

**“Επικύρωση και αξιολόγηση αναλυτικών μεθόδων  
προσδιορισμού υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών  
ουσιών νέας γενιάς σε γεωργικά προϊόντα με χρήση  
αέριας χρωματογραφίας”**

**Μεταπτυχιακή Διατριβή**

**Ασημίνα Τρ. Παπαδή-Ψύλλου**

**Γεωπόνος**

**Βόλος, 2009**

**“Επικύρωση και αξιολόγηση αναλυτικών μεθόδων  
προσδιορισμού υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών  
ουσιών νέας γενιάς σε γεωργικά προϊόντα με χρήση  
αέριας χρωματογραφίας”**

**Μεταπτυχιακή Διατριβή**

**Ασημίνα Τρ. Παπαδή-Ψύλλου**

**Γεωπόνος**

**Εξεταστική επιτροπή**

**Τσιρόπουλος Ν. – Αναπληρωτής Καθηγητής (Επιβλέπων)**

**Λιαπής Κ. – Ερευνητής Β΄ (Μέλος)**

**Χελά Δ. – Επίκουρος Καθηγήτρια (Μέλος)**

**Βόλος, 2009**

*Αφιερώνεται...*

*Στους γονείς μου, Τριαντάφυλλο και Μαρία*

*και στον αδερφό μου, Δημήτρη*

*Σε αυτούς που έφυγαν και δεν είναι πια κοντά μου*

## Ευχαριστίες

Μετά την ολοκλήρωση της παρούσας μελέτης αισθάνομαι την υποχρέωση να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα Καθηγητή μου κύριο Τσιρόπουλο Νικόλαο, Αναπληρωτή Καθηγητή και Διευθυντή του Εργαστηρίου Αναλυτικής Χημείας και Γεωργικής Φαρμακολογίας του Τμήματος Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφερε κατά τη διεξαγωγή της μελέτης και των μετρήσεων, για το χρόνο που αφιέρωσε για τη διόρθωση του γραπτού κειμένου, καθώς επίσης και για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο θέμα. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Λιαπή Κωνσταντίνο, Ερευνητή Β΄ του Εργαστηρίου Υπολειμμάτων Γεωργικών Φαρμάκων του Μπενάκειου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου, και την κυρία Χελά Δήμητρα, Επίκουρο Καθηγήτρια του Τμήματος Διοίκησης Επιχειρήσεων Αγροτικών Προϊόντων και Τροφίμων του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για τις χρήσιμες υποδείξεις και για το χρόνο που αφιέρωσαν για την διόρθωση της διατριβής μου.

Τις ευχαριστίες μου επίσης θα ήθελα να εκφράσω προς το Διευθυντή του Περιφερειακού Κέντρου Προστασίας Φυτών και Ποιοτικού Ελέγχου Βόλου, κατά το χρονικό διάστημα που πραγματοποιήθηκε η μεταπτυχιακή μου διατριβή, κύριο Βλειώρα Σπυρίδωνα, Γεωπόνο, καθώς και το τακτικό προσωπικό του Εργαστηρίου Υπολειμμάτων του Περιφερειακού Κέντρου Προστασίας Φυτών και Ποιοτικού Ελέγχου Βόλου, κύριο Λύκα Δημήτριο, Γεωπόνο Υποψήφιο Διδάκτορα, και κυρίες Αμβράζη Ελπινίκη, Χημικό (MSc, PhD) και Πετκούση Χρυσούλα, Χημικό (MSc) για την τεχνική υποστήριξη που μου προσέφεραν καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους γονείς μου και τον αδερφό μου για την πολύτιμη υποστήριξη και κατανόηση τους σε κάθε μου προσπάθεια.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα εργασία, στα πλαίσια της υλοποίησης της μεταπτυχιακής μου διατριβής, πραγματοποιήθηκε με σκοπό την εφαρμογή του αναλυτικού προτύπου ISO /IEC 17025 στον προσδιορισμό των υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών δραστικών ουσιών, που χαρακτηρίζονται ως φυτοπροστατευτικά προϊόντα (Φ.Π.) νέας γενιάς αλλά και μερικών κλασικών δραστικών ουσιών, σε τρία πολύ δημοφιλή για την Ελλάδα υποστρώματα (τομάτα, σταφύλι και μήλο), εφαρμόζοντας τη μεθοδολογία της εκχύλισης με ακετόνη, πετρελαϊκό αιθέρα και διχλωρομεθάνιο, που είναι η επίσημη μέθοδος των Εργαστηρίων της Ολλανδίας και που ακολουθείται σήμερα από τα περισσότερα Εργαστήρια Υπολειμμάτων των Περιφερειακών Κέντρων Προστασίας Φυτών του Υπουργείου Γεωργίας της Ελλάδας. Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται στον έλεγχο των υπολειμμάτων Φ.Π. σε περιορισμένο αριθμό δραστικών ουσιών ανά Περιφερειακό Κέντρο και με την παρούσα εργασία επιχειρήθηκε η διεύρυνση των δραστικών φυτοπροστατευτικών ουσιών για τις οποίες είναι διαπιστευμένο το Εργαστήριο Υπολειμμάτων του Περιφερειακού Κέντρου Προστασίας Φυτών Βόλου, στο οποίο πραγματοποιήθηκε το μεγαλύτερο μέρος της εργαστηριακής εργασίας.

Το κείμενο της εργασίας είναι οργανωμένο σε δύο μέρη, το θεωρητικό μέρος στο οποίο γίνεται βιβλιογραφική ανασκόπηση και το αναλυτικό μέρος. Στο **θεωρητικό μέρος** δίνονται γενικές πληροφορίες για τις καλλιέργειες της τομάτας, της αμπέλου και της μηλιάς, καθώς επίσης και οι λόγοι για τα υψηλά επίπεδα συμμετοχής τους στη διατροφή του πληθυσμού. Στο Κεφάλαιο 1 γίνεται αναφορά στα φυτοπροστατευτικά προϊόντα και στην εκτίμηση επικινδυνότητας των υπολειμμάτων τους και της πρόσληψής τους μέσω της διατροφής. Στο Κεφάλαιο 2 παρουσιάζεται η αναλυτική μεθοδολογία για τον προσδιορισμό των υπολειμμάτων Φ.Π. και αναλύονται εν συντομία οι εκχυλιστικές τεχνικές και οι ενόργανες τεχνικές προσδιορισμού αυτών. Στο Κεφάλαιο 3 προσεγγίζονται τα θέματα της διαπίστευσης των εργαστηρίων ανάλυσης, της διασφάλιση της ποιότητας των αναλυτικών αποτελεσμάτων όπως επίσης και το πώς γίνεται και που στηρίζεται η επικύρωση των αναλυτικών μεθόδων.

Στο **αναλυτικό μέρος**, παρουσιάζονται ο σκοπός της πραγματοποίησης της παρούσας εργασίας και οι λόγοι επιλογής των συγκεκριμένων 17 δραστικών ουσιών στόχων (Κεφάλαιο 4) και αναπτύσσεται η αναλυτική μεθοδολογία και τα ενόργανα συστήματα αέριας χρωματογραφίας και φασματομετρίας μάζας που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό και την επιβεβαίωση των Φ.Π. στα τρία προαναφερθέντα φυτικά υποστρώματα (Κεφάλαιο 5). Τέλος, στο Κεφάλαιο 6 παρουσιάζονται και συζητούνται τα

αποτελέσματα που προέκυψαν και αφορούν την αξιολόγηση και επικύρωση της αναλυτικής μεθοδολογίας που ακολουθήθηκε, για τον προσδιορισμό των Φ.Π. στόχων σε τρία χρωματογραφικά συστήματα χρησιμοποιώντας διαφορετικής πολικότητας στήλες και διαφορετικούς ανιχνευτές, HP-1–αζώτου φωσφόρου (NPD), HP-5–σύλληψης ηλεκτρονίων (ECD) και BPX-35 – (ECD), καθώς και σύστημα συζευγμένης αέριας χρωματογραφίας με φασματομετρία μάζα (GC-MS).

Συγκεκριμένα ελέγχθηκαν η **γραμμικότητα** (*Linearity*), η **ορθότητα** (*Accuracy*), η **πιστότητα** (*Precision*), η **ανιχνευσιμότητα** (*Detectability*), η **εκλεκτικότητα** (*Selectivity*), η **ειδικότητα** (*Specificity*) και η **αβεβαιότητα** (*Uncertainty*) της αναλυτικής μεθόδου.

Σύμφωνα με αυτά τα αποτελέσματα, από το σύνολο των δραστικών ουσιών που επιλέχθηκαν να αναλυθούν τα *diphenylamine*, *pyrimethanil*, *buprofezin* και *pyriproxyfen* προσδιορίζονται στον GC-NPD. Στο υπόστρωμα της τομάτας τα όρια ποσοτικού προσδιορισμού τους είναι χαμηλότερα των τιμών MRL εκτός από το *cymoxanil* για το οποίο το προκύπτον όριο ποσοτικού προσδιορισμού είναι ίσο με την τιμή MRL. Η διευρυμένη αβεβαιότητα, κυμαίνεται για όλες τις δραστικές ουσίες από 12 έως 24%, εκτός των *fosthiazate* και *cymoxanil* για τα οποία ανέρχεται στο 51 – 55%, ενώ στο φυτικό ιστό του σταφυλίου κυμαίνεται από 18 έως 51%. Στον ιστό του μήλου τα όρια ποσοτικού προσδιορισμού είναι υψηλότερα των τιμών MRL για τα *cymoxanil*, *fosthiazate* και *azoxystrobin*.

Για τα *metribuzin*, *vinclozolin*, *procymidone*, *kresoxim-methyl*, *fenhexamid*, *λ-cyhalothrin* και *azoxystrobin* προτιμάται η ανίχνευση και ο προσδιορισμός τους στον ECD, αφού παρουσιάζει καλύτερη ευαισθησία. Τα *metribuzin* και *fenhexamid* είναι ιδιαίτερες περιπτώσεις μορίων όπου το μεν πρώτο παρουσιάζει υψηλές τιμές αναπαραγωγιμότητας (19 – 42%) λόγω της διάσπασής του στους μεταβολίτες του και το δε δεύτερο έχει υψηλά ποσοστά επίδρασης του υποστρώματος (181 – 256%), λόγοι που οδηγούν στο να παρουσιάζουν και τα δύο Φ.Π. υψηλές διευρυμένες αβεβαιότητες, 41 – 85% και 52 – 86%, αντίστοιχα.

Για την ταυτοποίηση των ευρημάτων και την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφικό σύστημα αέριας χρωματογραφίας με ανιχνευτή φασματομετρίας μάζας GC-MS, στο οποίο πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός των δραστικών ουσιών χρησιμοποιώντας τη μέθοδο ανακατασκευής του χρωματογραφήματος (*Reconstructed Ion Chromatography – RIC*) και παρακολουθώντας το κύριο ιόν (ποσοτικοποίηση) και τα δευτερογενή ιόντα (ταυτοποίηση) για την κάθε δραστική ουσία στόχο.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	10
1. Οι Καλλιέργειες και τα Φυτοπροστατευτικά Προϊόντα (Φ.Π.).....	11
1.1 Οι καλλιέργειες της τομάτας, της αμπέλου και της μηλιάς.....	11
1.1.1. Η καλλιέργεια της τομάτας .....	11
1.1.2. Η καλλιέργεια της αμπέλου.....	13
1.1.3. Η καλλιέργεια της μηλιάς.....	17
1.2. Φυτοπροστατευτικά προϊόντα .....	19
1.2.1. Ιστορική αναδρομή και Νομοθεσία.....	19
1.2.2. Κατηγορίες και Ταξινόμηση Φ.Π.....	22
1.2.3. Τοξικότητα & Εκτίμηση επικινδυνότητας υπολειμμάτων Φ.Π. ....	25
2. Υπολείμματα Φ.Π. & Μέθοδοι προσδιορισμού τους.....	31
2.1. Προσδιορισμός υπολειμμάτων Φ.Π. ....	31
2.1.1. Δειγματοληψία .....	31
2.1.2. Επεξεργασία δειγμάτων και Αποθήκευση.....	32
2.1.3. Επιλογή αναλυτικής μεθόδου .....	33
2.1.4. Αναλυτική μεθοδολογία .....	33
2.2. Ενόργανες τεχνικές προσδιορισμού των υπολειμμάτων .....	47
2.2.1. Αέρια χρωματογραφία.....	47
2.2.2. Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης.....	49
2.2.3. Φασματομετρία μάζας.....	51
2.2.4. Ανοσοδοκιμασίες.....	53
3. Διαπίστευση των εργαστηρίων ανάλυσης & Επικύρωση των αναλυτικών μεθόδων ....	54
3.1. Εισαγωγή .....	54
3.2. Διαπίστευση των εργαστηρίων υπολειμμάτων Φ.Π.....	55
3.3. Διασφάλιση της ποιότητας των αποτελεσμάτων.....	56
3.4. Επικύρωση των μεθόδων προσδιορισμού υπολειμμάτων Φ.Π. ....	58
3.4.1. Ορθότητα της αναλυτικής μεθόδου.....	59
3.4.2. Πιστότητα της αναλυτικής μεθόδου.....	60
3.4.3. Ανιχνευσιμότητα της αναλυτικής μεθόδου .....	60
3.4.4. Εκλεκτικότητα και Ειδικότητα της αναλυτικής μεθόδου.....	62
3.4.5. Γραμμικότητα του ανιχνευτή .....	62
3.4.6. Εύρος των μετρήσεων .....	62

3.4.7. Ανθεκτικότητα της αναλυτικής μεθόδου.....	63
3.4.8. Ασφάλεια της αναλυτικής μεθόδου.....	63
3.4.9. Κόστος της Αναλυτικής Μεθόδου.....	63
3.4.10. Καταγραφή των στοιχείων επικύρωσης.....	64
3.5. Αβεβαιότητα των μεθόδων προσδιορισμού υπολειμμάτων Φ.Π. ....	64
3.5.1. Ποσοτικοποίηση της τυπικής αβεβαιότητας κάθε πηγής.....	66
3.5.2. Υπολογισμός της Διευρυμένης Αβεβαιότητας.....	68
ΑΝΑΛΥΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	69
4. Σκοπός της μελέτης .....	70
5. Περιγραφή των αναλυτικών διαδικασιών και των ενόργανων τεχνικών της μελέτης.....	75
5.1. Υποστρώματα των καρπών .....	75
5.2. Πρότυπες Ενώσεις, Διαλύματα & Διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν .....	76
5.3. Εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε.....	77
5.3.1. Όργανα και συσκευές για την προκατεργασία των δειγμάτων .....	77
5.3.2. Όργανα και συστήματα χρωματογραφίας που χρησιμοποιήθηκαν.....	77
5.4. Ανάπτυξη αναλυτικών μεθοδολογιών .....	78
5.4.1. Εμβολιασμοί - Φορτίσεις των δειγμάτων.....	78
5.4.2. Διαδικασία εκχύλισης των δειγμάτων .....	81
5.5. Προσδιορισμός των Φ.Π. με τη χρήση GC-NPD.....	82
5.6. Προσδιορισμός των Φ.Π. με τη χρήση GC-ECD.....	82
5.7. Ποιοτικός προσδιορισμός των Φ.Π. με τη χρήση GC-MS.....	84
6. Αποτελέσματα - Συζήτηση.....	85
6.1. Επικύρωση της αναλυτικής μεθόδου σε σύστημα GC-NPD.....	86
6.1.1. Έλεγχος της γραμμικότητας .....	86
6.1.2. Ορθότητα και πιστότητα της αναλυτικής μεθόδου .....	89
6.1.3. Ανιχνευσιμότητα της αναλυτικής μεθόδου .....	94
6.1.4. Έλεγχος επίδρασης του υποστρώματος.....	95
6.1.5. Έλεγχος της αβεβαιότητας της αναλυτικής μεθόδου .....	95
6.2. Επικύρωση της αναλυτικής μεθόδου σε σύστημα GC-ECD.....	100
6.2.1. Έλεγχος της γραμμικότητας .....	100
6.2.2. Ορθότητα και πιστότητα της αναλυτικής μεθόδου .....	105
6.2.3. Ανιχνευσιμότητα της αναλυτικής μεθόδου .....	112
6.2.4. Έλεγχος επίδρασης του υποστρώματος.....	113
6.2.5. Έλεγχος της αβεβαιότητας της αναλυτικής μεθόδου .....	114



6.3. Επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων με τη χρήση στήλης BPX-35 στο GC-ECD 119	
6.4. Ταυτοποίηση των ευρημάτων με τη χρήση φασματομετρίας μάζας.....	126
6.5. Συμπεράσματα.....	132
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	137

# ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

# 1. Οι Καλλιέργειες και τα Φυτοπροστατευτικά Προϊόντα (Φ.Π.)

## 1.1 Οι καλλιέργειες της τομάτας, της αμπέλου και της μηλιάς

Οι καλλιέργειες της τομάτας, της αμπέλου και της μηλιάς είναι από τις καλλιέργειες των οποίων οι καρποί, αλλά και τα προϊόντα αυτών, συμμετέχουν με υψηλά ποσοστά στη διατροφή του πληθυσμού. Για το λόγο αυτό, η μελέτη των υπολειμμάτων Φ.Π. σε αυτούς είναι ιδιαίτερα σημαντική. Με βάση τα στοιχεία των FAO/WHO (2008) η κατανάλωση των καρπών αυτών, από το γενικό πληθυσμό και από παιδιά ηλικίας 6 ετών και μικρότερα, καταγράφεται στον ακόλουθο πίνακα:

**Πίνακας 1:** Κατανάλωση των καρπών (τομάτα, σταφύλι, μήλο) από το γενικό πληθυσμό και από παιδιά ηλικίας 6 ετών και μικρότερα. (FAO/WHO, 2008)

Καρποί	Γενικός πληθυσμός			
	Κατανάλωση (g/ Kg σ.β/ ημέρα)	Χώρα αναφοράς	Σωματικό βάρος (Kg)	Ηλικία (έτη)
Τομάτα	7.41	Γαλλία	52.2	≥ 3
Σταφύλι	7.66	Αυστραλία	67.0	≥ 2
Μήλο	20.74	Η.Π.Α.	65.0	Όλες
Καρποί	Παιδιά ηλικίας ≤ 6ετών			
	Κατανάλωση (g/ Kg σ.β/ ημέρα)	Χώρα αναφοράς	Σωματικό βάρος (Kg)	Ηλικία (έτη)
Τομάτα	11.40	Γαλλία	18.9	3 έως 6
Σταφύλι	18.00	Αυστραλία	19.0	2 έως 6
Μήλο	45.25	Η.Π.Α.	15.0	1 έως 6

### 1.1.1. Η καλλιέργεια της τομάτας

Η τομάτα (*Lycopersicum esculentum*) είναι κατά κανόνα ετήσιο λαχανικό, αρκετά διαδεδομένο και πολύ δημοφιλές. Ανήκει στην οικογένεια Solanaceae. Σε διεθνή κλίμακα, η καλλιέργεια της τομάτας καταλαμβάνει την τρίτη σε έκταση θέση μετά την πατάτα και τη γλυκοπατάτα, ενώ στην Ελλάδα η επιτραπέζια τομάτα καταλαμβάνει τη δεύτερη σε έκταση θέση μετά την πατάτα. Η δημοτικότητα της τομάτας ποικίλει στις διάφορες χώρες, αλλά είναι πολύ λίγες οι περιοχές της γης όπου η τομάτα δεν καλλιεργείται σε καμία από τις μορφές καλλιέργειάς της. Καλλιεργείται για τον καρπό της, ο οποίος καταναλώνεται ώριμος, νωπός, αποξηραμένος σε άλμη, ακέραιος ή σε

πολύ. Ακόμη και άωροι καρποί (τοξικοί, εάν καταναλωθούν νωποί) συντηρούνται σε άλμη ή ξύδι. Είναι γνωστοί οι φόβοι που επικρατούσαν μέχρι τον 20<sup>ο</sup> αιώνα στις περιοχές της Μεσογείου, της Β. Ευρώπης και στη Β. Αμερική, ότι οι τομάτες περιέχουν τοξικές ουσίες, γεγονός που εμπόδιζε την κατανάλωσή τους. Οι φόβοι αυτοί οφείλονταν στην παρουσία δηλητηριωδών γλυκοαλκαλοϊδών στα φύλλα και στους καρπούς άλλων μελών της ίδιας οικογένειας. Αυτό ξεπεράστηκε στις αρχές του 20<sup>ου</sup> αιώνα, και από τότε η κατανάλωση της τομάτας αυξήθηκε σημαντικά. (Ολύμπιος, 2001)

Ποικιλίες της έχουν εγκλιματιστεί σε μεγάλο εύρος τύπων εδάφους και κλίματος, αν και θα πρέπει να τονιστεί ότι το φυτό απαιτεί θερμό κλίμα και εδάφη με καλή στράγγιση. Σήμερα, η καλλιέργεια της τομάτας εκτείνεται από τις τροπικές περιοχές μέχρι και μερικές μοίρες από τον αρκτικό κύκλο και στις μεν περιοχές όπου η διάρκεια της θερμής περιόδου το επιτρέπει, η τομάτα καλλιεργείται στο ύπαιθρο, ενώ σε άλλες περιοχές και σε περιόδους «εκτός εποχής» καλλιεργείται σε θερμοκήπια και άλλες κατασκευές υπό προστασία. Η μορφή καλλιέργειας της τομάτας ποικίλει από την εκτατική (μεγάλες εκτάσεις σε γραμμική καλλιέργεια πλήρως μηχανοποιημένη, με εφάπαξ συγκομιδή με μηχανικά μέσα), έως την εντατική (καλλιέργεια σε θερμοκήπια, υποστύλωση, κλάδεμα, επαναλαμβανόμενη συγκομιδή με το χέρι κ.λπ.).

Αξίζει να σημειωθεί ότι στην Ελλάδα ένα μεγάλο μέρος της έκτασης 53.8% (1997) καλλιεργείται με τομάτες που προορίζονται για μεταποίηση, το 39.8% είναι υπαίθρια καλλιέργεια για νωπή κατανάλωση και το 6.4% της έκτασης είναι η καλλιέργεια στα θερμοκήπια και χαμηλά σκέπαστρα. Το μεγαλύτερο ποσοστό των θερμοκηπίων που καλλιεργούνται με τομάτα, βρίσκεται στην Κρήτη με ποσοστό 35.4%, δεύτερη έρχεται η Δ. και Κ. Μακεδονία με 22.3% και τρίτη η Πελοπόννησος και Δ. Στερεά με 18.4%.

Το ύψος της παραγωγής ανά στρέμμα κυμαίνεται πολύ, γιατί επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, όπως ποικιλία, εποχή καλλιέργειας, συνθήκες θερμοκηπίου, διάρκεια καλλιέργειας κ.α. Στην Ελλάδα μια μέση απόδοση 12 – 15 τόν./ στρ. θεωρείται ικανοποιητική.

Ο καρπός της τομάτας είναι πολύχωρος ράγα, με ποικίλα σχήματα. Ο καρπός των ποικιλιών με δυο χωρίσματα (χώρους) είναι συνήθως στρογγυλός, ενώ αυτών με τρία, τέσσερα, πέντε ή περισσότερα χωρίσματα είναι πεπλατυσμένος και πιθανόν ακανόνιστος.

Οι λόγοι που καθιστούν την τομάτα δημοφιλές λαχανικό είναι πολλοί. Οι σπουδαιότεροι είναι ότι εφοδιάζει τον ανθρώπινο οργανισμό με βιταμίνες, ιδίως τη βιταμίνη C (25 mg/ 100 g) και το λυκοπένιο. Το λυκοπένιο προσδίδει στην τομάτα το κόκκινο χρώμα και αντιπροσωπεύει το 90% των καροτινοειδών. Έχει ελκυστικό χρώμα

και ιδιαίτερο άρωμα, γεγονός που την καθιστά αρεστή στη διατροφή. Τα κυριότερα συστατικά του καρπού της τομάτας είναι 94% νερό, 1.5 – 4.5% σάκχαρα, 0.14 – 0.15% υδατάνθρακες, 10.5% πρωτεΐνες και 0.2% λίπη. Τα 100 g νωπού βάρους της τομάτας έχουν ενέργεια ίση με 22 Kcal.

Οι κυριότεροι ζωικοί εχθροί της τομάτας είναι το πράσινο σκουλήκι (*Helicoverpa armigera*), ο αλευρώδης (*Trialeurodes vaporariorum*), οι νηματώδεις (*Meloidogyne spp.* και *Heterodera rostochiensis*), οι σιδηροσκώληκες (*Agriotes obscurus*), διάφορα είδη αφίδων, οι θρίπες (*Thrips tabaci*), ο φυλλορύκτης της τομάτας (*Liriomyza solani*) και ο τετράνυχος (*Tetranychus urticae*) (Σταμόπουλος, 1994).

Οι κυριότερες μυκητολογικές ασθένειες που προσβάλλουν την τομάτα είναι ο όψιμος περονόσπορος (*Phytophthora infestans*), ο πρώιμος περονόσπορος (*Alternaria solani*), το ωίδιο (*Leveillula taurica*), οι αδρομυκώσεις (*Verticillium dahliae*, *V. albo-atrum*, *Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici*), η καστανή σήψη των ριζών ή φελλώδης σηψιρριζία (Brown root ή Corky root) (*Pyrinochaeta lycopersici*), η ντιντιμέλλα (*Didymella lycopersici*), η τεφρά σήψη (*Botrytis cinerea*), η κλαδοσπορίωση (*Cladosporium fulvum* και *Fulvia fulva*) και η σκληρωτινίαση (*Sclerotinia sclerotiorum*) (Παναγόπουλος, 2000).

Από φυτοπροστατευτικής πλευράς, η χρήση των Φ.Π. για την προστασία των φυτών της τομάτας από εχθρούς και ασθένειες αρχίζει αμέσως μετά τη σπορά ή τη μεταφύτευση των φυταρίων στον αγρό ή στο θερμοκήπιο. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίνεται κατά την περίοδο δραστηριότητας του πράσινου σκουληκιού αφού απειλείται η αναρτημένη παραγωγή, καθώς επίσης και τις περιόδους με αυξημένη υγρασία διότι ευνοείται η ανάπτυξη του περονόσπορου ο οποίος καταστρέφει τόσο το φυτό όσο και τον καρπό.

### 1.1.2. Η καλλιέργεια της αμπέλου

Η καλλιέργεια της αμπέλου και η τέχνη της οινοποίησης αποτελούν βασικό στοιχείο των σπουδαιότερων αρχαίων πολιτισμών της ανατολικής λεκάνης της Μεσογείου. Από τους πολιτισμούς αυτούς μεταφέρθηκε στον Ελλαδικό χώρο και από εκεί στις Ελληνικές αποικίες της δύσης. Σήμερα, η αμπελοκαλλιέργεια έχει επεκταθεί σε όλο τον κόσμο, όπου το φυτό αυτό μπορεί να επιβιώσει και να ολοκληρώσει το βιολογικό του κύκλο. Η αμπελοκαλλιέργεια παγκοσμίως καταλαμβάνει 78.885.000 στρέμματα. Από την έκταση αυτή τα 49.740.000 στρέμματα καλλιεργούνται στην Ευρώπη, εκ των οποίων

τα 1.290.000 στρέμματα ανήκουν στην Ελλάδα. Η Ισπανία καταλαμβάνει την πρώτη θέση στην αμπελοκαλλιέργεια της Ευρώπης, ενώ ακολουθούν η Γαλλία και η Ιταλία.

Η άμπελος ανήκει στην Κλάση των Δικοτυλήδονων φυτών (Dicotyledones), την Τάξη Θαμνώδη (Ranunculales), την Οικογένεια Αμπελίδες (Vitaceae) και το γένος άμπελος (*Vitis*). Όλες σχεδόν οι ποικιλίες παραγωγής που καλλιεργούνται για την παραγωγή διαφόρων προϊόντων ανήκουν στο είδος *Vitis vinifera*. L. (άμπελος η οινοφόρος). Είναι ένα θαμνώδες πολυετές φυτό, του οποίου ο κορμός χρειάζεται υποστήριξη, φυσική ή τεχνητή. Τα αυτοφυή φυτά υποστηρίζονται σε άλλους θάμνους, σε βράχους ή αναρριχώνται σε δέντρα. Τα καλλιεργούμενα φυτά που διαμορφώνονται σε χαμηλά σχήματα διαμόρφωσης (κύπελλα) πολλές φορές δε χρειάζονται υποστήριξη, δεδομένου ότι το μέγεθός τους είναι μικρό, με κορμό μικρού ύψους ο οποίος είναι αρκετά ανθεκτικός. Τα φυτά που διαμορφώνονται σε πιο εκτεταμένα σχήματα (γραμμωτά, κρεβατίνες) χρειάζονται οπωσδήποτε τεχνητή υποστήριξη.

Από τα βασικά προϊόντα της αμπέλου είναι τα επιτραπέζια σταφύλια. Τα νωπά σταφύλια, ως εύγευστα φρούτα, περιέχουν σάκχαρα σε μεγάλες ποσότητες, ανόργανα άλατα και βιταμίνες (C, B, A και E), με πολύ σημαντικές διαιτητικές ιδιότητες. Η περιεκτικότητά τους σε λιπαρές ουσίες και πρωτεΐνες είναι χαμηλή. Τα 100 g εδώδιμου μέρους νωπού σταφυλιού περιέχουν 81% νερό και ενέργεια ίση με 67 Kcal. Τα δύο κύρια σάκχαρα που απαντώνται στα κύτταρα της ράγας είναι οι εξόζες D-γλυκόζη και D-φρουκτόζη. Το σύνολο της γλυκόζης και της φρουκτόζης στο γλεύκος φτάνει στα 150 – 250 g/ L (15 – 25%) ή και περισσότερο. Άλλα σάκχαρα που βρίσκονται στο γλεύκος και στους οίνους είναι οι πεντόζες L-αραβινόζη και D-ξυλόζη. Η σακχαρόζη (γλυκόζη+φρουκτόζη), είναι ο σπουδαιότερος δισακχαρίτης των σταφυλίων. Προέρχεται από την ενζυματική σύνδεση των αντίστοιχων μονοσακχάρων γλυκόζης και φρουκτόζης, τα οποία είναι προϊόντα της φωτοσύνθεσης. Η συγκέντρωσή της στο γλεύκος είναι χαμηλή, της τάξεως των 2.0 – 5.0 g/ L. Άλλα συστατικά των ραγών των σταφυλίων είναι τα γλυκοζίδια, οι πηκτινικές ουσίες, οι αζωτούχες ενώσεις, τα αμινοξέα, οι αρωματικές ενώσεις, καθώς επίσης και τα οργανικά οξέα. (Νικολάου, 2008)

Το σπουδαιότερο οξύ στις ράγες είναι το *τρυγικό οξύ*, προϊόν του δευτερογενούς μεταβολισμού των σακχάρων. Το τρυγικό οξύ δεν απαντάται ευρέως στη φύση, αλλά είναι ένα οξύ που χαρακτηρίζει τους καρπούς της αμπέλου. Είναι ένα σχετικά ισχυρό οξύ το οποίο δίνει στους οίνους ένα χαμηλό pH 3.0 – 3.2. Η συγκέντρωσή του στο γλεύκος των ώριμων σταφυλίων, σε μερικές βόρειες αμπελουργικές χώρες φθάνει στα 6.0 g/ L, ενώ σε νότιες ή πιο θερμές περιοχές φθάνει στα 2.0 – 3.0 g/ L. Το *μηλικό οξύ*, σημαντικό

οργανικό οξύ του κύκλου του Krebs, αν και απαντάται σε αφθονία στα μήλα, το βρίσκουμε και στις ράγες των σταφυλών σε σημαντικές ποσότητες. Στις βόρειες αμπελουργικές χώρες η συγκέντρωση του μηλικού οξέος στο γλεύκος κατά την ωρίμανση είναι 4.0 – 6.5 g/ L, ενώ στις νότιες ή πιο θερμές περιοχές κυμαίνεται μεταξύ 1.0 – 2.0 g/ L. Το τρίτο οργανικό οξύ που απαντάται στα σταφύλια, και συμβάλλει μαζί με τα άλλα δύο στην οξύτητα του γλεύκους, είναι το *κιτρικό οξύ*. Η συγκέντρωσή του στο γλεύκος κυμαίνεται μεταξύ 0.5 – 1.0 g/ L. Επίσης, έχει αναφερθεί και η ύπαρξη *ασκορβικού οξέος* (βιταμίνη C), σε ποσότητες που κυμαίνονται από 1.0 – 12.5 mg/ 100 g ραγών, και προστατεύει τις φαινολικές ενώσεις από τις οξειδώσεις.

Οι φαινολικές ενώσεις, είναι μια άλλη κατηγορία ενώσεων, οι οποίες θεωρούνται μεταβολίτες με άκρως ευεργετικές ιδιότητες για την υγεία του ανθρώπου. Απαντώνται σε μεγάλες ποσότητες στις ράγες των σταφυλιών και διαθέτουν έντονη αντιοξειδωτική δράση, καθώς επίσης αντικαρκινικές και βακτηριοστατικές ιδιότητες. Οι κατηγορίες των φαινολικών ουσιών είναι οι ακόλουθες:

- **Παράγωγα του φαινολικού οξέος.** Στην κατηγορία αυτή υπάγονται οι λεγόμενες μη φλαβονοειδείς φαινολικές ενώσεις, οι οποίες είναι μονομορικά παράγωγα του βενζοϊκού και κινναμωνικού οξέος.
- **Στιλμπένια.** Είναι μια κατηγορία ενώσεων που αποτελούν πιο σύνθετες φαινόλες που απαντώνται στα σταφύλια και με την οινοποίηση περνούν στο κρασί. Μια γνωστή ένωση αυτής της κατηγορίας είναι η *ρεσβερατρόλη* (3,5,4' τριυδροξυστιλμπένιο), η οποία παράγεται από την άμπελο ως αντίδραση σε μολύνσεις από μύκητες.
- **Φλαβονοειδή.** Οι φλαβονοειδείς φαινόλες είναι χρωστικές κίτρινου χρώματος και διαχωρίζονται σε δύο κατηγορίες. Τις *φλαβονόλες*, κίτρινες χρωστικές που απαντώνται τόσο στους φλοιούς των ερυθρών όσο και των λευκών ποικιλιών, και τις *φλαβανόνες*, που προέρχονται από το ξύλο της δρυός.
- **Ανθοκυάνες.** Ερυθρές χρωστικές που απαντώνται στους φλοιούς των σταφυλιών και πιο σπάνια στη σάρκα. Τα πέντε μόρια ανθοκυανών που έχουν εντοπιστεί στα σταφύλια είναι η *δελφιδίνη*, η *πετουνιδίνη*, η *μαλβιδίνη*, η *πεονιδίνη* και η *κυανιδίνη*. Από τις πέντε ανθοκυάνες, η *μαλβιδίνη* είναι αυτή που υπερτερεί στις περισσότερες ερυθρές ποικιλίες.
- **Κατεχίνες – προκυανιδίνες.** Υδροξυλιωμένα παράγωγα της 3-φλαβονόλης .
- **Ταννίνες.** Συσσωματώματα φαινολικών ουσιών που δημιουργούνται από πολυμερισμό στοιχειωδών μορίων με φαινολικά χαρακτηριστικά. Είναι ευμεγέθη

πολυμερή με μοριακό βάρος που κυμαίνεται από 600 έως 3500. Διαχωρίζονται σε μη υδρολυόμενες ή κατεχινικές ταννίνες και υδρολυόμενες ταννίνες. Οι υδρολυόμενες ταννίνες δεν υπάρχουν στα σταφύλια. Ανάλογα με την ποικιλία και τον τρόπο οινοποίησης η περιεκτικότητα των κρασιών σε ταννίνες κυμαίνεται μεταξύ 1.0 – 4.0 g/ L.

Κάθε ράγα μπορεί να περιέχει μέχρι 4 γίγαρτα. Τα γίγαρτα είναι οι σπόροι της αμπέλου. Η περιεκτικότητα των γιγάρτων σε νερό είναι υψηλή και κυμαίνεται από 24 – 45%. Επίσης, τα γίγαρτα περιέχουν περίπου 35% υδατάνθρακες, 13 – 20% έλαια, 4.0 – 6.0% ταννίνες, 4.0 – 6.5% αζωτούχες ενώσεις, 2.0 – 4.0% ανόργανα στοιχεία και 1.0% λιπαρά οξέα. (Νικολάου, 2008)

Οι κυριότεροι ζωικοί εχθροί της αμπέλου είναι η ευδεμίδα της αμπέλου (*Lobesia botrana*), η φυλλοξήρα της αμπέλου (*Viteus vitifoliae*), ο θρίπας της αμπέλου (*Drepanothrips reuteri*), ο θρίπας της Καλιφόρνιας (*Frankliniella occidentalis*), η κοχυλίδα της αμπέλου (*Eupoecilia ambiguella*), η πυραλίδα της αμπέλου (*Sparganothis pilleriana*), οι σφήκες (Vespididae) και οι ωπιόρυγχοι (Curculionidae) (Τζανακάκης & Κατσόγιαννος, 2003).

Οι κυριότερες μυκητολογικές ασθένειες που προσβάλλουν την άμπελο είναι ο περονόσπορος της αμπέλου (*Plasmopara viticola*), το ωΐδιο (*Uncinula necator*), η τεφρά σήψη ή βοτρυτής (*Botrytis cinerea*), η φώμοψη (*Phomopsis viticola*), η ίσκα (*Phellinus igniarius*, *Stereum hirsutum*), οι σηψιρριζίες (*Armillaria mellea*, *Rosellinia necatrix*) και η αδρομύκωση (*Verticillium dahliae*) (Παναγόπουλος, 2007).

Η προστασία των φυτών της αμπέλου από εχθρούς και ασθένειες πραγματοποιείται καθ' όλη τη διάρκεια του έτους και κυρίως τους θερινούς και φθινοπωρινούς μήνες όπου έχει αρχίσει η ανάπτυξη και ωρίμανση των καρπών. Ο περονόσπορος και το ωΐδιο αποτελούν στις περισσότερες περιοχές τις κυριότερες προς αντιμετώπιση ασθένειες, από τα πρώτα βλαστικά στάδια της αμπέλου μέχρι την ωρίμανση και συγκομιδή του καρπού, σε σχέση με την ίσκα και την αδρομύκωση που η αντιμετώπισή τους βασίζεται κυρίως στην πρόληψη. Ιδιαίτερης προσοχής ζωικός εχθρός των σταφυλιών είναι η ευδεμίδα, διότι εκτός από τις προσβολές που δημιουργεί στους καρπούς είναι η κύρια αιτία ανάπτυξης του βοτρυτή. Τα τραύματα και οι στοές που δημιουργεί στις ράγες η προνύμφη του εντόμου διευκολύνουν την είσοδο και επέκταση του μύκητα, ιδίως τους φθινοπωρινούς μήνες. Αποτέλεσμα αυτού είναι να επηρεάζεται άμεσα η παραγωγή και να καθίσταται αναγκαία η εφαρμογή εντομοκτόνων και μυκητοκτόνων σκευασμάτων μέχρι και το στάδιο της συγκομιδής.



### 1.1.3. Η καλλιέργεια της μηλιάς

Η καλλιέργεια της μηλιάς αντιπροσωπεύει σήμερα, κατά προσέγγιση, το 50% των φυλλοβόλων δένδρων. Η ετήσια παγκόσμια παραγωγή αν και ποικίλει από έτος σε έτος, ανάλογα με τις συνθήκες στα κύρια παραγωγικά κέντρα, ανέρχεται σε 40.860.000 τόνους (FAO, 1988). Η μεγαλύτερη παγκόσμια παραγωγή μήλων αποτελείται από ποικιλίες επιτραπέζιες και παρασκευής κομπόστας.

Η μηλοκαλλιέργεια είναι η τέταρτη σε σημασία καλλιέργεια μετά από εκείνες της ελιάς, των εσπεριδοειδών και της ροδακινιάς. Στην Ελλάδα, η μηλοκαλλιέργεια σε μορφή συστηματικών οπωρώνων εντοπίζεται κυρίως στην κεντρική και δυτική Μακεδονία, στη Θεσσαλία και την Πελοπόννησο. Οι συστηματικοί οπωρώνες μηλιάς στη χώρα μας καταλαμβάνουν έκταση 192.263 στρεμμάτων και η μέση παραγόμενη ποσότητα μήλων κυμαίνεται περί τους 300.000 τόνους ετησίως και παραμένει σταθερή τα τελευταία χρόνια. (Βασιλακάκης, 2007)

Η μηλιά ανήκει στην οικογένεια Rosaceae, στην υποοικογένεια Pomoideae και στο γένος *Malus*. Η καλλιεργούμενη μηλιά ανήκει στο είδος *Malus domestica* Borkh. Είναι δένδρο φυλλοβόλο, μεγάλου μεγέθους, πλαγιοκλαδο ή ορθόκλαδο (φιρίκι) και μακρόβιο. Τα φύλλα είναι απλά, κατ' εναλλαγή, ωοειδή, οδοντωτά, βραχύμυχα, με την κάτω επιφάνεια χνουδωτή. Τα άνθη είναι μεγάλα, λευκά ή ελαφρώς ρόδινα. Ο καρπός είναι μήλο (ψευδής καρπός), έχει διάφορο σχήμα, σφαιρικό, κωνικό, κολουροκωνικό, σφαιρικό έως επίμηκες, με ή χωρίς μαστοειδείς αποφύσεις, σάρκα τραγανή ή αλευρώδη, εύχυμη, γλυκιά, όξινη ή υπόξινη και σπέρματα καφέ απόχρωσης. (Ποντίκης, 2003)

Τα κυριότερα συστατικά του μήλου ανά 100 g νωπών καρπών είναι 84% νερό, 15% υδατάνθρακες, 2.0% γλυκόζη, 6.0% φρουκτόζη, 4.0% σακχαρόζη, 0.3% πρωτεΐνες, 0.6% λιπίδια και 0.9% κυτταρίνες. Η ενέργεια που αντιστοιχεί σε 100 g νωπού μήλου είναι 58 Kcal. Σημαντική είναι επίσης η περιεκτικότητα των μήλων σε βιταμίνες και ανόργανα στοιχεία, κυρίως σε Κάλιο (110 mg/ 100 g) και Φώσφορο (10 mg/ 100 g).

Οι ερευνητές κατατάσσουν τα μήλα, σε σχέση με τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες, ένατα, μεταξύ 12 φρούτων πλούσιων σε αντιοξειδωτικές ουσίες. Ιδιαίτερα ο φλοιός των μήλων περιέχει αρκετές αντιοξειδωτικές ουσίες (τοκοφερόλες, ανθοκυάνες, φαινόλες). Η κύρια ομάδα πολυφαινόλων στα μήλα είναι οι φλαβονόλες (κατεχίνη και προανθοκυανιδίνες) (71 – 90%), μετά τα υδροξυκινναμωμικά οξέα (4.0 – 18%), οι φλαβονόλες (1.0 – 11%), οι διϋδροχαλκόνες (2.0 – 6.0%) και στα κόκκινα μήλα οι ανθοκυάνες (1.0 – 3.0%). Οι κύριες ανθοκυάνες στα μήλα είναι τα γλυκοζίδια της

κυανιδίνης και αυτό που υπερτερεί είναι το 3-γαλακτοζίδιο της κυανιδίνης. (Βασιλακάκης, 2006)

Οι κυριότεροι ζωικοί εχθροί της μηλιάς είναι οι αφίδες (*Aphis pomi*, *Disaphis plantaginea*), η βαμβακάδα της μηλιάς (*Eriosoma lanigerum*), η ψώρα του San José (*Quanzaspidiotus perniciosus*), ο τίγρης της μηλιάς (*Staphanitis pyri*), ο ανθονόμος της μηλιάς (*Anthonomus pomorum*), οι φυλλορύκτες (*Phyllonorycter blancardella*, *Phyllonorycter corylifoliella*, *Leucoptera malifoliella*, *Lyonetia clerkella*), ο υπονομευτής της μηλιάς (*Yponomeuta malinellus*), η σέξια των γιγαρτοκάρπων (*Synanthedon myopiformis*), η κόσσοις (*Cossus cossus*), η ζευζέρα (*Zeuzera pyrina*), η καρπόκαψα (*Cydia pomonella*) και η οπλοκάμπη της μηλιάς (*Hoplocampa testudinea*) (Τζανακάκης & Κατσόγιαννος, 2003).

Οι κυριότερες μυκητολογικές ασθένειες που προσβάλλουν τη μηλιά είναι το φουζικλάδιο της μηλιάς (*Spilocaea pomi*), το ωΐδιο (*Oidium farinosum*), η φαιά σήψη ή μονίλα (*Monilia laxa*), η παρασιτική μολύβδωση ή αργύρωση (*Chondrostereum purpureum*), η εξέλκωση βραχιόνων (*Cylindrocarpon heteronemum*), η σκωρίαση της μηλιάς (*Gymnosporangium cornutum*), το έλκος ή σήψη λαιμού (*Phytophthora*), οι σηψιρριζίες (*Armillaria melea*, *Rosellinia necatrix*), η κυανή σήψη των μήλων (μετασυλλεκτική ασθένεια) (*Penicillium expansum*), η καπνιά και στιγμάτωση των καρπών (*Gloeodes pomigena*, *Zygophiala jamaicensis*), (Παναγόπουλος, 2007).

Η αντιμετώπιση των εχθρών και ασθενειών της μηλιάς αρχίζει με χειμερινές επεμβάσεις, αλλά αφορά κυρίως θερινούς ψεκασμούς οι οποίοι σκοπό έχουν την προστασία της αναρτημένης παραγωγής. Γίνονται συνήθως κατά την περίοδο δραστηριότητας της καρποκάψας για να αντιμετωπισθούν οι νεαρές προνύμφες πριν να εισέλθουν στους καρπούς, ή προτού να εκκολαφθούν από τα αυγά (θανάτωση στο εμβρυακό στάδιο), καθώς και κατά την περίοδο με αυξημένη υγρασία όπου ευνοείται η ανάπτυξη του φουζικλαδίου επί των καρπών. Οι δε ψεκασμοί που εφαρμόζονται στα τελευταία στάδια ανάπτυξης του καρπού και λίγο πριν τη συγκομιδή χρήζουν ιδιαίτερης προσοχής για την αποφυγή ανεπιθύμητων υπολειμμάτων στους προς κατανάλωση καρπούς. Στην περίπτωση των μήλων γίνεται εφαρμογή Φ.Π. σκευασμάτων και μετασυλλεκτικά ούτως ώστε να αποφευχθούν οι μετασυλλεκτικές προσβολές από παθογόνα, όπως η κυανή σήψη των μήλων, η καπνιά και στιγμάτωση των καρπών. Για το λόγο αυτό κρίνεται επιτακτική η μελέτη του ρυθμού αποδόμησης των εκάστοτε Φ.Π. στον καρπό καθώς και ο μεταβολισμός αυτών σε διάφορους ακίνδυνους ή μη μεταβολίτες.

## 1.2. Φυτοπροστατευτικά προϊόντα

### 1.2.1. Ιστορική αναδρομή και Νομοθεσία

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

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

Η αλόγιστη χρήση των Φ.Π. σε σύντομο χρονικό διάστημα ανέδειξε τις πρώτες ανεπιθύμητες επιπτώσεις της τοξικής τους δράσης στους ζωντανούς οργανισμούς, καθώς επίσης και την ανάπτυξη ανθεκτικότητας από τα παράσιτα. Μάλιστα, η ανθεκτικότητα των εντόμων έγινε για πρώτη φορά αντιληπτή το 1914 (Thacker, 2002). Η πρώτη ανακοίνωση για την επίπτωση των Φ.Π. στον ανθρώπινο οργανισμό έγινε το 1951 από τον Laug και τους συνεργάτες του (Laug *et al.*, 1951). Ακολούθησε το βιβλίο της Rachel Carson «Σιωπηλή Άνοιξη» (Silent Spring, 1962), όπου για πρώτη φορά γίνεται αναφορά στις δυσμενείς επιπτώσεις στο περιβάλλον από τη χρήση των Φ.Π. και τα υπολείμματά τους. Έτσι, ακολουθούν πολλές έρευνες οι οποίες αποδεικνύουν ότι η αλόγιστη και εκτεταμένη χρήση των Φ.Π. έχει ως αποτέλεσμα την ανίχνευση των υπολειμμάτων τους στο περιβάλλον σε ανησυχητικά επίπεδα.

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

Το πρώτο έτος εφαρμογής των οδηγιών του Συμβουλίου της Ευρώπης για τα υπολείμματα Φ.Π. ήταν το 1994. Με τις οδηγίες αυτές καθορίζονται τα ανώτατα όρια και επιβάλλεται στα κράτη μέλη να προβαίνουν σε συστηματικούς ελέγχους σε εγχώρια και εισαγόμενα προϊόντα και να κοινοποιούν τα αποτελέσματα των αναλύσεων. Η κοινοποίηση αυτή περιλαμβάνει τις μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν, τις ουσίες που ήταν δυνατό να ανιχνευθούν και να προσδιοριστούν, τον αριθμό των δειγμάτων που αναλύθηκαν, το ποσοστό των δειγμάτων με ανιχνεύσιμα υπολείμματα, το ποσοστό των δειγμάτων με συγκεντρώσεις που υπερέβαιναν τα κοινοτικά όρια και τα προϊόντα στα οποία βρέθηκαν.

Από την εξέταση των αποτελεσμάτων και τη σύγκριση των στοιχείων από διάφορες χώρες της Ε.Ε. φαίνεται ότι στο θέμα των ελέγχων υπολειμμάτων υπάρχει έντονη διαφοροποίηση μεταξύ «πλούσιων» και «φτωχών» χωρών.

Η σημαντικότερη καινοτομία των τελευταίων χρόνων στο χώρο των Φ.Π., η οποία κινείται προς την κατεύθυνση της αειφορίας, είναι η αλλαγή στον τρόπο έγκρισης και διάθεσής τους στην αγορά. Στην Αναμόρφωση της Κοινής Αγροτικής Πολιτικής ήταν σαφής η πρόθεση της Ε.Ε. να συμπεριλάβει τους περιβαλλοντικούς στόχους της διάστασης της αειφορίας στη χρήση των Φ.Π., στο κείμενο με τις κατευθύνσεις προς την αειφόρο γεωργία,

Η αειφορία στη χρήση των Φ.Π. αποτέλεσε έναν από τους στόχους του 5<sup>ου</sup> Προγράμματος Δράσης για το περιβάλλον το 1993, όπως αυτό αναθεωρήθηκε το 1998

και στο οποίο αναφέρεται ότι είναι αναγκαίο να καθοριστούν πρόσθετα μέτρα στον τομέα των Φ.Π. με σκοπό να εξασφαλιστεί η αειφορία στη χρήση τους και να μειωθούν οι εισροές χημικών ουσιών σε επίπεδα ώστε να μην επηρεάζεται καμία από τις βασικές φυσικές διεργασίες.

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

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

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

### 1.2.2. Κατηγορίες και Ταξινόμηση Φ.Π.

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

Τα οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα είναι από τις παλαιότερες συνθετικές οργανικές ενώσεις, οι οποίες έπαιξαν σημαντικό ρόλο στην προστασία της γεωργικής παραγωγής και της δημόσιας υγείας μετά το Β΄ Παγκόσμιο Πόλεμο. Το πιο γνωστό εντομοκτόνο αυτής της κατηγορίας είναι το *DDT*. Λόγω όμως της μεγάλης τους σταθερότητας και του φαινομένου της βιοσυσσωρευσης που παρουσιάζουν, με την πάροδο του χρόνου άρχισαν να διαπιστώνονται δυσμενείς επιπτώσεις στο περιβάλλον. Το κύριο μειονέκτημα αυτών των ενώσεων είναι ότι δεν αποδομούνται εύκολα, συσσωρεύονται στο λιπώδη ιστό, περνούν στο γάλα και τα αυγά, με αποτέλεσμα να εισέρχονται στην τροφική αλυσίδα των ζώων και του ανθρώπου. Έτσι, τη δεκαετία του '70 απαγορεύεται η χρήση των περισσότερων οργανοχλωριωμένων εντομοκτόνων. Τα μόνα εντομοκτόνα αυτής της κατηγορίας που κυκλοφορούν στις ανεπτυγμένες χώρες είναι το *endosulfan* και το *dicofol*. Όσον αφορά την εντομοτοξική δράση των οργανοχλωριωμένων έχει διαπιστωθεί ότι παρεμποδίζουν την αξονική μετάδοση των νευρικών σημάτων, προκαλώντας έτσι νευρική διέγερση, σπασμούς και τελικά το θάνατο των εντόμων. (Ζιώγας & Μαρκόγλου, 2007)

Τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα είναι μια πολυπληθής ομάδα συνθετικών οργανικών εντομοκτόνων με ευρύ φάσμα δράσης. Οι φυσικοχημικές και βιολογικές τους ιδιότητες τα κατέστησαν ικανά να υποκαταστήσουν σχεδόν πλήρως τα οργανοχλωριωμένα. Οι βασικές τους ιδιότητες είναι ότι χαρακτηρίζονται από υψηλή εντομοκτόνο και ακαρεοκτόνο δράση, έχουν ευρύ φάσμα δράσης, μικρή υπολειμματική

διάρκεια και σχετικά γρήγορη αποδόμηση σε μεταβολικά προϊόντα μη τοξικά για τον άνθρωπο και τα ζώα. Η κίνησή τους στο περιβάλλον είναι πρακτικά αμελητέα, αφού προσροφούνται ισχυρά στα εδαφικά κολλοειδή. Σχετικά με το βιοχημικό μηχανισμό δράσης τους, δρουν στις χολινεργικές συνάψεις ως ισχυροί αναστολείς των χολινεστερασών, δεσμεύοντας τη σερίνη της ενεργού περιοχής της Ache, παρεμποδίζοντας έτσι το μεταβολισμό της ακετυλοχολίνης.

