεονέκτημά της έναντι των απλών μεθόδων εκχύλισης, καθώς και το χαμηλό της κόστος, δεδομένου ότι απαιτεί την ύπαρξη ενός κοινού εργαστηριακού εξοπλισμού. Είναι μια μέθοδος απλή και γρήγορη με δυνατότητα για αυτοματοποίηση. Τα τελευταία χρόνια, η SDME έχει αναπτυχθεί και χρησιμοποιείται ιδιαίτερα για την εκχύλιση των οργανοχλωριωμένων (OCPS) αλλά και άλλων Φ.Ο (Λύκας 2009, Amvrazi and Tsiropoulos, 2009 , Amvrazi et al., 2010).

3.2.2.9 Εκχύλιση διασποράς προσροφητικού υλικού στο υπόστρωμα (*Matrix Solid Phase Dispersion - MSPD*)

Σε αυτή την τεχνική εκχύλισης χρησιμοποιείται μικρή ποσότητα δείγματος (0,1 - 5,0 g) που αναμιγνύεται με στερεό υπόστρωμα, το οποίο χρησιμεύει ως υλικό διασποράς, συμβάλλει στη δημιουργία ομοιογενούς δείγματος, με το οποίο κατασκευάζεται χρωματογραφική στήλη και η έκλυση των Φ.Π γίνεται με την κατάλληλη ποσότητα οργανικού διαλύτη. Το βασικό πλεονέκτημα αυτής της τεχνικής είναι ότι η εκχύλιση και ο καθαρισμός του εκχυλίσματος πραγματοποιούνται

ταυτόχρονα μειώνοντας έτσι το χρόνο και το κόστος της ανάλυσης σε σχέση με τις παραδοσιακές μεθόδους εκχύλισης. Η άμμος χρησιμοποιείται συχνά στην ανάλυση αυτού του τύπου, διότι δρα ως μέσο διάρρηξης της κυτταρικής δομής και τεμαχισμού του δείγματος. Η ομογενοποίηση του ιστού με το στερεό υπόστρωμα μέσα σε γουδί οδηγεί σε πλήρη διάρρηξη του κυττάρου, σε διαλυτοποίηση των συστατικών του δείγματος και στη διασπορά τους σε αυτό με βάση τις πολικότητες τους. Η πλήρης λύση των κυττάρων που επιτυγχάνεται με τη μέθοδο αυτή ερμηνεύει τα υψηλά επίπεδα ανακτήσεων. Το υλικό διασποράς μπορεί να είναι οποιοδήποτε προσροφητικό υλικό για χρωματογραφία. Το μέγεθος των σωματιδίων του υλικού διασποράς είναι σημαντικό, καθώς η χρήση υλικών με διάμετρο κόκκων 3,0 - 20 μm, δημιουργεί προβλήματα στη ροή του διαλύτη από τη στήλη. Συνήθως χρησιμοποιούνται υλικά με διάμετρο κόκκων 40 μm, ενώ έχουν χρησιμοποιηθεί και υλικά με μικτό μέγεθος κόκκων 40 - 100 μm με καλά αποτελέσματα και μικρότερο κόστος (Barker, 2000).

3.3 Καθαρισμός (clean up)

Ο όρος καθαρισμός στον προσδιορισμό των υπολειμμάτων εκφράζει τις χημικές διεργασίες στις οποίες υποβάλλεται το εκχύλισμα προκειμένου να απομονωθούν τα γεωργικά φάρμακα και τα υπόλοιπα συνεκχυζόμενα συστατικά του υποστρώματος τα οποία παρεμποδίζουν τη μέτρηση και μικραίνουν τη ζωή των στηλών και των ευαίσθητων ανιχνευτών της χρωματογραφίας.

Το εκχύλισμα που λαμβάνεται από το στάδιο της εκχύλισης είναι μίγμα του διαλύτη ή των διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν για την εκχύλιση, και ενδεχομένως του νερού του φυτικού ιστού και πολλών από τις φυτικές ουσίες που έχουν συνεκχυλισθεί (χρωστικές, κηροί, αιθέρια έλαια, σάκχαρα, οξέα και άλλων). Για να επιτευχθεί ο προσδιορισμός των υπολειμμάτων των Φ.Ο., θα πρέπει να απομακρυνθεί το νερό και όσον το δυνατό μεγαλύτερο αριθμό ανεπιθύμητων ουσιών με την προσθήκη στην αναλυτική διαδικασία του σταδίου του καθαρισμού (Bernal 1997).

3.3.1 Κατανομή μεταξύ δύο υγρών (liquid-liquid partitioning).

Ως τέτοια υγρά χρησιμοποιούνται μη αναμίξιμοι διαλύτες, κυρίως το εξάνιο και το διχλωρομεθάνιο. Στο εξάνιο (διαλύτης άπολος) διαλύονται μόνον οι μη πολικές

ενώσεις, (τόσο οι επιθυμητές όσο και οι ανεπιθύμητες ουσίες). Στο διχλωρομεθάνιο (διαλύτης μέσης πολικότητας) διαλύονται ουσίες μεγαλύτερου εύρους πολικότητας. Έχουμε έτσι περισσότερες ανεπιθύμητες ουσίες, αλλά και μεγαλύτερο αριθμό Φ.Ο. που μπορεί να περάσουν στο καθαρισμένο εκχύλισμα. Η κατανομή μεταξύ δύο υγρών απομακρύνει επίσης το μεγαλύτερο μέρος του νερού που υπήρχε στο εκχύλισμα. Ίχνη νερού που τυχόν παραμείνουν στο καθαρό εκχύλισμα απομακρύνονται με την χρήση άνυδρου θεικού νατρίου.

3.3.2 Χρωματογραφία διαπερατότητας πηκτής ή χρωματογραφία αποκλεισμού (*Gel Permeation Chromatography-GPC ή size exclusion chromatography*).

Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για πολλά υποστρώματα, είναι όμως χρήσιμη τεχνική για το διαχωρισμό των Φ.Ο. από λιπώδη και ελαιώδη υποστρώματα. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιεί μια στήλη πληρωμένη με κατάλληλου μεγέθους πόρων ρητίνης, συνήθως πηκτή πολυστυρενίου. Το μέγεθος των πόρων της ρητίνης καθορίζει την ταχύτητα απομάκρυνσης των ουσιών. Η πηκτή εκπλένεται με οργανικούς διαλύτες. Ο διαχωρισμός γίνεται με βάση τη μοριακή μάζα κάθε ουσίας. Μεγαλομοριακές ενώσεις (όπως τα λίπη και η χλωροφύλλη), εκλούνται πρώτες και απομακρύνονται, ενώ τα φυτοφάρμακα, που συνήθως είναι μικρομοριακές ενώσεις, εκλούνται αργότερα.

Η μέθοδος αυτή έχει αρκετά καλή επαναληψιμότητα, η στήλη διατηρεί την καλή της απόδοση για αρκετά μακρύ χρονικό διάστημα και μπορεί να αυτοματοποιηθεί. Έχει ορισμένες δυσκολίες με το διαχωρισμό των μεγαλομοριακών φυτοφαρμάκων, όπως τα πυρεθρινοειδή, από χρωστικές και λίπη .

3.3.3 Εκχύλιση στερεής φάσης (*Solid Phase Extraction, SPE*).

Βασίζεται στην κατανομή των ουσιών μεταξύ μιας στερεής στατικής και υγρής κινητής φάσης. Τέτοιες μικροστήλες κυκλοφορούν έτοιμες προς χρήση στο εμπόριο. Οι στήλες octa-silane (C₈) και octadecyl-silane (C₁₈) αποδείχτηκαν ιδιαίτερα αποτελεσματικές για τον καθαρισμό δειγμάτων νερού. Για τα φυτικά δείγματα παρόλο που δεν είχαν εφαρμοστεί σε μεγάλη έκταση, φαίνεται ότι έχουν να προσφέρουν πολλά και συνεχώς αυξάνεται ο αριθμός των ερευνητικών εργασιών που

αναφέρονται στη χρήση τους. Ιδιαίτερα πλεονεκτήματα είναι η εξοικονόμηση διαλυτών και η δυνατότητα αυτοματοποίησης.

Η διαδικασία πρέπει να πραγματοποιείται σε σταθερές συνθήκες με σκοπό τα αποτελέσματα να είναι αναπαραγώγιμα. Η ελαχιστοποίηση των χρησιμοποιούμενων ποσοτήτων των αντιδραστηρίων εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως από το δείγμα, την ευαισθησία του συστήματος ανίχνευσης, και τους προσδιοριζόμενους αναλύτες.

Μια τάση στην ανάλυση των υπολειμμάτων είναι η αύξηση της χρήσης μικρού μεγέθους στηλών για τον καθαρισμό του δείγματος. Σε αυτές τις μεθόδους, μια μικρή ποσότητα του εκχυλίσματος υφίσταται καθαρισμό και χρησιμοποιείται για ανάλυση αντί να λαμβάνεται ολόκληρη η ποσότητα του εκχυλίσματος, η οποία είναι η πιο συνήθης τακτική στις κοινές μεθόδους. Η σμίκρυνση του σταδίου καθαρισμού δεν μειώνει μόνο την ποσότητα των διαλυτών αλλά και τον χρόνο ανάλυσης.

3.4 Συμπύκνωση του εκχυλίσματος

Προκειμένου να αυξηθεί η ευαισθησία της ανάλυσης, το καθαρό εκχύλισμα συμπυκνώνεται σε μικρό όγκο. Η συμπύκνωση γίνεται είτε σε περιστροφικό εξατμιστήρα υπό κενό (rotary evaporator), είτε χωρίς κενό σε συσκευές τύπου Kuderna-Danish. Μικροί όγκοι πτητικών διαλυτών μπορούν να εξατμισθούν με ρεύμα καθαρού αζώτου. Ο τελικός όγκος πρέπει να μετράται με μεγάλη ακρίβεια, γιατί επηρεάζει άμεσα το τελικό αποτέλεσμα.

3.5 Ανίχνευση και ποσοτικός προσδιορισμός υπολειμμάτων

Η ανίχνευση και ο ποσοτικός προσδιορισμός των υπολειμμάτων επιτυγχάνεται με τεχνικές αέριας χρωματογραφίας και υγρής χρωματογραφίας.

Αέρια χρωματογραφία

Η τεχνική αυτή (Gas chromatography - GC) αναπτύχθηκε από τους Martin και James το 1952. Ο πρώτος αέριος χρωματογράφος διατέθηκε στο εμπόριο το 1959, και από τότε γίνονται συνεχείς βελτιώσεις.

Με την τεχνική της αέριας χρωματογραφίας, μικρή ποσότητα (1,0 – 2,0 μL) από το τελικό εκχύλισμα εγχέεται στην κορυφή θερμαινόμενης ειδικής στήλης.

χρωματογραφίας τοποθετημένης σε κλίβανο ώστε το εκχύλισμα να μεταπέσει σε αέρια φάση. Ένα αδρανές αέριο κινείται μέσα στη στήλη και παρασύρει τους ατμούς του δείγματος. Ο χρόνος παραμονής κάθε ουσίας στη στήλη (χρόνος κατακράτησης – retention time) είναι συνάρτηση των ιδιοτήτων της και είναι ένα από τα κριτήρια για τον ποιοτικό προσδιορισμό. Το μέγεθος του σήματος που καταγράφεται από τους ανιχνευτές στην έξοδο της στήλης, είναι το κριτήριο για τον ποσοτικό προσδιορισμό. Το σήμα καταγράφεται υπό μορφή κορυφής. Το ύψος ή η επιφάνεια της κορυφής χρησιμοποιούνται για τον ποσοτικό προσδιορισμό.

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται κυρίως για Φ.Ο. που έχουν ικανοποιητική πτητικότητα και θερμική σταθερότητα. Τα βασικά μέρη ενός συστήματος αέριας χρωματογραφίας είναι οι φιάλες παροχής αερίων (οβίδες), ο εγχυτής, ο φούρνος, η χρωματογραφική στήλη, ο ανιχνευτής και το καταγραφικό.

Ο εγχυτής είναι το εξάρτημα μέσα στο οποίο γίνεται η έγχυση του δείγματος. Στα σύγχρονα όργανα οι εγχυτές μπορεί να είναι δύο τύπων, Split-splitness ή on-column. Οι στήλες που χρησιμοποιούνται σήμερα είναι τριχοειδείς (capillary columns), διαμέτρου 0.22 - 0.50 mm και μήκους 15 - 60 m. Η επιλογή του υλικού πλήρωσεως γίνεται λαμβάνοντας υπόψη τη φύση των προς διαχωρισμό αναλυτών καθώς, η πολικότητα των στηλών είναι καθοριστική για την ανάλυση. Η χρησιμοποίηση στηλών διαφορετικής πολικότητας, συνίσταται σαν η πιο απλή και αξιόπιστη μέθοδος ταυτοποίησης και επιβεβαίωσης (Confirmation) των χρωματογραφικών ευρημάτων. Έτσι, για τον προσδιορισμό των οργανοχλωριωμένων και πυρεθροειδών φυτοπροστατευτικών προϊόντων, συνήθως, χρησιμοποιούνται μη πολικές στατικές φάσεις, όπως στήλες DB-1 (ή HP-1 ή BPX-1) και DB-5 (ή HP-5 ή BPX-5). Για τον προσδιορισμό πιο πολικών οργανοφωσφορικών χρησιμοποιούνται σχετικά πιο πολικές στατικές φάσεις, όπως στήλες HP-1701 ή DB-170 ή BPX-35 (Αμβράζη, 2007).

Ο *ανιχνευτής* είναι το εξάρτημα που ανιχνεύει τις ουσίες στην έξοδο της στήλης. Οι ανιχνευτές είναι είτε εξειδικευμένοι για ορισμένα άτομα των μορίων ή μη εξειδικευμένοι. Οι πλέον χρησιμοποιούμενοι ανιχνευτές στην αέρια χρωματογραφία για αναλύσεις υπολειμμάτων, είναι:

- ο Ανιχνευτής αζώτου-φωσφόρου (*Nitrogen Phosphorus Detector - NPD*) που είναι

εξειδικευμένος για ουσίες που περιέχουν άζωτο ή φώσφορο στο μόριό τους, π.χ. οργανοφωσφορικά, τριαζίνες .

- Ανιχνευτής σύλληψης ηλεκτρονίων (*Electron Capture Detector - ECD*) για οργανοαλογονούχες ενώσεις, που περιέχουν φθόριο ή χλώριο στο μόριό τους, π.χ. οργανοχλωριωμένα .
- Ανιχνευτής φωτομετρίας φλόγας (*Flame Photometric Detector - FPD*) που με το κατάλληλο φίλτρο προσδιορίζει ουσίες που στο μόριό τους περιέχεται θείο ή φώσφορος, π.χ. οργανοφωσφορικά .
- Ανιχνευτής φασματομετρίας μαζών.

Το *καταγραφικό* καταγράφει υπό μορφή κορυφής το σήμα. Στα σύγχρονα όργανα όλες οι παράμετροι ρυθμίζονται με σύστημα ηλεκτρονικού υπολογιστή όπου καταγράφονται και οι κορυφές. Με κατάλληλο λογισμικό (*Software*) γίνεται η επεξεργασία των χρωματογραφικών σημάτων και προκύπτουν τα τελικά αποτελέσματα για την κάθε κορυφή-ουσία του χρωματογραφήματος.

3.6 Ανάπτυξη της Μεθόδου QuEChERS.

Πολλές πολύ- υπολειμματικές μέθοδοι φυτοπροστατευτικών προϊόντων που χρησιμοποιούνται είναι πολύπλοκες, χρονοβόρες, απαιτούν μεγάλες ποσότητες διαλυτών και σε πολλές περιπτώσεις είναι και ακριβές μέθοδοι..

Παίρνοντας υπόψη τον χρόνο που καταναλώνεται στο εργαστήριο για την ανάλυση, που συνεχώς αυξάνεται, λόγω του ότι έχουμε συνεχώς την εισαγωγή καινούριων δραστικών ουσιών-αναλυτών και καινούριων τεχνικών ανάλυσης, τα εργαστήρια δεν είναι δυνατόν να αναλύσουν αυτόν τον μεγάλο αριθμό ουσιών. Έτσι πολλοί βασικοί αναλύτες δεν μπορούν να καλυφθούν από τις βασικές μεθόδους, με αποτέλεσμα κάθε εργαστήριο να μην μπορεί να αναλύσει την κάθε ουσία με κάποια μεθοδολογία.

Την τελευταία δεκαετία έχουν αναπτυχθεί αρκετές αναλυτικές μεθοδολογίες που είναι αρκετά γρήγορες. Παρ' όλα αυτά δεν μπόρεσαν να αντικαταστήσουν τις κλασσικές πολύ- υπολειμματικές μεθόδους.

Μια πολύ- υπολειμματική μέθοδος πρέπει να είναι γρήγορη, εύκολη, να μην χρειάζεται να χρησιμοποιεί μεγάλη ποσότητα χημικών, να προάγει έναν βασικό βαθμό επιλεκτικότητας για να αποφεύγει τις περίπλοκες διαδικασίες καθαρισμού και τέλος να καλύπτει ένα ικανοποιητικό φάσμα αναλυτών.

Κατά τη διάρκεια ανάπτυξης της μεθόδου, ο κύριος σκοπός είναι, όσο το δυνατότερο να αποφευχθούν τα πολύπλοκα και χρονοβόρα στάδια.

Στάδια της μεθόδου:

1. τεμαχισμός του δείγματος, ζύγιση και τοποθέτηση 10- 15g σε δοκιμαστικό σωλήνα 50 mL
2. προσθήκη 10 mL ακετονιτρίλιο στο δοκιμαστικό σωλήνα
3. ανακίνηση του σωλήνα με το χέρι για ένα λεπτό
4. μεταφορά του δείγματος και του εκχυλίσματός του σε άλλον δοκιμαστικό σωλήνα, ο οποίος περιέχει 4 g MgSO₄ και 1 g NaCl
5. ανακίνηση και με το χέρι για ένα λεπτό.
6. φυγοκέντρηση του σωλήνα (3000 rcf) για δύο λεπτά
7. μετά τη φυγοκέντρηση έχουν σχηματιστεί διάφορες φάσεις μέσα στο δοκιμαστικό σωλήνα. Μεταφέρουμε ένα μέρος από την οργανική φάση (1 mL) σε κάποιο προσροφητικό μέσο (για παράδειγμα d- SPE, DPX κ.α.), ανάλογα με το δείγμα που χρησιμοποιούμε (φρούτα, λαχανικά κτλ)
8. φυγοκέντρηση του καινούριου εκχυλίσματος
9. μεταφορά του τελικού εκχυλίσματος σε φιαλίδια χρωματογραφίας
10. ανάλυση σε χρωματογράφο

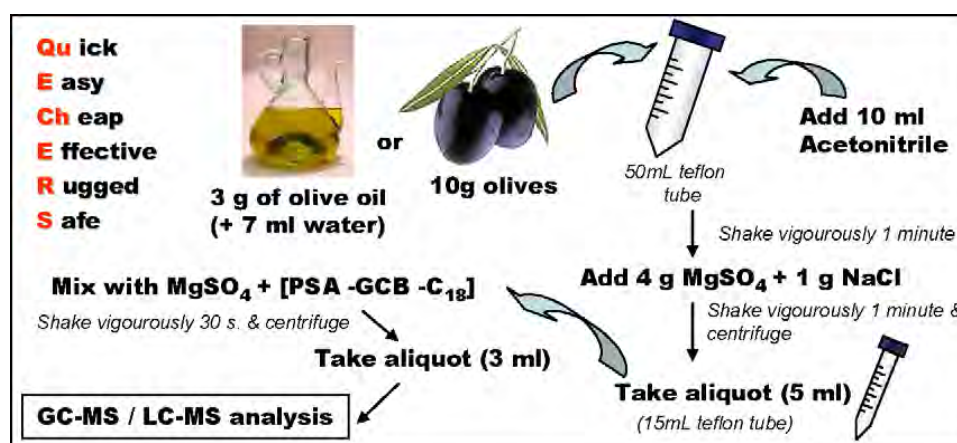
Κατά την εφαρμογή της διαδικασίας ανάλογα με το δείγμα που πρόκειται να εξεταστεί οι διάφορες ποσότητες των χημικών ουσιών αναλυτών αλλά και κάποια στάδια μπορεί να αλλάξουν (www.guechers.com).

Το ελαιόλαδο θεωρείται ένα δύσκολο υπόστρωμα για ανάλυση γιατί περιέχει λιπαρά συστατικά τα οποία επηρεάζουν τη χρωματογραφική ανάλυση. Η αποτελεσματικότητα αυτής της μεθόδου έγκειται στο γεγονός ότι έχει την ικανότητα να μεταφέρει και να διαχωρίζει σε φάσεις τα συστατικά του υποστρώματος.

Η μέθοδος αυτή έχει γνωρίσει μεγάλη εφαρμογή σε πλήθος υποστρωμάτων και έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες εξειδίκευσης της ανάλογα με την υφή και τα

ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του κάθε υποστρώματος. Παρακάτω αναφέρεται η πρόταση ερευνητικές εργασίας (Gilbert-Lopez 2009) για την εφαρμογή της μεθόδου QuEChERS στην ανάλυση υπολειμμάτων ελαιολάδου.

Μέθοδος QuEChERS για ελαιόλαδο: Ζυγίζονται 3g ελαιόλαδου σε γυάλινο σωλήνα με βιδωτό πώμα. Προσθέτουμε 7ml H₂O και 10 ml ACN και 4g MgSO₄ και 1g NaCl. Ανακινούμε τον γυάλινο σωλήνα για 1min. Παίρνουμε 1 mL εκχυλίσματος και το βάζουμε σε μικρούς σωλήνες φυγοκέντρησης που περιέχουν 1,5 g MgSO₄ και 0,5g άνθρακα και 0,5g PSA, C₁₈. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 2min. Στη συνέχεια παραλαμβάνονται 500μL εκχυλίσματος και τοποθετούνται σε φιαλίδια χρωματογραφίας. Ακλουθεί εξάτμιση σε ρεύμα αζώτου και επαναδιάλυση με 500 μL τουλουόλιο (Εικόνα 3.1).



Εικόνα 3.1: Μέθοδος QuEChERS για την ελιά και το ελαιόλαδο.

3.7 Μέθοδοι προσδιορισμού υπολειμμάτων στο ελαιόλαδο.

