

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ - ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ & ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ:

ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΥΔΑΤΩΝ &

ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ



**Αναλυτικές τεχνικές ποσοτικοποίησης και ταυτοποίησης φυτοφαρμάκων σε
δείγματα φυτικής προέλευσης**

Διπλωματική εργασία

**Ευστάθιος, Βασιλείου Στριφτάρας
Γεωπόνος, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης**

Λάρισα, 2014

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ - ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ & ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ:

ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΥΔΑΤΩΝ &

ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ



**Αναλυτικές τεχνικές ποσοτικοποίησης και ταυτοποίησης φυτοφαρμάκων σε
δείγματα φυτικής προέλευσης**

Διπλωματική εργασία

**Ευστάθιος, Βασιλείου Στριφτάρας
Γεωπόνος, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης**

Λάρισα, 2014

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. ΤΣΙΡΟΠΟΥΛΟΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ (Επιβλέπων)

Καθηγητής , Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος
,Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (Επιβλέπων).

2. ΤΣΑΚΑΛΩΦ ΑΝΔΡΕΑΣ

Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

3. ΛΙΑΠΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ

Ερευνητής Α, Τμήμα Ελέγχου Γεωργικών Φαρμάκων & Φυτοφαρμακευτικής,
Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο.

«Αναλυτικές τεχνικές ποσοτικοποίησης και ταυτοποίησης φυτοφαρμάκων σε δείγματα φυτικής προέλευσης»

Περίληψη

Στην παρούσα εργασία γίνεται βιβλιογραφική επισκόπηση και αναφορά της τελευταίας δεκαετίας 2005-2014 σχετικά με την ανάπτυξη αναλυτικών μεθόδων που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων σε δείγματα φυτικής προέλευσης. Στο πρώτο κεφάλαιο περιγράφονται οι μέθοδοι προκατεργασίας-προετοιμασίας των δειγμάτων που απαιτούνται για την εκχύλιση και την απομόνωση των αναλυτών από τα πολύπλοκα φυτικά υποστρώματα. Οι μέθοδοι προετοιμασίας μαζί με τη δειγματοληψία είναι, ίσως, και τα πιο κρίσιμα στάδια για την ανάλυση ενός δείγματος καθώς τα περισσότερα και σημαντικότερα από τα τυχαία και συστηματικά σφάλματα εμφανίζονται σε αυτό το στάδιο. Στο δεύτερο κεφάλαιο περιγράφονται οι απαιτήσεις για την επικύρωση μιας αναλυτικής μεθόδου, οι οποίες είναι θεσμοθετημένες από κοινοτικούς κανονισμούς. Στο τρίτο κεφάλαιο περιγράφονται οι τεχνικές που χρησιμοποιούνταν ευρέως στην ανάλυση φυτοφαρμάκων πριν την εισαγωγή της φασματομετρίας μαζών. Στο τέταρτο κεφάλαιο γίνεται βιβλιογραφική ανασκόπηση για την ανάπτυξη αναλυτικών τεχνικών της τελευταίας δεκαετίας, με αναφορά κυρίως στις τεχνικές συζευγμένης υγρής ή αεριοχρωματογραφίας με φασματομερία μαζών, που χρησιμοποιούνται σε πολύ-υπολειμματικές μεθόδους για προσδιορισμό μεγάλου αριθμού δραστικών ουσιών, είναι ευαίσθητες, με μεγάλη ειδικότητα και ικανοποιούν την ορθότητα και ακρίβεια που απαιτούν οι αναλυτικές μέθοδοι προσδιορισμού υπολειμμάτων. Γίνεται αναφορά με στοιχεία σχετικά με τις εφαρμοζόμενες τεχνικές εκχύλισης, τη διαδικασία εισαγωγής του δείγματος (μόνο στην αεριοχρωματογραφία), τον τύπο του ιονισμού στη φασματομετρία μαζών, τον τύπο του αναλυτή μάζας, την ταυτοποίηση των ευρυμάτων καθώς και τα όρια προσδιορισμού. Στο τέταρτο κεφάλαιο συχνά χρησιμοποιείται η έκφραση «επικύρωση/ασαν» με σκοπό να αποφευχθούν οι αναφορές σε όλα τα ποιοτικά κριτήρια που απαιτούν οι νομοθεσίες και οι ευρωπαϊκοί οδηγοί (SANCO) καθώς είναι αυτονόητο ότι μια μέθοδος που δεν τα τηρεί δεν γίνεται αποδεκτή. Στο πέμπτο κεφάλαιο αναπτύσσεται το αντικείμενο της οικονομικής αξιολόγησης των πολυ-υπολειμματικών μεθόδων. Εκτός από συγκεκριμένες αναφορές, για ευνόητους λόγους δεν γίνεται ιδιαίτερη αναφορά στις δραστικές ουσίες που αναλύονται καθώς η πλειονότητα των μεθόδων που αναφέρονται είναι «πολυ-υπολειμματικές μέθοδοι» και ο αριθμός των φυτοφαρμάκων ορισμένες φορές ξεπερνά και τα 200 ανά μέθοδο. Οι τεχνικές εκχύλισης αναφέρονται απευθείας με την ονομασία τους στη διεθνή ορολογία.

Η εργασία δομείται βάση της αναζήτησης διεθνούς βιβλιογραφίας μέσω των μηχανών αναζήτησης: Scopus.com, scholar.google.gr, ncbi.nlm.nih.gov καθώς και μεμονωμένης έρευνας σε σελίδες επιστημονικών περιοδικών ή άλλων συγγραμμάτων μέσα από το δίκτυο της βιβλιοθήκης του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Λέξεις κλειδιά Pesticides, LC-MS/MS, GC-MS/MS, Liquid chromatography, Gas chromatography, mass spectrometry, Time of flight mass spectrometry, multi-pesticides analysis, Extraction methods, method validation, Quechers, Liquid-liquid extraction, Solid phase extraction, Direct immersion single-drop microextraction, Headspace single-drop microextraction, Hollow-fiber microextraction, Dispersive

liquid liquid microextraction, Directly-suspended droplet microextraction, Solid phase extraction, Molecularly-imprinted stir-bar sorptive extraction, Microwave-assisted extraction, Ultrasound-assisted extraction, Super critical fluid extraction , Fruits, vegetables, feeds, wines

Abstract

"Analytical techniques for quantification and identification of pesticides in samples of plant origin"

In this thesis, take place a review of the decade 2005-2014 for the development of analytical methods used for the identification and quantification of pesticides in samples of plant origin. At the first chapter are described the methods of samples preparation which are required for the extraction and isolation of analytes from the complex plant matrix. The preparation methods as well as sampling are the most critical step in the analysis as the most of random and systematic errors occur in this phase. The second chapter describes the requirements for the validation of an analytical method, which is institutionalized and legally bestowed both by EU regulations and national legislation. The third chapter describes the techniques being used widely for the analysis of pesticides before the introduction of mass spectroscopy. The fourth chapter is a literature review on the development of analytical techniques of the last decade in particular to techniques coupled liquid or gas chromatography with mass spectrometry, which are used in multi- residue methods for identifying a large number of active substances. These techniques are sensitive, with high specificity, accuracy and precision. Reference is made to the technical elements that have to do : 1) extraction method , 2) the type of ionization which is being used from mass spectroscopy analyzers , 3) the type of mass analyzer , 4) The limits of quantification and identification, 5) The process of introducing the sample (only in gas chromatography). In the fourth chapter often uses the expression 'validation' in order to avoid references to all the quality criteria required by legislation and European directives as it is obvious that a method that does not comply is not accepted .In fifth chapter an economic evaluation of the multy-residues methods is taking place for the most frequently technique used. Except from specific references, for obvious reasons, it is not refers specifically to the pesticides analyzed for the reason that the majority of the methods are "multi - residues" and the number of pesticides, sometimes, exceeds 200 per method. The extraction techniques mentioned directly by name in international terminology.

This thesis based on the search in specific search machines, *thus: Scopous.com, scholar.google.gr, ncbi.nlm.nih.gov* or in official web sites of International journals via the library's network of University of Thessaly.

Key words: Pesticides, LC-MS/MS, GC-MS/MS, Liquid chromatography, Gas chromatography, mass spectrometry, Time of flight mass spectrometry, multi-pesticides analysis, Extraction methods, method validation, Quechers, Liquid-liquid extraction, Solid phase extraction, Direct immersion single-drop microextraction, Headspace single-drop microextraction, Hollow-fiber microextraction, Dispersive liquid liquid microextraction, Directly-suspended droplet microextraction, Solid phase extraction, Molecularly-imprinted stir-bar sorptive extraction, Microwave-assisted extraction, Ultrasound-assisted extraction, Super critical fluid extraction , Fruits, vegetables, feeds, wines

Στην εργασία εμφανίζονται οι παρακάτω ορισμοί (εμφάνιση κατά αλφαβητική σειρά)

Συντόμευση, (Διεθνής Ορολογία)

APCI(atmospheric pressure chemical ionization)

APPI(atmospheric pressure photoionization)

CCα

CCβ

Directly-suspended droplet microextraction

Dispersive liquid liquid microextraction (DLLME)

EI-(Electron impact)

ESI(Electrospray ionization)

GC (Gas Chromatography)

GC/ MS-MS(Gas Chromatography/ Mass spectrometry-
Mass spectrometry)

Hollow fiber based LPME (HF-LPME)

HPLC (High performance liquid chromatography)

HPLC για συντομία LC/MS-MS (High performance liquid
chromatography/ Mass

Liquid phase microextraction (LPME)

Liquid-liquid extraction (LLE)

LOD(Limit of detection)

LOQ(Lower limit of quantitation)

Microwave-assisted extraction- (MAE)

Molecularly-imprinted stir-bar sorptive extraction (MI-
SBSE)

MRLs (Maximum residue limits)

Single drop microextraction (SDME)

Solid phase extraction (SPE)

Solidification of floating drop microextraction (SFDME)

Solid-phase microextraction (SPME)

Stir-bar sorbet extraction (SBSE)

Super critical fluid extraction (SFE)

Ultrasound-assisted extraction (UAE)

Απόδοση στα Ελληνικά

Χημικός ιονισμός υπό ατμοσφαιρική πίεση

Φώτο ιονισμός υπό ατμοσφαιρική πίεση

CCα: όριο απόφασης νοείται το όριο στο οποίο και
πάνω από το οποίο μπορεί να αποφασισθεί ότι ένα
δείγμα είναι μη συμμορφούμενο με πιθανότητα
σφάλματος α

Ως ικανότητα ανίχνευσης (νοείται η μικρότερη
περιεκτικότητα σε ουσία που μπορεί να ανιχνευθεί,
να ταυτοποιηθεί ή/και να προσδιορισθεί ποσοτικά
σε ένα δείγμα με πιθανότητα σφάλματος β

Μικροεκχύλιση σταγόνας Άμεσης αναστολής

Υγρή μικροεκχύλιση διασκορπούμενου υγρού

Ιονισμός πρόσκρουσης ηλεκτρονίων

Ιονισμός ηλεκτρο-ψεκασμού

Αέρια χρωματογραφία

Αέρια χρωματογραφία / φασματοσκοπία μάζας-
μάζας

Υγρή μικροεκχύλιση κοίλης ίνας

Υγρή χρωματογραφία Υψηλής απόδοσης

Υγρή χρωματογραφία/ φασματοσκοπία μάζας-
μάζας

Μικροεκχύλιση υγής φάσης

Εκχύλιση υγρής φάσης

Όριο ανίχνευσης

Κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης

Υποβοηθούμενη εκύλιση μικροκυμάτων

Εκχύλιση μπάρας μοριακών αποτυπομάτων

Ανώτατο όριο συγκέντρωσης

Μικροεκχύλιση σταγόνας

Εκχύλιση στερεής φάσης

Μικροεκχύλιση σταγόνας στεροποίησης μέσω

Μικροεκχύλιση στερεής φάσης

Εκχύλιση αναδευόμενης μπάρας

Εκχύλιση υπερκρίσιμων υγρών

Υποβοηθούμενη εκύλιση υπερήχων

Περιεχόμενα

Εισαγωγή	iii
1.ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	1
1.1 Liquid-liquid extraction (LLE)	1
1.1.2 Liquid phase microextraction (LPME).....	1
1.1.2.1 Direct immersion single-drop microextraction	2
1.1.2.2 Headspace single-drop microextraction	3
1.1.3.1 Hollow-fiber microextraction (HF-LPME)	3
1.1.3.2 Dispersive liquid liquid microextraction (DLLME)	3
1.1.3.3 Directly-suspended droplet microextraction (DSDME) και solidification of a floating organic drop (SFOME)	4
1.2 Solid phase extraction (SPE)	5
1.2.1 Solid-phase microextraction (SPME).....	5
1.2.2 Μικροσωλήνες άνθρακα (CNTs) στην SPME.....	6
1.2.3 Stir-bar sorbet extraction (SBSE) & Molecularly-imprinted stir-bar sorptive extraction (MI-SBSE)	6
1.2.4 Εφαρμογές της SPME <i>in vivo</i>	9
1.3 Microwave-assisted extraction- (MAE)	9
1.4 Ultrasound-assisted extraction (UAE)	9
1.5 Super critical fluid extraction (SFE)	10
1.6 QuEChERS	10
1.7 Σύγκριση μεθόδων εκχύλισης.....	13
2. ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ	19
2.1 Επικύρωση αναλυτικών τεχνικών κατά FDA.....	20
2.2 Απαιτήσεις ISO/IEC /17025 για την διαπίστευση αναλυτικών εργαστηρίων στα πλαίσια της διασφάλισης ποιότητας	21
3.ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ	24
3.1 Ανιχνευτές στην υγρή χρωματογραφία	25
3.1.1 Ανιχνευτής UV/VIS	26
3.1.2 Ανιχνευτής Light Scattering ή (ELSD)	28
3.1.3 Ανιχνευτής Corona discharge	29
3.1.4 Ανιχνευτής FL	29
3.1.4 Ανιχνευτής EC	30
3.1.5 Ανιχνευτής αγωγιμότητας	31
3.1.6 Ανιχνευτής RI	31
3.1.7 Ανιχνευτής DAD.....	32
3.1.8 Ανίχνευση φυτοφαρμάκων με HPLC-UV/DAD.....	33
3.2 Ανιχνευτές στην αέρια χρωματογραφία	34
3.2.1 Κατηγοριοποίηση ανιχνευτών	34
3.2.2 Ανιχνευτής FID	35
3.2.3 Ανιχνευτής TCD	37
3.2.4 Ανιχνευτής ECD	37
3.2.5 Ανιχνευτής NPD	38
3.2.6 Ανιχνευτής PID.....	39
3.2.7 Ανιχνευτής FPD.....	39
3.2.8 Ανιχνευτής Chemiluminescent	40
3.3 Φασματοσκοπία μαζών	41
3.3.1 Τύποι ιονισμού και αναλυτές στη φασματοσκοπία μαζών	41
3.3.2 Ιονισμός EI	45
3.3.3 Ιονισμός ESI	46
3.3.4 Λειτουργίες (modes) αναλυτών μάζας και σύζευξη αυτών	46

3.4 Ανίχνευση φυτοφαρμάκων με GC –FID/ECD/NPD.....	49
3.5 Επίδραση υποστρώματος – Matrix effect.....	49
4.ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ-ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΜΑΖΑΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΕ ΦΥΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ	51
4.1 Υγρή χρωματογραφία-φασματοσκοπία μάζας για την ανάλυση φυτοφαρμάκων.....	51
4.2 Αέρια χρωματογραφία-φασματοσκοπία μάζας για την ανάλυση φυτοφαρμάκων.....	57
4.2.1 Συγκεντρωτικά δεδομένα από αναλυτικές μεθόδους επικύρωσης ανάλυσης φυτοφαρμάκων με τη χρήση αέριας χρωματογραφία-φασματοσκοπία μάζας.....	60
5. ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ	63
6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	64
7. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	66
Βιβλιογραφία	67

Κατάσταση πινάκων

Πίνακας 1. Ενδεικτικά παραδείγματα διαλυτών διασποράς και εκχύλισης για την ανάλυση φυτοφαρμάκων σε φρούτα	3
Πίνακας 2. Προσθήκη νερού ανάλογα την περιεκτικότητα του δείγματος σε υγρασία	11
Πίνακας 3. Σύγκριση μεθόδων εκχύλισης SDME και Acetone-Partition extraction	13
Πίνακας 4. Παράμετροι επίδοσης αναλυτικών τεχνικών σύμφωνα με την οδηγία 2002/657/EK.....	19
Πίνακας 5. Κριτήρια επικύρωσης σύμφωνα με τον οδηγό SANCO/12571/2013.....	19
Πίνακας 6. Τα αποδεκτά όρια ανάκτησης βάση της συγκέντρωσης του αναλύτη.....	20
Πίνακας 7. Τα αποδεκτά όρια επαναληψιμότητας -ακρίβειας βάση της συγκέντρωσης του αναλύτη..	20
Πίνακας 8. Τα αποδεκτά όρια αναπαραγωγιμότητας-ακρίβειας βάση της συγκέντρωσης του αναλύτη	21
Πίνακας 9. Τα κριτήρια για την χρησιμοποίηση της MS στην ταυτοποίηση φυτοφαρμάκων.....	21
Πίνακας 10. Οι διάφοροι τύποι ανιχνευτών που χρησιμοποιούνται στην υγρή χρωματογραφία.....	26
Πίνακας 11. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι ανιχνευτές στην αέρια χρωματογραφία	34
Πίνακας 12. Σύγκριση τριών βασικών ανιχνευτών βάση των παραπάνω ιδιοτήτων	35
Πίνακας 13. Σχετική ευαισθησία ανιχνευτή FID σε σχέση με τον αναλύτη	36
Πίνακας 14. Τύποι ιονισμού στη φασματοσκοπία μαζών	41
Πίνακας 15. Στοιχεία επικύρωσης μεθόδου, για την ανάλυση φυτοφαρμάκων σε σταφύλια.....	53
Πίνακας 16. Συγκεντρωτικά δεδομένα από αναλυτικές μεθόδους επικύρωσης ανάλυσης φυτοφαρμάκων.....	61

Κατάσταση σχημάτων

Σχήμα 1 Η κυκλοφορία των φυτοφαρμάκων στη φύση	v
Σχήμα 2. Τα βήματα που ακολουθούνται για την ανάλυση φυτοφαρμάκων.....	vi
Σχήμα 3. Σχηματική αναπαράσταση vial με το οποίο έγινε η μικροεκχύλιση SDME.....	2
Σχήμα 4. Σχηματική αναπαράσταση μεταξύ οργανικής και υδατικής φάσης στην άκρη του Teflon.	2
Σχήμα 5. Κατηγοριοποίηση των τεχνικών μικροεκχύλισης	2
Σχήμα 6. Σχηματική αναπαράσταση των τεχνικών μικροεκχύλισης.	4
Σχήμα 7. Hollow-fiber microextraction (HF-LPME).....	4
Σχήμα 8. Dispersive liquid liquid microextraction (DLLME).....	5
Σχήμα 9. Οι νέες τάσεις στην SMPE	6
Σχήμα 10. Θεωρητική ανάκτηση συναρτήσει του λόγου οκτανόλης /νερού μεταξύ SBSE και SPME ...	7
Σχήμα 11. Χρήση μεθόδων εκχύλισης βάσει της πτητικότητας των αναλυτών	7
Σχήμα 12. Χρήση μεθόδων εκχύλισης βάσει της πολικότητας των αναλυτών.....	8
Σχήμα 13. SPME <i>in vivo</i> από λουλούδι για την απομόνωση αρωματικών ουσιών.....	9
Σχήμα 14. Οι παραλλαγές της μεθόδου QuEChERS	11
Σχήμα 15. Τα στάδια της μεθόδου Quechers	12
Σχήμα 16.Σχετική επιφάνεια κορυφών για την ανίχνευση φυτοφαρμάκων εξαρτώμενη από το pH και τον συντελεστή αραίωσης του δείγματος.....	14
Σχήμα 17. Σύγκριση της μεθόδου Quechers και Klein and Alder	14
Σχήμα 18. Μέθοδος εκχύλισης Klein and Alder	15
Σχήμα 19. Παραλλαγές της μεθόδου Quechers για την ανάλυση φυτοφαρμάκων σε μαρμελάδα φράουλα.....	15
Σχήμα 20. Σύγκριση 4 μεθόδων εκχύλισης για την ανάκτηση φυτοφαρμάκων σε σταφύλια.....	16
Σχήμα 21. Επιφάνεια κορυφών με SPME χρησιμοποιώντας διαφορετικές ίνες.....	17
Σχήμα 22. Ανακτήσεις φυτοφαρμάκων με τρεις διαφορετικές μεθόδους εκχύλισης σε πευκοβελόνες..	18
Σχήμα 23. Σχέση ISO 9001:2008 και ISO/IEC /17025.....	22
Σχήμα 24. Απαιτήσεις του ISO/IEC /17025.....	22
Σχήμα 25. Όλα τα βήματα για να επιτευχθεί μια διαπίστευση κατά ISO/IEC /17025	23
Σχήμα 26. Ανάλυση διαφόρων ουσιών με υγρή ή αέρια χρωματογραφία βάσει της πτητικότητας και πολικότητας αυτών	24

Σχήμα 27. Σύγκριση χρωματογραφημάτων για τον προσδιορισμό ενός μείγματος ουσιών, μεταξύ του ανιχνευτή UV (214 nm), ELSD (Evaporative light scattering detector) και MS (mass spectrometry ESI+)	25
Σχήμα 28. Τυπική διάταξη ενός ανιχνευτή UV.	27
Σχήμα 29. Χρωματογράφημα HPLC-UV για την ανίχνευση φυτοφαρμάκων σε λαχανικά.	27
Σχήμα 30. Τυπική διάταξη ανιχνευτή Light Scattering.	28
Σχήμα 31. Τυπική διάταξη ανιχνευτή Corona discharge.	29
Σχήμα 32. Τυπική διάταξη ανιχνευτή FL.	29
Σχήμα 33. Τυπική διάταξη ηλεκτροδίου flow through	30
Σχήμα 34. Τυπική διάταξη ηλεκτροδίου thin layer.	30
Σχήμα 35. Τυπική διάταξη ανιχνευτή αγωγιμότητας	31
Σχήμα 36. Τυπική διάταξη ανιχνευτή RI	32
Σχήμα 37. Τυπική διάταξη ανιχνευτή DAD	32
Σχήμα 38. Μορφή χρωματογραφήματος με ανιχνευτή DAD	33
Σχήμα 39. Επίδραση του ρυθμού ροής μάζας	35
Σχήμα 40. Τυπική διάταξη ανιχνευτή FID	36
Σχήμα 41. Τυπική διάταξη ανιχνευτή TCD	37
Σχήμα 42. Τυπική διάταξη ανιχνευτή ECD	38
Σχήμα 43. Τυπική διάταξη ανιχνευτή NPD	38
Σχήμα 44. Τυπική διάταξη ανιχνευτή PID	39
Σχήμα 45. Τυπική διάταξη FPD	40
Σχήμα 46. Τυπική διάταξη NCD & SCD	41
Σχήμα 47. Τυπική διάταξη τετραπολικού αναλυτή	42
Σχήμα 48. Τυπική διάταξη αναλυτή TOF	42
Σχήμα 49. Τυπική διάταξη αναλυτή μαγνητικού τομέα	43
Σχήμα 50. Τυπική διάταξη αναλυτή διπλής εστίασης	43
Σχήμα 51. Τυπική διάταξη αναλυτή QIT	44
Σχήμα 52. Ποσοστιαία αναλογία χρησιμοποίησης αναλυτών μάζας ανά είδος σε δημοσιευμένες εργασίες μέχρι τον Μάιο του 2012	44
Σχήμα 53. Τυπική διάταξη ιονισμού EI	45
Σχήμα 54. Σχηματισμός ιόντων με την χρήση ιονισμού EI	45
Σχήμα 55. Μηχανισμός λειτουργίας του ESI	46
Σχήμα 56. Σύστημα άμεσης εισαγωγής με ακροσωλήνιο (A) πριν την εισαγωγή στην πηγή ιονισμού (B) κατά την εισαγωγή στην πηγή ιονισμού	47
Σχήμα 57. Στάδια σύζευξης τεχνικών και δομή συστήματος φασματογράφου	47
Σχήμα 58. Λειτουργίες MS/MS	48
Σχήμα 59. Προτεινόμενος μηχανισμός προστασίας του αναλυτή από το υπόστρωμα	50
Σχήμα 60. Ζευγάρια ιόντων (φυτοφάρμακα και ουσίες υποστρώματος) σε διάφορα υποστρώματα με εύρος 0-0,04 Da	50
Σχήμα 61. Χρωματογράφημα μάζας (a) :Scan mode, (b): MRM mode	52
Σχήμα 62. Διαδικασία εκχύλισης με TLC και ταυτοποίηση-ποσοτικοποίηση με LC/MS	54
Σχήμα 63. Χρωματογράφημα MS/MS για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση φυτοφαρμάκων	54
Σχήμα 64. Τυπικό παράδειγμα της επίδρασης υποστρώματος κατά τη διάρκεια επικύρωσης μεθόδου	55
Σχήμα 65. Αποτελέσματα αναλύσεως για το σύνολο των 146 δειγμάτων για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση 14 φυτοφαρμάκων	55
Σχήμα 66. Απόδοση εκχύλισης σε οξινισμένο και μη δείγμα	56
Σχήμα 67. Επίδραση υποστρώματος	56
Σχήμα 68. Χρωματογράφημα MS/MS για την ποσοτικοποίηση 4 φυτοφαρμάκων	57
Σχήμα 69. Αποτελέσματα ανάλυσης φυτοφαρμάκων σε πραγματικά δείγμα	58
Σχήμα 70. Χρωματογράφημα για την ανίχνευση φυτοφαρμάκου σε χυμό μήλου	59
Σχήμα 71. LOQ σε σχέση με τον αριθμό αναλυτών σε 5 διαφορετικά υποστρώματα	60
Σχήμα 72. Κατανομή συνολικού κέρδους για μια πολυ- υπολειμματική ανάλυση	63

Εισαγωγή

Τα φυτοφάρμακα ή γεωργικά φάρμακα είναι χημικές ουσίες που χρησιμοποιούνται σε παγκόσμια κλίμακα για την καταστροφή ή τον έλεγχο ζιζανίων, εντόμων, μυκήτων και άλλων παρασίτων ([Lopez-Fernández et al., 2012](#)). Τα φυτοφάρμακα χρησιμοποιούνται ευρέως στους περισσότερους τομείς της γεωργικής παραγωγής για την πρόληψη ή τη μείωση των απωλειών από παράσιτα και ως εκ τούτου μπορεί να βελτιώσουν την απόδοση καθώς και την ποιότητα του προϊόντος. Τα φυτοφάρμακα έχουν παίξει καθοριστικό ρόλο στην παροχή αξιόπιστων προμηθειών γεωργικών προϊόντων σε προσιτές τιμές για τους καταναλωτές και στην εξασφάλιση υψηλών κερδών σε γεωργούς ([Wang et al., 2013a](#)).

Υπάρχει ένας αριθμός κριτηρίων σύμφωνα με τα οποία τα γεωργικά φάρμακα μπορούν να ταξινομηθούν, όπως είναι η τοξικότητα, ο στόχος της εφαρμογής, η χημική σύνθεση, η σταθερότητα στο περιβάλλον και οι οδοί - τρόποι μέσω των οποίων διεισδύουν στο οργανισμό-στόχο ([Fenik et al., 2011](#)). Με βάση τη χημική τους σύνθεση χωρίζονται από παλιά στίς παρακάτω μεγάλες κατηγορίες, στις οποίες έχουν προστεθεί τα τελευταία χρόνια και νέες χημικές κατηγορίες:

- στα *Οργανοχλωριωμένα* (OCP's) που αποτελούν την παλαιότερη και πιο σημαντική ομάδα παρασιτοκτόνων. Είναι τα περισσότερο διαδεδομένα στο περιβάλλον και ανιχνεύονται σε όλες τις φάσεις της βίωσης. Οι περισσότερες από τις ενώσεις αυτές δεν είναι εύκολα βιοαποικοδομήσιμες και δεν αποσυντίθενται σε απλούστερες ακίνδυνες ενώσεις στις συνθήκες του περιβάλλοντος.
- στα *Οργανοφωσφορικά* (OPP's) τα οποία αναπτύχθηκαν κατά τη διάρκεια του 19ου αιώνα. Είναι τοξικά επειδή εμποδίζουν τα ένζυμα του νευρικού συστήματος και συγκεντρώνονται στους λιπαρούς ιστούς, αλλά από την άλλη αποσυντίθενται σε μερικές ημέρες ή εβδομάδες και έτσι σπάνια βρίσκονται στη τροφική αλυσίδα
- στα *Καρβαμιδικά*, τα οποία παρουσιάστηκαν ως εντομοκτόνα το 1951, είναι παράγωγα του καρβαμιδικού οξέος. Ο τρόπος δράσης τους είναι παρόμοιος με αυτόν των οργανοφωσφορικών. Έχουν μικρή περίοδο ζωής στο περιβάλλον, αφού υδrolύονται και αποσυντίθενται σε απλά μη τοξικά προϊόντα.
- στα *Πυρεθρινοειδή* που από χημικής πλευράς, τα συνθετικά πυρεθρινοειδή που χρησιμοποιούνται σήμερα, είναι συγγενείς ενώσεις με τις φυσικές πυρεθρίνες που απομονώθηκαν από φυτά του γένους *Chrysanthemum* αλλά με βελτιωμένες φυσικοχημικές και βιολογικές ιδιότητες που ανήκουν στην ομάδα των «φυσικών παρασιτοκτόνων». Τα πυρεθρινοειδή μεταβολίζονται από τον ανθρώπινο οργανισμό και τα θηλαστικά πολύ γρήγορα προς μη τοξικά παράγωγα και έτσι είναι πρακτικά ακίνδυνα
- καθώς και σε άλλες σημαντικές και πιο σύγχρονες κατηγορίες όπως νεονικοτινοειδή, στρομπιλουρίνες, τριαζίνες, ουρίες, τριαζόλες, διθειοκαρβαμιδικά, σουλφονυλουρίες, βενζουλουρίες, δινοτροανιλίνες και άλλες ([EPA, 2012](#)).

Συνηθέστερα τα φυτοφάρμακα διαχωρίζονται με βάση το στόχο της εφαρμογής τους σε τέσσερις κατηγορίες :

- Ζιζανιοκτόνα*: αναστέλλουν ή αδρανοποιούν την ανάπτυξη ανεπιθύμητων ζιζανίων
- Μυκητοκτόνα*: καταστρέφουν την ανεπιθύμητη και επιβλαβή παρουσία μυκήτων
- Εντομοκτόνα, νηματωδοκτόνα*: παρεμποδίζουν την ανάπτυξη εντόμων

–Ακαρεοκτόνα: καταστρέφουν τα ακάρεα στα φυτά (*Bakirci & Hisil., 2012*)

Όταν τα φυτοφάρμακα εφαρμόζονται καταχρηστικά, τα υπολείμματά τους μπορούν να δημιουργήσουν σημαντικούς κινδύνους τόσο για την υγεία των καταναλωτών που είναι όλο και περισσότερο ενήμεροι για την δυνατότητα επιβάρυνσης των τροφίμων και του πόσιμου νερού (*Fernández et al., 2012*), όσο και για το οικοσύστημα στο οποίο καταλήγουν. Η αξιολόγηση του κινδύνου των επιπτώσεων των φυτοφαρμάκων στην ανθρώπινη υγεία δεν είναι ένα εύκολη λόγω των διαφορών κατά τις περιόδους και τα επίπεδα της έκθεσης, τον τύπο των φυτοφαρμάκων και τα γεωγραφικά και μετεωρολογικά χαρακτηριστικά στις γεωργικές περιοχές όπου αυτά εφαρμόζονται (*Damalas & Eleftherohorinos., 2011*). Παρόλα αυτά θεωρούνται σημαντικές πηγές ρύπανσης που μπορεί να προκαλέσουν επιπτώσεις στην υγεία των ανθρώπων (*Juraske et al., 2009*).

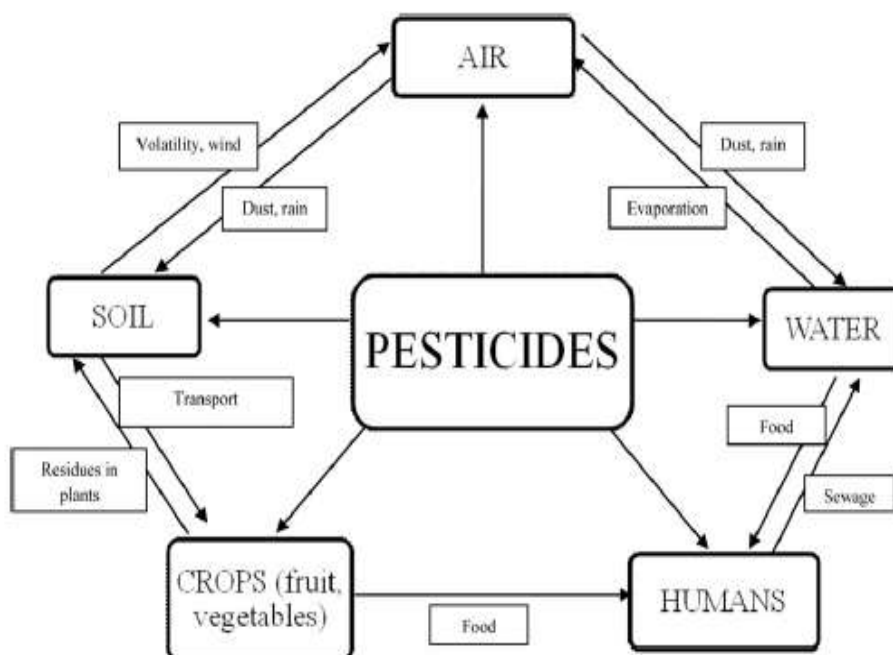
Οι βασικότερες επιδράσεις των φυτοφαρμάκων είναι σε συγκεκριμένα ανθρώπινα όργανα και συστήματα όπως :

- *Ενδοκρινικό σύστημα* : οι αναπτυσσόμενοι οργανισμοί έχουν αυξημένη ευαισθησία στη δράση χημικών ουσιών που διαταράσσουν το ενδοκρινικό σύστημα επειδή οι διαφοροποιούμενοι ιστοί είναι πιο ευπαθείς σε αλλαγές στα επίπεδα των ορμονών. Μπορούν να δεσμεύσουν υποδοχείς ορμονών φύλου, να τους ενεργοποιήσουν και έτσι να οδηγήσουν σε αντιδράσεις παρόμοιες με αυτές ενδογενών οιστρογόνων και ανδρογόνων.
- *Νευρικό σύστημα* : πολλές από τις κύριες ομάδες φυτοπροστατευτικών είναι νευροτοξικές ουσίες. Αποτελέσματα μακροχρόνιας έκθεσης σε φυτοπροστατευτικά περιλαμβάνουν διαταραχές μνήμης και συγκέντρωσης, προσανατολισμού, κατάθλιψη, ευερεθιστότητα, σύγχυση, κεφαλαλγία, διαταραχές λόγου, εφιάλτες, υπνοβασία κ.τ.λ. Οι μικρές δόσεις νευροτοξινών μπορούν να διαταράξουν δραστικά τη διαδικασία μάθησης στα παιδιά. Επίσης έχουν επίδραση στην ανάπτυξη του νευρικού συστήματος
- *Αναπνευστικό* : σε μελέτη με ενήλικες αγρότες και εργάτες ψεκασμών διαπιστώθηκαν αναπνευστικά προβλήματα, όπως συριγμός ή γριπώδεις σύνδρομο κατόπιν έκθεσης σε εντομοκτόνα και ζιζανιοκτόνα. Επίσης βρογχικό άσθμα συσχετίστηκε με καρβαμιδικά εντομοκτόνα (*EPA,2012*)
- *Δέρμα* : είναι γνωστό ότι προκαλούν δερματίτιδες με σπουδαιότερη τη δερματίτιδα εξ επαφής είτε ερεθιστική είτε αλλεργική

Η χειρότερη βέβαια επίπτωση είναι ο συσχετισμός των φυτοφαρμάκων με την ανάπτυξη καρκίνου και συγκεκριμένα με ορισμένα είδη όπως έχει διαπιστώθει σε αρκετές μελέτες. Έτσι η σχέση μεταξύ έκθεσης σε φυτοπροστατευτικές ουσίες και συμπαγών όγκων, όπως όγκοι εγκεφάλου, νεφρών, παγκρέατος, νευροβλάστωμα, σάρκωμα. Πέρα από τις επιπτώσεις στην υγεία των ανθρώπων, η χρήση φυτοφαρμάκων συνδέεται και με αρνητικές συνέπειες στο περιβάλλον, όπως :

- οι δυσμενείς επιδράσεις σε οργανισμούς-μη στόχους
- η ρύπανση του νερού από τη κίνηση ή μετακίνηση των φυτοφαρμάκων
- η ρύπανση του αέρα από πτητικά φυτοφάρμακα
- η βλάβη σε καλλιέργειες αμειψισποράς από υπολείμματα ζιζανιοκτόνων που παρέμειναν στο χώρο
- η ζημία των καλλιεργειών λόγω των υψηλών ποσοστών εφαρμογής, της λάθος χρονικά στιγμής εφαρμογής ή των δυσμενών περιβαλλοντικών συνθηκών μετά την εφαρμογή των φυτοφαρμάκων

Για την προστασία των καταναλωτών κυβερνήσεις και ιδιωτικές οργανώσεις σε διεθνές επίπεδο έχουν θεσπίσει ανώτατα όρια υπολειμμάτων (maximum residue levels MRLs), τα οποία συνήθως οδηγούν στον έλεγχο της ποσότητας των υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων στα τρόφιμα. (Latif *et al.*, 2011). Πιο συγκεκριμένα η Ελλάδα οφείλει να ακολουθεί τα ανώτερα επιτρεπτά όρια υπολειμμάτων των φυτοφαρμάκων, όπως αυτά προβλέπονται από την ευρωπαϊκή Επιτροπή. Η κυκλοφορία των φυτοφαρμάκων και η σχέση με τον άνθρωπο μπορεί να συνοψίζεται στο παρακάτω σχήμα .



Σχήμα 1. Η κυκλοφορία των φυτοφαρμάκων στη φύση (Fenik *et al.*, 2011)

Η χρήση των φυτοφαρμάκων μπορεί να συνοψιστεί στα εξής:

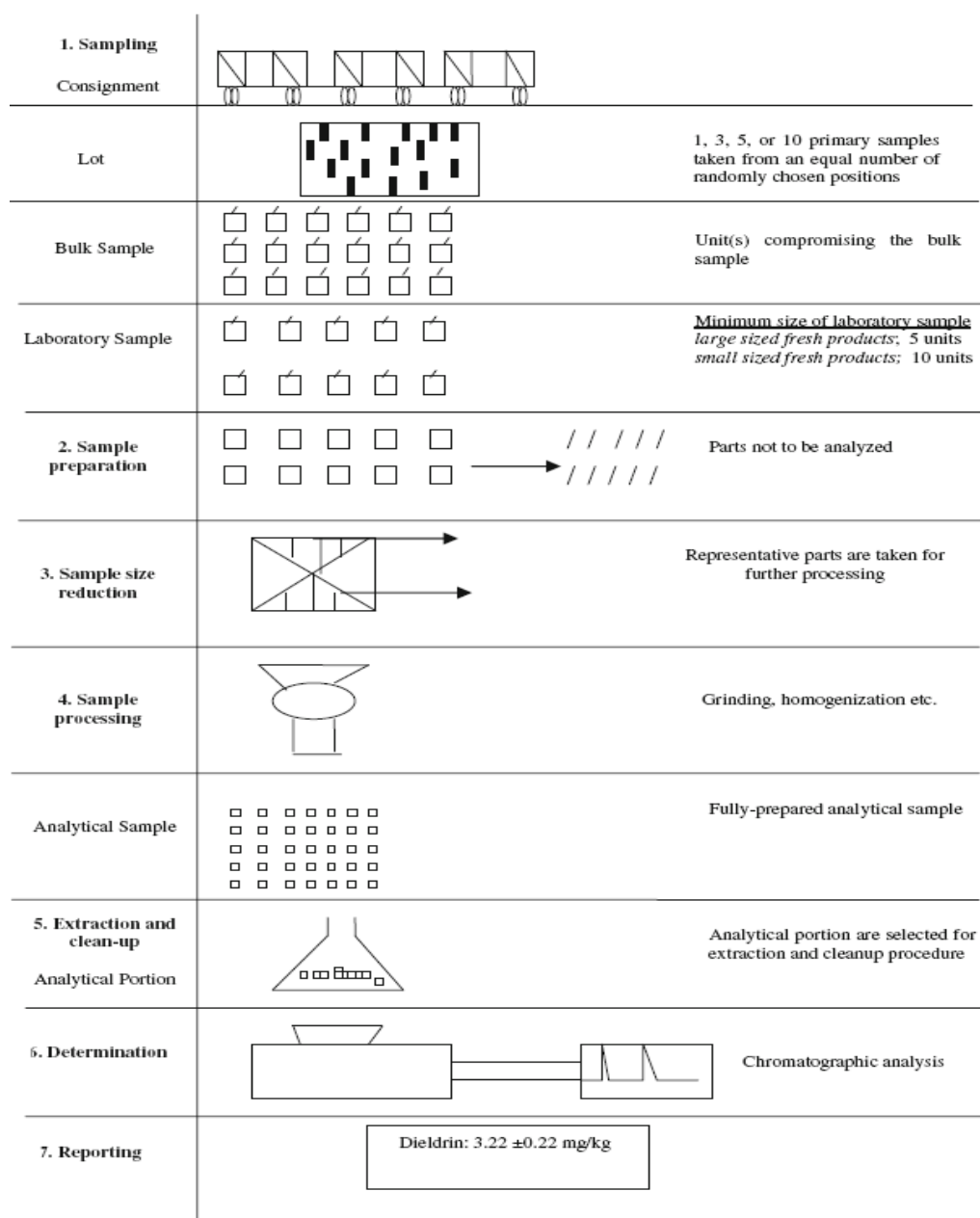
- Έλεγχος των εντόμων που καταστρέφουν φυτά ή μέρος αυτών
- Αύξηση της παραγωγής των ζώων και της βιομάζας
- Καταπολέμηση των μικροοργανισμών που προκαλούν σάπισμα
- Καταπολέμηση άλγεων, βακτηρίων, μυκήτων και αγριόχορτων
- Καταπολέμηση εντόμων
- Διεγείρουν ή αναστέλλουν τη διαδικασία ανάπτυξης των φυτών (π.χ αφαίρεση των επιπλέον ανθών)
- Καθιστούν δυνατή τη δράση άλλων ουσιών
- Καταπολεμούν την ανάπτυξη μικροοργανισμών σε κτήρια όπως τα νοσοκομεία, σπίτια και οχήματα. (Fenik *et al.*, 2011)

Τα MRLs στην Ευρώπη ορίζονται από τον EFSA (European Food Safety Authority) βάσει :

1. Της χρήσης του φυτοφαρμάκου η οποία περιλαμβάνει α) την ποσότητα, β) τη συχνότητα, γ) τη φάση ανάπτυξης του φυτού.
2. Πειραματικών δεδομένων ενδεχόμενων υπολειμμάτων από τα φυτά όταν αυτά εφαρμόζονται στα φυτά βάσει του GAP (Good agricultural Practice).

- Τοξικολογικών τιμών –αναφοράς για τα φυτοφάρμακα. Μέτρηση χρόνιας τοξικότητας με αναφορά στην αποδεκτή ημερήσια πρόσληψη (acceptable Daily intake- ADI), οξεία τοξικότητα και συγκεκριμένα στην οξεία δόση αναφοράς (Acute reference dose- ARfD).

Όταν σε ένα φυτοφάρμακο δεν ορίζεται MRL δεν παίρνει έγκριση κυκλοφορίας. Για το πως και πότε θα χρησιμοποιηθεί ένα φυτοφάρμακο επιβάλλεται από τις εθνικές αρχές κάθε κράτους. Για εισαγωγές καλλιεργειών από χώρες εκτός Ε.Ε τα MRLs ζητούνται από την αντίστοιχη χώρα ([EC.,2012](#)). Η νομοθεσία που αφορά τα φυτοφάρμακα στην Ε.Ε συνοψίζεται στους παρακάτω κανονισμούς: [Regulation EC 1095/2007](#), [Regulation EC 33/2008](#), [Directive 2009/128/EC](#), [Regulation EC 1107/2009](#), [Regulation EU 284/2013](#), [Regulation EU 283/2013](#). ([EC.,2012](#)). Ένα γενικό σχήμα ανάλυσης φυτοφαρμάκων είναι και το παρακάτω.