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

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

Με βάση την εξειδικευμένη βιολογική τους δράση τα μυκητοκτόνα και βακτηριοκτόνα διαχωρίζονται στις παρακάτω κατηγορίες:

1. Προστατευτικές ενώσεις με πολλαπλή δράση στις κυτταρικές και φυσιολογικές λειτουργίες.

#### 1.1. Ανόργανες Ενώσεις (Ενώσεις S, Cu, Hg, As)

- 1.2. Οργανομεταλλικές ενώσεις
- 1.3. Οργανικές προστατευτικές ουσίες πολλαπλής δράσης
- 1.4. Άλλα οργανικά προστατευτικά
2. Ενώσεις με εξειδικευμένη δράση στις κυτταρικές ή τις φυσιολογικές λειτουργίες
  - 2.1. Παρεμπόδιση συστημάτων παραγωγής ενέργειας
  - 2.1. Παρεμπόδιση λειτουργιών του πυρήνα
  - 2.1. Επίδραση στη δομή και λειτουργία των κυτταρικών μεμβρανών
  - 2.1. Παρεμπόδιση της βιοσύνθεσης λιπαρών οξέων
  - 2.1. Παρεμπόδιση της βιοσύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος
  - 2.1. Παρεμπόδιση της πρωτεϊνικής σύνθεσης
  - 2.1. Παρεμβολή στην αλληλεπίδραση ξενιστή – παθογόνου (Αντιπαθογονικά)
  - 2.1. Ενώσεις με άγνωστο μηχανισμό δράσης
3. Βιο – Αντιπαθογονικά
  - 3.1. Χρήση παρασιτικών ή ανταγωνιστικών μικροοργανισμών και ιών
  - 3.1. Χρήση μη παθογόνων στελεχών ο ίδιου μικροοργανισμού ή ιού
  - 3.1. Βιο – Αντιπαθογονικά σκευάσματα (βακτηρίων και μυκήτων)

Τα εντομοκτόνα, ακαρεοκτόνα και νηματοδοκτόνα με βάση την εξειδικευμένη βιολογική τους δράση διαχωρίζονται στις παρακάτω κατηγορίες:

1. Ενώσεις με πολλαπλή δράση στις κυτταρικές και φυσιολογικές λειτουργίες.
  - 1.1. Ανόργανες Ενώσεις
  - 1.2. Οργανικές ενώσεις πολλαπλής δράσης
2. Ενώσεις με εξειδικευμένη δράση στις κυτταρικές ή τις φυσιολογικές λειτουργίες
  - 2.1. Παρεμπόδιση του νευρικού συστήματος
  - 2.2. Παρεμπόδιση συστημάτων παραγωγής ενέργειας
  - 2.3. Παρεμπόδιση της βιοσύνθεσης των λιπιδίων
  - 2.4. Παρεμπόδιση της ανάπτυξης και εξέλιξης (Ρυθμιστές ανάπτυξης)
  - 2.5. Παρεμπόδιση της λειτουργίας του μυϊκού συστήματος
  - 2.6. Δράση στη συμπεριφορά των εντόμων και άλλων ζωικών εχθρών
  - 2.7. Συνθετικές ενώσεις με άγνωστο μηχανισμό δράσης
  - 2.8. Φυσικές ενώσεις με άγνωστο μηχανισμό δράσης
3. Βιο – Εντομοκτόνα
  - 3.1. Εντομοπαθογόνοι ιοί
  - 3.2. Εντομοπαθογόνα βακτήρια



- 3.3. Εντομοπαθογόνοι μύκητες
- 3.4. Εντομοπαθογόνα πρωτόζωα
- 3.5. Εντομοπαθογόνοι νηματώδεις
- 3.6. Παρασιτοειδή ή παράσιτα εντόμων
- 3.7. Αρπακτικά εντόμων και ακάρεων
- 4. Συνεργιστές εντομοκτόνων

Τέλος, τα ζιζανιοκτόνα με βάση την εξειδικευμένη βιολογική τους δράση τα στις ακόλουθες κατηγορίες:

- 1. Ζιζανιοκτόνα με πολλαπλή δράση στις κυτταρικές και φυσιολογικές λειτουργίες
  - 1.1. Ανόργανα ζιζανιοκτόνα
  - 1.2. Οργανικά ζιζανιοκτόνα πολλαπλής δράσης
- 2. Ζιζανιοκτόνα με εξειδικευμένη δράση στις κυτταρικές ή τις φυσιολογικές λειτουργίες
  - 2.1. Παρεμπόδιση της φωτοσύνθεσης και σχετικών με τη φωτοσύνθεση λειτουργιών
  - 2.2. Παρεμπόδιση της βιοσύνθεσης αμινοξέων
  - 2.3. Παρεμπόδιση της βιοσύνθεσης λιπαρών οξέων
  - 2.4. Παρεμπόδιση της διαίρεσης των κυττάρων
  - 2.5. Παρεμπόδιση της βιοσύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος
  - 2.6. Παρεμπόδιση της βιοσύνθεσης βιταμινών
  - 2.7. Δράση στο φυτοορμονικό σύστημα
  - 2.8. Ζιζανιοκτόνα με άγνωστο μηχανισμό δράσης
  - 2.9. Φυσικές ενώσεις ή ανάλογα φυσικών ενώσεων με ζιζανιοκτόνο δράση
- 3. Βιο – Ζιζανιοκτόνα
- 4. Αντιφυτοτοξικές ενώσεις (*Safeners*)

### **1.2.3. Τοξικότητα & Εκτίμηση επικινδυνότητας υπολειμμάτων Φ.Π.**

Τα **υπολείμματα φυτοπροστατευτικών προϊόντων** (*Pesticides residues*) είναι ουσίες ή μίγματα ουσιών που βρίσκονται στην τροφή των ανθρώπων ή των ζώων, ως αποτέλεσμα της χρήσης των Φ.Π.. Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται και οι ουσίες που είναι προϊόντα διάσπασης, μεταβολισμού ή χημικής αντίδρασης εφόσον είναι τοξικολογικά σημαντικές (FAO, 1981). Εκτός, όμως, από την παρουσία μιας ουσίας στο προϊόν, ενδιαφέρει το ποσό και η **τοξικότητα** (*Toxicity*) της. Η τοξικότητα των ουσιών διακρίνεται σε οξεία, υποξεία ή υποχρόνια και χρόνια. Η τοξικότητα μιας ουσίας είναι

μια ιδιότητά της, ενώ η βλάβη που μπορεί να προκαλέσει είναι θέμα χρήσης της ουσίας. Η εκτίμηση της τοξικότητας μιας ουσίας είναι ένα περίπλοκο θέμα που απαιτεί πολλές μελέτες. Επίσης, αξιοσημείωτο είναι ότι οι μέσες τιμές των υπολειμμάτων για ένα δείγμα μιας περιοχής επηρεάζονται από πολλούς παράγοντες, όπως η δόση, η μέθοδος εφαρμογής, η πυκνότητα φυτών και η θέση τους στο χώρο, το στάδιο ανάπτυξης, οι μετεωρολογικές συνθήκες κατά τη διάρκεια εφαρμογής του Φ.Π. καθώς και ο χρόνος από την εφαρμογή μέχρι τη δειγματοληψία (Ambrus, 1999).

Ως **επικινδυνότητα** (*Risk*) ορίζεται η πιθανότητα να συμβεί ένα επιβλαβές γεγονός ως αποτέλεσμα της έκθεσης σε ένα χημικό ή φυσικό παράγοντα υπό συγκεκριμένες συνθήκες, ή εναλλακτικά, η αναμενόμενη συχνότητα πρόκλησης ενός επιβλαβούς γεγονότος που θα προκύψει από την έκθεση σε έναν χημικό ή φυσικό παράγοντα υπό συγκεκριμένες συνθήκες. Στην περίπτωση που αναφερόμαστε στον **κίνδυνο** (*Hazard*) εννοούμε το σύνολο των ιδιοτήτων μιας ουσίας, ενός μίγματος ουσιών ή μιας διαδικασίας που περιλαμβάνει ουσίες οι οποίες υπό συνθήκες παραγωγής, χρήσης ή διάθεσης, είναι ικανές να προκαλέσουν δυσμενή αποτελέσματα στους οργανισμούς και στο περιβάλλον, ανάλογα με το βαθμό έκθεσής τους στις ουσίες αυτές.

Η **εκτίμηση της επικινδυνότητας** (*Risk assessment*) είναι ο προσδιορισμός και η ποσοτικοποίηση της, ως αποτέλεσμα της χρήσης ενός χημικού ή φυσικού παράγοντα, λαμβάνοντας υπόψη πιθανά επιβλαβή αποτελέσματα στα άτομα ενός πληθυσμού που εκτέθηκαν σε αυτό τον παράγοντα. Η εκτίμηση της επικινδυνότητας αποτελείται από τέσσερα στάδια:

1. Προσδιορισμός κινδύνου (*Hazard identification*)

Ποιες είναι οι ουσίες που πρέπει να μας ανησυχούν και ποια τα δυσμενή αποτελέσματά τους;

2. Χαρακτηρισμός κινδύνου (*Hazard characterization*)

Ποιά είναι η σχέση μεταξύ της δόσης και της επίδρασης; (καμπύλες δόσης – επίδρασης και δόσης – αντίδρασης)

3. Αξιολόγηση της έκθεσης (*Exposure assessment*)

Ποια είναι η ένταση και η διάρκεια ή η συχνότητα της έκθεσης σε έναν παράγοντα;

4. Χαρακτηρισμός επικινδυνότητας (*Risk characterization*)

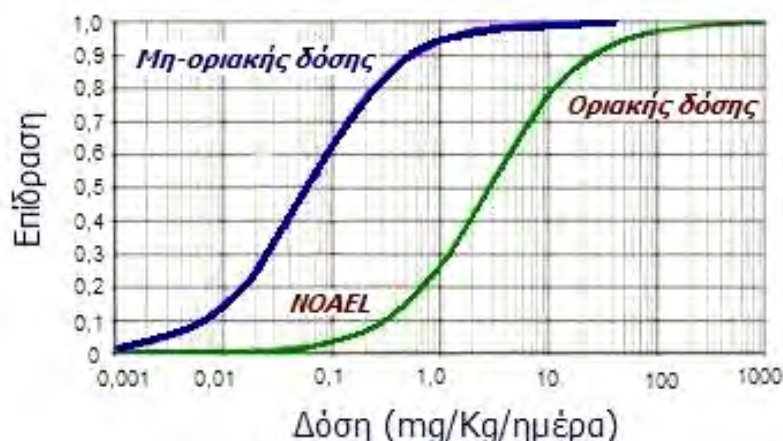
Πώς μπορεί κάποιος να ποσοτικοποιήσει την επικινδυνότητα με βάση τα ανωτέρω στοιχεία;

Μετά από την αξιολόγηση τοξικολογικών μελετών καθορίζονται οι ακόλουθες τρεις δόσεις αναφοράς για το χαρακτηρισμό του κινδύνου:

- Η **Αποδεκτή Ημερήσια Δόση** (*Acceptable Daily Intake – ADI*) ή Ανεκτή Ημερήσια Δόση (*Tolerance Daily Intake – TDI*) και ορίζεται ως η ημερήσια δόση δραστικής ουσίας (mg/ Kg σωματικού βάρους), η οποία χορηγούμενη καθημερινά για όλη τη ζωή του ενήλικα, δε φαίνεται να ενέχει κίνδυνο για την υγεία του.
- Η **Οξεία Δόση Αναφοράς** (*Acute Reference Dose – ARfD*): Η ημερήσια δόση δραστικής ουσίας, η οποία χορηγούμενη σε ένα γεύμα ή μια ημέρα, δε φαίνεται να ενέχει κίνδυνο για την υγεία του ανθρώπου.
- Το **Αποδεκτό Επίπεδο Έκθεσης Χειριστή** (*Acceptable Operator Exposure Level – AOEL*): Το ημερήσιο επίπεδο έκθεσης των ανθρώπων-χειριστών που δουλεύουν με Φ.Π. τακτικά (ημέρες, εβδομάδες ή και μήνες).

Ο καθορισμός της ADI είναι σχετικά δύσκολος, λόγω της αβεβαιότητας που υπάρχει στον καθορισμό της δόσης ή του επιπέδου που δεν επιφέρει κανένα παρατηρήσιμο αποτέλεσμα που να μπορεί να αξιολογηθεί εφαρμόζοντας όλες τις γνωστές τεχνικές της τοξικολογίας και προφανώς οι οποιεσδήποτε τιμές ADI θα ανανεώνονται σύμφωνα με τα νέα επιστημονικά δεδομένα (Παπαδοπούλου-Μουρκίδου, 1991<sup>α</sup>).

Υπάρχουν δύο ομάδες κινδύνου ανάλογα με το εάν μπορεί να προσδιορισθεί ένα **όριο-δόσης, κάτω από το οποίο δεν παρατηρείται καμία αρνητική επίδραση** (*Non-Observable Adverse Level – NOAEL*) (Εικόνα 1.1.). Η πρώτη ομάδα είναι οι **Επιδράσεις Οριακής Δόσης** (*Threshold effects*), όπου ο βιολογικός μηχανισμός δράσης απαιτεί την παρουσία συγκεκριμένου χημικού για τη διαταραχή των κανονικών βιολογικών διεργασιών και συνεπώς, η συσχέτιση δόσης – επίδρασης μπορεί να υποδείξει ένα NOAEL. Η αντιπροσωπευτική γραφική παράσταση αυτών των επιδράσεων είναι η **Καμπύλη Δόσης – Επίδρασης**, στην οποία απεικονίζεται η σχέση μεταξύ της δόσης και του μεγέθους της βιολογικής αλλαγής, που μετράται σε ανάλογες μονάδες. Ισχύει για μετρήσιμες αλλαγές που δίνουν μια βαθμονομημένη απάντηση στην αύξηση της δόσης ενός Φ.Π. ή ξενοβιοτικού. Οι βιολογικές επιδράσεις σε αυτή την περίπτωση είναι: αλλαγές στο βάρος του σώματος, στην πίεση του αίματος, η αυξημένη αναπνευστική δραστηριότητα, κ.α. Οι καμπύλες δόσεις – επίδρασης μελετούνται σε συνδυασμό με τη χρήση συντελεστών ασφαλείας, οι οποίοι κυμαίνονται από 100 – 1000. Συνήθως χρησιμοποιείται ένας παράγοντας 10 για κάθε παράγοντα διαφοροποίησης ή αβεβαιότητας, η οποία πηγάζει από τη διαφορετικότητα του είδους που μελετάται η επίδραση και την πληθυσμιακή ποικιλία των ανθρώπων.



**Εικόνα 1.1:** Καμπύλες μη-οριακής και οριακής δόσης επίδρασης.

Η δεύτερη ομάδα κινδύνου είναι οι **επιδράσεις μη-οριακής δόσης** (*Non-threshold effects*), όπως οι βιολογικές δράσεις της γενετικής τοξικότητας και της καρκινογένεσης, για τις οποίες δε μπορεί να οριστεί ένα όριο βασιζόμενο σε ένα βιολογικό μηχανισμό δράσης. Αντιπροσωπευτική γραφική παράσταση αυτής της περίπτωσης είναι η *Καμπύλη δόσης – αντίδρασης*, στην οποία απεικονίζεται η σχέση μεταξύ της δόσης και του ποσοστού των ατόμων που δέχονται μια οριστική επίδραση. Ουσιαστικά, είναι η γραφική παράσταση της πιθανότητας ενός περιστατικού σε σχέση με τη δόση. Όσο πιο ισχυρή είναι η επίδραση μιας ουσίας στον οργανισμό τόσο πιο απότομη η κλίση της ευθείας, και στις δύο ομάδες κινδύνου.

Τα καρκινογόνα διαχωρίζονται σε **γενotoξικά** (*Genotoxins*) και **μη-γενotoξικά** ή **επιγενετικά** (*Nongenotoxins*). Μια άλλη κατηγορία καρκινογόνων είναι τα **co-carcinogens**, τα οποία είναι χημικά που προκαλούν καρκινογένεση μόνο στην περίπτωση συνδυασμού τους με άλλες ουσίες και όχι από μόνα τους. Χαρακτηριστικά παραδείγματα γενotoξικών καρκινογόνων είναι η μυκοτοξίνη Αφλατοξίνη Β, το *captafol* και το *propiconazol*. Τα καρκινογόνα αυτής της κατηγορίας ανήκουν στην ομάδα κινδύνου των επιδράσεων μη-οριακής δόσης, διότι προκαλούν γενετικές καταστροφές και μεταλλάξεις, σε αντίθεση με τα επιγενετικά καρκινογόνα που στις 99 περιπτώσεις από τις 100 μιλάμε για NOAEL, λόγω του ότι δρουν μέσω αποσυντονισμού κάποιας άλλης διεργασίας, π.χ. επαγωγή κυτοχρώματος, αποσυντονισμού ενζύμων επιδιόρθωσης κ.λπ., και όχι μέσω άμεσης επίδρασης με το γενετικό υλικό. Σε αυτή την κατηγορία των καρκινογόνων ανήκουν οι ορμόνες και οι περισσότερες οργανικές ενώσεις. (Rakitsky *et al.*, 2000)

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

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

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

Για τον καθορισμό του MRL ενός Φ.Π. σε κάποιο γεωργικό προϊόν λαμβάνεται υπόψη η τιμή της ADI, το βάρος του ανθρώπου και το ποσοστό συμμετοχής του προϊόντος στην καθημερινή διαίτα ενός λαού ή μιας ομάδας του πληθυσμού, θεωρώντας ότι ο μέσος όρος ισχύει για το κάθε άτομο. Λαμβάνοντας υπόψη το ποσοστό συμμετοχής της τομάτας π.χ. στη διαίτα των Ελλήνων και των Γερμανών, τα MRLs θα έπρεπε να καθοριστούν σε διαφορετικό ύψος, αφού ο ελληνικός λαός καταναλώνει πολύ μεγαλύτερες ποσότητες τομάτας και μάλιστα καθ' όλη τη διάρκεια του έτους.

Επίσης, ο **βιολογικός έλεγχος** (*Biomonitoring*) μπορεί να δώσει μια καλή ένδειξη της έκθεσης του ανθρώπου σε Φ.Π. όπως οι **ενδοκρινικοί διαταράκτες** (*Endocrine Disruption Chemicals – EDCs*) οι οποίοι επιδρούν σε δόσεις πολύ μικρότερες από αυτές που δίνει η κλασική τοξικολογία και δεν υπολογίζονται στους τρέχοντες κανονισμούς και μελέτες επικινδυνότητας. (Mc Kinlay *et al.*, 2008) Ο βιολογικός έλεγχος είναι η ανίχνευση **βιολογικών δεικτών** (*Biomarkers*) σε βιολογικά δείγματα, όπως αίμα, ούρα, μητρικό γάλα ή ιστούς για να αξιολογηθεί η έκθεση και η επικινδυνότητα για την υγεία, συγκρίνοντας τα αποτελέσματα με επίπεδα αναφοράς. Οι βιολογικοί δείκτες μπορεί να είναι δύο ειδών. Οι **βιολογικοί δείκτες έκθεσης** (*Biomarkers of exposure*), ανίχνευση χημικών ουσιών και μεταβολιτών τους, και οι **βιολογικοί δείκτες επίδρασης** (*Biomarkers*

*of response*), ανίχνευση βιολογικών αντιδράσεων. (Becker *et al.*, 2003 & Angerer *et al.*, 2007)

Τέλος, ο χαρακτηρισμός της επικινδυνότητας είναι η ποιοτική και ποσοτική εκτίμηση της επικινδυνότητας, συμπεριλαμβανομένων των συνοδευτικών αβεβαιοτήτων, της πιθανότητας της έκθεσης και της δυνατότητας δυσμενών επιπτώσεων στην υγεία ενός συγκεκριμένου πληθυσμού. Στην περίπτωση αυτή γίνεται ταυτόχρονη εξέταση ουσιών που έχουν τα ίδια τοξικολογικά χαρακτηριστικά και τον ίδιο τοξικολογικό μηχανισμό δράσης στον άνθρωπο, ανεξάρτητα από το μηχανισμό δράσης τους προς τους «πραγματικούς τους στόχους». Ο χαρακτηρισμός της επικινδυνότητας γίνεται με τον υπολογισμό του **δείκτη κινδύνου** (*Hazard Index – HI*), του **συνολικού δείκτη επικινδυνότητας** (*Cummulative Risk Index – CRI*), του **δείκτη σημείου αναφοράς** (*Reference Point Index – RPI* ή *Point of Departure Index – PODI*), καθώς επίσης και άλλων παραμέτρων. (Seed *et al.*, 1995, Wilkinson *et al.*, 1999 & Boobis *et al.*, 2008)

Με βάση τα όσα αναπτύχθηκαν σε αυτό το κεφάλαιο διαπιστώνουμε ότι η ανάλυση και ο προσδιορισμός των υπολειμμάτων Φ.Π., τόσο σε τρόφιμα όσο και σε περιβαλλοντικά δείγματα, είναι ένα από τα σημαντικά θέματα μελέτης. Το πώς γίνεται η ανάλυση, ο προσδιορισμός και το ποιες μέθοδοι χρησιμοποιούνται για αυτό, είναι θέματα τα οποία θα συζητηθούν στο επόμενο κεφάλαιο.

## 2. Υπολείμματα Φ.Π. & Μέθοδοι προσδιορισμού τους

### 2.1. Προσδιορισμός υπολειμμάτων Φ.Π.

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

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

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

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

- ✓ Δειγματοληψία.
- ✓ Επεξεργασία και αποθήκευση.
- ✓ Προετοιμασία αναλυτικού δείγματος.
- ✓ Επιλογή αναλυτικής μεθόδου.
- ✓ Εφαρμογή αναλυτικής μεθόδου.
- ✓ Διασφάλιση ποιότητας των αναλυτικών μετρήσεων.

#### 2.1.1. Δειγματοληψία

Η παραγωγή μιας καλλιέργειας ελέγχεται δειγματοληπτικά, αφού είναι αδύνατο να ελεγχθεί στο σύνολό της. Η δειγματοληψία από κάθε πειραματικό τεμάχιο για να είναι αντιπροσωπευτική της συνολικής παραγωγής θα πρέπει να διεξαχθεί σύμφωνα με τις

οδηγίες των FAO/WHO (*Codex Alimentarius Commission CAC/GL 33-1999*). Είναι τυχαία, έτσι ώστε να δίνεται η ευκαιρία σε όλα τα φυτά της παραγωγής να αποτελέσουν μέλη του δείγματος εφόσον η εκλογή τους γίνει αντικειμενικά, χωρίς προκατάληψη και χωρίς υποκειμενικότητα. Κατά τη δειγματοληψία πρέπει να λαμβάνεται επαρκής ποσότητα γεωργικού προϊόντος προκειμένου να χρησιμοποιηθεί για τη διαδικασία του αναλυτικού ελέγχου.

Σε πειράματα αγρού (*Field trials*) ο «μάρτυρας», δηλαδή δείγμα από τεμάχιο που δεν έγινε επέμβαση με Φ.Π., πρέπει να λαμβάνεται σε επαρκή ποσότητα κάθε φορά που γίνεται δειγματοληψία και να μη γίνεται δειγματοληψία από τα περιθώρια του πειραματικού τεμαχίου του μάρτυρα, έτσι ώστε να αποφευχθούν επιμολύνσεις από γειτονικά τεμάχια. Στην αναλυτική διαδικασία ως δείγμα μάρτυρα μπορεί να χρησιμοποιηθεί γεωργικό προϊόν απαλλαγμένο από τα προς ανάλυση Φ.Π. (μόρια στόχοι – *Target compounds*) ή γεωργικό προϊόν βιολογικής καλλιέργειας.

Οι γενικοί κανόνες που ισχύουν για τη λήψη όλων των δειγμάτων είναι:

- Επιλογή απόλυτα υγιών φυτών ή τμημάτων αυτών (καρπών, φύλλων, κ.λπ.) με κανονική ανάπτυξη, όπως ακριβώς θα συγκομιζόταν για κατανάλωση.
- Αποφυγή απομάκρυνσης των επιφανειακών υπολειμμάτων των Φ.Π. (σκούπισμα, πλύσιμο κ.λπ.) κατά τη λήψη ή συσκευασία των δειγμάτων.
- Λήψη επαρκούς ποσότητας για όλες τις πιθανές επαναλήψεις των αναλύσεων στο εργαστήριο.
- Αποφυγή επιμόλυνσης των δειγμάτων κατά τη λήψη και μεταφορά.

Για το σκοπό αυτό πρέπει να χρησιμοποιούνται απολύτως καθαρά εργαλεία (ψαλίδια, μαχαίρια), να αποφεύγεται η επαφή των δειγμάτων με χέρια ή ρούχα που ήρθαν σε επαφή με Φ.Π., τα δείγματα να μην εκτίθενται σε ακραίες καιρικές συνθήκες και να μην μεταφέρονται μαζί με σκευάσματα Φ.Π.

Ειδική προσοχή πρέπει να δίνεται στη συλλογή των δειγμάτων του μάρτυρα, τα οποία πρέπει να λαμβάνονται πριν από τα άλλα δείγματα, έτσι ώστε να αποφεύγεται η επιμόλυνση τους από τα εργαλεία ή τα χέρια.

### **2.1.2. Επεξεργασία δειγμάτων και Αποθήκευση**

Αντιπροσωπευτικό μέρος του δείγματος, που προκύπτει από το αρχικό δείγμα με την τεχνική της συνεχούς μείωσης με τεταρτημόρια, στο εργαστήριο ομογενοποιείται και μέρος του μεταφέρεται σε ειδικά σακουλάκια (αναλυτικό δείγμα), τα οποία αποθηκεύονται σε καταψύκτες σε θερμοκρασία -22°C. Στην αποθήκευση η αποδόμηση



των φυτοπροστατευτικών προϊόντων πραγματοποιείται με εξαιρετικά χαμηλή ταχύτητα. Πρέπει να επισημανθεί ότι τα δείγματα πρέπει να αναλύονται το ταχύτερο δυνατό μετά τη συλλογή τους, ώστε να αποφευχθούν φυσικές και χημικές μεταβολές.

### 2.1.3. Επιλογή αναλυτικής μεθόδου

Ο έλεγχος των γεωργικών προϊόντων για την ύπαρξη υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων απαιτεί την ύπαρξη κατάλληλων εργαστηρίων εξειδικευμένων στη χημική ανάλυση ανίχνευσης και προσδιορισμού υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων στα τρόφιμα, την ύπαρξη εξειδικευμένου επιστημονικού και τεχνικού προσωπικού και τέλος, την επιλογή της κατάλληλης αναλυτικής μεθόδου προσδιορισμού υπολειμμάτων. Για την επιλογή αυτή (Μηλιάδης, 1998) λαμβάνεται υπόψη:

- Η διεθνής βιβλιογραφία, δηλαδή οι μέθοδοι που έχουν αναπτυχθεί στο συγκεκριμένο αντικείμενο.
- Η δυνατότητα που παρέχει η μέθοδος για ταυτόχρονο προσδιορισμό περισσότερων της μιας ουσιών.
- Η ικανότητα της μεθόδου για προσδιορισμό ουσιών σε συγκεντρώσεις αρκετά μικρότερες από το ανώτατο επιτρεπτό όριο (MRL).
- Η ικανότητα προσαρμογής της μεθόδου σε ένα μέσο εργαστήριο ανάλυσης υπολειμμάτων εφοδιασμένο με όργανα ρουτίνας.
- Ο σκοπός της ανάλυσης, αν δηλαδή η ανάλυση γίνεται για έλεγχο, έρευνα, επιβολή κυρώσεων κ.α. καθώς και οι απαιτήσεις για ταχύτητα ή ακρίβεια.

### 2.1.4. Αναλυτική μεθοδολογία

Η όλο αυξανόμενη σημασία της γνώσης των υπολειμμάτων στις τροφές έχει επιφέρει εντυπωσιακή εξέλιξη στις τεχνικές και τη μεθοδολογία της ενόργανης χημικής ανάλυσης. Οι μέθοδοι προσδιορισμού των υπολειμμάτων διακρίνονται σε **πολυδύναμες ή πολυϋπολειμματικές** (*Multi-residue methods*) και **ειδικές ή μονοϋπολειμματικές** (*Specific methods*). Οι πολυδύναμες ή πολυϋπολειμματικές αναπτύχθηκαν για να διευκολύνουν τον έλεγχο ρουτίνας (*Monitoring*) των φυτοπροστατευτικών προϊόντων και να επιτρέπουν τον ταυτόχρονο προσδιορισμό πολλών μορίων Φ.Π. (μέχρι και 200). Με τις μεθόδους αυτές προσδιορίζονται κυρίως Φ.Π. της ίδιας οικογένειας, όπως οργανοφωσφορικά, οργανοχλωριωμένα κ.α., αλλά και άλλων ομάδων αναλόγων των

χρησιμοποιούμενων χρωματογραφικών ανιχνευτών. Είναι χρήσιμες για προκαταρκτικό έλεγχο των Φ.Π. (*Screening*) αλλά, από μόνες τους δεν επαρκούν για την επισημάνση και τον προσδιορισμό του συνολικού φορτίου σε υπολείμματα ενός δείγματος. Συχνά χρειάζεται εφαρμογή δύο ή και περισσότερων πολυδύναμων μεθόδων ιδιαίτερα για μόρια τα οποία η ανάλυσή τους απαιτεί ξεχωριστές χρωματογραφικές τεχνικές (αέρια, υγρή χρωματογραφία). Τα τελευταία χρόνια με την ανάπτυξη της συζευγμένης χρωματογραφίας με φασματομετρία μάζας (GC-MS ή LC-MS) έχουν αυξηθεί εντυπωσιακά οι δυνατότητες των πολυδύναμων μεθόδων τόσο στον αριθμό των μορίων όσο και στην ταυτοποίησή τους, ώστε να αναφέρονται στη βιβλιογραφία μέθοδοι για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό έως και 500 μορίων παρασιτοκτόνων ουσιών (Alder *et al*, 2006).

Για τις ουσίες που δεν είναι δυνατόν να προσδιοριστούν με κάποια πολυδύναμη μέθοδο, απαιτείται η χρήση εξειδικευμένων ή μονοϋπολειμματικών μεθόδων που είναι τόσες, όσες και τα Φ.Π. που προσδιορίζουν. Οι μέθοδοι προσδιορισμού υπολειμμάτων περιλαμβάνουν σε γενικές γραμμές τις ακόλουθες φάσεις:

## **1. Προετοιμασία των δειγμάτων**

Σε ειδική οδηγία της Ε.Ε. ορίζεται το μέρος του γεωργικού προϊόντος στο οποίο αναφέρονται τα MRL<sub>S</sub> και επομένως το μέρος στο οποίο πρέπει να γίνει η ανάλυση. Στις περισσότερες περιπτώσεις τα MRL<sub>S</sub> αναφέρονται σε ολόκληρα προϊόντα, όπως αυτά κυκλοφορούν στο εμπόριο, για παράδειγμα όλο το πορτοκάλι ή το μήλο και όχι καθαρισμένα.

Το δείγμα που φτάνει στο εργαστήριο και πρέπει να είναι αντιπροσωπευτικό του αρχικού φορτίου, υφίσταται μείωση και ομογενοποιείται με εργαστηριακούς ομογενοποιητές. Από το ομογενοποιημένο δείγμα λαμβάνεται εις διπλούν μια μικρή ποσότητα που προορίζεται για ανάλυση (αναλυτικό δείγμα) και μια ανάλογου βάρους ποσότητα αποθηκεύεται στον καταψύκτη ως αντιδείγμα. Η ποσότητα του δείγματος που αποθηκεύεται είναι συνήθως 10-50 g.

## **2. Εκχύλιση του δείγματος**

Η εκχύλιση είναι η φάση κατά την οποία τα Φ.Π. λαμβάνονται από τους φυτικούς ιστούς με κατάλληλα εκχυλιστικά διαλύματα. Η επιλογή των εκχυλιστικών μέσων είναι καθοριστικής σημασίας για την επιτυχία της ανάλυσης. Επιδίωξη είναι, το εκχυλιστικό μέσο που θα χρησιμοποιηθεί να διαθέτει μεγάλη εκχυλιστική ικανότητα, ώστε να μπορεί

να «βγάλει» τα μόρια των Φ.Π. από τους ιστούς, παράλληλα όμως να είναι αρκετά εκλεκτικό για να αποφεύγεται η εκχύλιση ανεπιθύμητων ουσιών από το υπό μελέτη υποστρώμα (το προς ανάλυση προϊόν), ώστε το εκχύλισμα να είναι όσο το δυνατόν πιο καθαρό. Έτσι, η επιλογή της διεργασίας εκχύλισης των ξενοβιοτικών παρασιτοκτόνων ουσιών στα διάφορα υποστρώματα απαιτεί την προσεκτική μελέτη των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των αναλυτών, σε συνδυασμό με τη σύσταση του υποστρώματος. Οι περισσότερες φυτικές ουσίες είναι πολικές, με εξαίρεση τους κηρούς και τα έλαια. Ο κατάλληλος διαλύτης που θα χρησιμοποιηθεί, είναι εκείνος που θα έχει συγγενείς ιδιότητες και κυρίως παρόμοια πολικότητα με το υπό μελέτη Φ.Π.. Ισχύει η γενίκευση «όμοια ομοίως διαλύονται» (*Like dissolves likes*).

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

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

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

- ✓ Έλλειψη αντίδρασης μεταξύ του διαλύτη και των Φ.Π.
- ✓ Η πολικότητα των προς προσδιορισμό Φ.Π.
- ✓ Η διαλυτότητα των Φ.Π. στους διάφορους διαλύτες.
- ✓ Ο τύπος του προς ανάλυση δείγματος.

- ✓ Η τοξικότητα του διαλύτη.
- ✓ Η πτητικότητα του διαλύτη.
- ✓ Η καθαρότητα του διαλύτη
- ✓ Ο τύπος της μεθόδου (ειδική ή πολυϋπολειμματική).

## **2.1. Τεχνικές εκχύλισης**

### **2.1.1. Εκχύλιση υγρού/ υγρού (*Liquid/ Liquid Extraction – LLE*)**

Η εκχύλιση αυτού του τύπου είναι μια από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους παραλαβής των υπολειμμάτων από τα διάφορα περιβαλλοντικά και διατροφικά υποστρώματα. Αποτελεί την επίσημη μέθοδο εκχύλισης σε πολλά πρωτόκολλα αναλυτικών εργαστηρίων. Στηρίζεται στην κατανομή των χημικών ουσιών με βάση τη διαφορετική διαλυτότητά τους σε ένα σύστημα δύο πρακτικά μη αναμιγνυόμενων υγρών. Διακρίνεται σε συνεχή εκχύλιση, όπου το δείγμα εκχυλίζεται με τη συσκευή *Soxhlet*, και σε ασυνεχή εκχύλιση, όπου το δείγμα εκχυλίζεται με επαναληπτικές δόσεις διαλύτη με μηχανική ανάδευση ή συσκευή υπερήχων. Η υψηλή εκλεκτικότητά της και η ευρεία χρήση της στην απομόνωση διαφορετικών Φ.Π. με μεγάλο εύρος φυσικοχημικών ιδιοτήτων, την κάνουν να βρίσκει ευρεία εφαρμογή παρά τα μειονεκτήματά της, τα οποία είναι το σχετικά υψηλό της κόστος και το ότι είναι χρονοβόρα. Το μειονέκτημα όμως του υψηλού κόστους της χρήσης μεγάλων όγκων δείγματος και διαλυτών και του επακόλουθου κινδύνου επιμολύνσεων οδήγησε σε βελτιωμένη έκδοση της τεχνικής, την υγρού/υγρού μικροεκχύλιση (*Liquid/Liquid Microextraction – LLME*), η οποία είναι και πιο φιλική στο περιβάλλον, αφού χρησιμοποιούνται μικρότερες ποσότητες οργανικών διαλυτών (μL ή mL) και δείγματος (1.5 – 10 mL). (Αμβράζης, 2007)

### **2.1.2. Εκχύλιση στερεού/ υγρού (*Solid/ Liquid Extraction – SLE*)**

Η εκχύλιση αυτού του τύπου περιλαμβάνει την εκχύλιση του ομογενοποιημένου στερεού δείγματος με τον οργανικό διαλύτη και όπως η LLE διακρίνεται και αυτή σε συνεχή και ασυνεχή. Στην περίπτωση της συνεχούς εκχύλισης το δείγμα εκχυλίζεται με τη συσκευή *Soxhlet*, όπου το προς εκχύλιση δείγμα (5.0 – 50 g) τοποθετείται στον εκχυλιστήρα της συσκευής και εκχυλίζεται με οργανικό διαλύτη (100 – 200 mL) για 4 έως 18 ώρες. Στην ασυνεχή εκχύλιση το εξεταζόμενο δείγμα εκχυλίζεται διαδοχικά έως την ποσοτική λήψη των Φ.Π.. Παρά το ότι είναι μια χρονοβόρα διαδικασία εκχύλισης, βρίσκει ευρεία εφαρμογή διότι επιτυγχάνονται υψηλές ανακτήσεις (Pensado *et al.*, 2005).

Η πιο εξελιγμένη τεχνική της εκχύλισης στερεού/υγρού είναι η εκχύλιση με μηχανική ανάμιξη σε υψηλές ταχύτητες (*Blending*) ή με τη χρήση υπερήχων (*Sonication*), που βρίσκει ευρεία εφαρμογή στην ανάλυση υπολειμμάτων στα στερεά τρόφιμα και τα εδαφικά δείγματα. Η εκχύλιση περιλαμβάνει ομογενοποίηση του δείγματος με οργανικό διαλύτη (συνήθως ακετόνη ή ακετονιτρίλιο) και μηχανική ανάδευση σε αναμικτήρα (*Mixer*) υψηλών ταχυτήτων ή χρήση υπερήχων. Για να πετύχουμε ικανοποιητική εκχύλιση χρησιμοποιούμε ομογενοποιητή μεγάλων ταχυτήτων (4000 – 5000 στροφές/λεπτό), ενώ το δοχείο εκχύλισης (που είναι συνήθως μεταλλικό) βρίσκεται μέσα σε υδατόλουτρο ψύξης για την αποφυγή υψηλών θερμοκρασιών. Η εκχύλιση των φυτικών ιστών πραγματοποιείται είτε σε κλειστά δοχεία τύπου «*Omni mixer*» είτε σε ανοικτά, τύπου «*Ultra turax*». Ο Mills και οι συνεργάτες του ήταν αυτοί που εφάρμοσαν αυτή την τεχνική χρησιμοποιώντας 100 g ομογενοποιημένου δείγματος και 200 mL ακετονιτρίλιο, ενώ οι Luke *et al.*, εφάρμοσαν την ίδια τεχνική χρησιμοποιώντας 100 g ομογενοποιημένου δείγματος και 200 mL ακετόνης. Ο Bertuzzi και οι συνεργάτες του εφάρμοσαν την τεχνική όπως ο Mills χρησιμοποιώντας όμως 20 – 25 g δείγματος και 350 mL διαλύματος 35% νερό-ακετονιτρίλιο (Zweig and Sherma, 1986). Σήμερα, η τεχνική εφαρμόζεται με μικρότερες ποσότητες δείγματος και οργανικών διαλυτών, επιβαρύνοντας έτσι λιγότερο και το περιβάλλον. Επειδή η ακετόνη, όπως και το ακετονιτρίλιο είναι διαλύτες οι οποίοι αναμιγνύονται με το νερό, στην πράξη ο πραγματικός διαλύτης εκχύλισης είναι το μίγμα ακετόνης-νερού ή ακετονιτρίλιου-νερού. Στη συνέχεια, οι προς ανάλυση ενώσεις κατανέμονται σε άπολο διαλύτη με υγρού/ υγρού εκχύλιση.

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

### **2.1.3. Εκχύλιση με μικροκύματα (*Microwave Assisted Extraction – MAE*)**

Σε αυτή τη μέθοδο εκχύλισης το προς ανάλυση δείγμα αναμιγνύεται με τον οργανικό διαλύτη και ακτινοβολείται σε συμβατικό φούρνο μικροκυμάτων, χωρίς όμως το αιώρημα να φτάσει στο σημείο βρασμού του. Η ακτινοβολήση συνήθως γίνεται για 30 sec σε συχνότητα 2450 Hz και επαναλαμβάνεται μερικές φορές για να επιτευχθούν οι μέγιστες ανακτήσεις της εκχυλιζόμενης ουσίας. Το πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ο μικρός χρόνος εκχύλισης με αποδόσεις ανάλογες των κλασικών μεθόδων εκχύλισης με

οργανικούς διαλύτες. Χρησιμοποιείται περισσότερο στην ανάλυση Φ.Π. σε εδάφη. (Camel, 2000 and Kaufmann & Christen, 2002)

#### **2.1.4. Επιταχυνόμενη εκχύλιση με διαλύτη (*Accelerated Solvent Extraction – ASE*)**

Η επιταχυνόμενη εκχύλιση με διαλύτη ή εκχύλιση με διαλύτη υπό πίεση (*Pressurized Solvent Extraction – PSE*) εφαρμόζεται από το 1995. Το κύριο χαρακτηριστικό αυτής της μεθόδου είναι οι συνθήκες υψηλής πίεσης και θερμοκρασίας που επικρατούν κατά την εκχύλιση. Οι υψηλές πιέσεις εξασφαλίζουν την αποτελεσματική διείσδυση του διαλύτη στους πόρους του δείγματος, ενώ οι υψηλές θερμοκρασίες αυξάνουν το ρυθμό διάχυσης, τη μεταφορά μάζας και τη διαλυτότητα των υπό εξέταση ενώσεων και μειώνουν το ιξώδες και την επιφανειακή τάση των διαλυτών, μειώνοντας έτσι κατά πολύ τους όγκους εκχύλισης των διαλυτών (Ahmed, 2001 and Dean, 1998). Χρησιμοποιούνται διαλύτες μεγάλου εύρους πολικότητας, καθώς και μίγματα αυτών, και παρέχεται η δυνατότητα χρήσης μεγάλου εύρους πιέσεων (5.0 – 200 Atm) και θερμοκρασιών (από θερμοκρασίες δωματίου έως 200 °C). Η ASE έχει χρησιμοποιηθεί για ταυτόχρονη εκχύλιση και καθαρισμό (*Clean-up*) του δείγματος, χρησιμοποιώντας ως υλικό καθαρισμού τον γραφίτη (*Graphitized carbon*), στον προσδιορισμό Φ.Π. σε φυλλώδη λαχανικά με τη χρήση αέριας χρωματογραφίας και φασματομετρίας μάζας (Tanaka *et al.*, 2007). Έχει όμως και ευρύτερες εφαρμογές, όπως η εκχύλιση αντιοξειδωτικών ουσιών από το *Spirulina platensis* (Herrero *et al.*, 2005).

#### **2.1.5. Εκχύλιση υπερκρίσιμου σημείου (*Supercritical Fluid Extraction – SFE*)**

Μια διαχρονική τεχνική η οποία συγκεντρώνει όλο και περισσότερο το ενδιαφέρον των αναλυτών υπολειμμάτων, λόγω της υψηλής εκλεκτικότητας που παρουσιάζει και της χρήσης πολύ μικρών όγκων διαλυτών. Στην εκχύλιση αυτού του τύπου χρησιμοποιούνται ρευστά σε υπερκρίσιμη κατάσταση, συνήθως διοξείδιο του άνθρακα (CO<sub>2</sub>) λόγω της χαμηλής θερμοκρασίας (31 °C) και πίεσης (72.8 Atm) κρίσιμου σημείου, τα οποία παρουσιάζουν παρόμοια πυκνότητα με τους υγρούς διαλύτες, αλλά έχουν χαμηλότερο ιξώδες και υψηλότερους συντελεστές διάχυσης. Ο συνδυασμός των προαναφερθέντων ιδιοτήτων οδηγούν στην αποτελεσματικότερη και ταχύτερη εκχύλιση των αναλυτών σε σχέση με την εκχύλιση που γίνεται με τους υγρούς διαλύτες. Σε σύγκριση με την εκχύλιση σε στερεά προσροφητικά υλικά έχει το πλεονέκτημα του ενός βήματος στην πειραματική πορεία εκχύλισης. Τα εκχυλίσματα τα οποία λαμβάνονται είναι σχετικά καθαρά και το πλεονέκτημα του μικρού εκχυλιστικού όγκου μπορεί να

θεωρηθεί και μειονέκτημα στην περίπτωση που απαιτείται να αναλυθούν μεγαλύτερες ποσότητες δείγματος (Camel, 1998, Dean, 1998 and Ahmed, 2001).

#### **2.1.6. Εκχύλιση δια της στερεάς φάσης (*Solid Phase Extraction – SPE*)**

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

Ο Snyder (1964) τη χαρακτηρίζει ως γενική τάξη μετασχηματισμών φάσεων ή διαδικασία μοριακής κατανομής. Το χρωματογραφικό σύστημα αποτελείται από μια στατική φάση (προσροφητικό), η οποία είναι ένα στερεό υλικό επιφανειακά ενεργό, και μια κινητή φάση (διαλύτης έκλουσης), που αποτελείται από οργανικό διαλύτη ή μίγμα αυτών. Ο διαχωρισμός των ενώσεων στηρίζεται στη διαφορετική ικανότητα κατακράτησης των ουσιών πάνω στην επιφάνεια του προσροφητικού. Τα υλικά που χρησιμοποιούνται στη SPE είναι είτε μικροστήλες, οι οποίες περιέχουν κατάλληλο χρωματογραφικό υλικό (*C-18, Diol, Silica, Florisil*), είτε δίσκοι εκχύλισης στους οποίους το χρωματογραφικό υλικό είναι με μορφή μεμβράνης ενσωματωμένης πάνω σε ένα δίκτυο μικροϊνιδίων πολυτετραφθοροαιθυλενίου (*PTFE*).

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

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

Για τη σωστή επιλογή του προσροφητικού υλικού θα πρέπει να γίνεται μελέτη της φυσικοχημείας του συστήματος και να λαμβάνονται υπόψη διάφοροι παράμετροι, όπως

οι χαρακτηριστικές ομάδες των αναλυτών, η φύση του προσροφητικού υλικού, οι ενέργειες των σχηματιζόμενων δεσμών, οι δευτερεύουσες επιδράσεις και η αλληλεπίδραση του προσροφητικού και των προς ανάλυση ενώσεων με τα υπόλοιπα συστατικά του υποστρώματος (Masque *et al.*, 1998).

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

- **Προετοιμασία του προσροφητικού υλικού (Conditioning).** Μικρή ποσότητα οργανικού διαλύτη διέρχεται μέσω της μικροστήλης ή του δίσκου εκχύλισης. Ένα μέρος αυτής της ποσότητας προσροφάται στην επιφάνεια του προσροφητικού υλικού και την καθιστά πιο συμβατή με το διάλυμα του δείγματος, έτσι ώστε να επιτυγχάνεται καλύτερη επιφανειακή επαφή. Με αυτή τη διαδικασία απομακρύνονται και ξένες προς την ανάλυση οργανικές ουσίες οι οποίες βρίσκονται προσροφημένες στο στρώμα του προσροφητικού (Mayer *et al.*, 1994, Thurman *et al.*, 1998).
- **Εκχύλιση.** Το προς ανάλυση δείγμα διέρχεται από τη μικροστήλη ή το δίσκο εκχύλισης, με εφαρμογή πίεσης ή κενού. Στο στάδιο αυτό θα πρέπει ο ρυθμός της ροής να διατηρείται κατά το δυνατό σταθερός.
- **Εκπλωση.** Σκοπός αυτής της διαδικασίας είναι η απομάκρυνση των παρεμποδιστικών ουσιών, που πιθανόν να υπάρχουν, χωρίς όμως να γίνει έκλυση των αναλυτών.
- **Έκλυση.** Κατάλληλος όγκος οργανικού διαλύτη ή μίγμα διαλυτών διέρχεται από τη μικροστήλη ή το δίσκο εκχύλισης με σκοπό την ποσοτική εκρόφιση των αναλυτών και τη μεταφορά τους στην υγρή φάση. Η επιλογή του διαλύτη έκλυσης καθορίζεται από τη φύση του ίδιου του διαλύτη και της προς εκρόφιση ένωσης. Ο συντελεστής κατανομής θα πρέπει να ευνοεί τη μεταφορά του αναλύτη στο διαλύτη έκλυσης.

Οι κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν την απόδοση της εκχύλισης δια της στερεάς φάσης είναι η φύση του δείγματος, ο όγκος και το pH του δείγματος. Όταν αναφερόμαστε στη φύση του δείγματος εννοούμε τα ποσοστά του διαλυμένου οργανικού άνθρακα στο δείγμα, στον οποίο οφείλονται μερικές από τις μειωμένες ανακτήσεις, και την παρουσία αιωρούμενων στερεών, όπως οι χουμικές και φουλβικές ενώσεις στο νερό. Η επίδραση από τις χουμικές και φουλβικές ενώσεις μπορεί να περιοριστεί με τη χρήση πολυμερών προσροφητικών υλικών (Barcelo and Hennion, 1997). Όσον αφορά τον όγκο του δείγματος, όταν πρόκειται για περιβαλλοντικά δείγματα, η εκχύλιση μεγάλου όγκου είναι



απαραίτητη προκειμένου να είναι εφικτή η ανίχνευση ενώσεων που βρίσκονται σε ίχνη. Η ρύθμιση του pH στη συγκεκριμένη τεχνική είναι πολύ σημαντική και θα πρέπει να γίνεται με γνώμονα τόσο τη φύση των εκχυλιζόμενων ουσιών, όσο και τη χημική σύνθεση της στερεάς φάσης του προσροφητικού υλικού, διότι πολλά προσροφητικά υλικά είναι ασταθή σε ακραίες τιμές pH. Ανάλογα προς τον τύπο της εκχύλισης, η επίδραση του pH είναι πιο σημαντική κατά την εκχύλιση με ιοντοανταλλαγή και την εκχύλιση μέσω αντίστροφης φάσης (Pichon, 2000, Carson, 2000).

#### **2.1.7. Μικροεκχύλιση δια της στερεάς φάσης (*Solid Phase Microextraction – SPME*)**

Η μικροεκχύλιση δια της στερεάς φάσης είναι μια τεχνική η οποία αναπτύχθηκε από τον Pawlitzyn και τους συνεργάτες του (Berlardi and Pawlitzyn, 1989). Τα βασικά βήματα της συγκεκριμένης τεχνικής είναι τα ακόλουθα:

- Προσρόφηση των Φ.Π. στο υλικό ενός πολυμερικού υμενίου με τη μορφή ίνας, το οποίο είτε εμβαπτίζεται μέσα στο διάλυμα (*Direct SPME*), είτε κρατείται στον υπερκείμενο του διαλύματος χώρο, οπότε αναφερόμαστε σε μικροεκχύλιση δια της στερεάς φάσης στον υπερκείμενο χώρο (*Headspace Solid Phase Microextraction – HS-SPME*).
- Εκρόφηση των ενώσεων, η οποία για ενώσεις που είναι θερμικά σταθερές γίνεται θερμικά με την εισαγωγή της ίνας απευθείας στον αέριο χρωματογράφο ή διαφορετικά, οι ενώσεις εκλύονται σε ειδικό σύστημα προσαρμοσμένο στον εισαγωγέα του δείγματος σε διάταξη υγρής χρωματογραφίας.

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

#### **2.1.8. Μικροεκχύλιση δια της υγρής φάσης (*Liquid Phase Microextraction – LPME*)**

Η LPME είναι επίσης γνωστή ως *Single Drop Microextraction – SDME*. Αναπτύχθηκε το 1996 από τους Jeannot και Cantwell και αποτελεί μια εναλλακτική τεχνική, η οποία ενσωματώνει τη δειγματοληψία, την εκχύλιση και την προσυγκέντρωση σε ένα στάδιο. Η χρησιμοποίηση πολύ μικρότερων ποσοτήτων οργανικών διαλυτών είναι

το βασικό πλεονέκτημά της έναντι των απλών μεθόδων εκχύλισης, όπως επίσης και το χαμηλό της κόστος δεδομένου ότι απαιτεί την ύπαρξη ενός κοινού εργαστηριακού εξοπλισμού. Είναι μια μέθοδος απλή και γρήγορη με δυνατότητα για αυτοματοποίηση. Τα τελευταία χρόνια, η SDME έχει αναπτυχθεί και χρησιμοποιείται ιδιαίτερα για την εκχύλιση των οργανοχλωριωμένων (OCPs) αλλά και άλλων Φ.Π..