Δραστικές ουσίες	Μέθοδος Εκχύλισης	Καθαρισμός	Ανάλυση	LOD (mg/Kg)	Ανακτήσεις	Βιβλιογραφία
Οργανοφωσφορικά	LLP: 10g λάδι + Hx κορεσμένο με ACN ανακινούνται με 1 ml νερό και με ACN κορεσμένο με Hx.	Κατανομή σε Hx και ACN. Ξήρανση της φάσης του CAN, παραλαβή με ΑΚΤ.	GC-NPD			Lentza –Rizos 1994
Οργανοφωσφορικά	GPC με οξικό αιθυλεστέρα και κυκλοεξάνιο	-	GC-FID GC-NPD		93-160%	Vreuls et al., 1996
Οργανοφωσφορικά	LLE, 2g λάδι + 2ml Hx , ανακίνηση, +10ml ACN, ανακίνηση. 7,5ml εκχυλίσματος ACN ξηραίνονται, παραλαβή με 1,5ml Hx.	-	GC-NPD	-	74-118%	Cabras et al., 1997
Οργανοφωσφορικά	LLP: 10g λάδι + Hx κορεσμένο με ACN ανακινούνται με 1 ml νερό και με ACN κορεσμένο με Hx.	Κατανομή σε Hx και ACN. Ξήρανση της φάσης του CAN, παραλαβή με ΑΚΤ.	GC-FPD GC-NPD	0,0001-0,001	73-114% 73-121%	Hiskia et al. 1998
Οργανοφωσφορικά Τριαζίνες	LLE: 5g λάδι +25ml ACN ή +10ml ACN + 10ml ACT ή Hx Συγκέντρωση 10ml εκχυλίσματος στα 2ml ACT.	Καθίζηση λίπους σε -20°C	GC-NPD	1,5-6	77-104%	Lentza –Rizos et al. 2001(a)
Endosulfan, πυρεθροειδή	LLE: 5g λάδι σε ACN .	Καθίζηση λίπους σε -20°C. Normal SPE σε alumina N και διαλύτη έκλουσης ACN	GC-ECD	6-1200	71-91%	Lentza –Rizos et al., 2001(β)
οργανογλωριωμένα οργανοφωσφορικά πυρεθροειδή	SEC: 0,5g λάδι στα 5ml και διαχωρισμός με τεραϋδροφουράνιο	-	LC-MS GC-MS		40-95% 60-98%	Barrec et al., 2003
οργανοφωσφορικά	HS – SPME: με ένα PDMS	-	GC-FTD	5-10	80-106%	Tsousi et al., 2003

fenthion demethoate	- LLP: 15g λάδι + Hx κορεσμένο με ACN ανακινούνται με 1 ml νερό και με ACN κορεσμένο με Hx.	Κατανομή σε Hx και ACN. Ξήρανση της φάσης του ACN, παραλαβή με AKT. Reverse phase SPE σε C ₁₈ και διαλύτη έκλουσης χλωροφόρμιο-μεθανόλη(9:1)	GC-NPD	1,1-1,8	78% -84%	Tsatsakis et al., 2003
οργανοχλωριωμένα οργανοφωσφορικά τριαζίνες, ουρίες πυρεθροειδή	5g λάδι + 15ml PE κορεσμένος με ACN + 25+10 ml ACN κορεσμένο με PE. 7ml απο τη φάση του ACN εξατμίζονται μέχρι τελικού όγκου 2 ml	MSPD: εκχύλισμα (2ml) + 2g Bondesil-NH ₂ , μεταφορά σε Florisil SPE και έκλουση με ACN	GC- MS LC-MS	10-60 5	85-110%	Ferrer et al. 2005
Οργανοφωσφορικά	LLE: 2g λάδι + 2x1ml ACN	-	GC-FPD		78-97%	Dugo et al. 2005
οργανοχλωριωμένα οργανοφωσφορικά τριαζίνες, ουρίες	LLE: 2g λάδι + 10ml κορεσμένο με ακετονιτρίλιο εξάνιο. 5ml εκχυλίσματος για καθαρισμό.	GPC: με κινητή φάση οξικό αιθυλεστέρα/κυκλοεξάνιο (1:1).	GC-ECD GC-TSD GC-MS	1-10 2-10 0,5-10	91-124%, 82-100%, 89-105%	Guardia-Rubio et al. 2006
οργανοχλωριωμένα οργανοφωσφορικά, τριαζίνες, ουρίες πυρεθροειδή	LLE: 2g λάδι +ACT+Hx	GPC	GC-MS	0,05-1,5	84-110%	Ballesteros et al. 2006
Οργανοφωσφορικά	MAE με ακετονιτρίλιο και διχλωρομεθάνιο	SPE	GC-FPD GC-MS		62-99%	Fuentes et al. 2008
Οργανοφωσφορικά Τριαζινές , ουρίες	carbon nanotubes	SPE	GC-MS	1,5-3,0 μg/L		Lopez – Feria et al. 2009
Οργανοφωσφορικά	APMAE – MAE υπό πίεση	SPE ή σε -20°C	GC-FPD GC-MS	0,004- 0,015 (LOQ)	71-103%	Fuentes et al., 2009

LLE: Εκχύλιση υγρού/ υγρού (Liquid/ Liquid Extraction)

SPE: Εκχύλιση δια της στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction)

LLP: Κατανομή υγρού - υγρού (liquid-liquid partitioning)

HS-SPME: Μικροεκχύλιση δια της στερεάς φάσης στον υπερκείμενο χώρο (Headspace Solid Phase Microextraction)

MSPD: Εκχύλιση διασποράς προσροφητικού υλικού στο υπόστρωμα (Matrix Solid Phase Dispersion)

GPC ή SEC: Χρωματογραφία διαπερατότητας πηκτής ή χρωματογραφία αποκλεισμού (Gel Permeation Chromatography-GPC ή size exclusion chromatography).

MAE: Εκχύλιση με μικροκύματα (Microwave Assisted Extraction)

APMAE: Εκχύλιση με μικροκύματα σε ατμοσφαιρική πίεση (Microwave Assisted Extraction at atmospheric pressure)

ACT: ακετόνη

ACN: ακετονιτρίλιο

Hx: εξάνιο

PE : Πετρελαϊκός αιθέρας

GC- NPD: Αέρια χρωματογραφία- Ανιχνευτής αζώτου-φωσφόρου (Nitrogen Phosphorus Detector - NPD)

GC- ECD: Αέρια χρωματογραφία- Ανιχνευτής σύλληψης ηλεκτρονίων (Electron Capture Detector - ECD)

GC- FPD: Αέρια χρωματογραφία- Ανιχνευτής φωτομετρίας φλόγας (Flame Photometric Detector - FPD)

GC- MS: Συζευγμένο σύστημα αέριας χρωματογραφίας και φασματογραφίας μαζών

HPLC-MS ή LC-MS: Συζευγμένο σύστημα υγρής χρωματογραφίας και φασματογραφίας μαζών

3.8 Επικύρωση των μεθόδων προσδιορισμού υπολειμμάτων Φ.Π.

Η επικύρωση (*Validation*) είναι η επιβεβαίωση, μέσω εξέτασης και παροχής αντικειμενικών αποδείξεων, ότι ικανοποιούνται οι ιδιαίτερες απαιτήσεις, για μια συγκεκριμένη σκοπούμενη χρήση. Οι αναλυτικές απαιτήσεις της επικύρωσης εντοπίζονται από σαφή καθορισμό, των ενώσεων που προσδιορίζονται, του υποστρώματος και του εύρους των συγκεντρώσεων για τις οποίες εφαρμόζεται η μέθοδος. Επίσης ορίζεται η ορθότητα και η ακρίβεια των αποτελεσμάτων από τη νομοθεσία ή τη μέθοδο, καθώς επίσης και ο τρόπος έκφρασης των αποτελεσμάτων σε μονάδες και καθορίζονται τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης.

1. Ορθότητας (accuracy)

Η ορθότητα αναφέρεται στη διαφορά (σφάλμα) μεταξύ της μέσης τιμής μιας σειράς μετρήσεων και της αληθούς τιμής της μετρούμενης ποσότητας. Η αληθής τιμή μπορεί να ληφθεί από το αποτέλεσμα μιας άλλης μεθόδου γνωστής ορθότητας και ακρίβειας μετά από την προσθήκη σε ειδικά εμβολιασμένο δείγμα, ή και από υλικό αναφοράς γνωστής ή γενικά αποδεκτής σύνθεσης.

Ο απλούστερος τρόπος εκτίμησης της ορθότητας είναι με πειράματα ανάκτησης, δηλαδή τον προσδιορισμό της ανάκτησης εφαρμόζοντας τη μέθοδο σε δείγματα μάρτυρα, τα οποία δεν περιέχουν τον αναλύτη και τα οποία έχουν εμβολιαστεί τεχνητά με γνωστές συγκεντρώσεις του αναλύτη. Χρησιμοποιούνται διάφορα επίπεδα συγκέντρωσης εμβολιασμού ώστε να καλύπτουν την υπό μελέτη περιοχή. Συνήθως ένα σημαντικό επίπεδο εμβολιασμού είναι το όριο ποσοτικοποίησης και ένα άλλο το μέγιστο όριο υπολείμματος (MRL). Για κάθε τάξη μεγέθους επίπεδου εμβολιασμού απαιτούνται 2 ως 3 επίπεδα μελέτης. Οι εμβολιασμοί σε κάθε επίπεδο γίνονται σε ορισμένες επαναλήψεις (3 έως 7) και υπολογίζεται η μέση τιμή των ανακτήσεων και η σχετική τυπική απόκλιση τους. Σε περιπτώσεις όπου δεν είναι δυνατή η ανεύρεση μάρτυρα ή αν ο μάρτυρας περιέχει παρεμποδίζουσες κορυφές, το μικρότερο επίπεδο εμβολιασμού πρέπει να είναι τουλάχιστον 5 φορές μεγαλύτερο από το επίπεδο των παρεμποδίζουσών κορυφών.

Η Ε.Ε. αναφέρει ως μέσες εκατοστιαίες ανακτήσεις 70-110% για όλες τις

προσδιοριζόμενες ενώσεις σε κάθε επίπεδο εμβολιασμού. Σε περιπτώσεις στις οποίες ο στόχος αυτός δεν μπορεί να επιτευχθεί και δεν υπάρχει άλλη εναλλακτική μέθοδος, μπορούν να γίνουν αποδεκτές μικρότερες τιμές ανάκτησης οι οποίες συνοδεύονται από ικανοποιητικό στοιχείο ακρίβειας.

2. Πιστότητα (Precision)

Η πιστότητα ή ακρίβεια (*Precision*) των αποτελεσμάτων της αναλυτικής μεθόδου εκφράζεται με την επαναληψιμότητα (*Repeatability*) και την αναπαραγωγιμότητα (*Reproducibility*).

Η επαναληψιμότητα είναι η δυνατότητα της μεθόδου να επιτυγχάνονται επαναλήψιμα αποτελέσματα από τον ίδιο αναλύτη κάτω από τις ίδιες συνθήκες. Για τον έλεγχο αυτό πρέπει να γίνουν τουλάχιστον 3-5 ίδιες επαναλήψεις των πειραμάτων ανάκτησης. Η επαναληψιμότητα εκτιμάται με % σχετική τυπική απόκλιση (RSD). Τιμές RSD ίσες ή μικρότερες από 20 θεωρούνται αποδεκτές.

Η αναπαραγωγιμότητα είναι η ικανότητα της αναπαραγωγής αποτελεσμάτων από άλλους αναλύτες στο ίδιο εργαστήριο σε μεγάλο χρονικό διάστημα (1-3 εβδομάδες) ή και από άλλα ανεξάρτητα εργαστήρια. Εκτιμάται με % σχετική τυπική απόκλιση (RSD) των αποτελεσμάτων, είτε με αναλύσεις εμβολιασμένων δειγμάτων ή και με επαναλήψεις αναλύσεων πραγματικών δειγμάτων.

3. Εκλεκτικότητα (Selectivity) και Ειδικότητα (Specificity)

Σύμφωνα με την οδηγία 96/46/EC (European Commission, 2000) η ειδικότητα ορίζεται ως η ικανότητα της μεθόδου να διακρίνει έναν αναλύτη από άλλες ουσίες. Γενικά, ο όρος "ειδική" αναφέρεται σε μια μέθοδο η οποία προσδιορίζει μια μόνο αναλυτέα ένωση ενώ ο όρος "εκλεκτική" αναφέρεται στη μέθοδο η οποία προσδιορίζει διαφορετικές ενώσεις ταυτόχρονα διαχωρίζοντας τη μια από την άλλη. Δηλαδή η απόκριση της μεθόδου σε μια ένωση είναι ξεχωριστή από όλες τις αποκρίσεις όλων των άλλων ενώσεων.

Επομένως, με τη χρήση μια πλήρως ειδικής μεθόδου για μια ένωση, η συγκέντρωσή της μπορεί να προσδιοριστεί με ακρίβεια, ασχέτως της παρουσίας άλλων ουσιών στο δείγμα (η μέθοδος δεν δίνει απόκριση για άλλο χαρακτηριστικό,

εκτός του αναλυόμενου στοιχείου). Μια μέθοδος ονομάζεται πλήρως εκλεκτική, εάν παρέχει ακριβή αναλυτικά αποτελέσματα για τα διάφορα συστατικά του μίγματος χωρίς καμία αλληλεπίδραση μεταξύ τους.

Ο προσδιορισμός της ειδικότητας μεθόδου, μπορεί να γίνει:

- α) υπολογίζοντας την % ανάκτηση ενός αναλύτη σε εμβολιασμένα δείγματα σε συγκέντρωση του αναλύτη και ενώσεων που πιθανώς να παρεμποδίζουν κατάλληλα τον προσδιορισμό (δηλαδή ουσίες με παραπλήσιες φυσικοχημικές με τον αναλύτη ιδιότητες που βρίσκονται στο δείγμα)
- β) αναλύοντας τυφλά δείγματα αντιπροσωπευτικών δειγμάτων και οι τυχόν αποκρίσεις δεν θα πρέπει να είναι μεγαλύτερες από το 30% της απόκρισης του ορίου ποσοτικοποίησης της μεθόδου.

4. Ανιχνευσιμότητα (Detectability)

Κατά τον προσδιορισμό ενός αναλύτη, που περιέχεται σε μία πολύ μικρή συγκέντρωση σε ένα δείγμα, το αναλυτικό σήμα θα είναι πολύ μικρό. Είναι αρκετά δύσκολο να αποφασιστεί εάν το αυτό το σήμα προέρχεται από τον αναλύτη ή από τον θόρυβο (σήμα υπόβαθρου) που προκαλείται από τη μέθοδο ή από το όργανο. Αυτή η αβεβαιότητα έθεσε την ανάγκη θέσπισης σαφών ορισμών των ορίων ανίχνευσης (limit of detection, LOD) και ποσοτικοποίησης (limit of quantification, LOQ) ενός αναλύτη με μία μέθοδο.

Το όριο ανίχνευσης (LOD) ορίζεται ως η χαμηλότερη ποσότητα ενός αναλύτη σε ένα δείγμα που μπορεί να ανιχνευτεί με ακρίβεια αλλά όχι απαραίτητα να ποσοτικοποιηθεί.

Για τον προσδιορισμό του ορίου ανίχνευσης χρησιμοποιούνται διάφορες προσεγγίσεις, οι οποίες εξαρτώνται από το εάν η αναλυτική μέθοδος είναι ενόργανη ή μη ενόργανη. Μια προσέγγιση είναι με βάση την οπτική αξιολόγηση (Visual evaluation) που μπορεί να χρησιμοποιηθεί και στα δύο είδη αναλυτικών μεθόδων. Ο προσδιορισμός του ορίου ανίχνευσης γίνεται με την ανάλυση δειγμάτων του αναλύτη γνωστής συγκέντρωσης και τον καθορισμό του ελάχιστου επιπέδου συγκέντρωσης στο οποίο ο αναλύτης μπορεί να ανιχνευθεί αξιόπιστα. Με βάση το λόγο σήμα προς θόρυβο (Signal to Noise - S/N). Η προσέγγιση αυτή εφαρμόζεται μόνο σε αναλυτικές

μεθόδους οι οποίες παρουσιάζουν θόρυβος γραμμής βάσεως (Baseline noise). Πρακτικά, θεωρούμε ως όριο ανίχνευσης την ποσότητα του αναλύτη που μας δίνει σήμα τριπλάσιο από το θόρυβο του χρωματογραφικού σήματος ($S/N = 3.3$). Ένας άλλος τρόπος που προκύπτει το LOD είναι με βάση την τυπική απόκλιση (SD) της αναλυτικής απόκρισης (Response) και την κλίση (Slope - b) της καμπύλης αναφοράς. Ο υπολογισμός γίνεται με την ακόλουθη σχέση: $LOD = (3.3 * SD) / b$

Το όριο ποσοτικού προσδιορισμού ή ποσοτικοποίησης (Limit of Quantitation LOQ), είναι το όριο πάνω από το οποίο μπορεί να επιτευχθεί ποσοτική μέτρηση με ικανοποιητικό βαθμό αξιοπιστίας. Πρακτικά, θεωρούμε ως όριο ποσοτικού προσδιορισμού την ποσότητα του συστατικού που μας δίνει σήμα δεκαπλάσιο από το θόρυβο του χρωματογραφικού σήματος ($S/N = 10$). Το όριο ποσοτικοποίησης πρέπει ακολούθως να πιστοποιηθεί ως προς την αξιοπιστία του, με την ανάλυση ενός ικανοποιητικού αριθμού δειγμάτων που είναι γνωστό ότι περιέχουν τον αναλύτη σε συγκέντρωση ίση με το όριο ποσοτικοποίησης ή πολύ κοντά σε αυτή (EURACHEM Guide, 1998 και Λαμπή, 2003).

5. Γραμμικότητα (Linearity)

Η γραμμικότητα του συστήματος ανίχνευσης, είναι επιθυμητή αλλά δεν αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση και δεν είναι εξασφαλισμένη σε όλο το εύρος των συγκεντρώσεων. Στις περιπτώσεις που ενδιαφέρει η μελέτη της γραμμικότητας ενός ανιχνευτή για μια προσδιοριζόμενη ουσία, θα πρέπει να ελέγχεται η γραμμικότητα σε 5 τουλάχιστον συγκεντρώσεις οι οποίες να καλύπτουν όλο το εύρος της περιοχής μετρήσεων της αναλυτικής μεθόδου.

Η γραμμικότητα αποδεικνύεται με εξέταση του διαγράμματος της απόκρισης του ανιχνευτή σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του αναλύτη. Τα αποτελέσματα του ελέγχου αυτού αξιολογούνται με κατάλληλες στατιστικές μεθόδους, συνήθως, με εξέταση της ευθείας παλινδρόμησης με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων. Ο συντελεστής συσχέτισης (correlation coefficient, r) ή ο συντελεστής προσδιορισμού (determination coefficient R^2), η τεταγμένη επί την αρχή, η κλίση της ευθείας παλινδρόμησης και το άθροισμα τετραγώνων των υπολοίπων είναι οι παράμετροι που μπορούν να εξεταστούν. Για να θεωρηθεί η γραμμική η σχέση μεταξύ απόκρισης και

συγκέντρωσης στατιστικά σημαντική θα πρέπει ο συντελεστής συσχέτισης να έχει τιμές $> 0,98$. Εάν δεν είναι γραμμική η συσχέτιση είναι δυνατόν να περιοριστεί η περιοχή συγκεντρώσεων, ώστε να καταστεί γραμμική.

6. Ευαισθησία (Sensitivity)

Ευαισθησία (Sensitivity) μεθόδου είναι η ικανότητα της μεθόδου να διακρίνει μικρές διαφορές συγκέντρωσης μάζας του αναλύτη. Πρακτικά είναι η κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης. Μια μέθοδος χαρακτηρίζεται ευαίσθητη όταν οι μικρές αλλαγές συγκέντρωσης ποσότητας αναλύτη προκαλούν μεγάλες αλλαγές μετρούμενης απόκρισης. Αρκετές φορές γίνεται σύγκριση μεταξύ των ορίων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης και της ευαισθησίας της μεθόδου. Όταν μια μέθοδος είναι ικανή να ανιχνεύσει (προσδιορίσει) χαμηλές συγκεντρώσεις (ποσότητες) ενός αναλύτη δεν σημαίνει ότι είναι ευαίσθητη αλλά ότι η μέθοδος έχει υψηλή ανιχνευσιμότητα ή ότι το όριο ανίχνευσης της μεθόδου είναι πολύ χαμηλό.

7. Αντοχή (Ruggedness) και Ανθεκτικότητα (Robustness)

Αντοχή της μεθόδου είναι η πιστότητα της μεθόδου όταν τα δείγματα αναλύονται κάτω από κανονικές συνθήκες αλλά με την πραγματοποίηση μικρών αλλαγών στις συνθήκες περιβάλλοντος ή/και χειρισμών (διαφορετικά όργανα, θερμοκρασία χρόνος κ.α.).

Η αξιολόγηση της ανθεκτικότητας (*Robustness*) μιας αναλυτικής μεθόδου πρέπει να εξετάζεται στη φάση της ανάπτυξής της, και δείχνει την επιδεκτικότητα της μεθόδου σε σχέση με προσχεδιασμένες μεταβολές στις πειραματικές παραμέτρους της. Η συνέπεια της αξιολόγησης της ανθεκτικότητας μιας μεθόδου είναι η καθιέρωση μιας σειράς *παραμέτρων καταλληλότητας του συστήματος (System suitability testing)* για να εξασφαλιστεί η διατήρηση της αξιοπιστίας της αναλυτικής μεθόδου όταν αυτή χρησιμοποιείται.

8. Ασφάλεια (Safety)

Η έννοια της ασφάλειας (Safety) της αναλυτικής μεθόδου είναι πολύ δύσκολο να

χαρακτηρισθεί ποσοτικά. Τα αναλυτικά όργανα κατά κανόνα είναι ασφαλή, εφόσον τηρούνται οι κανόνες ασφαλείας τους. Οι διάφορες αναλυτικές διαδικασίες είναι κατά κανόνα ασφαλείς όταν εκτελούνται σύμφωνα με τις οδηγίες των προτύπων ασφαλείας και ληφθούν οι απαραίτητες προφυλάξεις. Ο μόνος παράγοντας κινδύνου που φαίνεται να είναι σημαντικός κατά την επιλογή μιας αναλυτικής μεθόδου είναι η χρήση επικίνδυνων αντιδραστηρίων. Οι κίνδυνοι αυτοί μπορούν να μειωθούν σε σημαντικό βαθμό με τη χρήση ειδικών συσκευών ή με εξειδικευμένη εκπαίδευση σύμφωνα με τους κανόνες Καλής Εργαστηριακής Πρακτικής (Good Laboratory Practice - GLP).