Σχήμα 2. Τα βήματα που ακολουθούνται για την ανάλυση φυτοφαρμάκων ([Omeroglu et al., 2012](#))

1.ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

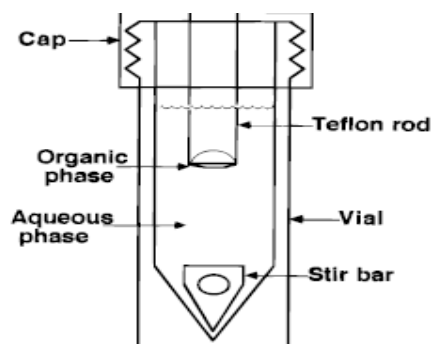
Οι πιο **βασικές** τεχνικές προετοιμασίας του δείγματος για την περαιτέρω ανάλυση με τεχνικές ενόργανης χημικής ανάλυσης σύμφωνα με τους [Jin et al., 2012](#), [Xu et al., 2014](#), [Beyer & Biziuk, 2008](#), [Retamal et al., 2013](#) είναι οι παρακάτω: Liquid-liquid extraction (LLE), Solid phase extraction (SPE), Solid phase microextraction (SPME), Stir bar sorptive extraction (SBSE), Matrix solid Phase dispersion (MSPD), Single-drop microextraction (SDME), Super critical fluid extraction, Microwave-assisted extraction (MAE), Ultra sound assisted extraction, Colorimetry.

1.1 Liquid-liquid extraction (LLE)

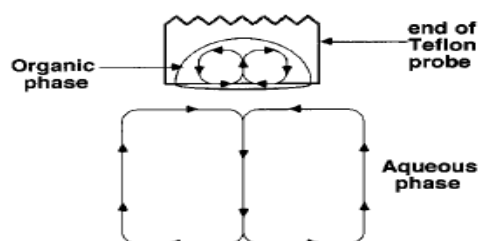
Ο διαχωρισμός με την τεχνική Liquid-liquid extraction (LLE) βασίζεται στην σχετική διαλυτότητα μιας ουσίας μεταξύ δύο μη αναμίξιμων υγρών, συνήθως νερού και κάποιου οργανικού διαλύτη. Η αποτελεσματικότητα της τεχνικής εξαρτάται κυρίως από τρεις παράγοντες, 1) από την χημική συγγένεια αναλύτη-διαλύτη, 2) τον όγκο εκχύλισης, 3) τον αριθμό των εκχυλίσεων. Αυτή η τεχνική είναι όμως χρονοβόρα όπως επίσης εμπεριέχει και κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία και για το περιβάλλον καθώς πραγματοποιείται με μεγάλες ποσότητες τοξικών διαλυτών. Η τεχνική χρησιμοποιείται όλο και λιγότερο καθώς εκτός από τα παραπάνω προβλήματα αντιμετωπίζει πρόβλημα και ως προς την απόδοση της όταν εμπεριέχονται πολλοί αναλύτες προς ανάλυση με διαφορετικές πολικότητες. Λόγω του τελευταίου, συνήθως πραγματοποιείται και Solid phase extraction (SPE) μετά την εφαρμογή αυτής ([Jin et al., 2012](#); [Fu et al., 2009](#); [Yazdanfar et al., 2013](#), [Pakade & Tewary., 2010](#)).

1.1.2 Liquid phase microextraction (LPME)

Το 1996 οι [Liu & Dasgupta](#) εισήγαγαν μια καινούργια τεχνική την Liquid phase microextraction (LPME) όπου ένα σταγονίδιο (~1,3μL) αποτελούμενο από οργανικό υδατοδιαλυτό διαλύτη, αιωρείται σε μεγαλύτερο όγκο υδατικής φάσης και πραγματοποιείται η εκχύλιση βασισμένη στην κατανομή του αναλύτη μεταξύ του σταγονιδίου και της υδατικής φάσης. Την ίδια χρονιά οι [Jeannot & Canwell](#) χρησιμοποιώντας 8 μL υδατοδιαλυτού οργανικού διαλύτη και εσωτερικού προτύπου και κάνοντας χρήση ενός τροποποιημένου vial (**Σχήματα 3&4**) κατάφεραν να εκχυλίσουν με μικροποσότητες τη χημική ένωση 4-methylacetophenone σε n-οκτάνιο. Αυτές οι δύο εργασίες θεωρούνται η βάση για την λεγόμενη τεχνική single drop microextraction (SDME). Η SDME χωρίζεται περαιτέρω στις τεχνικές 1) direct immersion SDME, 2) headspace SDME, 3) continuous flow microextraction. Άλλες τεχνικές όπως 1) Dispersive liquid liquid microextraction (DLLME), 2) Hollow fiber based LPME (HF-LPME), 3) Directly-suspended droplet microextraction (DSDME), 4) Solidification of floating drop microextraction (SFDME) επίσης χρησιμοποιούνται αναλόγως τον αναλύτη και το υπόστρωμα. ([Han & Row., 2012](#))

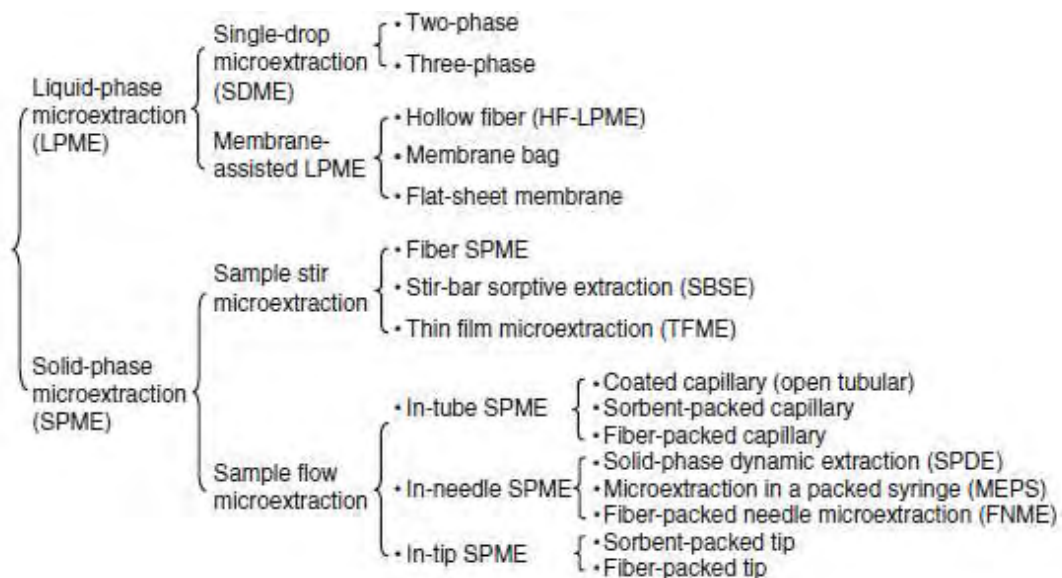


Σχήμα 3. Σχηματική αναπαράσταση vial με το οποίο έγινε η μικροεκχύλιση SDME. Στην ράβδο του Teflon έγινε έγχυση 8 μL n-οκτανίου με εσωτερικό πρότυπο και στην συνέχεια εμβαπτίστηκε στην υδατική φάση η οποία περιείχε και τον αναλύτη



Σχήμα 4. Σχηματική αναπαράσταση μεταξύ οργανικής και υδατικής φάσης στην άκρη του Teflon, η υδατική φάση αναδευόταν με την βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα.

Οι τεχνικές μικροεκχύλισης μπορούν συνοπτικά να κατηγοριοποιηθούν ως εξής



Σχήμα 5. Κατηγοριοποίηση των τεχνικών μικροεκχύλισης (Kataoka., 2010)

1.1.2.1 Direct immersion single-drop microextraction

1 μL οργανικού διαλύτη αναροφάται σε μια μικροσύριγγα η οποία και βυθίζεται στο υγρό δείγμα υπό ανάδευση (Σχήμα 6-A). Στη συνέχεια και αφού ολοκληρωθεί η εκχύλιση το σταγονίδιο του διαλύτη αναρροφάται και εισάγεται στο σύστημα της αέριας χρωματογραφίας. (Kataoka., 2010)

1.1.2.2 Headspace single-drop microextraction

Η συγκεκριμένη τεχνική χρησιμοποιείται κυρίως για πτητικούς αναλύτες. Το μικροσταγονίδιο αιωρείται πάνω από το υπό ανάδευση υγρό δείγμα. Τα ρεύματα αέρα που δημιουργούνται μεταφέρουν στο σταγονίδιο τον αναλύτη (Σχήμα 6-C). Η τεχνική προσφέρει εξαιρετικά αποτελέσματα (clean up) όταν υπάρχουν πολύπλοκα υποστρώματα. (Sarafraz-Yazdi & Amiri., 2010).

1.1.3.1 Hollow-fiber microextraction (HF-LPME)

Στην συγκεκριμένη τεχνική το vial γεμίζεται με το υγρό δείγμα. Ένα πορώδες κομμάτι πολυπροπυλενίου (polypropylene / hemp fibers) σε μορφή ράβδου ή μορφής U «ενεργοποιείται» με υδατοδιαλυτό οργανικό διαλύτη για να ενσωματώσει μέρος αυτού (Σχήμα 7). Ο συμβατός με το πολυπροπυλένιο οργανικός διαλύτης (συμβατός ώστε να γεμίσουν σωστά οι πόροι) σχηματίζει ένα λεπτό στρώμα με το τοίχωμα του πολυπροπυλενίου. Στην συνέχεια γεμίζεται ο αυλός του πολυπροπυλενίου με το διαλύτη «υποδοχέα» (acceptor) ο οποίος μπορεί να είναι ο ίδιος με τον διαλύτη ενεργοποίησης με αποτέλεσμα την δημιουργία ενός συστήματος εκχύλισης 2 φάσεων. Σε περίπτωση που ο διαλύτης «υποδοχέας» είναι κάποιο οξινοποιημένο ή αλκαλικό διάλυμα τότε έχουμε την δημιουργία συστήματος εκχύλισης 3 φάσεων (Sarafraz-Yazdi & Amiri, 2010; Lambrapoulou & Albanis., 2007).

1.1.3.2 Dispersive liquid liquid microextraction (DLLME)

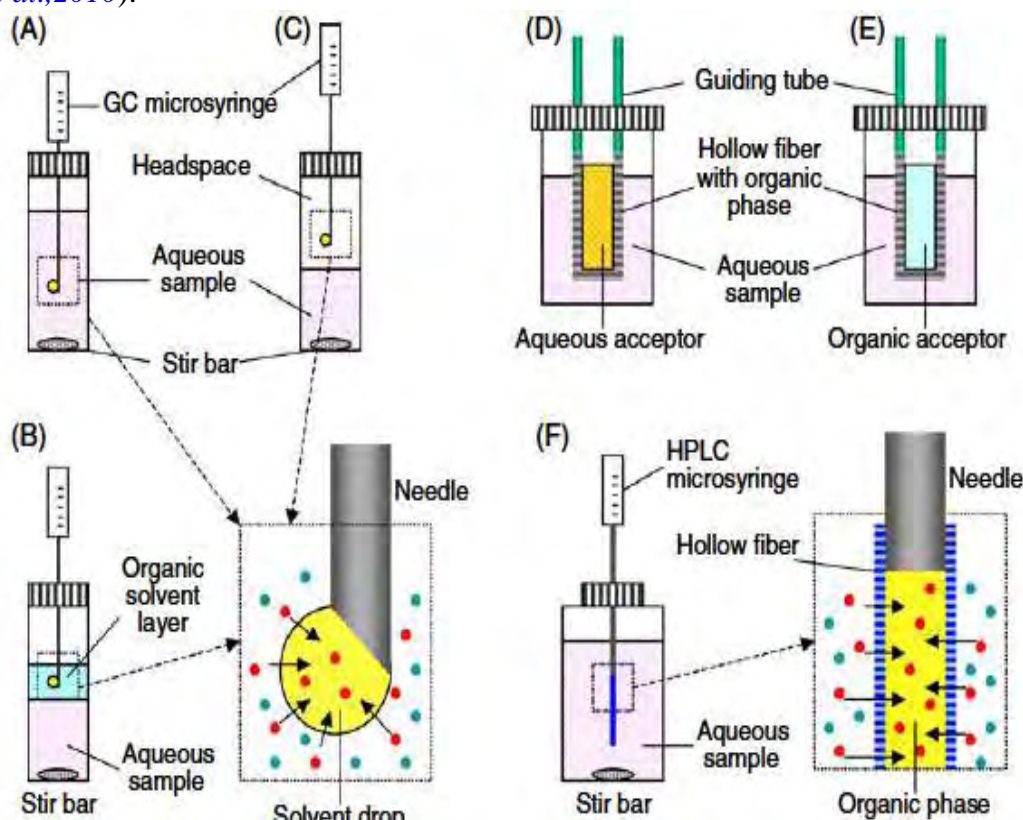
Για την εφαρμογή της DLLME απαιτούνται 2 διαλύτες, ο διαλύτης «διασποράς» (dispersion solvent) και ο διαλύτης εκχύλισης. Η τεχνική λαμβάνει χώρα σε δύο στάδια :1) Το μείγμα των 2 διαλυτών εγχύεται άμεσα και γρήγορα στο υγρό δείγμα με αποτέλεσμα την διασπορά των διαλυτών και την εκχύλιση των αναλυτών από το δείγμα. 2) Η διασπορά (θόλωμα) απομακρύνεται με φυγοκέντρηση και ο διαλύτης εκχύλισης (μαζί με τους αναλύτες) απομακρύνεται με μικροσύριγγα (Σχήμα8). Ο διαλύτης διασποράς πρέπει να είναι υδατοδιαλυτός και συνήθως χρησιμοποιείται ακετόνη, μεθανόλη ή ακετυλονιτρίλιο. Ο διαλύτης εκχύλισης θα πρέπει να είναι αναμίξιμος με τον διαλύτη διασποράς αλλά η υδατοδιαλυτότητα του να είναι πολύ χαμηλή και η πυκνότητα του σημαντικά διαφορετική από αυτή του νερού ώστε να πραγματοποιηθεί διαχωρισμός φάσεων (Zgola-Grzeskowiak & Grzeskowiak., 2011; Abdulra'Uf et al.,2012; Kokosa.,2013, Yan & Wang.,2013)

Πίνακας 1. Ενδεικτικά παραδείγματα διαλυτών διασποράς και εκχύλισης για την ανάλυση φυτοφαρμάκων σε φρούτα (Zgola-Grzeskowiak & Grzeskowiak., 2011)

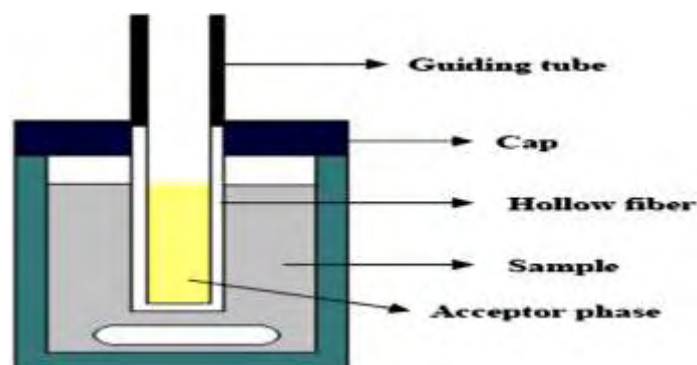
Φυτοφάρμακα	Υπόστρωμα	Δ/της Εκχύλισης	Δ/της Διασποράς	LOD
Οργανοφωσφορικά	Καρπούζι -αγγούρι	χλωροβενζόλιο	Ακετυλονιτρίλιο	0,10-0,19 µg/Kg
Διάφορα φυτοφάρμακα	Μπανάνα	[C6MIM][PF6]	Μεθανόλη	0,320-4,66 µg/Kg
Διάφορα φυτοφάρμακα	Φρούτα	[C6MIM][PF6]	Μεθανόλη	0,651-6,33 µg/Kg
Καρβαμιδικά φυτοφάρμακα	Μήλα	Χλωροφόρμιο	Ακετόνη	2,0-3,0 µg/Kg
N-μέθυλ-καρβαμιδικά φυτοφάρμακα	Λαχανικά	Χλωροφόρμιο	Ακετυλονιτρίλιο	0,5-3,0 µg/Kg

1.1.3.3 Directly-suspended droplet microextraction (DSDME) και solidification of a floating organic drop (SFOME)

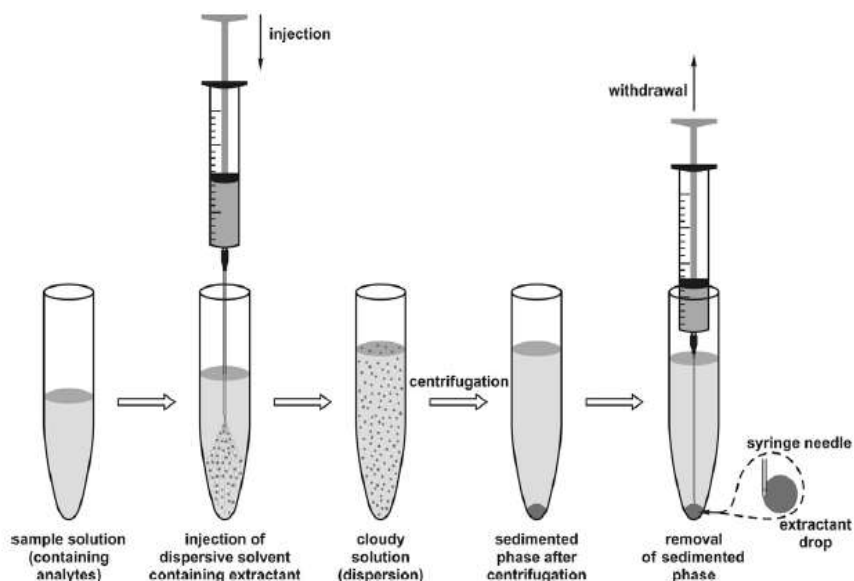
Στην τεχνική αυτή μια σταγόνα διαλύτη χαμηλότερης πυκνότητας από αυτής του νερού τοποθετείται στην υδατική φάση υπό ανάδευση. Καθώς η σταγόνα κινείται ελεύθερα στην επιφάνεια της υδατικής φάσης πραγματοποιείται εκχύλιση, με υψηλή απόδοση. Μια άλλη τεχνική είναι η solidification of a floating organic drop (SFOME), χρησιμοποιεί διαλύτες εκχύλισης χαμηλότερης πυκνότητας από αυτής του νερού με σημείο τήξης κοντά στην θερμοκρασία περιβάλλοντος (10-30 °C). Μόλις ολοκληρωθεί η φάση της εκχύλισης το φιαλίδιο του δείγματος ψύχεται και ο διαλύτης εκχύλισης με τους αναλύτες στεριοποιείται. Στη συνέχεια μεταφέρεται άμεσα σε κωνικό φιαλίδιο, όπου ξανά υγροποιείται για περαιτέρω επεξεργασία ([Pena-Pereira et al., 2010](#)).



Σχήμα 6. Σχηματική αναπαράσταση των τεχνικών μικροεκχύλισης . όπου :A direct immersion SDME (two-phase), B direct immersion SDME (three-phase), C headspace SDME, D U-shaped HF-LPME (three-phase), E U-shaped HF-LPME (two-phase), F rod-shaped HF-LPME (two-phase).



Σχήμα 7. Hollow-fiber microextraction (HF-LPME)



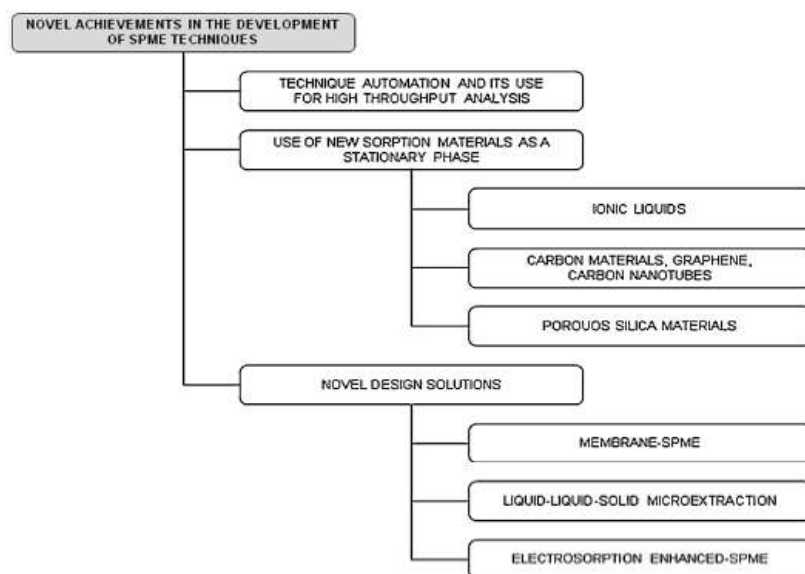
Σχήμα 8. Dispersive liquid liquid microextraction (DLLME)

1.2 Solid phase extraction (SPE)

Το 1991 δημοσιεύεται για πρώτη φορά στο περιοδικό *Nature* (Iijima, 1991) η δημιουργία μικροσωληνίσκων άνθρακα με διάμετρο έως και 2,2 nm. Είναι η αρχή για την δημιουργία της SPE η οποία χρησιμοποιείται ευρύτατα για την απομόνωση οργανικών ουσιών. Η SPE χρησιμοποιείται και για την απομόνωση φυτοφαρμάκων από διάφορα υποστρώματα χάρις στη μεγάλη αποδοτικότητα της αλλά και στη χρησιμοποίηση λιγότερης ποσότητας διαλυτών σε σχέση με τη συμβατική LLE (Ravelo-Pérez et al., 2010).

1.2.1 Solid-phase microextraction (SPME)

Η συγκεκριμένη τεχνική εισήχθη πρώτη φορά το 1993 και είναι μια από τις πιο δημοφιλείς για την απομόνωση ουσιών από πολύπλοκα υποστρώματα. Έχει πολλά πλεονεκτήματα όπως: 1) απλή στην χρήση, 2) ευέλικτη, 3) χαμηλό κόστος εξοπλισμού, 4) μικρός χρόνος εκχύλισης, 5) μικρές ποσότητες διαλυτών, 6) πιθανότητα συλλογής δείγματος *in situ* και *in vivo*, 7) πιθανή αυτοματοποίηση, 8) πιθανή εκφόρση των αναλυτών στο σύστημα της χρωματογραφίας, 9) γραμμικότητα σε μεγάλο εύρος αναλυτών, 10) χρησιμοποίηση μη τοξικών διαλυτών. Η εκχύλιση πραγματοποιείται είτε με την εμβάπτιση της ίνας στο υπό ανάλυση υγρό ή αέριο δείγμα είτε με την αιώρηση της ίνας πάνω το υπό εξέταση δείγμα (Head space SPME-HD SPME) (Spietelun et al., 2013(a), Abdulra'uf, et al 2012, Bagheri & Biziuk, 2008, Xu et al., 2014, Rial-Otero et al., 2007). Υπάρχουν πολλά υλικά που χρησιμοποιούνται για την κατασκευή της ίνας στην οποία και πραγματοποιείται η εκχύλιση. Οι νέες τάσεις εμπεριέχουν υλικά όπως γραφένιο, μικροσωλήνες άνθρακα (CNTs), μικρο-ίνες άνθρακα (CNFs), μοριακά αποτυπωμένα πολυμερή (MIPs), μεταλλοοργανικά σύμπλοκα, πολυπυρόλιο, οξείδια μετάλλου, πυρίτιο, φουλουρένιο, νανοδιαμάντια, (Xu et al., 2013, Zhang et al., 2013, Tian et al., 2013; Augusto et al., 2013), όπως επίσης και αγώγιμα πολυμερή. (Bagheri et al., 2013).



Σχήμα 9. Οι νέες τάσεις στην SPME (*Spietelun et al., 2013a*)

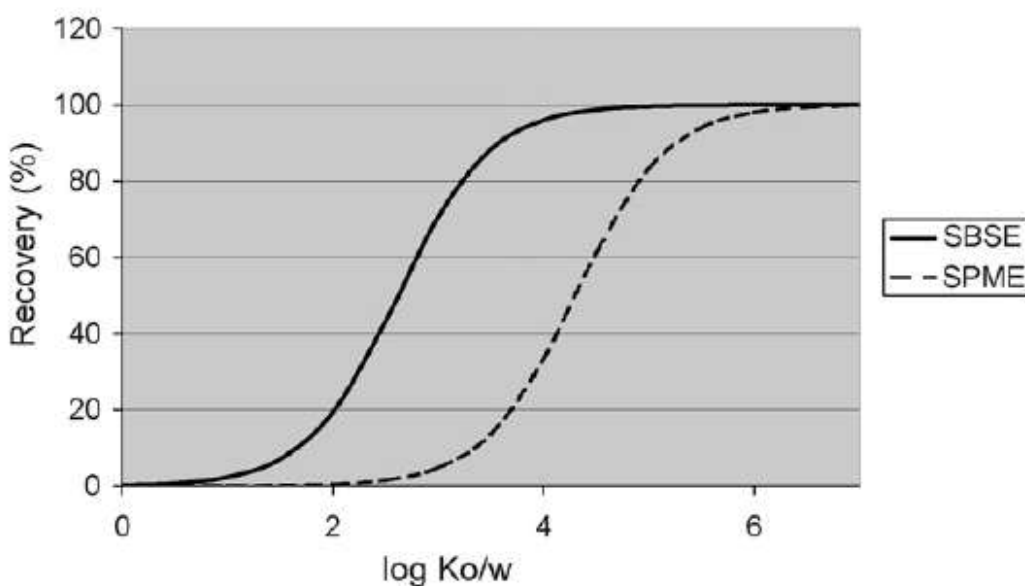
1.2.2 Μικροσωλήνες άνθρακα (CNTs) στην SPME

Οι μικροσωλήνες άνθρακα έχουν διάμετρο της τάξης των nm και μήκος της τάξης των μm. Η επιφάνεια του κυμαίνεται από 150-1500 m²/g και μπορούν να θεωρηθούν ως ένα φύλλο γραφενίου σε σχήμα κυλίνδρου. Στους μικροσωλήνες άνθρακα μπορούν εύκολα να προσαρμοστούν οργανικά μόρια ώστε να αυξηθεί η ειδικότητα τους σε σχέση με συγκεκριμένους αναλύτες. Εκτός όμως από τους μικροσωλήνες άνθρακα, υπάρχουν και οι μικροίνες άνθρακα (CNFs) οι οποίες έχουν επιφάνεια μεγαλύτερη από τους μικροσωλήνες >1877 m²/g και χρησιμοποιούνται κυρίως για την απορρόφηση αερίων (*Zhang et al., 2013*).

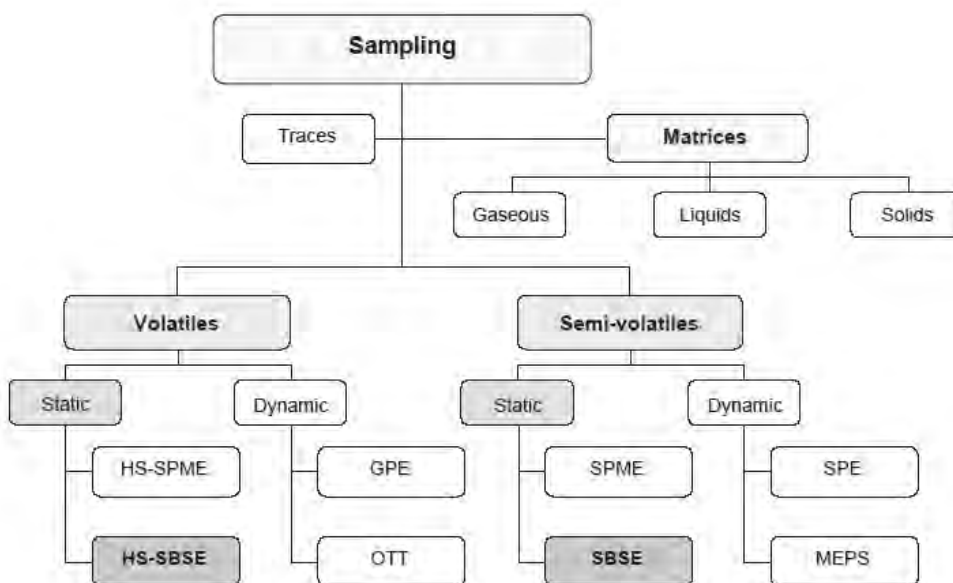
1.2.3 Stir-bar sorbet extraction (SBSE) & Molecularly-imprinted stir-bar sorptive extraction (MI-SBSE)

Η τεχνική (MI-SBSE) βασίζεται στην κατανομή των αναλυτών μεταξύ ενός υγρού δείγματος και ενός μαγνήτη (μπάρα) ανάδευσης ο οποίος είναι επικαλυμμένος με μοριακά αποτυπωμένο πολυμερές (*Martin., 2013*). Το 2006 οι *Zhu et al* δημιούργησαν μία μπάρα ανάδευσης επικαλυμμένη με μοριακά αποτυπωμένο πολυμερές με την αποτύπωση του οργανικοφωσφορικού φυτοφαρμάκου monocrotophos. Η ανάκτηση του φυτοφαρμάκου ανήρθε στο 95% και σε πολύ πιο σύντομο χρόνο συγκρινόμενη με την SBSE (Stir Bar Solid Phase Extraction), τεχνική που βασίζεται στην επικάλυψη μιας αναδευόμενης μπάρας με πολυδιμεθυλοσιλοξάνιο. Τα ίδια τα μοριακά αποτυπωμένα πολυμερή όμως χρησιμοποιούνται κυρίως ως ίνες εκχύλισης λόγω της μεγάλης ειδικότητας που έχουν κυρίως για εκχύλιση ουσιών, όπως φυτοφάρμακα, τριαζίνες, φαινόλες, βαρέα μέταλλα, αντιβιοτικά κυρίως από πολύπλοκα υποστρώματα όπως τρόφιμα, αίμα, περιβαλλοντολογικά δείγματα. Ένα μειονέκτημα που έχουν τα MIPs είναι ότι υπό την επίδραση ορισμένων οργανικών διαλυτών σε μη υδατικά διαλύματα γίνεται αναδιάταξη του εσωτερικού του πολυμερούς (*Spietelun et al., 2013b*). Η τεχνική (SBSE) χρησιμοποιείται κυρίως για πτητικούς και ημι-πτητικούς αναλύτες. Δημιουργήθηκε πρώτη φορά στο Βέλγιο το 1999 και έγινε γνωστή με το εμπορικό όνομα «Twister». Αποτελείται από μια μπάρα καλυμμένη από

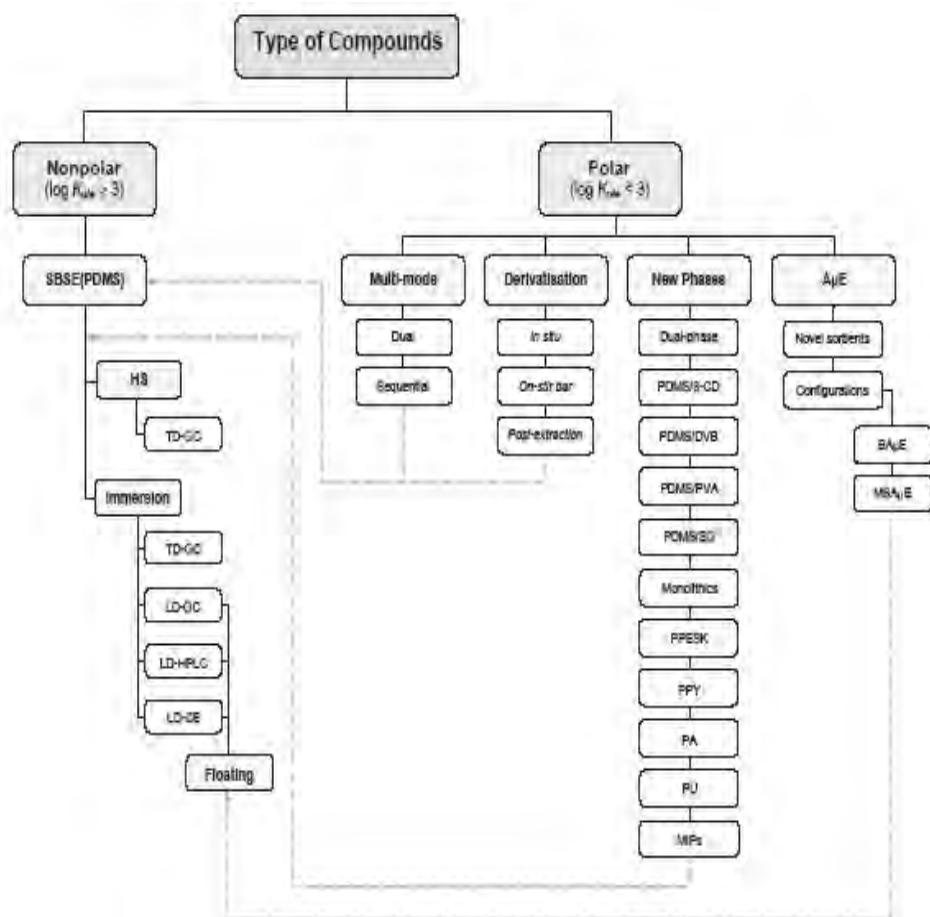
πολυδιμεθυλοσιλοξάνιο, η οποία αφού εκχυλίσει τους αναλύτες τοποθετείται σε ένα γυάλινο σωλήνα για να γίνει θερμική εκρόφηση σε σύστημα GC ή LC. Θεωρείται καλύτερη από την SPME σε θέματα ευαισθησίας και ορθότητας αλλά υστερεί στο θέμα της αυτοματοποίησης. Λόγω της μη πολικής φύσης του πολυδιμεθυλοσιλοξάνιου χρησιμοποιείται κυρίως για μη-πολικούς ή και μεσαίας πολικότητας αναλύτες ([Sánchez-Rojas et al.,2009](#), [Kawaguchi et al.,2013](#), [Huang & Yuang., 2012](#)). Η τεχνική συνοδεύεται κυρίως με παραγωγοποίηση (derivatization) ώστε να αυξηθεί ο συντελεστής οκτανόλης /νερού $K_{(o/w)}$ στους πολικούς διαλύτες με χαμηλό $K_{(o/w)}$. Εκτός από την θερμική εκρόφηση εναλλακτικά μπορεί η μπάρα να τοποθετηθεί σε φιαλίδιο των 2 mL το οποίο περιέχει μη πολικό διαλύτη (ανάλυση με GC) ή πολικό διαλύτη (ανάλυση με LC) ώστε να εκροφηθούν οι αναλύτες και να μεταφερθούν στα αντίστοιχα διαλύματα ([David & Sandra.,2007](#)).



Σχήμα 10. Θεωρητική ανάκτηση συναρτήσει του λόγου οκτανόλης /νερού μεταξύ SBSE και SPME ([David & Sandra.,2007](#).)



Σχήμα 11. Χρήση μεθόδων εκχύλισης βάσει της πτητικότητας των αναλυτών ([Nogueira.,2012](#))



Σχήμα 12. Χρήση μεθόδων εκχύλισης βάσει της πολικότητας των αναλυτών (Nogueira.,2012)

1.2.4 Εφαρμογές της SPME *in vivo*

Εκτός από τη χρησιμοποίηση της SPME για την εκχύλιση οργανικών πτητικών ενώσεων, φυτοφαρμάκων και άλλων οργανικών ουσιών από φρούτα και λαχανικά η SPME έχει και εφαρμογές *in vivo*. Χρησιμοποιείται για την απομόνωση ουσιών από φρούτα τα οποία είναι ακόμα στα δέντρα και δεν έχουν συγκομιστεί. Η τεχνική χρησιμοποιείται και στην απομόνωση οργανικών ουσιών από λουλούδια, οι οποίες είναι αρωματικές και χρησιμοποιούνται ευρύτατα στην τεχνολογία τροφίμων στην αρωματοθεραπεία, φαρμακοποιία και στη βιομηχανία των καλλυντικών (Σχήμα 13) (Zhu *et al.*,2013, Yang *et al.*,2013, Souza Silva *et al.*,2013).



Σχήμα 13. SPME *in vivo* από λουλούδι για την απομόνωση αρωματικών ουσιών

1.3 Microwave-assisted extraction- (MAE)

Είναι μια μέθοδος κατάλληλη για αναλύσεις ρουτίνας κυρίως από δείγματα εδάφους, δείγματα τροφίμων ή και από δείγματα φυτικής προέλευσης με μεγάλη περιεκτικότητα σε λίπος. Μειώνει το χρόνο εκχύλισης και έχει μεγάλη απόδοση. Η τεχνική βασίζεται στο ότι τα μικροκύματα προκαλούν κίνηση των μορίων με αποτέλεσμα την αύξηση της θερμοκρασίας η οποία και συμβάλει στη μεταφορά των αναλυτών από το υπόστρωμα στο διαλύτη. Καθώς τα μικροκύματα είναι ηλεκτρομαγνητικά κύματα, η ενέργεια που μεταφέρουν απορροφάται από πολικά μόρια ή από μείγμα διαλυτών το οποίο περιέχει πολικά μόρια π.χ μεθανόλη, ακετόνη, νερό. Το εξάνιο δεν συνίσταται ως διαλύτης γι' αυτή τη μέθοδο από μόνο του, συνήθως χρησιμοποιείται σε μείξη με κάποιο πολικό διαλύτη και χρησιμοποιείται κυρίως για την εκχύλιση φυτοφαρμάκων. Υπάρχουν δύο τύποι MAE, στο πρώτο η εκχύλιση γίνεται σε κλειστά δοχεία με ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας και πίεσης και στο δεύτερο σε ανοικτά σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης.(Tadeo *et al.*,2012, Gilbert-López *et al.*,2009).

1.4 Ultrasound-assisted extraction (UAE)

Η συγκεκριμένη τεχνική χρησιμοποιεί υπερήχους μεταξύ των 20 kHz -10MHz. Όταν ένα υπερηχητικό κύμα συναντηθεί με ένα υγρό μέσο κατά τη διάρκεια της κατεργασίας με υπέρηχους, δημιουργούνται διαμήκη κύματα,. Ως αποτέλεσμα αυτών των κυμάτων δημιουργούνται περιοχές διαφορετικής συμπίεσης όπως επίσης και κύματα αντανάκλασης, επηρεάζοντας τα μόρια του υγρού μέσου. Σ' αυτές τις περιοχές δημιουργείται το φαινόμενο της «σπηλαίωσης» όπου οι δημιουργηθείσες φυσαλίδες καταρρέουν υπό την μορφή ατμού δημιουργώντας ωστικά κύματα με τη

μορφή μικρο-πίδακα θερμοκρασίας 5500°C και πίεσης 50 MPa. Αυτοί οι μικρο-πίδακες εάν δημιουργηθούν πάνω σε στερεή επιφάνεια μπορούν να τη διαρρήξουν εντελώς. Η εκχύλιση με υπερήχους εκμεταλλεύεται αυτό το γεγονός και όταν εφαρμόζεται σε δείγματα φυτικής προέλευσης οι αναλύτες εξέρχονται από τα φυτικά κύτταρα με λύση των φυτικών κυττάρων. Η συγκεκριμένη τεχνική συνήθως δρα ως βοηθητική-προκαταρτική εκχύλιση και συνδυάζεται με μία από της παραπάνω τεχνικές (Picó.,2013). Το 2008 οι Ramos *et al* απέδειξαν ότι ο συνδυασμός αυτής της μεθόδου και της διασποράς υποστρώματος σε στερεή φάση - matrix solid-phase dispersion (MSPD) έχει σαν αποτέλεσμα τη μεγαλύτερη ανάκτηση φυτοφαρμάκων από φρούτα σε σχέση με την MSPD από μόνη της.

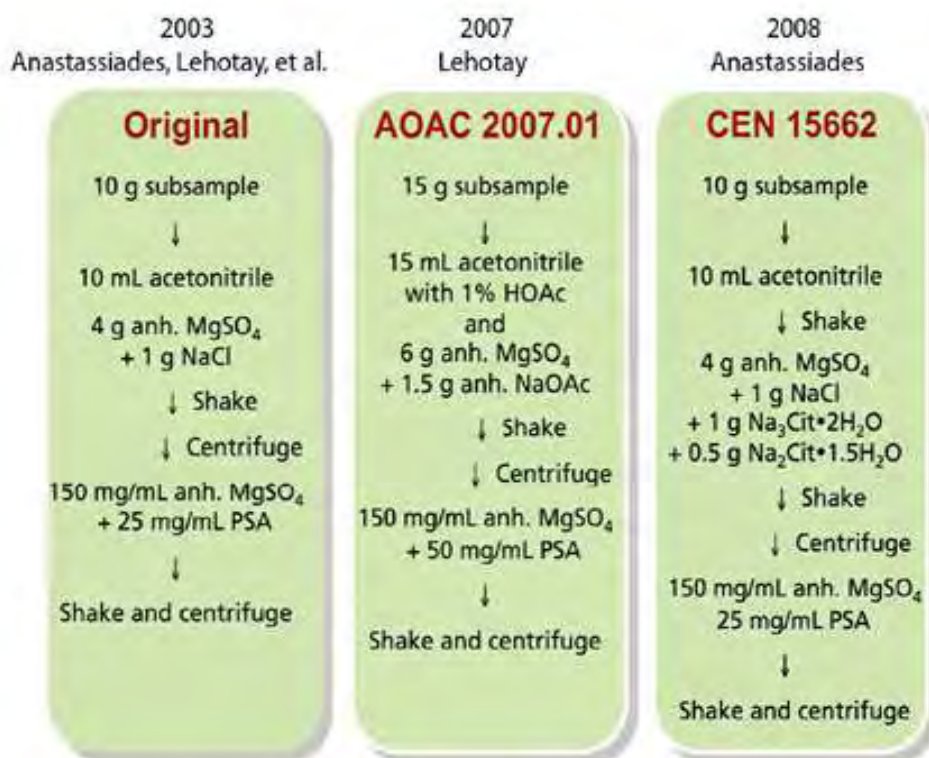
1.5 Super critical fluid extraction (SFE)

Είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται κυρίως στα περιβαλλοντολογικά δείγματα, το υπερκρίσιμο υγρό είναι κυρίως CO₂ για το λόγο ότι επιτρέπει πιο επιλεκτική εκχύλιση και αποδίδει περισσότερες κινητικές αντιδράσεις σε σχέση με τα άλλα υγρά. Η διαλυτική του δύναμη μπορεί να ρυθμιστεί αναλόγως με τη θερμοκρασία και την πίεση. Ένα από τα μεγαλύτερα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι η εύκολη απομάκρυνση του διαλύτη, αλλά υστερεί στην απόδοση όταν οι αναλύτες είναι σε μικρή συγκέντρωση. Στα μειονεκτήματα της μεθόδου συμπεριλαμβάνεται η μη καλή ανθεκτικότητα (robustness) αλλά και η επιπλέον επεξεργασία καθαρισμού (clean up) σε δείγματα τα οποία περιέχουν νερό και λίπος π.χ τρόφιμα. Προσπάθειες για ανάκτηση φυτοφαρμάκων σε παιδικές τροφές με τη συγκεκριμένη μέθοδο δεν είχαν καλά αποτελέσματα καθώς οι ανακτήσεις ήταν χαμηλές (Ridgway *et al.*,2007).

1.6 QuEChERS

Η τεχνική QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) αναπτύχθηκε πρώτη φορά από τους Anastassiades *et al.*,(2003). Η τεχνική περιλαμβάνει μικρής κλίμακας εκχύλιση με ακετυλονιτρίλιο και «clean up» του εκχυλίσματος με dispersive solid-phase extraction (d-SPE)(**σχήμα15**). Σε σχέση με τις παραδοσιακές τεχνικές η μέθοδος QuEChERS απαιτεί λίγα βήματα, μικρή ποσότητα δείγματος και αναλωσίμων εργαστηρίου. Η μέθοδος επίσης απαλείφει βήματα όπως εξάτμιση, συμπύκνωση, αλλαγή διαλυτών και μεταγγίσεις τα οποία συνήθως είναι υπεύθυνα για τυχόν απώλειες αναλυτών (Wilkowska & Biziuk .,2011, Kolberg *et al.*,2011, Payá *et al.*, 2007, Núñez *et al.*,2012a, Capriotti *et al.*,2013, Stefano *et al.*,2012). Η μέθοδος έχει υιοθετηθεί ως standard μέθοδος ανάλυσης φυτοφαρμάκων από πολλά εργαστήρια διεθνώς αλλά και είναι η standard ανάλυση φυτοφαρμάκων βάσει του European Standard Method EN 15662 και AOAC Official Method 2007.01. Πολλές μετατροπές έχουν γίνει στη μέθοδο για την προσαρμογή της στην ανάλυση φυτοφαρμάκων και σε άλλα υποστρώματα εκτός των φρούτων και λαχανικών. Τρεις είναι οι βασικές παραλλαγές της μεθόδου, 1) Η αυθεντική του 2003, 2) European Standard Method EN 15662, 3) AOAC Official Method 2007.01 (**Σχήμα 14**) (Lehotay *et al.*,2010a, Lehotay *et al.*,2007, European Standard Method EN 15662). Εκτός από τις παραλλαγές που φαίνονται στο **Σχήμα 14** μπορεί να προστεθεί ως επιλογή και η προσθήκη δεκαοκτυλίου (C-18) για την απομάκρυνση λιπαρών ουσιών από το εκχύλισμα ή και η προσθήκη άνθρακα GCB για την απομάκρυνση χρωστικών και κυρίως της χλωροφύλλης. Άλλες παραλλαγές συναντώνται στα αναλυτικά πρωτοκόλλα και έχουν να κάνουν με την προσθήκη νερού (**πινάκας 2**) αναλόγως της υγρασίας του υποστρώματος, τη ρύθμιση του pH

και την αλλαγή μερικών σταδίων αναλόγως αν η ανάλυση γίνεται με αέρια ή υγρή χρωματογραφία ([Lehotay et al.,2010a](#)).