Οι de Jager και Andrews (2000) σε έρευνά τους χρησιμοποιούν την SDME για την εκχύλιση έντεκα OCPs από το νερό ποταμών. Επίσης, οι Qian και He (2006) χρησιμοποιούν την SDME για την εκχύλιση 11 οργανοχλωριωμένων και δύο πυρεθρινοειδών Φ.Π. για την ανάλυση των δειγμάτων τσαγιού με τη χρήση αέριας χρωματογραφίας (GC-ECD). Εννέα OCPs εκχυλίστηκαν από δείγματα λαχανικών με τη χρήση μικτής σταγόνας 1.00  $\mu\text{L}$  με *p*-xylene και ακετόνης (8/ 2) (Zhang *et al.*, 2008). Η SDME χρησιμοποιήθηκε επίσης και για την εκχύλιση OCPs από τα ψάρια (Shrivastava *et al.*, 2008). (Cortada *et al.*, 2009) Η μέθοδος της μικροεκχύλισης με απλή σταγόνα τολουολίου έχει χρησιμοποιηθεί και για τον προσδιορισμό Φ.Π., διαφόρων χημικών ομάδων σε υγρά υποστρώματα (νερό, χυμοί, κρασί) και σε λαχανικά, με τη χρήση αέριας χρωματογραφίας (GC-ECD και GC-NPD) (Amvrazi and Tsiropoulos, 2009).

#### **2.1.9. Εκχύλιση διασποράς προσροφητικού υλικού στο υπόστρωμα (*Solid Phase Matrix Dispersion – SPMD*)**

Σε αυτή την τεχνική εκχύλισης χρησιμοποιείται μικρή ποσότητα δείγματος (0.1 – 5.0 g) που αναμιγνύεται με στερεό υπόστρωμα, το οποίο χρησιμεύει ως υλικό διασποράς, συμβάλλει στη δημιουργία ομοιογενούς δείγματος, με το οποίο κατασκευάζεται χρωματογραφική στήλη και η έκλουση των Φ.Π. γίνεται με την κατάλληλη ποσότητα οργανικού διαλύτη. Το βασικό πλεονέκτημα αυτής της τεχνικής είναι ότι η εκχύλιση και ο καθαρισμός του εκχυλίσματος πραγματοποιούνται ταυτόχρονα μειώνοντας έτσι το χρόνο και το κόστος της ανάλυσης σε σχέση με τις παραδοσιακές μεθόδους εκχύλισης (Ahmed, 2001). Η άμμος χρησιμοποιείται συχνά στην ανάλυση αυτού του τύπου, διότι δρα ως μέσο διάρρηξης της κυτταρικής δομής και τεμαχισμού του δείγματος. Η ομογενοποίηση του ιστού με το στερεό υπόστρωμα μέσα σε γουδί οδηγεί σε πλήρη διάρρηξη του κυττάρου, σε διαλυτοποίηση των συστατικών του δείγματος και στη διασπορά τους σε αυτό με βάση τις πολικότητες τους (Barker, 2000). Η πλήρης λύση των κυττάρων που επιτυγχάνεται με τη μέθοδο αυτή ερμηνεύει τα υψηλά επίπεδα ανακτήσεων της.

Το υλικό διασποράς μπορεί να είναι οποιοδήποτε προσροφητικό υλικό για χρωματογραφία. Το μέγεθος των σωματιδίων του υλικού διασποράς είναι σημαντικό, καθώς η χρήση υλικών με διάμετρο κόκκων 3.0 – 20  $\mu\text{m}$ , δημιουργεί προβλήματα στη ροή του διαλύτη από τη στήλη. Συνήθως χρησιμοποιούνται υλικά με διάμετρο κόκκων 40  $\mu\text{m}$ , ενώ έχουν χρησιμοποιηθεί και υλικά με μικτό μέγεθος κόκκων 40 – 100  $\mu\text{m}$  με καλά αποτελέσματα και μικρότερο κόστος (Barker, 2000).

Ο Anastasiades καθώς και ο Lehotay και οι συνεργάτες του χρησιμοποιούν μια μέθοδο για τον προσδιορισμό των υπολειμμάτων Φ.Π. στα τρόφιμα, γνωστή ως γρήγορη, εύκολη, φθηνή, αποτελεσματική και ασφαλής (*QuEChERS*) Η εκχύλιση του δείγματος γίνεται με ακετονιτρίλιο ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ) που περιέχει 1% οξικό οξύ και η κατανομή υγρού-υγρού υποβοηθείται με την προσθήκη άνυδρου  $\text{MgSO}_4$  και  $\text{CH}_3\text{COONa}$ . Η εκχύλιση πραγματοποιείται σε σωλήνα φυγοκέντρου που περιέχει 1 mL 1%  $\text{CH}_3\text{COOH}$  σε  $\text{CH}_3\text{CN}$  και 0.4 g άνυδρο  $\text{MgSO}_4$  και 0.1 g άνυδρο  $\text{CH}_3\text{COONa}$  ανά γραμμάριο δείγματος. Η μέθοδος έχει αξιολογηθεί για 32 διαφορετικά Φ.Π. σε διαφορετικά υποστρώματα με ανακτήσεις  $95\pm 10$ , ακόμη και για μερικά προβληματικά Φ.Π.. (Lehotay *et al.*, 2005)

### 3. Διήθηση ή/ και Φυγοκέντρωση

Το προϊόν της εκχύλισης αποτελείται από τους φυτικούς ιστούς σε πολύ μικρά σωματίδια (στερεή φάση) και την υγρή φάση. Για το λόγο αυτό διηθείται ή/ και φυγοκεντρείται, έτσι ώστε να απομακρυνθούν τα στερεά σωματίδια. Η διήθηση γίνεται είτε με φυσική ροή πάνω από τεμάχιο υάλου χαλαζία ή υαλοβάμβακα ειδικής καθαρότητας, είτε υπό κενό σε χωνιά *Buchner* εφοδιασμένα με χάρτινο ηθμό.

### 4. Καθαρισμός του εκχυλίσματος (*Clean-up*)

Το εκχύλισμα που λαμβάνεται από τη φάση της εκχύλισης είναι μίγμα του διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε για την εκχύλιση και του νερού που περιέχονταν στους φυτικούς ιστούς, αλλά περιέχει, επίσης, και πολλές από τις φυτικές ουσίες που έχουν συνεκχυλιστεί. Τα συνεκχυλίσματα του υποστρώματος μπορεί να είναι πτητικές ενώσεις, αμίνες, φαινόλες, οργανικά οξέα, σάκχαρα, φυτικά λίπη και έλαια, κηροί, χλωροφύλλη και λοιπές χρωστικές ενώσεις κ.α. Για να επιτευχθεί ο προσδιορισμός των υπολειμμάτων των Φ.Π., θα πρέπει να απαλλαγούμε από όσο το δυνατόν μεγαλύτερο αριθμό ανεπιθύμητων ουσιών. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται διάφορες μέθοδοι καθαρισμού του εκχυλίσματος ανάλογα με τις φυσικοχημικές ιδιότητες του Φ.Π. και των

συνεκχυλισμάτων (Μηλιάδης, 1998). Οι πιο συνηθισμένες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται, είναι:

- ❖ **Κατανομή μεταξύ δυο υγρών (*LLE*):** Στηρίζεται στο διαχωρισμό των χημικών ουσιών με βάση τη διαφορετική διαλυτότητά τους σε ένα σύστημα δύο μη αναμιγνυόμενων διαλυτών.
- ❖ **Χρωματογραφία προσρόφησης:** Το χρωματογραφικό σύστημα αποτελείται από μια στατική φάση (υλικό προσρόφησης) και μια κινητή φάση (διαλύτης έκλουσης). Τα συστατικά του μίγματος μεταφέρονται με την κινητή φάση διαμέσου της στατικής φάσης. Ο διαχωρισμός των ενώσεων στηρίζεται στη διαφορετική προσρόφηση των ουσιών πάνω στην επιφάνεια του προσροφητικού.
- ❖ **Εκχύλιση δια της στερεάς φάσης (*SPE*),** όπως αυτή αναπτύχθηκε προηγουμένως.
- ❖ **Χρωματογραφία διαπερατότητας πηκτής ή χρωματογραφία μοριακού διαχωρισμού (*Gel Permeation Chromatography – GPC*):** Εφαρμόζεται για το διαχωρισμό Φ.Π. από λιπώδη και ελαιώδη υποστρώματα. Χρησιμοποιείται μια στήλη πληρωμένη με κατάλληλου μεγέθους πόρους ρητίνης, συνήθως πηκτής πολυστυρενίου. Ενώσεις, όπως λίπη και χλωροφύλλη, εκλούνται πρώτες και απομακρύνονται, ενώ τα Φ.Π. εκλούνται αργότερα. Αυτό συμβαίνει διότι τα μεγάλα μόρια δεν εισέρχονται στους πόρους και διέρχονται την πηκτή άμεσα, ενώ τα μικρότερα μόρια εισέρχονται στους πόρους όπου διαχέονται και καθυστερεί η έκλουσή τους. Έτσι, τα μόρια εκλούνται κατά σειρά ελαττούμενου μοριακού βάρους από την πηκτή. Τα μοριακά βάρη των περισσότερων Φ.Π. είναι 200 έως 400, ενώ των περισσότερων λιπιδίων από 600 έως 1500. Έπειτα το παραλαμβανόμενο κλάσμα των Φ.Π., οδηγείται για το διαχωρισμό και τον προσδιορισμό των Φ.Π. σε σύστημα αέριας ή υγρής χρωματογραφίας. Το πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι δεν υπάρχουν απώλειες από την προσρόφηση και μπορεί να εφαρμοστεί σε όλα τα Φ.Π.
- ❖ **Καθαρισμός με χημικές αντιδράσεις:** Οι πιο συνηθισμένοι καθαρισμοί με χημικές αντιδράσεις είναι ο *όξινος καθαρισμός* και ο *αλκαλικός καθαρισμός*. Ο όξινος καθαρισμός περιλαμβάνει την κατεργασία του εκχυλίσματος με πυκνό θειϊκό οξύ για την οξειδωτική αποικοδόμηση των λιπαρών οξέων και εστέρων υψηλού μοριακού βάρους και την ταυτόχρονη απομάκρυνσή τους από το εκχύλισμα. Στην περίπτωση του αλκαλικού καθαρισμού γίνεται κατεργασία του εκχυλίσματος με αραιά αλκαλικά διαλύματα, συνήθως 20% αιθανολικού

διαλύματος υδροξειδίου του καλίου, για την υδρόλυση των λιπαρών οξέων και την μετέπειτα εκχύλιση των προϊόντων με απεσταγμένο νερό. Μια άλλη περίπτωση χημικών αντιδράσεων καθαρισμού είναι για τη δέσμευση του στοιχειακού θείου, με τη χρήση ενεργοποιημένου χαλκού (Cu). Το στοιχειακό θείο παρευρίσκεται στα εκχυλίσματα των ιζημάτων και καθιστά αδύνατο τον προσδιορισμό των υπολειμμάτων με αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων (GC-ECD).

## **5. Συμπύκνωση του εκχυλίσματος**

Ο τελικός όγκος του διαλύματος που παραλαμβάνουμε από το προηγούμενο στάδιο απαιτείται συνήθως να ελαττωθεί σε 1.0 – 10 mL με σκοπό την αύξηση της συγκέντρωσης του υπολείμματος. Αυτό επιτυγχάνεται με περιστροφικό εξάτμιστήρα (*Rotary evaporator*), όπου η εξάτμιση γίνεται υπό κενό σε σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες, συνήθως μέχρι 40 °C, για να μη διασπάται η ουσία. Επίσης, μικροί όγκοι πτητικών διαλυτών μπορούν να εξατμιστούν με ρεύμα καθαρού αζώτου.

Πολλές φορές μετά τη συμπύκνωση ακολουθεί «αλλαγή διαλύτη» για λόγους χρωματογραφικής ανάλυσης. Στην περίπτωση αυτή η συμπύκνωση γίνεται «μέχρι ξηρού» και έπειτα προστίθεται ο νέος διαλύτης. Οι όγκοι πρέπει να μετρώνται με μεγάλη ακρίβεια γιατί επηρεάζουν σημαντικά τον τελικό προσδιορισμό.

## **6. Σχηματισμός παραγώγων**

Σε ορισμένες περιπτώσεις, ιδιαίτερα σε μη πτητικά ή θερμοδιασπώμενα μόρια, πριν από το στάδιο του προσδιορισμού προηγείται ο σχηματισμός παραγώγου του μορίου που πρόκειται να προσδιοριστεί ώστε με αυτό τον τρόπο να αυξηθεί η πτητικότητα και η θερμική σταθερότητα του ενέσιμου παραγώγου για τον προσδιορισμό του με αέρια χρωματογραφία. Σε άλλες περιπτώσεις ο σχηματισμός παραγώγου απαιτείται για τη βελτίωση του χρωματογραφικού προσδιορισμού, την αύξηση της ευαισθησίας και της εκλεκτικότητας της ανίχνευσης, αλλά και για την επιβεβαίωση της ταυτότητας του Φ.Π.. Ο σχηματισμός του παραγώγου μπορεί να επιτευχθεί με αντιδράσεις μεθυλίωσης, αλογόνωσης, σιλανοποίησης (*Silylation*) κ.α. Στην ανάλυση των καρβαμδικών Φ.Π. συνήθως ακολουθείται παραγωγοποίηση μετά την έξοδό τους από τη στήλη (*Post column derivatization*) και προσδιορισμός τους με φθορισμομετρικό ανιχνευτή (HPLC-FL).

## **7. Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός**

Μέχρι το 1960 χρησιμοποιήθηκαν κυρίως βιολογικές μέθοδοι (βιοδοκιμές) ή μέθοδοι της κλασικής χημείας, όπως η χρωματομετρία, η χρωματογραφία σε χαρτί, η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, η φασματοφωτομετρία, κ.λπ. Από τη δεκαετία του 1970 όμως και μετά, η μεθοδολογία προσδιορισμού υπολειμμάτων Φ.Π. γνώρισε αλματώδη πρόοδο και βασίζεται κυρίως στη χρήση εξειδικευμένων ενόργανων συστημάτων ανάλυσης. Τα όργανα αυτά είναι κυρίως ο αέριος χρωματογράφος, ο υγρός χρωματογράφος υψηλής απόδοσης εφοδιασμένοι με τους κατάλληλους εκλεκτικούς και ευαίσθητους ανιχνευτές, καθώς και τα συζευγμένα συστήματα αέριας ή υγρής χρωματογραφίας με φασματομετρία μάζας. Για ορισμένες εξειδικευμένες μεθόδους, χρησιμοποιείται ακόμη το φασματοφωτόμετρο ορατού-υπεριώδους. Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί και οι βιοτεχνολογικές μέθοδοι (ανοσοδοκιμασίες – *Immunoassays*), οι οποίες όμως δεν εφαρμόζονται σε πολυυπολειμματικές μεθόδους ανάλυσης.

## **8. Ταυτοποίηση των αποτελεσμάτων**

Ένα στάδιο θεμελιώδους σημασίας στον προσδιορισμό υπολειμμάτων Φ.Π. αποτελεί η ταυτοποίηση των θετικών ανιχνεύσεων, όταν το κριτήριο ανίχνευσης είναι ο χρόνος κατακράτησης της ένωσης στα διάφορα συστήματα αέριας ή υγρής χρωματογραφίας που χρησιμοποιούνται. Η ταυτοποίηση των ενώσεων μπορεί να γίνει με τους ακόλουθους τρόπους:

- ❖ Χρησιμοποίηση διαφορετικών χρωματογραφικών συνθηκών προσδιορισμού, κυρίως με τη χρήση στήλης με χρωματογραφικό υλικό διαφορετικής πολικότητας.
- ❖ Χρησιμοποίηση άλλης αναλυτικής μεθόδου προσδιορισμού.
- ❖ Λήψη φάσματος υπεριώδους της ένωσης, όταν ο προσδιορισμός γίνεται με HPLC-DAD.
- ❖ Με παράλληλο σχηματισμό παραγώγου της ένωσης, το οποίο και προσδιορίζεται χρωματογραφικά.
- ❖ Χρησιμοποίηση φασματομετρίας μάζας.

## 2.2. Ενόργανες τεχνικές προσδιορισμού των υπολειμμάτων

### 2.2.1. Αέρια χρωματογραφία

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

Με την τεχνική της αέριας χρωματογραφίας, μικρή ποσότητα (1.0 – 2.0  $\mu\text{L}$ ) από το τελικό εκχύλισμα εγχέεται στην κορυφή θερμαινόμενης ειδικής στήλης χρωματογραφίας τοποθετημένης σε κλίβανο ώστε το εκχύλισμα να μεταπέσει σε αέρια φάση. Ένα αδρανές αέριο κινείται μέσα στη στήλη και παρασύρει τους ατμούς του δείγματος. Ο χρόνος παραμονής κάθε ουσίας στη στήλη (χρόνος κατακράτησης – *Retention time*), είναι συνάρτηση των ιδιοτήτων της και είναι ένα από τα κριτήρια για τον ποιοτικό προσδιορισμό. Το μέγεθος του σήματος που καταγράφεται από τους ανιχνευτές στην έξοδο της στήλης, είναι το κριτήριο για τον ποσοτικό προσδιορισμό. Το σήμα καταγράφεται υπό μορφή κορυφής. Το ύψος ή η επιφάνεια της κορυφής χρησιμοποιούνται για τον ποσοτικό προσδιορισμό.

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

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

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

- ✓ Ανιχνευτής αζώτου-φωσφόρου (*Nitrogen Phosphorus Detector – NPD*) που είναι εξειδικευμένος για ουσίες που περιέχουν άζωτο ή φώσφορο στο μόριό τους, π.χ. οργανοφωσφορικά, τριαζίνες.
- ✓ Ανιχνευτής σύλληψης ηλεκτρονίων (*Electron Capture Detector – ECD*) για οργανοαλογονούχες ενώσεις, που περιέχουν φθόριο ή χλώριο στο μόριό τους, π.χ. οργανοχλωριωμένα.
- ✓ Ανιχνευτής φωτομετρίας φλόγας (*Flame Photometric Detector – FPD*) που με το κατάλληλο φίλτρο προσδιορίζει ουσίες που στο μόριό τους περιέχεται θείο ή φώσφορος, π.χ. οργανοφωσφορικά.
- ✓ Ανιχνευτής φασματομετρίας μάζας.

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



**Εικόνα 2.1:** Σύστημα αέριας χρωματογραφίας με ανιχνευτές αζώτου – φωσφόρου (*NPD*) και σύλληψης ηλεκτρονίων (*ECD*).



### 2.2.2. Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης

Η τεχνική της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC), χρησιμοποιείται για προσδιορισμό υπολειμμάτων Φ.Π. που δε μπορούν να προσδιοριστούν με αέρια χρωματογραφία, είτε λόγω θερμικής αστάθειας, είτε λόγω χαμηλής πτητικότητας, είτε λόγω μεγάλης πολικότητας, όπως τα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα, τα N-μεθυλοκαρβαμιδικά εντομοκτόνα και αρκετά ζιζανιοκτόνα όπως φαινυλοξικά οξέα, φαινολικά παράγωγα της ουρίας και οι σουλφονυλουργίες. Το κύριο προσόν της είναι η λειτουργία της σε χαμηλές θερμοκρασίες και για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό ουσιών ευπαθών στις υψηλές θερμοκρασίες της αέριας χρωματογραφίας, όπως για παράδειγμα βιολογικών μορίων καθώς και ουσιών που δε μπορούν να αεριοποιηθούν (Κασσαβέτη, 2004). Συνεπώς, η υγρή χρωματογραφία πλεονεκτεί σε σχέση με την αέρια στον προσδιορισμό πολικών, μη πτητικών και θερμοευαίσθητων ενώσεων. Μειονεκτεί στη διακριτική ικανότητα και συνεπώς σε εξειδίκευση. Μια συνήθης στήλη HPLC έχει 12.500 θεωρητικές πλάκες σε αντίθεση με τις 150000 μιας τριχοειδούς στήλης GC, με συνέπεια, να διαχωρίζονται πολύ λιγότερες ουσίες ανά χρωματογράφημα. Συνήθως, στην ανάλυση φυτοπροστατευτικών προϊόντων με υγρή χρωματογραφία χρησιμοποιούνται στήλες αντίστροφης φάσης ( $C_8$ ,  $C_{18}$ , κ.α.).

Το χρωματογραφικό σύστημα της HPLC αποτελείται από τις φιάλες αποθήκευσης των διαλυτών (κινητή φάση), τα σύστημα απαέρωσης της κινητής φάσης, το σύστημα αντλιών, τον εγχυτή, τη χρωματογραφική στήλη, τη μονάδα θερμοστάτησης της στήλης, τον ανιχνευτή και τέλος το καταγραφικό με τη μονάδα επεξεργασίας του χρωματογραφικού σήματος.

Η τεχνική της υγρής χρωματογραφίας έχει αρκετά κοινά σημεία με την αέρια, όμως διαφέρει ως προς το ότι η ουσία παραμένει στην ίδια φυσική κατάσταση που είχε τόσο κατά την έγχυση όσο και κατά το διαχωρισμό της στη στήλη, και δεν αεριοποιείται. Επίσης η κινητή φάση είναι υγρή (διαλύτης ή μίγμα διαλυτών ή μίγμα διαλυτών και ρυθμιστικών διαλυμάτων) σε αντίθεση με την αέρια χρωματογραφία όπου είναι αέρια. Στην υγρή χρωματογραφία υπάρχουν πέντε διαφορετικοί μηχανισμοί διαχωρισμού: η χρωματογραφία προσρόφησης (*Adsorption*), η χρωματογραφία κατανομής (*Partition*), η χρωματογραφία προσδεμένης φάσης (*Bonded phase*), η χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων (*Ion exchange*) και η χρωματογραφία αποκλεισμού (*Exclusion*). Επειδή δεν είναι πάντα σαφής η διάκριση μεταξύ κατανομής και προσρόφησης διακρίνουμε δύο είδη

υγρής χρωματογραφίας ανάλογα με τις σχετικές πολικότητες μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης:

- ❖ τη χρωματογραφία κανονικής φάσης (*Normal Phase Chromatography*), όπου η στατική φάση είναι πιο πολική από την κινητή, με αποτέλεσμα οι λιγότερο πολικές ενώσεις να εκλύονται πρώτες και η έκλυση μιας ένωσης να γίνεται ευκολότερα με σχετική αύξηση της πολικότητας της κινητής φάσης και
- ❖ τη χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (*Reverse Phase Chromatography*), όπου η στατική φάση είναι λιγότερο πολική από την κινητή, με αποτέλεσμα οι πιο πολικές ενώσεις να εκλύονται πρώτες και η έκλυση μιας ένωσης να γίνεται ευκολότερα με σχετική μείωση της πολικότητας της κινητής φάσης.

Οι πλέον χρησιμοποιούμενοι ανιχνευτές στην υγρή χρωματογραφία για αναλύσεις υπολειμμάτων, είναι:

- **Απορρόφησης ορατού-υπεριώδους (UV-VS).** Είναι ο κατ' εξοχήν ανιχνευτής στην υγρή χρωματογραφία. Η λειτουργία τους στηρίζεται στη διέλευση της κινητής φάσης μέσα από κυψελίδα, στην οποία πέφτει δέσμη ακτίνων περιοχής UV-VIS. Ανιχνεύει ενώσεις που απορροφούν UV ή ορατό φως (200 – 350 nm), όπως οι αρωματικές και οι ενώσεις με πολλαπλούς δεσμούς μεταξύ C και O, N ή S. Η κινητή φάση συνήθως απορροφά καθόλου ή ελάχιστη ακτινοβολία. Έχει ευαισθησία  $10^{-6}$  ως  $10^{-10}$  g/ mL. Παρουσιάζει γραμμικότητα και γενικά δεν επηρεάζεται το σήμα από αλλαγές ροής ή πίεσης. Οι ανιχνευτές UV είναι τριών τύπων: **α)** σταθερού μήκους κύματος ( $\lambda$ ), π.χ. 254 nm, **β)** μεταβαλλόμενου μήκους κύματος και **γ)** συστοιχίας διόδων λυχνιών (*Diode Array Detector – UV-DAD*), ο οποίος είναι περισσότερο εκλεκτικός, μικρής όμως ευαισθησίας. Οι ανιχνευτές μεταβαλλόμενου μήκους κύματος πλεονεκτούν έναντι του σταθερού, γιατί έχουν αυξημένη ευαισθησία (επιλέγεται για την κάθε ουσία το βέλτιστο μήκος κύματος).
- **Φθορισμού (Fluorescent – FLD).** Οι ανιχνευτές φθορισμού είναι πολύ ευαίσθητοι ( $10^{-12}$  g/ mL) και πολύ εκλεκτικοί.
- **Φασματομετρίας μάζας (MS).** Η φασματομετρία μάζας λειτουργεί υπό κενό, γι' αυτό αναζητήθηκαν τρόποι εισαγωγής της κινητής φάσης που εξέρχεται από τη στήλη της υγρής χρωματογραφίας στο MS. Υπάρχουν διάφορες τεχνικές ιονισμού και αντίστοιχοι διασυνδέτες (*Interfaces*). Ο διασυνδέτης περιλαμβάνει την εισαγωγή του εκλούσματος της υγρής χρωματογραφίας στο MS σύστημα και τον ιονισμό του δείγματος (Μηλιαδής, 2004).

### 2.2.3. Φασματομετρία μάζας

Η χρωματογραφία εδώ και πολλά χρόνια είναι η κύρια μέθοδος επιλογής για τον προσδιορισμό των υπολειμμάτων Φ.Π.. Η φασματομετρία μάζας (*Mass Spectrometry – MS*) είναι μια σύγχρονη τεχνική με δυνατότητα να παράγει πληροφορίες που αφορούν τη μοριακή μάζα και/ή τη δομή της χημικής ουσίας. Όταν αυτές οι δύο μέθοδοι συνδυαστούν σε ένα σύστημα (GC-MS ή LC-MS) έχουμε πολύ καλά αποτελέσματα, καθώς η φασματομετρία μάζας ως ανιχνευτής ενός χρωματογράφου είναι ένας γενικός και συγχρόνως εκλεκτικός ανιχνευτής. Η χρωματογραφία συνδυάζεται και με τη συζευγμένη φασματομετρία (GC-MS/MS ή LC-MS/MS) έχοντας ακόμη καλύτερα αποτελέσματα.

Στη φασματομετρία μάζας τα οργανικά μόρια οδηγούνται σε ένα χώρο όπου βομβαρδίζονται με ηλεκτρόνια, με συνέπεια την αποδόμησή τους και το σχηματισμό μοριακών ιόντων. Τα μοριακά ιόντα μετατρέπονται περαιτέρω σε κατιόντα και ουδέτερα μέρη. Τα θετικά φορτισμένα ιόντα διαχωρίζονται σε ένα μαγνητικό πεδίο και καταγράφονται ποσοτικά. Ο διαχωρισμός των ιόντων βασίζεται στη σχέση μάζας : ηλεκτρικού φορτίου ( $m/z$ ) και η όλη διαδικασία οδηγεί στην καταγραφή του φάσματος μάζας.

Η τεχνική της συζευγμένης φασματομετρίας μάζας (*Tandem MS ή MS/MS*), είναι μια σημαντική αναλυτική τεχνική η οποία εφαρμόζεται σε διάφορους τομείς, όπως οι αναλύσεις περιβαλλοντικών δειγμάτων, δειγμάτων που αφορούν την προστασία του καταναλωτή και την ασφάλεια των τροφίμων, όπως ο έλεγχος υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων (Vidal *et al.*, 2002, Schachterle and Feigel, 1996), καθώς επίσης, και στις αναλύσεις φαρμακευτικών υλών, στην εύρεση της αλληλουχίας των αμινοξέων των πεπτιδίων (*Peptide sequencing*), στις μελέτες μεταβολισμού φαρμακευτικών ουσιών και στην ανίχνευση εκρηκτικών ουσιών (Noble, 1995, Clarke *et al.*, 2001). Σημαντικός είναι ο ρόλος της και στη χειρομορφική ανάλυση (*Chiral analysis*) οργανικών ουσιών, καθώς η χειρομορφία είναι πολύ σημαντική στα βιοχημικά συστήματα λόγω του ότι η πλειοψηφία των οργανικών ουσιών όλων των ζώντων οργανισμών είναι χειρόμορφες ενώσεις (Yao *et al.*, 2000).

Η συζευγμένη φασματομετρία μάζας χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις, συγχρόνως με την ταυτοποίηση του αναλύτη με υψηλά επίπεδα εμπιστοσύνης, με θραυσματοποίηση των ιόντων. Συχνά, η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται και για τον

προσδιορισμό ουσιών που βρίσκονται σε ίχνη μέσα σε περίπλοκα μίγματα (Oglobline *et al.*, 2001).

Με τον όρο συζευγμένη φασματομετρία μάζας εννοούμε μια διαδικασία αποτελούμενη από τρία στάδια. Στο πρώτο στάδιο της φασματομετρίας μάζας επιλέγεται και απομονώνεται ένα πρόδρομο ιόν (*Precursor ion*), το οποίο αποκαλείται και μητρικό ιόν (*Parent ion*). Στο επόμενο στάδιο γίνεται θραυσματοποίηση του πρόδρομου ιόντος και στο τρίτο στάδιο τα παραγόμενα ιόντα διαχωρίζονται και ανιχνεύονται. Τα παραγόμενα ιόντα καλούνται και θυγατρικά ιόντα (*Product ions* ή *Daughter ions*) και αποτελούν το δευτερογενές φάσμα.

Σε ένα τυπικό πείραμα συζευγμένης φασματομετρίας μάζας τα συστατικά ενός μίγματος διαχωρίζονται από ένα χρωματογραφικό σύστημα (αέριο χρωματογράφο ή υγρό χρωματογράφο) και στη συνέχεια όπως εκλούνται από τη στήλη εισέρχονται στην πηγή ιόντων όπου ιοντίζονται τα μόρια και απομονώνεται το πρόδρομο ιόν με βάση το λόγο μάζας προς φορτίο ( $m/z$ ). Στο επόμενο στάδιο τα ιόντα αυτά προωθούνται σε ένα άλλο χώρο όπου τα ιόντα που έχουν το συγκεκριμένο λόγο  $m/z$  διασπώνται σε «θυγατρικά» ιόντα. Ο χώρος αυτός καλείται «χώρος συγκρούσεων» (*Collision cell*) και είναι γεμάτος αδρανές αέριο, όπως ήλιο (He) ή Αργό (Ar), ενώ εφαρμόζεται συγχρόνως και μια τάση διέγερσης. Τα ιόντα που επιλέχθηκαν υφίστανται συγκρούσεις με το αδρανές αέριο (*Neutral gas* ή *Collision gas* ή *Target gas* ή *Inert gas* ή *Neutral target species*), ενώ προστίθεται και ενέργεια (*Collision energy*) λόγω της εφαρμοζόμενης τάσης. Έτσι, σε κάθε σύγκρουση μια μικρή ποσότητα μεταβατικής κινητικής ενέργειας (*Transitional kinetic energy*) του ιόντος, μετατρέπεται σε εσωτερική ενέργεια του ιόντος.

Τα παραγόμενα ιόντα είναι συνήθως προϊόντα θραυσματοποίησης του αρχικού πρόδρομου ιόντος, αλλά μπορεί να είναι και το αποτέλεσμα της αλλαγής του φορτίου του μητρικού ιόντος, δηλαδή από διπλά φορτισμένο  $z = 2$  να μετατραπεί σε απλά φορτισμένο  $z = 1$ . Αυτή η τελευταία περίπτωση απαντάται συνήθως στα συστήματα LC-MS. Τα παραγόμενα νέα ιόντα μεταφέρονται σε ένα τρίτο χώρο, τον αναλυτή μάζας, συνήθως ένα τετράπολο, όπου γίνεται ο διαχωρισμός των ιόντων και η ανίχνευσή τους. Οι διαδικασίες που προαναφέρθηκαν συμβαίνουν διαδοχικά ή μία μετά την άλλη σε διαφορετικούς χώρους και γι' αυτό την αποκαλούμε συζευγμένη φασματομετρία μάζας στο χώρο (*Tandem in space*) και το σύστημα αποτελείται από τρία τετράπολα (*Triple quadrupole*). Μια άλλη τεχνική για τη συζευγμένη φασματομετρία μάζας είναι οι τρεις παραπάνω διαδικασίες να συμβαίνουν στον ίδιο χώρο, αλλά σε διαφορετικές χρονικές στιγμές. Στην περίπτωση αυτή έχουμε συζευγμένη φασματομετρία μάζας στο χρόνο (*Tandem in time*),

και ισχύει για τα όργανα που διαθέτουν την τεχνική της τετραπολικής παγίδας ιόντων (*Quantrapole ion trap*). (Λιαπής, 2003)



**Εικόνα 2.2:** Σύστημα αέριας χρωματογραφίας – φασματομετρίας μάζας και συζευγμένης φασματομετρίας μάζας (GC-MS και GC-MS/MS).

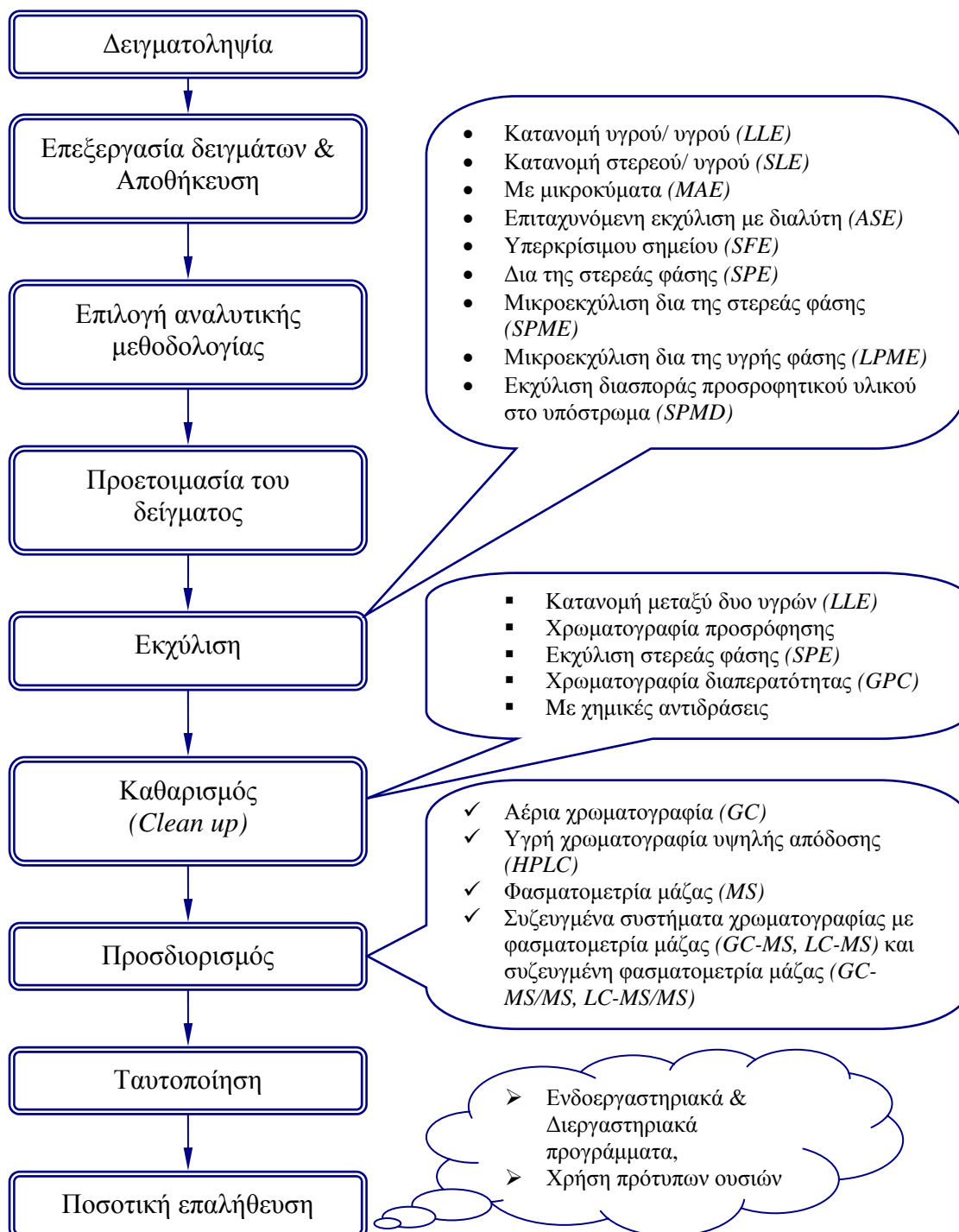
#### 2.2.4. Ανοσοδοκιμασίες

Είναι βιοτεχνολογικές μέθοδοι που γνωρίζουν αρκετή διάδοση τα τελευταία χρόνια. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η μέθοδος **ELISA** (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). Εξειδικευμένες ομάδες εργάζονται για τον προσδιορισμό Φ.Π. και ιδίως ζιζανιοκτόνων. Ως αντιδραστήρια χρησιμοποιούνται αντισώματα τα οποία παράγονται από πειραματόζωα ως αντίδραση του οργανισμού τους σε ξενοβιοτικές ουσίες, τα αντιγόνα. Ως αντιγόνα δρουν μόνο μεγαλομοριακές ενώσεις (M.B.> 10.000 daltons). Τα περισσότερα όμως Φ.Π. είναι μικρομοριακές ενώσεις (M.B.< 1.000 daltons) και ως εκ τούτου δεν είναι δυνατόν να διεγείρουν το ανοσοποιητικό σύστημα των ζωντανών οργανισμών και να προκαλέσουν την παραγωγή αντισωμάτων στο αίμα τους. Η επιτυχία της σύζευξης, που θα επιτρέψει στα Φ.Π. να καταστούν αντιγόνα προϋποθέτει ότι το μόριό τους διαθέτει κατάλληλες χημικές ομάδες. Στην αντίθετη περίπτωση, συντίθενται τέτοια παράγωγα της μητρικής ουσίας (Φ.Π.), που θα επιτρέψουν τη σύζευξη με πρωτεΐνη, χωρίς όμως να δημιουργήσουν προβλήματα άλλης φύσης. Τα παράγωγα αυτά ονομάζονται απτίνες. (Sherma, 1989)

### 3. Διαπίστευση των εργαστηρίων ανάλυσης, Διασφάλιση της ποιότητας των αποτελεσμάτων & Επικύρωση των αναλυτικών μεθόδων

#### 3.1. Εισαγωγή

Στο προηγούμενο κεφάλαιο αναλύθηκαν τα στάδια και οι μέθοδοι προσδιορισμού υπολειμμάτων Φ.Π., τα οποία απεικονίζονται εν συντομία στο παρακάτω διάγραμμα:



Ο αναλυτής ή το εργαστήριο που πρόκειται να χρησιμοποιήσει για πρώτη φορά τη μέθοδο που θα επιλεγεί για τον προσδιορισμό των υπολειμμάτων Φ.Π. θα πρέπει πρώτα να την επικυρώσει και να την αξιολογήσει με βάσει τα αποτελέσματά της. Η επικύρωση και αξιολόγηση των αναλυτικών μεθόδων είναι από τις βασικές προϋποθέσεις του εσωτερικού ελέγχου ασφάλειας, της διασφάλισης ποιότητας των αποτελεσμάτων των δοκιμών, που περιλαμβάνεται στη διαπίστευση ενός αναλυτικού εργαστηρίου.

Οποιαδήποτε αναλυτική μέθοδος προσδιορισμού υπολειμμάτων, ακόμα και αν χρησιμοποιείται ευρέως, πρέπει να αξιολογείται και να ελέγχεται από τον αναλυτή ή το εργαστήριο που πρόκειται να τη χρησιμοποιήσει για πρώτη φορά. Ο έλεγχος αυτός γίνεται μελετώντας παραμέτρους όπως, η **ορθότητα** (*Accuracy*), η **πιστότητα** (*Precision*), η **ανιχνευσιμότητα** (*Detectability*), η **ευαισθησία** (*Sensitivity*), η **εκλεκτικότητα** (*Selectivity*), η **ειδικότητα** (*Specificity*) και η **ασφάλεια** (*Safety*) της μεθόδου.

### 3.2. Διαπίστευση των εργαστηρίων υπολειμμάτων Φ.Π.

Η **διαπίστευση** (*Accreditation*) είναι μια διαδικασία με την οποία ένας αρμόδιος φορέας παρέχει επίσημη αναγνώριση σε ένα φορέα ή πρόσωπο ως προς την ικανότητά του να πραγματοποιεί ειδικά έργα. Σύμφωνα με την οδηγία 93/99 της Ευρωπαϊκής Ένωσης οι διαδικασίες των εργαστηρίων που αναλύουν υπολείμματα Φ.Π. πρέπει να είναι σύμφωνες με το πρότυπο **EN ISO/IEC 17025**. Το πρότυπο αυτό είναι το μοναδικό που υπάρχει σε παγκόσμιο επίπεδο και αφορά όλα τα εργαστήρια δοκιμών και μετρήσεων που εκτελούν αναλύσεις σε τροφές. Το πρότυπο που ισχύει σήμερα είναι το **ISO/IEC 17025:2005**, το οποίο περιλαμβάνει τις απαιτήσεις που πρέπει να πληρούνται από ένα εργαστήριο χημικών αναλύσεων. Ο αρμόδιος φορέας διαπίστευσης για την Ελλάδα είναι το **Εθνικό Σύστημα Διαπίστευσης (Ε.ΣΥ.Δ)**.

Ο σκοπός της διαπίστευσης των αναλυτικών εργαστηρίων είναι να διασφαλιστεί η ποιότητα των χημικών αναλύσεων προσδιορισμού των υπολειμμάτων Φ.Π., έτσι ώστε να αυξηθεί η εμπιστοσύνη των καταναλωτών, να προστατευθεί η υγεία των καταναλωτών και κυρίως οι ευπαθείς ομάδες, όπως τα παιδιά, να διευρυνθεί και να διευκολυνθεί το Διεθνές εμπόριο, να είναι δυνατή η επιβολή διοικητικών μέτρων και να αποφευχθούν αναλυτικά λάθη, τα οποία μπορεί να προκαλέσουν την επιβολή προστίμων ύψους χιλιάδων ευρώ, με αποτέλεσμα την καταστροφή της παραγωγής και τη δυσφήμιση των εισαγωγέων και των εμπορών.

Για την αξιολόγηση της τεχνικής επάρκειας ενός εργαστηρίου που συμμετέχει στη διαδικασία της διαπίστευσης είναι απαραίτητη η επιβεβαίωση της τεχνικής επάρκειας του προσωπικού, η δραστηριοποίηση του εργαστηρίου σε συγκεκριμένο πεδίο δοκιμών, η συμμετοχή του σε διεργαστηριακούς ελέγχους και η πραγματοποίηση του ελέγχου των διαδικασιών να γίνεται από ελεγκτές με αποδεδειγμένη τεχνική επάρκεια. Οι προϋποθέσεις για τη σωστή εφαρμογή του προτύπου *EN ISO/IEC 17025* από ένα αναλυτικό εργαστήριο είναι ο σχεδιασμός ενός ευέλικτου, λειτουργικού, και αποτελεσματικού **συστήματος διασφάλισης ποιότητας**, η εκπαίδευση, επιμόρφωση και κατάρτιση του προσωπικού, η εξασφάλιση του απαραίτητου εργαστηριακού εξοπλισμού, ο καθορισμός ενός προγράμματος βαθμονόμησης και διακρίβωσης του εργαστηριακού εξοπλισμού, η συστηματική ανίχνευση των μη συμμορφώσεων και η επιλογή των κατάλληλων διορθωτικών ενεργειών, καθώς επίσης και η συμμετοχή του σε **διεργαστηριακές δοκιμές** και κυρίως σε **δοκιμές ελέγχου ικανότητας** (*Proficiency Tests*). (EURACHEM Guide, 1998)

Στην Ελλάδα, από τα 16 εργαστήρια ανάλυσης υπολειμμάτων Φ.Π. σε τρόφιμα που υπάρχουν, τα επτά είναι κρατικά, τα έξι ιδιωτικά και τα τρία πανεπιστημιακά. Όλα τα ιδιωτικά και δύο από τα κρατικά εργαστήρια είναι διαπιστευμένα ή υπό τη διαδικασία διαπίστευσης.

### 3.3. Διασφάλιση της ποιότητας των αποτελεσμάτων

Το εργαστήριο πρέπει να διαθέτει διαδικασίες ελέγχου της ποιότητας για την παρακολούθηση της εγκυρότητας των δοκιμών. Η παρακολούθηση αυτή πρέπει να σχεδιάζεται και να ανασκοπείται. Η διαδικασία για τη διασφάλιση της ποιότητας των αποτελεσμάτων διαχωρίζεται στον **εσωτερικό** και **εξωτερικό έλεγχο ποιότητας**. Περιλαμβάνει την ανάπτυξη και τήρηση της διαδικασίας παρακολούθησης της εγκυρότητας των αποτελεσμάτων και του αρχείου δεδομένων της διασφάλισης ποιότητας αποτελεσμάτων, την καθιέρωση κριτηρίων αποδοχής των αποτελεσμάτων του ελέγχου ποιότητας, καθώς επίσης την αξιολόγηση και ανασκόπηση των αποτελεσμάτων σύμφωνα με τις εσωτερικές επιθεωρήσεις. Η διαδικασία αυτή αναφέρεται στο **εγχειρίδιο ποιότητας** στο οποίο καθορίζονται η οργανωτική και διοικητική δομή του εργαστηρίου, το τεχνικό προσωπικό και οι αρμοδιότητες του, περιγράφονται οι λειτουργίες του εργαστηρίου, οι εγκαταστάσεις και ο εξοπλισμός που διαθέτει, και τέλος αναφέρονται όλες οι διαδικασίες που ακολουθούνται για την υλοποίηση της πολιτικής ποιότητας.



Ο έλεγχος ποιότητας πρέπει να καλύπτει όλες τις δοκιμές του πεδίου διαπίστευσης και αναφέρεται στον εσωτερικό και στον εξωτερικό έλεγχο ποιότητας. Στην περίπτωση του *εσωτερικού ελέγχου ποιότητας* οι τρόποι με τους οποίους γίνεται ο έλεγχος αυτός είναι η *επικύρωση μεθόδων* (*Method validation*) και η *ανάλυση πιστοποιημένων υλικών αναφοράς* (*Certified reference materials*), όπως η *ανάλυση λευκών δειγμάτων* (*Reagent blank samples*), που δείχνει τη συνεισφορά στο αναλυτικό σήμα του οργάνου των υπολοίπων συστατικών εκτός του αναλυτή, η *ανάλυση τυφλών δειγμάτων*, τα οποία είναι δείγματα που ο αναλυτής δε γνωρίζει την ταυτότητά τους, και η *ανάλυση εμβολιασμένων ή φορτισμένων δειγμάτων* (*Fortified samples*), που είναι διαλύτες ή δείγματα «μάρτυρα» τεχνητά φορτισμένα με τη δραστική ουσία που εξετάζουμε. Επίσης, χρησιμοποιούνται πρότυπα μέτρησης, *δείγματα ελέγχου ποιότητας* (*QC*), γίνονται επαναλήψεις ανάλυσης αγνώστων δειγμάτων και τέλος, κατασκευάζονται τα διαγράμματα ελέγχου. Σκοπός των δειγμάτων QC είναι να αναλύονται κατά διαστήματα μεταξύ των αγνώστων δειγμάτων για να αναδείξουν την όποια πιθανή ολίσθηση του συστήματος. Όταν ακολουθείται το πρόγραμμα περιοδικών ελέγχων αποδεικνύεται ότι η διακύμανση μεταξύ αναλυτών, οργάνων, υλικών, κ.λπ. βρίσκεται υπό έλεγχο.

Όσον αφορά τον *εξωτερικό έλεγχο ποιότητας*, οι *διεργαστηριακές εξετάσεις ελέγχου ικανότητας* (*Proficiency Tests – PT*) είναι συμπληρωματικός έλεγχος του εσωτερικού ελέγχου ποιότητας και ένας από τους καλύτερους τρόπους για ένα αναλυτικό εργαστήριο να ελέγξει την απόδοσή του έναντι των απαιτήσεων της διαπίστευσης. Οι εξετάσεις αυτές συγκρίνουν την ικανότητα μιας ομάδας εργαστηρίων μέσω στατιστικής εκτίμησης των στοιχείων που προκύπτουν από την ανάλυση διανεμημένων δειγμάτων. Η συχνή συμμετοχή, τουλάχιστον μια φορά ανά έτος, των εργαστηρίων σε αυτό τον έλεγχο για κάθε τύπο δοκιμών είναι απαίτηση της Ευρωπαϊκής Ένωσης και των φορέων διαπίστευσης (Ε.ΣΥ.Δ). Η εκτίμηση της «αληθούς» τιμής δεν είναι συνήθως η τιμή που προκύπτει από τη «φόρτιση» του δείγματος, αλλά από τη μέση τιμή που προκύπτει από τις απαντήσεις των συμμετεχόντων εργαστηρίων. Η βαθμολόγηση των εργαστηρίων γίνεται με το *Z-Score*, το οποίο υπολογίζεται από τον τύπο:

$$Z = (x - X) / \sigma$$

όπου,  $x$  = το αποτέλεσμα του εργαστηρίου

$X$  = η εκτιμηθείσα τιμή από το διοργανωτή

$\sigma$  = η τυπική απόκλιση του PT

Όταν τα αποτελέσματα του *Z-Score* κυμαίνονται μεταξύ του 0 και του +/- 2, τότε κρίνονται ως ικανοποιητικά. Μεταξύ +2 και +3 ή μεταξύ -2 και -3 τα αποτελέσματα είναι αμφισβητήσιμα και στην περίπτωση που δεν ανιχνευθεί καμία ουσία το αποτέλεσμα είναι ίσο με 5 (*False negative*). (Λιαπής, 2007)

Μέσω αυτών των εξετάσεων ελέγχεται η **επαναληψιμότητα** (*Repeatability*) και η **αναπαραγωγιμότητα** (*Reproducibility*) μεταξύ των εργαστηρίων και εντοπίζονται τα συστηματικά σφάλματα.

Στην Ελλάδα, σε διεργαστηριακές εξετάσεις ελέγχου ποιότητας συμμετείχαν έντεκα αναλυτικά εργαστήρια. Τα δείγματα τα οποία κλήθηκαν να αναλύσουν περιείχαν δέκα Φ.Π. σε εύρος συγκεντρώσεων από 0.005 – 1.25 mg/ Kg. Από τις αναλύσεις προέκυψαν 36 τιμές για το *Z-Score*, από τις οποίες οι 31 ήταν αποδεκτές, 4 αμφισβητήσιμες και 1 μη αποδεκτή. Από τα έντεκα εργαστήρια που συμμετείχαν στον εξωτερικό έλεγχο ποιότητας, μόνο το ένα απέτυχε στη δοκιμή του *Z-Score*. Το συμπέρασμα που προκύπτει από την όλη διαδικασία και πρέπει να σημειωθεί είναι ότι τα εννέα από τα έντεκα εργαστήρια που συμμετείχαν στην όλη διαδικασία δεν ήταν διαπιστευμένα και συμμετείχαν πρώτη φορά σε τέτοιου είδους έλεγχο ποιότητας, έτσι είναι σημαντικό το γεγονός ότι η απόδοσή τους ήταν αποδεκτή στις περισσότερες περιπτώσεις. (Miliadis *et al.*, 2004)

### 3.4. Επικύρωση των μεθόδων προσδιορισμού υπολειμμάτων Φ.Π.

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

Για τις πολυυπολειμματικές μεθόδους μπορούν να χρησιμοποιηθούν αντιπροσωπευτικά υποστρώματα, όπως για τα μηλοειδή το μήλο, το πορτοκάλι για τα εσπεριδοειδή κ.λπ.. Σύμφωνα με το Ε.ΣΥ.Δ. ένα εργαστήριο μπορεί να έχει πολυδύναμη μέθοδο επικυρώνοντας αρχικά το 20% των Φ.Π. μιας χημικής ομάδας, τα οποία όμως θα καλύπτουν όλο το εύρος των φυσικοχημικών ιδιοτήτων. Για τον κάθε αναλύτη θα πρέπει

γίνουν φορτίσεις σε δύο επίπεδα κατ' ελάχιστο. Το ένα επίπεδο θα πρέπει να είναι στο επίπεδο αναφοράς και ένα άλλο μεγαλύτερο στο MRL. Για το κάθε επίπεδο απαιτούνται τουλάχιστον πέντε επαναλήψεις. Με τον υπολογισμό της **μέσης τιμής ανάκτησης** (% *Mean recovery*), της **τυπικής απόκλισης** (*Standard deviation*) και της **σχετικής τυπικής απόκλισης** (*Relative standard deviation %*) και χρησιμοποιώντας τα κριτήρια για ποσοτικές μεθόδους μπορούμε να αξιολογήσουμε τη μέθοδο για κάθε ουσία.