9. Κόστος (Cost)

Η μηχανοποίηση και αυτοματοποίηση ενός οργάνου μπορεί να αυξήσει το κόστος (Cost) εφαρμογής μιας αναλυτικής μεθόδου. Αυτό όμως είναι επιτακτική ανάγκη καθώς με αυτό τον τρόπο μπορεί να μειωθεί σημαντικά ο κίνδυνος λαθών που μπορεί να γίνουν από τον αναλυτή και επιπλέον αυξάνεται ο αριθμός των αναλύσεων ανά χρονική περίοδο, αφού βελτιστοποίηση της ακρίβειας σημαίνει περισσότερες επαναλήψεις. Κατά την κοστολόγηση της ανάλυσης λαμβάνονται υπόψη, η τιμή του οργάνου και ο χρόνος απόσβεσης, το κόστος εργασίας, ο χρόνος ανάλυσης και το κόστος των αντιδραστηρίων.

10. Αβεβαιότητα της μέτρησης

Σύμφωνα με την EURACHEM/CITAC 2000, η **αβεβαιότητα** (uncertainty) ορίζεται ως η παράμετρος που συνδέεται με το αποτέλεσμα της μέτρησης και χαρακτηρίζει τη διασπορά των τιμών της. Η αβεβαιότητα αναφέρεται ως **τυπική αβεβαιότητα** (standard uncertainty, u) και εκφράζεται ως τυπική απόκλιση. Η **συνδυασμένη τυπική αβεβαιότητα** (combined standard uncertainty) είναι η αβεβαιότητα που προκύπτει από το συνδυασμό των τυπικών αβεβαιοτήτων που εισάγει κάθε συνιστώσα και δίνεται ως η τετραγωνική ρίζα του αθροίσματος των τετραγώνων των τυπικών αβεβαιοτήτων κάθε συνιστώσας. Η **διευρυμένη αβεβαιότητα** (expanded uncertainty, U) χρησιμοποιείται για να καλύψει τις απαιτήσεις των τελικών χρηστών της μέτρησης και εκφράζει ένα μεγαλύτερο

διάστημα από αυτό της συνδυασμένης τυπικής αβεβαιότητας, εντός του οποίου η τιμή του μετρούμενου μεγέθους έχει μεγαλύτερη πιθανότητα να υπάρξει. Η διευρυμένη αβεβαιότητα υπολογίζεται πολλαπλασιάζοντας τη συνδυασμένη αβεβαιότητα με ένα συντελεστή κάλυψης (coverage factor) k , ο οποίος στις χημικές μετρήσεις λαμβάνει συνήθως την τιμή 2 και αντιστοιχεί σε επίπεδο εμπιστοσύνης περίπου 95 %.

Τα συστατικά της αβεβαιότητας χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, ανάλογα με τη μέθοδο εκτίμησής τους. Η **αβεβαιότητα τύπου A** εκτιμάται από μια σειρά επαναλαμβανόμενων μετρήσεων, χρησιμοποιώντας στατιστικές μεθόδους ενώ, η **αβεβαιότητα τύπου B** υπολογίζεται με άλλες τεχνικές εκτός στατιστικής, όπως δεδομένα από πιστοποιητικά διακριβώσεων, δεδομένα προηγούμενων πειραματικών μετρήσεων σε σχετικά μεγάλο χρονικό διάστημα, εμπειρία και οποιαδήποτε άλλη σχετική πληροφορία.

Όταν γίνεται μέτρηση της συγκέντρωσης μιας ουσίας το αποτέλεσμα αποτελεί μόνο μία εκτίμηση της αληθούς τιμής. Το αποτέλεσμα της μέτρησης αποκλίνει από την πραγματική τιμή εξαιτίας των συστηματικών και τυχαίων σφαλμάτων. Τα τυχαία σφάλματα προσδιορίζονται με πειράματα επαναληψιμότητας και δεν μπορούν να διορθωθούν, μπορούν όμως να μειωθούν αυξάνοντας τον αριθμό των μετρήσεων. Τα συστηματικά σφάλματα είναι δυσκολότερο να ποσοτικοποιηθούν.

Τα στάδια εκτίμησης της αβεβαιότητας σύμφωνα με τον οδηγό της EURACHEM είναι:

Προδιαγραφή του μετρούμενου συστατικού καταγράφοντας με σαφήνεια τι ακριβώς μετρείται καθώς και η διατύπωση μιας ποσοτικής σχέσης μεταξύ της συγκέντρωσης του προσδιοριζόμενου συστατικού και των παραμέτρων από τους οποίους υπολογίζεται.

Ταυτοποίηση των πηγών αβεβαιότητας για κάθε παράμετρο, δημιουργώντας ένα κατάλογο από τις πιθανές πηγές αβεβαιότητας. Στον κατάλογο αυτό θα περιλαμβάνονται και πηγές αβεβαιότητας παραμέτρων που δεν εμφανίζονται στην εξίσωση υπολογισμού του προσδιοριζόμενου συστατικού.

Ποσοτικοποίηση της τυπικής αβεβαιότητας (u) κάθε πηγής υπολογίζοντας την αβεβαιότητα κάθε συστατικού ως έκφραση τυπικής απόκλισης ή σχετικής τυπικής απόκλισης.

Υπολογισμός της συνδυασμένης τυπικής αβεβαιότητας (U_c) ακολουθώντας το νόμο

διάδοσης σφαλμάτων. Επειδή οι πηγές αβεβαιότητας έχουν συνήθως διαφορετικές μονάδες, η συνδυασμένη αβεβαιότητα υπολογίζεται ως σχετική τυπική αβεβαιότητα.

Υπολογισμός της διευρυμένης τυπικής **αβεβαιότητας (U)** χρησιμοποιώντας τον συντελεστή κάλυψης $k=2$ (95%). Η διευρυμένη αβεβαιότητα U είναι: $U = 2 * U_c$

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο - Σκοπός της μελέτης

Σκοπός αυτής της εργασίας ήταν η διερεύνηση αναλυτικών μεθόδων για τον προσδιορισμό των υπολειμμάτων δραστικών εντομοκτόνων ουσιών που χρησιμοποιούνται σήμερα ή χρησιμοποιήθηκαν τα τελευταία χρόνια στη φυτοπροστασία της ελιάς, παράλληλα με τον ταυτόχρονο προσδιορισμό και μερικών δραστικών ουσιών, όπως το οργανοχλωριωμένο εντομοκτόνο *endosulfan* και ο μεταβολίτης του, οι οποίες, πέραν της χρησιμοποίησής τους μέχρι πολύ πρόσφατα, ενδέχεται λόγω της μεγάλης εμμονής τους στο περιβάλλον να επιμολύνουν καλλιέργειες που δεν έχουν δεχτεί ψεκασμούς με το συγκεκριμένο εντομοκτόνο. Σημειώνεται ότι, ειδικά για αυτή τη δραστική ουσία, έχει δημοσιευθεί μελέτη που καταγράφει την παρουσία της στην Κρήτη σε συσχέτιση με τη μεταφορά της από τη Βόρειο Αφρική με το φαινόμενο της λασποβροχής και σε πιθανή επιβάρυνση των καλλιεργειών της ελιάς (Balayiannis et al.2009).

Σκοπός επίσης αυτής της εργασίας ήταν και η ανάλυση πραγματικών εμπορικών δειγμάτων ελαιολάδου για τον έλεγχο παρουσίας και τον προσδιορισμό των φυτοπροστατευτικών ουσιών στόχων της μελέτης σε προϊόντα που διακινούνται είτε τυποποιημένα είτε «χύμα» στην τοπική αγορά.

Οι δραστικές ουσίες στόχοι της εργασίας καθώς και τα ιδιαίτερα φυσικοχημικά τους χαρακτηριστικά παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.1. Όπως φαίνεται στον Πίνακα αυτό η επιλογή, εκτός του *endosulfan* και του μεταβολίτη του, εστιάζεται στις ουσίες που ανήκουν στην ομάδα των πυρεθρινών και χρησιμοποιούνται ευρέως για τη χημική καταπολέμηση του δάκου στην ελαιοκαλλιέργεια.

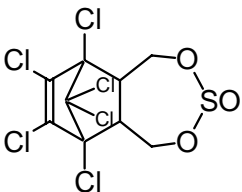
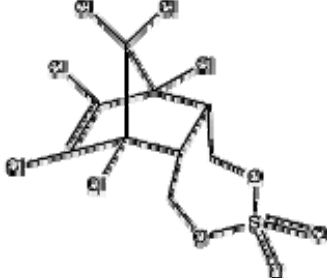
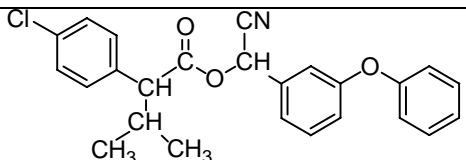
Καθώς ο προσδιορισμός των υπολειμμάτων των ουσιών αυτών του Πίνακα 4.1 είναι δυνατός με αεριοχρωματογραφική πολυϋπολειμματική μέθοδο και απευθύνεται σε ανάλυση φυτικών υποστρωμάτων με μεγάλη περιεκτικότητα λίπους ή λιπαρών προϊόντων, όπως το ελαιόλαδο, η εργασία αυτή κινήθηκε στο πλαίσιο της διερεύνησης τέτοιων σύγχρονων αναλυτικών μεθόδων, της επιβεβαίωσης τους και της βελτιστοποίησής τους με πειράματα ανάκτησης, με την εκτίμηση των αναλυτικών

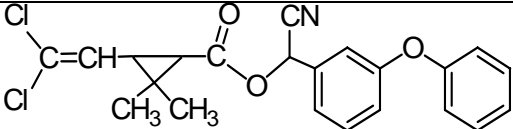
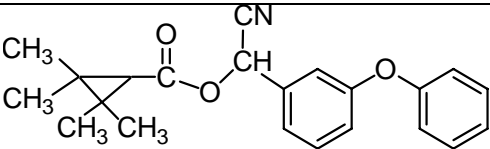
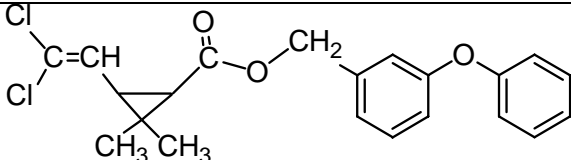
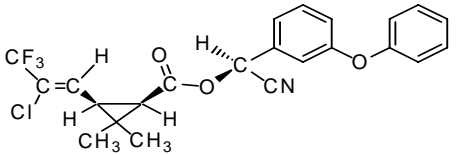
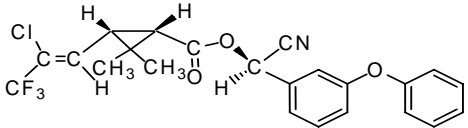
χαρακτηριστικών τους και με την ευκολία της εφαρμογής τους σε εργαστήρια αναλύσεων ρουτίνας που διαθέτουν βασικό εργαστηριακό εξοπλισμό.

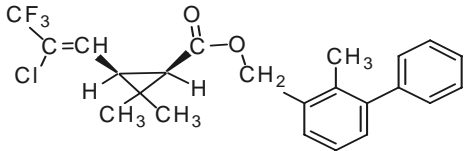
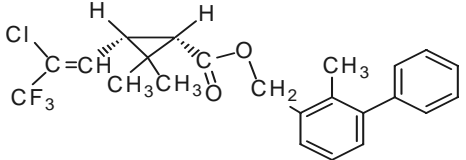
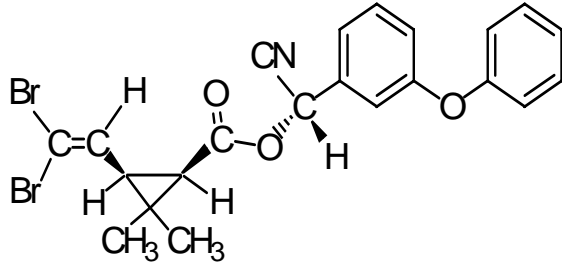
Από τη βιβλιογραφική ανασκόπηση, αλλά και τις πρωτογενείς δοκιμές, στο εργαστήριο, εφαρμογής μεθόδων ανάλυσης ελαιολάδου για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων με αέρια χρωματογραφία και με ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων προέκυψε η ευκολία και η «καθαρότητα» στη χρήση της μεθόδου QuEChERS για την εκχύλιση και τον καθαρισμό του εκχυλίσματος.

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται τα τελευταία χρόνια στον προσδιορισμό υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων σε ευρύτατο κύκλο υποστρωμάτων, όπως λαχανικά και φρούτα και προσαρμόζεται με μικρές τροποποιήσεις και βελτιώσεις και στην ανάλυση λιπαρών υποστρωμάτων, όπως η ελιά και το ελαιόλαδο.

Πίνακας 4.1: Δραστικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν και τα φυσικοχημικά τους χαρακτηριστικά.

<i>Δραστική ουσία</i>	<i>Χημική Δομή</i>	<i>Χημική ομάδα/ Χρήση</i>	<i>Vapour Pressure (mPa)</i>	<i>Solubility in Water (mg/L)</i>	<i>log K_{ow}</i>
α- endosulfan β- endosulfan		Οργανοχλωριωμένα / Εντομοκτόνο	0,83 mPa (20°C) for 2:1 mixture of α- and β- isomers	alpha-endosulfan 0,32, beta-endosulfan 0,33 (both in mg/l, 22 °C)	logP για α- = 4,74 β- = 4,79 (both at pH 5)
endosulfan - sulfate		Οργανοχλωριωμένα / Εντομοκτόνο (μεταβολίτης του endosulfan)		< 1 µg/l	
fenvalerate		Πυρεθρίνες / Εντομοκτόνο	1,92 × 10 ⁻² mPa (20 °C)	<10 µg/l (25 °C)	logP = 5,01 (23 °C)

cypermethrin		Πυρεθρίνες / Εντομοκτόνο	$2,0 \times 10^{-4}$ mPa (20 °C)	0,004 mg/l (pH 7)	logP = 6,6
fenpropathrin		Πυρεθρίνες / Εντομοκτόνο	0,730 mPa (20 °C)	14,1 µg/l (25 °C)	logP = 6 (20 °C)
permethrin		Πυρεθρίνες / Εντομοκτόνο	<i>cis</i> - 0,0025 mPa; <i>trans</i> - 0,0015 mPa (both 20 °C)	6×10^{-3} mg/l (pH 7, 20 °C)	logP = 6.1 (20 °C)
lambda-cyhalothrin	<p>(S) (Z)-(1R)-<i>cis</i>-</p>  <p style="text-align: center;">+</p>  <p>(R) (Z)-(1S)-<i>cis</i>-</p>	Πυρεθρίνες / Εντομοκτόνο	2×10^{-4} mPa (20 °C, est.); 2×10^{-1} mPa (60 °C, interpolated)	0,005 mg/l (20 °C)	logP = 7 (20 °C)

<p>bifenthrin</p>	<p>(Z)-(1R)-cis-</p>  <p>(Z)-(1S)-cis-</p> 	<p>Πυρεθρίνες / Εντομοκτόνο</p>	<p>0,024 mPa (25 °C)</p>	<p>< 1 mg/l</p>	<p>logP >6</p>
<p>deltamethrin</p>		<p>Πυρεθρίνες / Εντομοκτόνο</p>	<p>$1,24 \times 10^{-5}$ mPa (25 °C, gas saturation method)</p>	<p><0,2 µg/l (25 °C)</p>	<p>logP = 4,6 (25 °C)</p>

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο - Υλικά και Μέθοδοι.

5.1. Αντιδραστήρια και Διαλύτες

Τα αντιδραστήρια και οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή των πειραματικών δοκιμών και για την εφαρμογή της μεθόδου στις αναλύσεις πραγματικών δειγμάτων ήταν τα εξής:

- Ακετονιτρίλιο (HPLC Grade, Fisher Scientific - 99,99%)
- Τολουόλιο (Pestiscan Grade, LAB-SCAN - 99,8%)
- Ακετόνη (Analytical Reagent Grade, Fisher Scientific- 99,99%)
- Νερό (HPLC Gradient grade, Fisher Scientific)
- MgSO₄ Anhydrous – Ανυδρο θειικό μαγνήσιο (Analytical Reagent, SIGMA ALDRICH - ≥99,5%)
- NaCl (Analytical Reagent, Mallinckrodt Chemical Works)

5.2. Δραστικές ουσίες και πρότυπα διαλύματα

Οι φυτοπροστατευτικές δραστικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.1. Η επί τοις εκατό καθαρότητα των δραστικών ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των μητρικών προτύπων διαλυμάτων, κυμάνθηκε από 97,9 έως 99,4%.

Τα μητρικά πρότυπα διαλύματα κάθε δραστικής ουσίας παρασκευάστηκαν σε ακετόνη σε συγκέντρωση 1000 mg/L και φυλάχτηκαν σε γυάλινα φιαλίδια των 10 mL κλεισμένα αεροστεγώς στους -20 °C.

Από τα μητρικά πρότυπα διαλύματα παρασκευάστηκε ένα πρότυπο μικτό διάλυμα συγκέντρωσης 50 mg/ L σε ακετόνη. Με την κατάλληλα αραίωση αυτού παρασκευάστηκε το πρότυπο μικτό διάλυμα εργασίας συγκέντρωσης 2,5 mg/ L σε ακετόνη, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τους εμβολιασμούς του ελαιολάδου στα πειράματα ανάκτησης και για την παρασκευή των πρότυπων διαλυμάτων για την ποσοτικοποίησης.

Για τη βαθμονόμηση και για τον έλεγχο της γραμμικότητας του χρωματογραφικού σήματος του ανιχνευτή παρασκευάστηκαν πρότυπα μικτά διαλύματα βαθμονόμησης τόσο σε τολουόλιο (πρότυπα σε καθαρό διαλύτη), όσο και τα αντίστοιχης συγκέντρωσης μικτά πρότυπα διαλύματα σε εκχύλισμα υποστρώματος.

Οι συγκεντρώσεις των πρότυπων μικτών διαλυμάτων βαθμονόμησης που παρασκευάστηκαν ήταν 0,0076 - 0,015 - 0,03 - 0,076 - 0,15 - και 0,30 mg/ L. Οι συγκεντρώσεις αυτές επιλέχτηκαν ώστε να υπάρχει αντιστοίχιση των συγκεντρώσεων των τελικών διαλυμάτων έκχυσης που προέκυπταν από τα πειράματα ανάκτησης με τις συγκεντρώσεις των πρότυπων διαλυμάτων βαθμονόμησης.

5.3. Υλικά και όργανα – Εξοπλισμός

Για την προετοιμασία των πρότυπων διαλυμάτων καθώς και για αυτήν δείγματος, δηλαδή για την εκχύλιση και τον καθαρισμό του εκχυλίσματος χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω σκεύη και όργανα:

- Εργαστηριακός ζυγός ακριβείας (Kern ALS 220-4)
- Ομογενοποιητής Vortex
- Φυγόκεντρος, για τη φυγοκέντρωση των εκχυλισμάτων (Hettich Universal)
- Συσκευή συμπύκνωσης – ξήρανσης με ρεύμα αζώτου.
- Τυποποιημένοι πλαστικοί σωλήνες φυγοκέντρου με περιεχόμενο για εφαρμογή της μεθόδου QuEChERS της εταιρείας Thermo Scientific - 150 mg MgSO₄/ 50 mg CUPSA/ 50 mg CEC18/ 50 mg CUCARB – 2 mL Centrifuge Tubes.
- Γυάλινα φιαλίδια των 25 και 40 mL σκούρου χρώματος, ογκομετρικοί κύλινδροι των 10 mL, σιφόνια πλήρωσης των 2, 5, και 10 mL, μικροσύριγγες των 500, 250, 100, και 50 μL, γυάλινες σύριγγες των 10 mL, ογκομετρικές φιάλες, ποτήρια ζέσεως.
- Σύστημα αέριας χρωματογραφίας τύπου Hewlett Packard 6890, εφοδιασμένο με χρωματογραφική στήλη (30m x 250μm x 0.25 μm nominal) τύπου BPX-5 (35% *Phenyl-Polysilphenylene-Siloxane*) και ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων (ECD).

5.4. Εκχύλιση υπολειμμάτων από ελαιόλαδο

Εφαρμόστηκε κατά βάση η μέθοδος QuEChERS και αναπτύχθηκαν δοκιμές σε μερικά στάδια της για τη βελτιστοποίηση της απόδοσης της εκχύλισης. Αξιολογήθηκαν και εφαρμόστηκαν δύο μέθοδοι, η μέθοδος τόσο με ένα στάδιο εκχύλισης του ελαιόλαδου (Εικόνα 5.1) και μία μέθοδος με διπλή εκχύλιση του ελαιόλαδου (Εικόνα 5.2).

Μέθοδος ενός σταδίου εκχύλισης

- Ζύγιση 3,0 g ελαιόλαδου σε γυάλινο σωλήνα με βιδωτό πώμα.
- Προσθήκη στο γυάλινο σωλήνα 7ml νερού HPLC, 10 mL ακετονιτριλίου, 4g MgSO₄ και 1g NaCl.
- Ανακίνηση του σωλήνα με το χέρι για 1min και ακολούθως ισχυρή ανάδευση σε Vortex για 1min.
- Παραμονή του γυάλινου σωλήνα σε ηρεμία σε σκοτεινό χώρο για περίπου 30 min ώστε να ολοκληρωθεί η κατανομή και ο διαχωρισμός των φάσεων.
- Παραλαβή 1mL από την επάνω φάση (οργανική φάση) του εκχυλίσματος και μεταφορά του σε τυποποιημένους πλαστικούς σωλήνες φυγοκέντρησης, που περιέχουν 0,15 g MgSO₄ , 0,05g PSA , 0,05g C₁₈ και 0,05 g CUCARB.
- Ισχυρή ανακίνηση των πλαστικών σωλήνων φυγοκέντρησης με το χέρι.
- Φυγοκέντρηση των πλαστικών σωλήνων φυγοκέντρησης για 2min στις 4000 στροφές/ min.
- Παραλαβή 500μL εκχυλίσματος και μεταφορά τους σε φιαλίδια χρωματογραφίας.
- Εξάτμιση του διαλύτη (ακετονιτρίλιο) σε ρεύμα χαμηλής ροής αζώτου
- Επαναδιάλυση του ξηρού υπολείμματος με 500μL τολουόλιο και ανάδευση για πλήρη ομογενοποίηση του τελικού εκχυλίσματος.