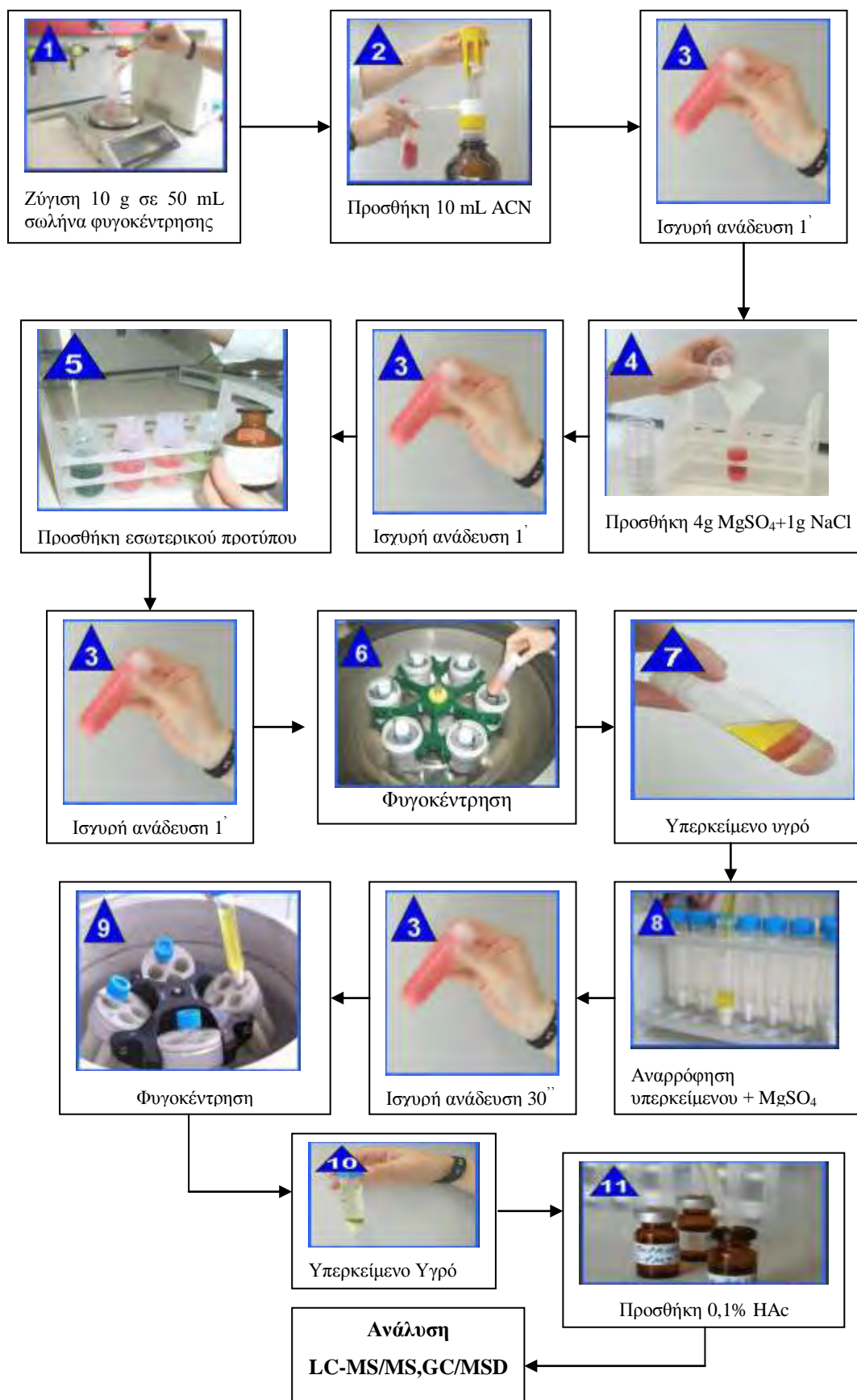


Σχήμα 14. Οι παραλλαγές της μεθόδου QuEChERS. ([Lehotay et al.,2010a](#))

Η μέθοδος αυτή έχει χρησιμοποιηθεί όχι μόνο για την εκχύλιση και απομόνωση φυτοφαρμάκων. Πολλές ουσίες προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο QuEChERS, μερικές από τις οποίες είναι ακρυλαμίδιο, κλινικά και κτηνιατρικά κατάλοιπα, τεστ σε διατροφικά συμπληρώματα και μυκοτοξίνες ([Lehotay et al.,2010b](#), [Irhan et al.,2014](#),[Park et al.,2012](#), [Pérez-Burgos et al., 2012](#)).

Πίνακας 2. Προσθήκη νερού αναλόγως της περιεκτικότητας του δείγματος σε υγρασία. ([GVUA.,2011](#))

Τύπος δείγματος	Βάρος δείγματος	Προσθήκη νερού	Σημειώσεις
Δημητριακά	5 g	10 g	-
Αποξηραμένα φρούτα	5g	7,5g	Το νερό μπορεί να προσθέτει κατά το στάδιο του κατακερματισμού. 12,5 g ομογενοποιημένο δείγματος χρησιμοποιείται.
Φρούτα και λαχανικά >80% υγρασία	10g	-	-
Φρούτα και λαχανικά με υγρασία 25-80%	10g	Xg	X=10g-υγρασία σε 10 g δείγματος
Μέλι	5g	10g	-
Μπαχαρικά	2g	10g	-



Σχήμα 15. Τα στάδια της μεθόδου Quechers (*Quechers .,2011*)

1.7 Σύγκριση μεθόδων εκχύλισης

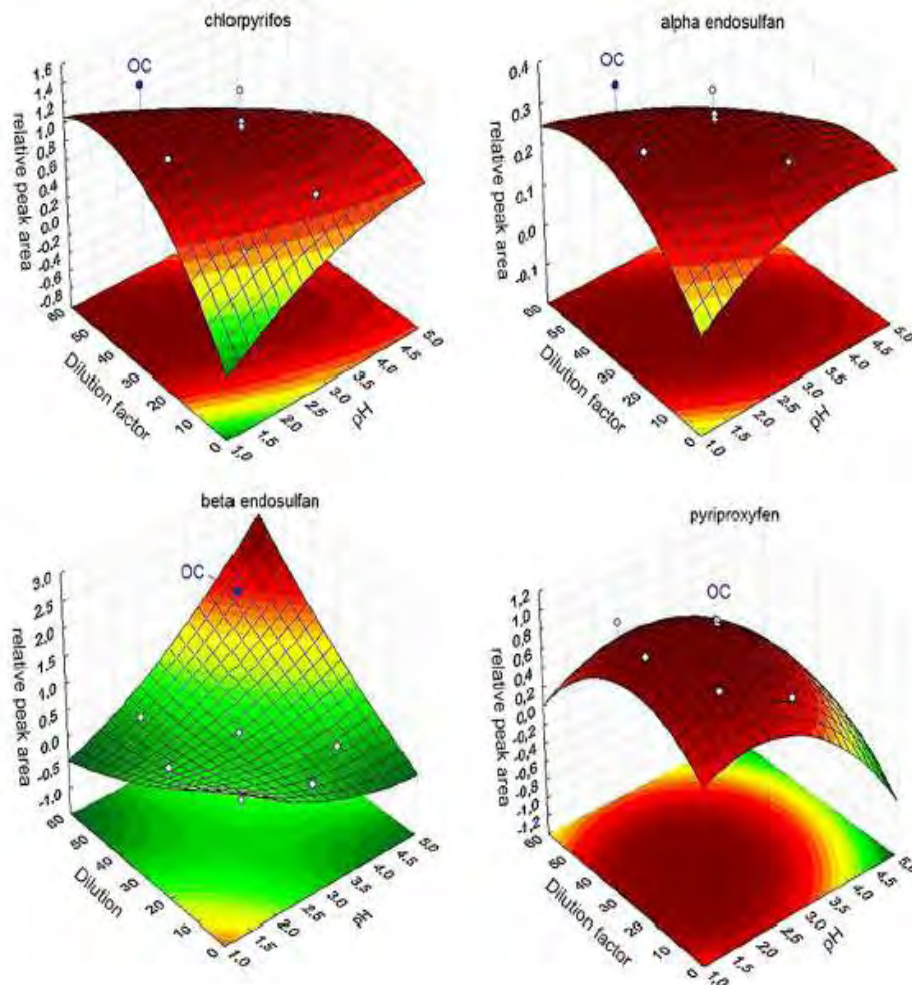
Η *Amvrizi et al.,2012* σύγκριναν τρεις διαφορετικούς τρόπους εκχύλισης για τον προσδιορισμό φυτοφαρμάκων με υπόστρωμα το μέλι. Σύγκριναν την HS-SDME την D-SDME και την LLE. Για την D-SDME το LODs κυμάνθηκε από 0,04 µg/Kg έως 2,40 µg/Kg, για την HS-SDME από 0,07-12,5 µg/Kg και για την LLE από 0,09 έως 19,3 µg/Kg. Οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η D-SDME είναι καταλληλότερη μέθοδος για τον προσδιορισμό φυτοφαρμάκων στο μέλι. Από την ίδια ερευνητική ομάδα συγκρίθηκε η απόδοση των εκχυλίσεων μικροεκχύλισης δια της σταγόνας -SDME και κατανομής σε ακετόνη -Acetone-Partition extraction (APE) με υπόστρωμα την τομάτα για την ανάλυση φυτοφαρμάκων. Η SDME απέδωσε πολύ καλύτερα αποτελέσματα σε σημείο που για ορισμένα φυτοφάρμακα το LOD ήταν έως και 138 φορές μικρότερο. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον πίνακα που ακολουθεί (*Amvrizi et al.,2010*)

Πίνακας 3. Σύγκριση μεθόδων εκχύλισης SDME και Acetone-Partition extraction

Φυτοφάρμακο	MRL (µg/ Kg)	SDME			APE		
		LOD (µg/ Kg)	LOQ (µg/ Kg)	RSD%	LOD (µg/ Kg)	LOQ (µg/ Kg)	RSD%
Metribuzin	300	0,6	2,0	9,0	8,0	25,0	6,0
Vinclozolin	50	0,1	0,5	10,3	7,0	23,0	5,7
Fosthiazate (sum of isomers)	ns	57,4	190	15,8	2450	8085	-
Procymidone	2000	0,3	1,0	12,3	6,0	19,8	11,3
Fludioxonil	1000	116	382	15,7	181	597	13,7
Kresoxim methyl	500	1,0	3,0	12,6	11,0	36,3	12,7
Fenhexamid	1000	0,5	1,7	11,9	69,0	228	11,3
Iprodione	5000	0,9	3,0	9,6	27,0	89	17,0
Bifenthrin	2000	20,3	67,0	17,8	10,0	33	19,4
λ-Cyhalothrin	100	4,3	13,0	15,3	4,0	13,2	15,6
Indoxacarb	500	6,3	20,0	8,7	10,0	34,0	18,1
Azoxystrobin	2000	17,2	51,0	6,9	228	752	2,27

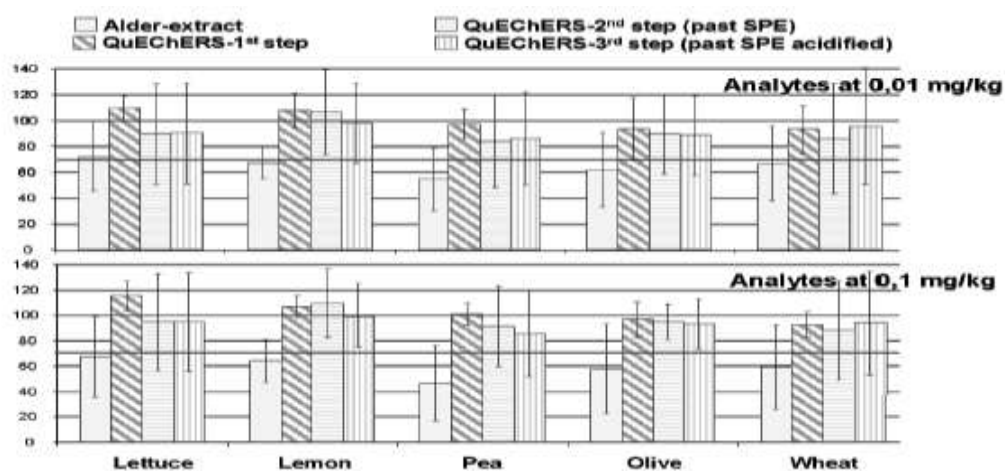
ns=not specified

Οι *Psillakis & Kalogerakis.,(2003)* σε ένα άρθρο ανασκόπησης συγκρίνουν την LPME και SDME. Οι συγγραφείς καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι η LPME είναι γρήγορη, αποτελεσματική, στην οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν πληθώρα οργανικών διαλυτών και έχει μεγάλο βαθμό επιλεκτικότητας-ειδικότητας και αναπαραγωγιμότητας με πολύ διανυγή εκχυλίσματα. Οι *Amvrizi & Tsiropoulos.,(2009)* εξέτασαν τους παράγοντες (pH και συντελεστή αραίωσης) για την ανάλυση 20 φυτοφαρμάκων χρησιμοποιώντας SDME για να εξετάσουν την ανάκτηση σε διαφορετικές συνθήκες σε μήλα και σταφύλια. Σε pH 4 και με συντελεστή αραίωσης 12,5 εντοπίστηκαν οι καταλληλότερες συνθήκες εκχύλισης με LOD 0,0003 -0,007 µg/g.(**Σχήμα 16**).

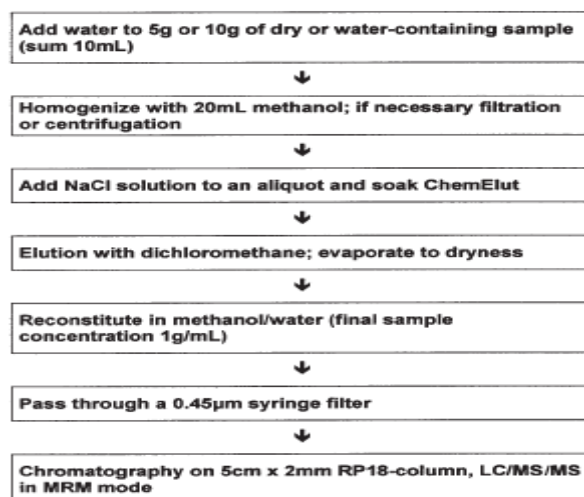


Σχήμα 16. Σχετική επιφάνεια κορυφών για την ανίχνευση φυτοφαρμάκων εξαρτώμενη από το pH και τον συντελεστή αραίωσης του δείγματος, OC (Optimum Conditions)

Τη μεγάλη δυναμική της μεθόδου Quechers ανέδειξαν οι [Riedel et al.,\(2010\)](#) όπου την σύγκριναν με τη μέθοδο [Klein & Alder.,\(2003\)](#) (**Σχήμα18**) για την ανάλυση 70 φυτοφαρμάκων. Τα αποτελέσματα (**Σχήμα 17**) έδειξαν ότι η μέθοδος Quechers υπερτερεί στην % ανάκτηση των αναλυτών στόχων έναντι της μεθόδου των Klein and Alder.

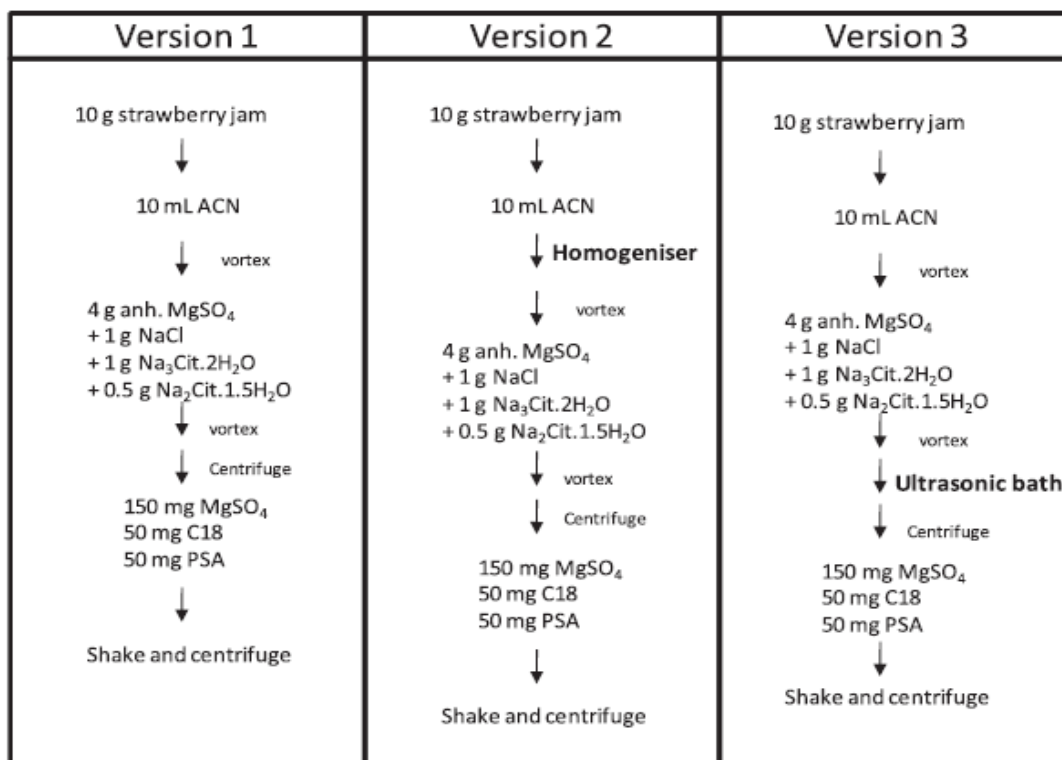


Σχήμα 17. Σύγκριση της μεθόδου Quechers και Klein and Alder (στον άξονα Y η % ανάκτηση).



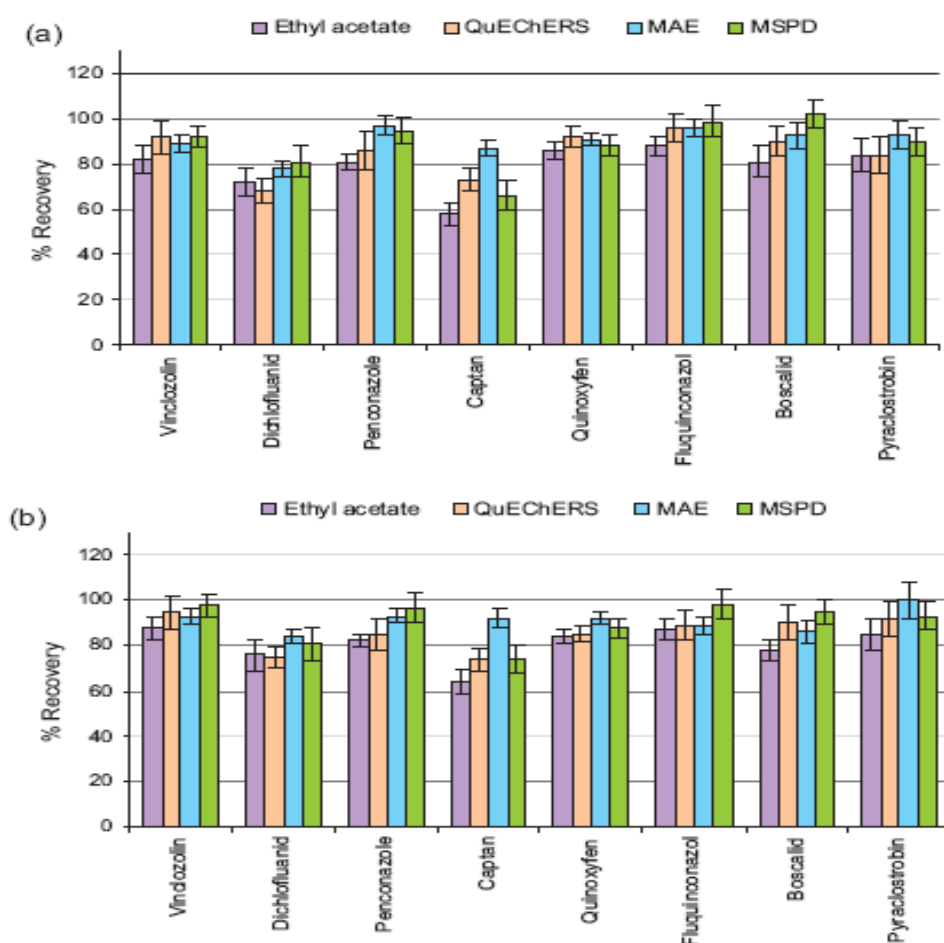
Σχήμα 18. Μέθοδος εκχύλισης Klein and Alder

Σε δημοσίευση του 2013 οι [Fan et al](#) προτείνουν την υιοθέτηση ως επίσημης μεθόδου AOAC την κινέζικη επίσημη μέθοδο προκατεργασίας (China National Standards) για την ανάλυση φυτοφαρμάκων στο πράσινο τσάι. Πραγματοποιώντας μια μελέτη για την ανάλυση 625 φυτοφαρμάκων κατέληξαν στο αποτέλεσμα ότι 201 από τα 625 φυτοφάρμακα είχαν καλύτερη ανάκτηση με την κινέζικη μέθοδο παρά με την Quechers. Οι [Fernandes et al.,\(2012\)](#) έκαναν τρεις διαφορετικές παραλλαγές (**σχήμα 19**) της μεθόδου Quechers (CEN 15652) για την ανάλυση οργανοχλωριωμένων φυτοφαρμάκων σε μαρμέλαδα φράουλα. Με τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων απεδείχθη ότι η παραλλαγή 3 ήταν η πιο αποτελεσματική.



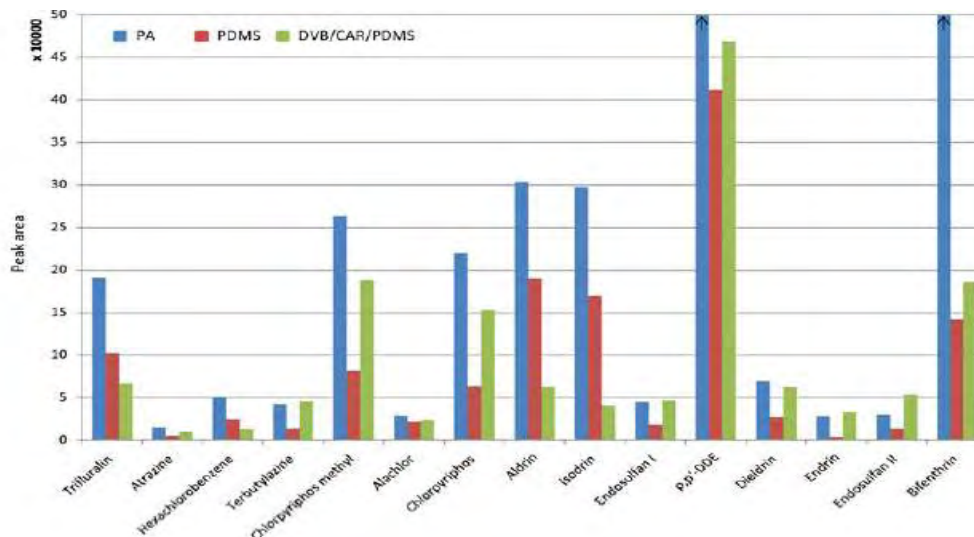
Σχήμα 19. Παραλλαγές της μεθόδου Quechers για την ανάλυση φυτοφαρμάκων σε μαρμελάδα φράουλα

Το 2011 οι *Blasco et al* σύγκριναν 4 μεθόδους εκχύλισης (Quechers, SPE, PLE και SDME) για εξετάσουν φυτοφάρμακα στο μέλι. Πρώτη σε βαθμό ανάκτησης ήρθε η Quechers (mean recovery 91,67%) δεύτερη η SPE (mean recovery 90,25%) και η PLE mean recovery 90,25%) και τρίτη η SDME (mean recovery 49,75%). Η Quechers επέδειξε και το υψηλότερο LOQ με την SDME το χαμηλότερο. Οι ερευνητές κατέληξαν ότι η SDME μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο ως μέθοδο screening για την ανάλυση φυτοφαρμάκων στο μέλι αλλά όχι για ποσοτικοποίηση λόγω της χαμηλής ανάκτησης της. Με υπόστρωμα τα σταφύλια οι *Lagunas-Allué et al.,(2012)* σύγκριναν 4 μεθόδους εκχύλισης, τις Microwave assisted extraction (MAE), matrix solid-phase dispersion (MSPD), solid-liquid extraction (SLE) και QuEChERS. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δεν υπάρχουν στατιστικές διαφορές (στην ανάκτηση) (σχήμα 20) μεταξύ των μεθόδων εκτός των περιπτώσεων των φυτοφαρμάκων captan, boscalid and penconazole.



Σχήμα 20. Σύγκριση 4 μεθόδων εκχύλισης για την ανάκτηση φυτοφαρμάκων σε σταφύλια

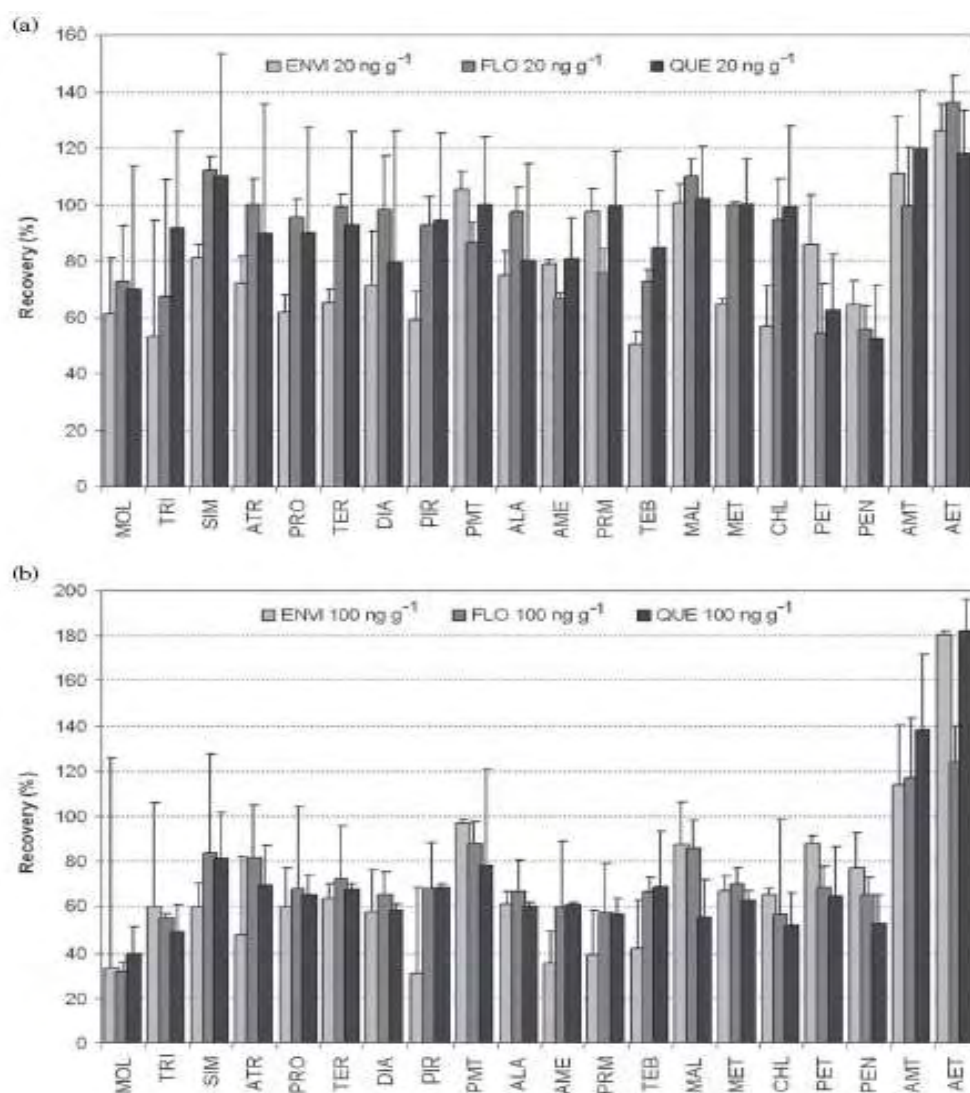
Το 2013 οι *Cherta et al(a)* σύγκριναν 3 μεθόδους εκχύλισης, την QuEChERS (AOAC Official Method 2007.01), την SPE, και την SPME σε υπόστρωμα χυμών φρούτων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η QuEChERS είναι η καταλληλότερη για την εφαρμογή στο συγκεκριμένο υπόστρωμα παρόλο που η SPME επέδειξε τα χαμηλότερα LOQs και την μεγαλύτερη ευαισθησία. Η ερευνητές σύγκριναν και διαφορετικές ίνες στην SPME και τα αποτελέσματα φαίνονται στο Σχήμα 21.



Σχήμα 21. Επιφάνεια κορυφών με SPME χρησιμοποιώντας διαφορετικές ίνες

Οι [Araújo et al., \(2012\)](#) εφάρμοσαν δύο διαφορετικές μεθόδους εκχύλισης την Ultrasound-assisted extraction (UAE) ακολουθούμενη από SPE (με στήλες ENVI 18 and Florisil και την QuEChERS για την ανίχνευση φυτοφαρμάκων σε πευκοβελόνες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο **Σχήμα 22**. Τα LODs που εξήχθησαν έχουν ως εξής: 15,96 ng/g για την UAE + ENVI 18, 11,36ng/g UAE + Florisil και 16,67 ng/g για την QuEChERS.

Με υπόστρωμα μαγειρεμένες πατάτες, ρύζι και ρεπάνι οι [Park et al.,\(2011α\)](#) σύγκριναν την επίσημη μέθοδο της Κορεάτικης υπηρεσίας ελέγχου τροφίμων και φαρμάκων (KFDA) και την Quechers για τον προσδιορισμό 41 φυτοφαρμάκων σε μαγειρεμένα φαγητά. Εκτός των φυτοφαρμάκων dichlofluanid, tetraconazole, oxadixyl, fenbuconazole και paclobutrazol και οι δύο μέθοδοι έδωσαν παρόμοιες ανακτήσεις. Οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η Quechers μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των υπολειμμάτων των φυτοφαρμάκων στα μαγειρεμένα φαγητά.



Σχήμα 22. Ανακτήσεις φυτοφαρμάκων με τρεις διαφορετικές μεθόδους εκχύλισης σε πευκοβελόνες

2. ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ

Από το 2002 η Ε.Ε έχει θεσπίσει την οδηγία (2002/657/EK) σχετικά με την επίδοση αναλυτικών τεχνικών και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων αυτών. Στον πίνακα 4 παρουσιάζονται οι παράμετροι επίδοσης.

Πίνακας 4. Παράμετροι επίδοσης αναλυτικών τεχνικών σύμφωνα με την οδηγία 2002/657/EK

ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ		
Παράμετροι επίδοσης ανεξάρτητες από μοντέλο	Παράμετροι επίδοσης εξαρτώμενες από μοντέλο	
Κοινά χαρακτηρίστηκα επίδοσης	Προσέγγιση συμβατικής επικύρωσης	Προσέγγιση εσωτερικής επικύρωσης
Ειδικότητα Ορθότητα Ανθεκτικότητα (μεταβολές ήσσοнос σημασίας) Σταθερότητα	Ανάκτηση Επαναληψιμότητα Ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγικότητα Αναπαραγωγικότητα Όριο απόφασης (CCa) Ικανότητα ανίχνευσης (CCb) Καμπύλες βαθμονόμησης Ανθεκτικότητα	Ανάκτηση Επαναληψιμότητα Ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγικότητα Αναπαραγωγικότητα Όριο απόφασης (CCa) Ικανότητα ανίχνευσης (CCb) Καμπύλες βαθμονόμησης Ανθεκτικότητα

Για τα φυτοφάρμακα ισχύει από τις 01/01/2014 βοηθητικά (δεν υπάρχει νομική καταχώρηση για την υποχρεωτική χρησιμοποίηση του) και ο οδηγός SANCO/12571/2013. Ο συγκεκριμένος οδηγός είναι βοηθητικός για την περίπτωση των φυτοφαρμάκων στα τρόφιμα & τροφές και υποχρεωτικός για τα εργαστήρια επίσημου ελέγχου. Στον πίνακα 5 φαίνονται τα κριτήρια που θέτει ο συγκεκριμένος οδηγός ο οποίος εμπεριέχει και τα κριτήρια συμμόρφωσης και εφαρμογής του ISO/IEC 17025. Ο Οδηγός περιέχει και τον υπολογισμό της διευρυμένης αβεβαιότητας η οποία απαιτείται από το ISO/IEC 17025

Πίνακας 5. Κριτήρια επικύρωσης σύμφωνα με τον οδηγό SANCO/12571/2013

Parameter	What/How	Criterion
Linearity	Calibration curve	Residuals $< \pm 20\%$
Matrix effect	Comparison of the response from solvent standards and matrix-matched standards	Asses % Matrix effect
LOQ	Lowest spiked level meeting the method performance criteria for trueness and precision	$\leq \text{MRL}$
Specificity	Response in reagent blank and blank control sample	$< 30\%$ of RL
Trueness (Bias)	Average recovery for spike levels tested	70-120%
Precision (RSD_r)	Repeatability RSD_r for spiked levels tested	$\leq 20\%$
Precision (RSD_{wR})	Within laboratory reproducibility, derived from on-going method validation/verification	$\leq 20\%$
Robustness	Average recovery and RSD_{wR} derived from on going method validation/verification	See above

2.1 Επικύρωση αναλυτικών τεχνικών κατά FDA

Τα κριτήρια επικύρωσης μιας αναλυτικής μεθόδου βάσει του FDA (Food and Drug administration) των Η.Π.Α δίνονται παρακάτω (FDA, 2012)

Recovery

Πίνακας 6. Τα αποδεκτά όρια ανάκτησης βάσει της συγκέντρωσης του αναλύτη

Συγκέντρωση	Όρια ανάκτησης
100%	98-101%
10%	95-102%
1%	95-105%
0,1%	90-108%
0,01%	85-110%
10µg/g (ppm)	80-115%
1 µg/g (ppm)	75-120%
10 µg/Kg (ppb)	70-125%

Repeatability –Precision (Sr-RSDr)

Πίνακας 7. Τα αποδεκτά όρια επαναληψιμότητας - ακρίβειας βάσει της συγκέντρωσης του αναλύτη.

Συγκέντρωση	RSDr
100%	1%
10%	1,5%
1%	2%
0,1%	3%
0,01%	4%
10µg/g (ppm)	6%
1 µg/g (ppm)	8%
10 µg/Kg (ppb)	15%

Reproducibility Precision (SR, RSDR)

Πίνακας 8. Τα αποδεκτά όρια αναπαραγωγιμότητας-ακρίβειας βάσει της συγκέντρωσης του αναλύτη

Συγκέντρωση	Αναπαραγωγιμότητα (RSDR)
100%	2%
10%	3%
1%	4%
0,1%	6%
0,01%	8%
10µg/g (ppm)	11%
1 µg/g (ppm)	16%
10 µg/Kg (ppb)	32%

Η τάση που επικρατεί τα τελευταία χρόνια είναι να γίνεται η ταυτοποίηση αλλά και ποσοτικοποίηση των φυτοφαρμάκων με φασματοσκοπία μαζών (MS) η και με (MS/MS). Στον παρακάτω πίνακα 9 φαίνονται οι απαιτήσεις και τα κριτήρια για την χρήση τεχνικών MS ([SANCO/12571/2013](#))

Πίνακας 9. Τα κριτήρια για την χρησιμοποίηση της MS στην ταυτοποίηση φυτοφαρμάκων

MS mode	Single state-MS (unit mass resolution)	Single state MS (high resolution /high mass accuracy)	MS/MS
Typical system examples	Quadrupole, ion trap, time-of flight (TOF)	TOF, Orbitrap, FTMS, magnetic sector	Triple Quadrupole, ion trap, hybrid MS (e.g Q-TOF, Q-trap)
Acquisition mode	Full scan Limited m/z range, Selected ion monitoring (SIM)	Full scan, Limited m/z range, selected ion monitoring (SIM)	Selected/multiple reaction monitoring (SRM/MRM), full scan product ion spectra
Requirements for identification	≥3 diagnostics ions, preferably including the (quasi) molecular ion	≥2 diagnostics ions, preferably including the (quasi) molecular ion; mass accuracy <5ppm; at least one fragment ion	≥2 products ion

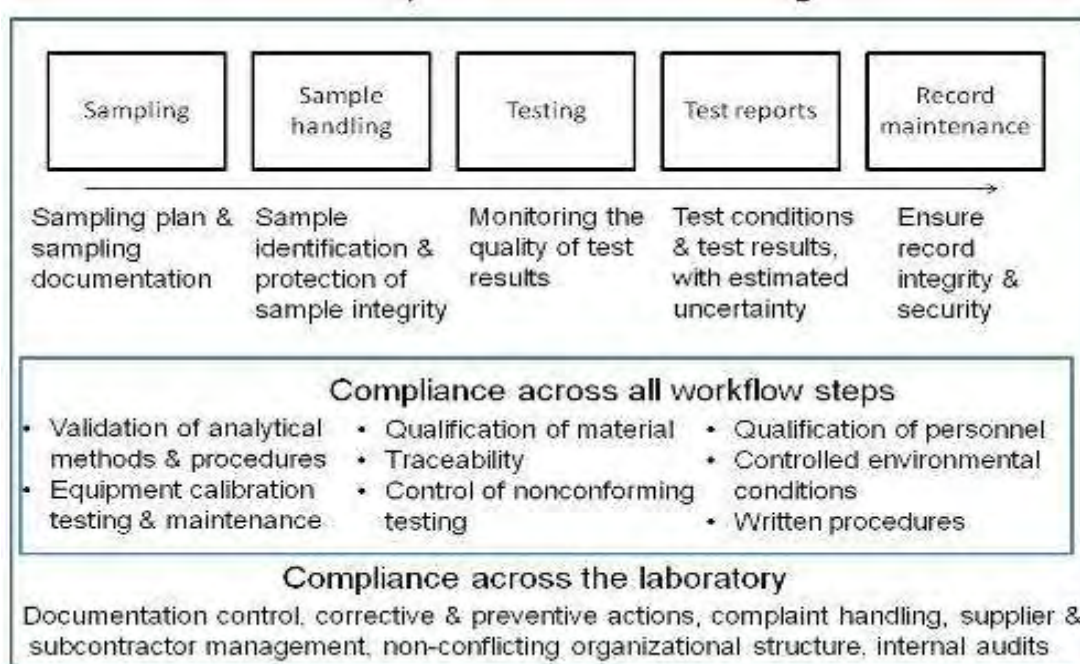
2.2 Απαιτήσεις ISO/IEC /17025 για την διαπίστευση αναλυτικών εργαστηρίων στα πλαίσια της διασφάλισης ποιότητας

Η σχέση του ISO/IEC /17025 και του ISO 9001/2008 μπορούν να συνοψιστεί στο **Σχήμα 23**. Το ISO /IEC/17025 είναι υποχρεωτικό βάσει του κανονισμού 882/2004 για τα εργαστήρια που εκτελούν επίσημες αναλύσεις. Στις τεχνικές απαιτήσεις του

προτύπου περιλαμβάνονται οι παρακάτω παράμετροι: 1) Ανθεκτικότητα, 2) αναπαραγωγιμότητα, 3) ιχνηλασιμότητα, 4) Γραμμικότητα, 5) Επίδραση υποστρώματος, 6) Απόδοση εκχύλισης. Στα δεδομένα επικύρωσης μια μεθόδου συμπεριλαμβάνονται: 1) Πλάνο επικύρωσης, 2) Αρχεία μελετών επικύρωσης (δεδομένα, αποφάσεις και αποτελέσματα), 3) χρήση υλικών αναφοράς, 4) Συμμετοχή σε διεργαστηριακά τεστ ([UKAS.,2007](#)). Ένα πλάνο των απαιτήσεων του συγκεκριμένου προτύπου φαίνεται στο **Σχήμα 24**.



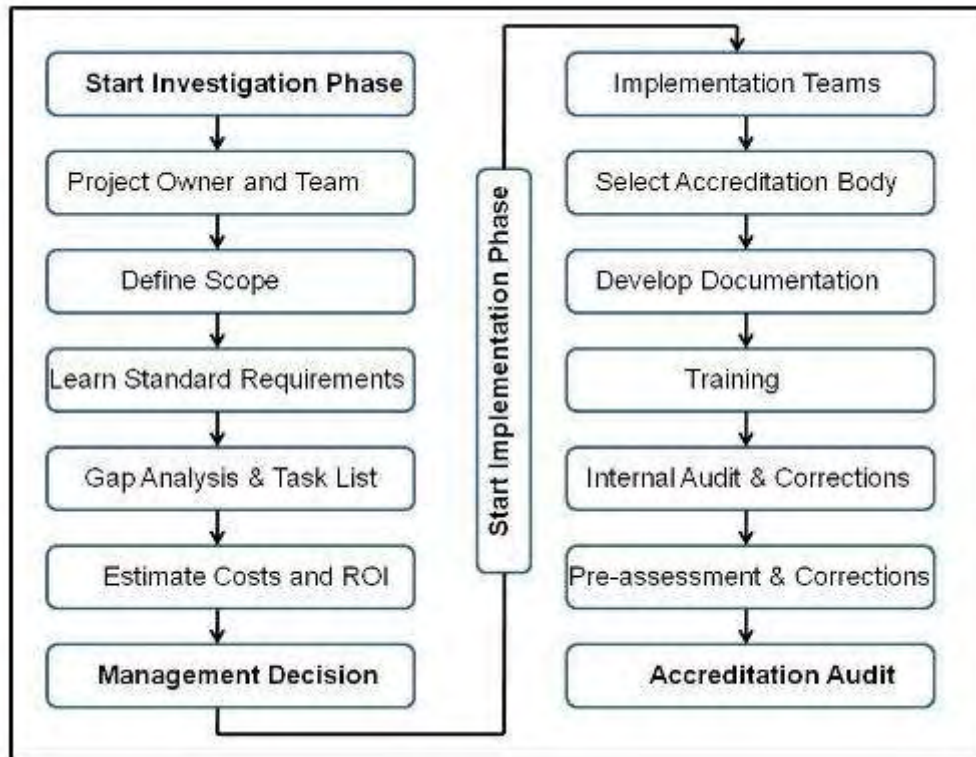
Σχήμα 23. Σχέση ISO 9001:2008 και ISO/IEC /17025 ([Valcárce & Lucena.,2013](#))



Σχήμα 24. Απαιτήσεις του ISO/IEC /17025 ([Lab compliance.,nd](#))

Στην Ε.Ε τα εργαστήρια αναφοράς κάθε χώρας-μέλους συμμετέχουν σε διεργαστηριακά test (δοκιμές) με σκοπό να αξιολογηθούν μέσω του Εργαστηρίου αναφοράς φυτοφαρμάκων (Eu Reference Laboratories for residues of pesticides) για την ικανότητα προσδιορισμού υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε φρούτα και

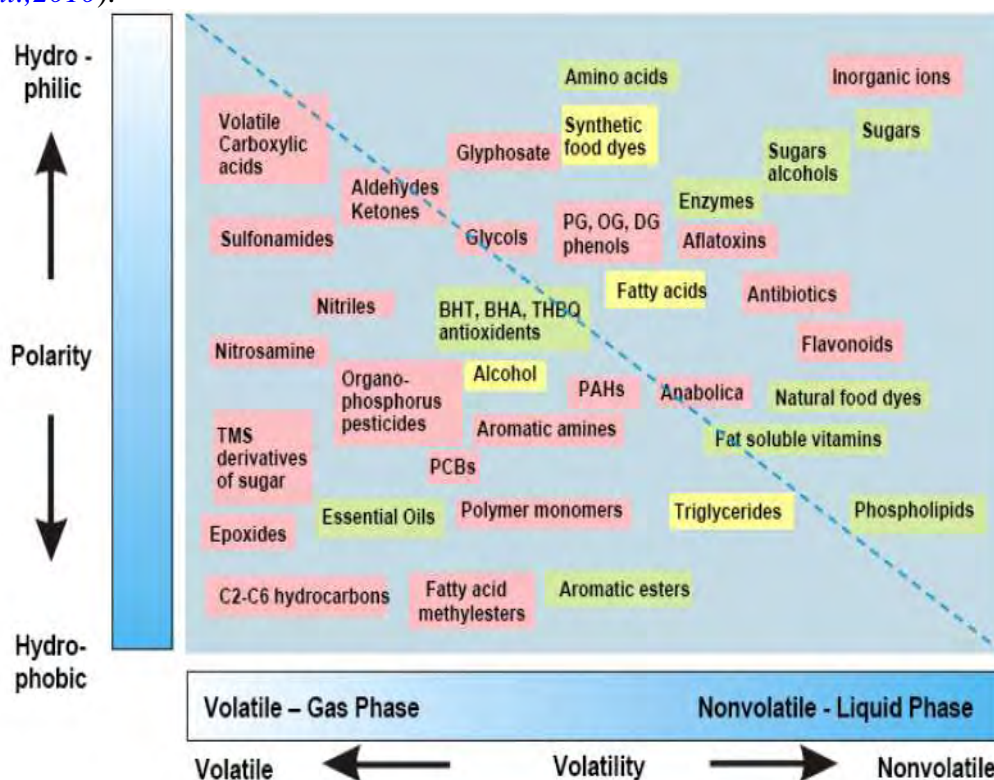
λαχανικά, όπως επίσης σε δημητριακά, τρόφιμα ζωικής προέλευσης & υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά καθώς και για εξειδικευμένες (single residue) μεθόδους. Μέχρι το 2008 από αυτές τις διεργαστηρικές δοκιμές δημιουργήθηκε μια πολύτιμη βάση δεδομένων με πάνω από 12000 αποτελέσματα για υπολείμματα φυτοφαρμάκων (*Medina-Pastor et al.,2010*). Όλα τα βήματα για να γίνει μια διαπίστευση κατά ISO/IEC /17025 φαίνονται στο **Σχήμα 25**.