Οι πρότυπες ουσίες που θα χρησιμοποιηθούν θα πρέπει να είναι γνωστής καθαρότητας, να συνοδεύονται από πιστοποιητικό και να καταγράφεται σε αυτά ημερομηνία παραλαβής και λήξης. Η αποθήκευσή τους θα πρέπει να γίνεται σύμφωνα με τις οδηγίες του προμηθευτή έτσι ώστε να ελαχιστοποιείται η υποβάθμιση. Για το λόγο αυτό συνιστάται η αποθήκευση να γίνεται σε χαμηλές θερμοκρασίες, όπως -20 °C. Τα **πρότυπα διαλύματα** (*Stock solutions*) παρασκευάζονται με μεγάλη προσοχή με τη ζύγιση κατάλληλης ποσότητας από τις πρότυπες ουσίες αναφοράς. Δεν πρέπει να ζυγίζονται ποσότητες μικρότερες των 0.01 g ή 10 mg. Από τα πρότυπα διαλύματα παρασκευάζονται τα διαλύματα εργασίας με κατάλληλο διαλύτη ή διαλύτες για την ουσία και τη μέθοδο. Τα διαλύματα συγκέντρωσης 10 mg/ L διατηρούνται για το χρονικό διάστημα των έξι μηνών. (EURACHEM Guide, 1998 και Λαμπή, 2003)

Στη συνέχεια, αναφέρονται τα κυριότερα χαρακτηριστικά ποιότητας, η περιγραφή του τρόπου μελέτης και της αξιολόγησης για την επικύρωση των αναλυτικών μεθόδων.

### 3.4.1. Ορθότητα της αναλυτικής μεθόδου

Η **ορθότητα** (*Accuracy*) συνήθως ελέγχεται με πειράματα ανάκτησης αναλύοντας δείγματα που έχουν εμβολιαστεί με τη δραστική ουσία (εμβολιασμένα ή φορτισμένα δείγματα) (*Fortified samples*). Γνωστή ποσότητα του υπό μελέτη Φ.Π. προστίθεται σε ένα ομογενοποιημένο δείγμα μάρτυρα και το δείγμα αναλύεται με την υπό δοκιμή μέθοδο και προσδιορίζεται η συγκέντρωση των υπολειμμάτων που περιέχονται σε αυτό. Η ποσότητα της δραστικής ουσίας που θα προσδιοριστεί συγκρίνεται με την ποσότητα της δραστικής ουσίας που έχει προστεθεί και εκφράζεται ως ποσοστό %. Ποσοστό ανάκτησης 100% είναι η ιδανική περίπτωση, όμως αυτό δεν είναι πάντα δυνατόν. Τα αποδεκτά εύρη ανάκτησης για αναλύσεις υπολειμμάτων, σύμφωνα με τις Οδηγίες της Ευρωπαϊκής Ένωσης (SANCO/10232/2006), κυμαίνονται από 70% έως 110%. Για ορισμένες δύσκολες περιπτώσεις μπορεί να γίνουν αποδεκτές ανακτήσεις της τάξεως 60 – 140%. Η ανάκτηση μπορεί να υπολογιστεί και ως ο λόγος των κλίσεων των καμπυλών

βαθμονόμησης χρησιμοποιώντας σειρά εμβολιασμένων δειγμάτων και καθαρών διαλυμάτων του αναλύτη.

### 3.4.2. Πιστότητα της αναλυτικής μεθόδου

Η **πιστότητα** ή **ακρίβεια** (*Precision*) των αποτελεσμάτων εκφράζεται με την **επαναληψιμότητα** (*Repeatability*) και την **αναπαραγωγιμότητα** (*Reproducibility*). Η επαναληψιμότητα είναι η δυνατότητα της μεθόδου να επιτυγχάνονται επαναλήψιμα αποτελέσματα από τον ίδιο τον αναλύτη κάτω από τις ίδιες συνθήκες. Για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας πρέπει να γίνουν τουλάχιστον 3-5 ίδιες επαναλήψεις των πειραμάτων ανάκτησης. Η επαναληψιμότητα εκτιμάται με την % σχετική τυπική απόκλιση (RSD). Η αναπαραγωγιμότητα είναι η ικανότητα της αναπαραγωγής των αποτελεσμάτων από άλλους αναλυτές στο ίδιο εργαστήριο σε μεγάλο χρονικό διάστημα (1-3 εβδομάδες) ή και από άλλα ανεξάρτητα εργαστήρια. Εκτιμάται με την % σχετική τυπική απόκλιση (RSD) των αποτελεσμάτων, είτε με αναλύσεις εμβολιασμένων δειγμάτων ή και με επαναλήψεις αναλύσεων πραγματικών δειγμάτων.

### 3.4.3. Ανιχνευσιμότητα της αναλυτικής μεθόδου

Όταν ένα δείγμα περιέχει έναν αναλύτη σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση, κατά τον προσδιορισμό του αναλύτη αυτού με μια μέθοδο, το αναλυτικό σήμα θα είναι πολύ μικρό. Έτσι, είναι δύσκολο να αποφασισθεί εάν το πολύ μικρό αναλυτικό σήμα προέρχεται από τον αναλύτη ή από τον αναπόφευκτο θόρυβο (σήμα υποβάθρου), που προκαλείται από τη μέθοδο ή το όργανο. Αυτή η αβεβαιότητα οδήγησε στην καθιέρωση του Ορίου Ανίχνευσης.

Το **όριο ανίχνευσης** (*Limit of Detection – LOD*), είναι η ελάχιστη συγκέντρωση του αναλύτη στο δείγμα που μπορεί να ανιχνευθεί ποιοτικά με την εν χρήσει μέθοδο. Εάν ο αναλυτής δεν έχει χρωματογραφική απόκριση για κάποια δραστική ουσία σε αναλυόμενο δείγμα, αυτό δε σημαίνει ότι το δείγμα δεν περιέχει καθόλου την εν λόγω δραστική ουσία αλλά ότι αυτή μπορεί να βρίσκεται σε συγκέντρωση που να μην είναι δυνατή η ανίχνευσή της με τη συγκεκριμένη αναλυτική μεθοδολογία. Επομένως δε χρησιμοποιούμε ποτέ τον όρο «μηδέν υπολείμματα», αλλά τον όρο «μη ανιχνεύσιμα υπολείμματα».

Για τον προσδιορισμό του ορίου ανίχνευσης χρησιμοποιούνται διάφορες προσεγγίσεις, οι οποίες εξαρτώνται από το εάν η αναλυτική μέθοδος είναι ενόργανη ή μη ενόργανη. Μια προσέγγιση είναι με βάση την **οπτική αξιολόγηση** (*Visual evaluation*) που μπορεί να χρησιμοποιηθεί και στα δύο είδη αναλυτικών μεθόδων. Ο προσδιορισμός του ορίου ανίχνευσης γίνεται με την ανάλυση δειγμάτων του αναλύτη γνωστής συγκέντρωσης και τον καθορισμό του ελάχιστου επιπέδου συγκέντρωσης στο οποίο ο αναλύτης μπορεί να ανιχνευθεί αξιόπιστα. Με βάση το **λόγο σήμα προς θόρυβο** (*Signal to Noise – S/N*). Η προσέγγιση αυτή εφαρμόζεται μόνο σε αναλυτικές μεθόδους οι οποίες παρουσιάζουν **θόρυβο γραμμής βάσεως** (*Baseline noise*). Πρακτικά, θεωρούμε ως όριο ανίχνευσης την ποσότητα του αναλύτη που μας δίνει σήμα τριπλάσιο από το θόρυβο του χρωματογραφικού σήματος ( $S/N = 3.3$ ). Ένας άλλος τρόπος που προκύπτει το LOD είναι με βάση την **τυπική απόκλιση** (*SD*) **της αναλυτικής απόκρισης** (*Response*) και την **κλίση** (*Slope – b*) **της καμπύλης αναφοράς**. Ο υπολογισμός γίνεται με την ακόλουθη σχέση:

$$LOD = (3.3 * SD) / b$$

Η τυπική απόκλιση μπορεί να υπολογιστεί με δυο τρόπους. Με βάση την **τυπική απόκλιση του λευκού** (*Standard deviation of blank*), η οποία επιτυγχάνεται με την ανάλυση ικανοποιητικού αριθμού λευκών δειγμάτων και τον υπολογισμό της τυπικής απόκλισης των αντίστοιχων αποκρίσεων, και με βάση την **καμπύλη αναφοράς**, όπου κατασκευάζεται μια ειδική καμπύλη αναφοράς χρησιμοποιώντας δείγματα που περιέχουν τον αναλύτη στην περιοχή συγκεντρώσεων του LOD. Η **τυπική απόκλιση της ευθείας παλινδρόμησης** (*Residual standard deviation –  $S_{y/x}$* ) ή η **τυπική απόκλιση της τομής στον άξονα των Y** (*Standard deviation of the Y – Intercept –  $S_a$* ), μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως η τυπική απόκλιση για τον υπολογισμό του LOD.

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

#### 3.4.4. Εκλεκτικότητα και Ειδικότητα της αναλυτικής μεθόδου

Στην ποσοτική ανάλυση ο προσδιορισμός ενός συστατικού σε ένα μίγμα μπορεί να παρεμποδίζεται από άλλα συστατικά του μίγματος. Επομένως, ως **εκλεκτικότητα** (*Selectivity*) ορίζεται η ικανότητα της μεθόδου να προσδιορίζει έναν αναλύτη παρουσία άλλων ουσιών, ενώ **ειδικότητα** (*Specificity*) είναι η ικανότητα της μεθόδου για ακριβή ποσοτικό προσδιορισμό πολλών ουσιών σε ένα μίγμα. Εάν μια μέθοδος δεν παρέχει επαρκή εκλεκτικότητα, συνεπώς και ειδικότητα, αυτό μπορεί να επιτευχθεί με συνδυασμό αναλυτικών μεθόδων και διαδικασιών, όπως ο καθαρισμός του δείγματος, ο χρωματογραφικός διαχωρισμός και η φασματομετρία μάζας.

#### 3.4.5. Γραμμικότητα του ανιχνευτή

Συνήθως οι ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται στους προσδιορισμούς των υπολειμμάτων Φ.Π. είναι απαραίτητο να ελεγχθούν ως προς τα εύρη των συγκεντρώσεων των ενέσιμων διαλυμάτων στα οποία η απόκριση των ανιχνευτών είναι ανάλογη της πραγματικής συγκέντρωσης στο δείγμα, δηλαδή ως προς την γραμμικότητά τους (*Linearity*). Ο έλεγχος γίνεται με την έγχυση πρότυπων διαλυμάτων και τη χάραξη της καμπύλης αναφοράς του χρωματογραφικού σήματος. Η καμπύλη αναφοράς συνήθως είναι ευθεία γραμμή με συντελεστή προσδιορισμού  $R^2 \geq 0.98$ . Συνήθως προτιμάται το 0.99, αλλά και το 0.98 είναι επίσης αποδεκτό. Το  $R^2$  είναι εξαρτώμενο από τις ανάγκες της μεθόδου και τις οδηγίες των διαφόρων φορέων. Όλες οι τιμές της καμπύλης αναφοράς θα πρέπει να βρίσκονται σε μια στενή ζώνη συγκεντρώσεων ( $\times 100$ ). Οι τιμές των συγκεντρώσεων που είναι έξω από αυτή τη ζώνη δεν πρέπει να θεωρούνται ως αποδεκτές για μια κανονική περιοχή εργασίας.

#### 3.4.6. Εύρος των μετρήσεων

Τα εύρος (*Range*) των μετρήσεων προκύπτει από τη μελέτη της γραμμικότητας και εξαρτάται από το σκοπό για τον οποίο εφαρμόζεται η μέθοδος. Με την επιβεβαίωση αποδεικνύεται ότι η αναλυτική μέθοδος παρέχει ένα αποδεκτό βαθμό γραμμικότητας, ακρίβειας και επαναληψιμότητας, όταν εφαρμόζεται σε δείγματα των οποίων οι συγκεντρώσεις κυμαίνονται εντός της καθοριζόμενης περιοχής της αναλυτικής μεθόδου.

### 3.4.7. Ανθεκτικότητα της αναλυτικής μεθόδου

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

### 3.4.8. Ασφάλεια της αναλυτικής μεθόδου

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

### 3.4.9. Κόστος της αναλυτικής μεθόδου

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

### 3.4.10. Καταγραφή των στοιχείων επικύρωσης

Τα στοιχεία επικύρωσης των μεθόδων καταγράφονται και φυλάσσονται στο αρχείο μαζί με τα πειραματικά στοιχεία. Παρουσιάζονται με μορφή πινάκων ώστε να γίνεται εύκολα η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων. Τα στοιχεία που τηρούνται είναι: οι ημερομηνίες πραγματοποίησης των επικυρώσεων, το προσωπικό που τις πραγματοποίησε και τότε συντρέχουν λόγοι επανεπικύρωσης.

### 3.5. Αβεβαιότητα των μεθόδων προσδιορισμού υπολειμμάτων Φ.Π.

Τα εργαστήρια υποχρεούνται μαζί με το αποτέλεσμα να δηλώνουν και την αβεβαιότητα, ειδικά για τις περιπτώσεις που υπάρχει υπέρβαση. Μπορούν να χρησιμοποιήσουν τη δική τους αβεβαιότητα ή τη διευρυμένη, όπως έχει αποφασιστεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση.

Η EURACHEM ορίζει την **αβεβαιότητα** (*Uncertainty*) ως μια παράμετρο που συνδέεται με το αποτέλεσμα μιας μέτρησης και χαρακτηρίζει τη διασπορά των τιμών που λογικά μπορούν να αποδοθούν στο προσδιοριζόμενο συστατικό. Στην περίπτωση που η αβεβαιότητα εκφράζεται ως τυπική απόκλιση, τότε αναφέρεται ως **τυπική αβεβαιότητα** (*Standard uncertainty –  $u$* ). Η αβεβαιότητα χαρακτηρίζεται ως **συνδυασμένη τυπική αβεβαιότητα** (*Combined standard uncertainty –  $u_c$* ) όταν προκύπτει από το συνδυασμό των τυπικών αβεβαιοτήτων και δίνεται ως η τετραγωνική ρίζα του αθροίσματος των τετραγώνων κάθε συνιστώσας, σταθμισμένων ανάλογα με το πώς μεταβάλλεται το αποτέλεσμα της μέτρησης από συνιστώσες. Η **διευρυμένη αβεβαιότητα** (*Expanded uncertainty –  $U$* ) χρησιμοποιείται για να καλύψει τις απαιτήσεις των τελικών χρηστών της μέτρησης και εκφράζει ένα μεγαλύτερο διάστημα από τη συνδυασμένη τυπική αβεβαιότητα, στο οποίο η τιμή του μετρούμενου μεγέθους έχει μεγαλύτερη πιθανότητα να υπάρξει. Υπολογίζεται πολλαπλασιάζοντας τη συνδυασμένη αβεβαιότητα με ένα **συντελεστή κάλυψης** (*Coverage factor*)  **$k$** , ο οποίος είναι ίσος με 2 στις χημικές μετρήσεις και αντιστοιχεί σε επίπεδο εμπιστοσύνης 95%.

Όταν οι αναλυτές μετρούν τη συγκέντρωση μιας ουσίας σε ένα δείγμα πρέπει να γνωρίζουν ότι το αποτέλεσμα που λαμβάνουν είναι μόνο μια εκτίμηση της πραγματικής τιμής. Η απόκλιση μεταξύ της πραγματικής τιμής και της μέτρησης οφείλεται σε κάποια συστηματικά (σταθερά ή αναλογικά) και τυχαία σφάλματα που αναπόφευκτα υπάρχουν.



Τα σφάλματα αυτά είναι:

- Το συστηματικό σφάλμα της μεθόδου (*Method bias*)
- Το συστηματικό σφάλμα του εργαστηρίου (*Laboratory bias*)
- Το σφάλμα από δείγμα σε δείγμα (*Run error*), το οποίο είναι τυχαίο και οφείλεται μεταξύ των άλλων παραγόντων και στον παράγοντα χρόνο. Συμπεριλαμβάνεται στην ενδοεργαστηρική αναπαραγωγικότητα.
- Το σφάλμα επαναληψιμότητας (*Reproducibility error*), το οποίο είναι τυχαίο και προέρχεται από τις επαναληπτικές αναλύσεις του δείγματος.

Μια διευκρίνιση η οποία είναι απαραίτητο να γίνει είναι ότι το **σφάλμα** είναι η διαφορά από την πραγματική τιμή, ενώ η **αβεβαιότητα** είναι το εύρος στο οποίο βρίσκεται με αξιοπιστία η μέτρησή μας σε ένα δεδομένο επίπεδο εμπιστοσύνης.

Οι πιθανές πηγές αβεβαιότητας που συναντώνται στις χημικές μετρήσεις προέρχονται συνήθως από τα ακόλουθα στάδια της ανάλυσης:

1. Ατελής ορισμός του προσδιοριζόμενου συστατικού, δηλαδή αποτυχία στο να οριστεί με ακρίβεια η μορφή του προσδιοριζόμενου υλικού.
2. Δειγματοληψία (ανομοιογένεια του δείγματος, λανθασμένη στρατηγική δειγματοληψίας, αλλοίωση του δείγματος).
3. Προκατεργασία του δείγματος (ατελής παραλαβή, επιμόλυνση, προσυγκέντρωση του προσδιοριζόμενου συστατικού, επίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων κ.α.).
4. Ανάλυση πιστοποιημένων υλικών αναφοράς και σύγκρισή τους με το δείγμα (Αβεβαιότητα πιστοποιημένης τιμής).
5. Βαθμονόμηση του οργάνου μέτρησης (Αβεβαιότητα στις περιεκτικότητες των πρότυπων ουσιών και των υλικών αναφοράς).
6. Τελική μέτρηση (Παρεμποδίσσεις, συστηματικά σφάλματα χειριστή κ.α.).
7. Επεξεργασία αποτελεσμάτων και παρουσίασή τους (Στρογγυλοποίηση).
8. Ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

Η επικύρωση μιας αναλυτικής μεθόδου όπως προαναφέρθηκε και αναλύθηκε δίνει στοιχεία για την αβεβαιότητα από τα επιμέρους τμήματά της, τα οποία είναι η ανάλυση δείγματος υπό συνθήκες ενδοεργαστηριακής επαναληψιμότητας ή αναπαραγωγικότητας, η ανάλυση πιστοποιημένων υλικών αναφοράς, η καμπύλη αναφοράς, η ανθεκτικότητα και η εκλεκτικότητα.

Ο οδηγός της EURACHEM περιλαμβάνει τα εξής στάδια εκτίμησης της αβεβαιότητας:

1. Προδιαγραφή του μετρούμενου συστατικού, που στην πράξη σημαίνει καταγραφή του τι ακριβώς μετράται και διατύπωση μιας ποσοτικής σχέσης μεταξύ της συγκέντρωσης του προσδιοριζόμενου συστατικού και των παραμέτρων από τις οποίες υπολογίζεται και εξαρτάται. Σημασία έχει το είδος της μεθόδου που χρησιμοποιείται.
2. Ταυτοποίηση των πηγών αβεβαιοτήτων
3. Ποσοτικοποίηση της τυπικής αβεβαιότητας κάθε πηγής
4. Υπολογισμός της συνδυασμένης αβεβαιότητας

### 3.5.1. Ποσοτικοποίηση της τυπικής αβεβαιότητας κάθε πηγής

Κατά την ανάπτυξη και επικύρωση μιας μεθόδου πραγματοποιούνται μια σειρά πειραμάτων ανάκτησης, επαναληψιμότητας, ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας, ανάλυσης υλικών αναφοράς, σύγκρισης της μεθόδου με μια πρότυπη μέθοδο και δοκιμών ομοιογένειας για τη διερεύνηση αντιπροσωπευτικής δειγματοληψίας. Τα δεδομένα που λαμβάνονται από αυτά τα πειράματα χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό της αβεβαιότητας. Έτσι έχουμε τον υπολογισμό των ακόλουθων αβεβαιοτήτων:

✓  $U_1$  – Αβεβαιότητα που συνδέεται με την προετοιμασία των Προτύπων Διαλυμάτων Αναφοράς (Standard Solutions) ( $U_1 = u_{Cj}$ ):

Η αβεβαιότητα της προετοιμασίας των προτύπων διαλυμάτων αναφοράς συνδέεται με την προετοιμασία κάθε προτύπου βαθμονόμησης ( $u(C_j)$ ) που υπολογίζεται λαμβάνοντας υπόψη την αβεβαιότητα της συγκέντρωσης των Προτύπων Διαλυμάτων (Stock Solutions) ( $u(C_{Stock})$ ), την αβεβαιότητα του όγκου των προτύπων διαλυμάτων που λήφθηκε για την παρασκευή των προτύπων διαλυμάτων αναφοράς ( $u(V_{Stock})$ ) και την αβεβαιότητα του όγκου της ογκομετρικής φιάλης ( $u(V_{flask})$ ), ως εξής:

$$u(C_i) = C_i \times \sqrt{\left(\frac{u(C_{stock})}{C_{stock}}\right)^2 + \left(\frac{u(V_{stock})}{V_{stock}}\right)^2 + \left(\frac{u(V_{flask})}{V_{flask}}\right)^2}$$

$$\text{όπου: } u(C_{stock}) = C_{stock} \sqrt{\left(\frac{u(m_{comp})}{m_{comp}}\right)^2 + \left(\frac{u(V_{dil})}{V_{dil}}\right)^2},$$

λαμβάνοντας υπόψη την αβεβαιότητα της μάζας της ουσίας που ζυγίστηκε ( $u(m_{comp})$ ) και την αβεβαιότητα του διαλυτού όγκου ( $u(V_{dil})$ ).

✓  **$U_2$  – Αβεβαιότητα που συνδέεται με την Καμπύλη Αναφοράς ( $U_2 = u(x_0)$ ):**

$$u(x_0) = \frac{S_y}{b} \times \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{b^2 \times \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}}$$

όπου:

$S_y$  = η τυπική απόκλιση των τιμών  $y$  που προκύπτουν από τη γραμμική συσχέτιση,

$b$  = η κλίση της καμπύλης αναφοράς

$N$  = ο αριθμός των προτύπων που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς

$n$  = ο αριθμός των επαναλήψεων κατά τη μέτρηση του άγνωστου δείγματος

$y_0$  = ο μέσος όρος των αποκρίσεων αυτών των επαναλήψεων

$\bar{y}$  = ο μέσος όρος των αποκρίσεων των προτύπων διαλυμάτων

$\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2$  = είναι το ποσό της υπολογισθείσας συγκέντρωσης, που προκύπτει από την καμπύλη αναφοράς, μείον τη μέση συγκέντρωση των προτύπων που χρησιμοποιούνται στην καμπύλη αναφοράς.

$x_j$  = η συγκέντρωση κάθε πρότυπου διαλύματος

$\bar{x}$  = ο μέσος όρος των συγκεντρώσεων των προτύπων διαλυμάτων

✓  **$U_3$  – Αβεβαιότητα που συνδέεται με την πιστότητα ( $U_3 = u(p)$ ):**

$$u(p) = \frac{s_n}{\sqrt{n}}$$

όπου:

$s_n$  = η τυπική απόκλιση των πειραματικών στοιχείων της πιστότητας

$n$  = ο αριθμός των δοκιμών

✓  $U_4$  – Αβεβαιότητα που συνδέεται με την ορθότητα ( $U_4 = u_{(REC)}$ ):

$$u(Rec) = \frac{s_{Rec}}{\sqrt{n}}$$

όπου:

$s_{REC}$  = η τυπική απόκλιση του επιπέδου της ανάκτησης

$n$  = ο αριθμός των δοκιμών

✓ Η Συνδυασμένη Τυπική Αβεβαιότητα ( $u_{C(X)}$ ) υπολογίζεται ως εξής :

$$u_c(X) = \sqrt{U_1^2 + U_2^2 + U_3^2 + U_4^2}.$$

(EURACHEM Guide, 1998 & EURACHEM/CITAC Guide, 2000)

### 3.5.2. Υπολογισμός της Διευρυμένης Αβεβαιότητας

Η διευρυμένη αβεβαιότητα (*Expanded uncertainty* –  $U$ ) υπολογίζεται χρησιμοποιώντας έναν συντελεστή κάλυψης  $k = 2$ , που αντιστοιχεί σε επίπεδο εμπιστοσύνης 95%. Ο υπολογισμός της γίνεται από την ακόλουθη σχέση (EURACHEM Guide, 1998 & EURACHEM/CITAC Guide, 2000):

$$U = (u_{C(X)}) * k$$

Κλείνοντας, μπορούμε να πούμε ότι η διαπίστευση των εργαστηρίων είναι απαίτηση της σημερινής εποχής, η οποία προσφέρει ισότιμη αναγνώριση με εργαστήρια άλλων χωρών και επισφράγιση της Διεθνούς αποδοχής των δραστηριοτήτων. Στο προσωπικό που εφαρμόζει τις διαδικασίες προσφέρει οργανωμένη δουλειά και σιγουριά για τις ενέργειες και τα παραγόμενα αποτελέσματα, καθώς ο πελάτης λαμβάνει την πιστοποίηση για την επάρκεια του εργαστηρίου.

# ΑΝΑΛΥΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## 4. Σκοπός της μελέτης

**Σκοπός** αυτής της εργασίας ήταν η εφαρμογή του αναλυτικού προτύπου ISO /IEC 17025 στον προσδιορισμό των υπολειμμάτων δραστικών ουσιών που χαρακτηρίζονται ως φυτοπροστατευτικά προϊόντα νέας γενιάς παράλληλα με τον ταυτόχρονο προσδιορισμό και μερικών κλασικών δραστικών ουσιών σε τρία πολύ δημοφιλή για την Ελλάδα υποστρώματα (τομάτα, σταφύλι και μήλο), εφαρμόζοντας τη μεθοδολογία της εκχύλισης με ακετόνη (*Analytical Methods for Pesticide Residues, Ministry of Public Health, Welfare, Health and Sport, The Netherlands, 1996.*). Η τεχνική αυτή της εκχύλισης ακολουθείται σήμερα από το Εργαστήριο Υπολειμμάτων του Περιφερειακού Κέντρου Προστασίας Φυτών και Ποιοτικού Ελέγχου Βόλου, όπως και από τα περισσότερα Εργαστήρια Υπολειμμάτων του Υπουργείου Γεωργίας και εφαρμόζεται στον έλεγχο των υπολειμμάτων Φ.Π. σε περιορισμένο αριθμό δραστικών ουσιών ανά Περιφερειακό Κέντρο.

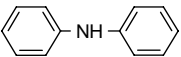
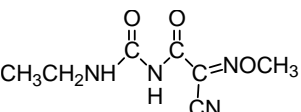
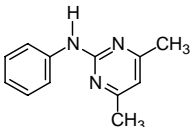
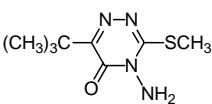
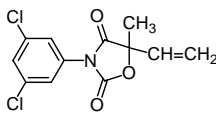
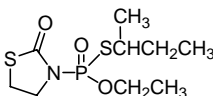
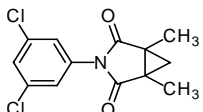
Συγκεκριμένα, το Εργαστήριο Υπολειμμάτων του Περιφερειακού Κέντρου Προστασίας Φυτών και Ποιοτικού Ελέγχου Βόλου, στο οποίο πραγματοποιήθηκε το μεγαλύτερο μέρος της εργαστηριακής εργασίας της διατριβής, είναι διαπιστευμένο κατά ΕΛΟΤ EN ISO/ IEC17025 για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων 17 δραστικών ουσιών σε φυτικά υποστρώματα. Οι περισσότερες από αυτές τις ουσίες είναι οργανοφωσφορικά και οργανοχλωριωμένα Φ.Π., παλιάς δηλαδή γενιάς γεωργικά φάρμακα. Ιδιαίτερα με τον περιορισμό του αριθμού των οργανοφωσφορικών δραστικών ουσιών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σήμερα, σε λίγα μόνο οργανοφωσφορικά χρειάζεται εμπλουτισμός των προς προσδιορισμό ουσιών για τον έλεγχο των φυτικών προϊόντων, ενώ η προσθήκη επιπλέον εντομοκτόνων μορίων και νέων μυκητοκτόνων, που έχουν κυκλοφορήσει τα τελευταία χρόνια είναι επιτακτική ανάγκη.

Η εργασία λοιπόν αυτή κινήθηκε στο πλαίσιο της διεύρυνσης του αριθμού των δραστικών ουσιών για τις οποίες είναι δυνατός ο προσδιορισμός των υπολειμμάτων τους με τη χρησιμοποιούμενη αεριοχρωματογραφική πολυυπολειμματική μέθοδο ανάλυσης φυτικών υποστρωμάτων με δύο άξονες. Ο πρώτος άξονας αφορά τη διεύρυνση με νέες δραστικές ουσίες που εφαρμόζονται στη φυτοπροστασία τα τελευταία χρόνια, όπως τα μυκητοκτόνα *azoxystrobin*, *kresoxim methyl*, *fenhexamid*, *fludioxonil*, *pyrimethanil*, τα εντομοκτόνα *indoxacarb* και *pyriproxyfen* και το νηματωδοκτόνο *fosthiazate*. Ο δεύτερος άξονας αφορά την προσθήκη μερικών επιπλέον κλασικών δραστικών ουσιών (των

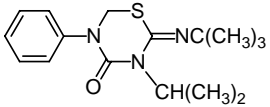
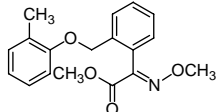
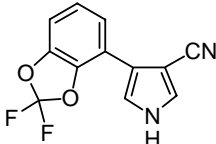
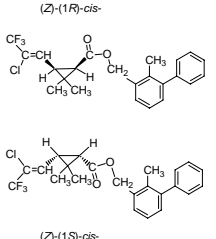
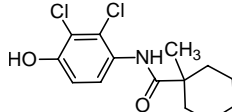
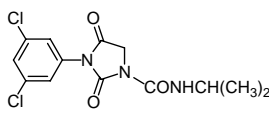
εντομοκτόνων πυρεθρινών *bifenthrin* και *lambda-cyhalothrin*, του ζιζανιοκτόνου *metribuzin*, των βοτρυδοκτόνων *iprodione*, *procymidone*, *vinclozolin*, του εντομοκτόνου *buprofezin*, καθώς και της μετασυλλεκτικά χρησιμοποιούμενης στα μήλα *diphenylamine*, οι οποίες όπως και αυτές της νέας γενιάς, δεν περιλαμβάνονται μεταξύ των δραστικών ουσιών για τον προσδιορισμό των οποίων είναι διαπιστευμένο το Εργαστήριο Υπολειμμάτων του Περιφερειακού Κέντρου Προστασίας Φυτών και Ποιοτικού Ελέγχου Βόλου. Επιπλέον, όπως φαίνεται και από τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των δραστικών ουσιών στόχων της εργασίας υπάρχουν μόρια με διαφορετικά χαρακτηριστικά, όπως με μεγάλο εύρος υδατοδιαλυτότητας, (από τα πολύ ευδιάλυτα *fosthiazate* και *metribuzin* μέχρι τα παρουσιάζοντα ελάχιστη διαλυτότητα *bifenthrin* και *lambda-cyhalothrin*) και υδροφοβικότητας (log Kow από 1.6 για το *metribuzin* μέχρι 7.0 για το *lambda-cyhalothrin*). Έτσι με την επιλογή αυτή καλύπτεται μεγάλο εύρος φυσικοχημικών χαρακτηριστικών για τις προς προσδιορισμό ουσίες. Οι δραστικές ουσίες στόχοι της εργασίας καθώς και τα ιδιαίτερα φυσικοχημικά τους χαρακτηριστικά παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.1.

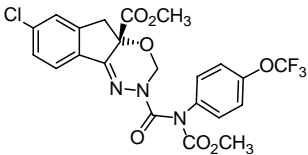
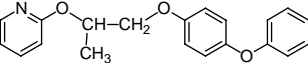
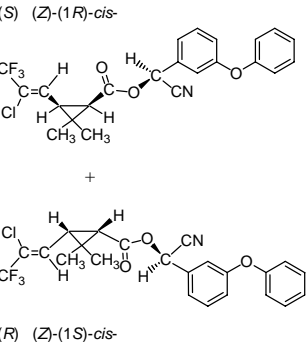
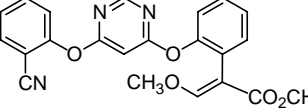
Τα επιλεγμένα υποστρώματα, πέραν του ότι είναι από τα πλέον δημοφιλή στην ελληνική αγορά φυτικά προϊόντα τα οποία καταναλώνονται σε αρκετά μεγάλες ποσότητες από όλες τις ομάδες του πληθυσμού, αντιπροσωπεύουν ως προς τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες στην αναλυτική προσέγγιση ένα ευρύ φάσμα φυτικών προϊόντων. Σύμφωνα λοιπόν με τις οδηγίες του Ε.ΣΥ.Δ η επικύρωση αναλυτικής μεθόδου σε υπόστρωμα τομάτας καλύπτει την ανάγκη ανάλυσης και άλλων υποστρωμάτων λαχανικών, όπως η πιπεριά και η μελιτζάνα. Η επικύρωση μεθόδου σε υπόστρωμα μήλου καλύπτει την ανάγκη ανάλυσης και άλλων υποστρωμάτων φρούτων, όπως το αχλάδι, το κυδώνι και τα μούσμουλα, ενώ στην περίπτωση του σταφυλιού καλύπτονται τα μούρα και οι μικροί καρποί (*Berries*), όπως οι φράουλες, τα σμέουρα, τα μύρτιλλα, τα φραγκοστάφυλα, τα βατόμουρα κ.α.

**Πίνακας 4.1:** Φ.Π. που αναλύθηκαν και μελετήθηκαν στην παρούσα μελέτη και τα φυσικοχημικά τους χαρακτηριστικά.

Δραστική ουσία	Χημική δομή	Χημική ομάδα/ Χρήση	Βιολογικός τρόπος δράσης	Vapour Pressure (mPa)	Solubility in Water (mg/L)	log $K_{ow}$
<i>diphenylamine</i> (M.B. 169.2)		Φαινυλοβενζαμίδια/ Μυκητοκτόνο	Συνθετικές ενώσεις με φυτορυθμιστική δράση	0.0215 (20°C)	40 (25°C)	
<i>cymoxanil</i> (M.B. 198.2)		Ακεταμίδια/ Μυκητοκτόνο	Παρεμποδιστές της βιοσύνθεσης του DNA	0.15 (20°C)	890 mg/ Kg (pH 5, 20°C)	0.59 (pH 5.0) 0.67 (pH 7.0)
<i>pyrimethanil</i> (M.B. 199.3)		Ανιλινοπυριμιδίνες/ Μυκητοκτόνο	Παρεμποδιστές της έκκρισης άλλων λυτικών ενζύμων (Αντιπαθογονικά)	2.2 (25°C)	121 (pH 6.1, 25°C)	2.84 (pH 6.1, 25°C)
<i>metribuzin</i> (M.B. 214.3)		1,2,4-Τριαζινόνες/ Ζιζανιοκτόνο	Παρεμποδιστές του φωτοσυστήματος II	0.058 (25°C)	1050 (21°C)	1.6 (pH 5.6, 20°C)
<i>vinclozolin</i> (M.B. 286.1)		Δικαρβοξιμιδικά/ Μυκητοκτόνο	Ενώσεις που προκαλούν βλάβες στη δομή των κυτταρικών μεμβρανών	0.13 (20°C)	2.6 (20°C)	3.00 (pH 7)
<i>fosthiazate</i> (M.B. 283.3)		Οργανοφωσφορικά/ Νηματωδοκτόνο, Εντομοκτόνο	Μη αναστρέψιμη παρεμπόδιση του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση	0.56 (25°C)	9850 (20°C)	1.68
<i>procymidone</i> (M.B. 284.1)		Δικαρβοξιμιδικά/ Μυκητοκτόνο	Ενώσεις που προκαλούν βλάβες στη δομή των κυτταρικών μεμβρανών	18 (25 °C) 10.5 (20 °C)	4.5 (25°C)	3.14 (25°C)



Δραστική ουσία	Χημική δομή	Χημική ομάδα/ Χρήση	Βιολογικός τρόπος δράσης	Vapour Pressure (mPa)	Solubility in Water (mg/L)	log K <sub>ow</sub>
<i>buprofezin</i> (M.B. 305.4)		Αζίνες/ Εντομοκτόνο, Ακαρεοκτόνο	Συνθετικές οργανικές ενώσεις με δράση στη βιοσύνθεση της χιτίνης	1.25 (25°C)	0.9 (25°C)	4.3
<i>kresoxim – methyl</i> (M.B. 313.4)		Μεθοξυιμινοοξικά/ Μυκητοκτόνο	Παρεμποδιστές του συμπλόκου ΙΙΙ της αναπνευστικής αλυσίδας	0.0023 (20°C)	2.0 (20°C)	3.4 (pH 7.0, 25°C)
<i>fludioxonil</i> (M.B. 248.2)		Φαινολοπυρολικά/ Μυκητοκτόνο	Ενώσεις που προκαλούν βλάβες στη δομή των κυτταρικών μεμβρανών	0.00039 (25°C)	1.8 (25°C)	4.12 (25°C)
<i>bifenthrin</i> (M.B. 422.9)		Πυρεθρινοειδή/ Εντομοκτόνο, Ακαρεοκτόνο	Παρεμπόδιση των νευρικών σημάτων προσυναπτικά (παρατεταμένο άνοιγμα των διαύλων νατρίου)	0.024 (25°C)	<0.001	>6.0
<i>fenhexamid</i> (M.B. 302.2)		Υδροξυανιλίδες/ Μυκητοκτόνο	Παρεμποδιστές βιοσύνθεσης εργοστερόλης (EBIs)	0.0004 (20°C)	20 (pH 5.0-7.0, 20°C)	3.51 (pH 7.0, 20°C)
<i>iprodione</i> (M.B. 330.2)		Δικαρβοξυμιδικά/ Μυκητοκτόνο	Ενώσεις που προκαλούν βλάβες στη δομή των κυτταρικών μεμβρανών	0.0005 (25°C)	13 (20°C)	3.0 (pH 7.0 & 5.0)

Δραστική ουσία	Χημική δομή	Χημική ομάδα/ Χρήση	Βιολογικός τρόπος δράσης	Vapour Pressure (mPa)	Solubility in Water (mg/L)	log $K_{ow}$
<i>indoxacarb</i> (M.B. 527.8)		Οξαδιαζινόνες/ Εντομοκτόνο	Δράση στο νευρικό σύστημα (παρόμοιος με αυτόν των πυρεθρινοειδών, στις διαλύσεις ιόντων νατρίου)	0.000025 (25°C)	0.2 (25°C)	4.65
<i>pyriproxyfen</i> (M.B. 321.4)		Ενώσεις που μιμούνται τη δράση της νεανικής ορμόνης/ Εντομοκτόνο	Ενώσεις που επηρεάζουν τη λειτουργία του ενδοκρινικού συστήματος (Ρυθμιστές ανάπτυξης, <i>IGRs</i> )	<0.013 (23°C)		5.37
<i>lambda – cyhalothrin</i> (M.B. 449.9)		Πυρεθρινοειδή/ Εντομοκτόνο	Παρεμπόδιση των νευρικών σημάτων προσυναπτικά (παρατεταμένο άνοιγμα των διαύλων νατρίου)	0.0002 (20°C)	0.005 (20°C)	7.0 (20°C)
<i>azoxystrobin</i> (M.B. 403.4)		Στρομπιλουρίνες ή Μεθοξακρυλικά/ Μυκητοκτόνο	Παρεμποδιστές του συμπλόκου III της αναπνευστικής αλυσίδας	0.00000011 (20°C)	6.0 (20°C)	2.5 (20°C)

## 5. Περιγραφή των αναλυτικών διαδικασιών και των ενόργανων τεχνικών της μελέτης

### 5.1. Υποστρώματα των καρπών

Κατά τη διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας χρησιμοποιήθηκαν και αναλύθηκαν τρεις τύποι καρπών που αποτέλεσαν τα κύρια υποστρώματα της μελέτης. Οι καρποί που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τομάτες, σταφύλια και μήλα βιολογικής καλλιέργειας, έτσι ώστε να αποτελέσουν ένα καθαρό υπόστρωμα για τους εμβολιασμούς. Η καθαρότητά τους ελέγχθηκε πριν τη έναρξη του πειράματος με χρωματογραφική ανάλυση των εκχυλισμάτων τους.

Τα δείγματα των καρπών της τομάτας, των σταφυλιών και των μήλων στο εργαστήριο χειρίστηκαν με βάση τις οδηγίες του *Codex Alimentarius Commission, Guidelines on Good Laboratory Practice in Pesticide Residue Analysis, 1993*, όπου ακλούθησε ζύγιση, καταγραφή των μεγέθους, μείωση του αρχικού δείγματος σε εργαστηριακό δείγμα με τη μέθοδο των τεταρτημορίων και τεμαχισμός, για τις τομάτες και τα μήλα, με αφαίρεση των ποδίσκων συγκράτησής τους στο φυτό, και αφαίρεση των ραγών από τα τσαμπιά για τα σταφύλια. Ακολούθησε ομογενοποίηση των καρπών με κοινό blender. Στη συνέχεια, μέρος από το ομογενοποιημένο δείγμα (περίπου 200 g) μεταφέρθηκε σε αποστειρωμένα σακουλάκια, αναγράφηκαν τα στοιχεία του δείγματος και φυλάχθηκαν στην κατάψυξη στους -22 °C.

Μετά την ομογενοποίηση των καρπών έγινε έλεγχος του pH και των διαλυτών σακχάρων των ιστών. Το pH για τον κάθε ιστό ήταν: 4.12 (18.5 °C) για την τομάτα, 3.88 (15.6 °C) για το σταφύλι και 4.20 (14.0 °C) για το μήλο. Τα διαλυτά σάκχαρα ήταν: 5.22% για την τομάτα, 18.54% για το σταφύλι και 17.29% για το μήλο. Πρέπει να σημειώσουμε ότι τα σταφύλια που χρησιμοποιήθηκαν στην πειραματική διαδικασία περιείχαν γίγαρτα. Τα διαλυτά σάκχαρα σταφυλιών χωρίς γίγαρτα ήταν 18.40%.

## 5.2. Πρότυπες Ενώσεις, Διαλύματα & Διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν

Η επί τοις εκατό καθαρότητα των δραστικών ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν κυμάνθηκε από 99 έως 100%, με εξαίρεση το *cymoxanil*, του οποίου η καθαρότητα ήταν 97%.

Τα πρότυπα διαλύματα παρακαταθήκης (μητρικά πρότυπα διαλύματα) κάθε δραστικής ουσίας παρασκευάστηκαν σε ακετόνη σε συγκέντρωση 1000 µg/ mL και φυλάχθηκαν σε γυάλινα φιαλίδια των 10 mL κλεισμένα αεροστεγώς στους -20 °C. Τα πρότυπα μικτά διαλύματα εργασίας παρασκευάστηκαν από τα πρότυπα διαλύματα παρακαταθήκης κάθε δραστικής ουσίας με κατάλληλες αραιώσεις σε ακετόνη.

Από τα πρότυπα διαλύματα παρακαταθήκης σε ακετόνη παρασκευάστηκε το πρότυπο μικτό διάλυμα εργασίας 250 F (µg/ mL) (Πίνακας 5.1) και με αρραίωση αυτού παρασκευάστηκε το πρότυπο μικτό διάλυμα εργασίας 25 F (µg/ mL). Για τους εμβολιασμούς των φυτικών ιστών, που έγιναν για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων με τη χρήση φασματομετρίας μάζας παρασκευάστηκαν πρότυπα μικτά διαλύματα εργασίας 50 F και 100 F (µg/ mL). Το πρότυπο μικτό διάλυμα εργασίας 250 F (µg/ mL) (Πίνακας 5.1), όπως και τα άλλα μικτά που προέκυψαν από αρραίωσή του περιείχε τις δραστικές ουσίες στόχους σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Ο λόγος για τον οποίο οι δραστικές ουσίες εισήχθησαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις η κάθε μια στα πρότυπα μικτά διαλύματα εργασίας ήταν η προσπάθεια να υπάρχει μια ομοιομορφία ως προς την απόκριση της κάθε ουσίας στα χρωματογραφήματα, καθώς στην κάθε ουσία η απόκριση του ανιχνευτή ήταν διαφορετική.

Για τον έλεγχο της γραμμικότητας των ανιχνευτών παρασκευάστηκαν πρότυπα μικτά διαλύματα βαθμονόμησης των ανιχνευτών, από το πρότυπο μικτό διάλυμα εργασίας 250 F (µg/ mL), τόσο σε καθαρό διαλύτη (ισοκτάνιο/ τολουόλιο, 90/10) όσο και σε εκχύλισμα υποστρώματος. Για κάθε υπόστρωμα και κάθε ανιχνευτή παρασκευάστηκαν πρότυπα μικτά διαλύματα επτά διαδοχικών συγκεντρώσεων. Με τη σύγκριση των χρωματογραφικών σημάτων (απόκριση) των προτύπων αυτών έγινε και ο έλεγχος του φαινομένου της «επίδρασης του υποστρώματος» (*Matrix effect*) στη χρωματογραφική ανάλυση.

Οι διαλύτες ακετόνη, διχλωρομεθάνιο και πετρελαϊκός αιθέρας χρησιμοποιήθηκαν για την εκχύλιση των Φ.Π. από τους ιστούς και το μίγμα 2,2,4-τριμέθυλο πεντάνιο (ισοκτάνιο)/ τολουόλιο (90/10, v/v), για την επαναδιάλυση των συμπυκνωμάτων. Όλοι οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν υψηλής καθαρότητας και κατάλληλοι για αναλύσεις υπολειμμάτων Φ.Π. (*Pestiscan grade*).

### **5.3. Εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε**

#### **5.3.1. Όργανα και συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν στην προκατεργασία των δειγμάτων**

- ✓ Ηλεκτρική συσκευή blender για την κοπή, πολτοποίηση και ομογενοποίηση των φυτικών ιστών.
- ✓ Ομογενοποιητής Ultra Turax, στην εκχύλιση των φυτικών ιστών για την ομογενοποίηση του δείγματος.
- ✓ Φυγόκεντρος, για τη φυγοκέντρωση των εκχυλισμάτων.
- ✓ Περιστρεφόμενος εξατμιστήρας της BUCHI, μοντέλο RE 111, για τη συμπύκνωση των εκχυλισμάτων.
- ✓ Συσκευή συμπύκνωσης-ξήρανσης με ρεύμα αζώτου.

#### **5.3.2. Όργανα και συστήματα χρωματογραφίας που χρησιμοποιήθηκαν στις αναλύσεις των δειγμάτων**

- Σύστημα Αέριας Χρωματογραφίας της Agilent, μοντέλο 6890N, με χρωματογραφική στήλη (30 m x 320 μm x 0.10 μm) τύπου HP-1 (*100% Methyl-Siloxane*) και ανιχνευτή αζώτου-φωσφόρου (NPD).
- Σύστημα Αέριας Χρωματογραφίας της Agilent, μοντέλο 6890N, με χρωματογραφική στήλη (30 m x 320 μm x 0.25μm) τύπου HP-5 (*5% Phenyl-Methyl-Siloxane*) και ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων (μ-ECD).
- Σύστημα Αέριας Χρωματογραφίας της Hewlett Packard, μοντέλο 6890, με χρωματογραφική στήλη (25 m x 250 μm x 22μm) τύπου BPX-35 (*35% Phenyl-Polysilphenylene-Siloxane*) και ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων (ECD).
- Σύστημα Αέριας Χρωματογραφίας – Φασματομετρίας μάζας Thermo Electron Corporation Trace, εφοδιασμένο με αέριο χρωματογράφο Trace GC Ultra με τριχοειδή στήλη (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm i.d) τύπου TR-5-MS SQC (*5% Phenyl-Methyl-Siloxane*) συζευγμένο με ένα Polaris Q φασματόμετρο μάζας με παγίδα ιόντων και εξοπλισμένο με το λογισμικό Xcalibur.

## 5.4. Ανάπτυξη αναλυτικών μεθοδολογιών

### 5.4.1. Εμβολιασμοί - Φορτίσεις των δειγμάτων

Οι εμβολιασμοί των δειγμάτων τομάτας, σταφυλιού και μήλου με το πρότυπο μίγμα των Φ.Π. πραγματοποιήθηκαν προσθέτοντας σε ζυγισμένη ποσότητα υποστρώματος 7.50 g κατάλληλη ποσότητα από το πρότυπο μικτό διάλυμα εργασίας 250 F (μg/ mL), το οποίο περιείχε τις δραστικές ουσίες σε διαφορετικές συγκεντρώσεις την κάθε μια. Στα χαμηλότερα επίπεδα (από το 5 F και κάτω), οι εμβολιασμοί έγιναν από το πρότυπο μικτό διάλυμα εργασίας 25 F (μg/ mL). Έτσι, προέκυψαν εμβολιασμένα δείγματα συγκεντρώσεων (μg/ g) 1 F – 100 F για την τομάτα (Πίνακας 5.1), 1 F – 40 F για το σταφύλι (Πίνακας 5.2) και 0.4 F – 50 F για το μήλο (Πίνακας 5.3). Κάθε εμβολιασμός πραγματοποιήθηκε σε επτά επαναλήψεις για τον κάθε φυτικό ιστό. Οι συγκεντρώσεις των δραστικών ουσιών στο πρότυπο μικτό διάλυμα εργασίας, τα επίπεδα των εμβολιασμών, καθώς επίσης και τα MRLs της κάθε δραστικής ουσίας για τον κάθε ιστό καταγράφονται στους ακόλουθους πίνακες.

**Πίνακας 5.1:** Συγκεντρώσεις των δραστικών ουσιών στο πρότυπο μικτό διάλυμα εργασίας, επίπεδα των εμβολιασμών και MRLs, για τον ιστό της τομάτας.

<b>Δραστική ουσία</b>	<b>250F</b> (μg/ mL)	<b>1F</b> (μg/ g)	<b>2F</b> (μg/ g)	<b>5F</b> (μg/ g)	<b>10F</b> (μg/ g)	<b>50F</b> (μg/ g)	<b>100F</b> (μg/ g)	<b>MRL</b> (μg/ g)
<i>metribuzin</i>	2.5	0.01	0.02	0.05	0.1	0.5	1.0	<b>0.3</b>
<i>vinclozolin</i>	2.5	0.01	0.02	0.05	0.1	0.5	1.0	<b>0.05</b>
<i>lambda-cyhalothrin</i>	2.5	0.01	0.02	0.05	0.1	0.5	1.0	<b>0.1</b>
<i>procymidone</i>	12.5	0.05	0.1	0.25	0.5	2.5	5.0	<b>2.0</b>
<i>kresoxim-methyl</i>	12.5	0.05	0.1	0.25	0.5	2.5	5.0	<b>0.5</b>
<i>bifenthrin</i>	12.5	0.05	0.1	0.25	0.5	2.5	5.0	<b>0.2</b>
<i>indoxacarb</i>	12.5	0.05	0.1	0.25	0.5	2.5	5.0	<b>0.5</b>
<i>azoxystrobin</i>	12.5	0.05	0.1	0.25	0.5	2.5	5.0	<b>2.0</b>
<i>fenhexamid</i>	25	0.1	0.2	0.5	1.0	5.0	10	<b>1.0</b>
<i>cymoxanil</i>	25	0.1	0.2	0.5	1.0	5.0	10	<b>0.2</b>
<i>iprodione</i>	25	0.1	0.2	0.5	1.0	5.0	10	<b>5.0</b>
<i>buprofezin</i>	125	0.5	1.0	2.5	5.0	25	50	<b>1.0</b>
<i>fludioxonil</i>	125	0.5	1.0	2.5	5.0	25	50	<b>1.0</b>
<i>fosthiazate</i>	125	0.5	1.0	2.5	5.0	25	50	
<i>pyrimethanil</i>	125	0.5	1.0	2.5	5.0	25	50	<b>1.0</b>
<i>pyriproxyfen</i>	125	0.5	1.0	2.5	5.0	25	50	<b>1.0</b>

**Πίνακας 5.2:** Συγκεντρώσεις των δραστικών ουσιών στο πρότυπο μικτό διάλυμα εργασίας, επίπεδα των εμβολιασμών και MRLs, για τον ιστό του σταφυλιού.