Μέθοδος διπλού σταδίου εκχύλισης

- Ζύγιση 3,0 g ελαιόλαδου σε γυάλινο σωλήνα με βιδωτό πώμα.
- Προσθήκη στο γυάλινο σωλήνα 7ml νερού HPLC, 10 mL ακετονιτριλίου, 4g MgSO₄ και 1g NaCl.

- Ανακίνηση του σωλήνα με το χέρι για 1min και ακολούθως ισχυρή ανάδευση σε Vortex για 1min.
- Παραλαβή της επάνω φάσης (οργανική φάση) του εκχυλίσματος –8 mL - και μεταφορά της σε σφαιρική φιάλη
- Προσθήκη στο γυάλινο σωλήνα με το δείγμα άλλων 8 mL ακετονιτριλίου.
- Ανακίνηση του σωλήνα με το χέρι για 1min και ακολούθως ισχυρή ανάδευση σε Vortex για 1min.
- Παραλαβή της επάνω φάσης (οργανική φάση) του εκχυλίσματος –8 mL - και μεταφορά της στη σφαιρική φιάλη και ανάμιξή της με αυτή από την πρώτη εκχύλιση.
- Ομογενοποίηση των εκχυλισμάτων με ανακίνηση της σφαιρικής φιάλης σε Vortex.
- Παραλαβή 2mL εκχυλίσματος από τη σφαιρική φιάλη και μεταφορά του σε τυποποιημένους πλαστικούς σωλήνες φυγοκέντρησης, που περιέχουν 0,15 g $MgSO_4$, 0,05g PSA , 0,05g C_{18} και 0,05 g CUCARB.
- Ισχυρή ανακίνηση των πλαστικών σωλήνων φυγοκέντρησης με το χέρι.
- Φυγοκέντρηση των πλαστικών σωλήνων φυγοκέντρησης για 2min στις 4000 στροφές/ min.
- Παραλαβή 1000μL εκχυλίσματος και μεταφορά τους σε φιαλίδια χρωματογραφίας.
- Εξάτμιση του διαλύτη (ακετονιτρίλιο) σε ρεύμα χαμηλής ροής αζώτου
- Επαναδιάλυση του ξηρού υπολείμματος με 500μL τολουόλιο και ανάδευση για πλήρη ομογενοποίηση του τελικού εκχυλίσματος.

Οι μέθοδοι εκχύλισης, όπως περιγράφονται παραπάνω, οδηγούν σε ένα συντελεστή συμύκνωσης ίσο με 0,3 gr υποστρώματος ανά mL τελικού ενέσιμου διαλύματος.



Εικόνα 5.1: Μέθοδος με ένα στάδιο εκχύλισης.



Εικόνα 5.2: Μέθοδος με διπλό στάδιο εκχύλισης.

5.5. Έλεγχος αναλυτικής διαδικασίας - Πειράματα ανάκτησης

Οι εμβολιασμοί του υποστρώματος ελαιολάδου (ελαιόλαδο βιολογικής παραγωγής) έγιναν με την προσθήκη μικρών όγκων πρότυπου μικτού διαλύματος 2,5 mg/ L σε ακετόνη σε προζυγισμένο δείγμα ελαιολάδου (3,0 g). Οι εμβολιασμοί πραγματοποιήθηκαν με στόχο να προκύψουν τρία επίπεδα συγκέντρωσης φ.ο. στο ελαιόλαδο, ήτοι 0,05 mg/Kg, 0,1 mg/Kg, 0,5 mg/Kg. Κάθε εμβολιασμός πραγματοποιήθηκε σε τρεις επαναλήψεις σε κάθε επίπεδο.

Για τον έλεγχο της αναλυτικής διαδικασίας αναλύθηκαν, ακολουθώντας τις προαναφερόμενες μεθόδους εκχύλισης, καθαρισμού και χρωματογραφικής ανάλυσης, δείγματα μάρτυρα από βιολογικό ελαιόλαδο καθώς και λευκά (blank) της αναλυτικής διαδικασίας. Με τον τρόπο αυτό ακολούθησε ο έλεγχος παρουσίας χρωματογραφικών κορυφών που να παρεμποδίζουν την καταγραφή των χρωματογραφικών κορυφών των δραστικών ουσιών στους αντίστοιχους χρόνους κατακράτησης.

5.6. Δείγματα ελαιολάδου

Η μέθοδος εφαρμόστηκε σε 27 πραγματικά δείγματα ελαιολάδου των οποίων η προμήθεια έγινε από τη λαϊκή αγορά του Βόλου, από ελαιοτριβεία των περιοχών Μαγνησίας, Φθιώτιδας και Σερρών.

Για τα πειράματα ανάκτησης και για τις δοκιμές στην βελτιστοποίηση και την αποτίμηση της μεθόδου αλλά και για την παρασκευή των μικτών προτύπων διαλυμάτων βαθμονόμησης σε εκχύλισμα υποστρώματος χρησιμοποιήθηκε ελαιόλαδο βιολογικής καλλιέργειας. Το προϊόν αυτό ελέγχθηκε για την παρουσία υπολειμμάτων Φ.Ο. της μελέτης και βρέθηκε απαλλαγμένο από την παρουσία τους.

5.7. Προσδιορισμός των Φ.Ο. με τη χρήση αέριας χρωματογραφίας και ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων (ECD).

Για τον προσδιορισμό των δραστικών ουσιών χρησιμοποιήθηκε σύστημα αέριας χρωματογραφίας της Hewlett Packard με στήλη τύπου BPX-5 και ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων τύπου mikro (μECD).

Η καταγραφή και επεξεργασία του χρωματογραφικού σήματος έγινε σε Η/Υ με το πρόγραμμα Chem Station.

Οι συνθήκες λειτουργίας του οργάνου ήταν οι ακόλουθες:

- Εγχυτής δείγματος σε λειτουργία “pulsed-splitless”
- Θερμοκρασία εγχυτή 260°C.
- Όγκος έγχυσης δείγματος 1μL.
- Θερμοκρασία ανιχνευτή 310 °C.
- Αέρια ανιχνευτή: N₂ (60mL/min).
- Φέρον αέριο He, με ροή 1,2mL/min.
- Θερμοκρασιακό πρόγραμμα ανάλυσης:

αρχική θερμοκρασία φούρνου στους 100 °C και διατήρησή της για 1,60 min, αύξηση με ρυθμό 10°C/ min μέχρι τους 210°C και παραμονή για 16 min, αύξηση με ρυθμό ανόδου 3 °C/ min μέχρι τους 280 °C και παραμονή για 7 min.

Ο συνολικός χρόνος του χρωματογραφικού χρόνου της ανάλυσης ήταν 58,93 min.

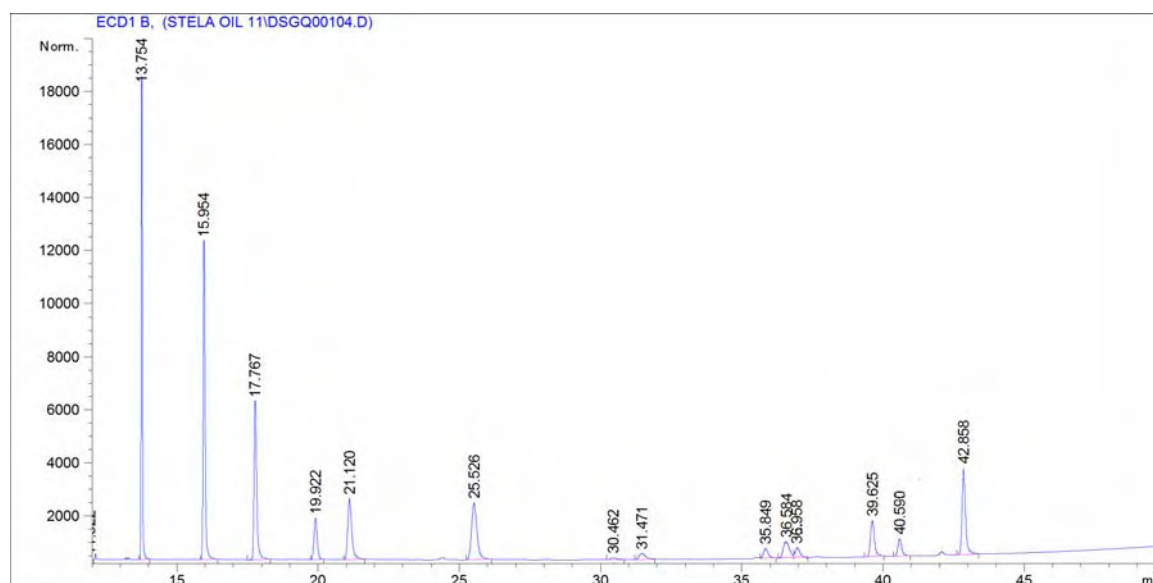
Η ποσοτικοποίηση του χρωματογραφικού σήματος έγινε με την τεχνική του εξωτερικού προτύπου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο - Αποτελέσματα & Συζήτηση

6.1. Διαχωρισμός των δραστικών ουσιών.

Οι χρωματογραφικές συνθήκες που επιλέχθηκαν και εφαρμόστηκαν για την ανάλυση των φυτοπροστατευτικών ουσιών (Φ.Ο.) – στόχων της μελέτης προσφέρουν σε σχετικά σύντομο χρόνο ανάλυσης, λαμβανομένου υπόψη της φύσης των Φ.Ο., ικανοποιητικό διαχωρισμό τους, όπως προκύπτει από τα χρωματογραφήματα που παρουσιάζονται στην εικόνα 6.1.

Οι χρόνοι κατακράτησης κάθε δραστικής ουσίας, όπως καταγράφηκαν στο χρωματογραφικό σύστημα που χρησιμοποιήθηκε εμφάνισαν ιδιαίτερη σταθερότητα κατά τη διάρκεια των αναλύσεων και παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.1.



Εικόνα 6.1: Χρωματογράφημα μικτού πρότυπου διαλύματος των δέκα φυτοπροστατευτικών ουσιών σε τολουόλιο και συγκέντρωσης (για κάθε μία ουσία) 0,15 mg δ.ο./L.

Από τις δέκα δραστικές ουσίες της μελέτης οι *Permethrin*, *Cypermethrin*, *Fenvalerate*, που ανήκουν στην ομάδα των πυρεθρινών, εμφανίζονται στο χρωματογράφημα με 2, 3 και 2 κορυφές, αντίστοιχα, που αποδίδονται σε στερεοϊσομερείς μορφές της κάθε δραστικής ουσίας.

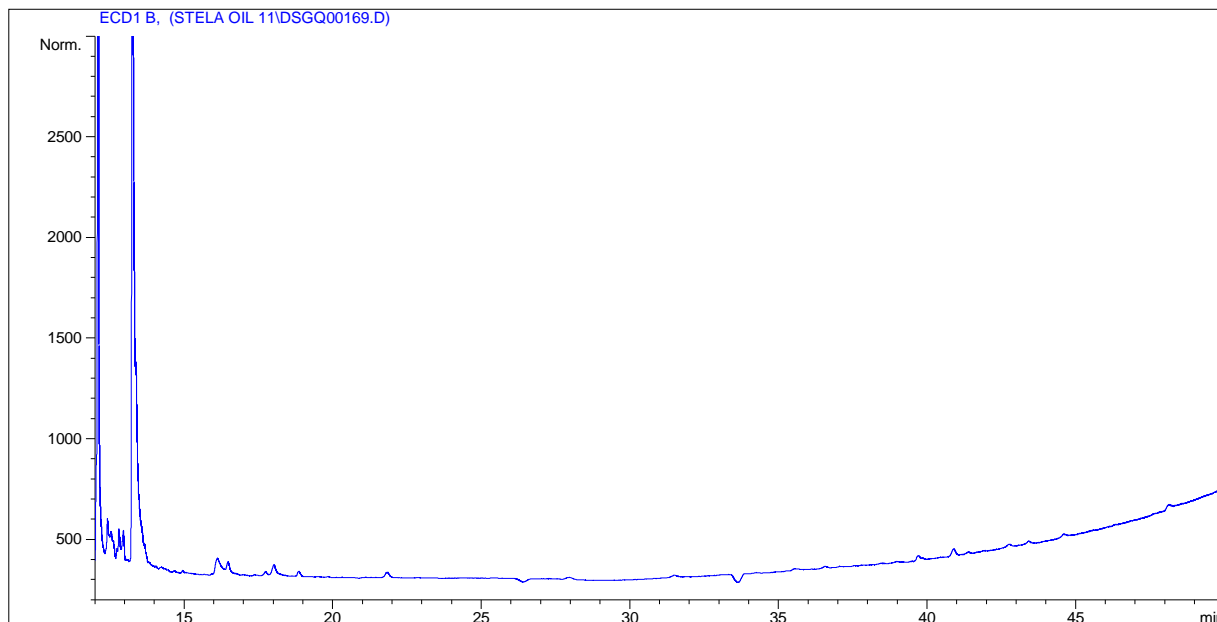
Πίνακας 6.1: Χρόνοι κατακράτησης (t_R) για τις 10 δραστικές ουσίες της μελέτης.

Δραστικές ουσίες	Χρόνος κατακράτησης
<i>α- endosulfan</i>	13,75
<i>β - endosulfan</i>	15,95
<i>endosulfan - sulfate</i>	17,76
<i>Bifenthrin</i>	19,92
<i>Fenpropathrin</i>	21,12
<i>L-cyhalothrin</i>	25,52
<i>Permethrin I</i>	30,46
<i>Permethrin II</i>	31,47
<i>Cypermethrin I</i>	35,84
<i>Cypermethrin II</i>	36,58
<i>Cypermethrin III</i>	36,95
<i>Fenvalerate I</i>	39,62
<i>Fenvalerate II</i>	40,56
<i>Deltamethrin</i>	42,85

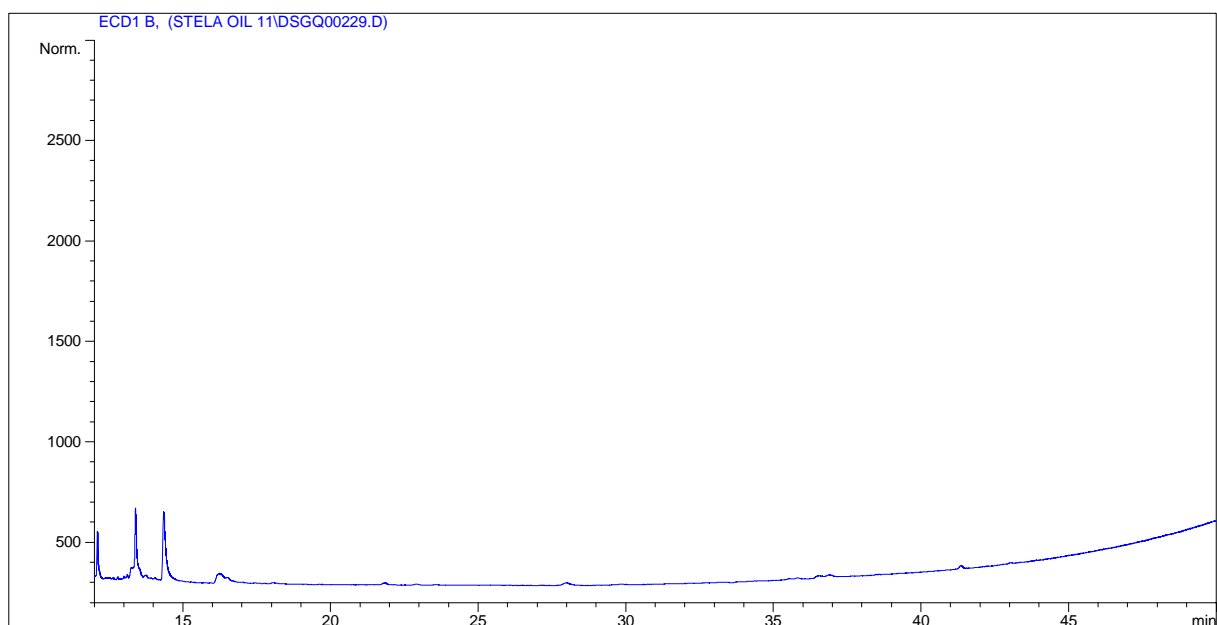
Η συνολική αναλυτική διαδικασία που ακολουθήθηκε (εκχύλιση, καθαρισμός εκχυλίσματος και χρωματογραφική ανάλυση) εξασφαλίζει την απουσία χρωματογραφικών κορυφών που να παρεμποδίζουν την εμφάνιση των κορυφών των δραστικών ουσιών στόχων, όπως προκύπτει και από τα χρωματογραφήματα του εκχυλίσματος μάρτυρα (βιολογικά παραγόμενο ελαιόλαδο) και του λευκού της αναλυτικής διαδικασίας που παρουσιάζονται στις Εικόνες 6.2 και 6.3, αντίστοιχα.

Η πολύ καλή και σταθερή γραμμή βάσης που εμφανίζεται σε αυτά , αλλά και σε όλα τα χρωματογραφήματα που παράχθηκαν, η ύπαρξη χαμηλού θορύβου στο χρωματογραφικό σήμα στη γραμμή βάσης, η ακρίβεια της εμφάνισης του χρόνου κατακράτησης για κάθε ουσία και το γεγονός της απουσίας παρεμποδίσεων ευνοεί την εφαρμογή της τεχνικής του χρόνου κατακράτησης για την ταυτοποίηση των χρωματογραφικών κορυφών σε άγνωστα δείγματα ελαιολάδου. Βέβαια για την επιβεβαίωση χρειάζονται και πρόσθετα αναλυτικά στοιχεία, όπως το κριτήριο του

χρόνου κατακράτησης σε διαφορετικό χρωματογραφικό σύστημα ή/και η επιβεβαίωση με ανάλυση σε συζευγμένο σύστημα αέριας χρωματογραφίας – φασματογραφίας μαζών.

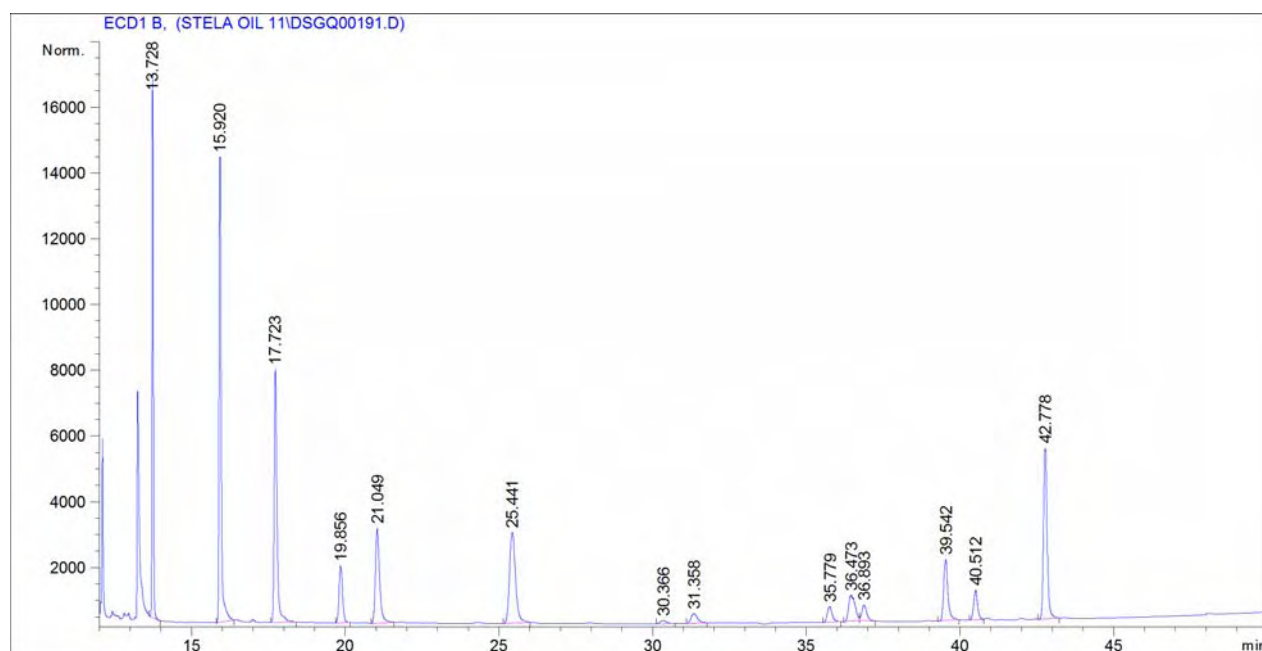


Εικόνα 6.2: Χρωματογράφημα εκχυλίσματος μάρτυρα (βιολογικού ελαιολάδου).

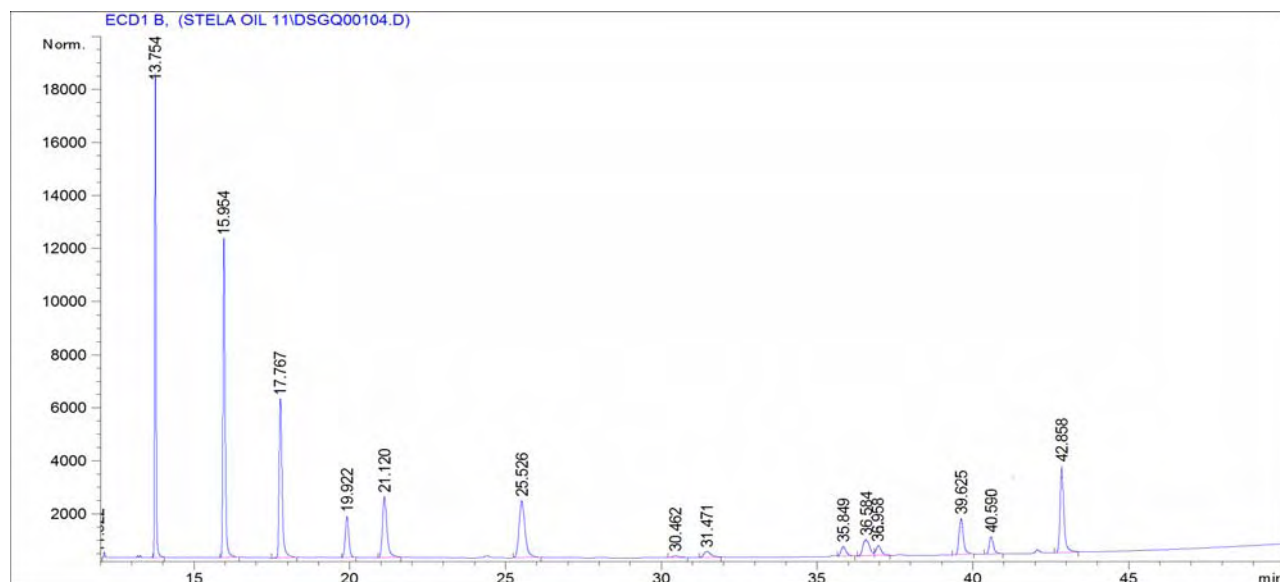


Εικόνα 6.3: Χρωματογράφημα που αντιστοιχεί στο λευκό (blank) της ακολουθούμενης αναλυτικής διαδικασίας.