Σχήμα 25. Όλα τα βήματα για να επιτευχθεί μια διαπίστευση κατά ISO/IEC /17025(*Lab compliance.,nd*). Η επιλογή φορέα διαπίστευσης πλέον δεν είναι εφικτή, καθώς ο φορέας διαπίστευσης είναι υποχρεωτικά από την χώρα της έδρας του εργαστηρίου, εκτός ειδικών περιπτώσεων.

3.ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

Η χρωματογραφική ανάλυση περιλαμβάνει μια σειρά μεθόδων διαχωρισμού μιγμάτων ανόργανων ή και οργανικών ουσιών στις επιμέρους ενώσεις που αποτελούν το μίγμα. Ο διαχωρισμός αυτός επιτυγχάνεται με την κατανομή των συστατικών του μίγματος μεταξύ δυο φάσεων, μιας κινητής και μιας στατικής. Το προς διαχωρισμό μίγμα εισέρχεται με τη βοήθεια μιας ρευστής (κινητή) φάσης σε μια προσροφητική (στατική) φάση με μεγάλη ειδική επιφάνεια, και τα συστατικά του διαπερνούν με διαφορετική ταχύτητα την προσροφητική φάση λόγω της διαφορετικής κατανομής τους, μεταξύ της κινητής και της στατικής φάσης. Το σήμα καταγράφεται ως συνάρτηση του χρόνου από την έναρξη της ροής του δείγματος στη χρωματογραφική στήλη. Οι διάφορες χρωματογραφικές μέθοδοι διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τη φύση της κινητής φάσης (υγρή και αέρια) ή της στατικής (στερεό ή υγρό πάνω σε στερεό υπόστρωμα), ως προς τον πρώτο μηχανισμό στον οποίο οφείλεται ο διαχωρισμός (προσρόφηση, ιονταλλαγή, κατανομή, μέγεθος μορίων) και ως προς το μέσο στο οποίο έχει τοποθετηθεί η στατική φάση (στήλη, λεπτή στοιβάδα πάνω σε γυάλινη πλάκα, χαρτί). Σε κάθε χρωματογραφικό πείραμα εισάγεται στην είσοδο της στήλης ένα δείγμα που περιέχει διάφορα συστατικά. Όλα τα συστατικά του δείγματος ξεκινούν την ίδια χρονική στιγμή από την ίδια θέση της στήλης, αλλά καθένα από αυτά κινείται με διαφορετική ταχύτητα λόγω του διαφορετικού συντελεστή κατανομής μεταξύ κινητής και στατικής φάσης. Στην έξοδο της στήλης τα διάφορα συστατικά του δείγματος εμφανίζονται σε διαφορετικούς χρόνους και μπορούν να ανιχνευτούν από ένα ανιχνευτή εμφανιζόμενες ως καμπύλες Gauss. (Δεληγιαννάκης *et al.*, 2010).



Σχήμα 26. Ανάλυση διαφόρων ουσιών με υγρή ή αέρια χρωματογραφία βάσει της πτητικότητας και πολικότητας αυτών (Agilent Inc.,nd)

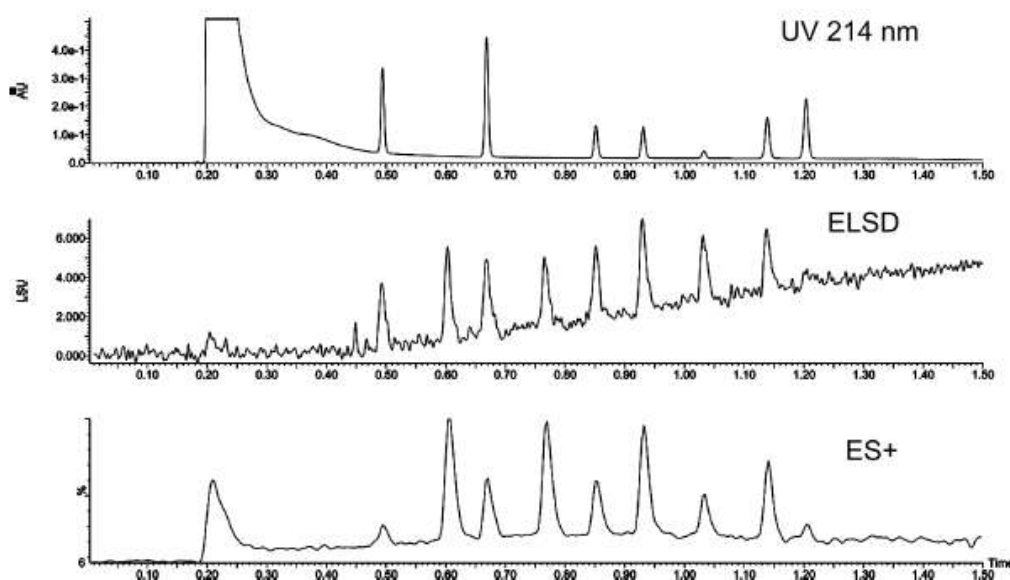
3.1 Ανιχνευτές στη υγρή χρωματογραφία

Υπάρχουν διάφοροι ανιχνευτές (**πίνακας 10**) που χρησιμοποιούνται στην υγρή χρωματογραφία (HPLC), κάθε τύπος ανιχνευτή εκμεταλλεύεται ένα από τα παρακάτω χαρακτηριστικά (*Swartz.,2010*):

1. Μια ιδιότητα της ύλης ή μια διαφορική μέτρηση
2. Μια συγκεκριμένη ιδιότητα του αναλύτη
3. Τροποποιήσεις της κινητής φάσης
4. Συνδυασμό τεχνικών

Τα επιθυμητά χαρακτηριστικά των ανιχνευτών είναι

1. Μεγάλη ευαισθησία και αναπαραγωγιμότητα.
2. Να αποκρίνονται σε όλες τις διαλυτές ουσίες ή και να έχει προβλέψιμη ειδικότητα.
3. Ευρεία γραμμική περιοχή λειτουργίας, απόκριση με την οποία αυξάνεται η γραμμικότητα σε αντίστοιχη αύξηση του αναλύτη.
4. Απόκριση η οποία δεν επηρεάζεται από αλλαγή στη ροή της κινητής φάσης ή στη θερμοκρασία.
5. Ανεξάρτητη απόκριση σε σχέση με την κινητή φάση.
6. Να μην συμβάλουν σε τυχόν διεύρυνση ζώνης που τυχόν οφείλεται στη στήλη.
7. Αξιόπιστα και εύκολη χρήση.
8. Μη καταστροφή της διαλυμένης ουσίας.
9. Να παρέχουν ποσοτικά και ποιοτικά χαρακτηριστικά στην ανιχνευόμενη κορυφή.
10. Γρήγορη απόκριση.



Σχήμα 27. Σύγκριση χρωματογραφημάτων για τον προσδιορισμό ενός μείγματος ουσιών, μεταξύ του ανιχνευτή UV (214 nm), ELSD (Evaporative light scattering detector) και MS (mass spectrometry ESI+)(*Swartz.,2010*)

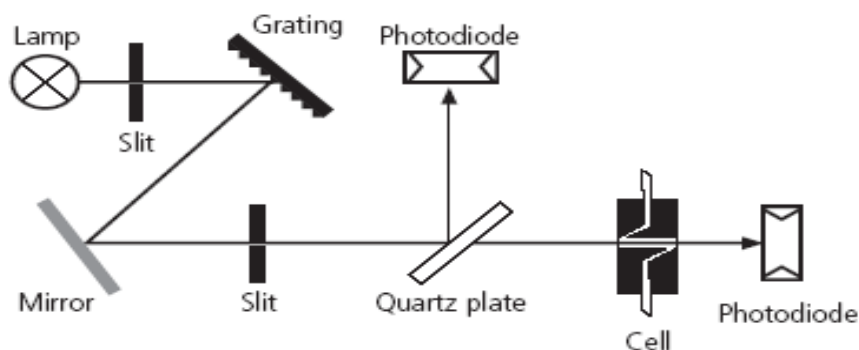
Πίνακας 10. Οι διάφοροι τύποι ανιχνευτών που χρησιμοποιούνται στην υγρή χρωματογραφία

Ανιχνευτής	Βασικά χαρακτηριστικά	Περιορισμοί
UV/Vis/PDA(Photodiode Array-Σειράς φωτοδιόδων)	UV:Οι πιο χρησιμοποιούμενοι ανιχνευτές, συμβατοί με βαθμιδωτή (gradient) έκλουση, ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση, PDA:καθαρότητα κορυφής/ομοιογένεια, βιβλιοθήκες φασμάτων, αναζητήσεις για ID, 3D φασματογραφήματα, μη καταστροφικοί, χαμηλό κόστος, ευκολία στην χρήση, αξιόπιστοι	Θα πρέπει η ουσία να απορροφά στο UV, Ο διαλύτης πρέπει να είναι διαφανής, Μεγάλο εύρος απόκρισης για διαφορετικές διαλυτές ουσίες
Light Scattering (σκεδασμού φωτός)	Κυρίως για μη πτητικούς αναλύτες, καλή λειτουργία με βαθμιδωτή (gradient) έκλουση, μεγαλύτερη ευαισθησία από τον RI	Απαιτεί την χρήση πτητικών ρυθμιστικών διαλυμάτων, περιορισμένη δυναμική λειτουργία, αναπαραγωγιμότητα μεθόδων.
Corona discharge (εκκένωση κορώνας)	Υψηλή ευαισθησία, ευρεία περιοχή λειτουργίας, Ανίχνευση μη πτητικών κα μεσαίος πτητικών αναλυτών, εύκολος στην χρήση, καλή απόκριση	Απαιτεί πτητικά ρυθμιστικά διαλύματα
FL (φθορισμού)	Μεγάλη ευαισθησία και ειδικότητα, δουλεύουν καλά με βαθμιδωτή (gradient) έκλουση	Δεν φθορίζουν όλες οι ουσίες συνήθως απαιτείται, παραγωγοποίηση, αμφισβητούμενο κόστος/απόδοση
Radioactivity (Ραδιενέργειας)	Συμβατοί με βαθμιδωτή (gradient) έκλουση μπορούν να προσδιορίσουν κατανομή και ισορροπία μάζας για μελέτες μεταβολισμού φαρμάκων, ευρεία δυναμική απόκριση	Μεγάλη κυψελίδα ροής, μειώνει την διαχωριστική ικανότητα, διεύρυνση κορυφών
EC (ηλεκτροχημικοί)	Πολύ ευαίσθητοι και με μεγάλη ειδικότητα, ευκολία χειρισμού	Η κινητή φάση πρέπει να είναι αγωγίμη , ευαισθησία στον θόρυβο υπόβαθρου, «ρύπανση» ηλεκτροδίου, μόνο για ουσίες που να μπορούν να οξειδωθούν ή να αναχθούν.
Conductivity (αγωγιμότητας)	Κατάλληλοι για χρωματογραφική ανάλυση ανόργανων ιόντων και ανόργανων οξέων, μεγάλη ειδικότητα, χαμηλό κόστος	Θα πρέπει να γίνεται κατάπνιξη του θορύβου λόγω αγωγιμότητας της κινητής, δεν μπορούν να ανιχνευθούν όλες οι ουσίες, απαιτεί ειδικές στήλες και συστήματα.
RI (refractive index-δείκτη διάθλασης)	Ανιχνευτής για την HPLC σε πολλές μεθόδους, εξαιρετική ευελιξία, Μη καταστρεπτικός, χαμηλό κόστος, αξιόπιστος και εύκολος στην χρήση	Ευαισθησία, ασυμβατότητα βαθμιδωτής (gradient) έκλουσης, σταθερότητα λόγω θερμοκρασίας και ροής.

3.1.1 Ανιχνευτής UV/VIS

Το είδος αυτό του ανιχνευτή (**σχήμα28**) είναι το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο. Βασίζεται στο νόμο των Beer-Lambert, όπου γίνεται σύγκριση μεταξύ της έντασης του προσπίπτοντος φωτός (I_0) και την ένταση του φωτός (I) αφού περάσει μέσα από το προς ανάλυση διάλυμα. Ο λόγος I/I_0 ονομάζεται διαπερατότητα (T). Μετά από έναν λογαριθμικό μετασχηματισμό λαμβάνεται η απορρόφηση (A) η οποία ισούται με $A = \log 1/T = \log I_0/I$. Η απορρόφηση (A) είναι ευθέως ανάλογη της συγκέντρωσης (c) του αναλύτη στο διάλυμα όταν πραγματοποιείται σε κυψελίδα πάχους (d). Συνδυάζοντας τα παραπάνω η απορρόφηση ισούται με: $A = \epsilon \cdot c \cdot d$, όπου ϵ = μοριακός

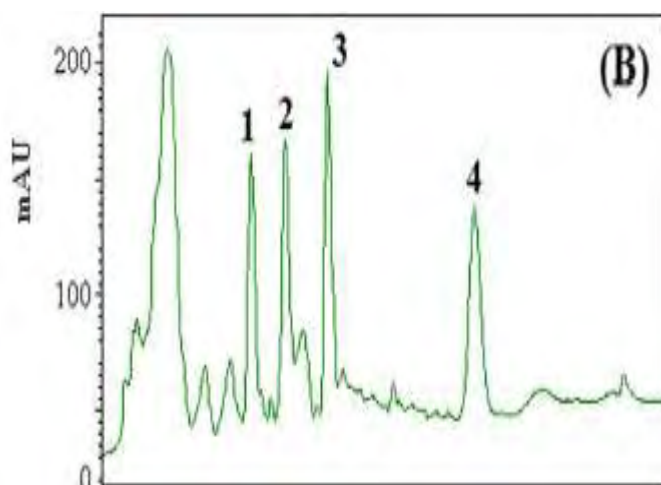
συντελεστής απόσβεσης ($L/\text{mol cm}$), $c = \text{mol/L}$ και $d = \text{cm}$. Όσο μεγαλύτερη είναι η A τόσο λιγότερο φως περνάει μέσα από την κυψελίδα.



Σχήμα 28. Τυπική διάταξη ενός ανιχνευτή UV.

Ο ανιχνευτής αποτελείται:

1. Από την λάμπα αποτελούμενη συνήθως από υδράργυρο με εκπεμπόμενη ακτινοβολία 253nm ή ψευδάργυρο (214 nm) ή κάδμιο (229 nm). Πολλές φορές μπορεί να χρησιμοποιηθεί και λάμπα δευτερίου (^2H) (190-360nm).
2. Από το μονοχρωμάτορα, παλιότερα αποτελούταν από ένα σχετικά φθινό πρίσμα. Οι πιο καινούργιοι μονοχρωμάτορες αποτελούνται από φράγματα περίθλασης (diffraction gratings).
3. Από την κυψελίδα, έχει συνήθως σχήμα «Z» με μήκος 10 mm και όγκο 8 μL και κάτω. Η κυψελίδα θα πρέπει να μην δημιουργεί φυσαλίδες και ομοιόμορφη ροή.
4. Στοιχεία ανίχνευσης φωτός, αποτελούνται κυρίως από φωτοδιόδους (ημιαγωγοί με αντίσταση εξαρτώμενη από το φως) οι οποίοι είναι σχετικά φθινοί και μικροί. Δυο φωτοδιόδοι είναι απαραίτητοι, ένας για το φως που έρχεται από την κυψελίδα και ένας για να αποκρίνεται στην διακύμανση της ακτινοβολίας της λάμπας (μέτρηση αρχικής ακτινοβολίας).
5. Υπολογιστής λογαριθμικού μετασχηματισμού, είναι ένας μικρο-υπολογιστής ο οποίος κάνει τους απαραίτητους μετασχηματισμούς στα σήματα εξόδου από τις φωτοδιόδους ώστε να γίνει η σύγκριση. (*Lendi & Meyer., 2005*).

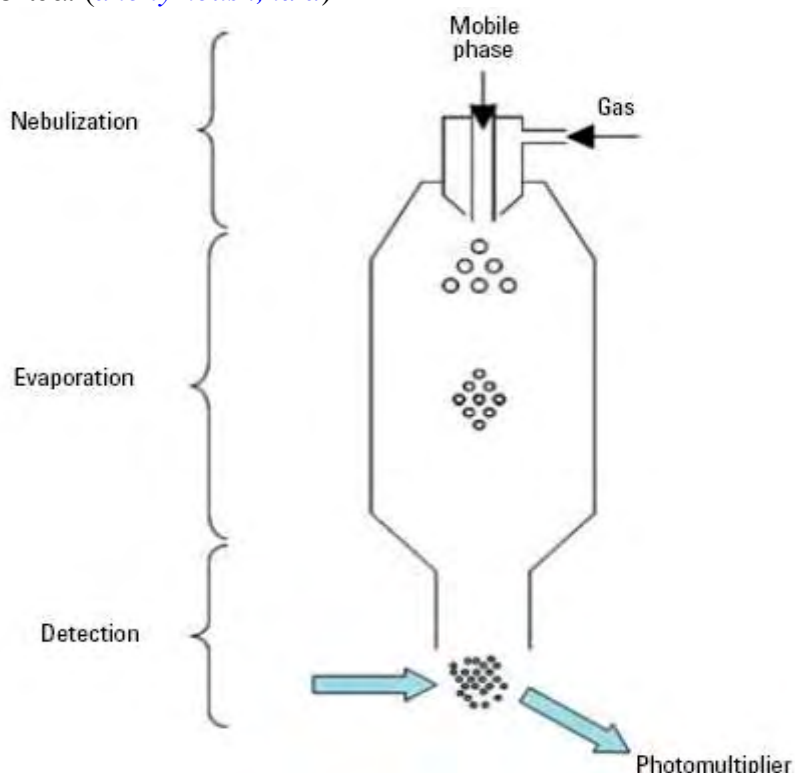


Σχήμα 29. Χρωματογράφημα HPLC-UV για την ανίχνευση φυτοφαρμάκων σε λαχανικά. Όπου 1: Diazinon, 2: phosale, 3) fenthion, chloropyrifose. (*Pirsaheb et al., 2013*).

3.1.2 Ανιχνευτής Light Scattering ή (ELSD)

Ο συγκεκριμένος ανιχνευτής μπορεί να χρησιμοποιηθεί για αναλύτες όπου είναι χαμηλότερης πτητικότητας από την κινητή φάση. Ημη-πτητικοί αναλύτες μπορούν να αναλυθούν και ποσοτικοποιηθούν σε συγκεντρώσεις της τάξης των ng ανά ένεση. Στον ανιχνευτή η κινητή φάση εισέρχεται, εξατμίζεται σε στοιχείο θέρμανσης και οι αναλύτες προσδιορίζονται με βάση την σκέδαση του φωτός (**σχήμα 30**). Η ένταση της σκέδασης του φωτός από τα στερεά σωματίδια (αναλύτες) εξαρτάται από το μέγεθος των σωματιδίων, κριτήριο το οποίο επηρεάζει και την περαιτέρω απόκριση του ανιχνευτή. Το μέγεθος των σωματιδίων εξαρτώνται από την συγκέντρωση των αναλυτών αλλά και από το νεφελοποιητή. Τρία είναι τα βασικά στάδια:

1. Νεφελοποίηση της κινητής φάσης η οποία εξέρχεται από τη στήλη της HPLC. Όσο πιο μεγάλες είναι οι σταγόνες τόσο πιο μεγάλη θερμοκρασία απαιτείται.
2. Εξάτμιση της κινητής φάσης, στο στάδιο αυτό η νεφελοποιημένη κινητή φάση συμπαρασύρεται από αέριο (carrier) και οδηγείται στο στοιχείο-μέρος εξάτμισης. Η θερμοκρασία κυμαίνεται από 40-60 °C όπου γίνεται πλήρης εξάτμιση της κινητής απελευθερώνοντας τα σωματίδια του αναλύτη.
3. Ανίχνευση, τα σωματίδια μεταφέρονται σε μια κυψελίδα ροής όπου προσπίπτει επάνω τους μια δέσμη φωτός, η ποσότητα της σκέδασης του φωτός μετριέται με φωτοπολλαπλασιαστές. Σε ορισμένες συσκευές υπάρχει και δεύτερη παροχή αερίου όπου συγκεντρώνει τα σωματίδια μέσα στην κυψελίδα. (*anonymous .,nd a*)

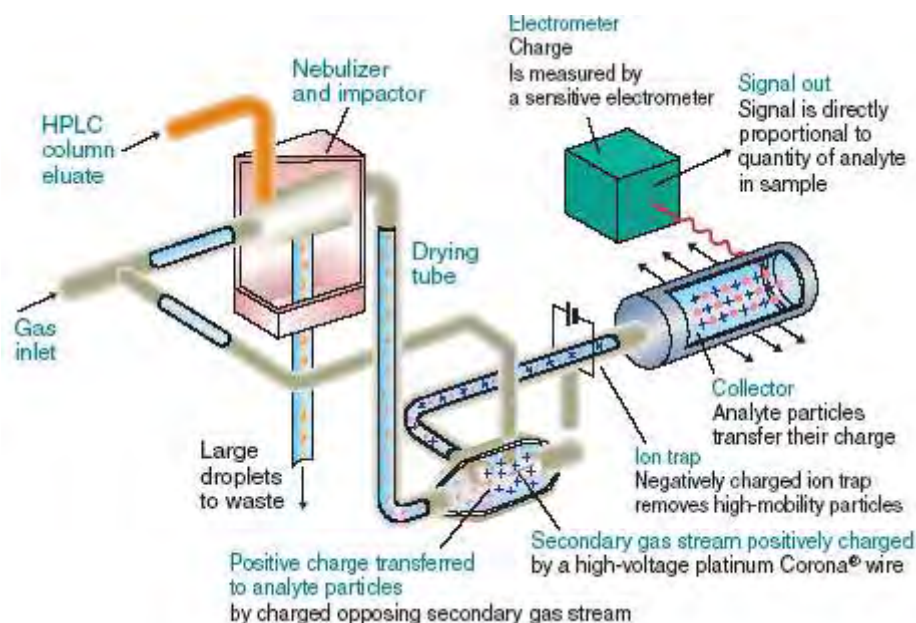


Σχήμα 30. Τυπική διάταξη ανιχνευτή Light Scattering (Xu,2008)

3.1.3 Ανιχνευτής Corona discharge

Ο συγκεκριμένος ανιχνευτής (σχήμα 31) μοιάζει πάρα πολύ με τον ELSD. Η αρχή λειτουργίας του βασίζεται στα παρακάτω:

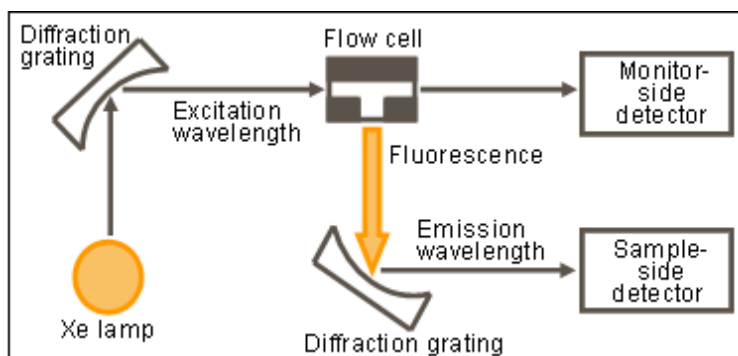
1. Νεφελοποίηση της κινητής φάσης σε πολύ μικρές σταγόνες.
2. Εισαγωγή στον σωλήνα ξήρανσης για απομάκρυνση της κινητής
3. Σύγκρουση των σωματιδίων με φορτισμένο αέριο αζώτου το οποίο έχει δημιουργηθεί με εκκένωση κορώνας. Τα σωματίδια πλέον είναι φορτισμένα θετικά.
4. Μέτρηση της έντασης των φορτισμένων σωματιδίων.



Σχήμα 31. Τυπική διάταξη ανιχνευτή Corona discharge (SHIMADZU CORPORATION.,2008)

3.1.4 Ανιχνευτής FL

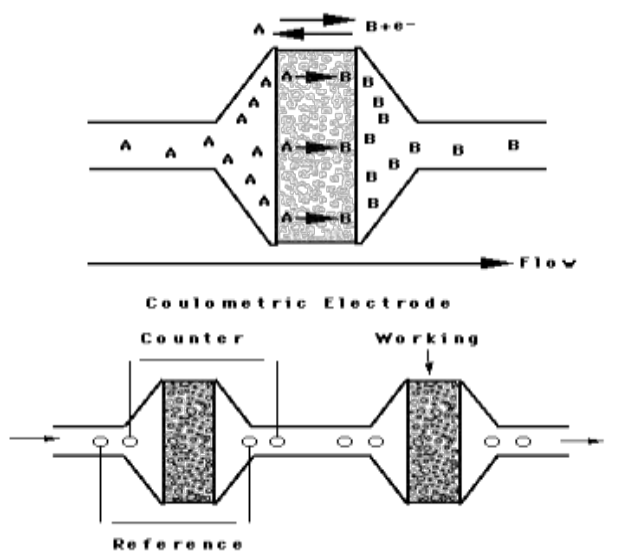
Ορισμένες ουσίες έχουν την ιδιότητα να φθορίζουν σε συγκεκριμένα μήκη κύματος. Οι ουσίες αυτές απορροφούν ενέργεια σε προκαθορισμένο μήκος κύματος όπου διεγείρονται σε υψηλό επίπεδο ενέργειας. Όταν γίνεται η αποδιέγερση εκπέμπουν ακτινοβολία (φωτόνια) ικανή να ανιχνευθεί από έναν ανιχνευτή. Αυτοί οι ανιχνευτές έχουν πολύ μεγάλη ειδικότητα και ευαισθησία. (Hitachi corporation.,nd)



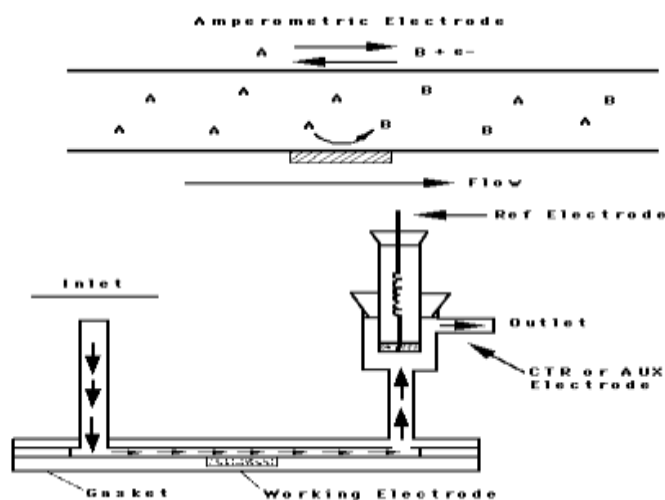
Σχήμα 32. Τυπική διάταξη ανιχνευτή FL

3.1.4 Ανιχνευτής EC

Ο ανιχνευτής αποτελείται από 3 τρία ηλεκτρόδια, το εργασίας (working), το ηλεκτρόδιο μέτρησης (counter) και το ηλεκτρόδιο αναφοράς (reference). Μεταξύ του ηλεκτροδίου αναφοράς και εργασίας εφαρμόζεται ένα σταθερό δυναμικό. Αυτό το δυναμικό οδηγεί σε μια ηλεκτροχημική αντίδραση (με τον αναλύτη) στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας. Το ρεύμα που δημιουργείται στο ηλεκτρόδιο εργασίας εξισορροπείται από ρεύμα αντίθετης κατεύθυνσης στο ηλεκτρόδιο μέτρησης. Το ρεύμα που προκύπτει από το ηλεκτρόδιο εργασίας ενισχύεται και αναπαριστάται γραφικά συναρτήσει του χρόνου ως κορυφή στη συσκευή καταγραφής. Το δυναμικό που εφαρμόζεται στο ηλεκτρόδιο εργασίας μετριέται σε σχέση με ένα γνωστό δυναμικό που λαμβάνεται από το ηλεκτρόδιο αναφοράς. Τα ηλεκτρόδια μπορούν να εμφανιστούν με πολλές γεωμετρίες. Υπάρχουν τρεις μορφές ηλεκτροδίων εργασίας. 1) Κουλορομετρικό «flow through» (σχήμα 33) , 2) Αμπερομετρικό «wall jet», 3) Αμπερομετρικό «thin layer» (σχήμα 34).(*Thermo Fisher Scientific.,nd*).



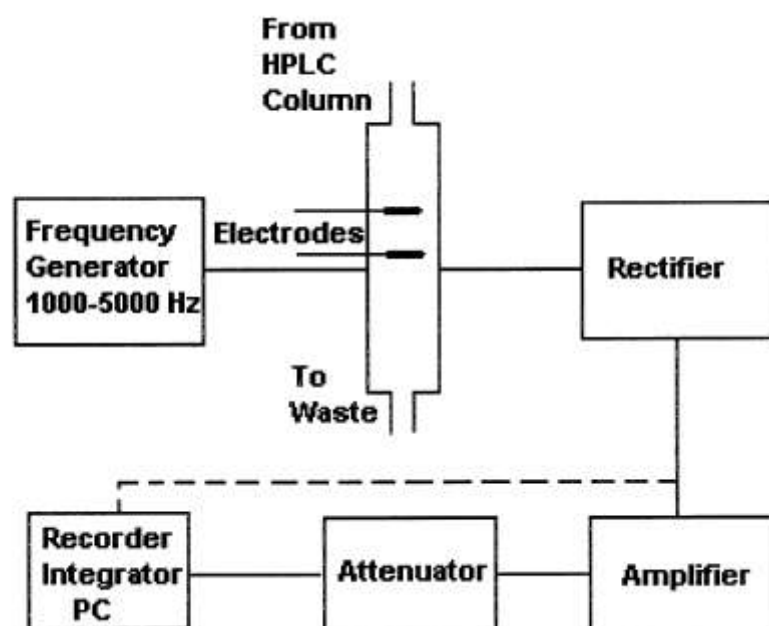
Σχήμα 33. Τυπική διάταξη ηλεκτροδίου flow through



Σχήμα 34. Τυπική διάταξη ηλεκτροδίου thin layer

3.1.5 Ανιχνευτής αγωγιμότητας

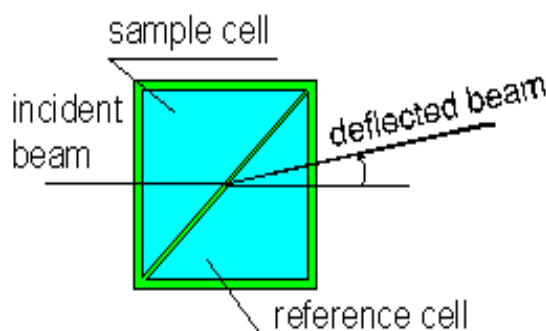
Η αρχή λειτουργίας ενός ανιχνευτή αγωγιμότητας (σχήμα 35) βασίζεται στην διαφορά δυναμικού μεταξύ της κινητής φάσης πριν αλλά και μετά όταν φέρει τον προς ανάλυση αναλύτη σε μορφή ιόντος. Χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό ανόργανων και ιοντικών οργανικών ουσιών. Το κελί αγωγιμότητας είτε τοποθετείται αμέσως μετά την αναλυτική στήλη ή μετά από μια συσκευή η οποία μειώνει τον θόρυβο (background) για να αυξηθεί ο λόγος σήματος/θορύβου για περαιτέρω αύξηση της ευαισθησίας. Η πρώτη περίπτωση ονομάζεται χρωματογραφία ιόντων απλής στήλης. Η δεύτερη περίπτωση ονομάζεται χρωματογραφία ιόντων καταστολής μέσου έκλουσης. Τα ιόντα ανιχνεύονται αφού περάσουν από μια μεμβράνη ώστε να μετατραπούν τα ιόντα σε πιο αγώγιμα είδη (π.χ σε υδροχλωρικό οξύ στην περίπτωση των χλωριούχων ιόντων). Κατά την διάρκεια μετατροπής τα ιόντα της κινητής μετατρέπονται σε χαμηλής – υπολειμματικής αγωγιμότητας μέσα όπως καρβονικό οξύ ή νερό. Η αγωγιμότητα μετριέται εφαρμόζοντας εναλλασσόμενη τάση σε δύο ηλεκτρόδια τα οποία μπορούν να είναι διαφόρων γεωμετρικών διαστάσεων μέσα σε μια κυψελίδα ροής με αποτέλεσμα, τη μετανάστευση των ανιόντων προς το θετικά ηλεκτρισμένο ηλεκτρόδιο (άνοδος) και την μετανάστευση των θετικά φορτισμένων κατιόντων προς το αρνητικά φορτισμένο ηλεκτρόδιο (κάθοδος). Ένα δυναμικό εναλλασσόμενου ρεύματος με συχνότητα 1000-5000 Hz απαιτείται ώστε να αποφευχθεί η πόλωση του ηλεκτροδίου. Το ρεύμα της κυψελίδας μετριέται και η αντίσταση του διαλύματος μετριέται με το νόμο του Ohm. Η αγωγιμότητα επιπλέον διορθώνεται από την σταθερά αγωγιμότητας της κυψελίδας. ([Papadoyannis & Samanidou.,2003](#))



Σχήμα 35. Τυπική διάταξη ανιχνευτή αγωγιμότητας

3.1.6 Ανιχνευτής RI

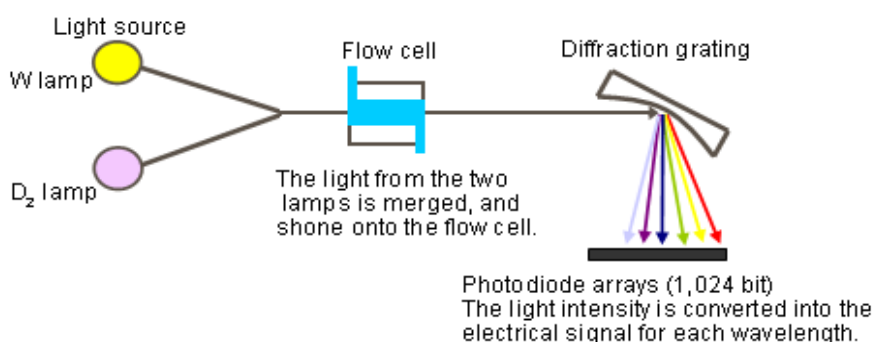
Ο συγκεκριμένος ανιχνευτής (σχήμα 36) είναι ο μοναδικός «παγκόσμιος» ανιχνευτής για την HPLC. Η αρχή ανίχνευσης βασίζεται στην μέτρηση της αλλαγής του δείκτη διάθλασης της ρέουσας φάσης από την στήλη μέσα από μια κυψελίδα ροής. Όσο μεγαλύτερη είναι η διαφορά του δείκτη διάθλασης μεταξύ της κινητής φάσης και του δείγματος τόσο μεγαλύτερη είναι και η ανισοροπία. Όσο μεγαλύτερη είναι η διαφορά στο δείκτη διάθλασης τόσο μεγαλύτερη είναι και η ευαισθησία. Πολύπλοκα υποστρώματα έχουν σαν αποτέλεσμα μεγάλο εύρος διαφορών στον δείκτη διάθλασης και μερικές φορές είναι αδύνατο να ανιχνευτούν όλοι οι αναλύτες καθώς υπερκαλύπτονται μέσα στο δείκτη διάθλασης της κινητής. Ο ανιχνευτής είναι καθαρά διαφορικό όργανο και οποιαδήποτε αλλαγή της κινητής φάσης απαιτεί επαναρύθμιση του οργάνου. Ο ανιχνευτής δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε βαθμιδωτή έκλυση. Στα πλεονεκτήματα περιλαμβάνονται η «Παγκόσμια» χρησιμοποίησή του, η χαμηλή ευαισθησία σε «βρωμιές» και ακαθαρσίες, η δυνατότητα να καλύπτει ένα εύρος από 1000 έως 1750 RI με μία απλή κυψελίδα ροής. Στα μειονεκτήματα συγκαταλέγονται η χαμηλή ευαισθησία και το δύσκολο καθάρισμα της κυψελίδας. (Anonymous.,nd b)



Σχήμα 36. Τυπική διάταξη ανιχνευτή RI

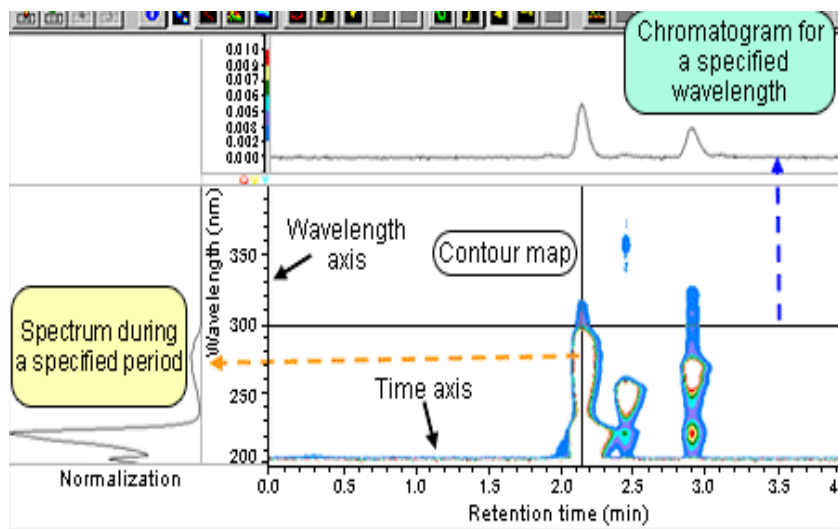
3.1.7 Ανιχνευτής DAD

Η διαφορά του ανιχνευτή DAD (σχήμα 37) με τον UV είναι ότι μπορεί να ανιχνεύσει απορρόφηση σε διάφορα μήκη κύματος. Ενώ στο UV υπάρχει μία σειρά φωτοδίοδων για την ανίχνευση του φωτός, στον DAD υπάρχουν περισσότεροι. Στο συγκεκριμένο ανιχνευτή το φως από τη λάμπα προσπίπτει απ' ευθείας στο δείγμα όπου στη συνέχεια διαχέεται από τα φράγματα περίθλασης στους φωτοδίοδους, όπου ανιχνεύουν φως σε διάφορα μήκη κύματος.



Σχήμα 37. Τυπική διάταξη ανιχνευτή DAD

Συγκρινόμενος με τον UV ο DAD έχει μειονεκτήματα, όπως ο μεγάλος θόρυβος λόγω της μικρής ποσότητας φωτός, την ευαισθησία σε διάφορες αλλαγές, διακυμάνσεις λαμπτήρα λόγω της μη μέτρησης του φωτός αναφοράς ([Hitachi corporation.,nd](#))



Σχήμα 38. Μορφή χρωματογραφήματος με ανιχνευτή DAD

3.1.8 Ανίχνευση φυτοφαρμάκων με HPLC-UV/DAD

Από τους παραπάνω ανιχνευτές ο ανιχνευτής που χρησιμοποιείται ευρέως στην ανάλυση φυτοφαρμάκων είναι ο UV. Πριν τη σύζευξη τεχνικών ήταν ο κατά κόρον ανιχνευτής για την ανίχνευση φυτοφαρμάκων με υγρή χρωματογραφία. Οι [Dos Santos et al., \(2013\)](#) χρησιμοποιώντας HPLC/UV-DAD επικύρωσαν μέθοδο για την ανάλυση φυτοφαρμάκων σε ένας είδος βοτάνου στην Βραζιλία. Χρησιμοποιώντας εκχύλιση MPSD κατάφεραν να επιτύχουν LOQ και LOD 0,05-0,07 $\mu\text{g/g}$ και 0,15-0,25 $\mu\text{g/g}$ αντίστοιχα. Ο ανιχνευτής UV χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση του φυτοφαρμάκου chromafenozide με υπόστρωμα το ρύζι [Ditya et al.,\(2012\)](#). Η χαμηλότερη συγκέντρωση που εντοπίστηκε ήταν 0,01% mg/Kg . Την ίδια χρονιά οι [Wu et al](#) επικύρωσαν μια μέθοδο χρησιμοποιώντας τον ανιχνευτή UV, με υπόστρωμα το έδαφος και εκχύλιση DLLME με LODs από 10,38 έως 15,56 $\mu\text{g/L}$ και γραμμικότητα από 50-2000 $\mu\text{g/L}$. Το 2008 με υπόστρωμα το έδαφος οι [Lourencetti et al](#) ανέπτυξαν μια μέθοδο για την ανάλυση τριών φυτοφαρμάκων με τον ανιχνευτή UV. Τα όρια ποσοτικοποίησης ανήρθαν από 0,0250 έως 0,050 mg/Kg . Το φυτοφάρμακο glyphosate σε νερά και έδαφος ποσοτικοποίησαν οι [Peruzzo et al., \(2008\)](#). Για τα νερά τα ευρήματα κυμάνθηκαν από 0,50 έως 0,70 mg/L και για το έδαφος 0,5-5 mg/L .

3.2 Ανιχνευτές στην αέρια χρωματογραφία

Οι απαιτήσεις και τα κριτήρια για έναν ανιχνευτή GC είναι τα εξής:

1. Ευαισθησία, ορίζεται ως η μικρότερη συγκέντρωση στον ανιχνευτή η οποία είναι ικανή να παράξει σήμα τουλάχιστον δυο φορές το επίπεδο του θορύβου.
2. Απόκριση, Το μέγεθος του σήματος που παράγεται από μια μονάδα συγκέντρωσης του αναλύτη στην αέρια φάση ή εναλλακτικά η ποσότητα του αναλύτη που μετριέται ως επιφάνεια κορυφής.
3. Χρόνος απόκρισης, ο οποίος προσδιορίζει τη δυνατότητα του ανιχνευτή να παράξει σήμα το οποίο με ακρίβεια ακολουθεί την αλλαγή της συγκέντρωσης του αναλύτη ή εναλλακτικά η δυνατότητα του ανιχνευτή να ανταποκριθεί στην αλλαγή της συγκέντρωσης του αναλύτη.
4. Γραμμικό εύρος λειτουργίας, το οποίο προσδιορίζει το εύρος της συγκέντρωσης του αναλύτη πάνω από το οποίο μπορεί ο ανιχνευτής να ανταποκριθεί με την ίδια ευαισθησία. (Braithwaite & Smith., 1995)

Για την αέρια χρωματογραφία έχουν εφευρεθεί πάνω από 60 ανιχνευτές και αυτοί που χρησιμοποιούνται συχνότερα φαίνονται στον **πίνακα 11** (Macknair & Miller., 1998) .

Πίνακας 11. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι ανιχνευτές στην αέρια χρωματογραφία

Εμπορικά διαθέσιμοι ανιχνευτές	Επιλεκτικότητα σε
Flame ionization (FID), ιονισμού φλόγας	Όχι
Thermal conductivity (TCD), Θερμικής αγωγιμότητας	Όχι
Electron capture detector (ECD), Σύλληψης ηλεκτρονίων	Αλογόνα
Nitrogen /Phosphorus detector (NPD), Αζώτου/Φωσφόρου	N, P
Alkali Flame ionization detector (AFID), ιονισμού φλόγας αλκαλίων	-
Thermomionic Ionization detector (TID), θερμομειωνικού ιονισμού	-
Photoionization detector (PID), φωτο ιονισμού	Αρωματικές ενώσεις
Discharge ionization detector (DID), ιονισμού αποφόρτισης	-
Helium ionization detector (HID), ιονισμού ηλίου	Όχι
Flame photometric detector (FPD), Μέτρησης φλόγας	S,P
Plasma Atomic Emission (AED), Εκπομπής Πλάσματος	Μέταλλα, αλογόνα, C,O
Hall Electrolytic Conductivity Detector (HECD), ηλεκτρολυτικής αγωγιμότητας	S,N, αλογόνα
Chemiluminescent, χημικού φθορισμού	S
Gas density detector (GADE) πυκνότητας αερίου	Όχι
Radioactivity detector, ραδιενέργειας	^3H , ^{14}C
Mass spectrometer (MS ή MSD) φασματοσκοπίας μαζών	Ναι
Fourier transformation Infrared (FTIR), Υπερύθρου (Μετατροπή σήματος μέσω μετασχηματισμών Fourier)	Ναι

3.2.1 Κατηγοριοποίηση ανιχνευτών

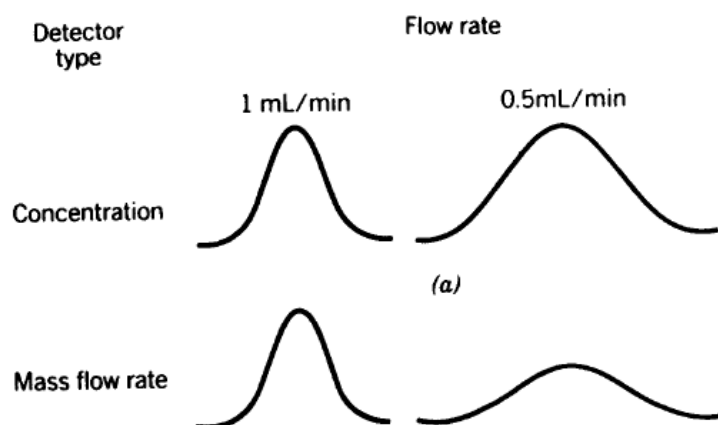
Οι ανιχνευτές κατηγοριοποιούνται βάσει 5 ιδιοτήτων τους (πίνακας 12). Αυτές είναι 1) Ο τρόπος ανίχνευσης (σχήμα 39), Concentration ή mass flow (Απευθείας βάση την συγκέντρωση του αναλύτη ή μέσω της ροής μάζας του αναλύτη συσχετιζόμενη με τη

ροή μάζας της κινητής φάσης), 2) Την επιλεκτικότητα, 3) Την καταστροφή του αναλύτη, 4) Ογκομετρικές ιδιότητες, 5) Απόδοση σήματος (*Macknair & Miller ., 1998*) . Παρακάτω περιγράφονται οι πιο βασικοί ανιχνευτές.