<i>Δραστική ουσία</i>	<i>250F</i> ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	<i>1F</i> ( $\mu\text{g}/\text{g}$ )	<i>2F</i> ( $\mu\text{g}/\text{g}$ )	<i>5F</i> ( $\mu\text{g}/\text{g}$ )	<i>10F</i> ( $\mu\text{g}/\text{g}$ )	<i>20F</i> ( $\mu\text{g}/\text{g}$ )	<i>40F</i> ( $\mu\text{g}/\text{g}$ )	<i>MRL</i> ( $\mu\text{g}/\text{g}$ )
<i>metribuzin</i>	2.5	0.01	0.02	0.05	0.1	0.2	0.4	<b>0.01</b>
<i>vinclozolin</i>	2.5	0.01	0.02	0.05	0.1	0.2	0.4	<b>5.0</b>
<i>lambda-cyhalothrin</i>	2.5	0.01	0.02	0.05	0.1	0.2	0.4	<b>0.2</b>
<i>procymidone</i>	12.5	0.05	0.1	0.25	0.5	1.0	2.0	<b>5.0</b>
<i>kresoxim-methyl</i>	12.5	0.05	0.1	0.25	0.5	1.0	2.0	<b>1.0</b>
<i>bifenthrin</i>	12.5	0.05	0.1	0.25	0.5	1.0	2.0	<b>0.2</b>
<i>indoxacarb</i>	12.5	0.05	0.1	0.25	0.5	1.0	2.0	<b>2.0</b>
<i>azoxystrobin</i>	12.5	0.05	0.1	0.25	0.5	1.0	2.0	<b>2.0</b>
<i>fenhexamid</i>	25	0.1	0.2	0.5	1.0	2.0	4.0	<b>5.0</b>
<i>cymoxanil</i>	25	0.1	0.2	0.5	1.0	2.0	4.0	<b>0.2</b>
<i>iprodione</i>	25	0.1	0.2	0.5	1.0	2.0	4.0	<b>10</b>
<i>buprofezin</i>	125	0.5	1.0	2.5	5.0	10	20	<b>1.0</b>
<i>fludioxonil</i>	125	0.5	1.0	2.5	5.0	10	20	<b>2.0</b>
<i>fosthiazate</i>	125	0.5	1.0	2.5	5.0	10	20	<b>0.02</b>
<i>pyrimethanil</i>	125	0.5	1.0	2.5	5.0	10	20	<b>5.0</b>
<i>pyriproxyfen</i>	125	0.5	1.0	2.5	5.0	10	20	<b>0.05</b>

**Πίνακας 5.3:** Συγκεντρώσεις των δραστικών ουσιών στο πρότυπο μικτό διάλυμα εργασίας, επίπεδα των εμβολιασμών και MRLs, για τον ιστό του μήλου.

<i>Δραστική ουσία</i>	<i>250 F</i> ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	<i>0.4F</i> ( $\mu\text{g}/\text{g}$ )	<i>1F</i> ( $\mu\text{g}/\text{g}$ )	<i>5F</i> ( $\mu\text{g}/\text{g}$ )	<i>10F</i> ( $\mu\text{g}/\text{g}$ )	<i>20F</i> ( $\mu\text{g}/\text{g}$ )	<i>50F</i> ( $\mu\text{g}/\text{g}$ )	<i>MRL</i> ( $\mu\text{g}/\text{g}$ )
<i>metribuzin</i>	2.5	0.004	0.01	0.05	0.1	0.2	0.5	<b>0.01</b>
<i>vinclozolin</i>	2.5	0.004	0.01	0.05	0.1	0.2	0.5	<b>1.0</b>
<i>lambda-cyhalothrin</i>	2.5	0.004	0.01	0.05	0.1	0.2	0.5	<b>0.1</b>
<i>procymidone</i>	12.5	0.02	0.05	0.25	0.5	1.0	2.5	<b>0.02</b>
<i>kresoxim-methyl</i>	12.5	0.02	0.05	0.25	0.5	1.0	2.5	<b>0.2</b>
<i>bifenthrin</i>	12.5	0.02	0.05	0.25	0.5	1.0	2.5	<b>0.3</b>
<i>indoxacarb</i>	12.5	0.02	0.05	0.25	0.5	1.0	2.5	<b>0.5</b>
<i>azoxystrobin</i>	12.5	0.02	0.05	0.25	0.5	1.0	2.5	<b>0.05</b>
<i>diphenylamine (DPA)</i>	12.5	0.02	0.05	0.25	0.5	1.0	2.5	<b>5.0</b>
<i>fenhexamid</i>	25	0.04	0.1	0.5	1.0	2.0	5.0	<b>0.05</b>
<i>cymoxanil</i>	25	0.04	0.1	0.5	1.0	2.0	5.0	<b>0.05</b>
<i>iprodione</i>	25	0.04	0.1	0.5	1.0	2.0	5.0	<b>5.0</b>
<i>buprofezin</i>	125	0.2	0.5	2.5	5.0	10	25	<b>0.5</b>
<i>fludioxonil</i>	125	0.2	0.5	2.5	5.0	10	25	<b>5.0</b>
<i>fosthiazate</i>	125	0.2	0.5	2.5	5.0	10	25	<b>0.02</b>
<i>pyrimethanil</i>	125	0.2	0.5	2.5	5.0	10	25	<b>5.0</b>
<i>pyriproxyfen</i>	125	0.2	0.5	2.5	5.0	10	25	<b>0.2</b>

Για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων με τη χρήση φασματομετρίας μάζας έγινε εμβολιασμός 7.50 g του κάθε φυτικού ιστού σε δύο επίπεδα. Για τον εμβολιασμό των υποστρωμάτων χρησιμοποιήθηκε το πρότυπο μικτό διάλυμα εργασίας 50 F (μg/ mL) για τα πειράματα των ανακλήσεων, καθώς και το 100 F (μg/ mL) για τον καθορισμό των ορίων ποσοτικού προσδιορισμού (Πίνακας 5.4). Κάθε εμβολιασμός πραγματοποιήθηκε σε τρεις επαναλήψεις για τον κάθε φυτικό ιστό. Οι συγκεντρώσεις των δραστικών ουσιών στο πρότυπο μικτό διάλυμα εργασίας και τα επίπεδα των εμβολιασμών για τον κάθε φυτικό ιστό καταγράφονται στον ακόλουθο πίνακα.

**Πίνακας 5.4:** Συγκεντρώσεις των δραστικών ουσιών στα πρότυπα μικτά διαλύματα εργασίας και επίπεδα των εμβολιασμών για τους υπό μελέτη φυτικούς ιστούς.

Δραστική ουσία	100 F (μg/mL)	1LOQ (μg/g)	2LOQ (μg/g)	50 F (μg/mL)	TOMATA		ΜΗΛΟ		ΣΤΑΦΥΛΙ	
					1F (μg/g)	4F (μg/g)	1F (μg/g)	2F (μg/g)	1F (μg/g)	10F (μg/g)
<i>pyrimethanil</i>	1.0	0.01	0.02	2.5	0.05	0.2	0.05	0.1	0.05	0.5
<i>bifenthrin</i>	1.0	0.01	0.02	12.5	0.25	1.0	0.25	0.5	0.25	2.5
<i>pyriproxyfen</i>	2.0	0.02	0.04	12.5	0.25	1.0	0.25	0.5	0.25	2.5
<i>buprofezin</i>	5.0	0.05	0.1	12.5	0.25	1.0	0.25	0.5	0.25	2.5
<i>kresoxim-methyl</i>	2.0	0.02	0.04	12.5	0.25	1.0	0.25	0.5	0.25	2.5
<i>metribuzin</i>	2.0	0.02	0.04	25	0.5	2.0	0.5	1.0	0.5	5.0
<i>vinclozolin</i>	2.0	0.02	0.04	25	0.5	2.0	0.5	1.0	0.5	5.0
<i>procymidone</i>	1.0	0.01	0.02	25	0.5	2.0	0.5	1.0	0.5	5.0
<i>iprodione</i>	4.0	0.04	0.08	25	0.5	2.0	0.5	1.0	0.5	5.0
<i>azoxystrobin</i>	2.0	0.02	0.04	25	0.5	2.0	0.5	1.0	0.5	5.0
<i>diphenylamine</i>	1.0	0.01	0.02	25	0.5	2.0	0.5	1.0	0.5	5.0
<i>λ-cyhalothrin</i>	2.0	0.02	0.04	75	1.5	6.0	1.5	3.0	1.5	15
<i>fenhexamid</i>	10	0.1	0.2	75	1.5	6.0	1.5	3.0	1.5	15
<i>indoxacarb</i>	2.0	0.02	0.04	75	1.5	6.0	1.5	3.0	1.5	15
<i>fosthiazate</i>	40	0.4	0.8	75	1.5	6.0	1.5	3.0	1.5	15
<i>fludioxonil</i>	5.0	0.05	0.1	75	1.5	6.0	1.5	3.0	1.5	15

Μετά την προσθήκη του κατάλληλου όγκου του μίγματος των Φ.Π. στις ζυγισμένες ποσότητες των ιστών, έγινε ανάμιξη του μίγματος των Φ.Π. με τον ιστό, έτσι ώστε να γίνει ομογενοποίηση, και παρέμειναν προς ισορροπία για 60 min πριν την εκχύλισή τους.

Για τον έλεγχο της αναπαραγωγιμότητας έγινε εμβολιασμός 100 g κάθε φυτικού ιστού με κατάλληλη ποσότητα από το πρότυπο μικτό διάλυμα εργασίας 250 F (μg/ mL), που αντιστοιχούσε σε επίπεδο εμβολιασμού 5 F (μg/ g) (Πίνακας 5.3), ακολούθησε πολύ καλή ανάμιξη του δείγματος με ανακίνηση. Από τα εμβολιασμένα δείγματα γινόνταν ανάλυση κάθε μέρα για το χρονικό διάστημα των δύο εβδομάδων (10 ημέρες).



#### 5.4.2. Διαδικασία εκχύλισης των δειγμάτων

Για την ανάλυση των εμβολιασμένων δειγμάτων της τομάτας, του σταφυλιού και του μήλου για τον προσδιορισμό των Φ.Π., ακολουθήθηκε η παρακάτω πορεία προετοιμασίας του δείγματος στα πλαίσια της αναλυτικής μεθοδολογίας προσδιορισμού υπολειμμάτων.

- ✓ Ζύγιση 7.50 g ιστού ομογενοποιημένου δείγματος καρπών μέσα σε γυάλινο σωλήνα φυγοκέντρησης και εμβολιασμός αυτών.
- ✓ Αναμονή για 60 min.
- ✓ Προσθήκη 15 mL ακετόνης και ομογενοποίηση σε Ultra Turax (8000 στρ./min) για 30 sec.
- ✓ Προσθήκη 15 mL διχλωρομεθανίου και 15 mL πετρελαϊκού αιθέρα.
- ✓ Ομογενοποίηση σε Ultra Turax (8000 στρ./min) για επιπλέον 30 sec.
- ✓ Φυγοκέντρηση των σωλήνων στις 4000 στρ./min για 2 min περίπου.

##### ❖ Προσδιορισμός στο σύστημα ανίχνευσης αζώτου-φωσφόρου (NPD)

- ✓ Λήψη 25 mL εκχυλίσματος και μεταφορά τους σε σφαιρική φιάλη των 50mL.
- ✓ Συμπύκνωση μέχρι ξηρού σε περιστρεφόμενο εξατμιστήρα υπό κενό και σε θερμοκρασία 35 °C.
- ✓ Προσθήκη 5 mL μίγματος ισοκτάνιο/τολουόλιο (90/10 v/v), ανακίνηση και μεταφορά του τελικού εκχυλίσματος σε φιαλίδια χρωματογραφίας.
- ✓ Χρωματογραφική ανάλυση.

##### ❖ Προσδιορισμός στο σύστημα ανίχνευσης δέσμευσης ηλεκτρονίων (ECD)

- ✓ Λήψη 0.20 mL εκχυλίσματος και μεταφορά τους σε φιαλίδιο χρωματογραφίας.
- ✓ Συμπύκνωση μέχρι ξηρού σε ελαφρό ρεύμα αζώτου.
- ✓ Προσθήκη 1 mL μίγματος ισοκτάνιο/τολουόλιο (90/10 v/v).
- ✓ Χρωματογραφική ανάλυση.

### 5.5. Προσδιορισμός των Φ.Π. με τη χρήση αέριας χρωματογραφίας και ανιχνευτή αζώτου – φωσφόρου (NPD)

Για τον προσδιορισμό των *cymoxanil*, *diphenylamine pyrimethanil*, *fosthiazate*, *fludioxonil*, *buprofezin*, *iprodione*, *pyriproxyfen* και *azoxystrobin* χρησιμοποιήθηκε σύστημα αέριου χρωματογράφου της Agilent με ανιχνευτή αζώτου-φωσφόρου. Ο διαχωρισμός των ενώσεων πραγματοποιήθηκε σε στήλη τύπου HP-1. Η καταγραφή και επεξεργασία του χρωματογραφικού σήματος έγινε σε H/Y με το πρόγραμμα Chem Station. Οι συνθήκες λειτουργίας του οργάνου ήταν οι ακόλουθες:

- Εγχυτής δείγματος σε λειτουργία «on column».
- Θερμοκρασία εγχυτή 230 °C.
- Όγκος έγχυσης δείγματος 1 µL.
- Θερμοκρασία ανιχνευτή 300 °C.
- Αέρια ανιχνευτή: make up N<sub>2</sub> (60 mL/ min).
- Φέρον αέριο ήλιο, με ροή 1.7 mL/ min.
- Θερμοκρασιακό πρόγραμμα ανάλυσης: αρχική θερμοκρασία φούρνου στους 50 °C και διατήρησή της για 1.0 min. Αύξηση με ρυθμό 20 °C/ min μέχρι τους 180 °C και παραμονή για 1.0 min, αύξηση με ρυθμό ανόδου 3 °C/ min μέχρι τους 200 °C και διατήρησή της για 6 min, αύξηση με ρυθμό 6 °C/ min μέχρι τους 250 °C και παραμονή για 8 min. Τέλος, αύξηση της θερμοκρασίας με ρυθμό 10 °C/ min μέχρι τους 275 °C και διατήρησή της για 5 min. Ο συνολικός χρόνος του χρωματογραφικού προγράμματος της ανάλυσης ήταν 45 min.

### 5.6. Προσδιορισμός των Φ.Π. με τη χρήση αέριας χρωματογραφίας και ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων (ECD)

Για τον προσδιορισμό των *metribuzin*, *vinclozolin*, *procymidone*, *fludioxonil*, *kresoxim-methyl*, *fenhexamid*, *iprodione*, *bifenthrin*, *lambda-cyhalothrin*, *indoxacarb* και *azoxystrobin* χρησιμοποιήθηκε σύστημα αέριου χρωματογράφου της Agilent με ανιχνευτή δέσμευσης ηλεκτρονίων. Ο διαχωρισμός των ενώσεων πραγματοποιήθηκε σε στήλη τύπου HP-5. Η καταγραφή και επεξεργασία του χρωματογραφικού σήματος έγινε σε H/Y με το πρόγραμμα Chem Station. Οι συνθήκες λειτουργίας του οργάνου ήταν οι ακόλουθες:

- Εγχυτής δείγματος σε λειτουργία «splitless».
- Θερμοκρασία εγχυτή 230 °C.
- Όγκος έγχυσης δείγματος 1 µL.
- Θερμοκρασία ανιχνευτή 320 °C.
- Αέρια ανιχνευτή: H<sub>2</sub> (3.3 mL/ min), Air (60 mL/ min), make up He (5 mL/ min).
- Φέρον αέριο ήλιο, με ροή 1.7 mL/ min.
- Θερμοκρασιακό πρόγραμμα ανάλυσης: αρχική θερμοκρασία φούρνου στους 50 °C και διατήρησή της για 1.0 min. Αύξηση με ρυθμό 20 °C/ min μέχρι τους 180 °C και παραμονή για 1.0 min, αύξηση με ρυθμό ανόδου 3 °C/ min μέχρι τους 200 °C και διατήρησή της για 6min, αύξηση με ρυθμό ανόδου 6 °C/ min μέχρι τους 250 °C και παραμονή για 8 min. Τέλος, αύξηση της θερμοκρασίας με ρυθμό 10 °C/ min μέχρι τους 275 °C και διατήρησή της για 5 min. Ο συνολικός χρόνος του χρωματογραφικού προγράμματος της ανάλυσης ήταν 45 min.

Για τον προσδιορισμό και επιβεβαίωση των *vinclozolin*, *metribuzin*, *procymidone*, *kresoxim-methyl*, *bifenthrin*, *iprodione*, *lambda-cyhalothrin*, *indoxacarb* και *azoxystrobin* χρησιμοποιήθηκε σύστημα αέριου χρωματογράφου της Hewlett Packard με στήλη διαφορετικής πολικότητας, τύπου BPX-35, και ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων. Η καταγραφή και επεξεργασία του χρωματογραφικού σήματος έγινε σε H/Y με το πρόγραμμα Chem Station. Οι συνθήκες λειτουργίας του οργάνου ήταν οι ακόλουθες:

- Εγχυτής δείγματος σε λειτουργία «pulsed-splitless».
- Θερμοκρασία εγχυτή 250 °C.
- Όγκος έγχυσης δείγματος 1 µL.
- Θερμοκρασία ανιχνευτή 310 °C.
- Αέρια ανιχνευτή: H<sub>2</sub> (3.3 mL/ min), Air (60 mL/ min), make up He (6 mL/ min).
- Φέρον αέριο ήλιο, με ροή 1.2 mL/ min.
- Θερμοκρασιακό πρόγραμμα ανάλυσης: αρχική θερμοκρασία φούρνου στους 80 °C και διατήρησή της για 1.0 min. Αύξηση με ρυθμό 14 °C/ min μέχρι τους 200 °C, αύξηση με ρυθμό ανόδου 10 °C/ min μέχρι τους 240 °C, αύξηση με ρυθμό 20 °C/ min μέχρι τους 280 °C και παραμονή για 12 min. Ο συνολικός χρόνος του χρωματογραφικού προγράμματος της ανάλυσης ήταν 27.57 min.

## 5.7. Ποιοτικός προσδιορισμός των Φ.Π. με τη χρήση αέριας χρωματογραφίας και φασματομετρίας μάζας

Για την επιβεβαίωση των ευρημάτων χρησιμοποιήθηκε αέριος χρωματογράφος συζευγμένος με ανιχνευτή φασματομετρίας μάζας. Ο διαχωρισμός των ενώσεων πραγματοποιήθηκε σε στήλη τύπου TR-5 MS SQC. Η καταγραφή και επεξεργασία του χρωματογραφικού σήματος έγινε σε H/Y με το πρόγραμμα Xcalibur. Οι συνθήκες λειτουργίας του οργάνου ήταν οι ακόλουθες:

- Εγχυτής δείγματος σε λειτουργία «splitless» (Split flow 50 mL/ min, Splitless time 1 min).
- Θερμοκρασία εγχυτή 250 °C.
- Όγκος έγχυσης δείγματος 1  $\mu$ L.
- Flow on column 1 mL/ min.
- Πηγή ιονισμού 70 ev. Ρυθμίστηκε στους 200 °C και η γραμμή μεταφοράς (MS transfer line) στους 300 °C.
- Καταγραφή ιόντων για m/z 40 – 450.
- Ο φούρνος ήταν προγραμματισμένος ως εξής: αρχική θερμοκρασία φούρνου στους 80 °C και διατήρησή της για 1.0 min. Αύξηση με ρυθμό 20 °C/ min μέχρι τους 200 °C και παραμονή για 10 min, αύξηση με ρυθμό ανόδου 3 °C/ min μέχρι τους 250 °C και διατήρησή της για 8 min, αύξηση με ρυθμό 10 °C/ min μέχρι τους 280 °C και παραμονή για 8 min. Ο συνολικός χρόνος του χρωματογραφικού προγράμματος της ανάλυσης ήταν 52.70 min.

## 6. Αποτελέσματα - Συζήτηση

Με βάση τα αποτελέσματα των χρωματογραφικών αναλύσεων στα τρία διαφορετικά συστήματα στήλης – ανιχνευτή καταγράφηκαν οι χρόνοι κατακράτησης της κάθε δραστικής ουσίας για κάθε χρωματογραφικό σύστημα και παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.1. Στον ίδιο Πίνακα παρουσιάζεται και η ποιότητα απόκρισης του κάθε συστήματος για κάθε δραστική ουσία με βάση το ύψος της χρωματογραφικής κορυφής.

**Πίνακας 6.1:** Χρόνοι κατακράτησης (RT) ανά χρωματογραφικό σύστημα στήλης – ανιχνευτή και κατηγοριοποίηση της απόκρισης του κάθε ανιχνευτή για τις δραστικές ουσίες της μελέτης.

<i>Δραστική ουσία</i>	<i>ECD (HP-5)</i>		<i>ECD (BPX-35)</i>		<i>NPD (HP-1)</i>	
	<i>RT</i>	<i>Απόκριση</i>	<i>RT</i>	<i>Απόκριση</i>	<i>RT</i>	<i>Απόκριση</i>
	<i>(min)</i>	<i>ανιχνευτή</i>	<i>(min)</i>	<i>ανιχνευτή</i>	<i>(min)</i>	<i>ανιχνευτή</i>
<i>cymoxanil</i>	-	-	-	-	9.281	+
<i>diphenylamine</i>	-	-	-	-	9.469	+++
<i>pyrimethanil</i>	-	-	-	-	11.453	+++
<i>metribuzin</i>	13.287	+++	11.765	+++	12.392	+
<i>vinclozolin</i>	13.527	+++	11.162	+++	12.817	+
<i>fosthiazate I</i>	16.022	++	-	-	14.575	+++
<i>fosthiazate II</i>	16.120	++	-	-		
<i>procymidone</i>	17.567	+++	12.986	+++	16.246	+
<i>buprofezin</i>	18.757	+	13.565	+	19.088	+++
<i>fludioxonil</i>	20.144	++	14.595	+	18.440	++
<i>kresoxim-methyl</i>	21.594	+++	14.052	-+	19.139	-+
<i>fenhexamid</i>	24.909	+++	15.135	++	23.701	+
<i>iprodione</i>	27.261	+++	15.458	++	26.020	++
<i>bifenthrin</i>	27.946	+++	14.967	+++	-	-
<i>pyriproxyfen</i>	-	-	-	-	28.093	+++
<i>lambda-cyhalothrin I</i>	-	-	15.709	+	-	-
<i>lambda-cyhalothrin II</i>	30.183	+++	15.774	+++	29.078	+
<i>indoxacarb</i>	40.620	+++	20.289	++	-	-
<i>azoxystrobin</i>	41.290	+++	23.921	+++	38.794	++

Τα *cymoxanil*, *diphenylamine*, *pyrimethanil* και *pyriproxyfen* ανιχνεύονται και προσδιορίζονται μόνο με ανιχνευτή αζώτου φωσφόρου (NPD), ενώ τα *indoxacarb* και *bifenthrin* μόνο με ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων (ECD). Για μια σειρά δραστικών ουσιών όπως τα *metribuzin*, *vinclozolin*, *procymidone*, *kresoxim-methyl*, *fenhexamid*, *λ-cyhalothrin* και *azoxystrobin* προτιμάται η ανίχνευση και ο προσδιορισμός τους στον ECD, αφού παρουσιάζει καλύτερη ευαισθησία.

Από τη χρωματογραφική ανάλυση διαπιστώθηκε ότι το *fosthiazate* στο σύστημα GC(HP-5) – ECD εμφανίζει δυο ίσες κορυφές λόγω της παρουσίας στερεοϊσομερών που διαχωρίζονται, ενώ στο σύστημα GC(HP-1) – NPD εμφανίζει μία κορυφή καθώς τα δύο ισομερή δε διαχωρίζονται. Επίσης και το *lambda-cyhalothrin* στο σύστημα GC(BPX-35) – ECD εμφανίζει δύο κορυφές, με την πρώτη κορυφή αρκετά μικρότερη σε σχέση με τη δεύτερη. Η ποσοτικοποίηση και των δύο αυτών Φ.Π. έγινε ως άθροισμα των δύο κορυφών τους, όπου εμφανίζονταν με δύο κορυφές.

Στο σύστημα GC(HP-1) – NPD τα *buprofezin* και *kresoxim-methyl* εμφανίζονται να έχουν πολύ κοντινούς χρόνους κατακράτησης με αποτέλεσμα το μη διαχωρισμό τους. Το γεγονός της πολύ χαμηλής ευαισθησίας που παρουσιάζει το *kresoxim-methyl* στο σύστημα αυτό και πρακτικά η μη χρησιμοποίηση αυτού του συστήματος στον προσδιορισμό του διευκολύνει την εκτίμηση προσδιορισμού του *buprofezin* στον NPD.

## **6.1. Επικύρωση της αναλυτικής μεθόδου σε σύστημα GC-NPD**

### **6.1.1. Έλεγχος της γραμμικότητας**

Ο έλεγχος της γραμμικότητας για τον ανιχνευτή και για τη μέθοδο έγιναν ξεχωριστά. Ο έλεγχος της γραμμικότητας του ανιχνευτή έγινε με την έγχυση πρότυπων διαλυμάτων επτά διαδοχικών συγκεντρώσεων (μg δ.ο./ mL) και για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς οι συγκεντρώσεις των προτύπων διαλυμάτων εκφράστηκαν σε μg δ.ο./g ιστού, με τη χρήση του συντελεστή συμπύκνωσης της αναλυτικής μεθόδου που χρησιμοποιείται για ουσίες προσδιοριζόμενες στον NPD, ο οποίος είναι 0.83 mL/ g ιστού.

Ο έλεγχος της γραμμικότητας της μεθόδου πραγματοποιήθηκε με τα εμβολιασμένα δείγματα για το κάθε υπόστρωμα και για το κάθε επίπεδο συγκέντρωσης λαμβάνοντας το μέσο όρο επτά επαναλήψεων.

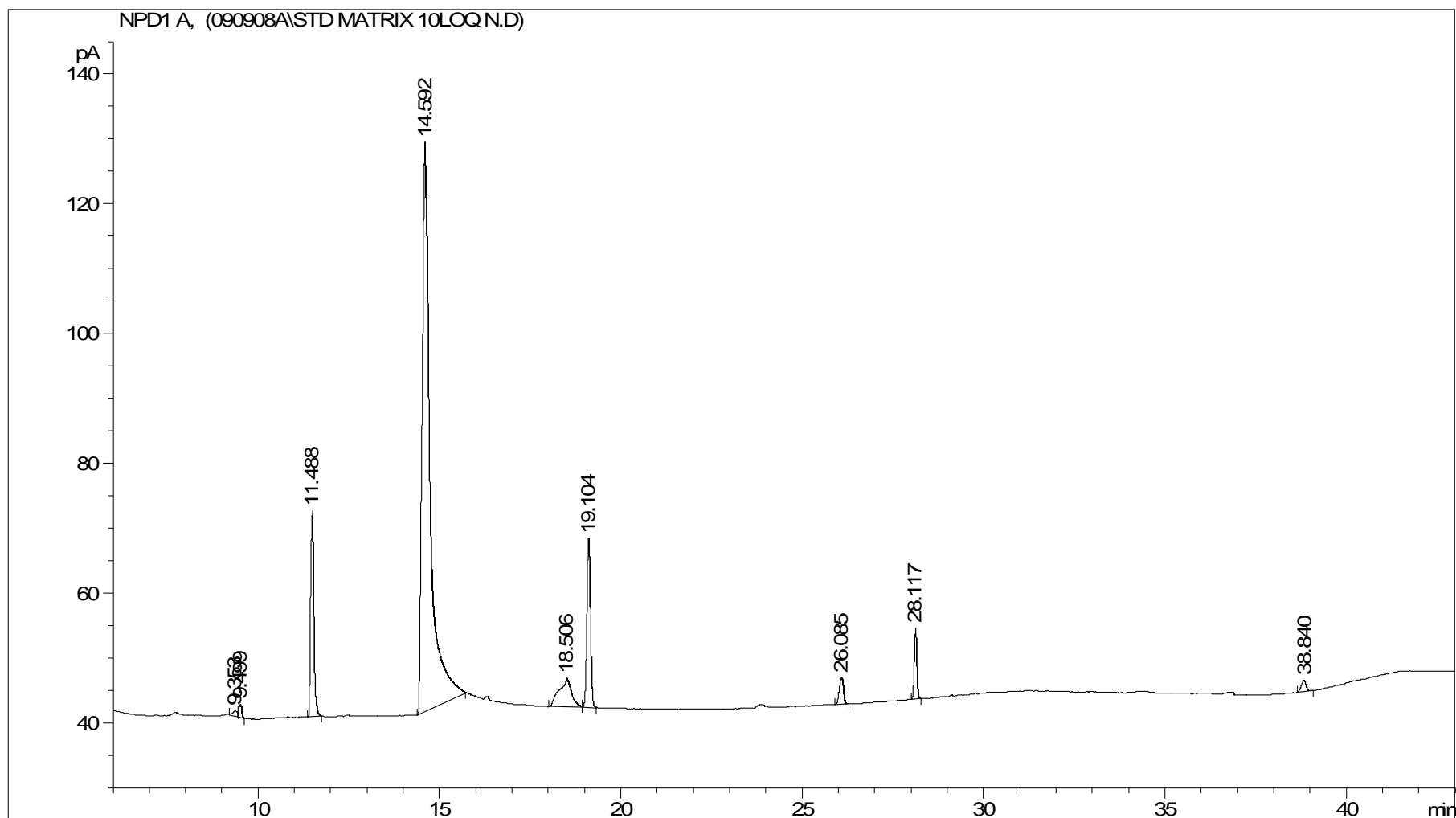
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, όπως αυτά καταγράφονται τους Πίνακες 6.2 & 6.3, οι αποκρίσεις του ανιχνευτή παρουσιάζουν γραμμικότητα στην περιοχή των συγκεντρώσεων που μελετήθηκαν, χωρίς να υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ της γραμμικότητας του ανιχνευτή και της μεθόδου. Εξαίρεση αποτελεί η συμπεριφορά των *iprodione* και *azoxystrobin* στο σταφύλι και του *cymoxanil* στο σταφύλι και το μήλο, για τα οποία παρατηρήθηκε η απουσία χρωματογραφικής κορυφής κατά τις εγχύσεις των προτύπων διαλυμάτων σε εκχυλίσματα των υποστρωμάτων, εν αντιθέσει με τις εγχύσεις των εκχυλισμάτων των εμβολιασμένων δειγμάτων.

**Πίνακας 6.2:** Γραμμικότητα του ανιχνευτή (σύστημα GC(HP-1) – NPD ) για όλους τους φυτικούς ιστούς.

<i>NPD (HP-1)</i>	<i>Υπόστρωμα τομάτας</i>			<i>Υπόστρωμα σταφυλιού</i>			<i>Υπόστρωμα μήλου</i>		
<i>Δραστική ουσία</i>	<i>Εύρος C</i> ( $\mu\text{g/g}$ )	$y=bx+a$	$R^2$	<i>Εύρος C</i> ( $\mu\text{g/g}$ )	$y=bx+a$	$R^2$	<i>Εύρος C</i> ( $\mu\text{g/g}$ )	$y=bx+a$	$R^2$
<i>cymoxanil</i>	0.24 – 0.6	$y = 3.8333x+0.79$	0.8966	-	-	-	-	-	-
<i>diphenylamine</i>	-	-	-	-	-	-	0.6 – 9.0	$y = 34.322x-2.5544$	0.9980
<i>pyrimethanil</i>	0.6 – 3.0	$y = 33.867x-0.56$	0.9991	0.6 – 9.0	$y = 30.043x-1.3466$	0.9998	0.18 – 0.9	$y = 17.697x+0.8013$	0.9950
<i>fosthiazate</i>	0.6 – 3.0	$y = 217.28x-32.39$	0.9999	0.5 – 9.0	$y = 271x-65.551$	0.9992	0.6 – 9.0	$y = 234.87x-47.25$	0.9999
<i>fludioxonil</i>	0.6 – 3.0	$y = 16.45x-0.95$	0.9962	0.6 – 9.0	$y = 7.7775x+0.1534$	0.9975	0.6 – 9.0	$y = 18.989x-3.898$	0.9960
<i>buprofezin</i>	0.6 – 3.0	$y = 30.017x-0.27$	0.9998	0.6 – 9.0	$y = 33.106x-16.462$	0.9981	0.6 – 9.0	$y = 30.579x-1.0456$	0.9999
<i>iprodione</i>	0.12 – 0.6	$y = 15.417x+0.85$	0.9920	-	-	-	0.36 – 1.8	$y = 27.524x+0.0522$	0.9996
<i>pyriproxyfen</i>	0.6 – 3.0	$y = 8.2333x+0.12$	0.9969	1.2 – 9.0	$y = 7.4479x-3.7546$	0.9975	0.6 – 9.0	$y = 8.4404x-0.1536$	1.0000
<i>azoxystrobin</i>	0.12 – 0.3	$y = 16.333x+2.92$	0.9942	-	-	-	0.18 – 0.9	$y = 25.611x-0.2822$	0.9997

**Πίνακας 6.3:** Γραμμικότητα τους μεθόδου (σύστημα GC(HP-1) – NPD ) για όλους τους φυτικούς ιστούς.

<i>NPD (HP-1)</i>	<i>Υπόστρωμα τομάτας</i>			<i>Υπόστρωμα σταφυλιού</i>			<i>Υπόστρωμα μήλου</i>		
<i>Δραστική ουσία</i>	<i>Εύρος C</i> ( $\mu\text{g/g}$ )	$y=bx+a$	$R^2$	<i>Εύρος C</i> ( $\mu\text{g/g}$ )	$y=bx+a$	$R^2$	<i>Εύρος C</i> ( $\mu\text{g/g}$ )	$y=bx+a$	$R^2$
<i>cymoxanil</i>	0.2 – 10	$y = 33.836x-15.897$	0.9965	1.0 – 4.0	$y = 29.45x-22.34$	1.0000	1.0 – 5.0	$y = 23.666x-23.162$	0.9743
<i>diphenylamine</i>	-	-	-	-	-	-	0.25 – 2.5	$y = 13.788x-0.5889$	0.9991
<i>pyrimethanil</i>	0.5 – 5.0	$y = 36.043x-1.1488$	0.9999	0.5 -20	$y = 31.322x+6.0492$	0.9995	0.2 – 25	$y = 37.261x-0.5323$	1.0000
<i>fosthiazate</i>	0.5 – 5.0	$y = 110.4x-9.7062$	1.0000	0.5 – 20	$y = 255.35x+48.938$	0.9980	0.2 – 25	$y = 208.11x+97.786$	0.9960
<i>fludioxonil</i>	0.5 – 5.0	$y = 18.465x-0.3484$	1.0000	0.5 – 20	$y = 3.8108x+8.9157$	0.9903	0.5 – 25	$y = 18.871x+1.9229$	1.0000
<i>buprofezin</i>	0.5 – 5.0	$y = 32.002x-1.1736$	0.9998	0.5 – 20	$y = 36.632x-1.3119$	0.9993	0.2 – 25	$y = 31.244x+2.5865$	0.9999
<i>iprodione</i>	0.1 – 10	$y = 19.598x-0.7715$	0.9998	0.4 – 4.0	$y = 14.322x+0.8503$	0.9991	0.5 – 5.0	$y = 18.332x+0.499$	1.0000
<i>pyriproxyfen</i>	0.5 – 5.0	$y = 8.6569x-0.0738$	0.9998	1.0 – 20	$y = 6.8924x+2.5573$	0.9998	0.2 – 25	$y = 8.5109x+0.7404$	0.9999
<i>azoxystrobin</i>	0.25 – 5.0	$y = 30.681x-0.67$	1.0000	0.25 – 20	$y = 25.552x+4.4416$	0.9816	0.25 – 2.5	$y = 29.589x+1.2371$	0.9998



**Εικόνα 6.1:** Χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος σε εκχύλισμα μήλου στο σύστημα GC-NPD. Το εύρος συγκεντρώσεων των δραστικών ουσιών κυμαίνεται από 0.12 έως 6.0 µg/ g.



### 6.1.2. Ορθότητα και πιστότητα της αναλυτικής μεθόδου

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προκύπτουν για τα πειράματα ανακτήσεων (Πίνακας 6.4) παρατηρείται ότι οι ανακτήσεις για όλα τα Φ.Π. που προσδιορίστηκαν στον GC-NPD στην τομάτα κυμαίνονται από 100 έως 121% με πολύ καλή επαναληψιμότητα που κυμαίνεται από 1 έως 11%, εκτός της περίπτωσης του *cymoxanil* στο επίπεδο 5.0 μg/g που εμφανίζει επαναληψιμότητα 21%. Τα κατώτερα επίπεδα φόρτισης για κάθε δραστική ουσία είναι χαμηλότερα από τα επίπεδα MRLs για την τομάτα.

Στην περίπτωση των πειραμάτων ανάκτησης στο σταφύλι (Πίνακας 6.5) παρατηρήθηκαν ανακτήσεις για όλα τα Φ.Π. που προσδιορίστηκαν στον GC-NPD που κυμαίνονται από 74 έως 115% με πολύ καλή επαναληψιμότητα (1 έως 23%) με εξαίρεση τις ανακτήσεις για τα *cymoxanil* και *fosthiazate* (ανακτήσεις μέχρι 138% και RSD < 38%).

Το *cymoxanil* και στην περίπτωση των ανακτήσεων στο μήλο εξακολουθεί να παραμένει ένα Φ.Π. το οποίο έχει πρόβλημα στην ανίχνευση και τον προσδιορισμό του, καθώς και πάλι το χαμηλότερο ποσοτικά προσδιοριζόμενο επίπεδο εμβολιασμού του είναι σε υψηλότερη συγκέντρωση από το επίπεδο της τιμής MRL. Το ίδιο πρόβλημα, όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα των πειραμάτων ανάκτησης στο μήλο (Πίνακας 6.6), παρατηρείται και στην περίπτωση του *azoxystrobin*, που όμως δεν έχει ιδιαίτερη σημασία, καθώς για τον προσδιορισμό του προτιμάται το σύστημα GC-ECD. Στις περιπτώσεις των *fosthiazate* και *pyriproxyfen* στο σταφύλι και το μήλο το χαμηλότερο επίπεδο εμβολιασμού του υποστρώματος είναι ίσο με το επίπεδο του MRL στον αντίστοιχο φυτικό ιστό.

Συμπερασματικά από τα πειράματα ανάκτησης προκύπτει ικανοποιητική ορθότητα της εφαρμοζόμενης αναλυτικής μεθοδολογίας με τις εξαιρέσεις που αναφέρθηκαν παραπάνω και αφορούν ιδιαίτερα τις δραστικές ουσίες *cymoxanil* και *fosthiazate*. Τα ίδια συμπεράσματα προκύπτουν και για την πιστότητα της εφαρμοζόμενης αναλυτικής μεθοδολογίας, όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα της επαναληψιμότητας.

Η πιστότητα επίσης ελέγχθηκε και ως προς την παράμετρο της αναπαραγωγιμότητας και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.7. Ο έλεγχος της αναπαραγωγιμότητας έγινε με εμβολιασμένα δείγματα στο επίπεδο 5 F (0.05 – 2.5 μg/g), όπως αναφέρεται στην παράγραφο 5.4.1.

**Πίνακας 6.4:** Ποσοστά ανάκτησης των Φ.Π. και σχετική τυπική απόκλιση (RSD) (n=7) στην τομάτα για διάφορα επίπεδα φορτίσεων.

NPD (HP-1)	RT (min)	MRL (µg/g)	Επίπεδο φόρτισης 1F			Επίπεδο φόρτισης 2F			Επίπεδο φόρτισης 5F		
			C (µg/g)	Ανάκτηση (%)	Επαναληψιμότητα (RSD)	C (µg/g)	Ανάκτηση (%)	Επαναληψιμότητα (RSD)	C (µg/g)	Ανάκτηση (%)	Επαναληψιμότητα (RSD)
<i>cymoxanil</i>	9.281	0.2	0.1	M.Π.	M.Π.	0.2	107	11	0.5	101	6
<i>pyrimethanil</i>	11.453	1.0	0.5	103	3	1.0	117	4	2.5	101	3
<i>fosthiazate</i>	14.575		0.5	104	5	1.0	116	10	2.5	103	5
<i>fludioxonil</i>	18.440	1.0	0.5	105	2	1.0	120	6	2.5	103	3
<i>buprofezin</i>	19.088	1.0	0.5	105	2	1.0	117	5	2.5	101	3
<i>iprodione</i>	26.020	5.0	0.1	104	9	0.2	121	5	0.5	100	3
<i>pyriproxyfen</i>	28.093	1.0	0.5	104	5	1.0	114	4	2.5	102	3
<i>azoxystrobin</i>	38.794	2.0	0.05	M.Π.	M.Π.	0.1	M.Π.	M.Π.	0.25	104	4

NPD (HP-1)	RT (min)	MRL (µg/g)	Επίπεδο φόρτισης 10F			Επίπεδο φόρτισης 50F			Επίπεδο φόρτισης 100F		
			C (µg/g)	Ανάκτηση (%)	Επαναληψιμότητα (RSD)	C (µg/g)	Ανάκτηση (%)	Επαναληψιμότητα (RSD)	C (µg/g)	Ανάκτηση (%)	Επαναληψιμότητα (RSD)
<i>cymoxanil</i>	9.281	0.2	1.0	104	5	5.0	119	21	10	115	2
<i>pyrimethanil</i>	11.453	1.0	5.0	103	1	25	Δ.Π.	Δ.Π.	50	Δ.Π.	Δ.Π.
<i>fosthiazate</i>	14.575		5.0	100	10	25	Δ.Π.	Δ.Π.	50	Δ.Π.	Δ.Π.
<i>fludioxonil</i>	18.440	1.0	5.0	102	2	25	Δ.Π.	Δ.Π.	50	Δ.Π.	Δ.Π.
<i>buprofezin</i>	19.088	1.0	5.0	104	2	25	Δ.Π.	Δ.Π.	50	Δ.Π.	Δ.Π.
<i>iprodione</i>	26.020	5.0	1.0	103	2	5.0	107	6	10	106	1
<i>pyriproxyfen</i>	28.093	1.0	5.0	104	2	25	Δ.Π.	Δ.Π.	50	Δ.Π.	Δ.Π.
<i>azoxystrobin</i>	38.794	2.0	0.5	104	1	2.5	109	5	5.0	105	1

M.Π. Μη προσδιορισμός (<LOQ)

Δ.Π. Δεν πραγματοποιήθηκαν

**Πίνακας 6.5:** Ποσοστά ανάκτησης των Φ.Π. και σχετική τυπική απόκλιση (RSD) (n=7) στο σταφύλι για διάφορα επίπεδα φορτίσεων.

<i>NPD (HP-1)</i>	<i>RT (min)</i>	<i>MRL (μg/g)</i>	<i>Επίπεδο φόρτισης 1F</i>			<i>Επίπεδο φόρτισης 2F</i>			<i>Επίπεδο φόρτισης 5F</i>		
<i>Δραστική ουσία</i>			<i>C (μg/g)</i>	<i>Ανάκτηση (%)</i>	<i>Επαναληψιμότητα (RSD)</i>	<i>C (μg/g)</i>	<i>Ανάκτηση (%)</i>	<i>Επαναληψιμότητα (RSD)</i>	<i>C (μg/g)</i>	<i>Ανάκτηση (%)</i>	<i>Επαναληψιμότητα (RSD)</i>
<i>cymoxanil</i>	9.281	0.2	0.1	M.Π.	M.Π.	0.2	M.Π.	M.Π.	0.5	M.Π.	M.Π.
<i>pyrimethanil</i>	11.453	5.0	0.5	111	7	1.0	108	6	2.5	102	4
<i>fosthiazate</i>	14.575	0.02	0.5	129	8	1.0	128	3	2.5	104	3
<i>fludioxonil</i>	18.440	2.0	0.5	115.	9	1.0	109	5.	2.5	88	18
<i>buprofezin</i>	19.088	1.0	0.5	113	5	1.0	103	15	2.5	107	7
<i>iprodione</i>	26.020	10	0.1	M.Π.	M.Π.	0.2	M.Π.	M.Π.	0.5	111	13
<i>pyriproxyfen</i>	28.093	0.05	0.5	101	7	1.0	109	5	2.5	102	1
<i>azoxystrobin</i>	38.794	2.0	0.05	M.Π.	M.Π.	0.1	M.Π.	M.Π.	0.25	102	14

<i>NPD (HP-1)</i>	<i>RT (min)</i>	<i>MRL (μg/g)</i>	<i>Επίπεδο φόρτισης 10F</i>			<i>Επίπεδο φόρτισης 20F</i>			<i>Επίπεδο φόρτισης 40F</i>		
<i>Δραστική ουσία</i>			<i>C (μg/g)</i>	<i>Ανάκτηση (%)</i>	<i>Επαναληψιμότητα (RSD)</i>	<i>C (μg/g)</i>	<i>Ανάκτηση (%)</i>	<i>Επαναληψιμότητα (RSD)</i>	<i>C (μg/g)</i>	<i>Ανάκτηση (%)</i>	<i>Επαναληψιμότητα (RSD)</i>
<i>cymoxanil</i>	9.281	0.2	1.0	138	32	2.0	131	11	4.0	88	8
<i>pyrimethanil</i>	11.453	5.0	5.0	108	4	10	103	6	20	91	3
<i>fosthiazate</i>	14.575	0.02	5.0	111	7	10	112	5	20	93	3
<i>fludioxonil</i>	18.440	2.0	5.0	77	18	10	90	19	20	77	23
<i>buprofezin</i>	19.088	1.0	5.0	107	6	10	106	8	20	89	3
<i>iprodione</i>	26.020	10	1.0	95	12	2.0	79	9	4.0	74	11
<i>pyriproxyfen</i>	28.093	0.05	5.0	107	3	10	109	5	20	98	5
<i>azoxystrobin</i>	38.794	2.0	0.5	109	11	1.0	106	15	2.0	99	19

M.Π. Μη προσδιορισίμο (<LOQ)

**Πίνακας 6.6:** Ποσοστά ανάκτησης των Φ.Π. και σχετική τυπική απόκλιση (RSD) (n=7) στο μήλο για διάφορα επίπεδα φορτίσεων.

NPD (HP-1)	RT (min)	MRL (μg/g)	Επίπεδο φόρτισης 0.4F			Επίπεδο φόρτισης 1F			Επίπεδο φόρτισης 5F		
			C (μg/g)	Ανάκτηση (%)	Επαναληψιμότητα (RSD)	C (μg/g)	Ανάκτηση (%)	Επαναληψιμότητα (RSD)	C (μg/g)	Ανάκτηση (%)	Επαναληψιμότητα (RSD)
<i>cymoxanil</i>	9.163	0.05	0.04	M.Π.	M.Π.	0.1	M.Π.	M.Π.	0.5	M.Π.	M.Π.
<i>diphenylamine</i>	9.469	5.0	0.02	M.Π.	M.Π.	0.05	M.Π.	M.Π.	0.25	111	16
<i>pyrimethanil</i>	11.453	5.0	0.2	111	5	0.5	104	4	2.5	107	3
<i>fosthiazate</i>	14.575	0.02	0.2	144	3	0.5	106	5	2.5	119	4
<i>fludioxonil</i>	18.440	5.0	0.2	M.Π.	M.Π.	0.5	117	5	2.5	115	3
<i>buprofezin</i>	19.088	0.5	0.2	107	5	0.5	106	2	2.5	110	4
<i>iprodione</i>	26.020	5.0	0.04	M.Π.	M.Π.	0.1	M.Π.	M.Π.	0.5	104	3
<i>pyriproxyfen</i>	28.093	0.2	0.2	87	17	0.5	102	4	2.5	101	3
<i>azoxystrobin</i>	38.794	0.05	0.02	M.Π.	M.Π.	0.05	M.Π.	M.Π.	0.25	123	4

NPD (HP-1)	RT (min)	MRL (μg/g)	Επίπεδο φόρτισης 10F			Επίπεδο φόρτισης 20F			Επίπεδο φόρτισης 50F		
			C (μg/g)	Ανάκτηση (%)	Επαναληψιμότητα (RSD)	C (μg/g)	Ανάκτηση (%)	Επαναληψιμότητα (RSD)	C (μg/g)	Ανάκτηση (%)	Επαναληψιμότητα (RSD)
<i>cymoxanil</i>	9.163	0.05	1.0	126	13	2.0	132	5	5.0	94	14
<i>diphenylamine</i>	9.469	5.0	0.5	108	4	1.0	109	3	2.5	93	3
<i>pyrimethanil</i>	11.453	5.0	5.0	105	5	10	108	3	25	103	2
<i>fosthiazate</i>	14.575	0.02	5.0	119	5	10	112	7	25	115	8
<i>fludioxonil</i>	18.440	5.0	5.0	114	11	10	120	8	25	104	4
<i>buprofezin</i>	19.088	0.5	5.0	111	5	10	104	3	25	100	2
<i>iprodione</i>	26.020	5.0	1.0	104	5	2.0	105	3	5.0	101	2
<i>pyriproxyfen</i>	28.093	0.2	5.0	109	4	10	103	3	25	99	2
<i>azoxystrobin</i>	38.794	0.05	0.5	125	9	1.0	107	5	2.5	88	2

M.Π. Μη προσδιορισμένο (<LOQ)

**Πίνακας 6.7:** Αναπαραγωγιμότητα σε επίπεδο φόρτισης 5 F για όλους τους φυτικούς ιστούς της μελέτης, εκφρασμένη ως σχετική τυπική απόκλιση (RSD) (n=10).

<i>Δραστική ουσία</i>	<i>C (μg/ g)</i>	<i>Τομάτα</i>	<i>Σταφύλι</i>	<i>Μήλο</i>
		<i>Αναπαραγωγιμότητα (RSD)</i>	<i>Αναπαραγωγιμότητα (RSD)</i>	<i>Αναπαραγωγιμότητα (RSD)</i>
<i>cymoxanil</i>	0.5	26	M.Π.	M.Π.
<i>diphenylamine</i>	0.25	-	-	5.0
<i>pyrimethanil</i>	2.5	3.0	5.0	6.0
<i>fosthiazate</i>	2.5	25	3.0	5.0
<i>fludioxonil</i>	2.5	8.0	15	9.0
<i>buprofezin</i>	2.5	4.0	8.0	7.0
<i>iprodione</i>	0.5	11	13	8.0
<i>pyriproxyfen</i>	2.5	4.0	10	11
<i>azoxystrobin</i>	0.25	8.0	14	8.0

M.Π. Μη προσδιορίσιμο (<LOQ)

Στην τομάτα όλα τα μόρια παρουσιάζουν καλά επίπεδα αναπαραγωγιμότητας, με εξαίρεση το *cymoxanil* του οποίου η αναπαραγωγιμότητα κυμαίνεται σε οριακές τιμές.

Στην περίπτωση του σταφυλιού, όπως και στις ανακτήσεις, το *cymoxanil* δείχνει ότι υπάρχει δυσκολία στον προσδιορισμό του, καθώς στο επίπεδο στο οποίο ελέγχθηκε η αναπαραγωγιμότητα δεν προσδιορίζεται.

Όσον αφορά το μήλο όλα τα Φ.Π. που προσδιορίζονται στον GC-NPD παρουσιάζουν πολύ καλές τιμές αναπαραγωγιμότητας, με εξαίρεση όμως και πάλι το *cymoxanil*, το οποίο δεν προσδιορίζεται σε αυτό το επίπεδο συγκέντρωσης, αν και το επίπεδο εμβολιασμού είναι δεκαπλάσιο της τιμής MRL στο μήλο.

### 6.1.3. Ανιχνευσιμότητα της αναλυτικής μεθόδου

Τα όρια ποσοτικού προσδιορισμού (LOQ) της αναλυτικής μεθόδου του κάθε Φ.Π. στο σύστημα GC-NPD υπολογίστηκαν με βάση τα αποτελέσματα της γραμμικότητας και της ορθότητας της μεθόδου. Δηλαδή ως όριο ποσοτικού προσδιορισμού θεωρήθηκε η συγκέντρωση στην οποία τα επίπεδα των ανακτήσεων για κάθε δραστική ουσία ήταν ικανοποιητικά και ο ανιχνευτής παρουσίαζε γραμμικότητα, είτε αυτή αναφέρεται ως γραμμικότητα ανιχνευτή είτε ως γραμμικότητα της μεθόδου. Τα περισσότερα όρια ποσοτικοποίησης όπως προέκυψαν από την παραπάνω θεώρηση επιβεβαιώνουν και το όριο ποσοτικοποίησης που προκύπτει λαμβάνοντας υπόψη το θόρυβο του κάθε υποστρώματος σε δείγματα «μάρτυρα» στον αντίστοιχο χρόνο κατακράτησης της κάθε δραστικής ουσίας.

Ως όριο ανίχνευσης της μεθόδου (LOD) κάθε δραστικής ουσίας ορίστηκε το τριπλάσιο του θορύβου στο συγκεκριμένο χρόνο κατακράτησης.