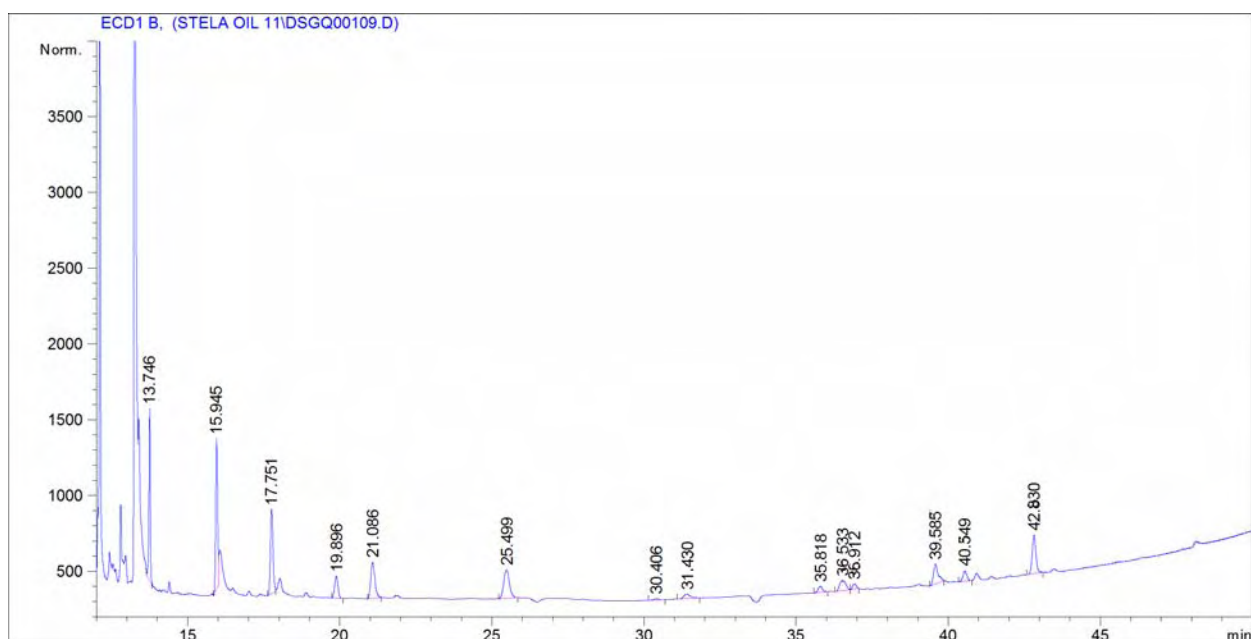
Στις εικόνες 6.4 , 6.5 , 6.6 και 6.7 παρουσιάζονται χρωματογράφημα των πρότυπων διαλυμάτων σε συγκεντρώσεις 0,015 και 0,15 mg/L σε εκχύλιση υποστρώματος και σε διαλύτη (τολουόλιο).



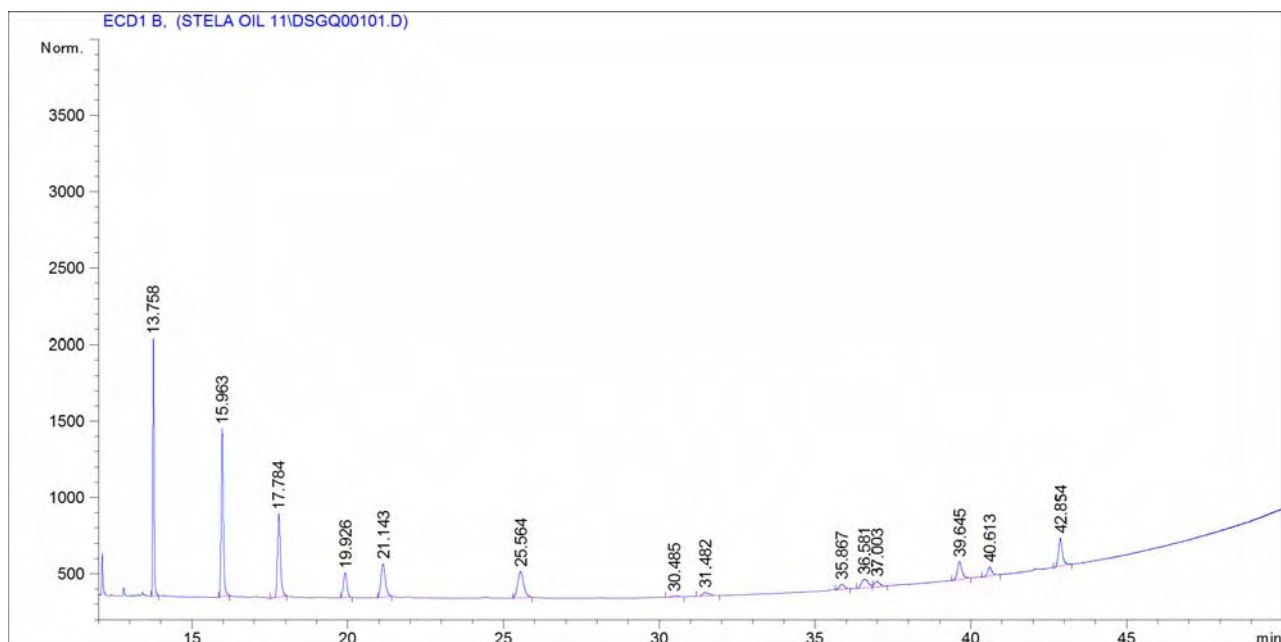
Εικόνα 6.4: Χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος σε υπόστρωμα σε συγκέντρωση 0,15 mg/L.



Εικόνα 6.5: Χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος σε διαλύτη τολουόλιο σε συγκέντρωση 0,15 mg/L.



Εικόνα 6.6: Χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος σε υπόστρωμα σε συγκέντρωση 0,015 mg/L.



Εικόνα 6.7: Χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος σε διαλύτη τολουόλιο σε συγκέντρωση 0,015 mg/L.

6.2. Καμπύλες αναφοράς.

Για την ποσοτικοποίηση ή βαθμονόμηση του χρωματογραφικού σήματος χρησιμοποιήθηκε η τεχνική του εξωτερικού προτύπου. Συγκεκριμένα παράχθηκαν καμπύλες αναφοράς (βαθμονόμησης) για κάθε δραστική ουσία και πραγματοποιήθηκε έλεγχος γραμμικότητας του χρωματογραφικού ανιχνευτή με έγχυση πρότυπων διαλυμάτων έξι διαδοχικών συγκεντρώσεων (με εύρος συγκεντρώσεων 0,076 - 0,3 µg/ml).

Επίσης για την παρακολούθηση του φαινομένου της επίδρασης του υποστρώματος στη χρωματογραφική απόκριση για κάθε δραστική ουσία πραγματοποιήθηκε η παραγωγή της καμπύλης αναφοράς τόσο με έγχυση πρότυπων διαλυμάτων σε διαλύτη (τολουόλιο) όσο και πρότυπων διαλυμάτων σε εκχύλισμα υποστρώματος ελαιολάδου. Στον πίνακα 6.2 παρουσιάζονται για κάθε δραστική ουσία οι εξισώσεις της καμπύλης αναφοράς και ο συντελεστής συσχέτισης (R^2) τόσο για το χρωματογραφικό σήμα από εκχύσεις πρότυπων σε διαλύτη όσο και από εκχύσεις πρότυπων σε εκχύλισμα υποστρώματος.

Από τις τιμές του συντελεστή συσχέτισης προκύπτει η εξασφάλιση της γραμμικότητας του χρωματογραφικού σήματος στο υπό μελέτη εύρος των συγκεντρώσεων των φυτοπροστατευτικών ουσιών, αφού η τιμή του R^2 κυμαίνεται από 0,9927 έως 0,9996.

Από τη σύγκριση της κλίσης της καμπύλης κάθε δραστικής ουσίας που παράχθηκε σε πρότυπα διαλύματα σε εκχύλισμα υποστρώματος (a_m) με την κλίση της καμπύλης που παράχθηκε με πρότυπα διαλύματα σε διαλύτη (a_s) μπορεί να εκτιμηθεί η επίδραση ή μη του υποστρώματος στο χρωματογραφικό σήμα. Μπορεί να θεωρηθεί ότι εμφανίζεται θετική επίδραση υποστρώματος όταν ο λόγος των κλίσεων (a_m / a_s) είναι μεγαλύτερος από 1,10 ή 1,15. Βέβαια το φαινόμενο της επίδρασης του υποστρώματος μερικές φορές εξαρτάται και από τη συγκέντρωση της δραστικής ουσίας στο εγχυόμενο διάλυμα, αλλά σύμφωνα με τις χρωματογραφικές αποκρίσεις που είχαμε και θεωρώντας ικανοποιητική τη γραμμικότητα που παρουσιάζουν οι καμπύλες αναφοράς δεν φαίνεται να εμφανίζεται η περίπτωση αυτή.

Πίνακας 6.2: Χαρακτηριστικά καμπυλών αναφοράς (εξίσωση και συντελεστής γραμμικότητας R^2) που παρήχθησαν για τις δραστικές ουσίες της μελέτης από πρότυπα διαλύματα σε εκχύλισμα υποστρώματος και σε διαλύτη. Εκτίμηση της επίδρασης υποστρώματος με τον υπολογισμό του λόγου της κλίσης των καμπυλών αναφοράς σε εκχύλισμα υποστρώματος (a_m) προς την κλίση των καμπυλών αναφοράς σε διαλύτη (a_s).

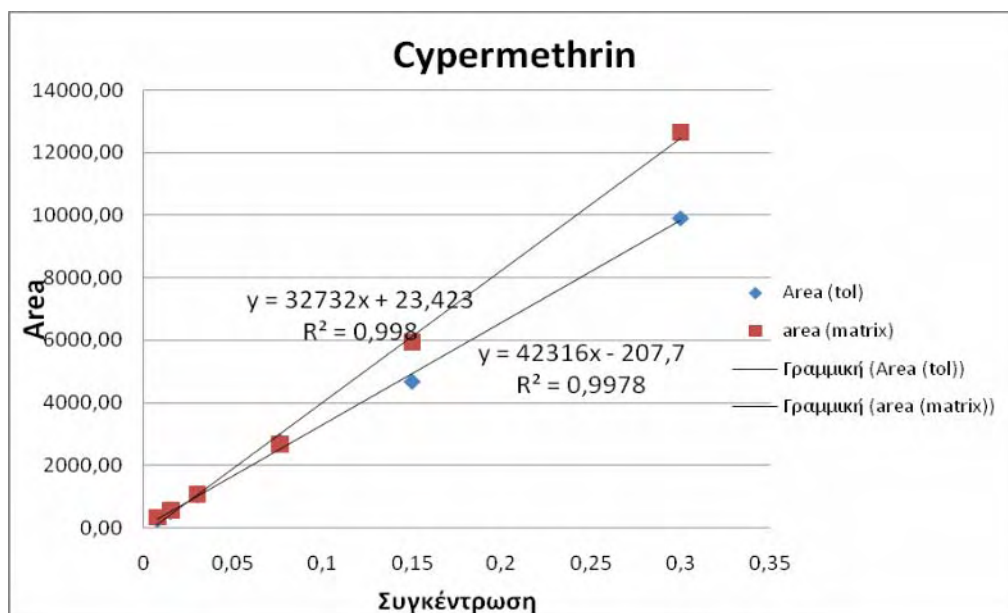
Δραστική ουσία	Πρότυπα διαλύματα σε εκχύλισμα υποστρώματος		Πρότυπα διαλύματα σε διαλύτη (τολουόλιο)		Λόγος κλίσεων – εκτίμηση επίδρασης υποστρώματος a_m / a_s
	$y = a_m x + b$	R^2	$y = a_s x + b$	R^2	
<i>α- endosulfan</i>	$y = 289272 x - 2386$	0,9970	$y = 380220 x + 2184$	0,9982	0,76
<i>β- endosulfan</i>	$y = 361177 x - 969$	0,9989	$y = 390787 x - 1499$	0,9996	0,92
<i>endosulfan - sulfate</i>	$y = 264572 x - 1060$	0,9990	$y = 273228 x - 987$	0,9993	0,97
<i>Bifenthrin</i>	$y = 72868 x - 71$	0,9995	$y = 84013 x - 62,9$	0,9994	0,87
<i>Fenpropathrin</i>	$y = 147804 x - 64$	0,9982	$y = 154657 x - 384$	0,9996	0,96
<i>L-cyhalothrin</i>	$y = 220836 x - 1938$	0,9963	$y = 208342 x - 1014$	0,9949	1,06
<i>Permethrin</i>	$y = 14364 x + 66$	0,9926	$y = 15115 x - 6,7$	0,9969	0,95
<i>Cypermethrin</i>	$y = 42316 x - 207$	0,9978	$y = 32732 x + 23$	0,9980	1,29
<i>Fenvalerate</i>	$y = 71633 x - 377$	0,9972	$y = 70498 x - 677$	0,9972	1,02
<i>Deltamethrin</i>	$y = 241628 x - 3101$	0,9940	$y = 217572 x - 3487$	0,9905	1,11

Σύμφωνα με τις τιμές του λόγου a_m / a_s παρατηρείται ότι έντονη και θετική εμφάνιση του φαινομένου της επίδρασης υποστρώματος έχουμε για τις δραστικές ουσίες *cypermethrin* και *deltamethrin*, όπου ο λόγος έχει τιμές 1,29 και 1,11, αντίστοιχα. Αρνητική επίδραση υποστρώματος παρουσιάζει το *a-endosulfan* με τιμή του λόγου κλίσης καμπυλών 0,76 και το *bifenthrin* με 0,87. Οι υπόλοιπες δραστικές ουσίες δεν παρουσιάζουν σημαντική επίδραση υποστρώματος αφού οι τιμές του λόγου των κλίσεων κυμαίνονται από 0,92 έως 1,06.

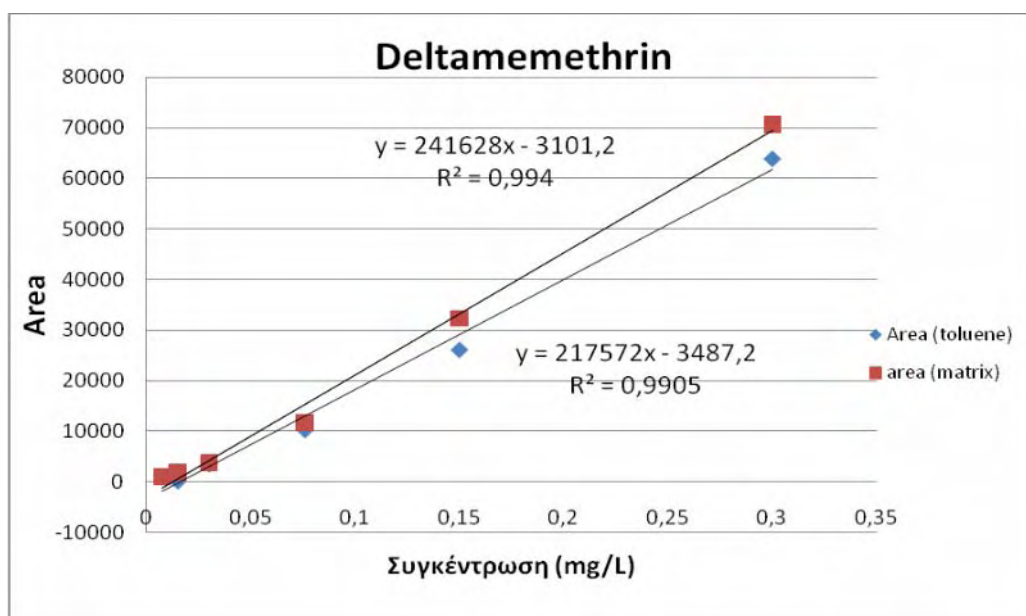
Λόγω των παρατηρούμενων επιδράσεων στην απόκριση του χρωματογραφικού ανιχνευτή, είτε αρνητικών είτε θετικών, η ποσοτικοποίηση των χρωματογραφικών κορυφών έγινε σύμφωνα με την καμπύλη αναφοράς που προκύπτει από την έκχυση πρότυπων διαλυμάτων σε εκχύλισμα υποστρώματος.

Κάτω από καθορισμένες και σταθερές πειραματικές συνθήκες η επιφάνεια (εμβαδόν) των κορυφών των χρωματογραφημάτων είναι μέτρο ποσοτικοποίησης των αντίστοιχων συστατικών στο εξεταζόμενο δείγμα. Έτσι, η συγκέντρωση των δραστικών ουσιών της μελέτης για κάθε αναλυτικό δείγμα υπολογίστηκε από την επιφάνεια των κορυφών των χρωματογραφημάτων χρησιμοποιώντας παράλληλα την καμπύλη αναφοράς για κάθε ουσία και το συντελεστή συμπύκνωσης κατά την προετοιμασία του δείγματος, που για τη ακολουθούμενη μέθοδο είναι 0,3 g ιστού / ml εκχυόμενου διαλύματος.

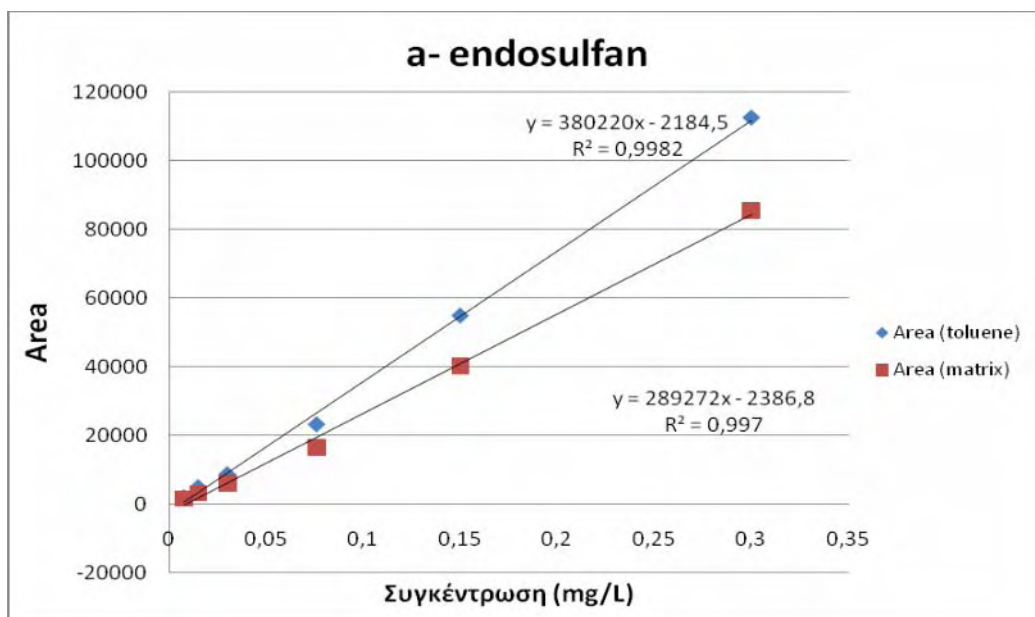
Στα Γραφήματα 6.1 – 6.6 παρουσιάζονται για ορισμένες δραστικές ουσίες ταυτόχρονα και οι καμπύλες αναφοράς τους σε εκχύλισμα υποστρώματος και σε διαλύτη και αναδεικνύεται η εμφάνιση ή όχι του φαινομένου της επίδρασης υποστρώματος. Συγκεκριμένα, στα γραφήματα για τις δραστικές ουσίες *cypermethrin* και *deltamethrin* εμφανίζεται θετική επίδραση υποστρώματος, για τις ουσίες *a-endosulfan* και *bifenthrin* αρνητική επίδραση υποστρώματος, ενώ δεν εμφανίζεται επίδραση υποστρώματος για τις ουσίες *fenvalerate* και *permethrin*.



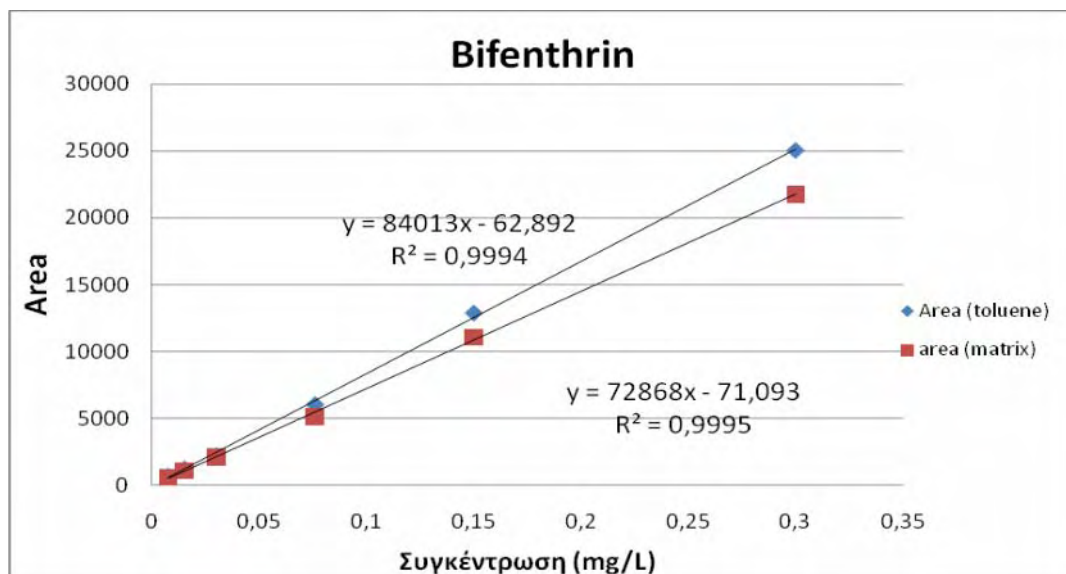
Γράφημα 6.1: Καμπύλη βαθμονόμησης για την δραστική ουσία *Cypermethrin*.