Πίνακας 12. Σύγκριση τριών βασικών ανιχνευτών βάσει των παραπάνω ιδιοτήτων

Απευθείας συγκέντρωση αναλύτη TCD, ECD	VS	Ροή μάζας αναλύτη FID
Επιλεκτικότητα ECD, (FID)	VS	«Παγκόσμιος» TCD
Καταστροφή αναλύτη FID	VS	Μη καταστροφή αναλύτη TCD, ECD
Ογκομετρικές Ιδιότητες TCD, ECD	VS	Συγκεκριμένη ιδιότητα FID
Αναλογικοί TCD, ECD, FID	VS	Ψηφιακοί

Για να γίνει αντιληπτή η διαφορά μεταξύ του «concentration» και «mass flow rate» ας υποθέσουμε ότι σταματά η ροή της κινητής φάσης σε έναν ανιχνευτή TCD. Ο αναλύτης που βρίσκεται στην κυψελίδα μέτρησης συνεχίζει να αποφέρει σήμα εξόδου στα καταγραφικά στοιχεία. Αν τώρα σταματήσει η ροή της κινητής φάσης προς σε έναν ανιχνευτή FID τότε το σήμα εξόδου ολοένα και θα μειώνεται καθώς ο αναλύτης για να δώσει σήμα ανίχνευσης στα καταγραφικά στοιχεία θα πρέπει να καίγεται, έτσι σταματώντας τη ροή σταματά και η καύση του αναλύτη.



Σχήμα 39. Επίδραση του ρυθμού ροής μάζας

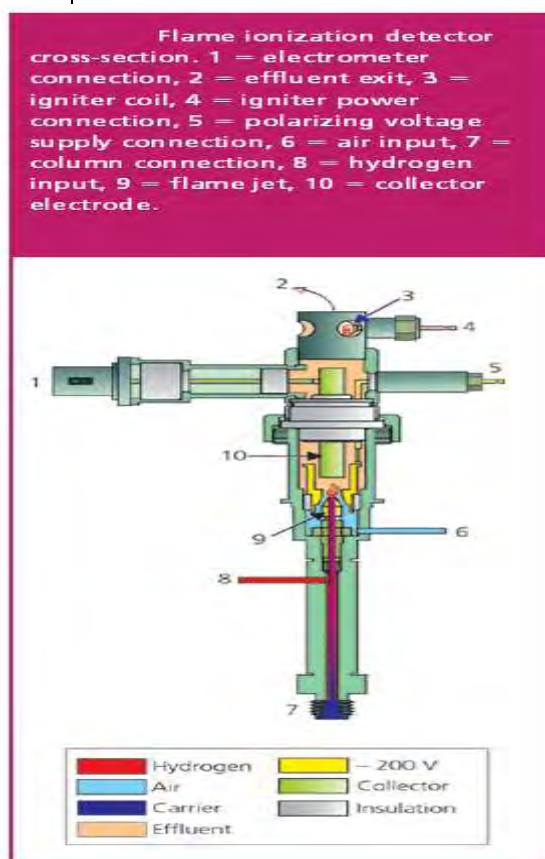
3.2.2 Ανιχνευτής FID

Ο συγκεκριμένος ανιχνευτής είναι ευαίσθητος σε μόρια τα οποία ιονίζονται σε φλόγα υδρογόνου-αέρα (**πίνακας 13**). Καθώς τα ιόντα που δημιουργούνται στο εσωτερικό του ανιχνευτή επιταχύνονται από ένα δυναμικό και κατευθύνονται προς ένα ηλεκτρόδιο δημιουργώντας ένα στιγμιαίο ρεύμα της τάξης των PA (ampere 10^{-12}). Αυτό το ρεύμα μετατρέπεται σε δυναμικό, «φιλτράρεται» και ενισχύεται όπως απαιτείται. Το εσωτερικό μέρος ενός FID ανιχνευτή απεικονίζεται στο **σχήμα 40**. Το αέριο της κινητής φάσης εισέρχεται από τον πάτο του ανιχνευτή και αναμιγνύεται με

το μείγμα υδρογόνου όπως επίσης και με το «make up» αέριο. Αυτό το μίγμα αερίων συνδυάζεται με τον αέρα και καίγεται ακριβώς πάνω από τη μύτη του εγχυτήρα. Ένα πολωμένο αρνητικό δυναμικό εφαρμόζεται μεταξύ της μύτης του εγχυτήρα και του ηλεκτροδίου συλλογής και καθώς δημιουργούνται τα ηλεκτρόνια επιταχύνονται σε όλη την άκρη της μύτης του εγχυτήρα από το ηλεκτρικό πεδίο και οδηγούνται στο ηλεκτομετρητή. Η ροή των αερίων ανάφλεξης πρέπει να ρυθμίζεται κατάλληλα, γενικά η αναλογία αέρα /υδρογόνου είναι 10/1 με ροή του υδρογόνου μεταξύ 30-45 mL/min και ροή του αέρα 300-400 mL/min. Η διάμετρος της μύτης του εγχυτήρα είναι μεταξύ 0,5-0,7mm. Η ροή της κινητής φάσης κυμαίνεται από 8-40 mL/min.(*Hinshaw., 2006a*)

Πίνακας 13. Σχετική ευαισθησία ανιχνευτή FID σε σχέση με τον αναλύτη

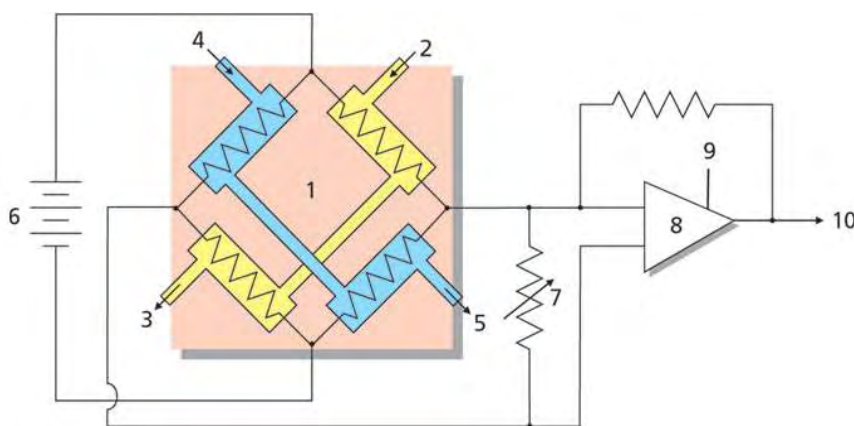
Αναλύτης	Σχετική ευαισθησία ανιχνευτή
Υδρογονάνθρακες	++
CHCl ₃	++
CHCl ₂	++
CCl ₄	++
CS ₂	+
H ₂ O	-



Σχήμα 40. Τυπική διάταξη ανιχνευτή FID

3.2.3 Ανιχνευτής TCD

Ο συγκεκριμένος ανιχνευτής (σχήμα 41) είναι από τους πρώτους που χρησιμοποιήθηκαν στην αέρια χρωματογραφία. Η αρχή λειτουργίας του βασίζεται στην μέτρηση της αγωγιμότητας της κινητής φάσης η οποία μεταβάλλεται παρουσία του αναλυτή. Ο σχεδιασμός του είναι σχετικά απλός, αποτελείται από μια ηλεκτρικά θερμαινόμενη πηγή η οποία δουλεύει σε σταθερή ισχύ. Η πηγή είναι συνήθως σύρμα χρυσού ή πλατίνας. Η αντίσταση του σύρματος εξαρτάται από την περιβάλλουσα θερμοκρασία η οποία με την σειρά της εξαρτάται από τη θερμική αγωγιμότητα της κινητής φάσης. Συνήθως έχει δυο ανιχνευτές, όπου ο ένας είναι ανιχνευτής αναφοράς (μέτρηση αγωγιμότητας της κινητής φάσης) και ο άλλος ανιχνευτής μέτρησης αγωγιμότητας μίγματος αερίου αναλύτη. Κυρίως χρησιμοποιείται ήλιο ή υδρογόνο. Χρησιμοποιείται για ανόργανες και οργανικές ουσίες, υστερεί στην ευαισθησία σε σχέση με άλλους μεθόδους ανάλυσης. (The & Woo .,nd). Συνήθως οι διαλυτές στην κινητή φάση είναι ουσίες που έχουν χαμηλότερη αγωγιμότητα από ότι το αέριο από μόνο του. Ένα μίγμα αναλύτη –αερίου παρουσιάζει χαμηλότερη αγωγιμότητα από ότι το αέριο μόνο του. Πρέπει να αποφεύγεται η χρήση του ανιχνευτή στην υψηλότερη ευαισθησία του καθώς υπάρχει κίνδυνος υπερθέρμανσης και καταστροφής του σύρματος ανίχνευσης.

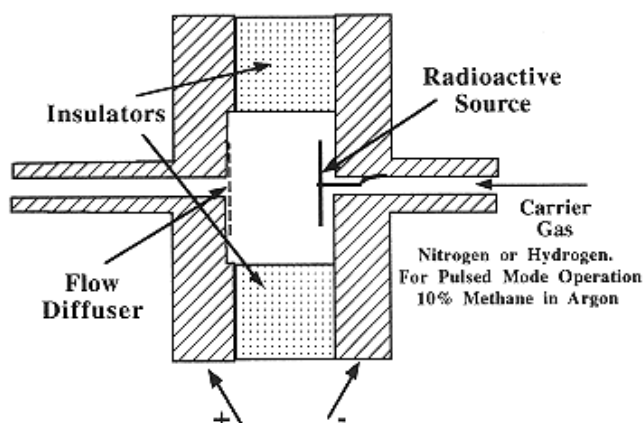


Σχήμα 41. Τυπική διάταξη ανιχνευτή TCD όπου: 1) Κυρίως μέρος ανιχνευτή, 2) Είσοδος δείγματος, 3) Έξοδος δείγματος, 4) Είσοδος αερίου αναφοράς, 5) Έξοδος αερίου αναφοράς, 6) Παροχή ισχύος, 7) Γέφυρα ανόρθωσης, 8) Ενισχυτής σήματος, 9) Διόρθωση off set ενισχυτή σήματος, 10) Μετατροπέας αναλογικού/ψηφιακού σήματος (Hinshaw., 2006b)

3.2.4 Ανιχνευτής ECD

Ο ανιχνευτής ECD (σχήμα 42) περιέχει μια ραδιενεργή πηγή χαμηλής ενέργειας ακτινοβολίας β (ηλεκτρόνια). Το ραδιενεργό στοιχείο που χρησιμοποιείται είναι κυρίως το ισότοπο του νικελίου ^{63}Ni . Ο ανιχνευτής μπορεί να λειτουργήσει σε δύο διαφορετικές λειτουργίες: Τη λειτουργία DC όπου ένα συνεχές δυναμικό εφαρμόζεται στους ανιχνευτές – ηλεκτρόδια και την λειτουργία παλλόμενου δυναμικού (pulsed potential) όπου ένα παλλόμενο δυναμικό εφαρμόζεται. Όταν ένα μόριο υψηλής ηλεκτοαρνητικότητας περάσει στον ανιχνευτή (μέσω της αέρια φάσης) όπως π.χ μια ουσία που περιέχει αλογόνο, τα παραγόμενα από τη ραδιενεργή πηγή ηλεκτρόνια συλλαμβάνονται από το μόριο το οποίο και φορτίζεται. Η κινητικότητα των ηλεκτρονίων που έχουν συλληφθεί από το μόριο συγκρινόμενα με τα ελεύθερα ηλεκτρόνια μειώνεται σημαντικά όπως επίσης εξουδετερώνονται με πιθανά θετικά

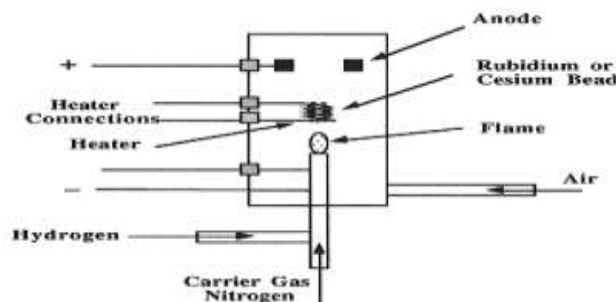
φορτισμένα μόρια λόγω συγκρούσεων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δραματική μείωση του ρεύματος στο ηλεκτρόδιο ανιχνευτή. Ως σχεδιασμός, ο ανιχνευτής αποτελείται από ένα μικρό θάλαμο 1-2 mL σε όγκο με κατάλληλη μόνωση, τα μεταλλικά άκρα δρουν κυρίως ως ηλεκτρόδια και ως ρυθμιστές ροής του αερίου. Σε αυτά τα μεταλλικά άκρα συνδέεται ηλεκτρικά (στον αρνητικό πόλο της παροχής ρεύματος) και η κυψελίδα με το ραδιενεργό υλικό. Στην έξοδο του ανιχνευτή υπάρχει ένας διαχύτης ροής, το ρεύμα στο ηλεκτρόδιο μετριέται με ενισχυτές και θερμομειωνικές βαλβίδες (Ryamond., 1996). Είναι ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος ανιχνευτής για αλογονομένες όσο και για αρωματικές ουσίες οι οποίες επίσης αποδίδουν σήμα (Chung et al., 2011)



Σχήμα 42. Τυπική διάταξη ανιχνευτή ECD

3.2.5 Ανιχνευτής NPD

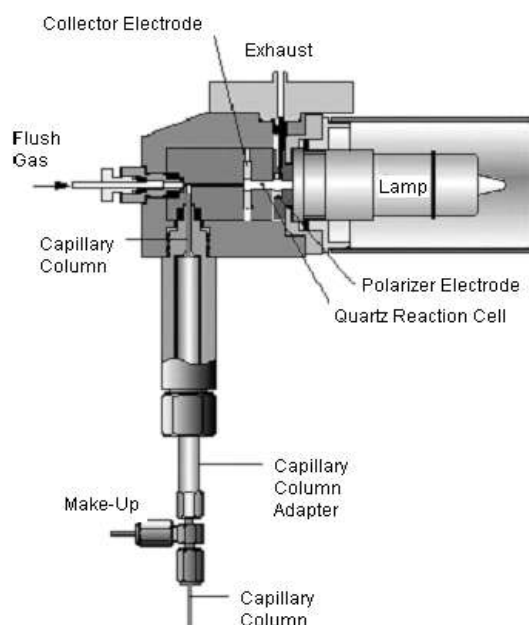
Ο συγκεκριμένος ανιχνευτής (σχήμα 43) δεν διαφέρει από τον FID σαν σχεδιασμό. Η διαφορά έγκειται στο γεγονός ότι αντί για τη φλόγα υδρογόνου/αέρα υπάρχει ένα θερμαινόμενο στοιχείο αποτελούμενο από πυριτικό ρουβίδιο στο οποίο όταν περάσει από επάνω του μόριο το οποίο περιέχει άζωτο ή φώσφορο εκπέμπει ηλεκτρόνια τα οποία ανιχνεύονται από τα στοιχεία καταγραφής και τα οποία παράγουν σήμα ανάλογο του FID. (Tissue ., 2000). Το σήμα παράγεται καθώς τα αναφλεγόμενα στοιχεία άζωτο και φώσφορος απορροφώνται από το στοιχείο του πυριτικού ρουβιδίου, αυτά τα στοιχεία μειώνουν την λειτουργική επιφάνεια με αποτέλεσμα να αυξάνεται η εκπομπή ηλεκτρονίων και η ένταση του ρεύματος στην άνοδο. Είναι ένας ανιχνευτής μεγάλης ευαισθησίας στα μόρια που περιέχουν άζωτο ή φώσφορο. (Ryamond., 1996).



Σχήμα 43. Τυπική διάταξη ανιχνευτή NPD

3.2.6 Ανιχνευτής PID

Ο ανιχνευτής (σχήμα 43) χρησιμοποιεί ακτινοβολία UV για να ιονίσει τους αναλύτες καθώς αυτοί εξέρχονται από τη στήλη. Στην αρχή της δημιουργίας του δεν θεωρήθηκε από τους σταθερούς ανιχνευτές έως ότου έγινε η τροποποίηση και διαχωρίστηκε η πηγή ενέργειας με τον θάλαμο ιονισμού. Όταν ένα μόριο απορροφά ακτινοβολία συγκεκριμένης ενέργειας διαχωρίζεται στο μητρικό μοριακό ιόν και ηλεκτρόνιο. Αυτό το ιόν μπορεί να συλλεχθεί από ένα ηλεκτρόδιο και το παραγόμενο ρεύμα να είναι ανάλογο των ιόντων. Ο σχεδιασμός του ανιχνευτή περιλαμβάνει μια λάμπα UV ενσωματωμένη σε μια χαμηλή όγκου θερμοστατούμενη κυψελίδα. Η πηγή του ιονισμού και η κυψελίδα πρέπει να διαχωρίζεται με διάφανο παράθυρο. Για φωτόνια υψηλής ενέργειας ως παράθυρα συνήθως χρησιμοποιούνται μέταλλα φθορίου. Η λάμπα ιονίζει ουσίες στις οποίες το δυναμικό ιονισμού είναι χαμηλότερο από την ενέργεια που παρέχει η λάμπα. Η βασική λάμπα ιονισμού είναι αυτή με αέριο αργού με εκπεμπόμενη ενέργεια 11,7 eV. Η ευαισθησία του ανιχνευτή αυξάνει με την αύξηση του αριθμού των ατόμων άνθρακα. (Colòn & Baird., 2004)

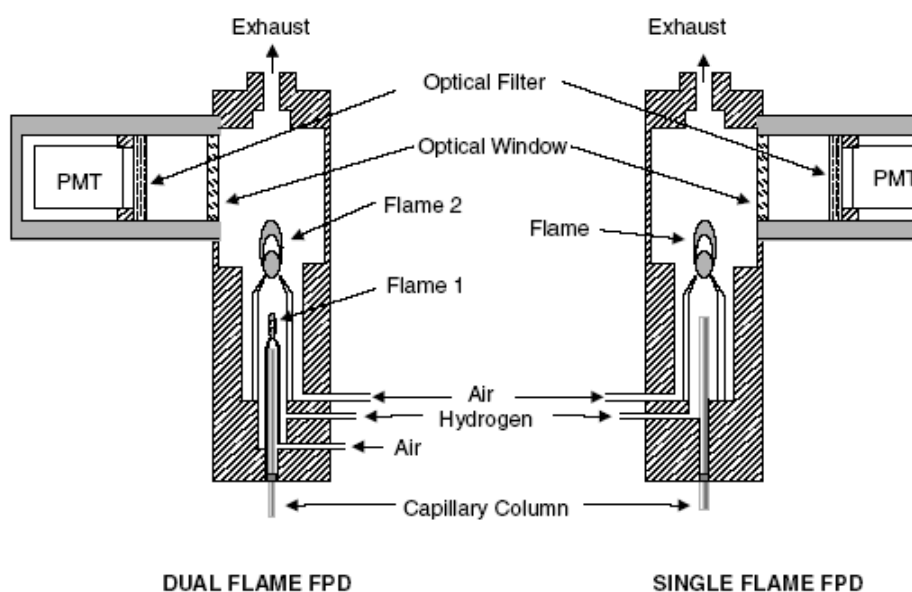


Σχήμα 44. Τυπική διάταξη ανιχνευτή PID

3.2.7 Ανιχνευτής FPD

Η λειτουργία του ανιχνευτή (σχήμα 45) βασίζεται στη μέτρηση της έντασης του φωτός εκπομπής, όταν οι ουσίες διεγείρονται παρουσία έντονης φλόγας. Οι αναλύτες αφού περάσουν από τη φλόγα υδρογόνου αποσυνθέτονται και διεγείρονται σε υψηλότερη ηλεκτρονική κατάσταση (μεταπήδηση ηλεκτρονίων σε υψηλότερη τροχιακή στοιβάδα). Αυτή η εκπομπή φωτός μπορεί να μετρηθεί από ένα σωλήνα φωτοπολλαπλασιασμού. Ένα οπτικό φίλτρο μπορεί να τοποθετείται έτσι ώστε να γίνει συλλογή του κατάλληλου μήκους κύματος φωτός. Ο ανιχνευτής έχει καλή απόκριση σε ουσίες που περιέχουν αλογόνα, άζωτο, σελήνιο, τελλούριο, και βόριο αλλάζοντας της συνθήκες της φλόγας. Χρησιμοποιείται κυρίως για θειούχες οργανικές ουσίες όπως επίσης και οργανοφωσφορικές ενώσεις με πολύ καλή επιλεκτικότητα. Ο ανιχνευτής μπορεί να είναι με απλό καυστήρα ή διπλό καυστήρα. Η κινητή φάση αζώτου αναμειγνύεται με το υδρογόνο σε αναλογίες ανάλογες του

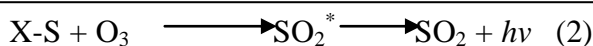
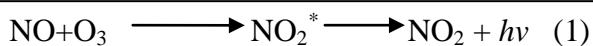
αέρα. Μια περίσσεια υδρογόνου εφαρμόζεται στην άκρη της μύτης του καυστήρα. Η φλόγα δημιουργείται στο εσωτερικό του καυστήρα έτσι ώστε να προστατέψει των σωλήνα φωτοπολλαπλασιαστή από την έκθεση του στη φλόγα. (Colòn & Baird., 2004)

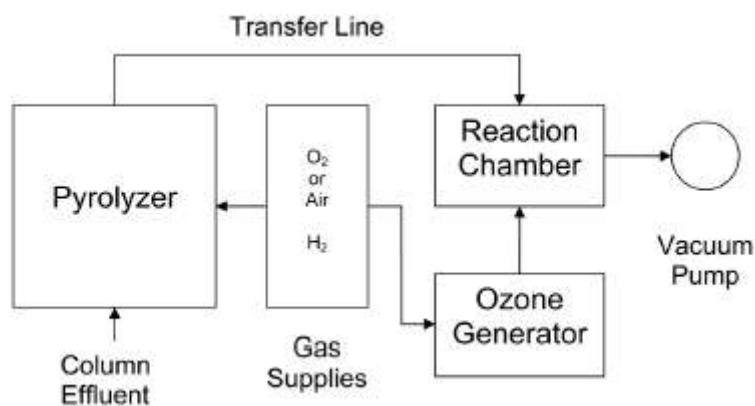


Σχήμα 45. Τυπική διάταξη FPD

3.2.8 Ανιχνευτής Chemiluminescent

Αυτή η κατηγορία ανιχνευτή χωρίζεται σε δυο βασικές κατηγορίες. Η πρώτη είναι η κατηγορία του ανιχνευτή χημικού φθορισμού αζώτου (Nitrogen chemiluminescence detector-NCD) και η δεύτερη η χημικού φθορισμού θείου (sulfur chemiluminescence Detector-SCD). Η λειτουργία και των δύο βασίζεται στη δημιουργία προϊόντων φθορισμού (βλέπε 3.1.4) τα οποία προκύπτουν μέσω χημικής αντίδρασης με το όζον (O_3). (αντιδράσεις 1&2). Σαν σχεδιασμό οι ανιχνευτές αποτελούνται από ένα σωλήνα καύσης στο οποίο εισέρχεται η κινητή φάση και γίνεται η ανάφλεξη από φλόγα υδρογόνου /οξυγόνου στους $800-1800\text{ }^{\circ}\text{C}$. Τα προϊόντα καύσης μονοξειδίου του θείου και αζώτου αντίστοιχα αντιδρούν με το όζον σε μια κυψελίδα αντίδρασης η οποία βρίσκεται υπό κενό (5-10 Torr). Μετά τη διέγερση (*) το μόριο αποδιεγείρεται εκπέμποντας ακτινοβολία ($h\nu$). Αυτό το είδος των ανιχνευτών παρουσιάζουν μεγάλη ευαισθησία, ειδικότητα σε προϊόντα θείου κα αζώτου. (Yan.,2006, Colòn & Baird., 2004)





Σχήμα 46. Τυπική διάταξη NCD & SCD (Yan.,2006)

3.3 Φασματοσκοπία μαζών

Η φασματοσκοπία μαζών είναι μια τεχνική η οποία χρησιμοποιεί ιονισμένα μόρια και ανάλυση μαζών ώστε να προσδιορίσει τη μάζα, τη δομή και το χημικό τύπο μορίων. Ένας αναλυτής μαζών διαχωρίζει τις ιονισμένες μάζες βάσει του λόγου μάζας/φορτίου (m/z). Παρακάτω περιγράφονται οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι αναλυτές.

3.3.1 Τύποι ιονισμού και αναλυτές στη φασματοσκοπία μαζών

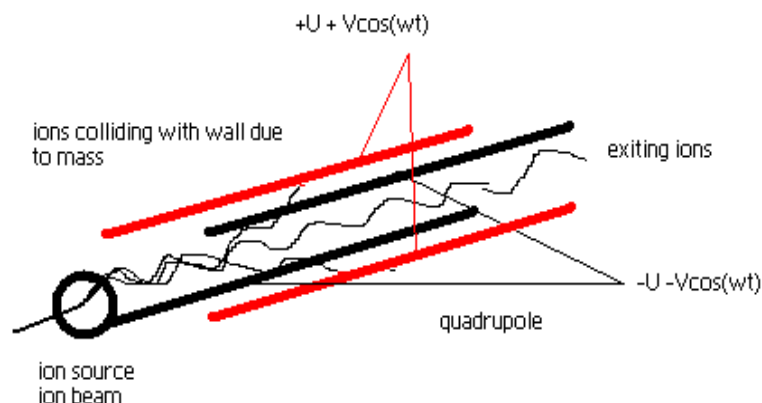
Υπάρχουν πολλοί τύποι ιονισμού στην φασματοσκοπία μαζών, μερικοί από αυτούς φαίνονται στον **πίνακα 14**.

Πίνακας 14. Τύποι ιονισμού στην φασματοσκοπία μαζών (Anonymous c.,nd)

Κατηγορία ιονισμού				
Αέριας φάσης	Εκφόρησης πεδίου	Βομβαρδισμού σωματιδίων	Ατμοσφαιρικής πίεσης	Εκφόρησης Laser
<ul style="list-style-type: none"> Electron impact (EI) Chemical ionization (CI) 	<ul style="list-style-type: none"> Field desorption (FD) Field ionization (FI) 	<ul style="list-style-type: none"> Fast Atom Bombardment (FAB) Secondary Ion Mass Spectrometry (SIMS) 	<ul style="list-style-type: none"> Electrospray Ionization (ESI) Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI) 	<ul style="list-style-type: none"> Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI)

Ο πιο απλός τύπος αναλυτή είναι ο τετραπολικός (Quadrupole-Q) (**σχήμα 47**). Ο συγκεκριμένος αναλυτής χρησιμοποιεί ηλεκτρικό πεδίο για να διαχωρίσει τα ιονισμένα σωματίδια. Αποτελείται από 4 παράλληλες ράβδους/πόλους οι οποίοι ανά ζεύγη έχουν αντίθετη πολικότητα. Το δυναμικό που τροφοδοτεί τους ράβδους είναι άθροισμα συνεχούς (DC) δυναμικού και ποικίλης συχνότητας ($V_{pe} \cos(wt)$), όπου w η γωνία συχνότητας ραδιοσυχνότητας. Η ηλεκτρική δύναμη των ιόντων, κάνει τα ιόντα να ταλαντώνονται με συγκεκριμένη τροχιά μεταξύ των τεσσάρων ράβδων όπου η ακτίνα της τροχιάς διατηρείται σταθερή. Η κίνηση των ιόντων είναι πολύπλοκη και είναι ανάλογη της μάζας, του δυναμικού του τετράπολου και της ραδιοσυχνότητας.

Τα ιόντα παραμένουν σε τροχιά στην περιοχή μεταξύ των πόλων. Οι τροχιές των ιόντων αλλάζουν μερικώς και αυτό έχει να κάνει με την μάζα τους. Μερικά συγκρούονται με τους πόλους και μερικά «φιλτράρονται» και περνούν προς τον ανιχνευτή.([Khan.,nd](#)). Τρία τετράπολα στη σειρά κάνουν έναν αναλυτή QqQ MS/MS(tandem mass spectrometry). Το μικρό q υποδηλώνει τετράπολο σύγκρουσης.



Σχήμα 47. Τυπική διάταξη τετραπολικού αναλυτή.

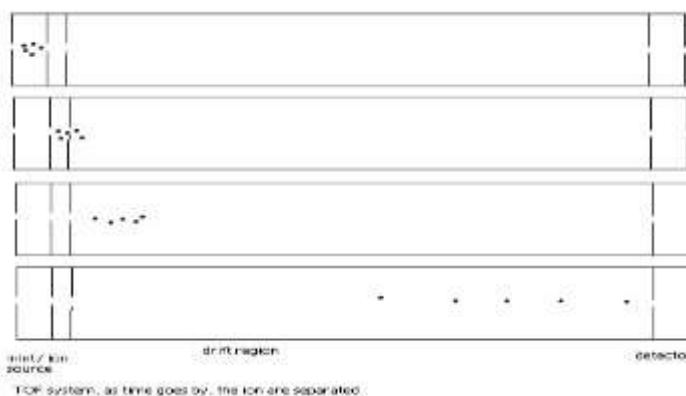
Ένας άλλος αναλυτής (**σχήμα 48**) είναι και αυτός του «χρόνου πτήσης» (Time of flight-TOF). Ο συγκεκριμένος αναλυτής δεν χρησιμοποιεί κάποιο μαγνητικό ή ηλεκτρικό πεδίο. Ο διαχωρισμός των ιόντων γίνεται βάσει της ταχύτητας και της κινητικής ενέργειας αυτών. Ιόντα με το ίδιο φορτίο έχουν την ίδια κινητική ενέργεια, Η κινητική ενέργεια του ιόντος στο σωλήνα πτήσης είναι ίδια με την κινητική ενέργεια καθώς απομακρύνεται από την πηγή (1). Ο χρόνος που κάνει το ιόν να διασχίσει το σωλήνα πτήσης δίνεται από την εξίσωση (2). Συνδυάζοντας την (1) και (2) καταλήγουμε στην εξίσωση (3)

$$(1) \text{ KE} = mv^2/2 = zV$$

$$(2) T_f = L(\text{length of tube})/v(\text{velocity of ion})$$

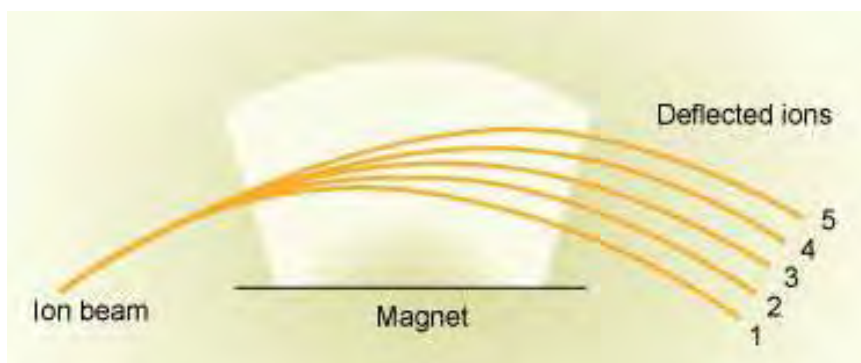
$$(3) T_f = L(m/z)^{1/2} (1/2V)^{1/2} / (\text{Constant}) * (m/z)^{1/2}$$

Κατά την διάρκεια της ανάλυσης το δυναμικό της πηγής ιονισμού διατηρείται σταθερό όπως και το μήκος του σωλήνα. Ο χρόνος πτήσης είναι ανάλογος της ρίζας του λόγου μάζας/φορτίου. Στην άκρη του σωλήνα τοποθετούνται ανακλαστές-δακτυλίδια υψηλού δυναμικού για να αυξάνει τη διαχωριστική ικανότητα ιόντων που έχουν το ίδιο m/z αλλά διαφορετική ταχύτητα(rTOF). ([Khan.,nd](#)). Άμα συνδεθεί με δύο τετράπολα δημιουργείται ένας αναλυτής QqTOF.

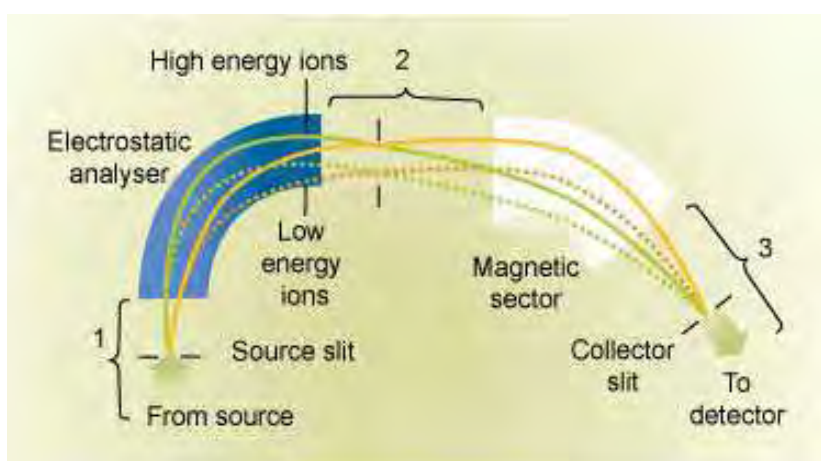


Σχήμα 48. Τυπική διάταξη αναλυτή TOF

Ο πρώτος αναλυτής και ίσως ο αναλυτής με τη μεγαλύτερη απόδοση είναι ο αναλυτής μαγνητικού τομέα (magnetic sector) (**σχήμα 49**). Στον συγκεκριμένο αναλυτή τα ιόντα ταξιδεύουν σε μια καμπύλη διαδρομή υπό την επίδραση ενός μαγνήτη. Τα ιόντα με το μεγαλύτερο m/z κατευθύνονται λόγω φυγόκεντρης δύναμης προς την εξωτερική πλευρά της διαδρομής, τα ιόντα με μικρότερο m/z κατευθύνονται προς τη μεριά του μαγνήτη. Για να δημιουργηθεί όμως η μεγάλη απόδοση του συγκεκριμένου αναλυτή συνδυάζεται με ένα δεύτερο τομέα ηλεκτροστατικής εστίασης ώστε να γίνει ομοιόμορφη η κινητική ενέργεια όλων των ιόντων-αναλυτής διπλής εστίασης. (**σχήμα 50**) ([Holcapek.,nd](#))



Σχήμα 49. Τυπική διάταξη αναλυτή μαγνητικού τομέα

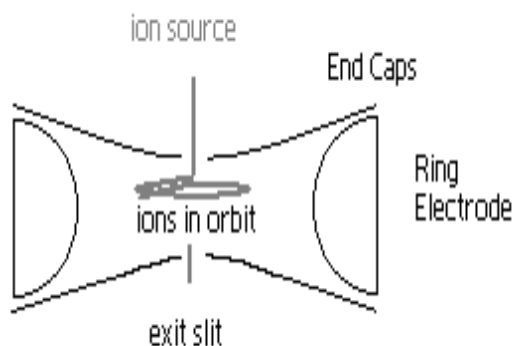


Σχήμα 50. Τυπική διάταξη αναλυτή διπλής εστίασης

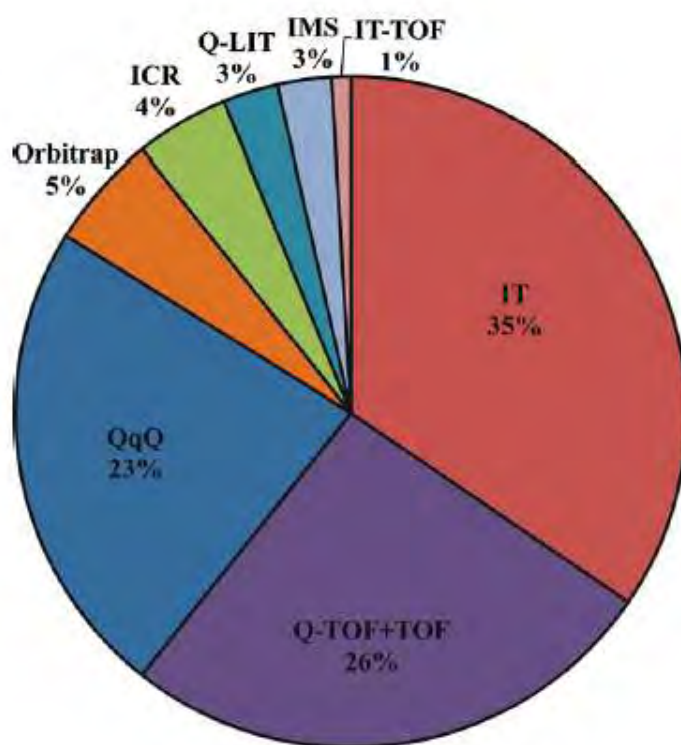
Ο αναλυτής παγίδας ιόντων (Quadrupole ion trap-QIT) (**σχήμα 51**) είναι ένα άλλο είδος αναλυτή που χρησιμοποιείται στη φασματοσκοπία μαζών. Πολλές φορές ονομάζεται και ως τρισδιάστατος τετραπολικός αναλυτής καθώς το σχήμα του μοιάζει με τετράπολο περιστρεφόμενο στον άξονα Z. Ο κύκλος σάρωσης περιλαμβάνει τα εξής:

1. Τα ιόντα σχηματίζονται στην πηγή ιονισμού και εισέρχονται στον αναλυτή.
2. Γίνεται εφαρμογή υψηλού δυναμικού, με αποτέλεσμα η «πόρτα» των ιόντων να κλείνει.
3. Τα ιόντα παγιδεύονται από το εναλλασσόμενο ρεύμα που εφαρμόζεται στο δακτυλίδι-ηλεκτρόδιο, γίνεται ψύξη μέσα στην παγίδα με ήλιο.
4. Τα ιόντα ανιχνεύονται και η διαδικασία επαναλαμβάνεται,
5. Το σήμα για μια σάρωση «full scan» είναι λιγότερο από ένα sec

Ο συγκεκριμένος αναλυτής μπορεί να κάνει ανάλυση MS/MS με τη νέα γενιά αναλυτών να σχεδιάζονται για ανάλυση MS/MS/MS (MS^3). Για να πραγματοποιήσει ανάλυση MS/MS το μητρικό ιόν παγιδεύεται στον αναλυτή αφού όλα τα άλλα απορριφθούν. Στη συνέχεια συγκρούεται με το αέριο ήλιο όπου παράγονται τα θυγατρικά ιόντα τα οποία και καταγράφονται. (*Holcapek.,nd*)



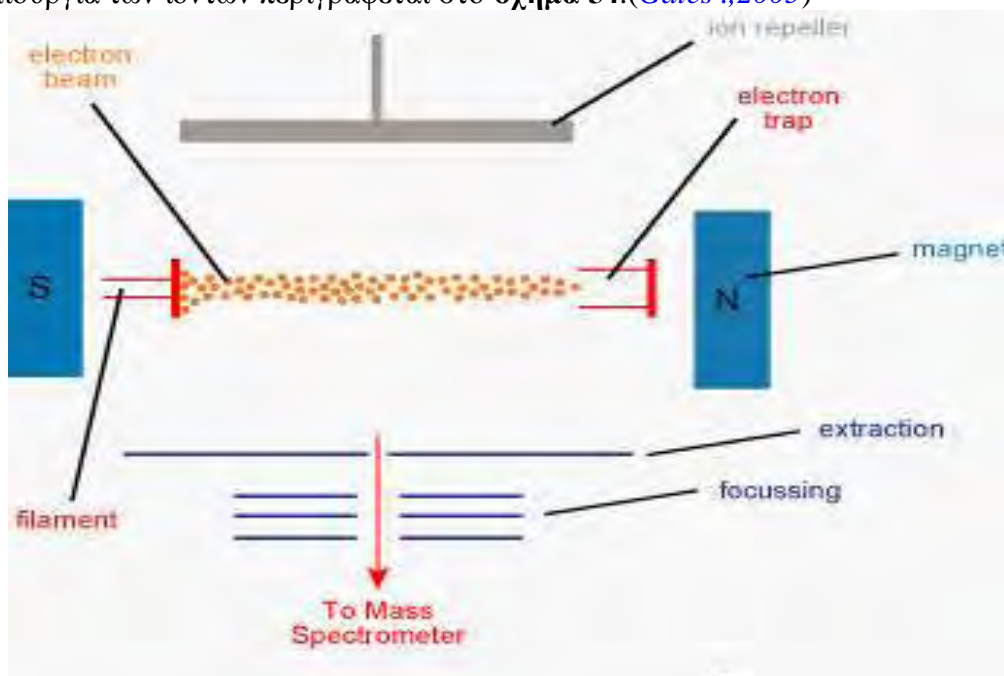
Σχήμα 51. Τυπική διάταξη αναλυτή QIT (*Khan.,nd*)



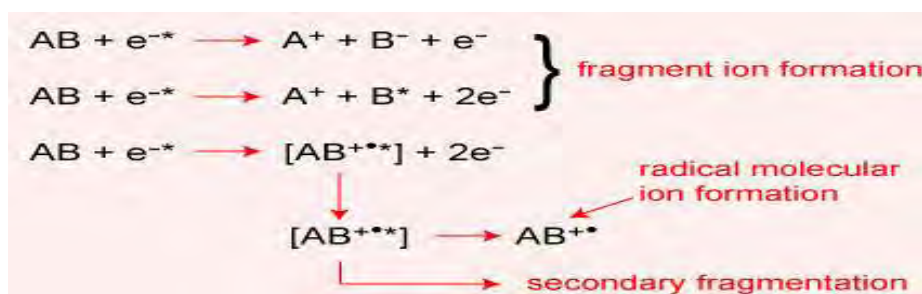
Σχήμα 52. Ποσοστιαία αναλογία χρησιμοποίησης αναλυτών μάζας ανά είδος σε δημοσιευμένες εργασίες μέχρι τον Μάιο του 2012 (*Holcapek et al.,2012*)

3.3.2 Ιονισμός EI

Αυτό το είδος του ιονισμού θεωρείται από τους κλασικούς ιονισμούς και χρησιμοποιείται κυρίως σε σύζευξη με αέρια χρωματογραφία. Τα κυρίως μόρια που ιονίζονται είναι πτητικά και συνήθως χαμηλού Μ.Β. Ο διαλύτης εξατμίζεται κυρίως θερμαίνοντας το άκρο του εγχυτήρα το οποίο περιέχει μέρος του αναλύτη. Όντας ο αναλύτης στην αέρια φάση περνάει στο θάλαμο του ιονισμού όπου αντιδρά με μια ομογενή δέσμη ηλεκτρονίων ενέργειας περίπου 70 eV (σχήμα 53). Η δέσμη παράγεται από ένα νήμα κατασκευασμένο από ρήνιο ή βολφράμιο και αναπτύσσεται σε μήκος της πηγής έως την παγίδα ιόντων. Ένας σταθερός αντίθετης πολικότητας μαγνήτης τοποθετείται με αντίθετη κατεύθυνση και ελαφρά εκτός του κυρίου άξονα ώστε να δημιουργηθεί μια σπειροειδής δέσμη. Αυτό γίνεται ώστε να αυξηθεί η πιθανότητα αλληλεπίδρασης μεταξύ δέσμης και του αερίου που φέρει τον αναλύτη. Στην πραγματικότητα δεν υπάρχει κάποια σύγκρουση μεταξύ δέσμης και αναλύτη αλλά απόρριψη ενός ηλεκτρονίου από τον αναλύτη λόγω αποσύνθεσης του. Η δημιουργία των ιόντων περιγράφεται στο σχήμα 54.(Gates .,2005)