**Πίνακας 6.8:** Όρια ανίχνευσης (LOD) και όρια ποσοτικοποίησης (LOQ) για τις δραστικές ουσίες της αναλυτικής μεθόδου, για όλους τους φυτικούς ιστούς.

<i>NPD (HP-1)</i>	<i>Τομάτα</i>			<i>Σταφύλι</i>			<i>Μήλο</i>		
<i>Δραστική ουσία</i>	<i>MRL</i> ( $\mu\text{g/g}$ )	<i>LOD</i> ( $\mu\text{g/g}$ )	<i>LOQ</i> ( $\mu\text{g/g}$ )	<i>MRL</i> ( $\mu\text{g/g}$ )	<i>LOD</i> ( $\mu\text{g/g}$ )	<i>LOQ</i> ( $\mu\text{g/g}$ )	<i>MRL</i> ( $\mu\text{g/g}$ )	<i>LOD</i> ( $\mu\text{g/g}$ )	<i>LOQ</i> ( $\mu\text{g/g}$ )
<i>cymoxanil</i>	0.2	0.07	0.2*	0.2	0.2	1.0*	0.05	0.1	1.0*
<i>diphenylamine</i>	-	-	-	-	-	-	5.0	0.04	0.25
<i>pyrimethanil</i>	1.0	0.02	0.5	5.0	0.05	0.5	5.0	0.05	0.2
<i>fosthiazate</i>	-	0.01	0.02	0.5	0.01	0.5*	0.02	0.01	0.2*
<i>fludioxonil</i>	1.0	0.1	0.5	2.0	0.15	0.5	5.0	0.15	0.5
<i>buprofezin</i>	1.0	0.02	0.5	1.0	0.05	0.5	0.5	0.05	0.2
<i>iprodione</i>	5.0	0.03	0.1	10	0.15	0.5	5.0	0.1	0.5
<i>pyriproxyfen</i>	1.0	0.1	0.5	0.05	0.15	0.5*	0.2	0.06	0.2*
<i>azoxystrobin</i>	2.0	0.05	0.25	2.0	0.08	0.25	0.05	0.05	0.25*

Όπως παρατηρούμε από τα αποτελέσματα στον Πίνακα 6.8, όλα σχεδόν τα όρια ποσοτικού προσδιορισμού καλύπτουν το ανώτατο επιτρεπτό όριο υπολειμμάτων. Εξαιρέσεις αποτελούν οι δραστικές ουσίες οι οποίες έχουν επισημανθεί με αστερίσκο (\*), για τις οποίες η τιμή LOQ είτε είναι ίση της τιμής MRL είτε την ξεπερνάει.

#### 6.1.4. Έλεγχος επίδρασης του υποστρώματος

Από τη σύγκριση των μέσων τιμών της επιφάνειας των χρωματογραφικών κορυφών των προτύπων διαλυμάτων σε εκχύλισμα υποστρώματος με αυτές σε καθαρό διαλύτη για διαφορετικά επίπεδα συγκεντρώσεων προέκυψε η επί τοις εκατό επίδραση του κάθε υποστρώματος, που παρουσιάζεται στον Πίνακα 6.9.

Παρατηρείται ότι έντονη επίδραση υποστρώματος έχουμε στα *fludioxonil* και *diphenylamine* στο μήλο με τιμές 282% και 174%, αντίστοιχα, ενώ στην τομάτα παρατηρείται επίδραση υποστρώματος για το *fludioxonil* (140%).

Αυτό που πρέπει να σημειωθεί είναι ότι μεταξύ των διαφορετικών επιπέδων συγκέντρωσης δεν υπήρχε σημαντική διαφορά στην επί τοις εκατό επίδραση του υποστρώματος, κάτι το οποίο αποδεικνύεται και από τις χαμηλές τιμές της σχετικής τυπικής απόκλισης (RSD).

**Πίνακας 6.9:** Η επί τοις εκατό επίδραση του κάθε υποστρώματος στο χρωματογραφικό σύστημα GC-NPD.

NPD (HP-1)	Τομάτα	Σταφύλι	Μήλο
Δραστική ουσία	% Επίδραση $\pm$ RSD(%)	% Επίδραση $\pm$ RSD(%)	% Επίδραση $\pm$ RSD(%)
<i>cymoxanil</i>	-	-	-
<i>diphenylamine</i>	-	-	174 $\pm$ 11
<i>pyrimethanil</i>	103 $\pm$ 4	97 $\pm$ 7	103 $\pm$ 4
<i>fosthiazate</i>	117 $\pm$ 2	102 $\pm$ 4	128 $\pm$ 8
<i>fludioxonil</i>	140 $\pm$ 10	80 $\pm$ 2	282 $\pm$ 1
<i>buprofezin</i>	98 $\pm$ 2	96 $\pm$ 10	90 $\pm$ 6
<i>iprodione</i>	120 $\pm$ 8	121 $\pm$ 7	117 $\pm$ 8
<i>pyriproxifen</i>	105 $\pm$ 2	93 $\pm$ 10	103 $\pm$ 5
<i>azoxystrobin</i>	107 $\pm$ 2	105 $\pm$ 5	103 $\pm$ 4

- : Η *diphenylamine* εξετάστηκε μόνο στο υπόστρωμα του μήλου.

- : Το *cymoxanil* εμφάνισε χρωματογραφικό σήμα μόνο στις εγχύσεις των πρότυπων διαλυμάτων σε εκχύλισμα υποστρώματος

#### 6.1.5. Έλεγχος της αβεβαιότητας της αναλυτικής μεθόδου

Η αβεβαιότητα της αναλυτικής μεθόδου εκφράζεται ως τυπική απόκλιση με βάση τους τύπους που αναφέρονται στην παράγραφο 3.5.1. Στην περίπτωση της αβεβαιότητας που συνδέεται με την ορθότητα της αναλυτικής μεθόδου αυτή εκφράστηκε με τη σχετική τυπική

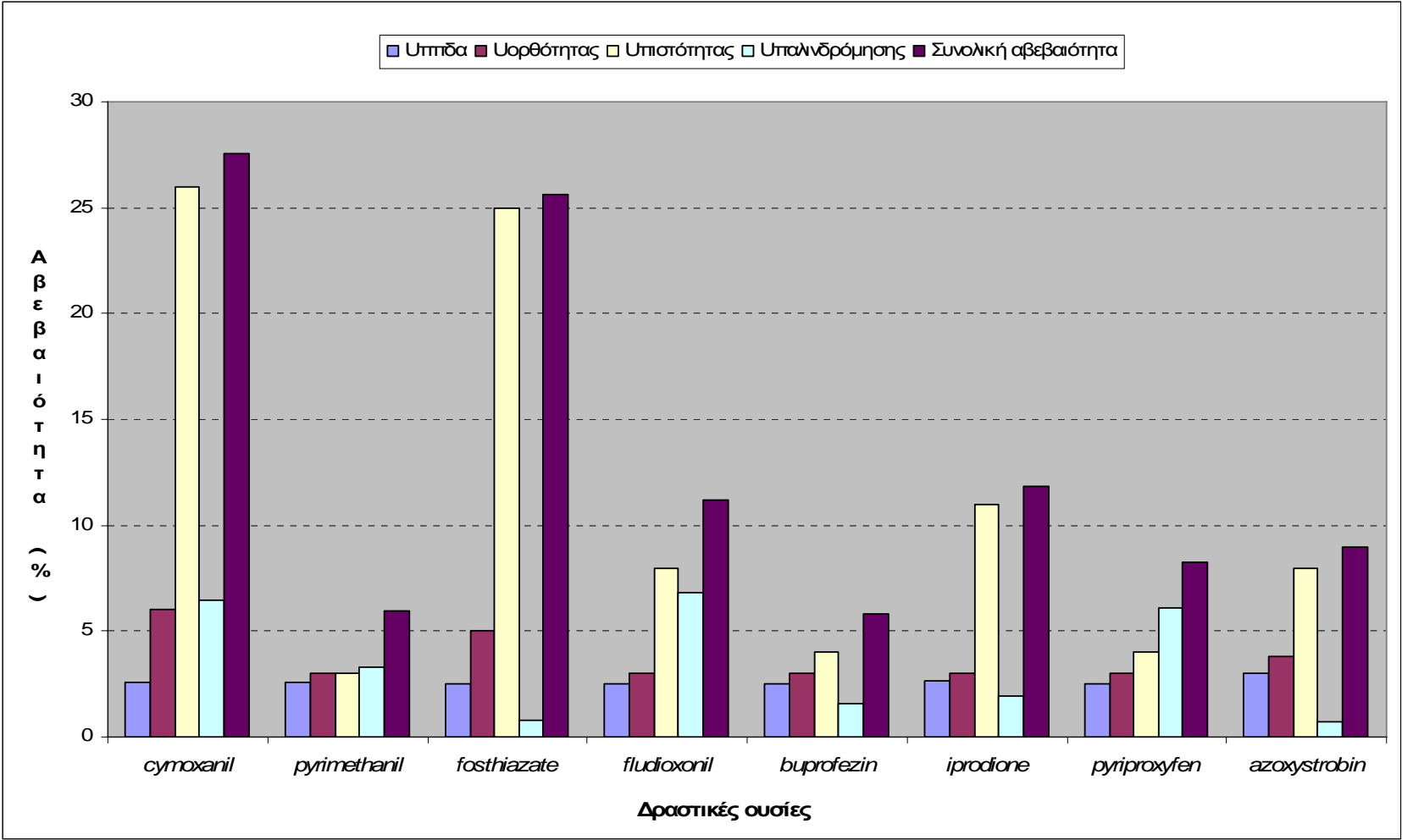
απόκλιση (RSD %) που παρουσίασαν τα πειράματα ανάκτησης στο επίπεδο εμβολιασμού 5 F (0.05 – 2.5 µg/ g), ενώ η αβεβαιότητα που συνδέεται με την πιστότητα της αναλυτικής μεθόδου εκφράστηκε με την αναπαραγωγιμότητα ως σχετική τυπική απόκλιση. Στην προκειμένη περίπτωση η αβεβαιότητα δεν έχει εκφραστεί ως τυπική απόκλιση, αλλά ως σχετική τυπική απόκλιση και για το λόγο αυτό οι αβεβαιότητες που συνδέονται με την παρασκευή των προτύπων διαλυμάτων και της καμπύλης αναφοράς πολλαπλασιάστηκαν με το εκατό, έτσι ώστε στον υπολογισμό της συνολικής αβεβαιότητας, όλες οι επί μέρους αβεβαιότητες να είναι εκφρασμένες με τον ίδιο τρόπο (%). Όσον αφορά την αβεβαιότητα που συνδέεται με την καμπύλη αναφοράς, αυτή υπολογίστηκε από τον τύπο που αναφέρεται στην παράγραφο 3.5.1 και πολλαπλασιάστηκε με το εκατό για το λόγο που προαναφέρθηκε. Η αβεβαιότητα που συνδέεται με την παρασκευή των προτύπων διαλυμάτων αναφοράς (ΠΠΔΑ) υπολογίστηκε ως η τετραγωνική ρίζα του αθροίσματος των τετραγώνων των επί μέρους αβεβαιοτήτων των σιφωνίων, των ογκομετρικών φιαλών, της καθαρότητας της δραστικής ουσίας και του ζυγού που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του κάθε προτύπου διαλύματος και πολλαπλασιάστηκε με το εκατό.

Στις γραφικές παραστάσεις που ακολουθούν (Γράφημα 6.1 - 6.3) παρουσιάζεται η επί μέρους αβεβαιότητα που οφείλεται στον κάθε παράγοντα, ώστε να αποδίδεται παραστατικά η συνεισφορά του καθενός από αυτούς στη συνολική αβεβαιότητα.

**Πίνακας 6.10:** Αβεβαιότητες της αναλυτικής μεθόδου για την κάθε δραστική ουσία στην τομάτα.

<i>Δραστικές ουσίες</i>	<i>U<sub>ΠΠΔΑ</sub> (%)</i>	<i>U<sub>Ορθότητας</sub> (%)</i>	<i>U<sub>Πιστότητας</sub> (%)</i>	<i>U<sub>Καμπύλης αναφοράς</sub> (%)</i>	<i>Συνολική αβεβαιότητα (%)</i>	<i>Διευρυμένη αβεβαιότητα (%)</i>
<i>cymoxanil</i>	2.6148	6.0	26	6.443	28	55
<i>pyrimethanil</i>	2.5534	3.0	3.0	3.277	6.0	12
<i>fosthiazate</i>	2.4999	5.0	25	0.805	26	51
<i>fludioxonil</i>	2.4999	3.0	8.0	6.808	11	22
<i>buprofezin</i>	2.4999	3.0	4.0	1.598	6.0	12
<i>iprodione</i>	2.6487	3.0	11	1.963	12	24
<i>pyriproxifen</i>	2.4999	3.0	4.0	6.097	8.0	17
<i>azoxystrobin</i>	3.0481	3.8	8.0	0.724	9.0	18

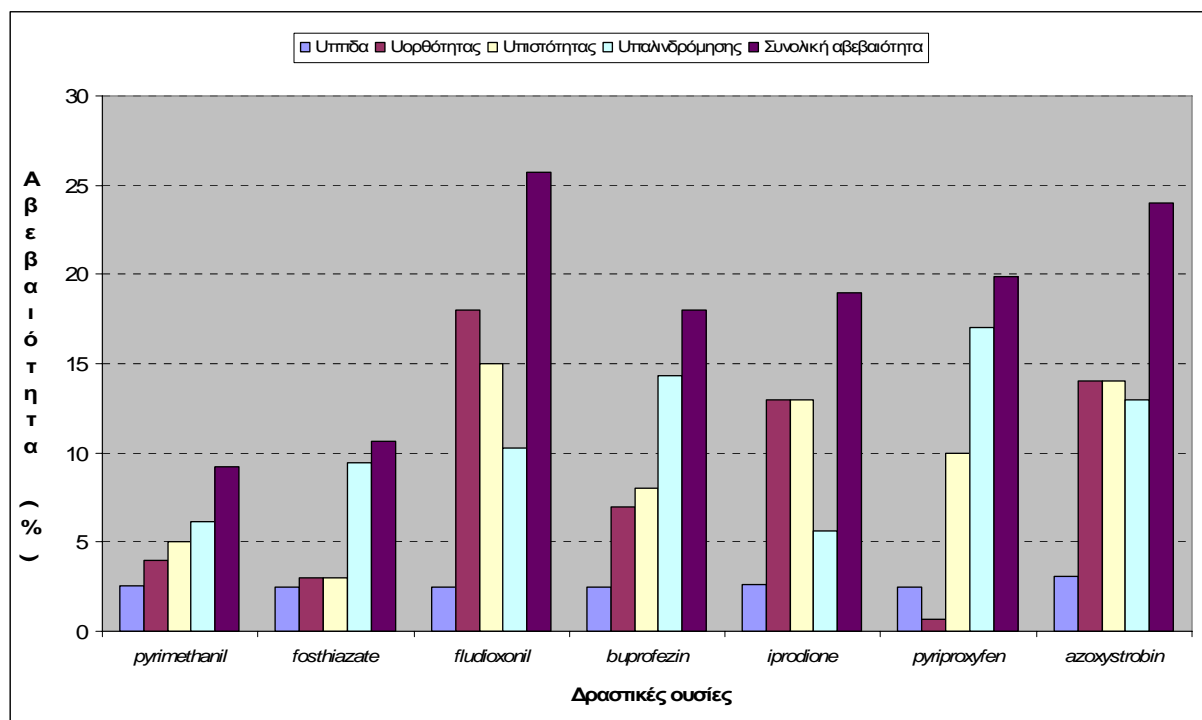




**Γράφημα 6.1:** Επί μέρους αβεβαιότητες (%) και συνολική αβεβαιότητα (%) της μεθόδου για τον προσδιορισμό των δραστικών ουσιών της μελέτης σε υπόστρωμα τομάτας

**Πίνακας 6.11:** Αβεβαιότητες της αναλυτικής μεθόδου για την κάθε δραστική ουσία στο σταφύλι.

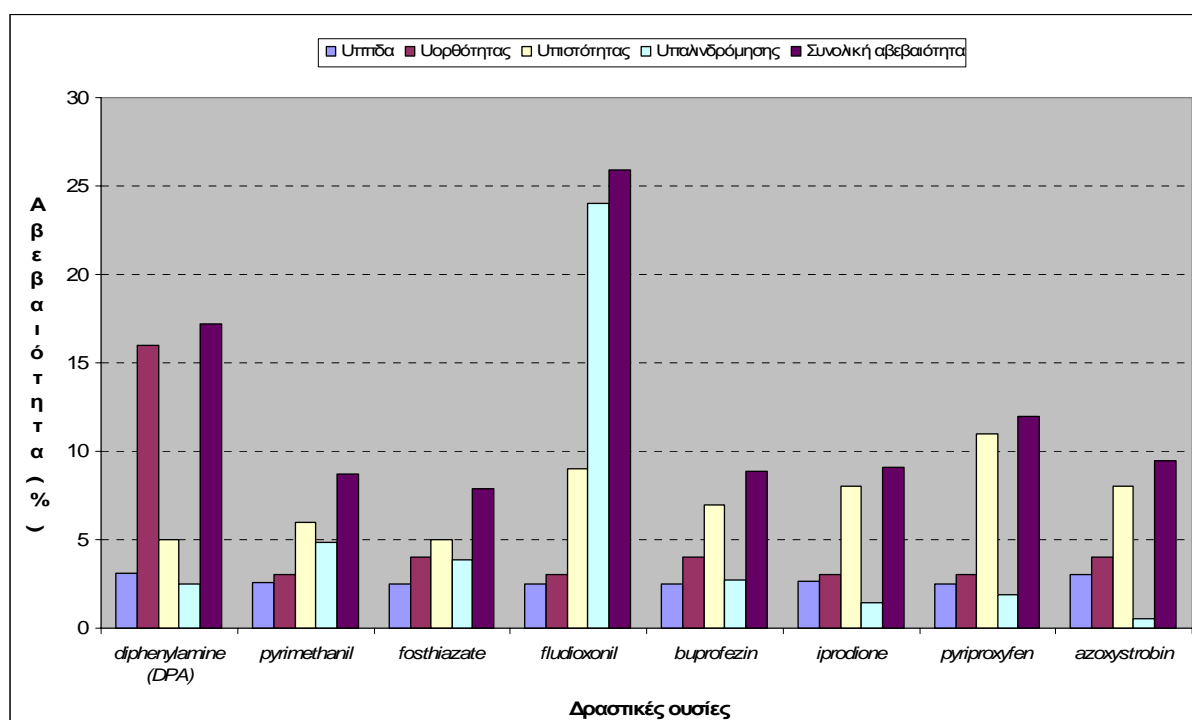
Δραστικές ουσίες	$U_{ΠΠΔΑ}$ (%)	$U_{Ορθότητας}$ (%)	$U_{Πιστότητας}$ (%)	$U_{Καμπύλης αναφοράς}$ (%)	Συνολική αβεβαιότητα (%)	Διευρυμένη αβεβαιότητα (%)
<i>cymoxanil</i>	2.6148	M.Π.	M.Π.	-	-	-
<i>pyrimethanil</i>	2.5534	4.0	5.0	6.114	9.0	18
<i>fosthiazate</i>	2.4999	3.0	3.0	9.461	11	21
<i>fludioxonil</i>	2.4999	18	15	10.28	26	51
<i>buprofezin</i>	2.4999	7.0	8.0	14.36	18	36
<i>iprodione</i>	2.6487	13	13	5.660	19	38
<i>pyriproxyfen</i>	2.4999	1.0	10	16.99	20	40
<i>azoxystrobin</i>	3.0481	14	14	12.96	24	48



**Γράφημα 6.2:** Επί μέρους αβεβαιότητες (%) και συνολική αβεβαιότητα (%) της μεθόδου για τον προσδιορισμό των δραστικών ουσιών της μελέτης σε υπόστρωμα σταφυλιού.

**Πίνακας 6.12:** Αβεβαιότητες της αναλυτικής μεθόδου για την κάθε δραστική ουσία στο μήλο.

Δραστικές ουσίες	U <sub>ΠΠΔΑ</sub> (%)	U <sub>Ορθότητας</sub> (%)	U <sub>Πιστότητας</sub> (%)	U <sub>Καμπύλης</sub> αναφοράς (%)	Συνολική αβεβαιότητα (%)	Διευρυμένη αβεβαιότητα (%)
<i>cymoxanil</i>	2.6148	M.Π.	M.Π.	-	-	-
<i>diphenylamine</i>	3.1075	16	5.0	2.491	17	34
<i>pyrimethanil</i>	2.5534	3.0	6.0	4.880	9.0	17
<i>fosthiazate</i>	2.4999	4.0	5.0	3.835	8.0	16
<i>fludioxonil</i>	2.4999	3.0	9.0	24.02	26	52
<i>buprofezin</i>	2.4999	4.0	7.0	2.733	9.0	18
<i>iprodione</i>	2.6487	3.0	8.0	1.442	9.0	18
<i>pyriproxyfen</i>	2.4999	3.0	11	1.861	12	24
<i>azoxystrobin</i>	3.0481	4.0	8.0	0.556	9.0	19



**Γράφημα 6.3:** Επί μέρους αβεβαιότητες (%) και συνολική αβεβαιότητα (%) της μεθόδου για τον προσδιορισμό των δραστικών ουσιών της μελέτης σε υπόστρωμα μήλου.

## 6.2. Επικύρωση της αναλυτικής μεθόδου σε σύστημα GC-ECD

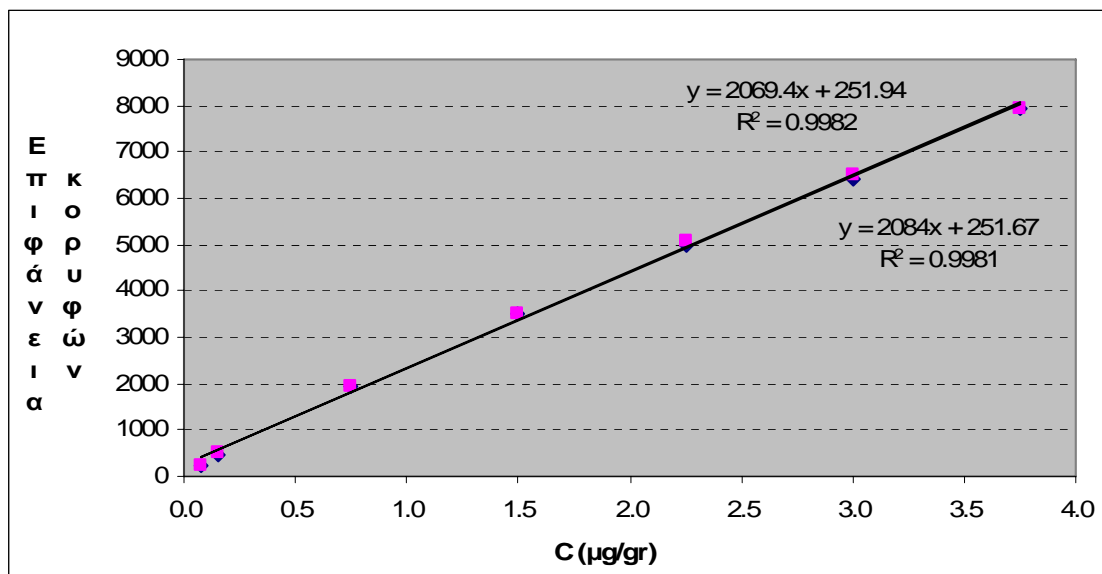
### 6.2.1. Έλεγχος της γραμμικότητας

Όπως στην περίπτωση του χρωματογραφικού συστήματος GC (HP-1) – NPD, έτσι και στο GC (HP-5) – ECD χρωματογραφικό σύστημα ο έλεγχος της γραμμικότητας για τον ανιχνευτή και τη μέθοδο έγιναν ξεχωριστά. Ο έλεγχος της γραμμικότητας του ανιχνευτή πραγματοποιήθηκε με την έγχυση πρότυπων διαλυμάτων επτά διαδοχικών συγκεντρώσεων ( $\mu\text{g } \delta.\text{o.}/ \text{mL}$ ) και για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς οι συγκεντρώσεις των προτύπων διαλυμάτων εκφράστηκαν σε  $\mu\text{g } \delta.\text{o.}/ \text{g}$  ιστού. Αυτό έγινε με τη χρήση του συντελεστή αραίωσης ( $30 \text{ mL}/ \text{g}$  ιστού) της αναλυτικής μεθόδου που χρησιμοποιείται για ουσίες που προσδιορίζονται στον ECD, έτσι ώστε να είναι δυνατή η σύγκριση της γραμμικότητας του ανιχνευτή με τη γραμμικότητα της μεθόδου, η οποία πραγματοποιήθηκε με τα εμβολιασμένα δείγματα για το κάθε υπόστρωμα και για το κάθε επίπεδο συγκέντρωσης λαμβάνοντας το μέσο όρο επτά επαναλήψεων.

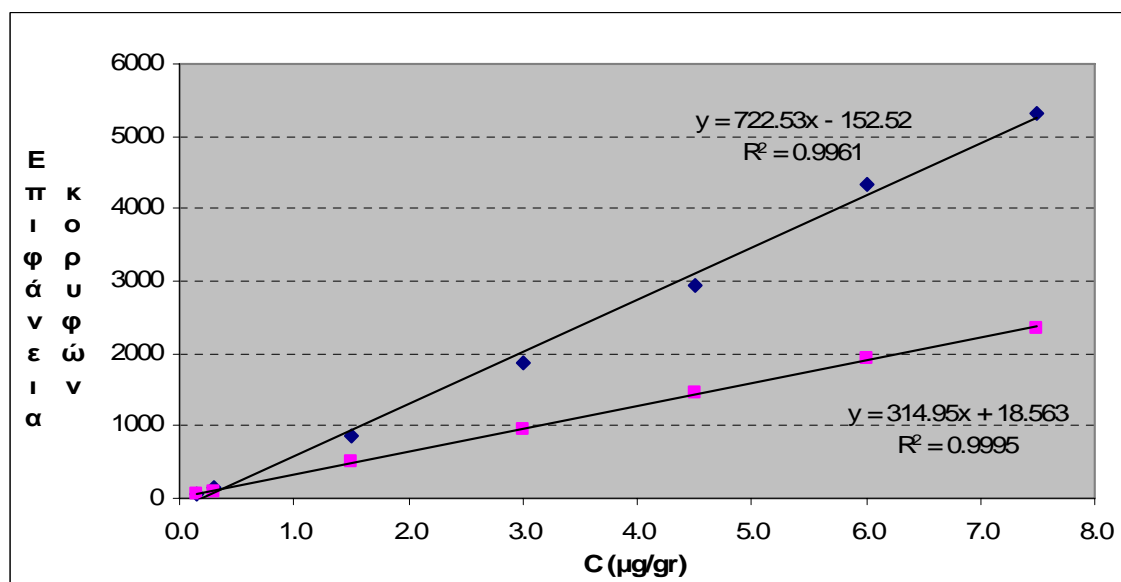
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, όπως αυτά καταγράφονται στους Πίνακες 6.13 & 6.14, οι αποκρίσεις του ανιχνευτή παρουσιάζουν γραμμικότητα στην περιοχή των συγκεντρώσεων που μελετήθηκαν, χωρίς να υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ της γραμμικότητας του ανιχνευτή και της μεθόδου, όπως παρατηρήθηκε στην περίπτωση των *iprodione* και *azoxystrobin* στο σύστημα GC (HP-1) – NPD. Έτσι, η ανίχνευση και ο προσδιορισμός των *iprodione* και *azoxystrobin* είναι εφικτό να πραγματοποιηθούν με μεγαλύτερη ακρίβεια σε σύστημα GC-ECD.

Στις πρότυπες καμπύλες βαθμονόμησης που απεικονίζονται στα Γραφήματα 6.4. και 6.5 διαπιστώνεται η γραμμικότητα του ανιχνευτή για το *procymidone*, με το εύρος των συγκεντρώσεων του να κυμαίνεται από 0.08 έως  $3.8 \mu\text{g}/ \text{g}$  και το συντελεστή προσδιορισμού του ( $R^2$ ) να είναι ίσος με 0.9982, καθώς επίσης και για το *fenhexamid* με εύρος συγκεντρώσεων από 0.15 έως  $7.5 \mu\text{g}/ \text{g}$  και συντελεστή προσδιορισμού  $R^2$  ίσο με 0.9961.

Στις καμπύλες βαθμονόμησης των δύο αυτών δραστικών ουσιών παρατηρείται ξεκάθαρα και το φαινόμενο της επίδρασης ή μη επίδρασης του υποστρώματος. Στην περίπτωση του *procymidone* οι δύο καμπύλες βαθμονόμησης, σε καθαρό διαλύτη και σε εκχύλισμα υποστρώματος συμπίπτουν και έχουν τον ίδιο συντελεστή διεύθυνσης, συνεπώς, δεν έχουμε επίδραση του υποστρώματος, ενώ αντίθετα στην περίπτωση του *fenhexamid*, όπου οι δύο πρότυπες καμπύλες έχουν διαφορετικό συντελεστή διεύθυνσης και απέχουν πολύ μεταξύ τους, εμφανίζεται έντονα η επίδραση υποστρώματος.



**Γράφημα 6.4:** Καμπύλη βαθμονόμησης του συστήματος GC-ECD για πρότυπα διαλύματα *procymidone* σε εκχύλισμα σταφυλιού και καθαρό διαλύτη.



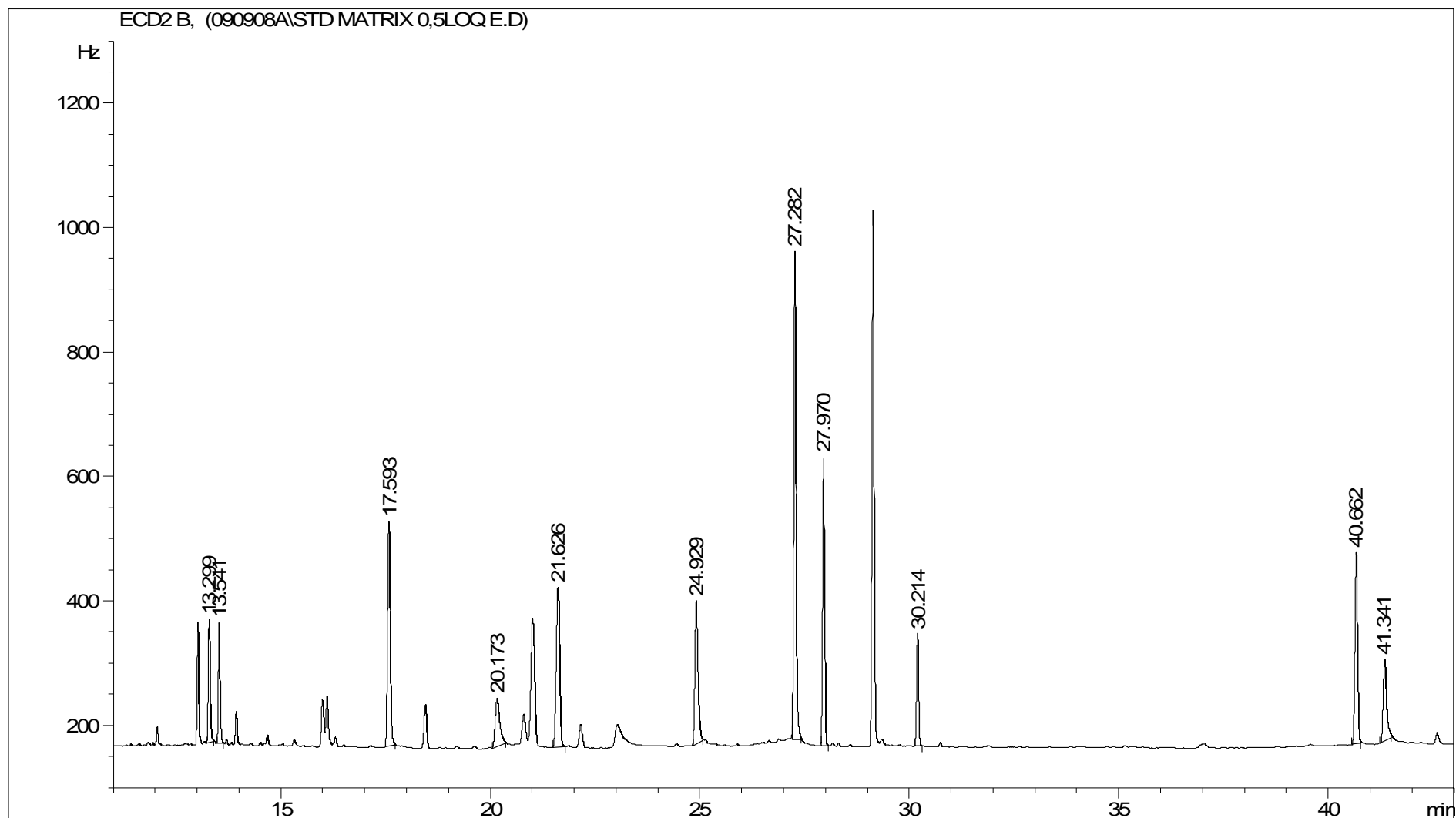
**Γράφημα 6.5:** Καμπύλη βαθμονόμησης του συστήματος GC-ECD για πρότυπα διαλύματα *fenhexamid* σε εκχύλισμα σταφυλιού και καθαρό διαλύτη.

**Πίνακας 6.13:** Γραμμικότητα του ανιχνευτή για όλους τους φυτικούς ιστούς.

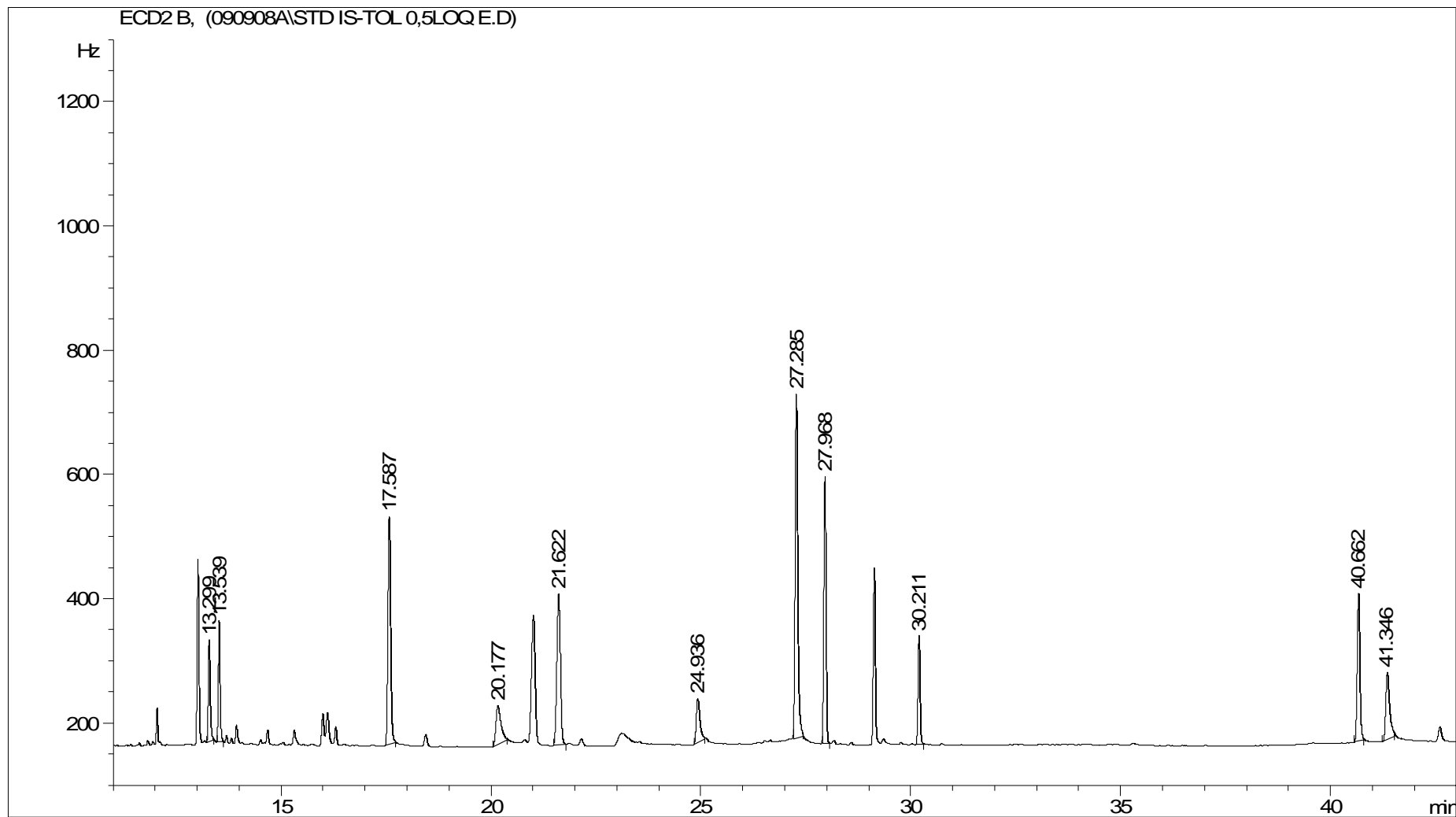
<i>ECD (HP-5)</i> <i>Δραστική ουσία</i>	<i>Υπόστρωμα τομάτας</i>			<i>Υπόστρωμα σταφυλιού</i>			<i>Υπόστρωμα μήλου</i>		
	<i>Εύρος C</i> ( $\mu\text{g/g}$ )	$y=bx+a$	$R^2$	<i>Εύρος C</i> ( $\mu\text{g/g}$ )	$y=bx+a$	$R^2$	<i>Εύρος C</i> ( $\mu\text{g/g}$ )	$y=bx+a$	$R^2$
<i>metribuzin</i>	0.02 - 1.5	$y = 5164.2x - 77.925$	0.9995	0.02 - 0.8	$y = 7135.3x - 64.544$	0.9985	0.03 - 0.8	$y = 4351.3x + 33.647$	0.9983
<i>vinclozolin</i>	0.02 - 1.5	$y = 3889.3x + 68.623$	0.9985	0.02 - 0.8	$y = 5118.7x + 12.527$	0.9999	0.02 - 0.8	$y = 3575x + 47.807$	0.9986
<i>procymidone</i>	0.05 - 7.5	$y = 1652.1x + 399.74$	0.9952	0.08 - 3.8	$y = 2069.4x + 251.94$	0.9982	0.08 - 3.8	$y = 1797.6x + 266.14$	0.9967
<i>fludioxonil</i>	0.5 - 15	$y = 58.083x + 4.181$	0.9986	0.75 - 15	$y = 81.3777x + 3.256$	0.9971	0.75 - 15	$y = 85.03x + 3.8$	1.0000
<i>kresoxim-methyl</i>	0.05 - 7.5	$y = 2082.6x + 129.3$	0.9989	0.08 - 3.8	$y = 2397.9x + 24.567$	0.9998	0.08 - 3.8	$y = 1857.5x + 26.946$	0.9963
<i>fenhexamid</i>	0.2 - 15	$y = 627.17x - 281.88$	0.9973	0.15 - 7.5	$y = 722.53x - 152.52$	0.9961	0.15 - 7.5	$y = 1006.4x - 154.15$	0.9982
<i>iprodione</i>	0.1 - 15	$y = 1158.2x + 31.005$	0.9995	0.3 - 7.5	$y = 1459.5x + 162.87$	0.9973	0.15 - 7.5	$y = 2048.2x + 82.026$	0.9989
<i>bifenthrin</i>	0.05 - 7.5	$y = 2071.6x + 149.84$	0.9988	0.08 - 3.8	$y = 2247.1x + 81.547$	0.9998	0.08 - 3.8	$y = 1869.8x + 76.595$	0.9979
<i><math>\lambda</math>-cyhalothrin</i>	0.01 - 1.5	$y = 4467.4x - 24.545$	0.9997	0.02 - 0.8	$y = 6299x - 53.62$	0.9978	0.02 - 0.8	$y = 3776.5x + 67.985$	0.9924
<i>indoxacarb</i>	0.05 - 7.5	$y = 2323.3x - 303.5$	0.9985	0.08 - 3.8	$y = 2457.9x - 185.47$	0.9961	0.08 - 3.8	$y = 1745.3x + 75.651$	0.9990
<i>azoxystrobin</i>	0.25 - 7.5	$y = 1161.7x - 60.859$	0.9994	0.08 - 3.8	$y = 1273.1x + 41.719$	0.9984	0.08 - 3.8	$y = 1071.8x + 31.586$	0.9982

**Πίνακας 6.14:** Γραμμικότητα της μεθόδου για όλους τους φυτικούς ιστούς.

<i>ECD (HP-5)</i> <i>Δραστική ουσία</i>	<i>Υπόστρωμα τομάτας</i>			<i>Υπόστρωμα σταφυλιού</i>			<i>Υπόστρωμα μήλου</i>		
	<i>Εύρος C</i> ( $\mu\text{g/g}$ )	$y=bx+a$	$R^2$	<i>Εύρος C</i> ( $\mu\text{g/g}$ )	$y=bx+a$	$R^2$	<i>Εύρος C</i> ( $\mu\text{g/g}$ )	$y=bx+a$	$R^2$
<i>metribuzin</i>	0.02 - 1.0	$y = 5423.5x - 135.53$	0.9938	0.01 - 0.4	$y = 5455.4x + 41.271$	0.9983	0.05 - 0.5	$y = 5981.82x + 61.17$	1.0000
<i>vinclozolin</i>	0.02 - 1.0	$y = 4992.5x - 45.254$	0.9998	0.01 - 0.4	$y = 4474.3x + 71.078$	0.9973	0.01 - 0.5	$y = 4398.9x + 54.503$	0.9989
<i>procymidone</i>	0.05 - 5.0	$y = 1735.9x + 240.36$	0.9969	0.1 - 2.0	$y = 1922.3x + 372.03$	0.9977	0.05 - 2.5	$y = 2021.9x + 319.02$	0.9927
<i>fludioxonil</i>	0.5 - 5.0	$y = 77.071x + 26.258$	0.9914	0.5 - 20	$y = 71.801x + 91.537$	0.9868	0.5 - 25	$y = 79.406x + 90.184$	0.9924
<i>kresoxim-methyl</i>	0.05 - 5.0	$y = 2043.1x + 116.08$	0.9996	0.05 - 2.0	$y = 2140x + 175.2$	0.9979	0.02 - 2.5	$y = 2362x + 118.39$	0.9981
<i>fenhexamid</i>	0.2 - 10	$y = 638.41x + 15.638$	0.9976	0.1 - 4.0	$y = 669.96x - 14.143$	0.9959	0.1 - 5.0	$y = 1099x - 75.261$	0.9999
<i>iprodione</i>	0.1 - 10	$y = 933.63x + 316.21$	0.9942	0.2 - 4.0	$y = 1286.1x + 329.64$	0.9986	0.04 - 5.0	$y = 1448.5x + 150.29$	0.9981
<i>bifenthrin</i>	0.05 - 5.0	$y = 2090.5x + 152.09$	0.9987	0.05 - 2.0	$y = 2114.58x + 201.9$	1.0000	0.02 - 2.5	$y = 648.93x + 35.661$	0.9983
<i><math>\lambda</math>-cyhalothrin</i>	0.01 - 1.0	$y = 6186.4x - 68.569$	0.9995	0.01 - 0.4	$y = 5300.8x + 50.401$	0.9987	0.01 - 0.5	$y = 4675.7x + 43.132$	0.9991
<i>indoxacarb</i>	0.05 - 5.0	$y = 1797.1x + 119.56$	0.9986	0.05 - 2.0	$y = 2144.5x + 100.42$	0.9984	0.02 - 2.5	$y = 2361.6x + 63.943$	0.9991
<i>azoxystrobin</i>	0.25 - 5.0	$y = 929.25x + 352.05$	0.9923	0.05 - 2.0	$y = 1344.3x + 114.99$	0.9962	0.02 - 2.5	$y = 1337.7x + 120.27$	0.9883



**Εικόνα 6.2:** Χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος από τον GC-ECD, σε εκχύλισμα μήλου και με εύρος συγκεντρώσεων των δραστικών ουσιών από 0.15 έως 7.5 µg/ g.



**Εικόνα 6.3:** Χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος από τον GC-ECD, σε καθαρό διαλύτη και με εύρος συγκεντρώσεων των δραστικών ουσιών από 0.15 έως 7.5 µg/g.



### 6.2.2. Ορθότητα και πιστότητα της αναλυτικής μεθόδου

Όπως προκύπτει από τα πειράματα των εμβολιασμών στο υπόστρωμα της τομάτας (Πίνακας 6.15) οι ανακτήσεις για όλα τα Φ.Π. που προσδιορίστηκαν στο σύστημα GC (HP-5) – ECD κυμαίνονται από 84 έως 120% και με εύρος επαναληψιμότητας από 2 έως 21%. Εξαιρέση αποτελεί το *kresoxim-methyl* το οποίο στο κατώτερο επίπεδο εμβολιασμού του υποστρώματος παρουσιάζει ποσοστό ανάκτησης 166% με επαναληψιμότητα 13%. Τα κατώτερα επίπεδα φόρτισης για όλες τις δραστικές ουσίες είναι χαμηλότερα από τα επίπεδα των MRLs για την τομάτα.

Στα πειράματα ανάκτησης στο σταφύλι (Πίνακας 6.16) και το μήλο (Πίνακας 6.17) οι ανακτήσεις για όλα τα Φ.Π. που προσδιορίστηκαν στο σύστημα GC (HP-5) – ECD κυμαίνονται από 96 έως 124% με εύρος επαναληψιμότητας από 1 έως 14%, στο υπόστρωμα του σταφυλιού, και από 86 έως 120% με την επαναληψιμότητα να κυμαίνεται από 1 έως 14%, στο υπόστρωμα του μήλου. Στις περιπτώσεις του *metribuzin* στο σταφύλι και του *procymidone* στο μήλο το χαμηλότερο επίπεδο εμβολιασμού του υποστρώματος είναι ίσο με το επίπεδο του MRL στον αντίστοιχο φυτικό ιστό.

Στον ιστό του μήλου ο προσδιορισμός των *metribuzin*, *procymidone* και *fenhexamid* είναι εφικτός σε επίπεδα υψηλότερα από τα MRLs που έχουν θεσπιστεί για το συγκεκριμένο υπόστρωμα. Η εφαρμοζόμενη αναλυτική τεχνική στο χρωματογραφικό σύστημα GC (HP-5) – ECD, παρουσιάζει ικανοποιητική ορθότητα και πιστότητα, όπως προκύπτει από τα πειράματα ανάκτησης και τον έλεγχο της επαναληψιμότητας, αντίστοιχα.

Η πιστότητα επίσης ελέγχθηκε και ως προς την παραμέτρο της αναπαραγωγιμότητας και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.18. Ο έλεγχος της αναπαραγωγιμότητας έγινε με εμβολιασμένα δείγματα στο επίπεδο 5 F (0.05 – 2.5 µg/ g), όπως αναφέρεται στην παράγραφο 5.4.1. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των πειραμάτων της αναπαραγωγιμότητας επαληθεύεται η πιστότητα της μεθόδου για όλα τα Φ.Π., με ιδιαίτερη περίπτωση το *metribuzin* σε όλους τους φυτικούς ιστούς, το οποίο εάν και είχε πολύ καλές τιμές επαναληψιμότητας στα πειράματα των ανακτήσεων σε όλα τα υποστρώματα η αναπαραγωγιμότητά του έχει υψηλές τιμές που κυμαίνονται από 19 έως 42%.

**Πίνακας 6.15:** Ποσοστά ανάκτησης των Φ.Π. και σχετική τυπική απόκλιση (RSD) (n=7) στην τομάτα για διάφορα επίπεδα φορτίσεων.

<b>ECD (HP-5)</b>	<b>RT (min)</b>	<b>MRL (μg/g)</b>	<b>Επίπεδο φόρτισης 1F</b>			<b>Επίπεδο φόρτισης 2F</b>			<b>Επίπεδο φόρτισης 5F</b>		
<b>Δραστική ουσία</b>			<b>C (μg/g)</b>	<b>Ανάκτηση (%)</b>	<b>Επαναληψιμότητα (RSD)</b>	<b>C (μg/g)</b>	<b>Ανάκτηση (%)</b>	<b>Επαναληψιμότητα (RSD)</b>	<b>C (μg/g)</b>	<b>Ανάκτηση (%)</b>	<b>Επαναληψιμότητα (RSD)</b>
<i>metribuzin</i>	13.287	0.3	0.01	M.Π.	M.Π.	0.02	99	8	0.05	97	6
<i>vinclozolin</i>	13.527	0.05	0.01	108	7	0.02	96	6	0.05	97	7
<i>procymidone</i>	17.567	2.0	0.05	105	11	0.1	109	4	0.25	108	4
<i>fludioxonil</i>	20.144	1.0	0.5	105	18	1.0	110	14	2.5	107	3
<i>kresoxim-methyl</i>	21.594	0.5	0.05	166	13	0.1	101	5	0.25	110	3
<i>fenhexamid</i>	24.909	1.0	0.1	M.Π.	M.Π.	0.2	101	11	0.5	92	13
<i>iprodione</i>	27.261	5.0	0.1	103	17	0.2	103	6	0.5	104	6
<i>bifenthrin</i>	27.946	0.2	0.05	114	21	0.1	101	4	0.25	110	3
<i>λ-cyhalothrin</i>	30.183	0.1	0.01	95	16	0.02	110	4	0.05	109	4
<i>indoxacarb</i>	40.620	0.5	0.05	110	18	0.1	109	7	0.25	99	8
<i>azoxystrobin</i>	41.290	2.0	0.05	M.Π.	M.Π.	0.1	M.Π.	M.Π.	0.25	104	13

<b>ECD (HP-5)</b>	<b>RT (min)</b>	<b>MRL (μg/g)</b>	<b>Επίπεδο φόρτισης 10F</b>			<b>Επίπεδο φόρτισης 50F</b>			<b>Επίπεδο φόρτισης 100F</b>		
<b>Δραστική ουσία</b>			<b>C (μg/g)</b>	<b>Ανάκτηση (%)</b>	<b>Επαναληψιμότητα (RSD)</b>	<b>C (μg/g)</b>	<b>Ανάκτηση (%)</b>	<b>Επαναληψιμότητα (RSD)</b>	<b>C (μg/g)</b>	<b>Ανάκτηση (%)</b>	<b>Επαναληψιμότητα (RSD)</b>
<i>metribuzin</i>	13.287	0.3	0.1	84	2	0.5	106	17	1.0	107	2
<i>vinclozolin</i>	13.527	0.05	0.1	98	2	0.5	101	8	1.0	108	2
<i>procymidone</i>	17.567	2.0	0.5	109	2	2.5	105	8	5.0	109	2
<i>fludioxonil</i>	20.144	1.0	5.0	98	6	25	Δ.Π.	Δ.Π.	50	Δ.Π.	Δ.Π.
<i>kresoxim-methyl</i>	21.594	0.5	0.5	113	3	2.5	101	7	5.0	105	2
<i>fenhexamid</i>	24.909	1.0	1.0	118	5	5.0	119	12	10	120	5
<i>iprodione</i>	27.261	5.0	1.0	106	2	5.0	91	11	10	91	2
<i>bifenthrin</i>	27.946	0.2	0.5	106	2	2.5	103	8	5.0	107	2
<i>λ-cyhalothrin</i>	30.183	0.1	0.1	103	2	0.5	105	7	1.0	117	2
<i>indoxacarb</i>	40.620	0.5	0.5	102	2	2.5	94	15	5.0	92	3
<i>azoxystrobin</i>	41.290	2.0	0.5	91	2	2.5	95	15	5.0	93	4

M.Π. Μη προσδιορισμένο (<LOQ)

Δ.Π. Δεν πραγματοποιήθηκαν

**Πίνακας 6.16:** Ποσοστά ανάκτησης των Φ.Π. και σχετική τυπική απόκλιση (RSD) (n=7) στο σταφύλι για διάφορα επίπεδα φορτίσεων.