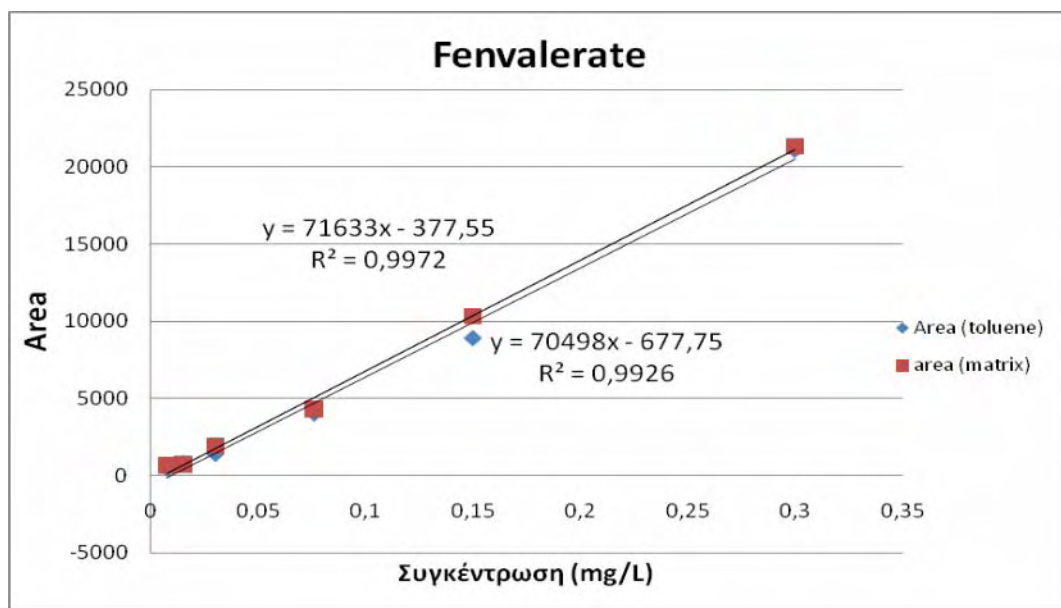
Γράφημα 6.2: Καμπύλη βαθμονόμησης για την δραστική ουσία *Deltamethrin*.



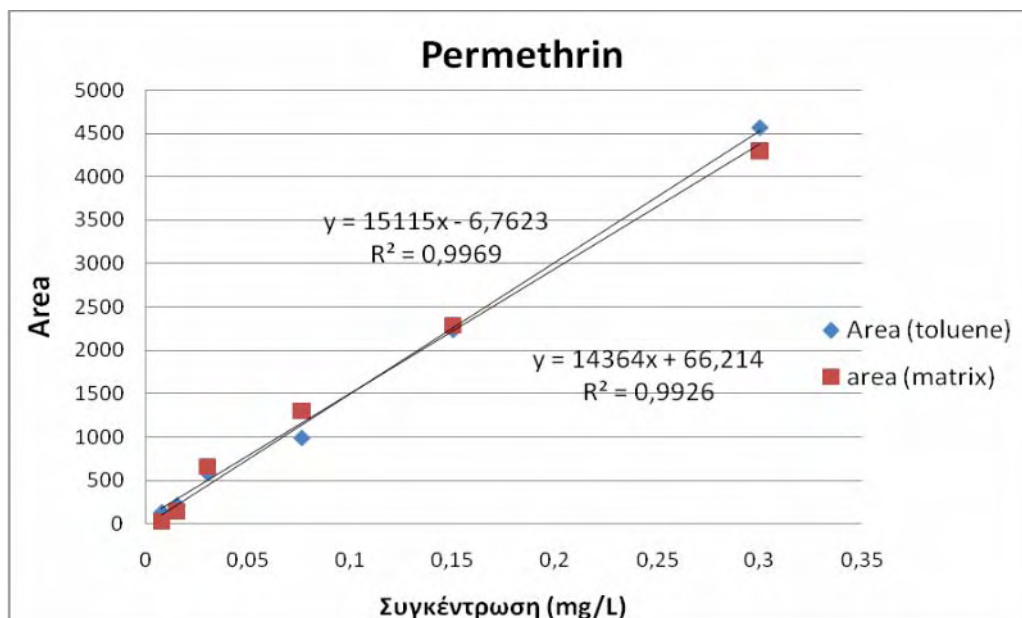
Γράφημα 6.3: Καμπύλες βαθμονόμησης για τη δραστική ουσία *a-endosulfan*.



Γράφημα 6.4: Καμπύλες βαθμονόμησης για τη δραστική ουσία *Bifenthrin*.



Γράφημα 6.5: Καμπύλες βαθμονόμησης για τη δραστική ουσία *Fenvalerate*.



Γράφημα 6.6: Καμπύλες βαθμονόμησης για τη δραστική ουσία *Permethrin*.

6.3. Αναλυτικά χαρακτηριστικά της μεθόδου, ορθότητα και ακρίβεια.

Τα πειράματα ανάκτησης πραγματοποιήθηκαν για να διαπιστωθεί και να εκτιμηθεί η ορθότητα και η ακρίβεια της αναλυτικής διαδικασίας για τον προσδιορισμό των φυτοπροστατευτικών ουσιών στο ελαιόλαδο. Καθώς τα αποτελέσματα, όσον αφορά τα ποσοστά ανάκτησης, θεωρήθηκαν μη ικανοποιητικά κατά την εφαρμογή της μεθόδου με ένα στάδιο εκχύλισης του ελαιολάδου δοκιμάστηκε και η εφαρμογή της με διπλή εκχύλιση ακολουθούμενη από παρόμοια διαδικασία ως προς τον καθαρισμό του εκχυλίσματος. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν παρουσιάζονται και συζητούνται παρακάτω.

Επίσης παρουσιάζονται και συζητούνται διάφορες διαδικασίες που εφαρμόστηκαν στον καθαρισμό του εκχυλίσματος με κριτήριο τόσο την οικονομικότερη ανάλυση με χρήση μικρότερης ποσότητας υλικών όσο και την επίτευξη ικανοποιητικού καθαρισμού που να εξασφαλίζει την ποιότητα της χρωματογραφικής ανάλυσης.

Επίσης παρουσιάζονται στοιχεία από την αποτίμηση της κάθε διαδικασίας ως προς την περιεκτικότητα τόσο του πρωτογενούς όσο και του μετά τον καθαρισμό εκχυλίσματος σε έλαιο καθόσον η απουσία ελαίου στο ενέσιμο εκχύλισμα είναι μία σημαντική παράμετρος για την καλή χρωματογραφική ανάλυση.

α) Πειράματα Ανάκτησης με τη Μέθοδος QuEChERS με ένα στάδιο εκχύλισης

Στον Πίνακα 6.3 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των πειραμάτων ανάκτησης με την μέθοδο QuEChERS με ένα στάδιο εκχύλισης σε τρία επίπεδα εμβολιασμού σε υπόστρωμα ελαιολάδου. Σε κάθε επίπεδο πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις εμβολιασμού.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προκύπτουν για τα πειράματα ανακτήσεων παρατηρείται ότι οι ανακτήσεις για όλες τις Φ.Ο. της μελέτης που προσδιορίστηκαν στον GC-ECD στο ελαιόλαδο είναι σχετικά χαμηλές και κυμαίνονται από 40,6 έως 72,3% ενώ εμφανίζουν σχετικά καλή επαναληψιμότητα, που κυμαίνεται από 2 έως 24,8 %, εκτός της περίπτωσης του *permethrin* στο επίπεδο 0,10 μg/g που εμφανίζει επαναληψιμότητα 28,2%. Τα ποσοστά των ανακτήσεων δεν διαφοροποιούνται ιδιαίτερα σε σχέση με το επίπεδο φόρτισης για καμία από τις δραστικές ουσίες της

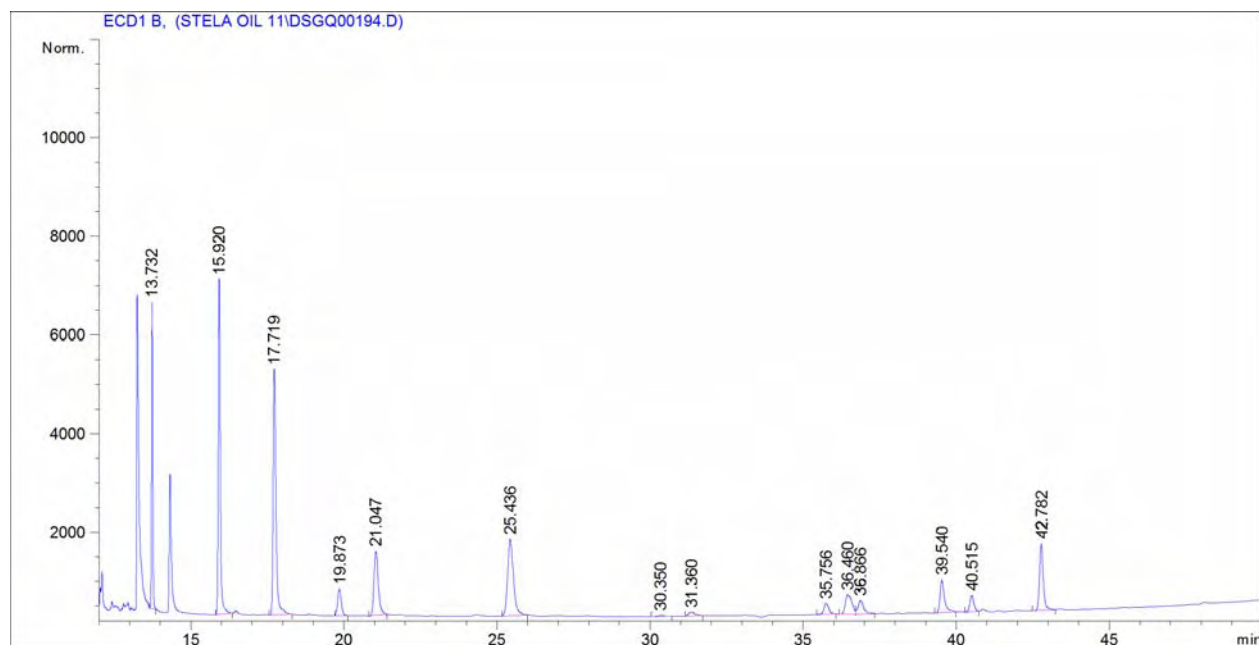
μελέτης. Επίσης, τα αποτελέσματα παρουσιάζουν καλύτερες τιμές επαναληψιμότητας για την ομάδα του *endosulfan* σε σχέση με τις πυρεθρίνες.

Πίνακας 6.3: Αποτελέσματα των πειραμάτων ανάκτησης σε διαφορετικά επίπεδα εμβολιασμού ελαιολάδου με την εφαρμογή της αναλυτικής διαδικασίας σύμφωνα με τη μέθοδο ενός σταδίου εκχύλισης και καθαρισμού QuEChERS. Παρουσιάζονται η % ανάκτηση κάθε δραστικής ουσίας και η τιμή της σχετικής τυπικής απόκλισης (ΣΤΑ) από τρεις επαναλήψεις.

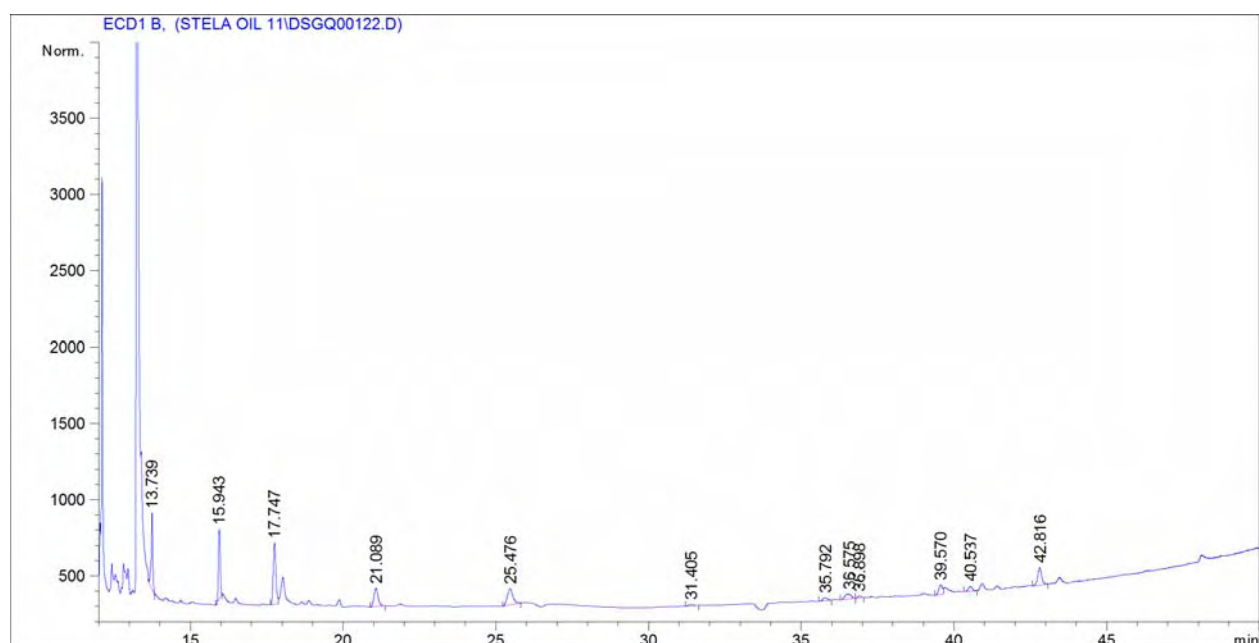
Δραστικές ουσίες	Επίπεδο εμβολιασμού					
	0,05 µg / g		0,10 µg / g		0,50 µg / g	
	ανάκτηση (%)	ΣΤΑ	ανάκτηση (%)	ΣΤΑ	ανάκτηση (%)	ΣΤΑ
<i>α - endosulfan</i>	54,0	18,9	42,4	12,3	45,8	1,94
<i>β - endosulfan</i>	51,0	10,9	51,4	10,4	56,7	5,1
<i>endosulfan - sulfate</i>	67,6	10,2	71,6	12,7	65,9	2,9
<i>Bifenthrin</i>	43,6	24,3	44,3	19,4	40,9	10,0
<i>Fenpropathrin</i>	60,5	24,8	61,3	23,4	56,6	18,3
<i>L-cyhalothrin</i>	59,9	19,2	60,4	12,1	56,4	7,5
<i>Permethrin</i>	45,8	26,6	51,7	28,2	48,4	22,9
<i>Cypermethrin</i>	53,9	21,9	72,3	23,6	52,7	23,73
<i>Fenvalerate</i>	53,0	20,3	40,6	14,8	48,3	14,9
<i>Deltamethrin</i>	46,8	19,3	48,1	15,9	44,8	23,2

Οι παρατηρούμενες σχετικά υψηλότερες τιμές της σχετικής τυπικής απόκλισης για τις πυρεθρίνες μπορούν εν μέρει να αποδοθούν στην παρουσία και ισομερών τους, που μερικά από αυτά εμφανίζουν πολύ μικρές κορυφές. Για παράδειγμα οι δραστικές ουσίες *permethrin* και *cypermethrin* εμφανίζουν τις υψηλότερες τιμές σχετικής τυπικής απόκλισης. Σημειώνεται, ότι για το *permethrin*, που η συνολική απόκριση υπολογίζεται ως άθροισμα των επιφανειών των κορυφών *permethrin I* και *II*, δεν είναι δυνατή η ποσοτικοποίηση του ενός ισομερούς (*permethrin I*) στο κατώτερο επίπεδο εμβολιασμού (0,05 µg/g), όπως φαίνεται και στο αντίστοιχο χρωματογράφημα (εικόνα 6.9).

Στις Εικόνες 6.8 και 6.9 παρουσιάζονται τα χρωματογράφημα που αντιστοιχούν στην ανάλυση εμβολιασμένου ελαιολάδου στο υψηλότερο και στο χαμηλότερο επίπεδο.



Εικόνα 6.8: Χρωματογράφημα που αντιστοιχεί σε εμβολιασμένο δείγμα ελαιόλαδου σε επίπεδο 0,5 μg/g.



Εικόνα 6.9: Χρωματογράφημα που αντιστοιχεί σε εμβολιασμένο δείγμα ελαιόλαδου στο χαμηλότερο επίπεδο (0,05 μg/g).

β) Πειράματα Ανάκτησης με τη Μέθοδο QuEChERS με διπλό στάδιο εκχύλισης

Στον Πίνακα 6.4 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των πειραμάτων ανάκτησης με την διπλή εκχύλιση σε τρία επίπεδα φόρτισης σε υπόστρωμα ελαιολάδου. Σε κάθε επίπεδο φόρτισης πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις.

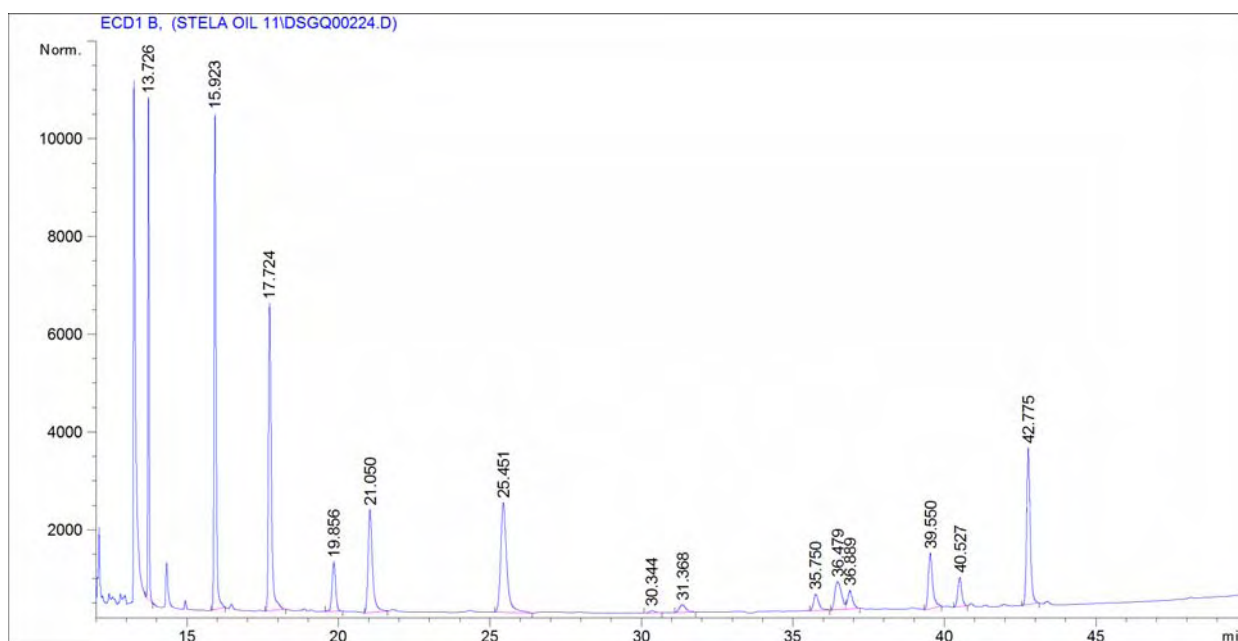
Πίνακα 6.4: Αποτελέσματα των πειραμάτων ανάκτησης σε διαφορετικά επίπεδα εμβολιασμού ελαιολάδου με την εφαρμογή της αναλυτικής διαδικασίας σύμφωνα με τη μέθοδο ενός διπλού σταδίου εκχύλισης και του καθαρισμού QuEChERS. Παρουσιάζονται η % ανάκτηση κάθε δραστικής ουσίας και η τιμή της σχετικής τυπικής απόκλισης (ΣΤΑ) από τρεις επαναλήψεις.