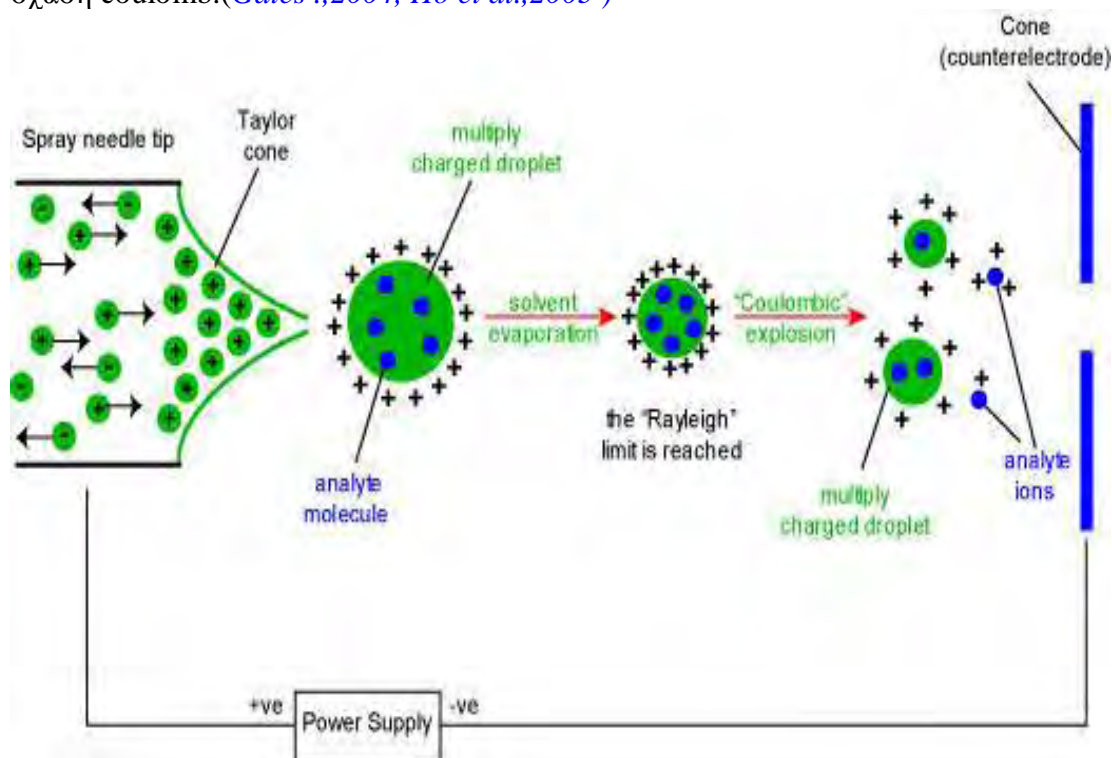
Σχήμα 53. Τυπική διάταξη ιονισμού EI



Σχήμα 54. Σχηματισμός ιόντων με τη χρήση ιονισμού EI

3.3.3 Ιονισμός ESI

Το είδος αυτού του ιονισμού (**σχήμα 55**) χρησιμοποιεί ηλεκτρική ενέργεια ώστε να βοηθήσει στη μεταφορά των ιόντων από το διάλυμα στην αέρια φάση προτού περάσουν προς τον αναλυτή μάζας. Αυτή η μεταφορά περιλαμβάνει 3 στάδια. 1) Διασπορά πολύ λεπτών φορτισμένων σταγονιδίων ακολουθούμενα 2) από εξάτμιση του διαλύτη και 3) εξώθηση των ιόντων από τα υψηλά φορτισμένα σταγονίδια. Στο άκρο του εγχυτήρα εφαρμόζεται δυναμικό της τάξης των 2,5-6,0 KV. Η εφαρμογή του αέριου νεφελοποίησης-εξάτμισης βοηθά στην καλύτερη ροή των αναλυτών. Καθώς οι σταγόνες κατευθύνονται προς την “capillary” (τριχοειδή στήλη από ανοξείδωτο χάλυβα) ολοένα και μειώνονται σε μέγεθος χάρις στην εξάτμιση του διαλύτη με αποτέλεσμα την αύξηση της πυκνότητας φορτίου επιφάνειας και την μείωση της ακτίνας του σταγονιδίου. Στο τέλος η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου στο φορτισμένο σταγονίδιο φτάνει σε οριακό σημείο (σημείο Rayleigh) όπου κινητικά και ενεργειακά τα ιόντα περνούν στην αέρια φάση λόγω της επιφανειακής τάσης η οποία δεν μπορεί να συγκαρτήσσει τη φόρτιση και έτσι πραγματοποιείται η λεγόμενη σχάση coulomb. (*Gates .,2004, Ho et al.,2003*)

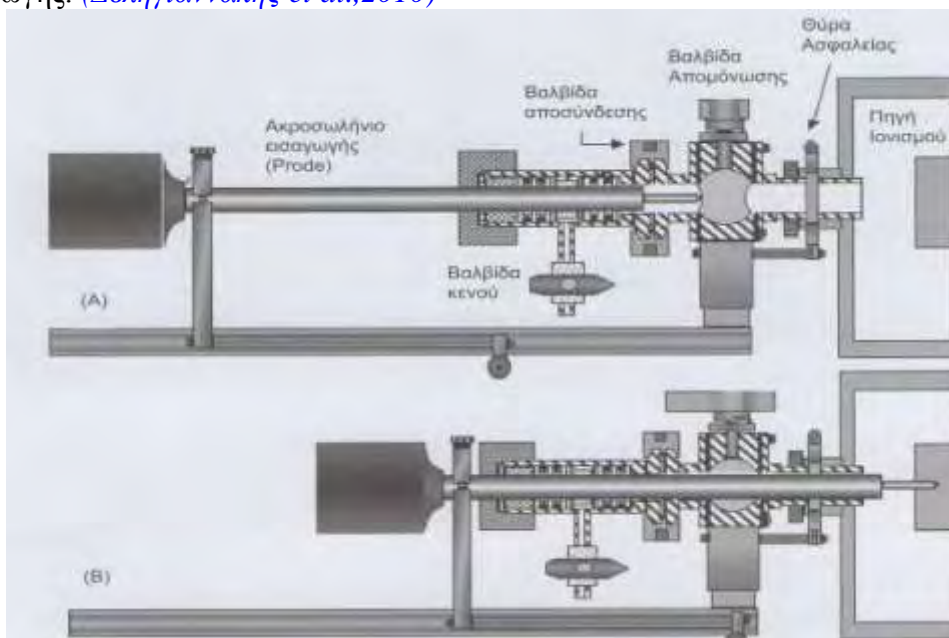


Σχήμα 55. Μηχανισμός λειτουργίας του ESI

3.3.4 Λειτουργίες (modes) αναλυτών μάζας και σύζευξη αυτών

Η σύζευξη της φασματοσκοπίας μαζών με τη χρωματογραφία αποτέλεσε μια από τις σημαντικότερες εξελίξεις στον τομέα της ενόργανης ανάλυσης. Η αέρια χρωματογραφία είναι ίσως η πιο χρησιμοποιούμενη τεχνική για την εισαγωγή δειγμάτων στο φασματογράφο. Συνήθως η εισαγωγή του δείγματος (**σχήμα 57**) στο θάλαμο ιονισμού γίνεται κατ'ευθείαν μετά την έξοδο της τριχοειδούς στήλης του χρωματογράφου. Τα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά είναι η ποσότητα του φέροντος

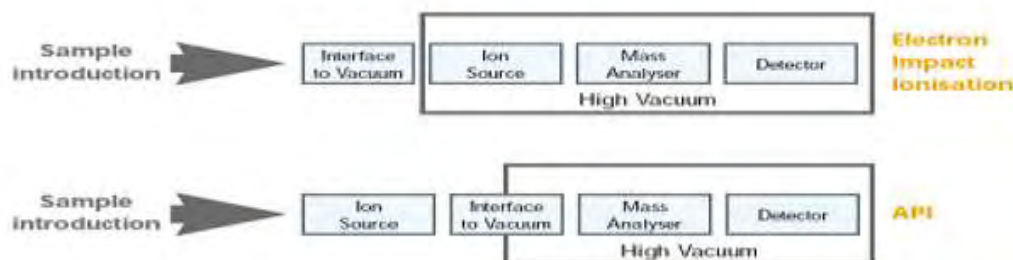
αερίου και η ποσότητα του δείγματος που έχουν προηγουμένως διαχωριστεί στην τριχοειδή χρωματογραφική στήλη. Η εισαγωγή του δείγματος με υγρή χρωματογραφία απαιτεί την παρουσία ενός διασυνδέτη της εξόδου της αναλυτικής στήλης με την πηγή ιόντων προκειμένου ο ιονισμός να γίνει στην υγρή ή στην αέρια φάση ανάλογα με τον τύπο της πηγής των ιόντων. Η ροή της κινητής φάσης και του αερίου εκνέφωσης είναι οι πιο σημαντικές παράμετροι σε αυτά τα συστήματα εισαγωγής. (Δεληγιαννάκης *et al.*, 2010)



Σχήμα 56. Σύστημα άμεσης εισαγωγής με ακροσωλήνιο (Α) πριν την εισαγωγή στην πηγή ιονισμού (Β) κατά την εισαγωγή στην πηγή ιονισμού.

Η σύζευξη των τεχνικών πραγματοποιείται και συνήθως περιλαμβάνει έξι στοιχεία

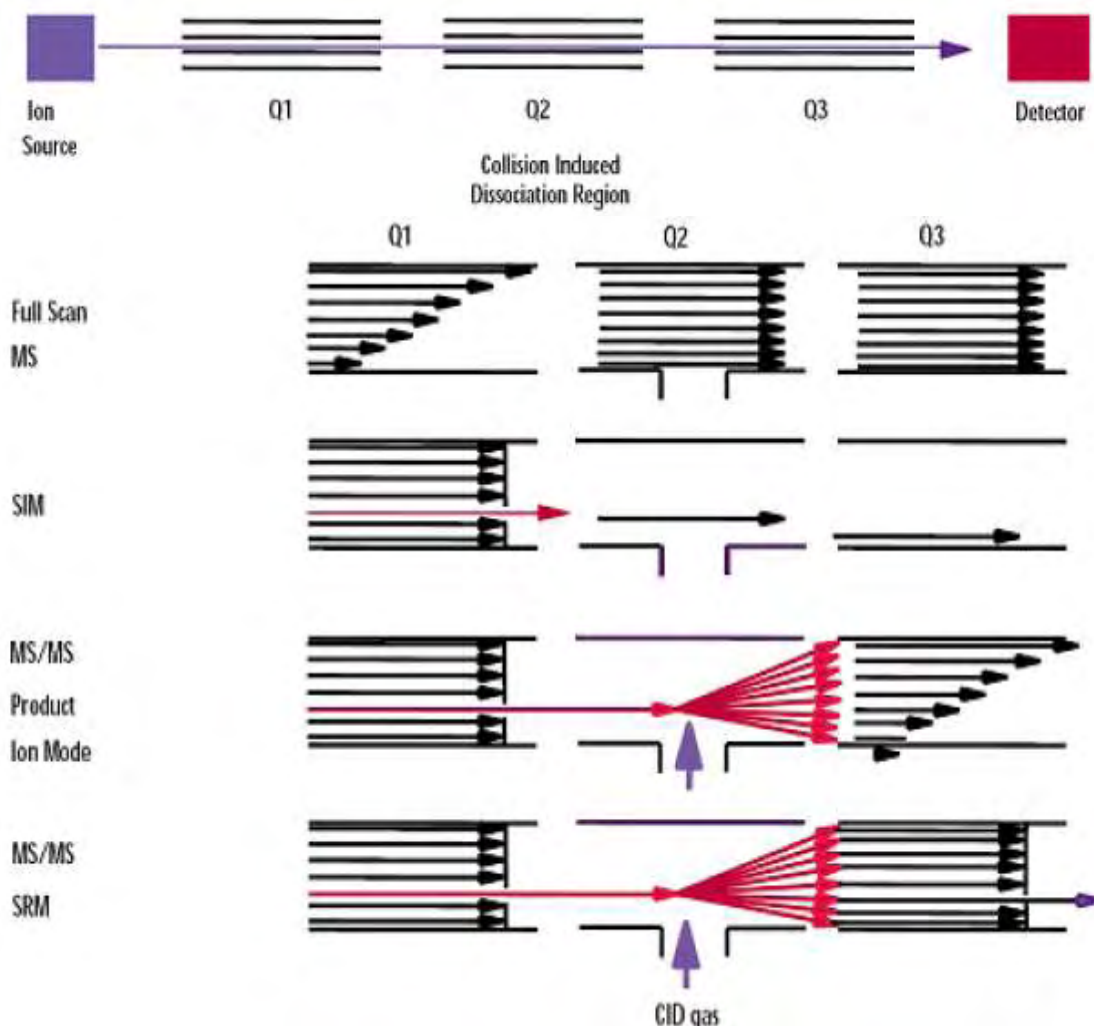
1. Ένα σύστημα κενού
2. Σύστημα εισαγωγής στο φασματογράφο
3. Σύστημα ιονισμού
4. Σύστημα πρόσκρουσης των ιόντων για να συλλεχθούν πληροφορίες δομής ή και πιο επιλεκτική ανίχνευση
5. Σύστημα ανίχνευσης
6. Λογισμικό σύστημα



Σχήμα 57. Στάδια σύζευξης τεχνικών και δομή συστήματος φασματογράφου

Οι αναλυτές μάζας όμως προσφέρουν 2 βασικές λειτουργίες όπου ο χρήστης μπορεί να επιλέξει για να πραγματοποιηθεί η ανάλυση

1. Λειτουργία πλήρους σάρωσης (Full scan). Ο πρώτος αναλυτής μαζών σαρώνει ιόντα m/z τα οποία διέρχονται από τους επόμενους αναλυτές και καταγράφονται στον ανιχνευτή. Με αυτή τη λειτουργία παίρνουμε πληροφορία για το μοριακό βάρος και τη δομή όμως έχουμε αργή σάρωση και μη ικανοποιητικά αποτελέσματα ποσοτικοποίησης.
2. Παρακολούθηση επιλεγμένων ιόντων (SIM). Ο πρώτος αναλυτής μαζών επιλέγει (απομονώνει) συγκεκριμένα ιόντα m/z τα οποία διέρχονται από τους επόμενους αναλυτές και καταγράφονται στον ανιχνευτή. Πλεονεκτήματα αυτού του τρόπου λειτουργίας είναι η γρήγορη σάρωση, η απλότητα λόγω της παρακολούθησης συγκεκριμένου αναλύτη ενώ μειονεκτήματα αποτελούν οι παρεμποδίσεις. Σε λειτουργία MS/MS μπορούν να επιλεγθούν 4 βασικές λειτουργίες. (σχήμα 58). (Δελγιαννάκης *et al.*, 2010, Anonymous *nd d*)



Σχήμα 58. Λειτουργίες MS/MS

3.4 Ανίχνευση φυτοφαρμάκων με GC –FID/ECD/NPD

Οι *Farajzadeh et al.,(2013)* με υπόστρωμα χυμό σταφυλιών, τομάτα και αγγούρια ανέπτυξαν μια μέθοδο ανάλυσης φυτοφαρμάκων χρησιμοποιώντας GC-FID. Τα LODs και LOQs κυμάνθηκαν αντίστοιχα από 0,53-1,13 ng/mL και 1,76-3,77 ng/mL. Με υπόστρωμα λотούς οι *Miao et al.,(2013)* και χρησιμοποιώντας GC-ECD ανέπτυξαν μια μέθοδο για την ανάλυση 36 φυτοφαρμάκων. Τα LODs και LOQ κυμάνθηκαν από 0,01-0,03 µg/L και 0,05-10 µg/L αντίστοιχα. Οι ερευνητές χρησιμοποίησαν Quechers ως μέθοδο εκχύλισης. Σε φυτικά έλαια οι *Li et al.,(2014)* ανέπτυξαν μέθοδο ανάλυσης 14 οργανοχλωριομένων φυτοφαρμάκων. Με χρήση GC-ECD κατέφεραν να επιτύχουν LODs από 0,04-0,74 ng/g. Τα LOQs κυμάνθηκε από 0,14-2,45 ng/g. Σε χυμό σακχαροκάλαμου οι *Furlani et al.,(2011)* επικύρωσαν μέθοδο ανάλυσης 7 φυτοφαρμάκων χρησιμοποιώντας Quechers ως μέθοδο εκχύλισης και GC-ECD. Τα LODs κυμάνθηκαν από 0,003 έως 0,04 mg/L και τα LOQs από 0,007-0,080 mg/L. Χρησιμοποιώντας GC-NPD οι *Park et al.,(2011b)* επικύρωσαν μέθοδο ανάλυσης 37 φυτοφαρμάκων με υπόστρωμα το έδαφος. Οι ερευνητές κατάφεραν να επιτύχουν πολύ χαμηλά LODs και LOQs τα οποία κυμάνθηκαν από 1 έως 20 µg/L και 3,30 έως 66,00 µg/L αντίστοιχα. Με διπλό σύστημα ανίχνευσης GC-ECD/NPD οι *Łozowicka et al., (2012)* εξέτασαν 365 δείγματα λαχανικών για την ανάλυση 136 φυτοφαρμάκων. Το 9% των δειγμάτων περιείχαν φυτοφάρμακα πάνω από τα επιτρεπόμενα MRLs. Τα LODs και LOQs κυμανθήκαν από 0,001 έως 0,030 mg/Kg και 0,001 έως 0,010 mg/Kg αντίστοιχα. Με εκχύλιση Quechers και με GC-ECD οι *Obuseng et al.,(2013)* ανέλυσαν φυτοφάρμακα σε δείγματα φυτών τα αποτελέσματα ανέδειξαν LODs από 0,102 έως 1,693 µg/L.

3.5 Επίδραση υποστρώματος – Matrix effect

Η επίδραση υποστρώματος (ME) είναι ένα φαινόμενο όπου κάνει την απόκριση της χρωματογραφικής μεθόδου έναντι του αναλύτη να διαφέρει (μειωμένη ή αυξημένη) με την παρουσία του υποστρώματος. Εμφανίζεται και στην αέρια αλλά και στην υγρή χρωματογραφία. Ο μηχανισμός επίδρασης του υποστρώματος δεν είναι ακόμα πολύ ξεκάθαρος και έχει να κάνει με φυσικοχημικές ιδιότητες του υποστρώματος, τη συγκέντρωση του αναλύτη (κορεσμός στο τμήμα του ιονισμού) αλλά ακόμα και με τη μετακίνηση ουσιών από πλαστικούς σωλήνες. Από άποψη ιονισμού στη φασματοσκοπία μαζών ο APCI φαίνεται να είναι λιγότερο επιρρεπής στο ME σε σχέση με τον ESI (*De Sousa Freitas & Lanças, 2009, O'Mahony et al.,2013*). Ένας τρόπος υπολογισμού γίνεται με τη σύγκριση των κορυφών του στάνταρτ (Α) στην κινητή φάση, (Β) μετά την εκχύλιση (spiked) και (Γ) πριν την εκχύλιση. Αναλυτικά το ME, η απόδοση της ανάκτησης (RE) και η απόδοση της μεθόδου (PE) υπολογίζονται βάση των παρακάτω τύπων:

$ME (\%) = B/A * 100$ ή

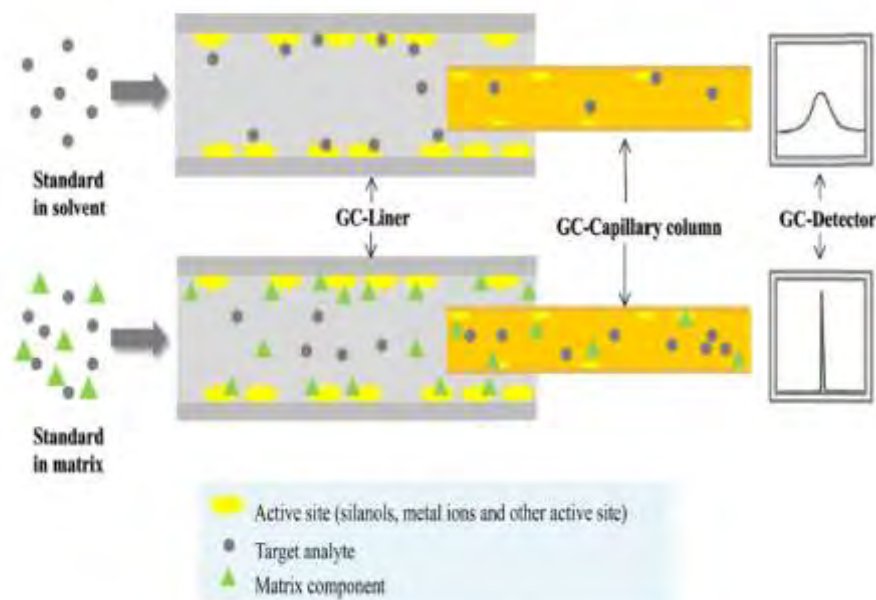
$ME (\%) = \text{κλίση καμπύλης (B)} - \text{κλίση καμπύλης (A)} / \text{κλίση καμπύλης (A)} * 100$

$RE (\%) = \Gamma / B * 100$

$PE (\%) = \Gamma / A * 100 = (ME * RE) / 100$ (*Lucini & Molinari .,2011*)

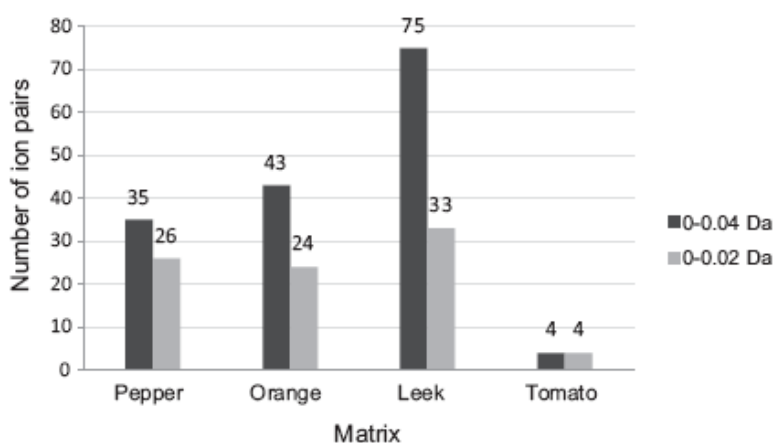
Ο οδηγός SANCO/12571/2013 απαιτεί και τον υπολογισμό της επίδρασης του υποστρώματος ώστε να γίνει η επικύρωση μιας μεθόδου. Για να αποτραπεί το ME συνήθως αλλάζει η μέθοδος προετοιμασίας του δείγματος ή γίνεται επιπλέον αραιώση

στο δείγμα.([Patel,2011](#)). Από διαφορετική σκοπιά αντιμετωπίζουν την επίδραση υποστρώματος για την ανάλυση φυτοφαρμάκων οι [Rahman et al.,\(2013\)](#). Οι συγγραφείς υποστηρίζουν ότι η ίδια η επίδραση υποστρώματος μπορεί να παίζει θετικό ρόλο στην ποιότητα των κορυφών στην αέρια χρωματογραφία για την ανάλυση ορισμένων φυτοφαρμάκων. Στη δημοσίευσή τους υποστηρίζουν ότι μερικά συστατικά του υποστρώματος δρουν ως προστατευτικά για τον αναλύτη (**σχήμα 56**).



Σχήμα 59. Προτεινόμενος μηχανισμός προστασίας του αναλύτη από το υπόστρωμα

Το ΜΕ μπορεί να παίζει καθοριστικό ρόλο στην ταυτοποίηση φυτοφαρμάκων και στην εξαγωγή ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων. Χαρακτηριστικό είναι το **σχήμα 60** όπου εμφανίζονται ζευγάρια ιόντων (φυτοφάρμακα και ουσίες υποστρώματος) με τον χρόνο συγκράτησης να διαφέρει κάτω από 0,5 λεπτά σε εύρος από 0-0,04 Da.([Gómez-Ramos et al.,2013](#)).



Σχήμα 60. Ζευγάρια ιόντων (φυτοφάρμακα και ουσίες υποστρώματος) σε διάφορα υποστρώματα με εύρος 0-0,04 Da

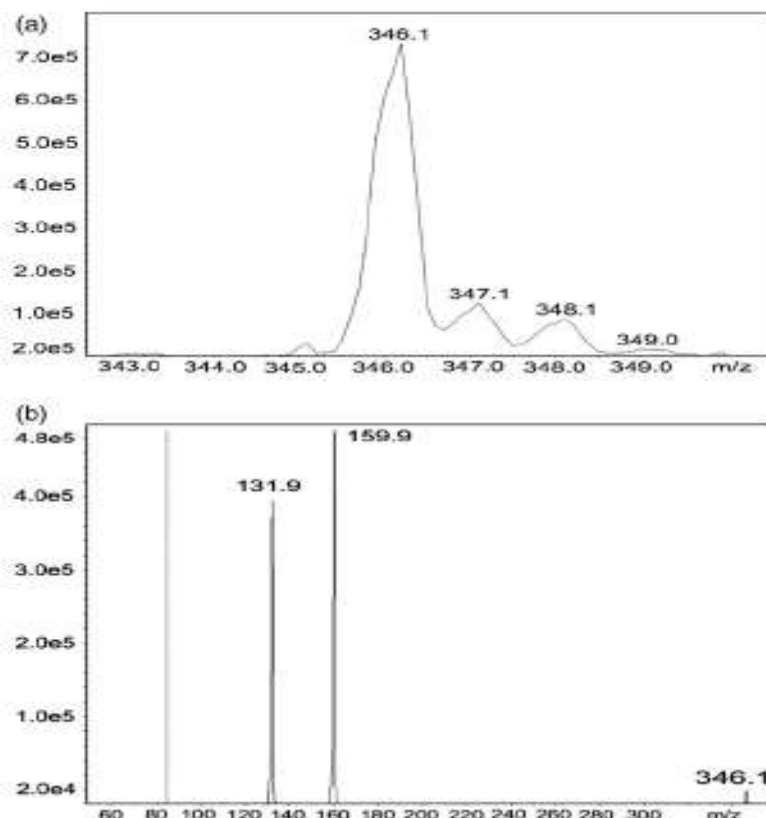
4. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ-ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΜΑΖΑΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΕ ΦΥΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ

Συνήθως οι αναλύσεις φυτοφαρμάκων πραγματοποιούνται με αέρια χρωματογραφία-φασματοσκοπία μάζας (GC-MS) χάρις στη μεγάλη διαχωριστική ικανότητα, την ευαισθησία ειδικά στη λειτουργία SIM (Selective ion monitoring) αλλά και τη μεγάλη δυνατότητα ταυτοποίησης (βιβλιοθήκες φασμάτων) με τη χρήση του ιονισμού EI (Electron impact). Με την εισαγωγή του MS/MS στην υγρή χρωματογραφία και στην συνέχεια στην αεριοχρωματογραφία όμως αυτό έχει αλλάξει και σήμερα χρησιμοποιείται και για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση φυτοφαρμάκων ([Sharma et al.,2010](#), [Wang et al.,2013b](#), [Alves et al.,2012](#)).

4.1 Υγρή χρωματογραφία-φασματοσκοπία μάζας για την ανάλυση φυτοφαρμάκων

Οι [Pizzutti et al.,\(2007\)](#) επικύρωσαν μια πολυ-μέθοδο ταυτοποίησης και ποσοτικοποίησης 169 φυτοφαρμάκων σε σόγια χρησιμοποιώντας LC-MS/MS με αρνητικό και θετικό ιονισμό ESI (Electrospray ionization). Χρησιμοποίησαν εκχύλιση με ακετόνη-διχλωρομεθάνιο-πετρελαϊκό αιθέρα (1:1:1) και ανασύσταση με μεθανόλη. Η γραμμικότητα της μεθόδου (καμπύλη αναφοράς) εντοπίστηκε στα 0,25-10 ng/mL που αντιστοιχεί σε συγκέντρωση φυτοφαρμάκων 5-200 µg/Kg δείγματος. Το LOD της μεθόδου εντοπίστηκε στα 0,25 ng/mL. Την ίδια χρονιά οι [Leandro et al.,\(2007\)](#) επικύρωσαν πολυ-μέθοδο ταυτοποίησης και ποσοτικοποίησης 59 φυτοφαρμάκων σε τρόφιμα δημητριακών, πορτοκάλια και πατάτες. Για την επικύρωση χρησιμοποιήθηκε LC-MS/MS με αρνητικό και θετικό ιονισμό ESI. Η γραμμικότητα της μεθόδου για όλους τους αναλύτες ήταν από 0,005 έως 0,250 mg/Kg. Η εκχύλιση έγινε χρησιμοποιώντας ακετυλονιτρίλιο-οξικό οξύ (99:1) με την προσθήκη αλάτων και τελικό «clean up» με 50 mg PSA παρουσία MgSO₄. Οι [Sagratinì et al.,\(2007\)](#) χρησιμοποιώντας LC-MS/MS με αρνητικό και θετικό ιονισμό ESI επικύρωσαν μια μέθοδο για την ανάλυση της φαινυλουρίας καθώς και καρβαδιμικών φυτοφαρμάκων σε χυμούς φρούτων. Η εκχύλιση έγινε με αυτοματοποιημένο σύστημα SPME /HPLC. Το LOQ για όλους τους αναλύτες ανήρθε στα 0,005-0,05 mg/mL. Η Ολλανδική υπηρεσία προστασίας του καταναλωτή και η αρμόδια χημική υπηρεσία υπό τους [Hiemstra & de Kok.,\(2007\)](#) αντικατέστησε τις παλιές μεθόδους ταυτοποίησης και ποσοτικοποίησης 171 φυτοφαρμάκων με μια πολυ-μέθοδο χρησιμοποιώντας LC-MS/MS και ιονισμό ESI+. Τα υποστρώματα στα οποία και έγινε η επικύρωση της μεθόδου ήταν το μαρούλι, πορτοκάλι, μήλο, λάχανο, σταφύλι και αλεύρι. Το LOQ της μεθόδου ορίστηκε μετά από επικύρωση στα 0,01 mg/Kg. Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε με ακετόνη-διχλωρομεθάνιο-πετρελαϊκό αιθέρα (1:1:1). Με τη συγκεκριμένη μέθοδο ελέχθησαν πάνω από 12000 δείγματα μεταξύ 2004-2007. Χρησιμοποιώντας τον οδηγό SANCO/2007/3131 οι [Kmellár et al.,\(2008\)](#) επικύρωσαν μια πολυ-μέθοδο για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση 160 φυτοφαρμάκων σε λαχανικά με LC-MS/MS και ιονισμό ESI+. Το LOD της μεθόδου ανήρθε στα 5 µg/Kg. Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο Quechers. Κάνοντας εκχύλιση με Quechers και με τη χρήση UPLC/ TOF MS και ιονισμό ESI(+,-) οι [Lacina et al.,\(2010\)](#) επικύρωσαν μια πολυ-μέθοδο ταυτοποίησης και ποσοτικοποίησης 212 φυτοφαρμάκων σε διάφορα υποστρώματα φρούτων όπως το μήλο το κέρασι και τις φράουλες. Το LOQ ανήρθε στα <10 µg/Kg. Οι [Camino-](#)

Sánchez et al.,(2010) επικύρωσαν και διαπίστευαν κατά ISO/IEC 17025 μια πολυ-μέθοδο για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση 69 φυτοφαρμάκων, η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο Quechers και χρησιμοποιήθηκε LC-MS/MS ιονισμός ESI (+,-). Με τη συγκεκριμένη μέθοδο έχουν αναλυθεί πάνω από 2000 δείγματα.



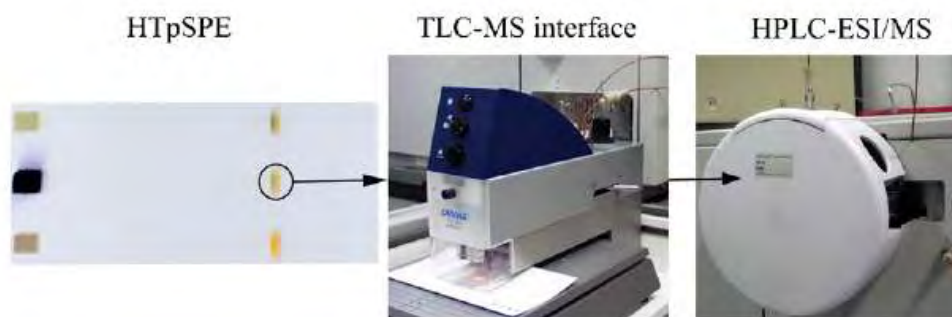
Σχήμα 61. Χρωματογράφημα μάζας (a) :Scan mode, (b): MRM mode για το φυτοφάρμακο azinphos ethyl

Το 2009 το Ελληνικό χημείο του κράτους επικύρωσε μια πολυ-μέθοδο ανάλυσης 46 φυτοφαρμάκων σε οίνους. Η εκχύλιση περιλαμβάνει SPE και ανάλυση με LC-MS/MS ιονισμός ESI(+). Το LOQ της μεθόδου κυμάνθηκε μεταξύ 0,001 mg/L και το LOD μεταξύ 0,0003-0,003 mg/L (*Economou et al.,2009*). Μια μέθοδο ταυτοποίησης και ποσοτικοποίησης φυτοφαρμάκων σε ελαιόλαδο αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε από τους *Benincasa et al.,(2011)*. Η μέθοδος παρουσίασε LOQ από 0,004-0,073 ng/mL. Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε με ακέτυλονιτριλιο και χρησιμοποιήθηκε LC-MS/MS ιονισμός ESI(+). Χρησιμοποιώντας εκχύλιση MSPD και LC-MS/MS, ESI (+,-) οι *Radišić et al.,2009* επικύρωσαν πολυ-μέθοδο για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση 12 φυτοφαρμάκων σε χυμούς φρούτων. Η μέθοδος επέδειξε χαμηλά όρια ανίχνευσης (LOQ 0,01-0,94 ng/mL) και όρια ποσοτικοποίησης, LOQ από 0,03 έως 3,12 ng/mL. Με υπόστρωμα τα σταφύλια οι *Venkateswarlu et al.,(2007)* ανέπτυξαν μια πολυ-μέθοδο ανίχνευσης φυτοφαρμάκων με τη χρήση ESI (+,-) και εκχύλιση με αιθανικό αιθυλεστέρα. Τα στοιχεία της επικύρωσης φαίνονται στον **πίνακα 11**.

Πίνακας 15. Στοιχεία επικύρωσης μεθόδου, για την ανάλυση φυτοφαρμάκων σε σταφύλια

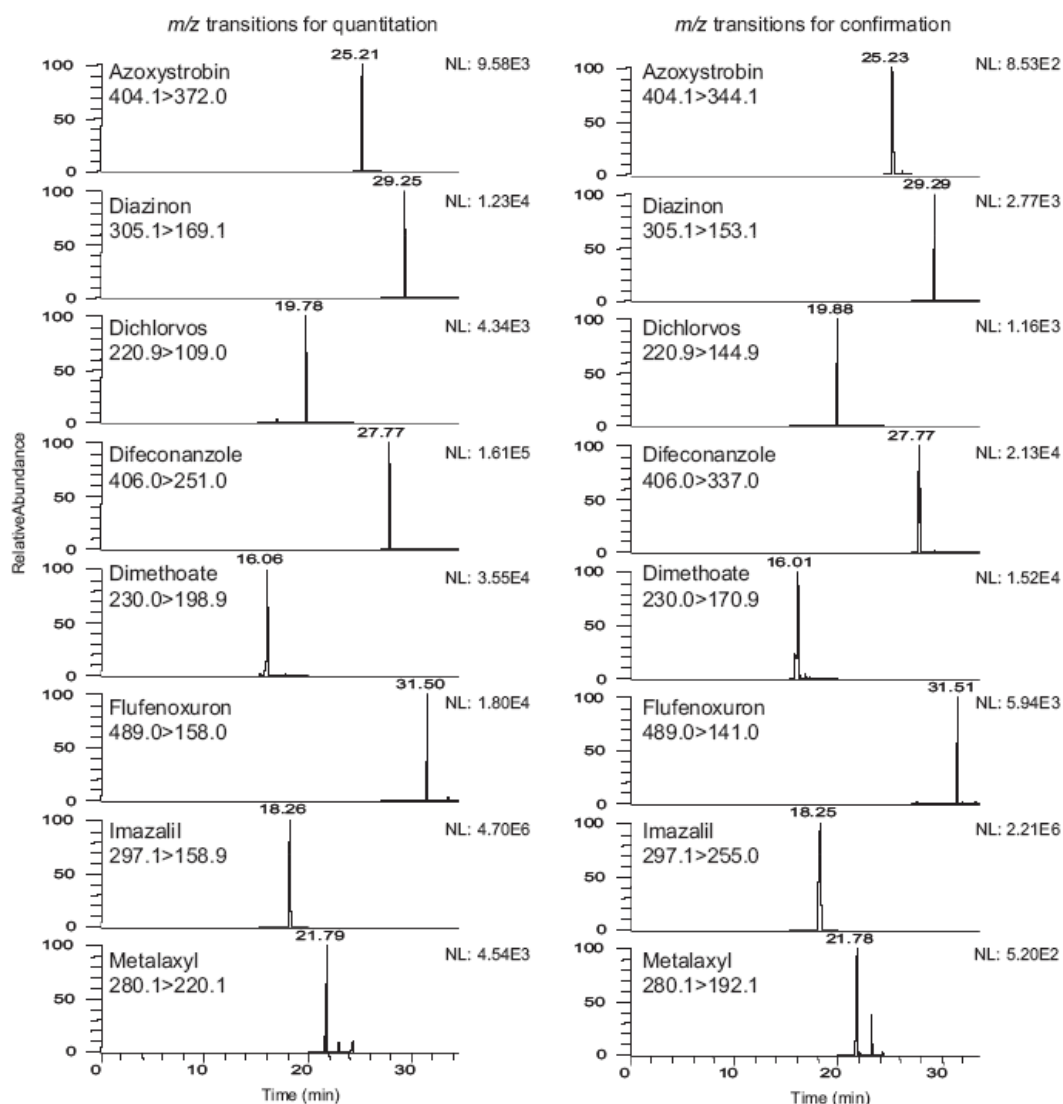
Φυτοφάρμακο	Προστέθηκε (spike) mg/Kg	Ανάκτηση % ^a	RSD (%) ^a	LOQ (mg/Kg)
Imidacloprid	0,010	78	12	0,005
	0,100	85	10	
Thiamethoxam	0,010	92	12	0,005
	0,100	98	9	
Chlorpyrifos	0,010	89	15	0,01
	0,100	85	10	
Dimethoate	0,010	89	14	0,005
	0,100	98	10	
Monocrotophos	0,010	94	8	0,01
	0,100	98	10	
Metalaxyl	0,010	92	15	0,01
	0,100	98	10	
Methomyl	0,010	92	12	0,01
	0,100	96	9	
Hexaconazole	0,010	89	10	0,01
	0,100	92	8	
Myclobutanil	0,010	94	12	0,01
	0,100	98	9	
Carbendazim	0,010	82	8	0,01
	0,100	102	6	

Χρησιμοποιώντας τον οδηγό SANCO/12495/2011 οι *Carneiro et al.,(2013)* ανέπτυξαν πολυ-μέθοδο για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση 128 φυτοφαρμάκων με υπόστρωμα την μπανάνα και κάνοντας εκχύλιση με μια τροποποιημένη μέθοδο Quechers. Με UPLC-MS/MS και ESI (+,-) κατάφεραν να επιτύχουν LOD 5 µg/Kg και LOQ 10 µg/Kg. Οι *Oellig & Schwack., (2011)* χρησιμοποίησαν μία όχι και τόσο χρησιμοποιούμενη τεχνική για εκχύλιση. Με TLC (thin layer chromatography) απομόνωσαν φυτοφάρμακα από διάφορα υποστρώματα (μήλα, αγγούρια, κόκκινα σταφύλια, τομάτες) και στην συνέχεια με LC-MS και ESI έκαναν την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση αυτών. (σχήμα 59)



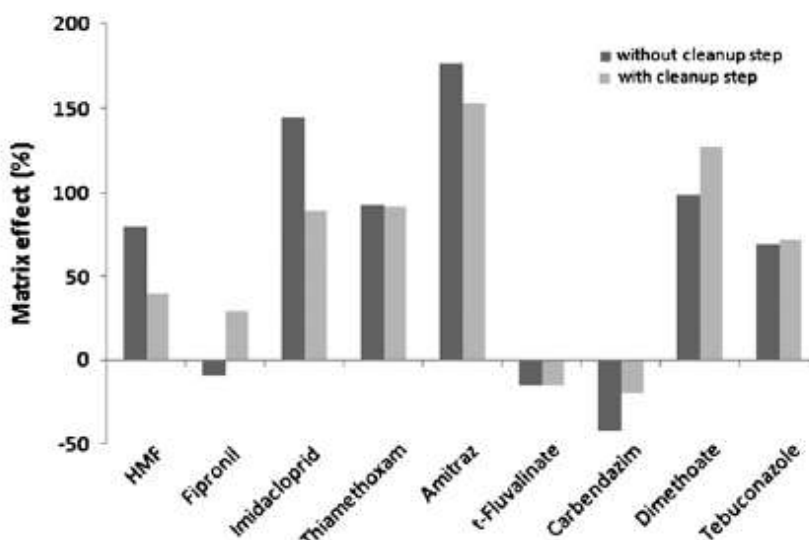
Σχήμα 62. Διαδικασία εκχύλισης με TLC και ταυτοποίηση-ποσοτικοποίηση με LC/MS

Μια πολυμέθοδο για την ανάλυση 100 φυτοφαρμάκων ανέπτυξαν οι Núñez et al., (2012) χρησιμοποιώντας ESI+ και LC-MS/MS. Οι ερευνητές χρησιμοποίησαν εκχύλιση Quechers σε υπόστρωμα φρούτων και λαχανικών. Τα LODs κυμάνθηκαν από 0,01 έως 20 µg/Kg. (σχήμα 60)



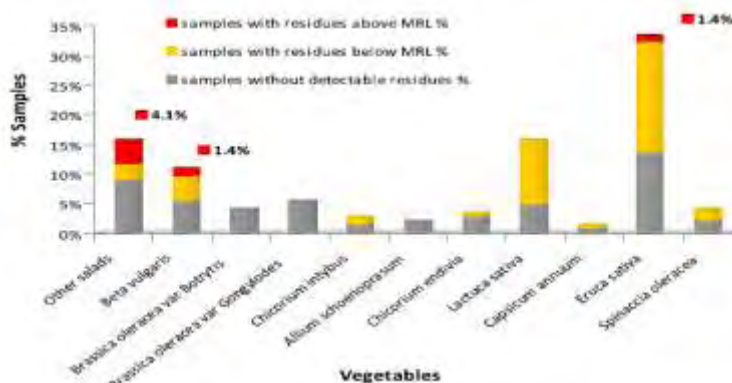
Σχήμα 63. Χρωματογράφημα MS/MS για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση φυτοφαρμάκων

Με υπόστρωμα το τσάι και το χαμομήλι και χρησιμοποιώντας LC-MS/MS με ESI+,- οι [Lozano et al.,\(2012\)](#) επικύρωσαν μια πολυμέθοδο για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση 87 φυτοφαρμάκων. Έκαναν χρήση της εκχύλισης Quechers και τα αποτελέσματα επέδειξαν LOQs από 10-100 µg/Kg και LODs από 0,1-210 µg/Kg. Οι [Ferrer et al.,\(2011\)](#) επικύρωσαν μια πολύ μέθοδο για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση 53 φυτοφαρμάκων σε διάφορα φρούτα χρησιμοποιώντας LC-MS/MS και turboionspray + ιονισμό και εκχύλιση νερού/ ακετυλονιτριλίου. Τα LOQs εντοπίστηκαν πολύ κάτω από τα επίσημα MRLs. Σε επιπλέον έλεγχο σε δείγματα της αγοράς το 43% βρέθηκαν θετικά. Με μια τροποποιημένη μέθοδο Quechers και υπόστρωμα το μέλι οι [Tomasini et al.,\(2012\)](#) επικύρωσαν μια μέθοδο για την ανάλυση 9 φυτοφαρμάκων κάνοντας χρήση LC-MS/MS και ιονισμό APCI +. Τα LOQs και LODs εντοπίστηκαν στα 0,005-1 mg/Kg και από 0,0016-0,33 mg/Kg αντίστοιχα.



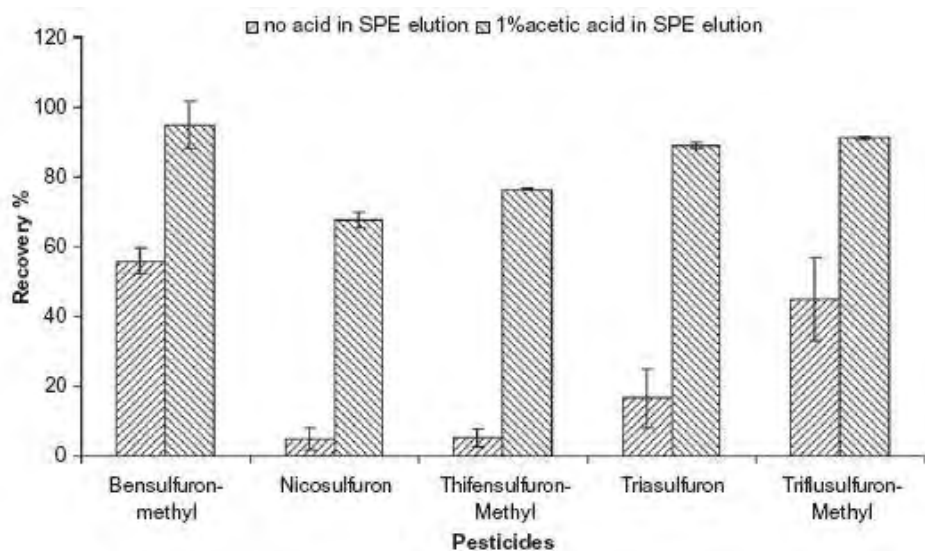
Σχήμα 64. Τυπικό παράδειγμα της επίδρασης υποστρώματος κατά τη διάρκεια επικύρωσης μεθόδου. Θετικές τιμές σημαίνουν αύξηση του σήματος ενώ αρνητικές μείωση του σήματος.