<b>ECD (HP-5)</b>	<b>RT (min)</b>	<b>MRL (μg/g)</b>	<b>Επίπεδο φόρτισης 1F</b>			<b>Επίπεδο φόρτισης 2F</b>			<b>Επίπεδο φόρτισης 5F</b>		
<b>Δραστική ουσία</b>			<b>C (μg/g)</b>	<b>Ανάκτηση (%)</b>	<b>Επαναληψιμότητα (RSD)</b>	<b>C (μg/g)</b>	<b>Ανάκτηση (%)</b>	<b>Επαναληψιμότητα (RSD)</b>	<b>C (μg/g)</b>	<b>Ανάκτηση (%)</b>	<b>Επαναληψιμότητα (RSD)</b>
<i>metribuzin</i>	13.287	0.01	0.01	112	11	0.02	106	8	0.05	103	7
<i>vinclozolin</i>	13.527	5.0	0.01	103	6	0.02	107	5	0.05	104	2
<i>procymidone</i>	17.567	5.0	0.05	M.Π.	M.Π.	0.1	124	4	0.25	108	2
<i>fludioxonil</i>	20.144	2.0	0.5	101	12	1.0	106	8	2.5	110	3
<i>kresoxim-methyl</i>	21.594	1.0	0.05	112	9	0.1	105	5	0.25	104	2
<i>fenhexamid</i>	24.909	5.0	0.1	M.Π.	M.Π.	0.2	119	13	0.5	107	5
<i>iprodione</i>	27.261	10	0.1	M.Π.	M.Π.	0.2	105	6	0.5	107	2
<i>bifenthrin</i>	27.946	0.2	0.05	102	8	0.1	106	5	0.25	110	1
<i>λ-cyhalothrin</i>	30.183	0.2	0.01	105	5	0.02	106	6	0.05	108	3
<i>indoxacarb</i>	40.620	2.0	0.05	110	12	0.1	108	7	0.25	110	2
<i>azoxystrobin</i>	41.290	2.0	0.05	117	14	0.1	116	8	0.25	100	3

<b>ECD (HP-5)</b>	<b>RT (min)</b>	<b>MRL (μg/g)</b>	<b>Επίπεδο φόρτισης 10F</b>			<b>Επίπεδο φόρτισης 20F</b>			<b>Επίπεδο φόρτισης 40F</b>		
<b>Δραστική ουσία</b>			<b>C (μg/g)</b>	<b>Ανάκτηση (%)</b>	<b>Επαναληψιμότητα (RSD)</b>	<b>C (μg/g)</b>	<b>Ανάκτηση (%)</b>	<b>Επαναληψιμότητα (RSD)</b>	<b>C (μg/g)</b>	<b>Ανάκτηση (%)</b>	<b>Επαναληψιμότητα (RSD)</b>
<i>metribuzin</i>	13.287	0.01	0.1	97	5	0.2	107	3	0.4	100	4
<i>vinclozolin</i>	13.527	5.0	0.1	112	3	0.2	100	2	0.4	108	3
<i>procymidone</i>	17.567	5.0	0.5	107	2	1.0	105	2	2.0	105	3
<i>fludioxonil</i>	20.144	2.0	5.0	117	3	10	106	2	20	107	3
<i>kresoxim-methyl</i>	21.594	1.0	0.5	111	3	1.0	109	2	2.0	108	3
<i>fenhexamid</i>	24.909	5.0	1.0	109	4	2.0	120	8	4.0	114	11
<i>iprodione</i>	27.261	10	1.0	99	3	2.0	105	4	4.0	111	6
<i>bifenthrin</i>	27.946	0.2	0.5	99	3	1.0	107	2	2.0	109	3
<i>λ-cyhalothrin</i>	30.183	0.2	0.1	96	3	0.2	106	3	0.4	109	4
<i>indoxacarb</i>	40.620	2.0	0.5	97	3	1.0	103	4	2.0	114	6
<i>azoxystrobin</i>	41.290	2.0	0.5	105	3	1.0	109	4	2.0	111	5

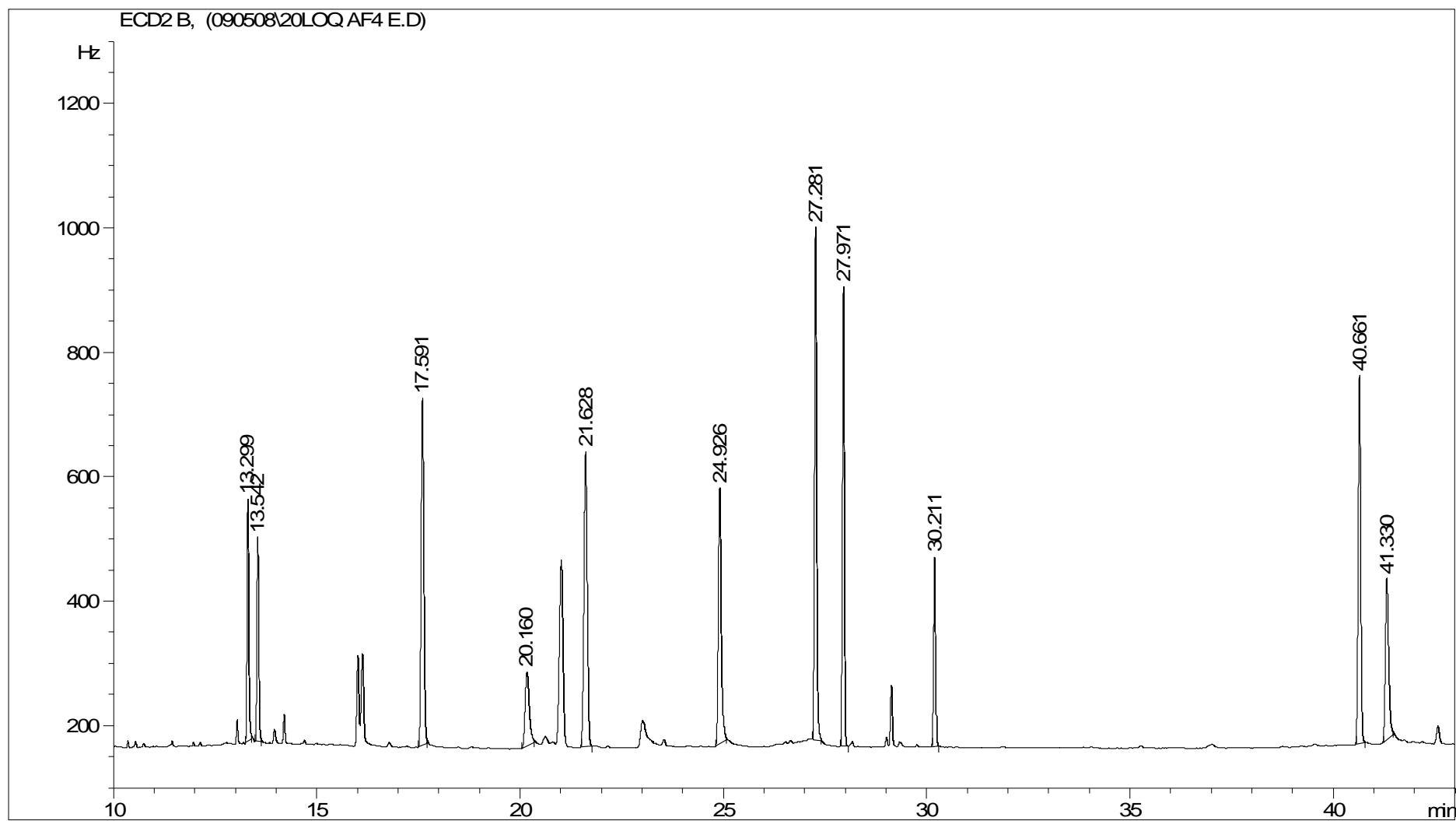
M.Π. Μη προσδιορισμό (<LOQ)

**Πίνακας 6.17:** Ποσοστά ανάκτησης των Φ.Π. και σχετική τυπική απόκλιση (RSD) (n=7) στο μήλο για διάφορα επίπεδα φορτίσεων.

<b>ECD (HP-5)</b>	<b>RT (min)</b>	<b>MRL (μg/g)</b>	<b>Επίπεδο φόρτισης 0.4F</b>			<b>Επίπεδο φόρτισης 1F</b>			<b>Επίπεδο φόρτισης 5F</b>		
<b>Δραστική ουσία</b>			<b>C (μg/g)</b>	<b>Ανάκτηση (%)</b>	<b>Επαναληψιμότητα (RSD)</b>	<b>C (μg/g)</b>	<b>Ανάκτηση (%)</b>	<b>Επαναληψιμότητα (RSD)</b>	<b>C (μg/g)</b>	<b>Ανάκτηση (%)</b>	<b>Επαναληψιμότητα (RSD)</b>
<i>metribuzin</i>	13.287	0.01	0.004	M.Π.	M.Π.	0.01	M.Π.	M.Π.	0.05	110	5
<i>vinclozolin</i>	13.527	1.0	0.004	M.Π.	M.Π.	0.01	110	7	0.05	105	5
<i>procymidone</i>	17.567	0.02	0.02	M.Π.	M.Π.	0.05	115	1	0.25	106	3
<i>fludioxonil</i>	20.144	5.0	0.2	M.Π.	M.Π.	0.5	116	8	2.50	112	5
<i>kresoxim-methyl</i>	21.594	0.2	0.02	117	5	0.05	105	3	0.25	100	3
<i>fenhexamid</i>	24.909	0.05	0.04	M.Π.	M.Π.	0.1	111	12	0.5	105	14
<i>iprodione</i>	27.261	5.0	0.04	111	8	0.1	110	5	0.5	104	5
<i>bifenthrin</i>	27.946	0.3	0.02	115	5	0.05	115	2	0.25	104	3
<i>λ-cyhalothrin</i>	30.183	0.1	0.004	M.Π.	M.Π.	0.01	116	2	0.05	114	4
<i>indoxacarb</i>	40.620	0.5	0.02	111	9	0.05	116	4	0.25	100	6
<i>azoxystrobin</i>	41.290	0.05	0.02	117	11	0.05	117	3	0.25	105	6

<b>ECD (HP-5)</b>	<b>RT (min)</b>	<b>MRL (μg/g)</b>	<b>Επίπεδο φόρτισης 10F</b>			<b>Επίπεδο φόρτισης 20F</b>			<b>Επίπεδο φόρτισης 50F</b>		
<b>Δραστική ουσία</b>			<b>C (μg/g)</b>	<b>Ανάκτηση (%)</b>	<b>Επαναληψιμότητα (RSD)</b>	<b>C (μg/g)</b>	<b>Ανάκτηση (%)</b>	<b>Επαναληψιμότητα (RSD)</b>	<b>C (μg/g)</b>	<b>Ανάκτηση (%)</b>	<b>Επαναληψιμότητα (RSD)</b>
<i>metribuzin</i>	13.287	0.01	0.1	89	3	0.2	105	2	0.5	99	1
<i>vinclozolin</i>	13.527	1.0	0.1	96	2	0.2	108	1	0.5	108	2
<i>procymidone</i>	17.567	0.02	0.5	98	2	1.0	93	1	2.5	108	1
<i>fludioxonil</i>	20.144	5.0	5.0	102	5	10	94	4	25	120	4
<i>kresoxim-methyl</i>	21.594	0.2	0.5	99	3	1.0	95	2	2.5	108	1
<i>fenhexamid</i>	24.909	0.05	1.0	116	8	2.0	106	12	5.0	113	5
<i>iprodione</i>	27.261	5.0	1.0	98	5	2.0	94	9	5.0	104	5
<i>bifenthrin</i>	27.946	0.3	0.5	88	3	1.0	94	2	2.5	105	1
<i>λ-cyhalothrin</i>	30.183	0.1	0.1	86	3	0.2	90	2	0.5	110	1
<i>indoxacarb</i>	40.620	0.5	0.5	93	4	1.0	97	5	2.5	102	1
<i>azoxystrobin</i>	41.290	0.05	0.5	99	5	1.0	103	3	2.5	101	3

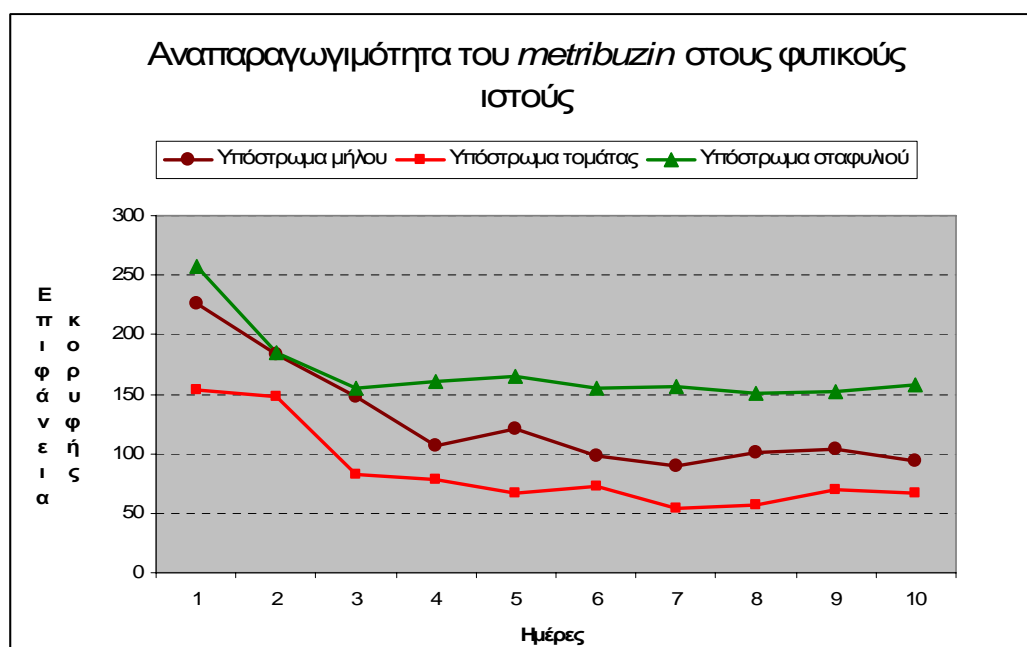
M.Π. Μη προσδιορισμό (<LOQ)



**Εικόνα 6.4:** Χρωματογράφημα εμβολιασμού υποστρώματος μήλου σε επίπεδο 20F, με εύρος συγκεντρώσεων των δραστικών ουσιών από 0.2 έως 10 µg/ g, στο σύστημα GC-ECD.

**Πίνακας 6.18:** Αναπαραγωγιμότητα σε επίπεδο φόρτισης 5 F για όλους τους φυτικούς ιστούς. εκφρασμένη ως σχετική τυπική απόκλιση (RSD) (n=10).

Δραστική ουσία	C (μg/g)	Τομάτα	Σταφύλι	Μήλο
		Αναπαραγωγιμότητα (RSD)	Αναπαραγωγιμότητα (RSD)	Αναπαραγωγιμότητα (RSD)
<i>metribuzin</i>	0.05	42	19	36
<i>vinclozolin</i>	0.05	9.0	9.0	10
<i>procymidone</i>	0.25	7.0	11	8.0
<i>fludioxonil</i>	2.5	11	7.0	19
<i>kresoxim-methyl</i>	0.25	7.0	8.0	10
<i>fenhexamid</i>	0.5	26	16	20
<i>iprodione</i>	0.5	16	8.0	11
<i>bifenthrin</i>	0.25	5.0	3.0	8.0
<i>λ-cyhalothrin</i>	0.05	6.0	6.0	8.0
<i>indoxacarb</i>	0.25	17	5.0	11
<i>azoxystrobin</i>	0.25	19	6.0	13



**Γράφημα 6.6:** Αναπαραγωγιμότητα του *metribuzin* στους υπό έλεγχο φυτικούς ιστούς.

Στο Γράφημα 6.6. παρατηρείται η διακύμανση της συγκέντρωσης του *metribuzin* στο χρονικό διάστημα των δύο εβδομάδων (n=10) που εξελίχθηκαν τα πειράματα της αναπαραγωγιμότητας. Όπως φαίνεται και από το γράφημα τις τρεις πρώτες ημέρες η παρατηρούμενη συγκέντρωσή του μειώνεται με ταχύ ρυθμό και στη συνέχεια παραμένει σταθερή σε χαμηλότερο επίπεδο. Για το λόγο αυτό δείγματα τα οποία μπορεί να φέρουν υπολείμματα από το εν λόγω ζιζανιοκτόνο είναι προτιμότερο να αναλύονται όσο το δυνατό πλησιέστερα στο χρόνο λήψης του δείγματος, καθώς το Φ.Π. με την πάροδο του χρόνου θεωρούμε ότι διασπάται στους μεταβολίτες του *desamino-metribuzin*, *desaminodiketo-metribuzin* και *diketo-metribuzin* (Jarcjyk, 1983). Η ανάλυση πρέπει να γίνεται λαμβάνοντας υπόψη στον ποσοτικό προσδιορισμό και τον κύριο μεταβολίτη του.

Η παρουσία των μεταβολιτών παρατηρήθηκε και στην ταυτοποίηση των ευρημάτων που έγινε με τη χρήση φασματομετρίας μάζας, όπου δεξιά από το χρόνο κατακράτησης και την κορυφή του *metribuzin* παρουσιαζόταν μια κορυφή με πολύ παρόμοιο φάσμα. Η ποσοτικοποίηση του αθροίσματος των επιφανειών των κορυφών αντιστοιχούσε στη συγκέντρωση του ενέσιμου διαλύματος.

Τα αποτελέσματα αυτά της συμπεριφοράς του *metribuzin* και της ανάγκης άμεσης ποσοτικοποίησης του σε τομάτα και σταφύλι, επιβεβαιώθηκαν και από το Εργαστήριο Υπολειμμάτων του Μπενάκειου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου μετά από προσωπική επικοινωνία (Λιαπής Κ.). Σύμφωνα με μετρήσεις που πραγματοποίησαν η άγνωστη κορυφή δεξιά της κορυφής του *metribuzin*, μετά από φασματομετρική ανάλυση αποδόθηκε στο μεταβολίτη *desamino-metribuzin*.

Το *fenhexamid* είναι μια ακόμη δραστική ουσία για την οποία παρατηρούνται υψηλές τιμές αναπαραγωγιμότητας σε όλους τους φυτικούς ιστούς, η οποία πιθανόν οφείλεται στην επίδραση του υποστρώματος που παρουσιάζει το εν λόγω Φ.Π. Η χρωματογραφική απόκριση στην περίπτωση του *fenhexamid* δεν παρατηρήθηκε να παρουσιάζει μεταβολή με το χρόνο, όπως στην περίπτωση του *metribuzin*.

### 6.2.3. Ανιχνευσιμότητα της αναλυτικής μεθόδου

Τα όρια ποσοτικοποίησης (LOQ) του κάθε Φ.Π. στον GC-ECD υπολογίστηκαν, όπως και στο σύστημα GC-NPD, με βάση τα αποτελέσματα της γραμμικότητας και της ορθότητας της μεθόδου. Δηλαδή, ως όριο ποσοτικού προσδιορισμού θεωρήθηκε η συγκέντρωση στην οποία τα επίπεδα των ανακτήσεων για κάθε δραστική ουσία ήταν ικανοποιητικά και ο ανιχνευτής παρουσίαζε γραμμικότητα, είτε αυτή αναφέρεται ως γραμμικότητα ανιχνευτή είτε ως γραμμικότητα της μεθόδου. Όλα σχεδόν τα όρια ποσοτικοποίησης επαληθεύουν τα όρια ποσοτικοποίησης που προκύπτουν από τον έλεγχο του θορύβου του κάθε υποστρώματος σε δείγματα «μάρτυρα» στον αντίστοιχο χρόνο κατακράτησης της κάθε δραστικής ουσίας.

Ως LOD ορίστηκε το τριπλάσιο του θορύβου του χρωματογραφικού σήματος στο χρόνο κατακράτησης της κάθε δραστικής ουσίας.

**Πίνακας 6.19:** Όρια ανίχνευσης και όρια ποσοτικοποίησης για τις δραστικές ουσίες της αναλυτικής μεθόδου, για όλους τους φυτικούς ιστούς.

<i>ECD (HP-5)</i>	<i>Τομάτα</i>			<i>Σταφύλι</i>			<i>Μήλο</i>		
<i>Δραστική ουσία</i>	<i>MRL</i> ( $\mu\text{g/g}$ )	<i>LOD</i> ( $\mu\text{g/g}$ )	<i>LOQ</i> ( $\mu\text{g/g}$ )	<i>MRL</i> ( $\mu\text{g/g}$ )	<i>LOD</i> ( $\mu\text{g/g}$ )	<i>LOQ</i> ( $\mu\text{g/g}$ )	<i>MRL</i> ( $\mu\text{g/g}$ )	<i>LOD</i> ( $\mu\text{g/g}$ )	<i>LOQ</i> ( $\mu\text{g/g}$ )
<i>metribuzin</i>	0.3	0.007	0.02	0.01	0.004	0.01*	0.01	0.01	0.05*
<i>vinclozolin</i>	0.05	0.003	0.01	5.0	0.001	0.01	1.0	0.003	0.01
<i>procymidone</i>	2.0	0.006	0.05	5.0	0.02	0.1	0.02	0.01	0.05*
<i>fludioxonil</i>	1.0	0.15	0.5	2.0	0.13	0.5	5.0	0.15	0.5
<i>kresoxim-methyl</i>	0.5	0.01	0.05	1.0	0.005	0.05	0.20	0.007	0.02
<i>fenhexamid</i>	1.0	0.06	0.2	5.0	0.05	0.2	0.05	0.04	0.1*
<i>iprodione</i>	5.0	0.03	0.1	10	0.06	0.2	5.0	0.01	0.04
<i>bifenthrin</i>	0.2	0.01	0.05	0.2	0.005	0.05	0.30	0.003	0.02
<i><math>\lambda</math>-cyhalothrin</i>	0.1	0.003	0.01	0.2	0.003	0.01	0.1	0.003	0.01
<i>indoxacarb</i>	0.5	0.01	0.05	2.0	0.01	0.05	0.5	0.004	0.02
<i>azoxystrobin</i>	2.0	0.07	0.25	2.0	0.01	0.05	0.05	0.005	0.02

Όπως παρατηρούμε από τις τιμές LOQ των δραστικών ουσιών σε κάθε υπόστρωμα (Πίνακα 6.19), για όλες τις ουσίες τα όρια ποσοτικού προσδιορισμού καλύπτουν το ανώτατο επιτρεπτό όριο υπολειμμάτων (MRL) με εξαίρεση τα *metribuzin*, *procymidone* και *fenhexamid* στο μήλο και το *metribuzin* στο σταφύλι, όπου έχουν επισημανθεί και με αστερίσκο.



#### 6.2.4. Έλεγχος επίδρασης του υποστρώματος

Η επί τοις εκατό επίδραση του κάθε υποστρώματος, όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 6.20, προέκυψε από τη σύγκριση των μέσων τιμών της επιφάνειας των χρωματογραφικών κορυφών των προτύπων διαλυμάτων σε εκχύλισμα υποστρώματος με αυτές σε καθαρό διαλύτη (ισοκτάνιο/ τολουόλιο, 90/10) για διαφορετικά επίπεδα συγκεντρώσεων.

Έντονη επίδραση υποστρώματος εμφανίζει το *fenhexamid* σε όλους τους φυτικούς ιστούς με τιμές που κυμαίνονται από 181% έως 256% και σχετική τυπική απόκλιση της επίδρασης μεταξύ των διαφορετικών επιπέδων συγκέντρωσης από 9 έως 25%

Σε σχέση με τα υποστρώματα του σταφυλιού και του μήλου, το υπόστρωμα της τομάτας φαίνεται να έχει μεγαλύτερη επίδραση στα περισσότερα Φ.Π. της μελέτης και πιο συγκεκριμένα στα *fludioxonil*, *iprodione*, *indoxacarb* και *azoxystrobin* με το εύρος της επίδρασης για αυτές τις δραστικές ουσίες να κυμαίνεται από 125% έως 140%.

**Πίνακας 6.20:** Η επί τοις εκατό επίδραση του κάθε υποστρώματος

<i>ECD (HP-5)</i>	<i>Τομάτα</i>	<i>Σταφύλι</i>	<i>Μήλο</i>
<i>Δραστική ουσία</i>	<i>% Επίδραση ± RSD(%)</i>	<i>% Επίδραση ± RSD(%)</i>	<i>% Επίδραση ± RSD(%)</i>
<i>metribuzin</i>	123 ± 10	112 ± 4	115 ± 11
<i>vinclozolin</i>	107 ± 3	100 ± 4	102 ± 9
<i>procymidone</i>	105 ± 3	100 ± 1	98 ± 7
<i>fludioxonil</i>	132 ± 15	111 ± 16	107 ± 4
<i>kresoxim-methyl</i>	105 ± 8	102 ± 1	105 ± 3
<i>fenhexamid</i>	244 ± 11	181 ± 25	256 ± 9
<i>iprodione</i>	130 ± 6	117 ± 5	119 ± 4
<i>bifenthrin</i>	106 ± 3	102 ± 1	103 ± 3
<i>λ-cyhalothrin</i>	118 ± 10	108 ± 9	105 ± 9
<i>indoxacarb</i>	140 ± 16	119 ± 8	118 ± 4
<i>azoxystrobin</i>	125 ± 7	102 ± 9	108 ± 4

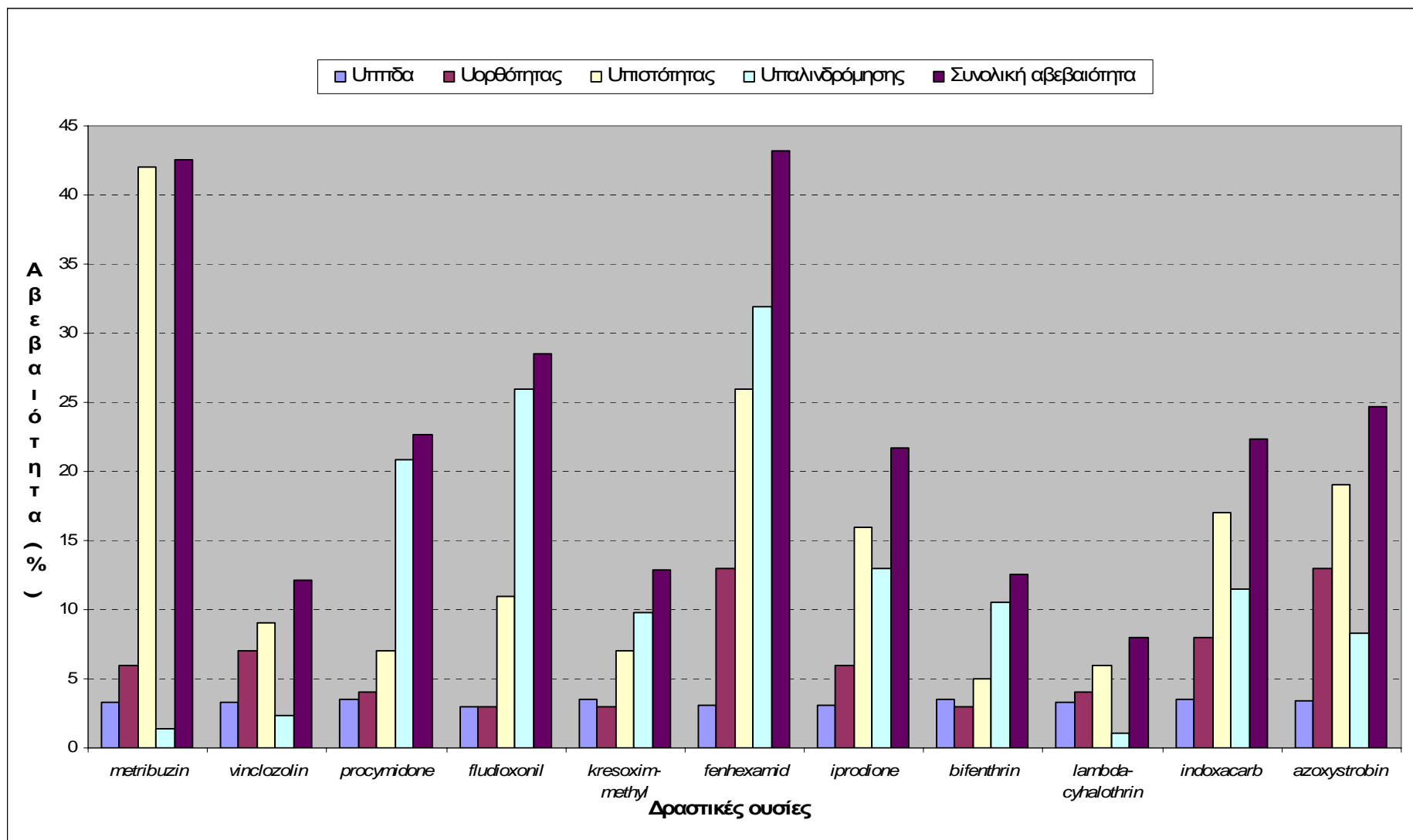
### 6.2.5. Έλεγχος της αβεβαιότητας της αναλυτικής μεθόδου

Η αβεβαιότητα που συνδέεται με την ορθότητα της αναλυτικής μεθόδου εκφράστηκε με τη σχετική τυπική απόκλιση (RSD %) που παρουσίασαν τα πειράματα ανάκτησης στο επίπεδο εμβολιασμού 5 F (0.05 – 2.5 μg/ g), ενώ η αβεβαιότητα που συνδέεται με την πιστότητα της αναλυτικής μεθόδου εκφράστηκε με την αναπαραγωγιμότητα ως σχετική τυπική απόκλιση. Στην προκειμένη περίπτωση η αβεβαιότητα έχει εκφραστεί ως σχετική τυπική απόκλιση και για το λόγο αυτό η αβεβαιότητα που συνδέεται με την παρασκευή των προτύπων διαλυμάτων αναφοράς (ΠΠΔΑ) που υπολογίστηκε ως η τετραγωνική ρίζα του αθροίσματος των τετραγώνων των επί μέρους αβεβαιοτήτων των σιφωνίων, των ογκομετρικών φιαλών, της καθαρότητας της δραστικής ουσίας και του ζυγού που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του κάθε προτύπου διαλύματος πολλαπλασιάστηκε με το εκατό, όπως και η αβεβαιότητα που συνδέεται με την καμπύλη αναφοράς, που υπολογίστηκε από τον τύπο που αναφέρεται στην παράγραφο 3.5.1. Έτσι, στον υπολογισμό της συνολικής αβεβαιότητας, όλες οι επί μέρους αβεβαιότητες είναι εκφρασμένες με τον ίδιο τρόπο (%).

Στις γραφικές παραστάσεις που ακολουθούν (Γράφημα 6.7 - 6.9) παρουσιάζεται η επί μέρους αβεβαιότητα που οφείλεται στον κάθε παράγοντα, ώστε να αποδίδεται παραστατικά η συνεισφορά του καθενός από αυτούς στη συνολική αβεβαιότητα.

**Πίνακας 6.21:** Αβεβαιότητες της αναλυτικής μεθόδου για την κάθε δραστική ουσία στην τομάτα.

Δραστικές ουσίες	$U_{ΠΠΔΑ}$ (%)	$U_{Ορθότητας}$ (%)	$U_{Πιστότητας}$ (%)	$U_{Καμπύλης}$ αναφοράς (%)	Συνολική αβεβαιότητα (%)	Διευρυμένη αβεβαιότητα (%)
<i>metribuzin</i>	3.29	6.0	42	1.334	43	85
<i>vinclozolin</i>	3.29	7.0	9.0	2.371	12	24
<i>procymidone</i>	3.46	4.0	7.0	20.84	23	45
<i>fludioxonil</i>	2.98	3.0	11	25.93	28	57
<i>kresoxim-methyl</i>	3.46	3.0	7.0	9.817	13	26
<i>fenhexamid</i>	3.08	13	26	31.87	43	86
<i>iprodione</i>	3.11	6.0	16	12.99	22	43
<i>bifenthrin</i>	3.46	3.0	5.0	10.53	13	25
<i>λ-cyhalothrin</i>	3.28	4.0	6.0	1.086	8.0	16
<i>indoxacarb</i>	3.46	8.0	17	11.49	22	45
<i>azoxystrobin</i>	3.46	13	19	8.287	25	49



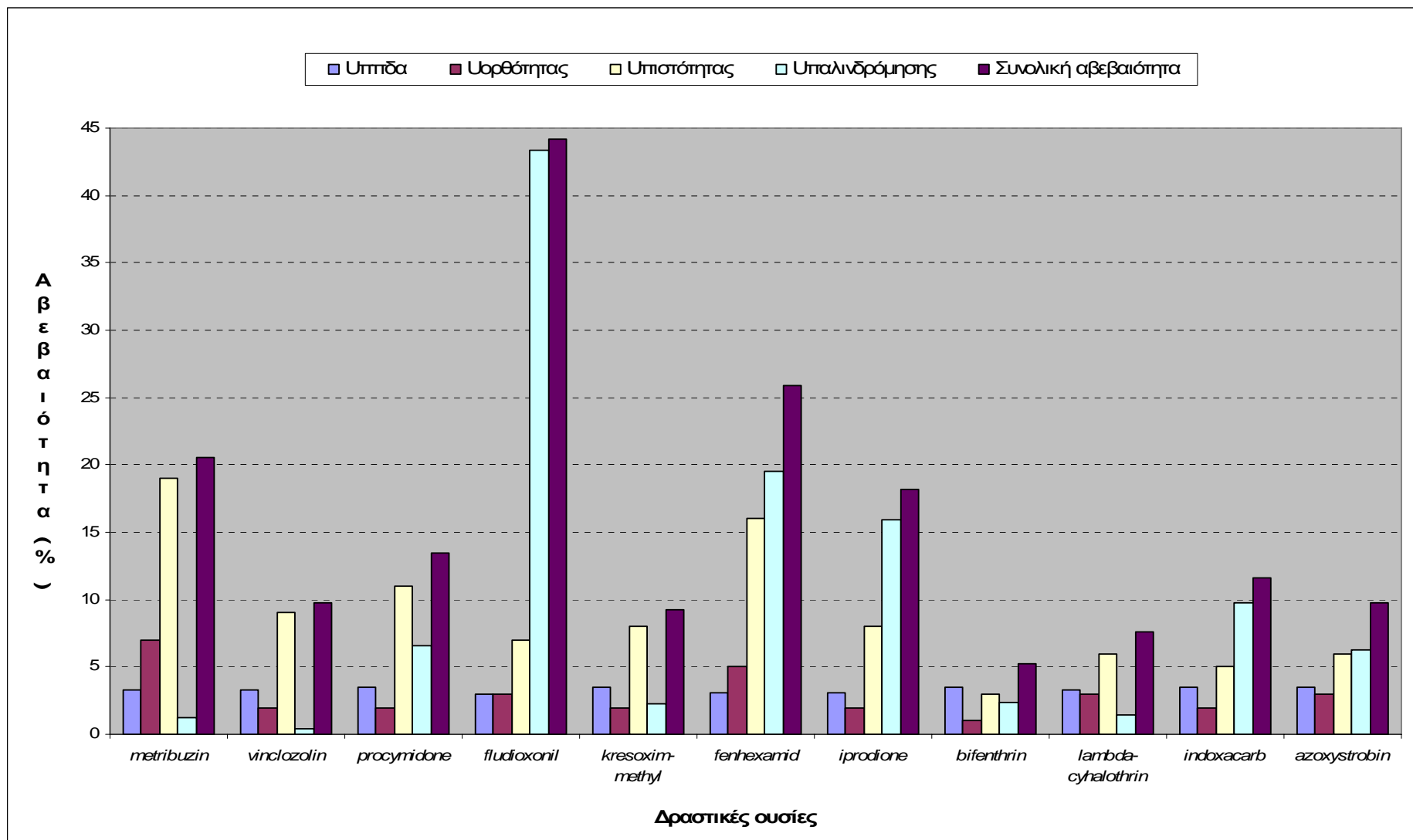
**Γράφημα 6.7:** Επί μέρους αβεβαιότητες (%) και συνολική αβεβαιότητα (%) της μεθόδου για τον προσδιορισμό των δραστικών ουσιών της μελέτης σε υπόστρωμα τομάτας.

**Πίνακας 6.22:** Αβεβαιότητες της αναλυτικής μεθόδου για την κάθε δραστική ουσία στο σταφύλι.

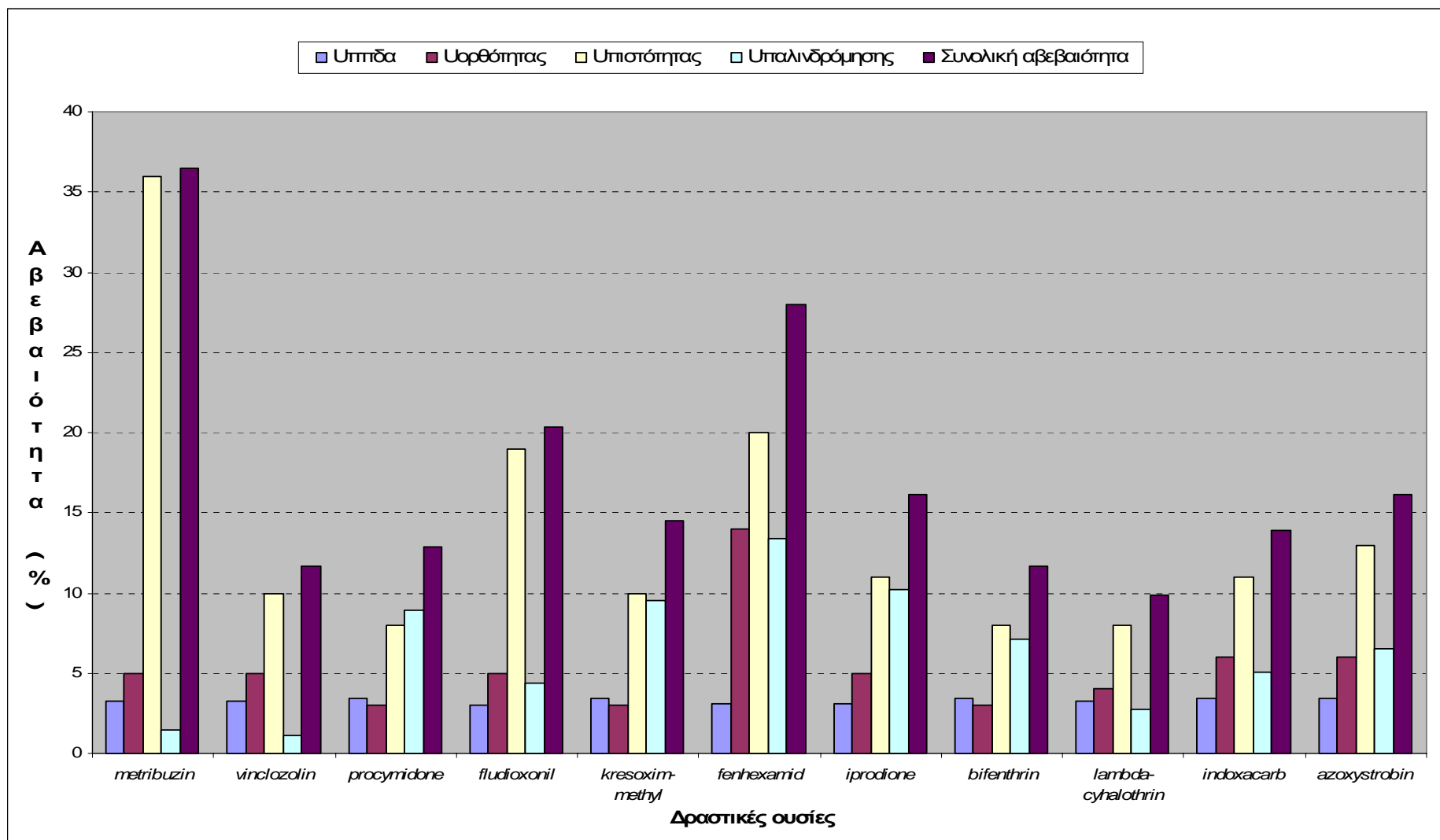
Δραστικές ουσίες	$U_{\text{ΠΠΔΑ}} (\%)$	$U_{\text{Ορθότητας}} (\%)$	$U_{\text{Πιστότητας}} (\%)$	$U_{\text{Καμπύλης αναφοράς}} (\%)$	Συνολική αβεβαιότητα (%)	Διευρυμένη αβεβαιότητα (%)
<i>metribuzin</i>	3.2872	7.0	19	1.195	21	41
<i>vinclozolin</i>	3.2914	2.0	9.0	0.369	10	20
<i>procymidone</i>	3.4617	2.0	11	6.625	13	27
<i>fludioxonil</i>	2.9832	3.0	7.0	43.38	44	88
<i>kresoxim-methyl</i>	3.4649	2.0	8.0	2.234	9.0	18
<i>fenhexamid</i>	3.0778	5.0	16	19.49	26	52
<i>iprodione</i>	3.1090	2.0	8.0	15.88	18	36
<i>bifenthrin</i>	3.4649	1.0	3.0	2.403	5.0	11
<i>λ-cyhalothrin</i>	3.2759	3.0	6.0	1.448	8.0	15
<i>indoxacarb</i>	3.4617	2.0	5.0	9.712	12	23
<i>azoxystrobin</i>	3.4556	3.0	6.0	6.248	10	20

**Πίνακας 6.23:** Αβεβαιότητες της αναλυτικής μεθόδου για την κάθε δραστική ουσία στο μήλο.

Δραστικές ουσίες	$U_{\text{ΠΠΔΑ}} (\%)$	$U_{\text{Ορθότητας}} (\%)$	$U_{\text{Πιστότητας}} (\%)$	$U_{\text{Καμπύλης αναφοράς}} (\%)$	Συνολική αβεβαιότητα (%)	Διευρυμένη αβεβαιότητα (%)
<i>metribuzin</i>	3.2872	5.0	36	1.463	37	73
<i>vinclozolin</i>	3.2914	5.0	10	1.158	12	23
<i>procymidone</i>	3.4617	3.0	8.0	8.948	13	26
<i>fludioxonil</i>	2.9832	5.0	19	4.399	20	41
<i>kresoxim-methyl</i>	3.4649	3.0	10	9.500	15	29
<i>fenhexamid</i>	3.0778	14	20	13.37	28	56
<i>iprodione</i>	3.1090	5.0	11	10.19	16	32
<i>bifenthrin</i>	3.4649	3.0	8.0	7.163	12	23
<i>λ-cyhalothrin</i>	3.2759	4.0	8.0	2.737	10	20
<i>indoxacarb</i>	3.4617	6.0	11	5.046	14	28
<i>azoxystrobin</i>	3.4556	6.0	13	6.544	16	32



**Γράφημα 6.8:** Επί μέρους αβεβαιότητες (%) και συνολική αβεβαιότητα (%) της μεθόδου για τον προσδιορισμό των δραστικών ουσιών της μελέτης σε υπόστρωμα σταφυλιού.



**Γράφημα 6.9:** Επί μέρους αβεβαιότητες (%) και συνολική αβεβαιότητα (%) της μεθόδου για τον προσδιορισμό των δραστικών ουσιών της μελέτης σε υπόστρωμα μήλου.

### 6.3. Επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων με τη χρήση της στήλης BPX-35 σε σύστημα GC-ECD

Για την επιβεβαίωση των ευρημάτων που προκύπτουν από το χρωματογραφικό σύστημα GC(HP-5) – ECD χρησιμοποιήθηκε ένα δεύτερο χρωματογραφικό σύστημα με τον ίδιο ανιχνευτή αλλά με διαφορετικής πολικότητας χρωματογραφική στήλη. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε μια περισσότερο πολική στήλη, η BPX-35. Στο σύστημα αυτό (GC(BPX-35) – ECD), καταγράφηκαν οι χρόνοι κατακράτησης των δραστικών ουσιών της μελέτης, μελετήθηκε η ορθότητα και η πιστότητα σε τέσσερα επίπεδα εμβολιασμένων δειγμάτων, υπολογίστηκε η γραμμικότητα του ανιχνευτή και υπολογίστηκαν τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης των δραστικών ουσιών που προσδιορίζονται στον ECD.

Από τα αποτελέσματα της γραμμικότητας του ανιχνευτή και από τις ανακτήσεις επαληθεύονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν για την HP-5. Διαφορά παρατηρείται μεταξύ των αποτελεσμάτων των δύο χρωματογραφικών στηλών στους χρόνους κατακράτησης των δραστικών ουσιών (Πίνακες 6.1 & 6.24), όπως ήταν αναμενόμενο, και στα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης, τα οποία είναι ίσα και σε αρκετές περιπτώσεις υψηλότερα στην BPX-35 από ότι στην HP-5 (Πίνακας 6.28). Αλλαγή στη σειρά εξόδου από τη χρωματογραφική στήλη παρατηρείται μεταξύ των *metribuzin* και *vinclozolin*, καθώς επίσης και των *bifenthrin* και *iprodione*, σε σχέση με την HP-5.

Οι ανακτήσεις για όλες τις δραστικές ουσίες που προσδιορίστηκαν στο σύστημα GC (BPX-35)-ECD (Πίνακας 6.25) στο υπόστρωμα της τομάτας κυμαίνονται από 86% έως 120% με εύρος επαναληψιμότητας από 2 έως 18%. Τα κατώτερα επίπεδα εμβολιασμού για όλες τις δραστικές ουσίες, με εξαίρεση το *metribuzin*, είναι χαμηλότερα από τα επίπεδα των MRLs για την τομάτα, καθώς επίσης και τα όρια ποσοτικού προσδιορισμού.

Στον ιστό του σταφυλιού τα ποσοστά ανάκτησης (Πίνακας 6.26) έχουν εύρος από 95% έως 118% με την επαναληψιμότητα να κυμαίνεται από 2% έως 15%. Με μόνη εξαίρεση το *metribuzin* τα κατώτερα επίπεδα εμβολιασμού και τα όρια ποσοτικοποίησης για όλες τις δραστικές ουσίες είναι χαμηλότερα από τα επίπεδα των MRLs για το σταφύλι.

Στην περίπτωση του υποστρώματος του μήλου (Πίνακας 6.27) οι ανακτήσεις κυμαίνονται από 100 έως 121%, με εύρος επαναληψιμότητας από 2 έως 13%. Αν και τα κατώτερα επίπεδα φόρτισης για όλες τις δραστικές ουσίες ήταν χαμηλότερα από τα επίπεδα MRL, τα *metribuzin*, *procymidone* και *azoxystrobin* έχουν όρια ποσοτικού προσδιορισμού υψηλότερα από αυτά τα επίπεδα.

**Πίνακας 6.24:** Γραμμικότητα του ανιχνευτή για όλους τους φυτικούς ιστούς.

<i>ECD (BPX-35)</i> <i>Δραστική ουσία</i>	<i>RT (min)</i>	<i>Υπόστρωμα τομάτας</i>			<i>Υπόστρωμα σταφυλιού</i>		
		<i>Εύρος C (μg/g)</i>	<i>y=bx+a</i>	<i>R<sup>2</sup></i>	<i>Εύρος C (μg/g)</i>	<i>y=bx+a</i>	<i>R<sup>2</sup></i>
<i>vinclozolin</i>	11.162	0.02 - 1.2	$y = 3201.4x - 27.344$	0.9994	0.02 - 0.8	$y = 4052.6x - 36.014$	0.9989
<i>metribuzin</i>	11.765	0.02 - 1.2	$y = 5709.8x + 98.47$	0.9993	0.02 - 0.8	$y = 7220.2x + 65.93$	0.9993
<i>procymidone</i>	12.986	0.1 - 6.0	$y = 1651.7x - 18.18$	0.9998	0.08 - 3.8	$y = 1576.4x + 79.959$	0.9984
<i>kresoxim-methyl</i>	14.052	0.1 - 6.0	$y = 1957.3x - 106.06$	0.9987	0.08 - 3.8	$y = 2109.9x - 9.6871$	0.9999
<i>bifenthrin</i>	14.967	0.1 - 6.0	$y = 1952.7x - 110.47$	0.9976	0.08 - 3.8	$y = 2177.6x - 39.631$	0.9998
<i>iprodione</i>	15.458	0.5 - 12	$y = 1134.8x - 267.16$	0.9992	0.15 - 7.5	$y = 1307.5x - 118.53$	0.9990
<i>λ-cyhalothrin</i>	15.774	0.02 - 1.2	$y = 4461.2x - 127.9$	0.9971	0.02 - 0.8	$y = 5835.7x - 113.64$	0.9972
<i>indoxacarb</i>	20.289	0.1 - 6.0	$y = 3230.7x - 562.46$	0.9965	0.08 - 3.8	$y = 3097.6x - 350.7$	0.9965
<i>azoxystrobin</i>	23.921	0.1 - 6.0	$y = 3062.7x - 952.44$	0.9990	0.08 - 3.8	$y = 3284.4x - 43.488$	0.9985

<i>ECD (BPX-35)</i> <i>Δραστική ουσία</i>	<i>RT (min)</i>	<i>Υπόστρωμα μήλου</i>		
		<i>Εύρος C (μg/g)</i>	<i>y=bx+a</i>	<i>R<sup>2</sup></i>
<i>vinclozolin</i>	11.162	0.03 - 0.8	$y = 2639.9x + 1.3402$	0.9974
<i>metribuzin</i>	11.765	0.03 - 0.8	$y = 4424.9x + 76.699$	0.9975
<i>procymidone</i>	12.986	0.15 - 3.8	$y = 1452.9x + 64.188$	0.9961
<i>kresoxim-methyl</i>	14.052	0.08 - 3.8	$y = 1637.0x - 7.1658$	0.9964
<i>bifenthrin</i>	14.967	0.08 - 3.8	$y = 1761x - 6.1063$	0.9995
<i>iprodione</i>	15.458	1.5 - 7.5	$y = 1932.8x - 874.84$	0.9945
<i>λ-cyhalothrin</i>	15.774	0.03 - 0.8	$y = 3870.7x - 57.083$	0.9992
<i>indoxacarb</i>	20.289	0.15 - 3.8	$y = 2397.8x - 245.38$	0.9984
<i>azoxystrobin</i>	23.921	0.15 - 3.8	$y = 2601.8x + 10.735$	0.9970



**Πίνακας 6.25:** Ποσοστά ανάκτησης των Φ.Π. και σχετική τυπική απόκλιση (RSD) (n=5) στην τομάτα για διάφορα επίπεδα φορτίσεων.

<i>ECD (BPX-35)</i>	<i>RT (min)</i>	<i>MRL (μg/g)</i>	<i>Επίπεδο φόρτισης 1F</i>			<i>Επίπεδο φόρτισης 2F</i>		
<i>Δραστική ουσία</i>			<i>C (μg/g)</i>	<i>Ανάκτηση (%)</i>	<i>Επαναληψιμότητα (RSD)</i>	<i>C (μg/g)</i>	<i>Ανάκτηση (%)</i>	<i>Επαναληψιμότητα (RSD)</i>
<i>vinclozolin</i>	11.162	0.05	0.01	M.Π.	M.Π.	0.02	101	12
<i>metribuzin</i>	11.765	0.3	0.01	M.Π.	M.Π.	0.02	92	6
<i>procymidone</i>	12.986	2.0	0.05	M.Π.	M.Π.	0.1	119	6
<i>kresoxim-methyl</i>	14.052	0.5	0.05	M.Π.	M.Π.	0.1	114	10
<i>bifenthrin</i>	14.967	0.2	0.05	120	18	0.1	110.	11
<i>iprodione</i>	15.458	5.0	0.1	M.Π.	M.Π.	0.2	M.Π.	M.Π.
<i>λ-cyhalothrin</i>	15.774	0.1	0.01	86	17	0.02	113	9
<i>indoxacarb</i>	20.289	0.5	0.05	M.Π.	M.Π.	0.1	111	10
<i>azoxystrobin</i>	23.921	2.0	0.05	M.Π.	M.Π.	0.1	117	6

<i>ECD (BPX-35)</i>	<i>RT (min)</i>	<i>MRL (μg/g)</i>	<i>Επίπεδο φόρτισης 10F</i>			<i>Επίπεδο φόρτισης 50F</i>		
<i>Δραστική ουσία</i>			<i>C (μg/g)</i>	<i>Ανάκτηση (%)</i>	<i>Επαναληψιμότητα (RSD)</i>	<i>C (μg/g)</i>	<i>Ανάκτηση (%)</i>	<i>Επαναληψιμότητα (RSD)</i>
<i>vinclozolin</i>	11.162	0.05	0.1	112	2	0.5	116	10
<i>metribuzin</i>	11.765	0.3	0.1	99	2	0.5	109	9
<i>procymidone</i>	12.986	2.0	0.5	111	2	2.5	102	9
<i>kresoxim-methyl</i>	14.052	0.5	0.5	110	3	2.5	110	8
<i>bifenthrin</i>	14.967	0.2	0.5	117	2	2.5	109	6
<i>iprodione</i>	15.458	5.0	1.0	106	9	5.0	90	11
<i>λ-cyhalothrin</i>	15.774	0.1	0.1	102	5	0.5	112	7
<i>indoxacarb</i>	20.289	0.5	0.5	115	3	2.5	94	8
<i>azoxystrobin</i>	23.921	2.0	0.5	112	2	2.5	98	9

M.Π. Μη προσδιορίσιμο (<LOQ)

**Πίνακας 6.26:** Ποσοστά ανάκτησης των Φ.Π. και σχετική τυπική απόκλιση (RSD) (n=5) στο σταφύλι για διάφορα επίπεδα φορτίσεων.