Δραστικές ουσίες	Επίπεδο εμβολιασμού					
	0,05 µg / g		0,10 µg / g		0,50 µg / g	
	ανάκτηση (%)	ΣΤΑ	ανάκτηση (%)	ΣΤΑ	ανάκτηση (%)	ΣΤΑ
<i>α - endosulfan</i>	80,6	10,9	67,8	11,8	69,6	4,2
<i>β - endosulfan</i>	111,2	5,7	76,4	12,7	81,7	3,9
<i>endosulfan - sulfate</i>	105,3	9,6	77,8	13,4	83,4	4,5
<i>Bifenthrin</i>	71,5	4,9	66,2	7,8	60,9	2,8
<i>Fenpropathrin</i>	117,8	3,8	72,6	4,4	84,1	3,9
<i>L-cyhalothrin</i>	72,7	3,5	70,9	13,5	87,8	2,4
<i>Permethrin</i>	113,1	27,2	68,7	16,3	58,5	20,3
<i>Cypermethrin</i>	106,3	18,7	76,7	20,1	89,9	18,3
<i>Fenvalerate</i>	75,5	19,3	70,8	26,3	71,3	15,1
<i>Deltamethrin</i>	110,6	13,4	68,1	12,8	65,9	19,3

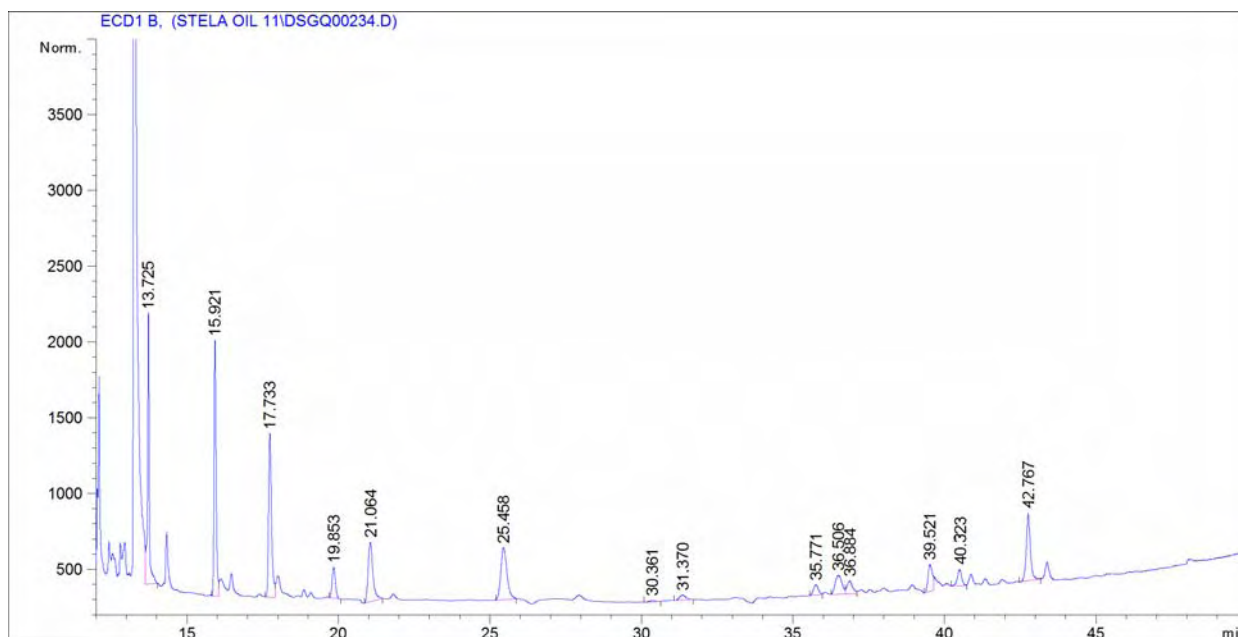
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προκύπτουν για τα πειράματα ανακτήσεων ακολουθώντας διπλή εκχύλιση παρατηρείται ότι οι ανακτήσεις για όλες τις Φ.Ο. της μελέτης κυμαίνονται από 60,9 έως 117,8%. Οι χαμηλότερες ανακτήσεις παρατηρούνται και πάλι για την ουσία *bifenthrin* (60,9 – 71,5%). Οι τιμές των ανακτήσεων είναι σχετικά υψηλότερες από αυτές που προέκυψαν για τα εμβολιασμένα δείγματα ελαιολάδου που αναλύθηκαν με μονή εκχύλιση (βλέπε Πίνακα 6.3), ενώ οι υψηλότερες τιμές εμφανίζονται στο χαμηλότερο επίπεδο εμβολιασμού.

Όσον αφορά την επαναληψιμότητα, οι τιμές της σχετικής τυπικής απόκλισης είναι <20,3%, εκτός της περίπτωσης του *permethrin* στο επίπεδο 0,05 μg/g, που εμφανίζει ΣΤΑ 27,2%, και του *fenvalerate* στο επίπεδο 0,05 μg/g, που εμφανίζει ΣΤΑ 26,3%. Τα αποτελέσματα παρουσιάζουν καλύτερες τιμές επαναληψιμότητας για την ομάδα του *endosulfan* και για τις πυρεθρίνες που δεν εμφανίζουν ισομερή. Για παράδειγμα οι δραστικές ουσίες *permethrin*, *cypermethrin* και *fenvalerate* εμφανίζουν υψηλότερες τιμές σχετικής τυπικής απόκλισης σε σχέση με τις *bifenthrin*, *fenpropathrin* και *L-cyhalothrin*.

Στις Εικόνες 6.10 και 6.11 παρουσιάζονται τα χρωματογράφημα που αντιστοιχούν στην ανάλυση εμβολιασμένου ελαιολάδου στο υψηλότερο και στο χαμηλότερο επίπεδο και που αναλύθηκαν με διπλή εκχύλιση.



Εικόνα 6.10: Χρωματογράφημα που αντιστοιχεί σε εμβολιασμένο ελαιόλαδο σε επίπεδο 0,5 μg/g και προέκυψε μετά από διπλή εκχύλιση.



Εικόνα 6.11: Χρωματογράφημα που αντιστοιχεί σε εμβολιασμένο ελαιόλαδο σε επίπεδο 0,05 µg/g και προέκυψε μετά από διπλή εκχύλιση.

γ) Άλλες πειραματικές δοκιμασίες για τη βελτιστοποίηση της εκχύλισης και του καθαρισμού

Καθώς είναι γνωστό ότι η παρουσία ελαίου, έστω και σε μικροποσότητες, στο τελικό ενέσιμο διάλυμα έχει αρνητικό επίδραση τόσο στο ίδιο το χρωματογράφημα (θόρυβος, γραμμή βάσης,) όσο και στο χρόνο ζωής της χρωματογραφικής στήλης αλλά και στην ποιότητα του χρωματογραφικού σήματος του ανιχνευτή πραγματοποιήθηκαν δοκιμές για την παρακολούθηση της περιεκτικότητας των εκχυλισμάτων σε έλαιο.

Για το λόγο αυτό μετρήθηκε η περιεκτικότητα σε έλαιο του εκχυλίσματος πριν και μετά από τη διαδικασία του καθαρισμού. Συγκεκριμένα, 2 ml εκχυλίσματος τοποθετήθηκαν σε προζυγισμένο γυάλινο φιαλίδιο, ακολούθησε εξάτμιση του διαλύτη (ακετονιτρίλιο) σε ήπιο ρεύμα αζώτου και μετά από αναμονή περίπου 30 min (για αποκατάσταση της θερμοκρασίας του φιαλιδίου και του περιεχόμενου του) ακολούθησε ζύγιση, ώστε να μετρηθεί η ποσότητα ελαίου που περιέχεται στο εκχύλισμα. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε με τρεις επαναλήψεις και

ακολουθήθηκε τόσο στη μονή όσο και στη διπλή εκχύλιση του ελαιολάδου . Σύμφωνα με τις πραγματοποιηθείσες μετρήσεις μεταφέρονται από το υπόστρωμα στο εκχύλισμα που οδηγείται για καθαρισμό 2,5mg και 12,9 mg ελαιολάδου/mL εκχυλίσματος με την απλή εκχύλιση και τη διπλή εκχύλιση, αντίστοιχα, ενώ η ποσότητα ελαίου που παραμένει μετά το στάδιο του καθαρισμού είναι μηδενική και στις δύο περιπτώσεις εκχύλισης.

Επίσης, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές για την επίδραση της μείωσης στο μισό της ποσότητας του μίγματος των προσροφητικών στερεών υλικών και αλάτων, που χρησιμοποιούνται στο στάδιο του καθαρισμού του εκχυλίσματος, στη χρωματογραφική απόκριση τόσο από την άποψη της ποιότητας του χρωματογραφικού σήματος, όσο και από την άποψη της ενίσχυσης του σήματος των κορυφών των δραστικών ουσιών της μελέτης. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε ένα επίπεδο εμβολιασμού (0,5 mg/kg) σε τρεις επαναλήψεις με εφαρμογή της εκχύλισης ενός σταδίου (μονή εκχύλιση με ακετονιτρίλιο).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα δεν προέκυψε σημαντική βελτίωση ούτε στο ποσοστό των ανακτήσεων (αν και βρέθηκαν ελαφρώς υψηλότερα) ούτε στη τιμή της επαναληψιμότητας σε σχέση με τα αποτελέσματα με ολόκληρη την ποσότητα του μίγματος των στερεών υλικών. Τα αποτελέσματα αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα ότι μπορεί να επιτευχθεί ικανοποιητικός καθαρισμός του εκχυλίσματος και με τη μισή ποσότητα του μίγματος των στερεών υλικών που περιέχονται στους τυποποιημένους πλαστικούς σωλήνες φυγοκέντρου (δηλαδή 75 mg MgSO₄, 25 mg CUPSA, 25 mg CEC18 και 25 mg CUCARB αντί 150 mg MgSO₄, 50 mg CUPSA, 50 mg CEC18 και 50 mg CUCARB).

6.4 Αναλυτικά χαρακτηριστικά της μεθόδου - Όρια Ποσοτικοποίησης

Τα όρια ποσοτικού προσδιορισμού της αναλυτικής μεθόδου για την κάθε δραστική ουσία μπορεί είτε να υπολογιστούν με βάση τα αποτελέσματα της ορθότητας της μεθόδου και αναφέρονται στην παρούσα εργασία ως **LOQ** (Limit Of Quantification), είτε να εκτιμηθούν με βάση τη σχέση σήματος προς θόρυβο στην περιοχή εμφάνισης κάθε κορυφής και αναφέρονται ως **MQL** (Method Quantification Limit).

Με βάση την πρώτη προσέγγιση η οποία είναι και η προτεινόμενη από την Ευρωπαϊκή Ένωση για τον υπολογισμό των ορίων ποσοτικοποίησης ως όριο ποσοτικού προσδιορισμού θεωρείται η συγκέντρωση στην οποία τα επίπεδα των ανακτήσεων για κάθε δραστική ουσία ήταν ικανοποιητικά. Στην περίπτωση μας και ιδιαίτερα στην περίπτωση της μονής εκχύλισης τα όρια ανάκτησης είναι σχετικά χαμηλά σε όλα τα επίπεδα φόρτισης, τόσο στο χαμηλότερο όσο και στα άλλα δύο που δοκιμάστηκαν. Στην περίπτωση της διπλής εκχύλισης τα ποσοστά των ανακτήσεων είναι βελτιωμένα και κυμαίνονται από 60,9 έως 117,8%. Τόσο στη μία όσο και στην άλλη περίπτωση οι τιμές της επαναληψιμότητας, που σε γενικές γραμμές θεωρούνται ικανοποιητικές αφού είναι χαμηλότερες από 25%, μας επιτρέπουν να θεωρήσουμε τη μέθοδο που δοκιμάσαμε ικανοποιητικής αξιοπιστίας και εφαρμόσιμη και για τα τρία επίπεδα εμβολιασμού που δοκιμάστηκαν. Με βάση τα προαναφερόμενα μπορούμε να δεχθούμε ως **όριο ποσοτικού προσδιορισμού –LOQ** - τα χαμηλότερο επίπεδο των εμβολιασμών, δηλαδή το 0,05 mg/kg (Πίνακας 6.5).

Ως **όριο ανίχνευσης** της μεθόδου (Limit of Detection- **LD**), συντηρητικά υπολογιζόμενο με βάση τη σχέση $LD = 3 \cdot \text{signal noise}$ από τα χρωματογραφήματα των χαμηλότερων συγκεντρώσεων των προτύπων σε εκχύλιση υποστρώματος και αυτά των εκχυλισμάτων των δειγμάτων του «μάρτυρα» στον αντίστοιχο χρόνο κατακράτησης της κάθε δραστικής ουσίας., θεωρήθηκαν τα <0,0001-0,0003 μg/ml για τα α - και β - *endosulfan* και το μεταβολίτη τους, τα 0,001 μg/ml για τις ουσίες *bifenthrin*, *fenpropathrin*, *L-cyhalothrin* και *deltamethrin*, και τα 0,002 – 0,005 για τα *fenvalerate*, *cypermethrin* και *permethrin*. Αυτά τα όρια που υπολογίστηκαν για το εκχυόμενο διάλυμα στο χρωματογραφικό σύστημα αντιστοιχούν σε <0,0001-0,0003 mg/kg για τα α - και β - *endosulfan* και το μεταβολίτη τους, τα 0,003 mg/kg για τις

ουσίες *bifenthrin*, *fenpropathrin*, *L-cyhalothrin* και *deltamethrin*, και τα 0,006 -0,015 mg/kg για τα *fenvalerate*, *cypermethrin* και *permethrin*.

Ως όριο προσδιορισμού της μεθόδου (Method Quantification Limit -**MQL**), συντηρητικά υπολογιζόμενο με βάση τη σχέση $MQL = 3 \cdot LD$, θεωρήθηκαν τα <0,001-0,003 mg/kg για τα α - και β - *endosulfan* και το μεταβολίτη τους, τα 0,01 mg/kg για τις ουσίες *bifenthrin*, *fenpropathrin*, *L-cyhalothrin* και *deltamethrin*, και τα 0,02 mg/kg για το *fenvalerate*, τα 0,025 mg/kg για το *cypermethrin* και τα 0,05 mg/kg *permethrin*, όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.5. Τα όρια αυτά είναι ικανοποιητικά σε σχέση με τα Ανώτατα Επιτρεπόμενα Όρια (MRLs) που έχουν θεσπισθεί για τις ουσίες της μελέτης για την ελιά και ισχύουν και για τα μεταποιημένα προϊόντα, όπως το λάδι.

Πίνακας 6.5 : Όρια ποσοτικοποίησης LOQ και MQL (mg/kg) για τις δραστικές ουσίες της αναλυτικής μεθόδου για το ελαιόλαδο και Ανώτατα Επιτρεπτά Όρια (MRL) για τις δραστικές ουσίες της μελέτης στην ελιά.

Δραστικές ουσίες	LOQ mg/kg	MQL mg/kg	MRL(mg/kg) στην ελιά
<i>α - endosulfan</i>	0,05	< 0,001	0,05
<i>β - endosulfan</i>	0,05	0,001	0,05
<i>endosulfan - sulfate</i>	0,05	0,003	0,05
<i>Bifenthrin</i>	0,05	0,01	0,05
<i>Fenpropathrin</i>	0,05	0,01	0,01
<i>L-cyhalothrin</i>	0,05	0,01	1
<i>Permethrin</i>	0,05	0,05	0,05
<i>Cypermethrin</i>	0,05	0,025	0,05
<i>Fenvalerate</i>	0,05	0,02	0,02
<i>Deltamethrin</i>	0,05	0,01	1

6.5. Εφαρμογή της μεθόδου στην ανάλυση δειγμάτων ελαιολάδου

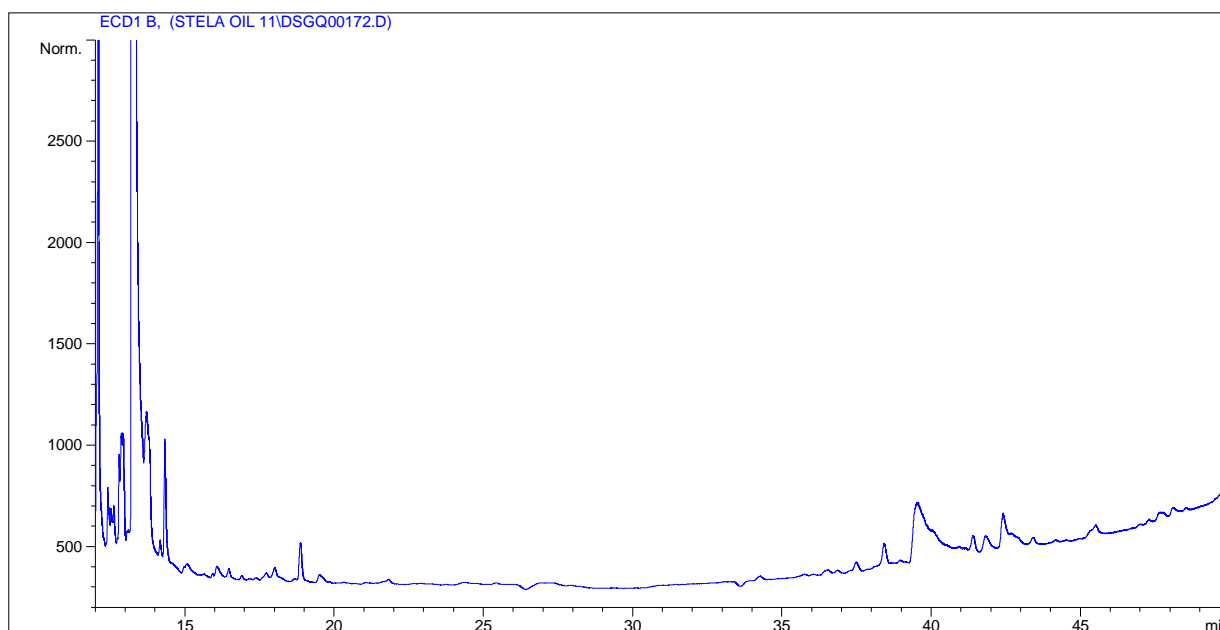
Η μέθοδος που δοκιμάστηκε και επικυρώθηκε εφαρμόστηκε στην ανάλυση πραγματικών δειγμάτων ελαιολάδου μη τυποποιημένων προϊόντων αλλά χύμα που προέρχονταν είτε από παραγωγούς είτε από ελαιοτριβεία από τις περιοχές της Μαγνησίας, της Φθιώτιδας και των Σερρών.

Από τα είκοσι επτά δείγματα που αναλύθηκαν στα είκοσι δύο δεν ανιχνεύθηκαν υπολείμματα κάποιας από τις φυτοπροστατευτικές ουσίες στόχους της μελέτης, δηλαδή στα χρωματογραφήματα των εκχυλισμάτων τους στο σύστημα GC-ECD δεν εμφανίστηκαν κορυφές στους αντίστοιχους χρόνους κατακράτησης κάθε δραστικής ουσίας (Εικόνα 6.12).

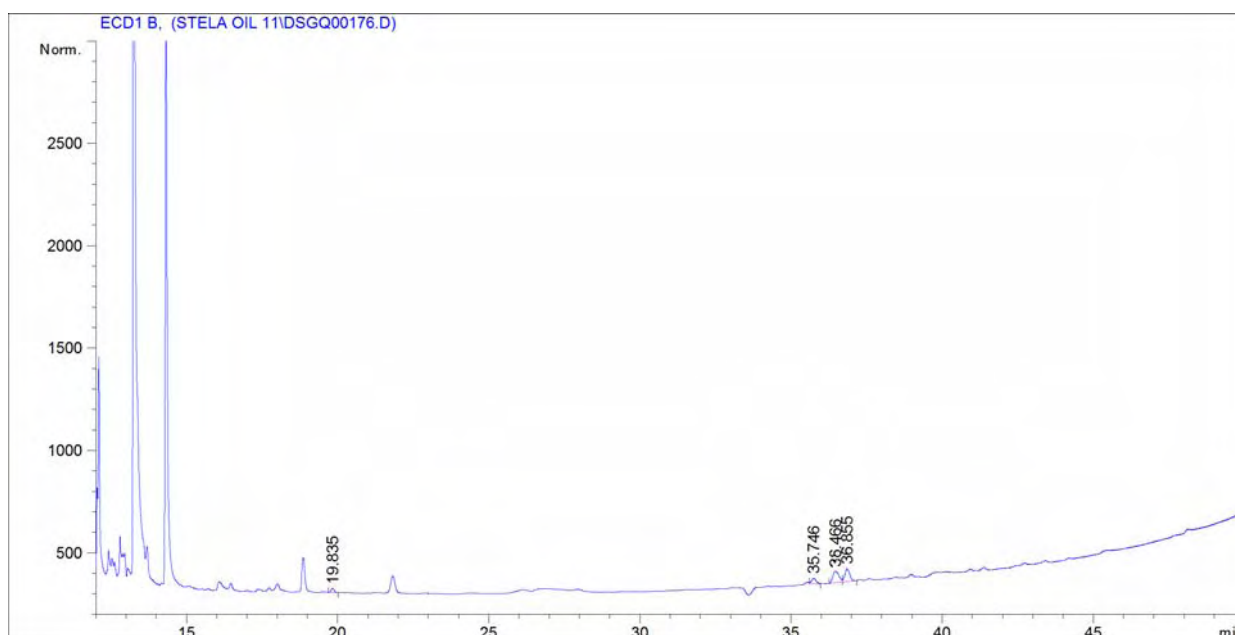
Σε τρία δείγματα ανιχνεύθηκαν υπολείμματα *cypermethrin*, δηλαδή σε επίπεδα μικρότερα από το όριο προσδιορισμού της μεθόδου – MQL. Σε δύο δείγματα προσδιορίστηκαν υπολείμματα καθώς σε ένα δείγμα βρέθηκαν υπολείμματα *bifenthrin* και *cypermethrin* (Εικόνα 6.13) και σε ένα άλλο δείγμα βρέθηκαν υπολείμματα *cypermethrin* (Εικόνα 6.14) σε συγκεντρώσεις που παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.6.

Πίνακας 6.6 : Αποτελέσματα ανάλυσης δειγμάτων ελαιολάδου για προσδιορισμό υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών ουσιών στόχων της μελέτης

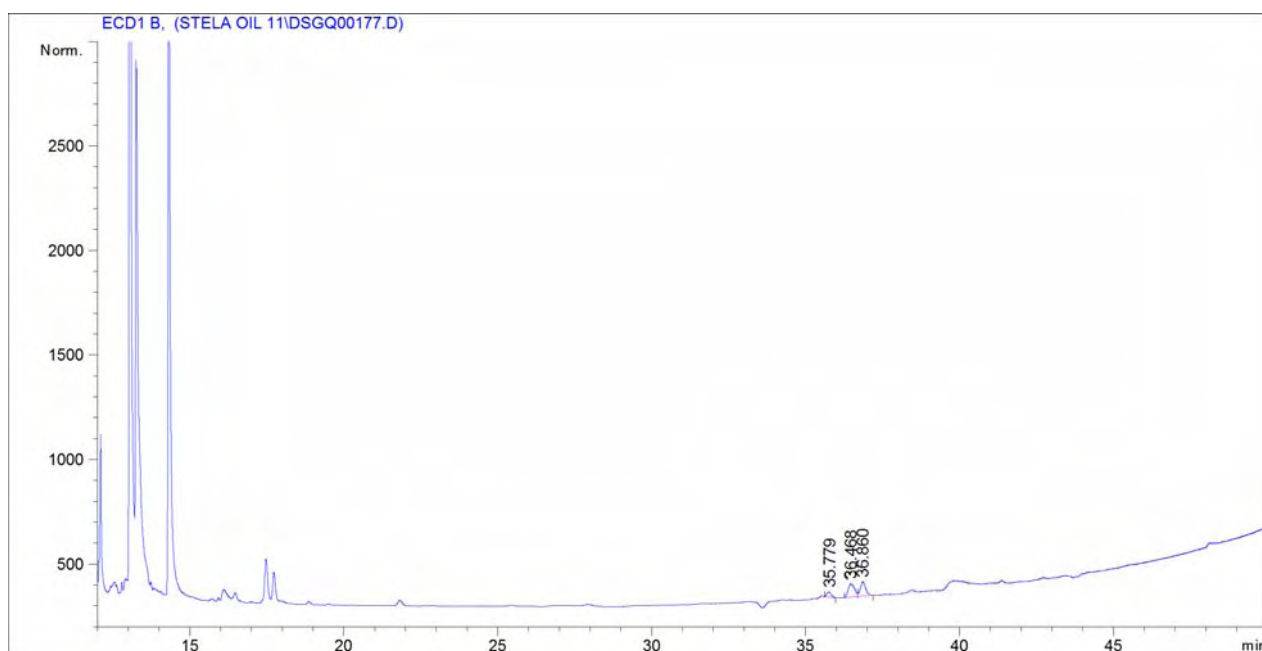
Αριθμός δείγματος	Ευρήματα -Δραστική ουσία	Ποσοτικοποίηση ευρημάτων
27	<i>Bifenthrin</i>	0,012 mg/kg
27	<i>Cypermethrin</i>	0,04 mg/kg
12	<i>Cypermethrin</i>	0,05 mg/kg
9	<i>Cypermethrin</i>	< MQL
13	<i>Cypermethrin</i>	< MQL
24	<i>Cypermethrin</i>	< MQL



Εικόνα 6.12: Χρωματογράφημα εκχυλίσματος δείγματος ελαιολάδου στο οποίο δεν ανιχνεύθηκε κανένα από τις φυτοπροστατευτικές ουσίες στόχους.