Για την ανάλυση 14 φυτοφαρμάκων σε 146 δείγματα (**σχήμα 62**) λαχανικών και φρούτων οι [Arienzo et al.,\(2013\)](#) επικύρωσαν πολυ-μέθοδο χρησιμοποιώντας LC-MS/MS, ESI+ και εκχύλιση Quechers. Τα LODs και LOQs ανήρθαν στα 0,01-0,05 mg/Kg και 0,03-0,15 mg/Kg αντίστοιχα.



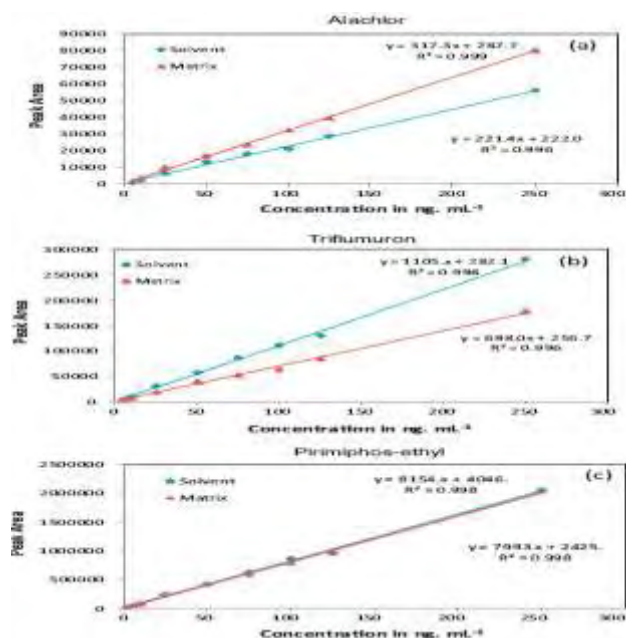
Σχήμα 65. Αποτελέσματα αναλύσεως για το σύνολο των 146 δειγμάτων για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση 14 φυτοφαρμάκων

Οι [Chen et al.,\(2011\)](#) επικύρωσαν μια πολυ-μέθοδο για την ανάλυση 65 φυτοφαρμάκων σε τσάι με τη χρήση UPLC/MS-MS και ιονισμό API. Χρησιμοποίησαν τροποποιημένη μέθοδο Quechers, το LOQ εντοπίστηκε κάτω από 0,01 mg/Kg.



Σχήμα 66. Απόδοση εκχύλισης σε οξινισμένο και μη δείγμα

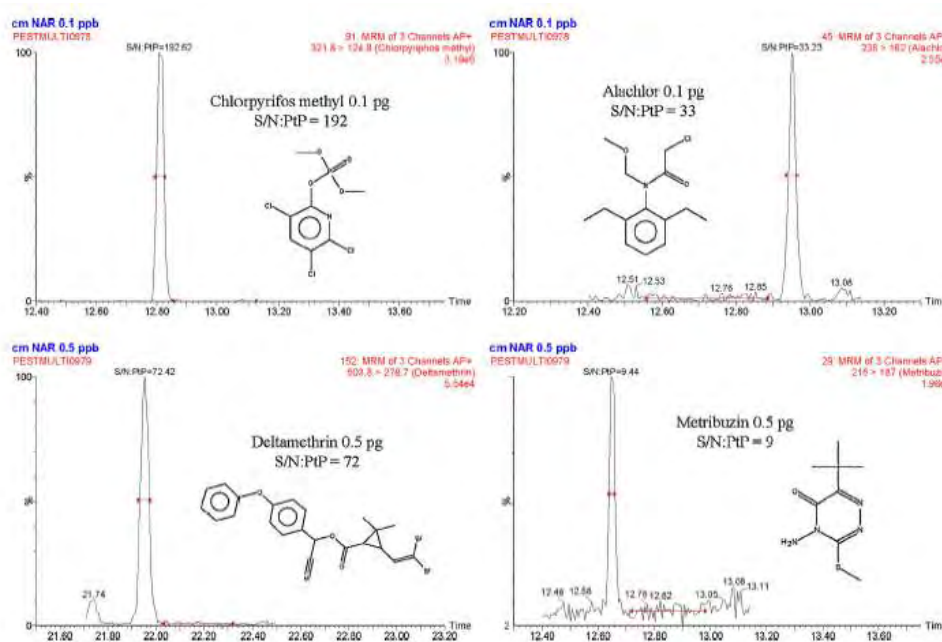
Σε ένα είδος κινέζικου φυτού το “ginseng” και με εκχύλιση DLLME οι [Chen et al.,\(2013\)](#) επικύρωσαν μια πολυ-μέθοδο για την ανάλυση 39 φυτοφαρμάκων. Με UPLC/MS-MS και ιονισμό ESI(+,-) κατάφεραν να επιτύχουν LOQs από 0,01 έως 0,1 μg/Kg.



Σχήμα 67. Επίδραση υποστρώματος .a: αύξηση του σήματος, b: μείωση σήματος, c: καμία επίδραση υποστρώματος

4.2 Αέρια χρωματογραφία-φασματοσκοπία μάζας για την ανάλυση φυτοφαρμάκων

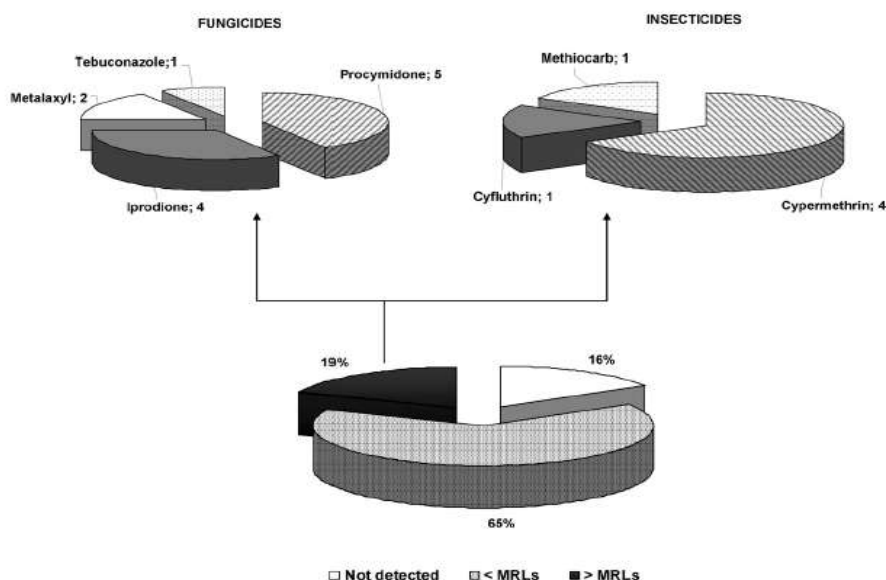
Ο [Walorczyk, \(2007\)](#) επικύρωσε μια πολυ-μέθοδο για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση 122 φυτοφαρμάκων σε φυτικές τροφές ζώων, χρησιμοποιώντας GC-MS/MS και εκχύλιση d-SPE (dispersive-Solid phase extraction). Το όριο ανίχνευσης (LOD) ανήρθε στα 0,01 mg/Kg. Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Quechers. Η εισαγωγή του δείγματος στον αέριο χρωματογράφο ήταν προγραμματισμένη (programmed) και σε λειτουργία split με ιονισμό EI (Electron ionization). Σε μια άλλη εργασία υπό τους [Pizzutti et al.,\(2012\)](#) αναπτύχθηκε μια μέθοδος ταυτοποίησης και ποσοτικοποίησης 51 φυτοφαρμάκων σε σπόρους καφέ. Οι ερευνητές χρησιμοποίησαν ένα ιονισμό οποίος προσφέρει μεγάλη ειδικότητα, τον αρνητικό χημικό ιονισμό (negative chemical ionization -NCI). Με μια τροποποιημένη μέθοδο Quechers και συσκευή GC-MS/MS με προγραμματισμένη εισαγωγή δείγματος και λειτουργία split κατάφεραν να επιτύχουν LOQs από 10 έως 50 µg/Kg. Οι [Cherta et al.,\(2013b\)](#) έκαναν χρήση ενός πιο «μαλακού» (soft ionization) ιονισμού τον APCI (atmospheric pressure chemical ionization), για να επιτύχουν μικρή θραυσματοποίηση των πρωτονιομένων μητρικών ιόντων και δημιουργία έντονης αφθονίας (abundance) αυτών. Με εκχύλιση τροποποιημένης μεθόδου Quechers και GC-MS/MS με την εισαγωγή του δείγματος σε προγραμματισμένη λειτουργία και split injection κατάφεραν να επικυρώσουν πολυ-μέθοδο ανάλυσης 142 φυτοφαρμάκων με LODs από 0,01-10 µg/Kg. Τα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η τομάτα το καρότο και το πορτοκάλι.



Σχήμα 68. Χρωματογράφημα MS/MS για την ποσοτικοποίηση 4 φυτοφαρμάκων σε επίπεδα συγκέντρωσης της τάξης των 0,1 έως 0,5 ng/mL τα οποία αντιστοιχούν σε 0,1-0,5 pg στην στήλη.

Με GC-QTOF/MS οι [Zhang et al.,\(2012\)](#) για την ταυτοποίηση 187 φυτοφάρμακων δημιούργησαν μια βάση δεδομένων από τα δεδομένα των μεταπτώσεων της μάζας μεταξύ των MS¹ και MS² συμπεριλαμβάνοντας και το χρόνο συγκράτησης. Οι ερευνητές εφάρμοσαν εκχύλιση με ακετυλονιτρίλιο και προγραμματισμένη εισαγωγή δείγματος σε λειτουργία split. Η βάση δεδομένων μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως

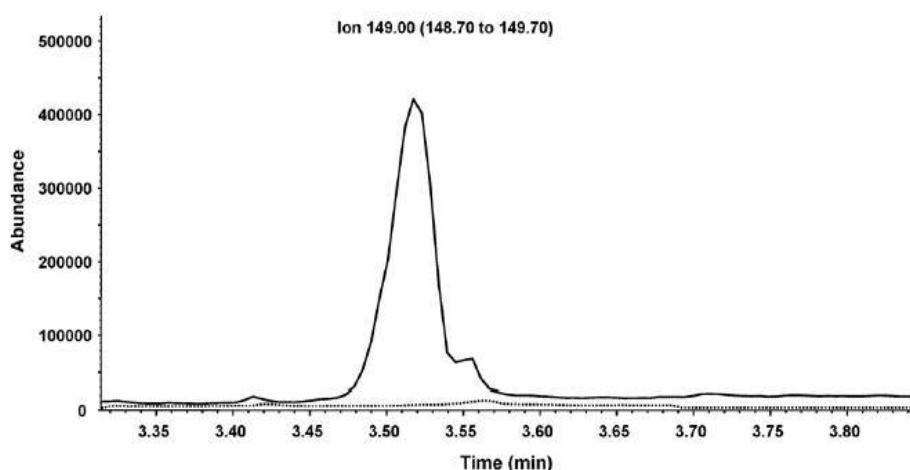
βιβλιοθήκη φασμάτων 2 μεταπτώσεων. Οι [Wank et al.,\(2013c\)](#) επικύρωσαν μια μέθοδο για την ανάλυση φυτοφαρμάκων σε διάφορα φρούτα και λαχανικά, χρησιμοποίησαν εκχύλιση MAE και μ -SPE. Χρησιμοποίησαν αναλυτή GC/MS-QP και ιονισμό EI με την εισαγωγή του δείγματος σε λειτουργία splitless. Τα LODs και LOQs κυμάνθηκαν από 0,07-0,23 $\mu\text{g/Kg}$ και 0,21-0,69 $\mu\text{g/Kg}$ αντίστοιχα. Οι [Ho et al.,\(2013\)](#) επικύρωσαν μέθοδο για την ανάλυση 10 φυτοφαρμάκων χρησιμοποιώντας GC-MS-Q. Έκαναν χρήση εκχύλισης DLLME σε υποστρώματα φρούτων λαχανικών όπως επίσης και σε βότανα τα οποία προορίζονται για ιατρικούς σκοπούς. Η διαδικασία εισαγωγής του δείγματος ήταν σε προγραμματισμένη λειτουργία splitless. Κατάφεραν να επιτύχουν LODs και LOQs από 0,02 έως 0,23 και 0,06 έως 0,69 ng/L αντίστοιχα. Με υποστρώματα το αβοκάντο και το αμύγδαλο οι [Lozano et al.,\(2014\)](#) προσπάθησαν να μειώσουν το ME χρησιμοποιώντας εκχύλιση Quechers και ως απορροφητικά υλικά βασισμένα στο διοξείδιο του ζιρκονίου επικύρωσαν μια πολυ-μέθοδο για 170 φυτοφάρμακα. Κάνοντας χρήση GC-QTOF και ιονισμό EI σε προγραμματισμένη εισαγωγή δείγματος κατάφεραν να επιτύχουν LOQs από 10-50 $\mu\text{g/Kg}$ για το αμύγδαλο και για το αβοκάντο. Τα αποτελέσματα έδειξαν επίσης καλύτερη απόδοση των απορροφητικών υλικών βασισμένα στο διοξείδιο του ζιρκονίου σε σχέση με τα PSA και C-18 που χρησιμοποιεί κυρίως η Quechers. Με GC-MS-Q και ιονισμό EI οι [Latif et al., \(2011\)](#) ανέλυσαν διάφορα φυτοφάρμακα από την περιοχή του Πακιστάν. Χρησιμοποιήθηκε εκχύλιση UAE και συμπύκνωση και φιλτράρισμα του εκχυλίσματος, η εισαγωγή του δείγματος ήταν προγραμματισμένη σε λειτουργία Splitless. Το 61% των δειγμάτων βρέθηκαν πάνω από τα MRLs. Τα LODs και LOQs κυμάνθηκαν από 0,01-0,07 και 0,08-0,26 mg/Kg αντίστοιχα. Για την ανάλυση 23 φυτοφαρμάκων σε λαχανικά οι [González-Rodríguez.,\(2008\)](#) χρησιμοποίησαν GC-MS/QIT με ιονισμό EI και εκχύλιση SPE. Χρησιμοποιήθηκε προγραμματισμένη εισαγωγή δείγματος και εντοπίστηκαν LOQs και LODs από 0,001 έως 0,016 και 0,001 έως 0,034 mg/Kg . Στα δείγματα που αναλύθηκαν εντοπίστηκαν φυτοφάρμακα σύμφωνα με το **σχήμα 66**.



Σχήμα 69. Αποτελέσματα ανάλυσης φυτοφαρμάκων σε πραγματικά δείγμα

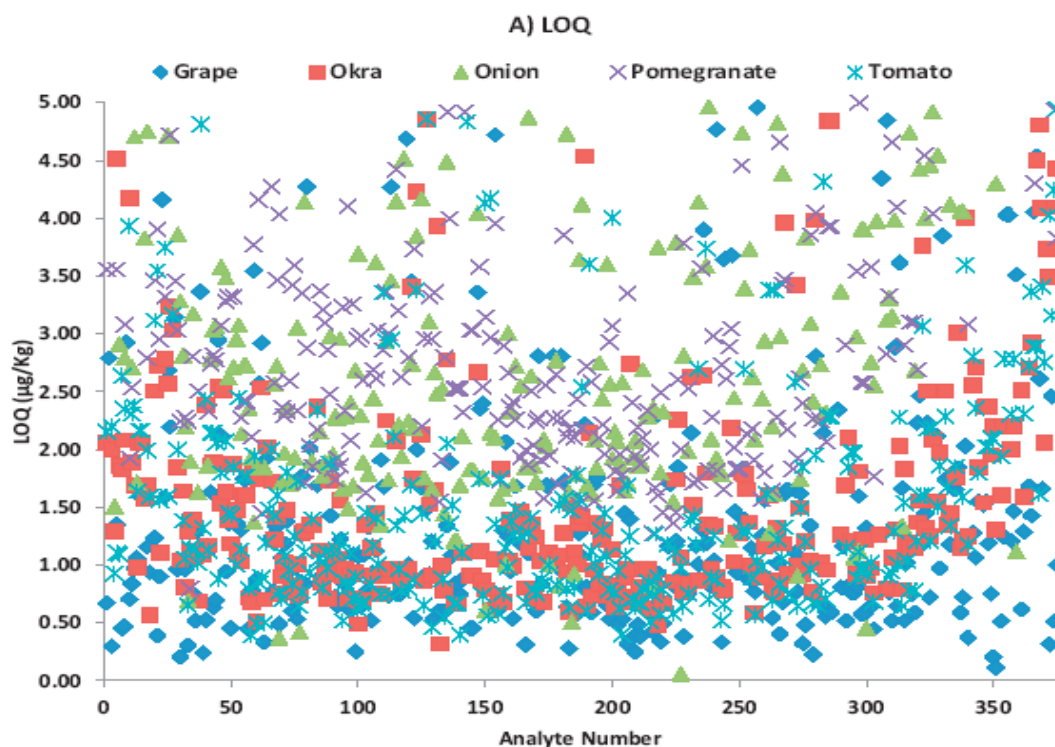
Οι [Walorczyk et al., \(2008\)](#) επικύρωσαν πολυ-μέθοδο ανάλυσης 140 φυτοφαρμάκων χρησιμοποιώντας GC-MS/MS με ιονισμό EI με προγραμματισμένη λειτουργία και

εισαγωγή split σε υπόστρωμα φυτικών ζωοτροφών. Χρησιμοποίησαν μέθοδο εκχύλισης Quechers και επέτυχαν LOQ στα 0,01 mg/Kg. Οι [Cunha et al.,\(2009\)](#) με εκχύλιση DLLME και κάνοντας χρήση GC- MS και ιονισμό EI επικύρωσαν μέθοδο για την ανάλυση 24 φυτοφαρμάκων με υπόστρωμα χυμό μήλου. Χρησιμοποίησαν προγραμματισμένη λειτουργία και εισαγωγή splitless και κατέφεραν να επιτύχουν LODs από 0,06 έως 2,20 µg/L.



Σχήμα 70. Χρωματογράφημα για την ανίχνευση φυτοφαρμάκου σε χυμό μήλου: όπου (-----) χωρίς την προσθήκη φυτοφαρμάκου, (—) με την προσθήκη φυτοφαρμάκου 0,541 µg/L.

Το 2010 οι [Koesukwiwat et al](#) επικύρωσαν πολυ-μέθοδο για την ανάλυση 150 φυτοφαρμάκων με την χρήση GC-MS-TOF. Η εισαγωγή του δείγματος ήταν προγραμματισμένη και σε λειτουργία split. Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε με Quechers σε υπόστρωμα φρούτων και λαχανικών. Η μέθοδος επέτυχε LOQs < 25 ng/g. Ο [Walorczyk., \(2012a\)](#) επικύρωσε πολυ-μέθοδο για την ανάλυση 36 φυτοφαρμάκων σε διάφορα φρούτα κάνοντας χρήση GC-MS/MS-QqQ και ιονισμό EI. Η λειτουργία εισαγωγής δείγματος ήταν προγραμματισμένη- split. Οι [Belmonte Valles et al.,\(2012\)](#) επικύρωσαν μέθοδο για την ανάλυση 53 φυτοφαρμάκων σε διάφορα υποστρώματα φρούτων και λαχανικών. Κάνοντας εκχύλιση με αιθανικό αιθυλεστέρα και με τη χρήση GC-MS-QqQ σε προγραμματισμένη λειτουργία split και ιονισμό CI- κατάφεραν να επιτύχουν LOD < 2,5 ppb και LOQs 1 ppb αντίστοιχα. Για 349 φυτοφάρμακα, 11 PCBs και 15 PHAs οι [Banerjee et al.,\(2012\)](#) επικύρωσαν πολυ-μέθοδο ανάλυσης σε φρούτα και λαχανικά κάνοντας χρήση του GC-MS-QqQ και ιονισμό EI+ σε προγραμματισμένη λειτουργία (**σχήμα 68**). Η ερευνητές έκαναν χρήση εκχύλισης με αιθανικό αιθυλεστέρα και κατάφεραν να επιτύχουν LOQs < 5 µg/ Kg.



Σχήμα 71. LOQ σε σχέση με τον αριθμό αναλυτών σε 5 διαφορετικά υποστρώματα

4.2.1 Συγκεντρωτικά δεδομένα από αναλυτικές μεθόδους επικύρωσης ανάλυσης φυτοφαρμάκων με τη χρήση αέριας χρωματογραφία-φασματοσκοπία μάζας

Παρακάτω (πίνακας 16) παρατίθενται συγκεντρωτικά δεδομένα με βάση τα στοιχεία: 1) Τη μέθοδο εκχύλισης, 2) Τον τύπο του ιονισμού που χρησιμοποιούν οι συσκευές φασματοσκοπίας μαζών, 3) Τον τύπο του αναλυτή μάζας, 4) Τα όρια ποσοτικοποίησης και ταυτοποίησης, 5) Τη διαδικασία εισαγωγής του δείγματος σε μορφή πίνακα περιλαμβάνει αναφορές από το 2007-2014.

Πίνακας 16. Συγκεντρωτικά δεδομένα από αναλυτικές μεθόδους επικύρωσης ανάλυσης φυτοφαρμάκων

Υπόστρωμα	Αριθμός αναλυτών	Μέθοδος εκχύλισης	Ιονισμός	Αναλυτής μάζας	LOQ	LOD	Μέθοδος εισαγωγής ^a	Αναφορές
Δημητριακά, ζωοτροφές	167	Quechers (mod)	-	QqQ	0,01 mg/Kg	-	P, LVI	Walorczyk & Drozdzyński.,(2012b)
Σταφύλια	8	MAE	EI	Q	2,2-5,8 µg/Kg	0,7-1,7 µg/Kg	P, splitless	Lagunas-Allué et al.,(2012)
Σταφύλια	8	MSPD	EI	Q	3,4-8,7 µg/Kg	1,0-2,6 µg/Kg	P, splitless	Lagunas-Allué et al.,(2012)
Σταφύλια	8	Quechers	EI	Q	4,2-14,3 µg/Kg	1,2-4,3 µg/Kg	P, splitless	Lagunas-Allué et al.,(2012)
Σταφύλια	8	Ethyl acetate	EI	Q	4,9-13,6 µg/Kg	1,5-4,1 µg/Kg	P, splitless	Lagunas-Allué et al.,(2012)
Λαχανικά	10	Quechers (mod)	-	Q	1,3-29 ng/g	0,39-8,6 ng/g	P, splitless	Zheng et al.,(2013)
Χυμοί φρούτων	54	SMPE	EI,CI	QIT	0,1-0,5 µg/L	0,01-16,7 µg/L	P,-	Cortés-Aguado et al.,(2008)
Οίνοι	160	dSPE	EI	QqQ	0,01-0,05 mg/Kg	-	P,-	Walorczyk et al.,(2011)
Radix astragali ^b	27	MAE & PSA	EI	Q	0,8-3 µg/Kg	0,2-1 µg/Kg	P,-	Mao et al.,(2012)
Νερό ποταμού	7	SPE&SPME	-	OIT	0,2-3,5 ng/L	0,07-1,1 ng/L	P,-	Bonansea et al.,(2013)
Λαχανικά	23	SPE	EI	OIT	6-20 µg/Kg	2-10 µg/Kg	P,-	Osman et al.,(2010)
Πράσο	20	Quechers	EI	QqQ	0,25-5 µg/Kg	0,07-1,5 µg/Kg	P,-	Qu et al.,(2010)
Φρούτα	14	Quechers	CI	QIT	0,001-0,013 mg/Kg	-	P, splitless	Cieřlik et al.,(2011)
Σταφύλια	25	HF-LPME	EI	Q	1,6-28 µg/L	0,9-8,4 µg/L	P, splitless	Li et al.,(2011)
Φαγητά ^c	41	Quechers	EI	QIT	0,0125-1,0 µg/Kg	0,004-0,3 µg/Kg	P, splitless	Park et al.,(2011a)
Χυμοί φρούτων	174	Quechers	-	Q	0,001-0,0034 µg/g	-	P, splitless	Tran et al.,(2012)

Πίνακας 16. (συνέχεια)

Υπόστρωμα/ τα	Αριθμός αναλυτών	Μέθοδος εκχύλισης	Ιονισμός	Αναλυτής μάζας	LOQ	LOD	Μέθοδος εισαγωγής ^a	Αναφορές
Ginseng ^d	32	ACN	EI	QqQ	0,15-13 µg/Kg	0,04-3,91 µg/Kg	P, split	Lee et al.,(2012)
Τομάτα	30	DLLME	EI	QqQ	8,9-840 µg/Kg	2,7-250 µg/Kg	P,-	Melo et al.,(2012)
Λαχανικά	11	HS-SPME	EI	QIT	0,20-8,63 µg/L	0,01-2,70 µg/L	P, splitless	Sang et al.,(2013)
Σταφύλια	47	Quechers	-	-	<0,01 mg/Kg	-	P, splitless	Banerjee et al.,(2013)
Ρύζι	124	Quechers (mod)	EI	QqQ	1,2-26,3 µg/Kg	0,1-7,3 µg/Kg	P,-	Hou et al.,(2013)
Φρούτα, λαχανικά	29	Quechers	EI	QqQ	<0,01 mg/Kg	-	P, splitless	Walorczyk et al.,(2013)
Μήλο	4	SPME	EI	Q	0,05-1 µg/Kg	0,01-0,2 µg/Kg	P, splitless	Abdulra'uf & Tan.,(2013)
Έλαια	35	DSPE	NCI	QqQ	0,05-1 ng/g	0,01-1 ng/g	P, split	Deme et al.,(2014)
Φράουλα	2	SLE, MSPD	EI	QIT	5-15 µg/Kg	2-6 µg/Kg	P,-	López-Fernández et al.,(2014)
Φρούτα, λαχανικά	1	Acid hydrolysis	-	QIT	0,04 mg/Kg	0,01 mg/Kg	P, split	Mujawar et al.,(2014)
Φρούτα, λαχανικά	105	Quechers (mod)	EI	Q	1,2-161 µg/Kg	0,4-48,2 µg/Kg	P, splitless	Lesueur et al.,(2008)
Λαχανικά	19	ASE	EI	Q	3,3-3 µg/Kg	1,3-4,1 µg/Kg	P,-	Alamgir Zaman Chowdhury et al.,(2013)
Τσάι	33	ASE	EI	-	-	5-20 µg/Kg	P, splitless	HU et al.,(2008)
Βότανα	23	Quechers	EI	QIT	0,2-10,1 µg/Kg	0,05-1,3 µg/Kg	P,-	Dai et al.,(2011)
Φρούτα, λαχανικά	130	ASE	EI	QqQ	10 µg/Kg	0,1-10 µg/Kg	P, splitless	Cervera et al.,(2010)
Φράουλες	151	Quechers	EI	QqQ	10 µg/Kg	4 µg/Kg	P, split	Bolaños et al.,(2007)
Μέλι	20	ASE	EI	Q	5-8 µg/Kg	1-5 µg/Kg	P, split	Graziella et al.,(2011)

5. ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ

Λόγω των πολύ χαμηλών MRLs που έχει θεσπίσει η Ε.Ε στα φυτοφάρμακα μια ανάλυση θα πρέπει να έχει :

1. Πολύ μεγάλη ειδικότητα και ευαισθησία
2. Σαφή επιβεβαίωση και ταυτοποίηση του κάθε αναλυτή που τυχόν ανιχνευτεί
3. Κατάλληλη ποσοτικοποίηση από τον αναλύτη που ανιχνεύεται

Βάσει της νομοθεσίας, εργαστήρια που εκτελούν τέτοιες αναλύσεις θα πρέπει να έχουν διαπιστευτεί κατά ISO/17025:2005 όπως επίσης να έχουν κατάλληλο και εκπαιδευμένο προσωπικό συχνά με μεταπτυχιακούς ή διδακτορικούς τίτλους.

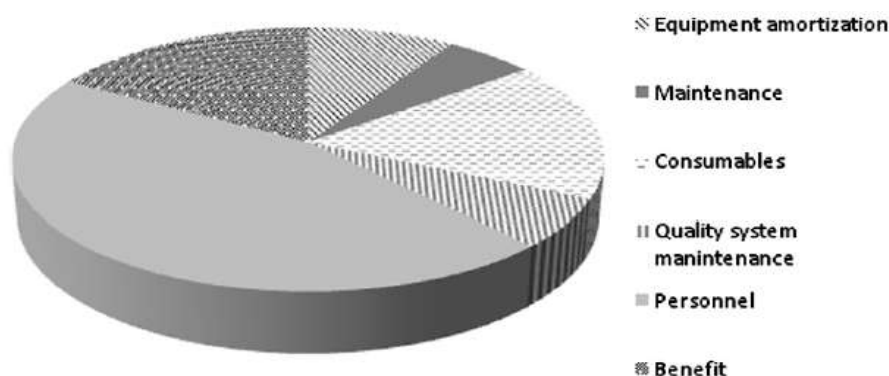
Το συνολικό κόστος (σχήμα 69) μιας ανάλυσης με πολυ-υπολειμματική μέθοδο μπορεί να συνοψιστεί από τις παρακάτω εξισώσεις (1 & 2)

$$C_t = C_v + C_f \quad (1)$$

$$C_f = C_A + C_M + C_p + C_Q \quad (2)$$

όπου: C_t =συνολικό κόστος, C_v = διάφορα κόστη, C_f = σταθερά κόστη, C_A = κόστος απόσβεσης, C_M =κόστη συντήρησης, C_p = κόστος προσωπικού, C_Q =κόστη τήρησης συστήματος ποιότητας.

Στο κόστος C_v περιλαμβάνονται τα πρότυπα των φυτοφαρμάκων καθώς και οργανικοί διαλύτες και αναλώσιμα που μπορούν να φτάσουν τα 8,9 € / δείγμα. Ένα εργαστήριο πρέπει να έχει ~ 450 πρότυπα ως στοκ τα οποία τα μισά από αυτά πρέπει να τα αγοράζει κάθε χρόνο καθώς έχουν διάρκεια ζωής 2 χρόνια. Πριν τη διαπίστευση πρέπει να ποσοτικοποιηθούν ~ 300 αναλύτες εκ των οποίων θα γίνει η επιλογή για την τελική διαπίστευση. Για τα κόστη $C_A + C_M$ οι τιμές τα τελευταία χρόνια παραμένουν σταθερές με μια συσκευή GC-QqQ/MS να κοστίζει περί τα 140.000 € και μια συσκευή GC-IT/MS περί τα 100.000 €. Μια συσκευή UHPLC-MS/MS-QqQ κοστίζει περίπου 250.000 € με το MS/TOF να αγγίζει τα 300.000-400.000 €. Το κόστος απόσβεσης αυτών των μηχανημάτων με περίοδο 6-ετίας λόγω αλλαγής των τεχνολογιών είναι από 23,333 έως 41,660 €/ χρόνο και κόστος συντήρησης περίπου στις 11.500 € και 17.500 για το GC-QqQ/MS και UHPLC-MS/MS-QqQ αντίστοιχα. Το κόστος της διαπίστευσης ανά χρόνο κυμαίνεται ~ στα 1500 ανά μέθοδο με ένα επιπλέον ποσό των 1250€ για συζευγμένες τεχνικές. Το κόστος προσωπικού/ αναλυτή κυμαίνεται ~ 34.500 € μαζί με ασφάλεια, φόρους και εκπαίδευση (ποικίλει σημαντικά ανάλογως την χώρα).



Σχήμα 72. Κατανομή συνολικού κέρδους για μια πολυ- υπολειμματική ανάλυση

Για να είναι επικερδές ένα εργαστήριο (βασισμένο στα παραπάνω κόστη) θα πρέπει περίπου η τιμή ανά δείγμα για 300 αναλύτες να είναι στα 100 € με ελάχιστο τα 4069 δείγματα/ χρόνο ή 80 € με ελάχιστο αριθμό δειγμάτων τα 5368 / χρόνο ή 70 € με ελάχιστο αριθμό δειγμάτων 6408/ χρόνο.([Martínez-del-Río et al.,2013](#))

6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Από 01/01/2014 η Ε.Ε ως αρχή δέχεται μόνο αποτελέσμα με χρήση φασματομετρίας μαζών από τα εργαστήρια που εκδίδουν αποτελέσματα στο πλαίσιο του ελέγχου των προϊόντων για υπολείμματα γεωργικών φαρμάκων. Παρά τη ραγδαία εισαγωγή της φασματομετρίας μαζών στην ανάλυση φυτοφαρμάκων, πολλοί ερευνητές (κυρίως πανεπιστήμια) εξακολουθούν και επικυρώνουν μεθόδους κυρίως ποσοτικοποίησης με τους πιο κλασικούς ανιχνευτές, είτε πρόκειται για την χρήση αέριας ή υγρής χρωματογραφίας ([Dos Santos et al., 2013](#), [Ditya et al.,2012](#), [Wu et al.,2012](#), [Lourencetti et al.,2008](#), [Peruzzo et al., 2008](#), [Farajzadeh et al.,2013](#)), [Miao et al.,2013](#), [Li et al.,2014](#), [Furlani et al.,2011](#), [Park et al.,2011b](#), [Łozowicka et al.,2012](#), [Obuseng et al.,2013](#)). Ένας από τους λόγους που μπορεί να οφείλεται αυτό είναι υψηλότερες τιμές αγοράς (βλέπε κεφάλαιο 5) συντήρησης και χειρισμού των συζευγμένων τεχνικών που μερικές φορές είναι απαγορευτικές. Η εισαγωγή της MS και ειδικά της MS/MS αύξησε την ειδικότητα, την ευαισθησία και αύξησε κατά πολύ την δυνατότητα των πολυ-υπολειμματικών μεθόδων να εφαρμόζονται σε πολύπλοκα υποστρώματα. Οι λειτουργίες SIM (selective ion monitoring) και ειδικά η MRM (multiply reaction monitoring) που προσφέρουν αυτές οι συσκευές με τις οποίες ο χρήστης έχει τη δυνατότητα να επιλέξει συγκεκριμένα μητρικά και θυγατρικά ιόντα έχουν αυξήσει κατά πολύ την ειδικότητα όπως επίσης και έχουν μειώσει το θόρυβο με αποτέλεσμα όλο και χαμηλότερα όρια ποσοτικοποίησης και ανίχνευσης. Παρόλο τα πολύ χαμηλά LODs και LOQs που προσφέρει η φασματοσκοπία μαζών και άλλοι ανιχνευτές μπορούν να προσφέρουν τόση μεγάλη ευαισθησία ειδικά εάν πρόκειται για τους ECD και NPD. Με υπόστρωμα λωτούς οι [Miao et al.,\(2013\)](#) και χρησιμοποιώντας GC-ECD ανέπτυξαν μια μέθοδο για την ανάλυση 36 φυτοφαρμάκων. Τα LODs και LOQ κυμάνθηκαν από 0,01-0,03 µg/L και 0,05-10 µg/L αντίστοιχα. Συγκρινόμενα αυτά τα αποτελέσματα με εργασίες φασματοσκοπίας μαζών ([Cortés-Aguado et al.,2008](#), LOQs από 0,1-0,5 µg/L και LODs από 0,01-16,7 µg/L σε σταφύλια) παρατηρείται ότι όχι μόνο η μέθοδος με ανιχνευτή ECD δεν υστερεί σε ευαισθησία, αλλά υπερτερεί. Δεν είναι μόνο όμως οι δυο αυτοί ανιχνευτές που μπορούν να δώσουν τόσα χαμηλά όρια ποσοτικοποίησης. Οι [Farajzadeh et al.,\(2013\)](#) με υπόστρωμα χυμό σταφυλιών, τομάτα και αγγούρια ανέπτυξαν μια μέθοδο ανάλυσης φυτοφαρμάκων χρησιμοποιώντας GC-FID. Τα LODs και LOQs κυμάνθηκαν αντίστοιχα από 0,53-1,13 ng/mL και 1,76-3,77 ng/mL, αποτελέσματα πολύ κοντά σ'αυτά των [Lee et al.,\(2012\)](#) οι οποίοι χρησιμοποιώντας MS/MS κατάφεραν να επιτύχουν LOQs LODs και από 0,15-13 µg/Kg και 0,04-3,91 µg/Kg. Το πρόβλημα όμως σ'αυτές τις τεχνικές έγκειται περισσότερο στην ταυτοποίηση και όχι στην ποσοτικοποίηση και με το γεγονός ότι τα MRLs διαφέρουν από φυτοφάρμακο σε φυτοφάρμακο η ταυτοποίηση είναι απαραίτητη. Χαρακτηριστικό είναι το **Σχήμα 57** όπου σχεδόν ίδια ιόντα (πολύ μικρή διαφορά τις τάξης των 0-0,04 Da) εμφανίζονται σε χρόνο που διαφέρει λιγότερο από 0,5 min, ιόντα που

προέρχονται από φυτοφάρμακα και ουσίες από το υπόστρωμα. Συνεπώς μια τεχνική π.χ GC-ECD δεν θα μπορέσει να δώσει την ταυτοποίηση που απαιτείται. Τα φυτικά υποστρώματα είναι πολύπλοκα υποστρώματα και η δυσκολία ανάλυσης ενισχύεται μέσω της επίδρασης υποστρώματος, κυρίως λόγω και των πολλών χρωστικών που περιέχουν. Ακόμα και η φασματοσκοπία μαζών ορισμένες φορές αδυνατεί να δώσει πλήρως ταυτοποίηση αν ο αναλυτής μαζών έχει μικρή δύναμη ανάλυσης (resolving power) και τα ιόντα έχουν πάρα πολύ κοντινή μάζα. Σ' αυτή την περίπτωση απαιτείται αναλυτής, όπως ο μαγνητικής εστίασης ο οποίος όμως είναι δυσεύρετος και πολύ ακριβός. Η αέρια χρωματογραφία –φασματοσκοπία είναι πιο συχνά χρησιμοποιημένη τεχνική λόγω και της μεγάλης διαχωριστικής ικανότητας που προσφέρει αλλά και της σχετικά μικρότερης τιμής με ένα αντίστοιχο σύστημα υγρής χρωματογραφίας. Απ' άποψη ιονισμού οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται κατά κόρον είναι για την υγρή χρωματογραφία ο ESI και για την αέρια ο EI. Ο τελευταίος προσφέρει λίγες πληροφορίες για το μητρικό ιόν λόγω της έντονης θραυσματοποίησης, χρησιμοποιείται όμως καθώς μπορούν να δημιουργηθούν βιβλιοθήκες φασμάτων σύγκρισης, ένα πολύτιμο εργαλείο μέσα στις εκατοντάδες διαφορετικών φυτοφαρμάκων. Ο ESI θεωρείται «μαλακός-soft» ιονισμός, δίνει πληροφορίες για το μητρικό ιόν και δη του πρωτονιομένου (M+1) και αποπρωτονιομένου (M-1) μητρικού ιόντος. Η εισαγωγή του δείγματος είναι κυρίως προγραμματισμένη στην αέρια χρωματογραφία και σε λειτουργία splitless κυρίως λόγω της χαμηλής συγκέντρωσης των αναλυτών αλλά και της διαφορετικής πτητικότητας αυτών, επιλογή, που δεν προσφέρει η υγρή χρωματογραφία. Η ταυτοποίηση που παρέχει η φασματοσκοπία μαζών επιτρέπει την ανάλυση >200 αναλυτών από ένα μόνο δείγμα. Από άποψη τεχνικών προετοιμασίας του δείγματος η μέθοδος Quechers φαίνεται ότι εξελίσσεται σε πρότυπη μέθοδο για πολλούς ερευνητές και επίσημα πρωτόκολλα ανά τον κόσμο. Ήδη θεωρείται επίσημη μέθοδος βάσει των European Standard Method EN 15662 και AOAC Official Method 2007.01 για E.E και Η.Π.Α, αντίστοιχα. Η μέθοδος φαίνεται να υπερτερεί ([Blasco et al.,2011](#), [Cherta et al.2013a](#)) έναντι άλλων μεθόδων και δεν είναι τυχαίο ότι πολλά διεργαστηριακές δοκιμές την έχουν στο πρωτόκολλο τους. Είναι μέθοδος που δεν χρησιμοποιείται μόνο για φυτοφάρμακα. Πολλές ουσίες προσδιορίστηκαν χάρις στη μέθοδο QuEChERS, μερικές από αυτές είναι, ακρυλαμίδιο, κλινικά και κτηνιατρικά κατάλοιπα, τεστ σε διατροφικά συμπληρώματα και μυκοτοξίνες. ([Lehotay et al.,2010b](#), [irhan et al.,2014](#),[Park et al.,2012](#), [Pérez-Burgos et al., 2012](#)). Από τις άλλες τεχνικές ενδιαφέρον παρουσιάζει η Molecularly-imprinted stir-bar sorptive extraction (MI-SBSE) λόγω της μεγάλης ειδικότητας που μπορεί να προσφέρει. Η επιλογή φυσικά της μεθόδου εκχύλισης λαμβάνει υπόψη πολλούς παράγοντες (**Σχήματα 11 & 12**) και η επιλογή της πρέπει να γίνει με πολύ προσοχή. Η QuEChERS επίσης απαλείφει βήματα όπως εξάτμιση, συμπύκνωση, αλλαγή διαλυτών και μεταγγίσεις τα οποία συνήθως είναι υπεύθυνα για τυχόν απώλειες αναλυτών, ([Wilkowska & Biziuk.,2011](#), [Kolberg et al.,2011](#), [Payá et al., 2007](#), [Núñez et al.,2012a](#), [Capriotti et al.,2013](#), [Stefano et al.,2012](#)) σημείο κομβικό αν θεωρηθεί ότι τα MRLs είναι της τάξης των 0,01 mg/Kg. Επίσης με μικρές αλλαγές κυρίως στα τελευταία στάδια είναι δυνατόν από ένα δείγμα να πραγματοποιηθεί ανάλυση GC/MS ή LC/ MS-MS. Οι πιο παλιές τεχνικές SPE και LLE τείνουν να εκλείβουν από τα αναλυτικά πρωτόκολλα καθώς χρησιμοποιούνται όλο και λιγότερο. Στην επικύρωση των μεθόδων πλέον χρησιμοποιείται έντονα και από ερευνητές εκτός E.E σε Ασία, Λατινική Αμερική, Η.Π.Α ο οδηγός SANCO ο οποίος αναφέρει συγκεντρωτικά και με παραδείγματα πως πρέπει να γίνει σωστά η διαδικασία της επικύρωσης ώστε να υπάρχουν και συγκρινόμενα αποτελέσματα. Από επίπεδο διασφάλισης ποιότητας απαιτείται σε τέτοια εργαστήρια το ISO/IEC /17025 πρότυπο

πολύ απαιτητικό και μερικές φορές πολύ ακριβό για τη διαπίστευση και παρακολούθηση του, απαραίτητο όμως για την έκδοση επισήμων αποτελεσμάτων. Η Ε.Ε έχει θεσπίσει από τα χαμηλότερα MRLs στον κόσμο ([Martínez-del-Río et al., 2013](#)) και πολλοί ερευνητές από περιοχές εκτός Ε.Ε έχουν ως μέτρο σύγκρισης τη βάση δεδομένων MRLs της Ε.Ε μια βάση δεδομένων με πάνω από 500 φυτοφάρμακα και τα MRLs σε διάφορα προϊόντα. Ο συνδυασμός κατάλληλων τεχνικών προετοιμασίας και συζευγμένων τεχνικών επιτρέπει την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση πολλών αναλυτών από πληθώρα υποστρωμάτων, τεχνικές που πριν μερικά χρόνια θα φάνταζαν απίθανες. Η φασματοσκοπία μαζών σε όλες τις εκδοχές της φάνηκε να άνοιξε τον δρόμο για την εφαρμογή πολυ-υπολειμματικών μεθόδων με αποτελέσματα την προστασία του καταναλωτή και της δημόσιας υγείας.

7. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

1. Πολύ χαμηλά όρια ποσοτικοποίησης μπορούν να προσφέρουν και άλλοι κλασικοί ανιχνευτές εκτός της φασματοσκοπίας μαζών.
2. Οι κλασικοί ανιχνευτές υστερούν στην ταυτοποίηση των φυτοφαρμάκων.
3. Οι συζευγμένες τεχνικές προσφέρουν και ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις.
4. Οι πολυ-υπολειμματικοί μέθοδοι με συζευγμένες τεχνικές τείνουν να γίνουν στάνταρτ μέθοδοι ανάλυσης φυτοφαρμάκων
5. Η επίδραση υποστρώματος είναι η παράμετρος η οποία μπορεί να αυξήσει ή να μειώσει την απόκριση του αναλύτη στο χρωματογραφικό σύστημα.
6. Η μέθοδος Quechers είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη και αποτελεσματική σε σχέση με άλλες μεθόδους προετοιμασίας δείγματος σε μεγάλο εύρος υποστρωμάτων. Με την μέθοδο του ethyl acetate να έρχεται δεύτερη.
7. Η φασματοσκοπία μαζών σε συνδυασμό με την αέρια χρωματογραφία είναι πιο συχνά χρησιμοποιημένη τεχνική για την ανάλυση φυτοφαρμάκων.
8. Η δυνατότητα αρνητικού και θετικού ιονισμού ESI στην υγρή χρωματογραφία επιτρέπει την ανάλυση πληθώρας φυτοφαρμάκων.