Εικόνα 6.13: Χρωματογράφημα εκχυλίσματος δείγματος ελαιολάδου στο οποίο προσδιορίστηκαν *bifenthrin* και *cypermethrin*.



Εικόνα 6.14: Χρωματογράφημα εκχλίσματος δείγματος ελαιολάδου στο οποίο προσδιορίστηκε *cypermethrin*.

Σημειώνεται ότι τα ευρήματα που αναφέρθηκαν έχουν ταυτοποιηθεί μόνο με το κριτήριο του χρόνου κατακράτησης σε ένα χρωματογραφικό σύστημα, γεγονός το οποίο δεν παρέχει ασφάλεια στην ταυτοποίηση. Βέβαια, η ιδιαίτερη μορφή της χρωματογραφικής απόκρισης για την ανίχνευση του *cypermethrin* διευκολύνει την προσέγγιση της ταυτοποίησης καθώς η απόκριση αποτελείται από τρεις κορυφές, που αντιστοιχούν στα ισομερή του. Έτσι, λοιπόν καθώς και στο άγνωστο δείγμα εμφανίζεται η ίδια μορφή απόκρισης θεωρείται ένα επιπλέον στοιχείο επιβεβαίωσης για την ταυτοποίηση της παρουσίας του *cypermethrin*.

Βέβαια, τα υπάρχοντα ευρήματα θα πρέπει να επιβεβαιωθούν και με χρήση και άλλης αναλυτικής διαδικασίας, είτε με τη χρήση μιας στήλης με διαφορετική πολικότητα (π.χ. BPX-35 ή HP 17) και με τον ίδιο ανιχνευτή, είτε με έκχυση σε σύστημα συζευγμένης χρωματογραφίας φασματογραφίας μαζών και καταγραφή του φάσματος μαζών για κάθε χρωματογραφική κορυφή.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7^ο - Συμπεράσματα

Μετά από την έκθεση και συζήτηση όλων των αποτελεσμάτων που προέκυψαν για τις δραστικές ουσίες στόχους από το χρωματογραφικό σύστημα GC-ECD στην πορεία επικύρωσης της αναλυτικής μεθοδολογίας, που βασίζεται στην εκχύλιση του ελαιολάδου με ακετονιτρίλιο και καθαρισμό του εκχυλίσματος με μίγμα στερεών προσροφητικών και αλάτων, μπορούμε να έχουμε μια πλήρη εικόνα για τη συμπεριφορά κάθε δραστική ουσίας.

Συνολικά η μελέτη αφορά 10 δραστικές ουσίες τις α - και β - *endosulfan* και το μεταβολίτη τους *endosulfan sulfate* και τις πυρεθρίνες *bifenthrin*, *fenpropathrin*, *L-cyhalothrin*, *permethrin*, *fenvalerate*, *cypermethrin* και *deltamethrin* για τον προσδιορισμό των οποίων χρησιμοποιήθηκε ο ανιχνευτής σύλληψης ηλεκτρονίων (ECD) μετά από πολύ καλό διαχωρισμό τους σε τριχοειδή χρωματογραφική στήλη τύπου 5% Phenyl-Methyl-Siloxane.

Η ποσοτικοποίηση των υπολειμμάτων των φυτοπροστατευτικών προϊόντων της μελέτης έγινε με πρότυπα διαλύματα σε εκχυλίσματα υποστρώματος ελαιολάδου, αφού παρατηρήθηκε για κάποια εξ αυτών έντονη επίδραση υποστρώματος, όπως για παράδειγμα θετική επίδραση για το *cypermethrin* και *deltamethrin*, (129% και 111%, αντίστοιχα) και αρνητική επίδραση για τα *a-endosulfan* και *bifenthrin* (76% και 87%, αντίστοιχα).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των πειραμάτων ανάκτησης οι δραστικές ουσίες παρουσίασαν σχετικά χαμηλά ποσοστά ανακτήσεων (41–72%) στην περίπτωση της μονής εκχύλισης ελαιολάδου με ακετονιτρίλιο και σχετικά ικανοποιητικά (61-117 %) στην περίπτωση της διπλής εκχύλισης του υποστρώματος με ακετονιτρίλιο), ενώ παρουσίασαν ικανοποιητικά χαρακτηριστικά στο σύνολό τους ως προς την ακρίβεια (επαναληψιμότητα <25%, με ελάχιστες εξαιρέσεις) και στις δύο περιπτώσεις εκχύλισης. Με δεδομένη την ικανοποιητική ακρίβεια που παρατηρήθηκε, μπορεί να θεωρηθεί ότι και η μέθοδος με όποιον από τους δύο τρόπους εκχύλισης και αν πραγματοποιηθεί δίνει αξιόπιστα αποτελέσματα. Στην περίπτωση της εκχύλισης με μονό στάδιο προτείνεται η χρήση κάποιου συντελεστή διόρθωσης για την πιστότερη απόδοση των αποτελεσμάτων. Όσον αφορά την ακρίβεια, οι υψηλότερες τιμές της επαναληψιμότητας παρατηρήθηκαν για αυτές τις ουσίες από τις πυρεθρίνες

που στο χρωματογραφικό τους σήμα παρουσιάζονται με δύο ή τρεις κορυφές και που αντιστοιχούν στα στερεοϊσομερή τους (*permethrin*, *fenvalerate*, *cypermethrin*).

Τα όρια ποσοτικού προσδιορισμού που επιτεύχθηκαν υπολογιζόμενα με βάση το θόρυβο των χρωματογραφημάτων κυμαίνονται από 0,01 έως 0,05 mg/kg για τις πυρεθρίνες και από 0,001 έως 0,003 mg/kg για τα endosulfan, ενώ υπολογιζόμενα με βάση το χαμηλότερο επίπεδο φόρτισης με ικανοποιητική ορθότητα και ακρίβεια είναι στο 0,05 mg/kg για όλες τις ουσίες στόχους της μελέτης. Οι τιμές αυτές των ορίων ποσοτικοποίησης συγκρινόμενες με τα θεσπισμένα από την Ευρωπαϊκή Ένωση και την Ελλάδα Ανώτατα Επιτρεπτά Όρια (MRLs) στην ελιά θεωρούνται ικανοποιητικές και μπορεί να επιτευχθεί ο προσδιορισμός των υπολειμμάτων όλων των φυτοπροστατευτικών ουσιών στόχων στο ελαιόλαδο.

Από την ανάλυση είκοσι επτά δειγμάτων μη τυποποιημένου ελαιολάδου από διάφορες περιοχές προέκυψε η μη ανίχνευση κάποιας από τις φυτοπροστατευτικές ουσίες στόχων σε είκοσι δύο δείγματα. Από τα υπόλοιπα πέντε δείγματα στα τρία ανιχνεύτηκε η δραστική ουσία *cypermethrin* σε συγκεντρώσεις μικρότερες από τα όρια ποσοτικοποίησης, σε ένα βρέθηκε η ουσία *cypermethrin* σε συγκέντρωση 0.05 mg/kg, ενώ στο άλλο δείγμα βρέθηκαν οι ουσίες *bifenthrin* και *cypermethrin* σε συγκεντρώσεις 0,012 mg/kg και 0,04 mg/kg , αντίστοιχα.

Μετά την εμπειρία που αποκτήθηκε και τα ενθαρρυντικά αναλυτικά χαρακτηριστικά που επιβεβαιώθηκαν για την αναλυτική μέθοδο που εφαρμόστηκε στο απώτερο μέλλον μπορούν να προγραμματιστούν ερευνητικές δραστηριότητες σε δύο άξονες. Ο πρώτος άξονας έχει αναλυτικό χαρακτήρα και σχετίζεται με την ενσωμάτωση και άλλων εντομοκτόνων δραστικών ουσιών που χρησιμοποιούνται στη φυτοπροστασία της ελιάς, όπως ουσίες της ομάδας της σπινουσίνης. Οι ουσίες αυτές απαιτούν βέβαια τη χρήση υγρής χρωματογραφίας για τον προσδιορισμό τους αλλά θα πρέπει να δοκιμαστεί η εφαρμογή κοινών σταδίων προετοιμασίας του δείγματος (εκχύλιση και καθαρισμός) και ακολούθως διαφορετικός χειρισμός και ανάλυση του τελικού εκχυλίσματος. Ο άλλος άξονας σχετίζεται με την παρακολούθηση των υπολειμμάτων των παραπάνω παλιών και νέων εντομοκτόνων ουσιών στην πορεία της ελαιοποίησης της ελιάς ή ακόμη και στη μεταποίηση της.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ahmed E., 2001. Analysis of pesticides and their metabolites in food and drinks. *TRAC – Trend. Anal. Chem.*, 20 (11): 649-661.
- Αμβράζη Γ. Ε., 2007. Ανάπτυξη Μεθοδολογίας και εφαρμογή της στον προσδιορισμό επιλεγμένων φυτοφαρμάκων στην ελιά και στο ελαιόλαδο κατά την διαδικασία παραγωγής του. Διδακτορική Διατριβή. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Ιωαννίνων, Ιωάννινα.
- E.G. Amvrazi and N.G. Tsiropoulos. "Application of single-drop microextraction coupled with gas chromatography for the determination of multiclass pesticides in vegetables with nitrogen phosphorus and electron capture detection", *J. Chromatogr. A* , 1216, 2789-2797, (2009).
- E.G. Amvrazi, A.T. Papadi-Psyllou, N.G. Tsiropoulos. "Pesticide enrichment factors and matrix effects on the determination of multiclass pesticides in tomato samples by single-drop microextraction (SDME) coupled with gas chromatography and comparison study between SDME and acetone-partition extraction procedure", *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 90, 245-259, (2010).
- Balayiannis G., Anastassiadis M., Anagnostopoulos E. (2009). Endosulfan in Wind-Transported African Dust Depositions in Crete. *Bull Environ Contam Toxicol* 92(2009) 83:780-782.
- Barker S. A., 2000. Matrix solid-phase dispersion. *J. Chromatogr. A*, 885: 1115.
- Bartolini Giorgio and Petruccelli Raffaella 2002. Classification, origin, diffusion and history of the olive. Food and Agricultural organization of the united nations. Rome
- Beaufy G. (2002) The environmental impact of the olive oil production in the European Union, European forum on Nature conservation and pastoralism. www.europa.eu.int/comm/environment/agriculture/pdf/oliveoil.pdf.
- E. Ballesteros, A. Garcia Sanchez, N. Ramos Martos. Simultaneous multi determination of residues of pesticides and polycyclic aromatic hydrocarbons in

- olive and olive-pomace oils by gas chromatography/tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* , 1111 (2006) 89–96.
- Sami Barrek , Olivier Paise, Marie-Florence, Grenier-Loustalot. Determination of residual pesticides in olive oil by GC–MS and HPLC–MS after extraction by size-exclusion chromatography. *Anal Bioanal Chem* (2003) 376 : 355–359
- Bernal, Normal J., Jimenez J., Rivera M. Matrix effects in the determination of acaricides and fungicides in must by gas chromatography with electron – capture and nitrogen – phosphorus detection. *J. Chromatogr.* (1997), 7778, 111-117.
- Γαμβριάς Χρήστος 1998. Γεωργική Εντομολογία – Εντομολογικοί Εχθροί Ελιάς. Εκδόσεις Αθ. Σταμούλης. Αθήνα.
- Paolo Cabras, Alberto Anglont, Marinella Mehs, Elizabeth V. Minelli, Filippo M. Simplefied multiresidue method for the determination of organophosphorus insecticides in olive oil. *J. Chromatogr. A*, 761 (1997) 327-331.
- Camel V., 1998. Supercritical fluid extraction as a useful method for pesticides determination. *J. Chromatogr. A*, 26: 99-111.
- Camel V., 2000. Microwave-assisted solvent extraction of environmental samples. *TRAC – Trend. Anal. Chem.*, 19(4): 229-248.
- Sara C. Cunha, Steven J Lehotay, Katerina Mastovska, Jos O. Fernandes, Maria Beatriz P.P. Oliveira. Evaluation of the QuEChers sample preparation approach for the analysis of pesticide residues in olives. *J Sep. Sci.* 2007, 30, 620-632.
- Dean R., 1998. Extraction methods for environmental analysis. Edited by John Wiley & Sons, New York.
- Dugo G., Bella G., Torre L., Saitta M. Rapid GC-FPD determination of organophosphorus pesticide residues in Sicilian and Apulian olive oil. *Food Control* 16 (2006) 435-438.
- EURACHEM Guide, 1998. The Fitness for purpose of analytical methods. A laboratory guide to method validation and related topics.
- Ζιώγας & Μαρκόγλου, 2007. Γεωργική Φαρμακολογία. Αθήνα.

- Θερίος Ν. Ιωάννης 2005. Ελαιοκομία. Εκδόσεις Γαρταγάνη. Θεσσαλονίκη.
- FAO, 1981. Guidelines on pesticide residues trials to provide data for the registration of pesticides and the establishment of maximum residue limits. Plant protection bulletin. Vol. 29, 1981.
- Carmen Ferrer, M. Jose Gomez, Juan F. Garcia-Reyes, Imma Ferrer, E. Michael Thurman, Amadeo R. Fernandez-Alba Determination of pesticide residues in olives and olive oil by matrix solid-phase dispersion followed by gas chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1069 (2005) 183–194
- Fooks Richard 1995. Το βιβλίο της ελιάς. Εκδόσεις Ψύχαλος. Αθήνα.
- Edwar Fuentes, Marva E. Baez, Adalv Quinones Suitability of microwave-assisted extraction coupled with solid-phase extraction for organophosphorus pesticide determination in olive oil. *J. Chromatogr. A*, 1207 (2008) 38–45.
- Edwar Fuentes, Marva E. Baez, Juan Dvaz Microwave-assisted extraction at atmospheric pressure coupled to different clean-up methods for the determination of organophosphorus pesticides in olive and avocado oil. *J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 8859–8866.
- Bienvenida Gilbert-Lopez, Juan F. Garcva-Reyes, Antonio Molina-Dvaz. Sample treatment and determination of pesticide residues in fattyvegetable matrices: A review. *Talanta* 79 (2009) 109–128.
- Maria Guardia-Rubio, Maria Luisa Fernandez-De Cordova, Maria Jose Ayora-Canada, Antonio Ruiz-Medina. Simplified pesticide multiresidue analysis in virgin olive oil by gas chromatography with thermoionic specific, electron capture and mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A*, 1108 (2006) 231-239.
- M. Guardia-Rubio, R.M. Marchal-Lopez b, M. J. Ayora-Canada, Ruiz-Medina. Determination of pesticides in olives by gas chromatography using different detection systems. *J. Chromatogr. A*, 1145 (2007) 195-203

- Hiskia Anastasia, Atmajidou Markela, Tsipi Despina. Determination of organophosphorus pesticide residues in Greek virgin olive oil by capillary gas chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 1988. 46. 570-574.
- Καλαμαράκη Ε. Α. και Μαρκάκης Κ., 2004. Οι επιπτώσεις από την επαναξιολόγηση δραστικών ουσιών μυκητοκτόνων στα πλαίσια της Ε.Ε. Πρακτικά 4^{ης} Πανελλήνιας συνάντησης φυτοπροστασίας: «Η φυτοπροστασία σήμερα». σελ 155-157 κ' 161-162.
- Καρπούζας Γ., 2003. Γεωργική Φαρμακολογία. Πανεπιστημιακές παραδόσεις, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας, Βόλος.
- Λαμπή Ε., 2003. Χημική μετρολογία Ιχνηλασιμότητα στις χημικές αναλύσεις. Γενικό Χημείο του Κράτους. Αθήνα.
- Dimitra A. Lampropoulou & Triantafyllos A. Albanis. Methods of sample preparation for determination of pesticide residues in food matrices by chromatography-mass spectrometry-based techniques: a review. *Anal Bioanal Chem* (2007) 389 :1663-1683.
- Λέντζα – Ρίζου Χ., 1994. Υπολείμματα γεωργικών φαρμάκων στα αγροτικά προϊόντα.
- Λύκας Δ., 2009. Ανάπτυξη μεθόδων ανάλυσης και παρακολούθησης υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων στην αμπελοκαλλιέργεια και στα προϊόντα οινοποίησης. Διδακτορική Διατριβή. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας. Βόλος.
- Ch.Lentza-Rizos, Monitoring pesticides residues in olive products: organophosphorus insecticides in olives and oil. *J. AOAC Int.* Vol.77. no 5. 1994.
- Ch.Lentza-Rizos, E. J. Avramidesa, Low temperature clean-up method for the determination of organophosphorus insecticides in olive oil. *J. Chromatogr. A*, 912 (2001) 135-142.
- Ch.Lentza-Rizos, E. J. Avramidesa, E. Visib. Determination of residues of endosulfan and 5 pyrethroid insecticides in virgin olive oil using gas chromatography with ECD, *J. Chromatogr. A*, 921(2001) 297-304.

- S. Lopez-Feria , S. Cardenas, M. Valcarcel. One step carbon nanotubes-based solid-phase extraction for the gas chromatographic–mass spectrometric multiclass pesticide control in virgin olive oils. *J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 7346–7350
- Μηλιάδης Γ. 2001. Μεθοδολογία και προτεραιότητες στην εργαστηριακή παρακολούθηση των περιβαλλοντικών επιπτώσεων από την χρήση φυτοπροστατευτικών προϊόντων. Σεμινάριο από το ανθρώπινο δίκτυο διάδοσης της Ε&Τ Γνώσης – ΕΠΕΤ ΙΙ, 98 ΑΔ60. Αθήνα.
- Μπρούμας Θ., Πρακτικά 2^{ης} Πανελληνίας συνάντησης φυτοπροστασίας, Λάρισα 1998.
- Masque N., Marce M., Borrul F. 1998. New polymeric and other type of sorbents for solid-phase extractin of polar organic micropollutants from environmental water. *TrAC Trend. Anal. Chem.*, 17: 384.
- Najmanova K., Rozmarynowska D., Duteau M., Garcia L. Improviing the environment thought CAP reform, with a special focus on olive oil production. *Center for Environmental Studies*. June 2003.
- Nastreddine L., Parent-Massin D., 2002. Food contamination by metals and pesticides in the European Union. Should we worry? *Toxicology Letters*, 127: 29-41.
- Παπαδή-Ψύλλου Α. 2009. Επικύρωση και αξιολόγηση αναλυτικών μεθόδων προσδιορισμού υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών ουσιών νέας γενιάς σε γεωργικά προϊόντα με χρήση αέριας χρωματογραφίας.
- Παπαδόπουλος Β. 2010. Ανάπτυξη και εφαρμογή μεθοδολογίας ελέγχου οργανικών τοξικών ενώσεων σε ψάρια. Διδακτορική Διατριβή. Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων. Αγρίνιο.
- Ποντίκης Α. Κωνσταντίνος 2000. Ειδική Δεντροκομία – Ελαιοκομία. Εκδόσεις Αθ. Σταμούλης. Αθήνα.
- Pensado L., Casais C, Mejuto C., Cela R. 2005. Application of matrix solid-phase dispersion in the analysis of priority polycyclic aromatic hydrocardons in fish samples. *J. Chromatogr. A*, 1077:103.

- Pichon V., 2000. Solid-phase extraction for multiresidue analysis of organic contaminants in water. *J. Chromatogr. A*, 885: 195.
- Tanaka T., Hori T., Asada T., Oikawa K., Kawata K., 2007. Simple one-step extraction and cleanup by pressurized liquid extraction for GC-MS determination of pesticides in green leafy vegetables. *J. Chromatogr. A*, 1175: 181-186.
- Τζανακάκης Ε.Μ. – Κατσόγιαννος Ι.Β. 2003. Έντομα καρποφόρων δέντρων και αμπέλου. Εκδόσεις Αγρότυπος. Αθήνα.
- Tsatsakis A., Tsakiris I., Tzatzarakis M., Agourakis Z., Tutudaki M., Alegakis A. Three-year study of fenthion and demethoate pesticides in olive oil from organic and conventional cultivation. *Food Addit. Contam.* 2003, Vol. 20, No 6, 553-559.
- Tsoutsis C., Konstantinou I., Hela D., Albanis T. Screening method for organophosphorus insecticides and their metabolites in olive oil samples based on headspace solid-phase microextraction coupled with gas chromatography. *Anal. Chim. Acta* 573-574 (2006) 216-222.
- Vreuls J., Swen R., Goudriaan V., Kerkhoff M., Jongenotter G., Brinkman U. Automated on-line gel permeation chromatography-gas chromatography for the determination of organophosphorus pesticides in olive oil. *J. Chromatogr. A*, 750 (1996) 275-286.
- Codex Alimentarius Commission-FAO/WHO, CL 2006/20, 2006
- oliveoil.eu | the world of european olive oil © 2007. <http://oliveoil.eu/index.php>
- USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 22 (2009)
- INTERNATIONAL OLIVE OIL COUNCIL (November 2010)
- www.quechers.com
- www.elais.gr
- www.oliveandoil.com
- www.minagric.gr