Βιβλιογραφία

1. Abdulra'uf, L. B., & Tan, G. H. (2013). Multivariate study of parameters in the determination of pesticide residues in apple by headspace solid phase microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry using experimental factorial design. *Food Chemistry*, 141(4), 4344-4348
2. Abdulra'uf, L. B., Hammed, W. A., & Tan, G. H. (2012). SPME fibers for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables: A review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 42(2), 152-161
3. Abdulra'uf, L. B., Sirhan, A. Y., & Huat Tan, G. (2012). Recent developments and applications of liquid phase microextraction in fruits and vegetables analysis. *Journal of Separation Science*, 35(24), 3540-3553
4. Agilent Inc.(nd). Fundamentals of Liquid Chromatography (HPLC).<http://polymer.ustc.edu.cn/xwxx_20/xw/201109/P020110906263097048536.pdf>.Last access 21/01/2014
5. Alamgir Zaman Chowdhury, M., Fakhruddin, A. N. M., Nazrul Islam, M., Moniruzzaman, M., Gan, S. H., & Khorshed Alam, M. (2013). Detection of the residues of nineteen pesticides in fresh vegetable samples using gas chromatography-mass spectrometry. *Food Control*, 34(2), 457-465
6. Alves, A. A. R., Rezende, M. J. C., Hovell, A. M. C., Bizzo, H. R., Oliveira, A. C. L., Rodrigues, S. V., & Rezende, C. M. (2012). Comparison between GC-MS-SIM and GC-ECD for the determination of residues of organochlorine and organophosphorus pesticides in brazilian citrus essential oils. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 23(2), 306-314
7. Amvrazi, E. G., & Tsiropoulos, N. G. (2009). Chemometric study and optimization of extraction parameters in single-drop microextraction for the determination of multiclass pesticide residues in grapes and apples by gas chromatography mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216(45), 7630-7638
8. Amvrazi, E. G., Martini, M. A., & Tsiropoulos, N. G. (2012). Headspace single-drop microextraction of common pesticide contaminants in honey-method development and comparison with other extraction methods. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 92(4), 450-465
9. Amvrazi, E. G., Papadi-Psyllou, A. T., & Tsiropoulos, N. G. (2010). 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. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 90(3-6), 245-259
10. Anastassiades, M., Lehotay, S. J., Štajnbaher, D., & Schenck, F. J. (2003). Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International*, 86(2), 412-431
11. Anonymous ., (nd a). LIGHT-SCATTERING AND CHARGED AEROSOL DETECTORS.<<http://www.cyberlipid.org/elsd/elsd0001.htm>>.Last access 28/01/14
12. Anonymous ., (nd b). THE REFRACTIVE INDEX DETECTOR.<http://hplc.chem.shu.edu/NEW/HPLC_Book/Detectors/det_ri.html>.Last access 30/01/14

13. Anonymous ., (nd c). Ionization Methods in OrganicMass Spectrometr .<<http://www.research.uky.edu/core/massspec/jeolioniz.pdf>>.Last access 5/02/14
14. Anonymous ., (nd d). Mass Spectrometry (MS) Primer. <<http://chemweb.ucc.ie/mass%20spec/MS%20summary.pdf>>.Last access 2/01/14
15. Araújo, R., Ratola, N., Moreira, J. L., Santos, L., & Alves, A. (2012). Different extraction approaches for the biomonitoring of pesticides in pine needles. *Environmental Technology (United Kingdom)*, 33(20), 2359-2368.
16. Arienzo, M., Cataldo, D., & Ferrara, L. (2013). Pesticide residues in fresh-cut vegetables from integrated pest management by ultra performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Food Control*, 31(1), 108-115
17. Augusto, F., Hantao, L. W., Mogollón, N. G. S., & Braga, S. C. G. N. (2013). New materials and trends in sorbents for solid-phase extraction. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 43, 14-23
18. Bagheri, H., Ayazi, Z., & Naderi, M. (2013). Conductive polymer-based microextraction methods: A review. *Analytica Chimica Acta*, 767(1), 1-13
19. Bakirci, G. T., & Hişil, Y. (2012). Fast and simple extraction of pesticide residues in selected fruits and vegetables using tetrafluoroethane and toluene followed by ultrahigh-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 135(3), 1901-1913.
20. Banerjee, K., Mujawar, S., Utture, S. C., Dasgupta, S., & Adsule, P. G. (2013). Optimization of gas chromatography-single quadrupole mass spectrometry conditions for multiresidue analysis of pesticides in grapes in compliance to EU-MRLs. *Food Chemistry*, 138(1), 600-607
21. Belmonte Valles, N., Retamal, M., Mezcuá, M., & Fernández-Alba, A. R. (2012). A sensitive and selective method for the determination of selected pesticides in fruit by gas chromatography/mass spectrometry with negative chemical ionization. *Journal of Chromatography A*, 1264, 110-116
22. Benincasa, C., Perri, E., Iannotta, N., & Scalercio, S. (2011). LC/ESI-MS/MS method for the identification and quantification of spinosad residues in olive oils. *Food Chemistry*, 125(3), 1116-1120
23. Beyer, A., & Biziuk, M. (2008). Applications of sample preparation techniques in the analysis of pesticides and PCBs in food. *Food Chemistry*, 108(2), 669-680
24. Blasco, C., Vazquez-Roig, P., Onghena, M., Masia, A., & Picó, Y. (2011). Analysis of insecticides in honey by liquid chromatography-ion trap-mass spectrometry: Comparison of different extraction procedures. *Journal of Chromatography A*, 1218(30), 4892-4901
25. Bolaños, P. P., Moreno, J. L. F., Shtereva, D. D., Frenich, A. G., & Vidal, J. L. M. (2007). Development and validation of a multiresidue method for the analysis of 151 pesticide residues in strawberry by gas chromatography coupled to a triple quadrupole mass analyzer. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 21(14), 2282-2294
26. Bonansea, R. I., Amé, M. V., & Wunderlin, D. A. (2013). Determination of priority pesticides in water samples combining SPE and SPME coupled to GC-MS. A case study: Suquía river basin (argentina). *Chemosphere*, 90(6), 1860-1869

27. Botitsi, H. V., Garbis, S. D., Economou, A., & Tsipi, D. F. (2011). Current mass spectrometry strategies for the analysis of pesticides and their metabolites in food and water matrices. *Mass Spectrometry Reviews*, 30(5), 907-939.
28. Braithwaite, D., Smith, J. F. (1995). Gas chromatography. in: *Chromatography methods* 5th Edition. pp:229, Kluwer Academic Publishers, Netherlands
29. Camino-Sánchez, F. J., Zafra-Gómez, A., Oliver-Rodríguez, B., Ballesteros, O., Navalón, A., Crovetto, G., & Vilchez, J. L. (2010). UNE-EN ISO/IEC 17025:2005-accredited method for the determination of pesticide residues in fruit and vegetable samples by LC-MS/MS. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 27(11), 1532-1544
30. Capriotti, A. L., Cavaliere, C., Laganà, A., Piovesana, S., & Samperi, R. (2013). Recent trends in matrix solid-phase dispersion. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 43, 53-66
31. Carneiro, R. P., Oliveira, F. A. S., Madureira, F. D., Silva, G., de Souza, W. R., & Lopes, R. P. (2013). Development and method validation for determination of 128 pesticides in bananas by modified QuEChERS and UHPLC-MS/MS analysis. *Food Control*, 33(2), 413-423
32. Cervera, M. I., Medina, C., Portolés, T., Pitarch, E., Beltrán, J., Serrahima, E., Hernández, F. (2010). Multi-residue determination of 130 multiclass pesticides in fruits and vegetables by gas chromatography coupled to triple quadrupole tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397(7), 2873-2891
33. Chen, G., Cao, P., & Liu, R. (2011). A multi-residue method for fast determination of pesticides in tea by ultra performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry combined with modified QuEChERS sample preparation procedure. *Food Chemistry*, 125(4), 1406-1411
34. Chen, L., Yin, L., Song, F., Liu, Z., Zheng, Z., Xing, J., & Liu, S. (2013). Determination of pesticide residues in ginseng by dispersive liquid-liquid microextraction and ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 917-918, 71-77
35. Cherta, L., Beltran, J., Pitarch, E., & Hernández, F. (2013). Comparison of simple and rapid extraction procedures for the determination of pesticide residues in fruit juices by fast gas chromatography-mass spectrometry. *Food Analytical Methods*, 6(6), 1671-1684.
36. Cherta, L., Portolés, T., Beltran, J., Pitarch, E., Mol, J. G. J., & Hernández, F. (2013). Application of gas chromatography-(triple quadrupole) mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization for the determination of multiclass pesticides in fruits and vegetables. *Journal of Chromatography A*, 1314, 224-240
37. Chung, S. W. C., & Chen, B. L. S. (2011). Determination of organochlorine pesticide residues in fatty foods: A critical review on the analytical methods and their testing capabilities. *Journal of Chromatography A*, 1218(33), 5555-5567
38. Cieřlik, E., Sadowska-Rociek, A., Ruiz, J. M. M., & Surma-Zadora, M. (2011). Evaluation of QuEChERS method for the determination of organochlorine pesticide residues in selected groups of fruits. *Food Chemistry*, 125(2), 773-778

39. Colón, L., Baird, L. J. (2004). Detectors in Modern Gas Chromatography. in: MODERN PRACTICE OF GAS CHROMATOGRAPHY 4th edition. Eds: Robert L. Grob., Eugene F. Barry. pp: 321-323, 326-328, 329 WILEY & SONS INC, USA
40. Cortés-Aguado, S., Sánchez-Morito, N., Arrebola, F. J., Frenich, A. G., & Vidal, J. L. M. (2008). Fast screening of pesticide residues in fruit juice by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Food Chemistry*, 107(3), 1314-1325
41. Cunha, S. C., Fernandes, J. O., & Oliveira, M. B. P. P. (2009). Fast analysis of multiple pesticide residues in apple juice using dispersive liquid-liquid microextraction and multidimensional gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216(51), 8835-8844
42. Dai, R., Ren, X., He, X., & Huo, Y. (2011). Convenient analytical method for quantitative determination of 23 pesticide residues in herbs by gas chromatography-mass spectrometry. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 86(6), 559-564
43. Damalas, C. A., & Eleftherohorinos, I. G. (2011). Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 8(5), 1402-1419
44. David, F., & Sandra, P. (2007). Stir bar sorptive extraction for trace analysis. *Journal of Chromatography A*, 1152(1-2), 54-69
45. De Sousa Freitas, S., & Lanças, F. M. (2009). Matrix effects observed during pesticides residue analysis in fruits by GC. *Journal of Separation Science*, 32(21), 3698-3705
46. Deme, P., Azmeera, T., Prabhavathi Devi, B. L. A., Jonnalagadda, P. R., Prasad, R. B. N., & Vijaya Sarathi, U. V. R. (2014). An improved dispersive solid-phase extraction clean-up method for the gas chromatography-negative chemical ionisation tandem mass spectrometric determination of multiclass pesticide residues in edible oils. *Food Chemistry*, 142, 144-151
47. Dos Santos, E. S., Navickiene, S., Wanderley, K. A., De Sá, G. F., & Júnior, S. A. (2013). MSPD method for the determination of clofentezine, flumetralin, and kresoxim-methyl residues in fresh and dehydrated forms of plantago major medicinal plant by HPLC/UV-DAD. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 36(13), 1802-1809.
48. Economou, A., Botitsi, H., Antoniou, S., & Tsiipi, D. (2009). Determination of multi-class pesticides in wines by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216(31), 5856-5867
49. EN 15662: Determination of Pesticide Residues Using GC-MS and/or LC-MS (/MS) following Acetonitrile Extraction/Partitioning and Clean-up by Dispersive SPE - QuEChERS method. In European Committee for Standardization, Technical Committee CEN/TC 275; "Food analysis - Horizontal Methods; Brussels, Belgium, 2008
50. Environmental Protection Agency, Types of Pesticides, 2012. Retrieved from <http://www.epa.gov/pesticides/about/types.htm#type>
51. European Commission (EC), (2012). Pesticides - EU rules. <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/index_en.htm>. Last access 16/01/2014

52. Fan, C. ., Chang, Q. ., Pang, G. ., Li, Z. .-, Kang, J., Pan, G. .-Ji, X. . (2013). High-throughput analytical techniques for determination of residues of 653 multiclass pesticides and chemical pollutants in tea, part II: Comparative study of extraction efficiencies of three sample preparation techniques. *Journal of AOAC International*, 96(2), 432-440
53. Farajzadeh, M. A., & Khoshmaram, L. (2013). Air-assisted liquid-liquid microextraction-gas chromatography-flame ionisation detection: A fast and simple method for the assessment of triazole pesticides residues in surface water, cucumber, tomato and grape juices samples. *Food Chemistry*, 141(3), 1881-1887
54. Fenik, J., Tankiewicz, M., & Biziuk, M. (2011). Properties and determination of pesticides in fruits and vegetables. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 30(6), 814-826
55. Fernandes, V. C., Domingues, V. F., Mateus, N., & Delerue-Matos, C. (2012). Analysing organochlorine pesticides in strawberry jams using GC-ECD, GC-MS/MS and QuEChERS sample preparation. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 29(7), 1074-1084
56. Ferrer.M, Martínez-BuenoM.J. Lozano.A, AlbaA.R.F, Pesticide residue analysis of fruit juices by LC-MS/MS direct injection (2011). One year pilot survey, *Talanta*, Volume 83,1552-1561
57. Fu, L., Liu, X., Hu, J., Zhao, X., Wang, H., & Wang, X. (2009). Application of dispersive liquid-liquid microextraction for the analysis of triazophos and carbaryl pesticides in water and fruit juice samples. *Analytica Chimica Acta*, 632(2), 289-295
58. Furlani, R. P. Z., Marcilio, K. M., Leme, F. M., & Tfouni, S. A. V. (2011). Analysis of pesticide residues in sugarcane juice using QuEChERS sample preparation and gas chromatography with electron capture detection. *Food Chemistry*, 126(3), 1283-1287.
59. Gates, P.(2004). Electrospray Ionisation (ESI).
<<http://www.chm.bris.ac.uk/ms/theory/esi-ionisation.html>>. Last access 23/2/14
60. Gates, P.(2005). Electron Ionisation (EI) and Chemical Ionisation (CI).
<<http://www.chm.bris.ac.uk/ms/theory/eici-ionisation.html>>. Last access 23/2/14
61. Gilbert-López, B., García-Reyes, J. F., & Molina-Díaz, A. (2009). Sample treatment and determination of pesticide residues in fatty vegetable matrices: A review. *Talanta*, 79(2), 109-128
62. Gómez-Ramos, M. M., Ferrer, C., Malato, O., Agüera, A., & Fernández-Alba, A. R. (2013). Liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry for pesticide residue analysis in fruit and vegetables: Screening and quantitative studies. *Journal of Chromatography A*, 1287, 24-37
63. González-Rodríguez, R. M., Rial-Otero, R., Cancho-Grande, B., & Simal-Gándara, J. (2008). Determination of 23 pesticide residues in leafy vegetables using gas chromatography-ion trap mass spectrometry and analyte protectants. *Journal of Chromatography A*, 1196-1197(1-2), 100-109
64. Graziella, A., Pelosi, P., & Dommarco, R. (2011). Solid-phase extraction for multi-residue analysis of pesticides in honey. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 46(1), 24-34

65. Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. SANCO/12571/2013 19 November 2013 rev. 0
66. GVUA.(2011). Quechers-A Mini-Multiresidue Method for the Analysis of Pesticide Residues in Low-Fat Products.<<http://quechers.cvua-stuttgart.de/pdf/reality.pdf>> Last access 17/01/14
67. Hiemstra, M., & de Kok, A. (2007). Comprehensive multi-residue method for the target analysis of pesticides in crops using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1154(1-2), 3-25
68. Hinshaw, J. V. (2006a). The flame ionization detector. *LC-GC Europe*, 19(4), 206-216.
69. Hinshaw, J. V. (2006b). The thermal conductivity detector. *LC-GC Europe*, 19(6), 344-351
70. Hitachi corporation.(nd). HPLC Basic Course8. Principle and Feature of Various Detection Methods(2).<http://www.hitachi-hitec.com/global/science/lc/lc_basic_7.html>. Last access 30/01/14
71. Hitachi corporation.(nd). HPLC Basic Course8. Principle and Feature of Various Detection Methods(2).<http://www.hitachi-hitec.com/global/science/lc/lc_basic_8.html>. Last access 28/01/14
72. Ho, CS.,Lam, CWK., Cheung, RCK., Law,LK., Lit, LCW., Ng, KF., Suen, MWM, Tai, HL.(2003). Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications. *Clin Biochem Rev.*24(1): 3–12
73. Ho, Y., Tsoi, Y., & Leung, K. S. Y. (2013). Highly sensitive and selective organophosphate screening in twelve commodities of fruits, vegetables and herbal medicines by dispersive liquid-liquid microextraction. *Analytica Chimica Acta*, 775, 58-66
74. Holčapek, M., Jirásko, R., & Lísá, M. (2012). Recent developments in liquid chromatography-mass spectrometry and related techniques. *Journal of Chromatography A*, 1259, 3-15
75. Holcapek.M.(nd). Mass analyzers.<<http://www.chromedia.org/chromedia?waxtrapp=kwbgcDsHqnOxmOIIecCpBgFlFyB&subNav=oibelDsHqnOxmOIIecCvBG>>. Last access 05/02/14
76. Hou, X., Han, M., Dai, X., Yang, X., & Yi, S. (2013). A multi-residue method for the determination of 124 pesticides in rice by modified QuEChERS extraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 138(2-3), 1198-1205
77. HU, B., SONG, W., XIE, L., & SHAO, T. (2008). Determination of 33 pesticides in tea using accelerated solvent extraction/gel permeation chromatography and solid phase extraction/gas chromatography-mass spectrometry. *Chinese Journal of Chromatography*, 26(1), 22-28
78. Huang, X., & Yuan, D. (2012). Recent developments of extraction and micro-extraction technologies with porous monoliths. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 42(1), 38-49
79. Iijima. S. (1991). Helical microtubules of graphitic carbon.*Nature* 354, 56 - 58
80. irhan, A. Y., Tan, G. H., Al-Shunnaq, A., Abdula'uf, L., & Wong, R. C. S. (2014). QuEChERS-HPLC method for aflatoxin detection of domestic and imported food in jordan. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 37(3), 321-342

81. Jeannot, M. A., & Cantwell, F. F. (1996). Solvent microextraction into a single drop. *Analytical Chemistry*, 68(13), 2236-2240
82. Jin, B., Xie, L., Guo, Y., & Pang, G. (2012). Multi-residue detection of pesticides in juice and fruit wine: A review of extraction and detection methods. *Food Research International*, 46(1), 399-409
83. Juraske, R., Mutel, C. L., Stoessel, F., & Hellweg, S. (2009). Life cycle human toxicity assessment of pesticides: Comparing fruit and vegetable diets in Switzerland and the United States. *Chemosphere*, 77(7), 939-945
84. Kawaguchi, M., Takatsu, A., Ito, R., & Nakazawa, H. (2013). Applications of stir-bar sorptive extraction to food analysis. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 45, 280-293
85. Khan, O. (nd). Mass Analyzers (Mass Spectrometry).
<http://chemwiki.ucdavis.edu/Analytical_Chemistry/Instrumental_Analysis/Mass_Spectrometry/Mass_Spectrometers_%28Instrumentation%29/Mass_Analyzers_%28Mass_Spectrometry%29>. Last access 05/02/14
86. Klein, J., & Alder, L. (2003). Applicability of gradient liquid chromatography with tandem mass spectrometry to the simultaneous screening for about 100 pesticides in crops. *Journal of AOAC International*, 86(5), 1015-1037
87. Kmellár, B., Fodor, P., Pareja, L., Ferrer, C., Martínez-Uroz, M. A., Valverde, A., & Fernandez-Alba, A. R. (2008). Validation and uncertainty study of a comprehensive list of 160 pesticide residues in multi-class vegetables by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1215(1-2), 37-50
88. Koesukwiwat, U., Lehotay, S. J., Miao, S., & Leepipatpiboon, N. (2010). High throughput analysis of 150 pesticides in fruits and vegetables using QuEChERS and low-pressure gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217(43), 6692-6703
89. Kokosa, J. M. (2013). Advances in solvent-microextraction techniques. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 43, 2-13
90. Kolberg, D. I., Prestes, O. D., Adaime, M. B., & Zanella, R. (2011). Development of a fast multiresidue method for the determination of pesticides in dry samples (wheat grains, flour and bran) using QuEChERS based method and GC-MS. *Food Chemistry*, 125(4), 1436-1442
91. Lab compliance. (nd). ISO/IEC 17025 in Laboratories. <http://www.labcompliance.com/tutorial/iso17025/default.aspx?sm=d_e>. Last access 20/01/2014
92. Lacina, O., Urbanova, J., Poustka, J., & Hajslova, J. (2010). Identification/quantification of multiple pesticide residues in food plants by ultra-high-performance liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217(5), 648-659
93. Lagunas-Allué, L., Sanz-Asensio, J., & Martínez-Soria, M. T. (2012). Comparison of four extraction methods for the determination of fungicide residues in grapes through gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1270, 62-71
94. Lambropoulou, D. A., & Albanis, T. A. (2007). Liquid-phase micro-extraction techniques in pesticide residue analysis. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70(2), 195-228

95. Latif, Y., Sherazi, S. T. H., & Bhanger, M. I. (2011). Assessment of pesticide residues in commonly used vegetables in hyderabad, pakistan. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(8), 2299-2303
96. Leandro, C. C., Hancock, P., Fussell, R. J., & Keely, B. J. (2007). Ultra-performance liquid chromatography for the determination of pesticide residues in foods by tandem quadrupole mass spectrometry with polarity switching. *Journal of Chromatography A*, 1144(2), 161-169
97. Lee, K. -, & Jo, E. -. (2012). Multiresidue pesticide analysis in korean ginseng by gas chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 134(4), 2497-2503
98. Lehotay, S. J., Anastassiades, M., & Majors, R. E. (2010a). The QuEChERS revolution. *LC-GC Europe*, 23(9)
99. Lehotay, S. J., O'Neil, M., Tully, J., García, A. V., Contreras, M., Mol, H., Parker, A. (2007). Determination of pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate: Collaborative study. *Journal of AOAC International*, 90(2), 485-520
100. Lehotay, S. J., Son, K. A., Kwon, H., Koesukwiwat, U., Fu, W., Mastovska, K., Leepipatiboon, N. (2010b). Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. *Journal of Chromatography A*, 1217(16), 2548-2560
101. Lendi, B. E., & Meyer, V. R. (2005). The UV detector for HPLC - an ongoing success story. *LC-GC Europe*, 18(3), 156-163.
102. Lesueur, C., Knittl, P., Gartner, M., Mentler, A., & Fuerhacker, M. (2008). Analysis of 140 pesticides from conventional farming foodstuff samples after extraction with the modified QuEChERS method. *Food Control*, 19(9), 906-914
103. Li, J., Liu, D., Wu, T., Zhao, W., Zhou, Z., & Wang, P. (2014). A simplified procedure for the determination of organochlorine pesticides and polychlorobiphenyls in edible vegetable oils. *Food Chemistry*, 151, 47-52.
104. Li, J., Zhang, H. -, & Shi, Y. -. (2011). Monitoring multi-class pesticide residues in fresh grape by hollow fibre sorptive extraction combined with gas chromatography-mass spectrometry. *Food Chemistry*, 127(2), 784-790.
105. Liu, H., & Dasgupta, P. K. (1996). Analytical chemistry in a drop. solvent extraction in a microdrop. *Analytical Chemistry*, 68(11), 1817-1821
106. López-Fernández, O., Rial-Otero, R., Cid, A., & Simal-Gándara, J. (2014). Combined determination and confirmation of ethylenethiourea and propylenethiourea residues in fruits at low levels of detection. *Food Chemistry*, 145, 1002-1010
107. López-Fernández, O., Rial-Otero, R., González-Barreiro, C., & Simal-Gándara, J. (2012). Surveillance of fungicidal dithiocarbamate residues in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 134(1), 366-374
108. Lourencetti, C., de Marchi, M. R. R., & Ribeiro, M. L. (2008). Determination of sugar cane herbicides in soil and soil treated with sugar cane vinasse by solid-phase extraction and HPLC-UV. *Talanta*, 77(2), 701-709
109. Lozano, A., Rajski, Ł., Belmonte-Valles, N., Uclés, A., Uclés, S., Mezcuá, M., & Fernández-Alba, A. R. (2012). Pesticide analysis in teas and chamomile by liquid chromatography and gas chromatography tandem mass spectrometry using a modified QuEChERS method: Validation and pilot survey in real samples. *Journal of Chromatography A*, 1268, 109-122

110. Lozano, A., Rajski, L., Uclés, S., Belmonte-Valles, N., Mezcua, M., & Fernández-Alba, A. R. (2014). Evaluation of zirconium dioxide-based sorbents to decrease the matrix effect in avocado and almond multiresidue pesticide analysis followed by gas chromatography tandem mass spectrometry. *Talanta*, 118, 68-83.
111. Łozowicka, B., Jankowska, M., & Kaczyński, P. (2012). Pesticide residues in brassica vegetables and exposure assessment of consumers. *Food Control*, 25(2), 561-575
112. Lucini, L., & Molinari, G. P. (2011). Performance and matrix effect observed in QuEChERS extraction and tandem mass spectrometry analyses of pesticide residues in different target crops. *Journal of Chromatographic Science*, 49(9), 709-714
113. Macknair, M. H. & Miller, M. J. (1998). Detectors. In: *Basic gas chromatography*. PP:101-102, John Wiley and sons, INC, USA
114. Mao, X., Wan, Y., Yan, A., Shen, M., & Wei, Y. (2012). Simultaneous determination of organophosphorus, organochlorine, pyrethroid and carbamate pesticides in radix astragali by microwave-assisted extraction/dispersive-solid phase extraction coupled with GC-MS. *Talanta*, 97, 131-141
115. Martínez-del-Río, J., Martínez Vidal, J. L., & Garrido Frenich, A. (2013). Economic evaluation of pesticide-residue analysis of vegetables. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 44, 90-97.
116. Medina-Pastor, P., Fernández-Alba, A. R., Andersson, A., & Rodríguez-Torreblanca, C. (2010). European commission proficiency tests for pesticide residues in fruits and vegetables. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 29(1), 70-83
117. Melo, A., Cunha, S. C., Mansilha, C., Aguiar, A., Pinho, O., & Ferreira, I. M. P. L. V. O. (2012). Monitoring pesticide residues in greenhouse tomato by combining acetonitrile-based extraction with dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas-chromatography-mass spectrometry. *Food Chemistry*, 135(3), 1071-1077
118. Miao, Q., Kong, W., Yang, S., & Yang, M. (2013). Rapid analysis of multi-pesticide residues in lotus seeds by a modified QuEChERS-based extraction and GC-ECD. *Chemosphere*, 91(7), 955-962
119. Mujawar, S., Utture, S. C., Fonseca, E., Matarrita, J., & Banerjee, K. (2014). Validation of a GC-MS method for the estimation of dithiocarbamate fungicide residues and safety evaluation of mancozeb in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 150, 175-181
120. Nogueira, J. M. F. (2012). Novel sorption-based methodologies for static microextraction analysis: A review on SBSE and related techniques. *Analytica Chimica Acta*, 757, 1-10
121. Núñez, O., Gallart-Ayala, H., Ferrer, I., Moyano, E., & Galceran, M. T. (2012b). Strategies for the multi-residue analysis of 100 pesticides by liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1249, 164-180
122. Núñez, O., Gallart-Ayala, H., Martins, C. P. B., & Lucci, P. (2012a). New trends in fast liquid chromatography for food and environmental analysis. *Journal of Chromatography A*, 1228, 298-323

123. Obuseng, V. C., Mookantsa, B. M., Okatch, H., Mosepele, K., & Torto, N. (2013). Extraction of pesticides from plants using solid phase microextraction and QuEChERS. *South African Journal of Chemistry*, 66, 183-188
124. Oellig, C., & Schwack, W. (2011). Planar solid phase extraction-A new clean-up concept in multi-residue analysis of pesticides by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218(37), 6540-6547
125. O'Mahony, J., Clarke, L., Whelan, M., O'Kennedy, R., Lehotay, S. J., & Danaher, M. (2013). The use of ultra-high pressure liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection in the analysis of agrochemical residues and mycotoxins in food - challenges and applications. *Journal of Chromatography A*, 1292, 83-95
126. Omeroglu, P. Y., Boyacioglu, D., Ambrus, Á., Karaali, A., & Saner, S. (2012). An overview on steps of pesticide residue analysis and contribution of the individual steps to the measurement uncertainty. *Food Analytical Methods*, 5(6), 1469-1480
127. Osman, K. A., Al-Humaid, A. M., Al-Rehiyani, S. M., & Al-Redhaiman, K. N. (2010). Monitoring of pesticide residues in vegetables marketed in al-qassim region, saudi arabia. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(6), 1433-1439
128. Pakade, Y. B., & Tewary, D. K. (2010). Development and applications of single-drop microextraction for pesticide residue analysis: A review. *Journal of Separation Science*, 33(23-24), 3683-3691
129. Papadoyannis, N., I. & Samanidou, F., F. (2003). Conductivity Detection in HPLC. In: *Encyclopedia of chromatography*. Ed: Jack Cazes. pp:361-362. Marcel Dekker Inc, New York
130. Park, J. ., Choi, J. ., Abd El-Aty, A. M., Kim, B. M., Oh, J. ., Do, J. ., Shim, J. . (2011a). Simultaneous multiresidue analysis of 41 pesticide residues in cooked foodstuff using QuEChERS: Comparison with classical method. *Food Chemistry*, 128(1), 241-253.
131. Park, J. H., Iqbal Rouf Mamun, M., Abd El-Aty, A. M., Na, T. W., Choi, J. ., Ghafar, M. W., Shim, J. -. (2011b). Development and validation of a multiresidue method for determination of 37 pesticides in soil using GC-NPD. *Biomedical Chromatography*, 25(9), 1003-1009
132. Park, K. H., Choi, J. ., Abd El-Aty, A. M., Cho, S. ., Park, J. ., Kwon, K. S., Shim, J. -. (2012). Development of QuEChERS-based extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for quantifying flumethasone residues in beef muscle. *Meat Science*, 92(4), 749-753
133. Patel, D. (2011). MATRIX EFFECT IN A VIEW OF LC-MS/MS: AN OVERVIEW. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 2 ,559-564
134. Payá, P., Anastassiades, M., MacK, D., Sigalova, I., Tasdelen, B., Oliva, J., & Barba, A. (2007). Analysis of pesticide residues using the quick easy cheap effective rugged and safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389(6), 1697-1714
135. Pena-Pereira, F., Lavilla, I., & Bendicho, C. (2010). Liquid-phase microextraction techniques within the framework of green chemistry. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 29(7), 617-628

136. Pérez-Burgos, R., Grzelak, E. M., Gokce, G., Saurina, J., Barbosa, J., & Barrón, D. (2012). Quechers methodologies as an alternative to solid phase extraction (SPE) for the determination and characterization of residues of cephalosporins in beef muscle using LC-MS/MS. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 899, 57-65
137. Peruzzo, P. J., Porta, A. A., & Ronco, A. E. (2008). Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of argentina. *Environmental Pollution*, 156(1), 61-66
138. Picó, Y. (2013). Ultrasound-assisted extraction for food and environmental samples. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 43, 84-99
139. Pirsahab, M., Fattahi, N., & Shamsipur, M. (2013). Determination of organophosphorous pesticides in summer crops using ultrasound-assisted solvent extraction followed by dispersive liquid-liquid microextraction based on the solidification of floating organic drop. *Food Control*, 34(2), 378-385.
140. Pizzutti, I. R., de Kok, A., Dickow Cardoso, C., Reichert, B., de Kroon, M., Wind, W., Cael da Silva, R. (2012). A multi-residue method for pesticides analysis in green coffee beans using gas chromatography-negative chemical ionization mass spectrometry in selective ion monitoring mode. *Journal of Chromatography A*, 1251, 16-26
141. Pizzutti, I. R., de Kok, A., Zanella, R., Adaime, M. B., Hiemstra, M., Wickert, C., & Prestes, O. D. (2007). Method validation for the analysis of 169 pesticides in soya grain, without clean up, by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using positive and negative electrospray ionization. *Journal of Chromatography A*, 1142(2), 123-136
142. Psillakis, E., & Kalogerakis, N. (2003). Developments in liquid-phase microextraction. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 22(9), 565-574
143. Qu, L. -, Zhang, H., Zhu, J. -, Yang, G. -, & Aboul-Enein, H. Y. (2010). Rapid determination of organophosphorous pesticides in leeks by gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. *Food Chemistry*, 122(1), 327-332
144. Quechers.(2011). Theory.<<http://quechers.cvua-stuttgart.de/index.php?nav1o=2&nav2o=2&nav3o=0>. Last access 17/01/14
145. Radišić, M., Grujić, S., Vasiljević, T., & Laušević, M. (2009). Determination of selected pesticides in fruit juices by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 113(2), 712-719
146. Rahman, M. M., Abd El-Aty, A. M., & Shim, J. -. (2013). Matrix enhancement effect: A blessing or a curse for gas chromatography?-A review. *Analytica Chimica Acta*, 801, 14-21
147. Ramos, J. J., Rial-Otero, R., Ramos, L., & Capelo, J. L. (2008). Ultrasonic-assisted matrix solid-phase dispersion as an improved methodology for the determination of pesticides in fruits. *Journal of Chromatography A*, 1212(1-2), 145-149.
148. Ravelo-Pérez, L. M., Herrera-Herrera, A. V., Hernández-Borges, J., & Rodríguez-Delgado, M. T. (2010). Carbon nanotubes: Solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A*, 1217(16), 2618-2641

149. Retamal, M., Costa, C., Suárez, J. M., & Richter, P. (2013). Multi-determination of organic pollutants in water by gas chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 93(1), 93-107
150. Rial-Otero, R., Gaspar, E. M., Moura, I., & Capelo, J. L. (2007). Chromatographic-based methods for pesticide determination in honey: An overview. *Talanta*, 71(2), 503-514
151. Ridgway, K., Lalljie, S. P. D., & Smith, R. M. (2007). Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods. *Journal of Chromatography A*, 1153(1-2), 36-53.
152. Riedel, M., Speer, K., Stuke, S., & Schmeer, K. (2010). Simultaneous analysis of 70 pesticides using HPLC/MS/MS: A comparison of the multiresidue method of Klein and Alder and the QuEChERS method. *Journal of AOAC International*, 93(6), 1972-1986
153. Ryamond, S.P.W.(1996).The Argon Ionization Family of Detectors:Argon Detectors, Helium Detectors and the Electron Capture Detector In:Chromatographic Detectors Design, Function, and Operation. Ed: JACK CAZES, pp:113,137-138, MARCEL DEKKER, INC, USA
154. Sagratini, G., Mañes, J., Giardiná, D., Damiani, P., & Picó, Y. (2007). Analysis of carbamate and phenylurea pesticide residues in fruit juices by solid-phase microextraction and liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1147(2), 135-143
155. Sánchez-Rojas, F., Bosch-Ojeda, C., & Cano-Pavón, J. M. (2009). A review of stir bar sorptive extraction. *Chromatographia*, 69(SUPPL. 1), S79-S94
156. Sang, Z. -, Wang, Y. -, Tsoi, Y. -, & Leung, K. S. -. (2013). CODEX-compliant eleven organophosphorus pesticides screening in multiple commodities using headspace-solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. *Food Chemistry*, 136(2), 710-717
157. Sarafray-Yazdi, A., & Amiri, A. (2010). Liquid-phase microextraction. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 29(1), 1-14.
158. Sharma, D., Nagpal, A., Pakade, Y. B., & Katnoria, J. K. (2010). Analytical methods for estimation of organophosphorus pesticide residues in fruits and vegetables: A review. *Talanta*, 82(4), 1077-1089
159. SHIMADZU CORPORATION.(2008).Selecting Detectors for Compounds with No Optical Absorbance Technical Report vol.15.<http://www2.shimadzu.com/applications/lc/Shimadzu_TechReport_Vol15_HPLC.pdf>.Last access 28/01/14
160. Souza Silva, E. A., Risticevic, S., & Pawliszyn, J. (2013). Recent trends in SPME concerning sorbent materials, configurations and in vivo applications. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 43, 24-36
161. Spietelun, A., Kloskowski, A., Chrzanowski, W., & Namieśnik, J. (2013a). Understanding solid-phase microextraction: Key factors influencing the extraction process and trends in improving the technique. *Chemical Reviews*, 113(3), 1667-1685
162. Spietelun, A., Marcinkowski, T., de la Guardia, M., & Namieśnik, J. (2013b). Recent developments and future trends in solid phase microextraction techniques towards green analytical chemistry. *Journal of Chromatography A*, 1321, 1-1

163. Stefano.V.D, Avellone.G, Bongiorno.D, Cunsolo.V, Muccilli.V, Sforza.S, Dossena.A, Drahos.L, Vékey.K, (2012).Applications of liquid chromatography-mass spectrometry for food analysis, *Journal of Chromatography A*, Volume 1259, 74-85
164. Swartz, M. (2010). HPLC detectors: A brief review. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 33(9-12), 1130-1150
165. Tadeo, J. L., Pérez, R. A., Albero, B., García-Valcárcel, A. I., & Sánchez-Brunete, C. (2012). Review of sample preparation techniques for the analysis of pesticide residues in soil. *Journal of AOAC International*, 95(5), 1258-1271
166. Thermo Fisher Scientific.(nd). How electrochemical detection for HPLC works.<http://www.esainc.com/resources/Detector_tech/How_EC_works>. Last access 30/01/2014
167. Thet, K.,Woo, N.(nd). Gas Chromatography. <http://chemwiki.ucdavis.edu/Analytical_Chemistry/Instrumental_Analysis/Chromatography/Gas_Chromatography#Thermal_Conductivity_Detectors> Last access 02/02/14
168. Tian, J., Xu, J., Zhu, F., Lu, T., Su, C., & Ouyang, G. (2013). Application of nanomaterials in sample preparation. *Journal of Chromatography A*, 1300, 2-16
169. Tissue,B.M.(2000). Nitrogen-Phosphorus Detector (NPD).<<http://www.files.chem.vt.edu/chem-ed/sep/gc/detector/npd.html>> Last accesses 02/02/14
170. Tomasini.D, Sampaio.M., Sergiane CaldasS., BuffonJ.G.,. Duarte F.A, . PrimeE.G, Simultaneous determination of pesticides and 5-hydroxymethylfurfural in honey by the modified QuEChERS method and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (2012), *Talanta*,99,380-386
171. Tran, K., Eide, D., Nickols, S. M., Cromer, M. R., Sabaa-Srur, A., & Smith, R. E. (2012). Finding of pesticides in fashionable fruit juices by LC-MS/MS and GC-MS/MS. *Food Chemistry*, 134(4), 2398-2405
172. UKAS.(2007). Method validation Requirements of ISO/IEC17025:2005 and Accreditation.<http://www.npl.co.uk/upload/pdf/20070522_nsuf_ruddle_1.pdf>. Last access 20/01/2014
173. US Food and Drug Administration (FDA,2012). Guidelines for the Validation of Chemical Methods for the FDA Foods Program, FDA 2012
174. Valcárcel, M., & Lucena, R. (2013). Synergistic relationships between analytical chemistry and written standards. *Analytica Chimica Acta*, 788, 1-7
175. Venkateswarlu, P., Rama Mohan, K., Ravi Kumar, C., & Sessaiah, K. (2007). Monitoring of multi-class pesticide residues in fresh grape samples using liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 105(4), 1760-1766.
176. Walorczyk, S. (2007). Development of a multi-residue screening method for the determination of pesticides in cereals and dry animal feed using gas chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1165(1-2), 200-212

177. Walorczyk, S. (2008). Development of a multi-residue method for the determination of pesticides in cereals and dry animal feed using gas chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry. II. improvement and extension to new analytes. *Journal of Chromatography A*, 1208(1-2), 202-214
178. Walorczyk, S. (2012). Gas chromatographic-tandem mass spectrometric analysis of pesticides residues in produce using concurrent solvent recondensation-large volume injection. *Journal of Chromatography A*, 1222, 98-108
179. Walorczyk, S., & Drozdzyński, D. (2012b). Improvement and extension to new analytes of a multi-residue method for the determination of pesticides in cereals and dry animal feed using gas chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry revisited. *Journal of Chromatography A*, 1251, 219-231
180. Walorczyk, S., Drodyński, D., & Gnusowski, B. (2011). Multiresidue determination of 160 pesticides in wines employing mixed-mode dispersive-solid phase extraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta*, 85(4), 1856-1870
181. Walorczyk, S., Drozdzyński, D., Kowalska, J., Remlein-Starosta, D., Ziółkowski, A., Przewoźniak, M., & Gnusowski, B. (2013). Pesticide residues determination in polish organic crops in 2007-2010 applying gas chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry. *Food Chemistry*, 139(1-4), 482-487
182. Wang, S., Wang, Z., Zhang, Y., Wang, J., & Guo, R. (2013a). Pesticide residues in market foods in shaanxi province of china in 2010. *Food Chemistry*, 138(2-3), 2016-2025
183. Wang, X., Wang, S., & Cai, Z. (2013b). The latest developments and applications of mass spectrometry in food-safety and quality analysis. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 52, 170-185
184. Wang, Z., Zhao, X., Xu, X., Wu, L., Su, R., Zhao, Y., Dong, D. (2013c). An absorbing microwave micro-solid-phase extraction device used in non-polar solvent microwave-assisted extraction for the determination of organophosphorus pesticides. *Analytica Chimica Acta*, 760, 60-68
185. Wilkowska, A., & Biziuk, M. (2011). Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology. *Food Chemistry*, 125(3), 803-812
186. Wu, T., Liu, Y., Yang, Z., Gao, H., & Zhou, Z. (2012). Determination of pyrethroid pesticides in environmental samples using ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 23(7), 1327-1333
187. Xu, J., Zheng, J., Tian, J., Zhu, F., Zeng, F., Su, C., & Ouyang, G. (2013). New materials in solid-phase microextraction. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 47, 68-83
188. Xu, M. -, Liu, J. -, & Lu, J. (2014). Determination and control of pesticide residues in beverages: A review of extraction techniques, chromatography, and rapid detection methods. *Applied Spectroscopy Reviews*, 49(2), 97-120.
189. Xu,Z.(2010). Analysis of traditional Chinese medicines with the Agilent 1200 Series evaporative light scattering detector.<<http://www.chem.agilent.com/Library/applications/5989-8922EN.pdf>>Last access 28/01/14

190. Yan, H., & Wang, H. (2013). Recent development and applications of dispersive liquid-liquid microextraction. *Journal of Chromatography.A*, 1295, 1-15
191. Yan, X. (2006). Unique selective detectors for gas chromatography: Nitrogen and sulfur chemiluminescence detectors. *Journal of Separation Science*, 29(12), 1931-1945
192. Yang, C., Wang, J., & Li, D. (2013). Microextraction techniques for the determination of volatile and semivolatile organic compounds from plants: A review. *Analytica Chimica Acta*, 799, 8-22
193. Yazdanfar, N., Yamini, Y., & Ghambarian, M. (2013). Homogeneous liquid-liquid microextraction for determination of organochlorine pesticides in water and fruit samples. *Chromatographia*, , 1-8.
194. Zgoła-Grześkowiak, A., & Grześkowiak, T. (2011). Dispersive liquid-liquid microextraction. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 30(9), 1382-1399
195. Zhang, B. -, Zheng, X., Li, H. -, & Lin, J. -. (2013). Application of carbon-based nanomaterials in sample preparation: A review. *Analytica Chimica Acta*, 784, 1-17
196. Zhang, F., Yu, C., Wang, W., Fan, R., Zhang, Z., & Guo, Y. (2012). Rapid simultaneous screening and identification of multiple pesticide residues in vegetables. *Analytica Chimica Acta*, 757, 39-47
197. Zheng, H. -, Zhao, Q., Mo, J. -, Huang, Y. -, Luo, Y. -, Yu, Q. -, & Feng, Y. -. (2013). Quick, easy, cheap, effective, rugged and safe method with magnetic graphitized carbon black and primary secondary amine as adsorbent and its application in pesticide residue analysis. *Journal of Chromatography A*, 1300, 127-133
198. Zhu, F., Xu, J., Ke, Y., Huang, S., Zeng, F., Luan, T., & Ouyang, G. (2013). Applications of in vivo and in vitro solid-phase microextraction techniques in plant analysis: A review. *Analytica Chimica Acta*, 794, 1-14.
199. Zhu, X., Cai, J., Yang, J., Su, Q., & Gao, Y. (2006). Films coated with molecular imprinted polymers for the selective stir bar sorption extraction of monocrotophos. *Journal of Chromatography A*, 1131(1-2), 37-44
200. ΑΠΟΦΑΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ της 12ης Αυγούστου 2002 για εφαρμογή της οδηγίας 96/23/EK του Συμβουλίου σχετικά με την επίδοση των αναλυτικών μεθόδων και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων
201. Δεληγιαννάκης.Ι, Χελά.Δ, Κωνσταντίνου.Ι.(2010). Χρωματογραφικές Μέθοδοι. In: Ενόργανη Περιβαλλοντική Ανάλυση. Ed: Εκδόσεις Τζιόλα, PP:89,90,92, 139-140,182, Αθήνα