<i>ECD (BPX-35)</i>	<i>RT (min)</i>	<i>MRL (μg/g)</i>	<i>Επίπεδο φόρτισης 2F</i>			<i>Επίπεδο φόρτισης 5F</i>		
<i>Δραστική ουσία</i>			<i>C (μg/g)</i>	<i>Ανάκτηση (%)</i>	<i>Επαναληψιμότητα (RSD)</i>	<i>C (μg/g)</i>	<i>Ανάκτηση (%)</i>	<i>Επαναληψιμότητα (RSD)</i>
<i>vinclozolin</i>	11.162	5.0	0.02	111.	7.	0.05	114	8
<i>metribuzin</i>	11.765	0.01	0.02	115.	5	0.05	111	7
<i>procymidone</i>	12.986	5.0	0.1	113	8	0.25	109	5
<i>kresoxim-methyl</i>	14.052	1.0	0.1	116	15	0.25	103	3
<i>bifenthrin</i>	14.967	0.2	0.1	115	7	0.25	103	2
<i>iprodione</i>	15.458	10	0.2	111	12	0.5	101	4
<i>λ-cyhalothrin</i>	15.774	0.2	0.02	110	6	0.05	106	5
<i>indoxacarb</i>	20.289	2.0	0.1	115	7	0.25	110	3
<i>azoxystrobin</i>	23.921	2.0	0.1	118	6	0.25	107	5

<i>ECD (BPX-35)</i>	<i>RT (min)</i>	<i>MRL (μg/g)</i>	<i>Επίπεδο φόρτισης 10F</i>			<i>Επίπεδο φόρτισης 20F</i>		
<i>Δραστική ουσία</i>			<i>C (μg/g)</i>	<i>Ανάκτηση (%)</i>	<i>Επαναληψιμότητα (RSD)</i>	<i>C (μg/g)</i>	<i>Ανάκτηση (%)</i>	<i>Επαναληψιμότητα (RSD)</i>
<i>vinclozolin</i>	11.162	5.0	0.1	104	9	0.2	109	6
<i>metribuzin</i>	11.765	0.01	0.1	103	4	0.2	95	7
<i>procymidone</i>	12.986	5.0	0.5	109	4	1.0	109	8
<i>kresoxim-methyl</i>	14.052	1.0	0.5	108	2	1.0	103	5
<i>bifenthrin</i>	14.967	0.2	0.5	108	2	1.0	107	4
<i>iprodione</i>	15.458	10	1.0	103	2	2.0	108	9
<i>λ-cyhalothrin</i>	15.774	0.2	0.1	108	5	0.2	95	9
<i>indoxacarb</i>	20.289	2.0	0.5	101	3	1.0	99	10
<i>azoxystrobin</i>	23.921	2.0	0.5	101	3	1.0	104	4

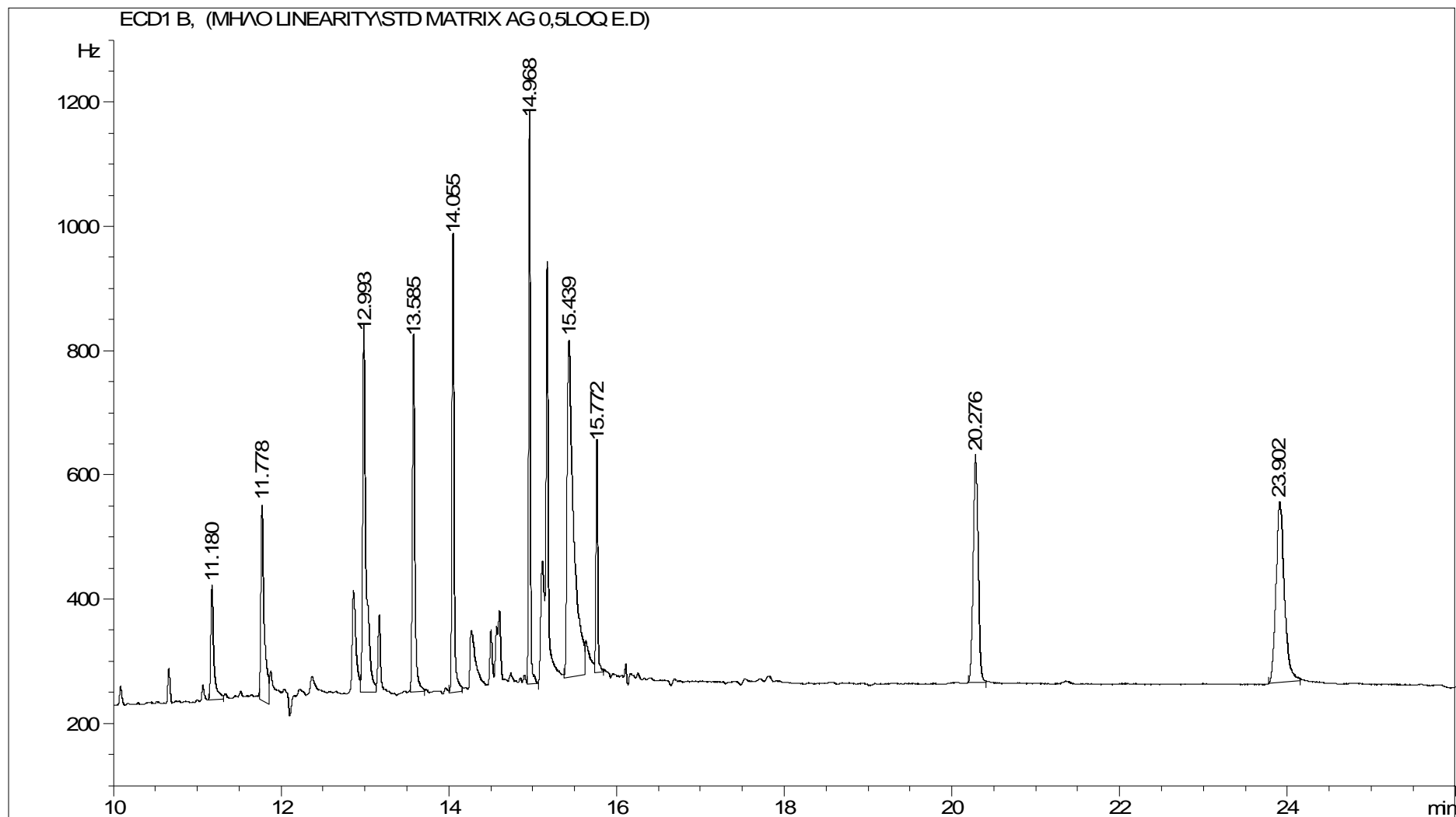
Μ.Π. Μη προσδιορίσιμο (<LOQ)

**Πίνακας 5.27:** Ποσοστά ανάκτησης των Φ.Π. και σχετική τυπική απόκλιση (RSD) (n=5) στο μήλο για διάφορα επίπεδα φορτίσεων.

<b>ECD (BPX-35)</b>	<b>RT (min)</b>	<b>MRL (μg/g)</b>	<b>Επίπεδο φόρτισης 0.4F</b>			<b>Επίπεδο φόρτισης 1F</b>		
<b>Δραστική ουσία</b>			<b>C (μg/g)</b>	<b>Ανάκτηση (%)</b>	<b>Επαναληψιμότητα (RSD)</b>	<b>C (μg/g)</b>	<b>Ανάκτηση (%)</b>	<b>Επαναληψιμότητα (RSD)</b>
<i>vinclozolin</i>	11.162	1.0	0.004	M.Π.	M.Π.	0.01	M.Π.	M.Π.
<i>metribuzin</i>	11.765	0.01	0.004	M.Π.	M.Π.	0.01	M.Π.	M.Π.
<i>procymidone</i>	12.986	0.02	0.02	M.Π.	M.Π.	0.05	M.Π.	M.Π.
<i>kresoxim-methyl</i>	14.052	0.2	0.02	121	6	0.05	109	4
<i>bifenthrin</i>	14.967	0.3	0.02	M.Π.	M.Π.	0.05	112	2
<i>iprodione</i>	15.458	5.0	0.04	M.Π.	M.Π.	0.1	M.Π.	M.Π.
<i>λ-cyhalothrin</i>	15.774	0.1	0.004	M.Π.	M.Π.	0.01	M.Π.	M.Π.
<i>indoxacarb</i>	20.289	0.5	0.02	M.Π.	M.Π.	0.05	M.Π.	M.Π.
<i>azoxystrobin</i>	23.921	0.05	0.02	M.Π.	M.Π.	0.05	M.Π.	M.Π.

<b>ECD (BPX-35)</b>	<b>RT (min)</b>	<b>MRL (μg/g)</b>	<b>Επίπεδο φόρτισης 5F</b>			<b>Επίπεδο φόρτισης 10F</b>		
<b>Δραστική ουσία</b>			<b>C (μg/g)</b>	<b>Ανάκτηση (%)</b>	<b>Επαναληψιμότητα (RSD)</b>	<b>C (μg/g)</b>	<b>Ανάκτηση (%)</b>	<b>Επαναληψιμότητα (RSD)</b>
<i>vinclozolin</i>	11.162	1.0	0.05	102	9	0.1	112	7
<i>metribuzin</i>	11.765	0.01	0.05	106	10	0.1	118	3
<i>procymidone</i>	12.986	0.02	0.25	102	11	0.5	103	8
<i>kresoxim-methyl</i>	14.052	0.2	0.25	101	12	0.5	103	5
<i>bifenthrin</i>	14.967	0.3	0.25	100	13	0.5	107	7
<i>iprodione</i>	15.458	5.0	0.5	M.Π.	M.Π.	1.0	105	10
<i>λ-cyhalothrin</i>	15.774	0.1	0.05	119	12	0.1	107	8
<i>indoxacarb</i>	20.289	0.5	0.25	102	13	0.5	106	7
<i>azoxystrobin</i>	23.921	0.05	0.25	102	6	0.5	103	4

M.Π. Μη προσδιορίσιμο (<LOQ)



**Εικόνα 6.5:** Χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος από τον GC-ECD (BPX-35), σε εκχύλισμα μήλου και με εύρος συγκεντρώσεων των δραστικών ουσιών από 0.15 έως 7.5 µg/ g.

**Πίνακας 6.28:** Όρια ανίχνευσης (LOD) και όρια ποσοτικοποίησης (LOQ) για τις δραστικές ουσίες της αναλυτικής μεθόδου, για όλους τους φυτικούς ιστούς.

<i>ECD (BPX35)</i>	<i>Τομάτα</i>			<i>Σταφύλι</i>			<i>Μήλο</i>		
<i>Δραστική ουσία</i>	<i>MRL</i> (μg/ g)	<i>LOD</i> (μg/ g)	<i>LOQ</i> (μg/ g)	<i>MRL</i> (μg/ g)	<i>LOD</i> (μg/ g)	<i>LOQ</i> (μg/ g)	<i>MRL</i> (μg/ g)	<i>LOD</i> (μg/ g)	<i>LOQ</i> (μg/ g)
<i>vinclozolin</i>	0.05	0.006	<b>0.02</b>	5.0	0.006	<b>0.02</b>	1.0	0.03	<b>0.05</b>
<i>metribuzin</i>	0.3	0.006	<b>0.02</b>	0.01	0.006	<b>0.02*</b>	0.01	0.03	<b>0.05*</b>
<i>procymidone</i>	2.0	0.04	<b>0.1</b>	5.0	0.01	<b>0.1</b>	0.02	0.05	<b>0.25*</b>
<i>kresoxim-methyl</i>	0.5	0.03	<b>0.1</b>	1.0	0.01	<b>0.1</b>	0.2	0.04	<b>0.02</b>
<i>bifenthrin</i>	0.2	0.015	<b>0.05</b>	0.2	0.01	<b>0.1</b>	0.3	0.01	<b>0.05</b>
<i>iprodione</i>	5.0	0.15	<b>1.0</b>	10.0	0.07	<b>0.2</b>	5.0	0.1	<b>1.0</b>
<i>λ-cyhalothrin</i>	0.1	0.003	<b>0.01</b>	0.2	0.006	<b>0.02</b>	0.1	0.01	<b>0.05</b>
<i>indoxacarb</i>	0.5	0.036	<b>0.1</b>	2.0	0.015	<b>0.1</b>	0.5	0.05	<b>0.25</b>
<i>azoxystrobin</i>	2.0	0.02	<b>0.1</b>	2.0	0.03	<b>0.1</b>	0.05	0.05	<b>0.25*</b>

■ **LOQ (BPX-35) < LOQ (HP-5)** ■ **LOQ (BPX-35) > LOQ (HP-5)** ■ **LOQ (BPX-35) = LOQ (HP-5)**

Και σε αυτή την περίπτωση ως όριο ποσοτικού προσδιορισμού θεωρήθηκε η συγκέντρωση στην οποία τα επίπεδα των ανακτήσεων για κάθε δραστική ουσία ήταν ικανοποιητικά και ο ανιχνευτής παρουσίαζε γραμμικότητα. Όλα σχεδόν τα όρια ποσοτικοποίησης επαληθεύουν τα όρια ποσοτικοποίησης που προκύπτουν από τον έλεγχο του θορύβου του κάθε υποστρώματος σε δείγματα «μάρτυρα» στον αντίστοιχο χρόνο κατακράτησης της κάθε δραστικής ουσίας.

Ως LOD ορίστηκε το τριπλάσιο του θορύβου του χρωματογραφικού σήματος μάρτυρα στο χρόνο κατακράτησης της κάθε δραστικής ουσίας.

Στις δραστικές ουσίες που έχουν επισημανθεί με αστερίσκο (\*) η τιμή LOQ είτε είναι ίση της τιμής MRL είτε την ξεπερνάει.

#### 6.4. Ταυτοποίηση των ευρημάτων με τη χρήση φασματομετρίας μάζας

Η επιβεβαίωση και η ταυτοποίηση των ευρημάτων πραγματοποιήθηκε με τον ποιοτικό προσδιορισμό των δραστικών ουσιών με αέρια χρωματογραφία και ανιχνευτή φασματομετρίας μάζας (GC-MS). Ο διαχωρισμός των ενώσεων πραγματοποιήθηκε σε στήλη τύπου TR-5-MS SQC ιδίου υλικού κατασκευής (5% *Phenyl-Methyl-Siloxane*) και πολικότητας με την HP-5 που χρησιμοποιήθηκε στο χρωματογραφικό σύστημα GC-ECD.

Τα φάσματα μάζας λήφθηκαν με πρόσκρουση ηλεκτρονίων στα 70 ev, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο ανακατασκευής του χρωματογραφήματος (*Reconstructed Ion Chromatography – RIC*). Η καταγραφή των ιόντων έγινε για  $m/z$  40 – 450. Στον Πίνακα 6.29 καταγράφονται ο χρόνος κατακράτησης της κάθε δραστικής ουσίας, το κύριο ιόν με βάση το οποίο έγινε η ποσοτικοποίηση των κορυφών, καθώς επίσης και τα δευτερογενή ιόντα με τη σχετική αφθονία σε σχέση με το κύριο ιόν. Τα δευτερογενή ιόντα καταγράφονται ξεχωριστά για τον κάθε φυτικό ιστό, καθώς υπολογίστηκε και η τυπική απόκλιση της σχετικής αφθονίας τους για αριθμό επαναλήψεων  $n=3$ .

Με βάση τους χρόνους κατακράτησης, τα *fludioxonil* και *buprofezin* έχουν πολύ κοντινούς χρόνους κατακράτησης. Όμως αυτό δεν αποτελεί ιδιαίτερο πρόβλημα καθώς μπορεί να γίνει η ταυτοποίηση της ουσίας με βάση το φάσμα και τα ιόντα που έχουν επιλεγεί για τον προσδιορισμό της κάθε μίας στον αντίστοιχο χρόνο κατακράτησης.

Τα πειράματα των ανακτήσεων πραγματοποιήθηκαν σε δύο επίπεδα για τον κάθε φυτικό ιστό σε τρεις επαναλήψεις το κάθε ένα με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας από το πρότυπο μικτό διάλυμα εργασίας 50 F ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (παράγραφος 5.4.1.), το οποίο περιείχε τις δραστικές ουσίες σε εύρος συγκεντρώσεων από 2.5 έως 75  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Πίνακας 5.4).

Για τον καθορισμό των ορίων ποσοτικοποίησης χρησιμοποιήθηκε ο λόγος S/N για την κάθε δραστική ουσία στα επίπεδα των φορτίσεων του κάθε υποστρώματος. Με βάση το λόγο αυτό και τις συγκεντρώσεις της κάθε δραστικής ουσίας υπολογίστηκε ένα θεωρητικό LOQ για τον κάθε αναλύτη, το οποίο ήταν ίδιο σχεδόν για όλους τους φυτικούς ιστούς. Έτσι παρασκευάστηκε πρότυπο μικτό διάλυμα εργασίας 100 F ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), το οποίο περιείχε τις δραστικές ουσίες σε συγκεντρώσεις από 1 έως 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Έγιναν φορτίσεις των φυτικών ιστών στο θεωρητικό επίπεδο LOQ και στο διπλάσιο αυτού (Πίνακας 5.4). Έτσι προέκυψαν τα όρια ποσοτικοποίησης που καταγράφονται στον Πίνακα 6.33. Οι πραγματικές τιμές του ορίου ποσοτικοποίησης για τους περισσότερους αναλύτες όπως αποδείχθηκε από τα αποτελέσματα ήταν στο διπλάσιο του θεωρητικού LOQ και στις περιπτώσεις του *procymidone* και του *azoxystrobin* σε ακόμη υψηλότερα επίπεδα.

**Πίνακας 6.29:** Κύριο ιόν και δευτερογενή ιόντα των Φ.Π., σχετικές αφθονίες των δευτερευόντων ιόντων και τυπικές αποκλίσεις αυτής (n=3) για το κάθε υπόστρωμα της μελέτης.

Δραστική ουσία	RT (min)	Main ion (100%)	Ion 1	Τομάτα		Σταφύλι		Μήλο		Ion 2	Τομάτα		Σταφύλι		Μήλο	
				Σχετική αφθονία	SDV	Σχετική αφθονία	SDV	Σχετική αφθονία	SDV		Σχετική αφθονία	SDV	Σχετική αφθονία	SDV	Σχετική αφθονία	SDV
diphenylamine	8.18	169	168	87	2	88	2	88	3	167	49	2	50	1	49	3
pyrimethanil	9.98	198	199	35	3	36	2	41	2							
metribuzin	11.23	198	199	17	2	12	2	19	1							
vinclozolin	11.37	212	178	98	1	97	3	94	5	198	67	3	64	4	67	4
fosthiazate I	14.26	104	227	94	2	84	2	94	1							
fosthiazate II	14.40	104	227	86	3	88	3	86	2							
procymidone	16.25	96	283	37	4	39	2	39	1	67	37	2	38	1	39	1
fludioxonil	19.85	248	182	47	3	47	2	45	1	127	36	1	35	1	35	2
buprofezin	19.98	175	249	61	3	61	8	69	6	172	49	7	47	8	49	3
kresoxim-methyl	20.47	116	206	79	6	79	3	82	2	131	47	3	48	3	49	5
fenhexamid	24.66	266	97	94	3	96	2	93	4	177	90	7	92	3	86	3
iprodione	27.86	314	316	67	2	66	2	64	3	187	31	2	29	3	27	3
bifenthrin	28.58	181	166	41	1	40	1	41	1	165	31	2	32	1	33	1
λ-cyhalothrin	32.25	181	197	70	3	72	5	67	4	141	38	3	38	2	39	2
pyriproxyfen	31.02	136	226	19	2	20	1	25	2	96	19	2	21	1	23	4
indoxacarb	45.82	264	266	36	2	35	2	35	4	218	30	1	29	2	29	3
azoxystrobin	46.80	344	345	34	2	32	4	37	4	388	33	2	31	3	34	3

**Πίνακας 6.30:** Επίπεδα φόρτισης για το υπόστρωμα της τομάτας, το κύριο ιόν και οι ανακτήσεις που υπολογίστηκαν με ποσοτικοποίηση αυτού.

<i>Δραστική ουσία</i>	<i>RT (min)</i>	<i>Main ion (100%)</i>	<i>Επίπεδο φόρτισης 1F</i>			<i>Επίπεδο φόρτισης 4F</i>		
			<i>C (μg/g)</i>	<i>Ανάκτηση (%)</i>	<i>RSD (%)</i>	<i>C (μg/g)</i>	<i>Ανάκτηση (%)</i>	<i>RSD (%)</i>
<i>diphenylamine</i>	8.18	169	0.5	103	27	2.0	112	2
<i>pyrimethanil</i>	9.98	198	0.05	135	33	0.2	121	3
<i>metribuzin</i>	11.23	198	0.5	84	30	2.0	99	16
<i>vinclozolin</i>	11.37	212	0.5	123	30	2.0	118	2
<i>fosthiazate</i>	14.26	104	1.5	121	39	6.0	113	3
<i>procymidone</i>	16.25	96	0.5	113	30	2.0	118	3
<i>fludioxonil</i>	19.85	248	1.5	130	33	6.0	104	2
<i>buprofezin</i>	19.98	175	0.25	125	21	1.0	110	3
<i>kresoxim-methyl</i>	20.47	116	0.25	117	31	1.0	117	4
<i>fenhexamid</i>	24.66	266	1.5	126	34	6.0	117	3
<i>iprodione</i>	27.86	314	0.5	124	33	2.0	121	2
<i>bifenthrin</i>	28.58	181	0.25	119	32	1.0	118	2
<i>λ-cyhalothrin</i>	32.25	181	1.5	119	32	6.0	121	1
<i>pyriproxyfen</i>	31.02	136	0.25	120	36	1.0	120	3
<i>indoxacarb</i>	45.82	264	1.5	112	31	6.0	120	4
<i>azoxystrobin</i>	46.80	344	0.5	100	34	2.0	120	3



**Πίνακας 6.31:** Επίπεδα φόρτισης για το υπόστρωμα του σταφυλιού, το κύριο ιόν και οι ανακτήσεις που υπολογίστηκαν με ποσοτικοποίηση αυτού.

<i>Δραστική ουσία</i>	<i>RT (min)</i>	<i>Main ion (100%)</i>	<i>Επίπεδο φόρτισης 1F</i>			<i>Επίπεδο φόρτισης 10F</i>		
			<i>C (μg/g)</i>	<i>Ανάκτηση (%)</i>	<i>RSD (%)</i>	<i>C (μg/g)</i>	<i>Ανάκτηση (%)</i>	<i>RSD (%)</i>
<i>diphenylamine</i>	8.18	169	0.5	121	4	5.0	102	6
<i>pyrimethanil</i>	9.98	198	0.05	102	2	0.5	86	14
<i>metribuzin</i>	11.23	198	0.5	141	11	5.0	128	24
<i>vinclozolin</i>	11.37	212	0.5	113	3	5.0	89	11
<i>fosthiazate</i>	14.26	104	1.5	130	4	15	91	14
<i>procymidone</i>	16.25	96	0.5	110	3	5.0	87	19
<i>fludioxonil</i>	19.85	248	1.5	112	8	15	91	19
<i>buprofezin</i>	19.98	175	0.25	111	4	2.5	84	19
<i>kresoxim-methyl</i>	20.47	116	0.25	119	5	2.5	86	19
<i>fenhexamid</i>	24.66	266	1.5	126	10	15	82	19
<i>iprodione</i>	27.86	314	0.5	150	5	5.0	80	25
<i>bifenthrin</i>	28.58	181	0.25	128	3	2.5	83	24
<i>λ-cyhalothrin</i>	32.25	181	1.5	121	5	15	78	24
<i>pyriproxyfen</i>	31.02	136	0.25	124	6	2.5	80	24
<i>indoxacarb</i>	45.82	264	1.5	127	9	15	78	27
<i>azoxystrobin</i>	46.80	344	0.5	106	14	5.0	79	20

**Πίνακας 6.32:** Επίπεδα φόρτισης για το υπόστρωμα του μήλου, το κύριο ιόν και οι ανακτήσεις που υπολογίστηκαν με ποσοτικοποίηση αυτού.

<i>Δραστική ουσία</i>	<i>RT (min)</i>	<i>Main ion (100%)</i>	<i>Επίπεδο φόρτισης 1F</i>			<i>Επίπεδο φόρτισης 2F</i>		
			<i>C (μg/ g)</i>	<i>Ανάκτηση (%)</i>	<i>RSD (%)</i>	<i>C (μg/ g)</i>	<i>Ανάκτηση (%)</i>	<i>RSD (%)</i>
<i>diphenylamine</i>	8.18	169	0.5	93	4	1.0	105	3
<i>pyrimethanil</i>	9.98	198	0.05	114	2	0.1	115	2
<i>metribuzin</i>	11.23	198	0.5	92	5	1.0	92	3
<i>vinclozolin</i>	11.37	212	0.5	110	4	1.0	114	3
<i>fosthiazate</i>	14.26	104	1.5	105	3	3.0	112	6
<i>procymidone</i>	16.25	96	0.5	103	4	1.0	111	3
<i>fludioxonil</i>	19.85	248	1.5	103	12	3.0	103	6
<i>buprofezin</i>	19.98	175	0.25	109	8	0.5	102	8
<i>kresoxim-methyl</i>	20.47	116	0.25	108	6	0.5	111	2
<i>fenhexamid</i>	24.66	266	1.5	95	7	3.0	106	3
<i>iprodione</i>	27.86	314	0.5	94	5	1.0	109	7
<i>bifenthrin</i>	28.58	181	0.25	105	4	0.5	106	4
<i>λ-cyhalothrin</i>	32.25	181	1.5	95	5	3.0	104	1
<i>pyriproxyfen</i>	31.02	136	0.25	92	2	0.5	97	6
<i>indoxacarb</i>	45.82	264	1.5	92	7	3.0	100	7
<i>azoxystrobin</i>	46.80	344	0.5	104	6	1.0	96	3

**Πίνακας 6.33:** Όρια ανίχνευσης και όρια ποσοτικοποίησης για τις δραστικές ουσίες που επικυρώθηκαν με τη χρήση φασματομετρίας μάζας, για όλους τους φυτικούς ιστούς.

<i>Δραστική ουσία</i>	<i>Θεωρητικό LOQ (μg/ g)</i>	<i>LOD (μg/ g)</i>	<i>LOQ (μg /g)</i>
<i>diphenylamine</i>	0.01	0.006	0.02
<i>pyrimethanil</i>	0.01	0.003	0.01
<i>metribuzin</i>	0.02	0.01	0.04
<i>vinclozolin</i>	0.02	0.006	0.02
<i>fosthiazate</i>	0.4	0.12	0.4
<i>procymidone</i>	0.01	0.02	0.06
<i>fludioxonil</i>	0.05	0.30	1.0
<i>buprofezin</i>	0.05	0.03	0.1
<i>kresoxim-methyl</i>	0.02	0.006	0.02
<i>fenhexamid</i>	0.1	0.06	0.2
<i>iprodione</i>	0.04	0.01	0.04
<i>bifenthrin</i>	0.01	0.003	0.01
<i>λ-cyhalothrin</i>	0.02	0.01	0.04
<i>pyriproxyfen</i>	0.02	0.01	0.04
<i>indoxacarb</i>	0.02	0.01	0.04
<i>azoxystrobin</i>	0.02	0.1	0.3

## 6.5. Συμπεράσματα

Μετά από την έκθεση και συζήτηση όλων των αποτελεσμάτων που προέκυψαν για τις δραστικές ουσίες στόχους από τα διαφορετικά χρωματογραφικά συστήματα στην πορεία επικύρωσης της αναλυτικής μεθοδολογίας, που βασίζεται στην εκχύλιση του φυτικού ιστού με ακετόνη διχλωρομεθάνιο και πετρελαϊκό αιθέρα, μπορούμε να έχουμε μια πλήρη εικόνα για τη συμπεριφορά κάθε δραστική ουσίας σε κάθε ένα από τα χρωματογραφικά συστήματα και σε κάθε ένα από τους φυτικούς ιστούς της μελέτης.

Συνολικά η μελέτη αφορά 17 δραστικές ουσίες, τις *metribuzin*, *vinclozolin*, *lambda-cyhalothrin*, *procymidone*, *kresoxim-methyl*, *bifenthrin*, *indoxacarb*, *azoxystrobin*, *fenhexamid*, *cymoxanil*, *iprodione*, *buprofezin*, *fludioxonil*, *fosthiazate*, *pyrimethanil* και *pyriproxyfen* που αναλύθηκαν και στα τρία υποστρώματα και τη *diphenylamine*, που αναλύθηκε μόνο στο υπόστρωμα του μήλου.

Τα *cymoxanil*, *diphenylamine*, *pyrimethanil* και *pyriproxyfen* ανιχνεύονται και προσδιορίζονται μόνο με ανιχνευτή αζώτου φωσφόρου (NPD), ενώ τα *indoxacarb* και *bifenthrin* μόνο με ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων (ECD). Για μια σειρά δραστικών ουσιών όπως τα *metribuzin*, *vinclozolin*, *procymidone*, *kresoxim-methyl*, *fenhexamid*, *lambda-cyhalothrin* και *azoxystrobin* προτιμάται η ανίχνευση και ο προσδιορισμός τους στον ECD, αφού παρουσιάζει καλύτερη ευαισθησία, ενώ αντίστοιχα για τα *fosthiazate* και *buprofezin* προτιμάται ο προσδιορισμός τους στον NPD. Όσον αφορά τα *fludioxonil* και *iprodione* η επιλογή προσδιορισμού τους μπορεί να είναι και ο ECD και ο NPD. Η ποσοτικοποίηση των υπολειμμάτων των φυτοπροστατευτικών προϊόντων της μελέτης σε κάθε ένα από τα χρωματογραφικά συστήματα που χρησιμοποιήθηκαν έγινε με πρότυπα διαλύματα σε εκχυλίσματα υποστρώματος, αφού παρατηρήθηκε για κάποια εξ αυτών έντονη επίδραση υποστρώματος, όπως για παράδειγμα για το *fludioxonil* στο μήλο και την τομάτα στο σύστημα GC-NPD (282% και 140%, αντίστοιχα), το *fenhexamid* σε όλους τους φυτικούς ιστούς στο σύστημα GC-ECD (181% – 256%) και το *indoxacarb* στην τομάτα στο σύστημα GC-ECD (140%). Σε σχέση με τα υποστρώματα του σταφυλιού και του μήλου, το υπόστρωμα της τομάτας παρουσιάζει εντονότερη επίδραση υποστρώματος στον προσδιορισμό των περισσότερων Φ.Π. της μελέτης στο χρωματογραφικό σύστημα GC-ECD.

Στο χρωματογραφικό σύστημα GC (HP-1) – NPD αξιολογήθηκε η αναλυτική μεθοδολογία για τον προσδιορισμό των υπολειμμάτων των *cymoxanil*, *diphenylamine*, *pyrimethanil*, *pyriproxyfen*, *fosthiazate*, *buprofezin*, *fludioxonil*, *iprodione* και *azoxystrobin* στους τρεις φυτικούς ιστούς. Το *cymoxanil* είναι η ουσία που εμφάνισε τα περισσότερα προβλήματα στην προσπάθεια του προσδιορισμού της, σε όλους τους φυτικούς ιστούς. Μόνο στην τομάτα επιτεύχθηκε ο προσδιορισμός της, ενώ στα υποστρώματα του σταφυλιού και του μήλου δεν ήταν δυνατός ο προσδιορισμός της σε επίπεδα συγκεντρώσεων μικρότερα των MRLs (0.2 και 0.05 µg/ g, αντίστοιχα) και για το λόγο αυτό δεν κατέστη δυνατή η επικύρωση του συγκεκριμένου μορίου με τη χρήση της συγκεκριμένης αναλυτικής μεθόδου.

Στο φυτικό ιστό της τομάτας οι προαναφερόμενες δραστικές ουσίες παρουσίασαν καλά αναλυτικά χαρακτηριστικά με ικανοποιητικά ποσοστά ανακτήσεων, επαναληψιμότητας και αναπαραγωγιμότητας και όρια ποσοτικού προσδιορισμού χαμηλότερα των τιμών MRL των δραστικών ουσιών στη τομάτα, εκτός από το *cymoxanil* για το οποίο το προκύπτον όριο ποσοτικοποίησης είναι ίσο με την τιμή MRL. Η διευρυμένη αβεβαιότητα, που υπολογίστηκε με βάση τις επιμέρους αβεβαιότητες στην προετοιμασία των αναλυτικών προτύπων, στα πειράματα ανάκτησης, στην αναπαραγωγιμότητα και στο σχεδιασμό της καμπύλης αναφοράς, κυμαίνεται για όλες τις δραστικές ουσίες από 12 έως 24%, εκτός των *fosthiazate* και *cymoxanil* για τα οποία ανέρχεται στο 51-55%.

Στο φυτικό ιστό του σταφυλιού οι προαναφερόμενες δραστικές ουσίες παρουσίασαν την ίδια σχεδόν εικόνα με αυτή στην τομάτα ως προς τα μεγέθη της ορθότητας και της πιστότητας της μεθόδου. Τα όρια ποσοτικοποίησης είναι χαμηλότερα των τιμών MRL για το *buprofezin* και πολύ χαμηλότερα για τα *pyrimethanil*, *fludioxonil*, *iprodione* και *azoxystrobin*, ενώ είναι υψηλότερα των τιμών MRL για τα *cymoxanil* και *pyriproxyfen*. Καθώς αυτά τα δύο φυτοπροστατευτικά προϊόντα προσδιορίζονται μόνο στον NPD προκύπτει ότι η συγκεκριμένη αναλυτική μεθοδολογία παρουσιάζει σημαντικό μειονέκτημα στον έλεγχο των υπολειμμάτων των δύο αυτών ουσιών στο σταφύλι. Η διευρυμένη αβεβαιότητα κυμαίνεται για όλες τις δραστικές ουσίες (εκτός από το *cymoxanil* για το οποίο δεν προσδιορίστηκε) από 18 έως 51%.

Στο φυτικό ιστό του μήλου τα όρια ποσοτικού προσδιορισμού είναι χαμηλότερα των τιμών MRL για το *buprofezin* και πολύ χαμηλότερα για τα *pyrimethanil*, *fludioxonil*, *iprodione*, όπως και για τη *diphenylamine*, στα ίδια επίπεδα των τιμών MRL είναι για το *pyriproxyfen*, ενώ υψηλότερα των τιμών MRL είναι για τα *cymoxanil*, *fosthiazate* και

*azoxystrobin*. Καθώς ο προσδιορισμός του *azoxystrobin* επιτυγχάνεται σε ικανοποιητικό όριο ποσοτικοποίησης στον ECD και το νηματωδοκτόνο *fosthiazate* δεν είναι εγκεκριμένο για χρήση στην καλλιέργεια της μηλιάς τα προβλήματα που προκύπτουν από την υπέρβαση των ορίων δεν θεωρούνται ιδιαίτερα σημαντικά.

Στο χρωματογραφικό σύστημα GC (HP-5) – ECD αξιολογήθηκε η αναλυτική μεθοδολογία για τον προσδιορισμό των υπολειμμάτων των *metribuzin*, *vinclozolin*, *procymidone*, *fludioxonil*, *kresoxim-methyl*, *fenhexamid*, *iprodione*, *bifenthrin*, *lambda-cyhalothrin*, *indoxacarb* και *azoxystrobin* στους τρεις φυτικούς ιστούς.

Στο φυτικό υπόστρωμα της τομάτας οι δραστικές ουσίες παρουσίασαν καλά αναλυτικά χαρακτηριστικά με ικανοποιητικά ποσοστά ανακτήσεων (84 – 120%), επαναληψιμότητας (2 – 21%) και αναπαραγωγιμότητας και όρια ποσοτικοποίησης χαμηλότερα των τιμών MRL των δραστικών ουσιών στη τομάτα. Ιδιαίτερη περίπτωση στην αναπαραγωγιμότητα αποτελεί το *metribuzin*, του οποίου η αναπαραγωγιμότητα βρέθηκε ίση με 42% και αποδόθηκε στη γρήγορη διάσπαση του μορίου προς τους μεταβολίτες του μετά το χρονικό διάστημα των τριών περίπου ημερών. Η διευρυμένη αβεβαιότητα κυμαίνεται για όλες τις δραστικές ουσίες από 16 έως 49%, εκτός των *metribuzin* (85%), *fenhexamid* (86%) και *fludioxonil* (57%). Στην περίπτωση του *metribuzin* η υψηλή τιμή οφείλεται στην επί μέρους αβεβαιότητα που συνδέεται με την πιστότητα (αναπαραγωγιμότητα) και στα *fenhexamid* και *fludioxonil* στην επί μέρους αβεβαιότητα που συνδέεται με την καμπύλη αναφοράς, διότι αυτές οι δύο δραστικές ουσίες παρουσιάζουν επίδραση υποστρώματος 244% και 132%, αντίστοιχα.

Στο φυτικό ιστό του σταφυλιού οι προαναφερόμενες δραστικές ουσίες παρουσίασαν την ίδια σχεδόν εικόνα με αυτή στην τομάτα ως προς τα μεγέθη της ορθότητας (96-124%) και της πιστότητας της μεθόδου (με ιδιαίτερη περίπτωση και πάλι το *metribuzin*). Στο *metribuzin* το χαμηλότερο επίπεδο εμβολιασμού του υποστρώματος είναι ίσο με το επίπεδο του MRL. Η διευρυμένη αβεβαιότητα κυμαίνεται για όλες τις δραστικές ουσίες από 11 έως 36%, εκτός των τριών δραστικών ουσιών που αναφέρθηκαν και στην τομάτα, *metribuzin* (41%), *fenhexamid* (52%) και *fludioxonil* (88%).

Στο φυτικό υπόστρωμα του μήλου η εφαρμοζόμενη αναλυτική τεχνική παρουσίασε ικανοποιητική ορθότητα και πιστότητα (ιδιαίτερότητα το *metribuzin*). Για τα *metribuzin* και *fenhexamid*, στα οποία αν και τα κατώτερα επίπεδα εμβολιασμού ήταν χαμηλότερα από το ανώτατο επιτρεπτό όριο υπολειμμάτων, ο προσδιορισμός τους είναι εφικτός σε επίπεδα υψηλότερα από τα MRLs που έχουν θεσπιστεί για το συγκεκριμένο

υπόστρωμα. Η διευρυμένη αβεβαιότητα στον προσδιορισμό των υπολειμμάτων των φυτοπροστατευτικών προϊόντων στο μήλο βρέθηκε σε παρόμοια επίπεδα με αυτά στο σταφύλι.

Το χρωματογραφικό σύστημα GC (BPX-35) – ECD χρησιμοποιήθηκε για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων. Οι δραστικές ουσίες οι οποίες είναι εφικτό να επιβεβαιωθούν από το συγκεκριμένο χρωματογραφικό σύστημα είναι οι ακόλουθες: *vinclozolin*, *metribuzin*, *procymidone*, *kresoxim-methyl*, *bifenthrin*, *iprodione*, *lambda-cyhalothrin*, *indoxacarb* και *azoxystrobin*. Παρατηρήθηκε διαφορά στους χρόνους κατακράτησης, όπως ήταν αναμενόμενο, και στα όρια ποσοτικοποίησης μεταξύ των δύο χρωματογραφικών στηλών στο σύστημα GC-ECD, με τα όρια να είναι υψηλότερα στην BPX-35 (σχεδόν διπλάσια από αυτά στην HP-5).

Επίσης, για την ταυτοποίηση των ευρημάτων και την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφικό σύστημα αέριας χρωματογραφίας με ανιχνευτή φασματομετρίας μάζας GC-MS, στο οποίο πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός των δραστικών ουσιών χρησιμοποιώντας τη μέθοδο ανακατασκευής του χρωματογραφήματος (*Reconstructed Ion Chromatography – RIC*) και παρακολουθώντας το κύριο ιόν (ποσοτικοποίηση) και τα δευτερογενή ιόντα (ταυτοποίηση) για την κάθε δραστική ουσία στόχο (η μόνη δραστική ουσία που δεν είχε καλή απόκριση και δεν ήταν εφικτή η παρακολούθησή της ήταν το *cymoxanil*).

Μετά την έκθεση όλων των παραπάνω στοιχείων για τις δραστικές ουσίες και τη συμπεριφορά τους στα χρωματογραφικά συστήματα που χρησιμοποιήθηκαν προκύπτει μια πλήρης εικόνα για κάθε μια από αυτές.

Έτσι, η *diphenylamine* είναι μια ουσία που εφαρμόζεται κατ' εξοχήν στα μήλα μετασυλλεκτικά και για το λόγο αυτό ελέγχθηκε μόνο σε αυτά. Προσδιορίζεται μόνο στο σύστημα GC-NPD με ικανοποιητικά χαμηλό όριο ποσοτικού προσδιορισμού, πολύ καλή ορθότητα, πιστότητα και διευρυμένη αβεβαιότητα στον προσδιορισμό της με τη συγκεκριμένη αναλυτική μέθοδο ίση με 34%.

Ένα μόριο το οποίο προσδιορίζεται με τη χρήση GC-NPD αλλά στην περίπτωση του μήλου σε επίπεδα συγκεντρώσεων υψηλότερα των MRLs είναι το *azoxystrobin*. Αυτό όμως δεν αποτελεί ιδιαίτερο πρόβλημα, αφού ο προσδιορισμός του μπορεί να επιτευχθεί

με πολύ καλά αναλυτικά χαρακτηριστικά στο σύστημα GC-ECD (χαμηλότερα όρια ποσοτικοποίησης).

Συνοπτικά τα Φ.Π. *pyrimethanil*, *buprofezin* και *pyriproxifen* προσδιορίζονται άριστα με τη χρήση του GC-NPD, αφού παρουσιάζουν πολύ καλές τιμές αναπαραγωγιμότητας και αβεβαιότητας. Ένα μόριο το οποίο αν και ανιχνεύεται αρκετά καλά στον GC-NPD, αλλά θα ήταν προτιμότερο να προσδιοριστεί με τη χρήσης του GC-ECD είναι το *iprodione*, διότι στον ανιχνευτή αυτό προσδιορίζεται σε χαμηλότερα επίπεδα συγκεντρώσεων από ότι στον πρώτο, αν και για το *iprodione* αυτό δεν αποτελεί ιδιαίτερο πρόβλημα αφού έχει υψηλά επίπεδα MRLs. Η απόκριση όμως του ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων είναι πολύ υψηλότερη για αυτή τη δραστική ουσία.

Από τις δραστικές ουσίες που προσδιορίζονται στον GC-ECD, τα *vinclozolin*, *procymidone*, *kresoxim-methyl*, *bifenthrin*, *lambda-cyhalothrin* και *indoxacarb*, παρουσιάζουν ικανοποιητικά επίπεδα ανακτήσεων σε επίπεδα εμβολιασμού χαμηλότερα των MRLs (με μόνη εξαίρεση το *procymidone* για το μήλο) και με πολύ καλή αναπαραγωγιμότητα.

Το *metribuzin* αν και είναι ένα μόριο που εμφανίζει τιμές LOQ σαφώς χαμηλότερες των MRLs στην τομάτα, εμφανίζει υψηλές τιμές αναπαραγωγιμότητας και συνεπώς και υψηλή αβεβαιότητα. Οι υψηλές τιμές της αναπαραγωγιμότητας αποδόθηκαν στη γρήγορη διάσπαση του μορίου στους μεταβολίτες του. Για το λόγο αυτό πρέπει τα δείγματα που μπορεί να φέρουν το συγκεκριμένο Φ.Π. να αναλύονται λαμβάνοντας υπόψη στον ποσοτικό προσδιορισμό και τον κύριο μεταβολίτη του και όσο το δυνατό πλησιέστερα στο χρόνο λήψης του δείγματος.

Το *fenhexamid* είναι μια ιδιαίτερη περίπτωση μορίου στο οποίο παρουσιάζεται υψηλή επίδραση του υποστρώματος για όλους τους φυτικούς ιστούς. Στο μήλο προσδιορίζεται με την προτεινόμενη μεθοδολογία σε επίπεδα υψηλότερα του MRL. Οι υψηλές τιμές αβεβαιότητας που προέκυψαν οφείλονταν στις επιμέρους αβεβαιότητες της πιστότητας και της καμπύλης αναφοράς.

Το *fludioxonil* είναι και αυτό ένα Φ.Π. το οποίο παρουσιάζεται να προσδιορίζεται και στα δύο συστήματα, αλλά καλύτερα στο σύστημα GC-ECD, όμως και στα δύο συστήματα παρουσιάζει υψηλά επίπεδα διευρυμένης αβεβαιότητας που συνδέεται κυρίως με την αβεβαιότητα της καμπύλης αναφοράς.



# ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

## ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Αμβράζη Γ. Ε., 2007.** Ανάπτυξη μεθοδολογίας και εφαρμογή της στον προσδιορισμό επιλεγμένων φυτοφαρμάκων στην ελιά και το ελαιόλαδο κατά τη διαδικασία παραγωγής του. Διδακτορική διατριβή. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Ιωαννίνων, Ιωάννινα.
2. **Βασιλακάκης Μ., 2006.** Μετασυλλεκτική Φυσιολογία, Μεταχείριση Οπωροκηπευτικών και Τεχνολογία. Διαιτητική Αξία Οπωροκηπευτικών. Εκδόσεις Γαρταγάνη, Θεσσαλονίκη.
3. **Βασιλακάκης Μ., 2007.** Γενική και Ειδική Δενδροκομία. Εκδόσεις Γαρταγάνη, Θεσσαλονίκη.
4. **Ζιώγας Ν. Β.- Μαρκόγλου Ν. Α., 2007.** Γεωργική Φαρμακολογία. Εκδόσεις Β. Ζιώγας/ Α. Μαρκόγλου. Αθήνα.
5. **Καλαμαράκη Ε. Α. & Μαρκάκης Κ., 2004.** «Οι επιπτώσεις από την επαναξιολόγηση δραστικών ουσιών μυκητοκτόνων στα πλαίσια της Ε.Ε.». Πρακτικά 4<sup>ης</sup> Πανελλήνιας συνάντησης φυτοπροστασίας: «Η φυτοπροστασία σήμερα». σελ. 155-157 & 161-162.
6. **Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 149/2008 της επιτροπής των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων της 29ης Ιανουαρίου 2008** για την τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 396/2005 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου με τη θέσπιση των παραρτημάτων II, III και IV για τον καθορισμό ανώτατων ορίων καταλοίπων στα προϊόντα που καλύπτονται από το παράρτημα I του κανονισμού.
7. **Καρπούζας Γ., 2003.** Γεωργική Φαρμακολογία. Πανεπιστημιακές παραδόσεις, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας, Βόλος. σελ. 23-24, σελ. 62-63.
8. **Κασσαβέτη Α., 2004.** Συγκριτική παρακολούθηση των υπολειμμάτων επιλεγμένων φυτοπροστατευτικών προϊόντων σε υδροπονική και συμβατική καλλιέργεια τομάτας υπό κάλυψη. Πτυχιακή διατριβή. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Βόλος.
9. **Λαμπή Ν. Ε., 2003.** Χημική μετρολογία-Ιχνηλασιμότητα στις χημικές αναλύσεις. Γενικό Χημείο του Κράτους, Αθήνα.
10. **Λιαπής Κ., 2003.** Εφαρμογές της φασματομετρίας μάζας αρνητικού χημικού ιονισμού στη μελέτη δραστικών ουσιών γεωργικών φαρμάκων και των υπολειμμάτων αυτών σε γεωργικά προϊόντα. Διδακτορική διατριβή. Αθήνα.

11. **Λιαπής Κ., 2003.** Διδακτικές σημειώσεις του μαθήματος: Μεθοδολογία προσδιορισμού υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών και συναφών προϊόντων, του Δ.Π.Μ.Σ. του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
12. **Μηλιάδης Ε. Γ., 1998.** Διδακτικές σημειώσεις από το Χημικό Τμήμα του Πανεπιστημίου Αθηνών.
13. **Μηλιάδης Ε. Γ., 2004.** Διδακτικές σημειώσεις από το Χημικό Τμήμα του Πανεπιστημίου Αθηνών.
14. **Νικολάου Α. Ν., 2008.** Αμπελουργία. Εκδόσεις Σύγχρονη Παιδεία, Θεσσαλονίκη.
15. **Οδηγία 91/414/ΕΟΚ του Συμβουλίου της 15<sup>ης</sup> Ιουλίου 1991** σχετικά με τη διάθεση στην αγορά φυτοπροστατευτικών προϊόντων Φ.Π.
16. **Ολύμπιος Μ. Χ., 2001.** Η τεχνική της καλλιέργειας των κηπευτικών στα θερμοκήπια. Εκδόσεις Αθ. Σταμούλης, Αθήνα.
17. **Παναγόπουλος Γ. Χ., 2000.** Ασθένειες κηπευτικών καλλιεργειών. Εκδόσεις Α Αθ. Σταμούλης, Αθήνα.
18. **Παναγόπουλος Γ. Χ., 2007.** Ασθένειες καρποφόρων δέντρων και αμπέλου. Εκδόσεις Α Αθ. Σταμούλης, Αθήνα.
19. **Παπαδοπούλου-Μουρκίδου Ε., 1991.** Διδακτικές σημειώσεις του μαθήματος Γεωργικά Φάρμακα, Μέρος Ι. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Υπηρεσία Δημοσιευμάτων.
20. **Ποντίκης Α. Κ. 2003.** Ειδική Δενδροκομία - Μηλοειδή. Εκδόσεις Αθ. Σταμούλης, Αθήνα.
21. **Σταμόπουλος Κ. Δημ., 1999.** Έντομα αποθηκών μεγάλων καλλιεργειών και λαχανικών. Εκδόσεις Ζήτη, Θεσσαλονίκη.
22. **Τζανακάκης Ε. Μ. – Κατσόγιαννος Ι. Β., 2003.** Έντομα καρποφόρων δέντρων και αμπέλου. Εκδόσεις ΑγροΤύπος α.ε., Αθήνα.

## ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Ahmed, F. E., 2001.** Analysis of pesticides and their metabolites in food and drinks. *Trends in Analytical Chemistry*, 20 (11): 649-661.
2. **Alder L. Greulich K., Kempe G., Vieth B., 2006.** Residue analysis of 500 high priority pesticides Better by GC-MS or LC-MS/MS?. *Mass Spectrometry Reviews*, 25 (6): 838-865.
3. **Amvrazi, G. E., Tsiropoulos, G. N., 2009.** Application of single-drop microextraction coupled with gas chromatography for the determination of multiclass pesticides in vegetables with nitrogen phosphorus and electron capture detection. *Journal of Chromatography A*, 1216: 2789–2797.
4. **Analytical Methods for Pesticide Residues, 1996.** Ministry of Public Health, Welfare, Health and Sport, The Netherlands.
5. **Angerer, J., Ewers, U., Wilhelm, M., 2007.** Human biomonitoring: State of the art, *Int. J. Hyg. Environ.-Health*, 210: 201–228.
6. **Barker S. A., 2000.** Matrix solid-phase dispersion. *Journal of Chromatography A*, 885: 115.
7. **Becker, R., Brozena, S., Smith, D., 2003.** What is biomonitoring?. *Chemistry Bussiness*. (This article has been adapted from a version that first appeared in “Inside EPA’s Risk Policy Report”)
8. **Berlardi, R., Pawliszyn, J., 1989.** The application of chemically modified fused silica fibers in the extraction of organics from water matrix samples and their rapid transfer to capillary columns. *Water Pollution Research Journal of Canada*, 24: 179.
9. **Boobis, R. A., Ossendorp, C. B., Banasiak, U., Hamey, Y. P., Sebestyen, I., Moretto, A., 2008.** Cumulative risk assessment of pesticide residues in food. *Toxicology Letters*, 180: 137–150.
10. **Barcelo D., Hennion, C., 1997.** Sampling of polar pesticides from water matrices. *Analytica Chimica Acta*, 338: 3.
11. **Camel, V., 1998.** Supercritical fluid extraction as a useful method for pesticides determination. *Journal of Chromatography A*, 26: 99–111.
12. **Camel, V., 2000.** Microwave-assisted solvent extraction of environmental samples. *Trends in Analytical Chemistry*, 19(4): 229–248.
13. **Carson, M., C., 2000.** Ion-pair solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A*, 885: 343.

14. **Codex Alimentarius Commision, 1999.** Recommended methods of sampling for the determination of pesticide residues for compliance with MRLs. *CAC/GL 33-1999*.
15. **Cortada, C., Vidal, L., Tejada, S., Romo, A., Canals, A., 2009.** Determination of organochlorine pesticides in complex matrices by single-drop microextraction coupled to gas chromatography–mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 638: 29–35.
16. **Dean, J.,R., 1998.** Extraction methods for environmental analysis. Edited by John Wiley & Sons, New York.
17. **EURACHEM Guide, 1998.** The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics.
18. **EURACHEM/ CITAC Guide CG 4, 2000.** Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement.
19. **FAO, 1981.** Guidelines on pesticide residue trials to provide data for the registration of pesticides and the establishment of maximum residue limits. *Plant protection bulletin*, Vol. 29, 1981.
20. **Herrero, M., Martin-Alvarez, P., Senorans, F., J., Cifuentes, A., Ibanez, E., 2005.** Optimization of accelerated solvent extraction of antioxidants from *Spirulina platensis* microalga. *Food Chemistry*, 93: 417–423.
21. **Jarczyk, H. J., 1983.** Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer, 36/1983, 1: 84-94.
22. **Kaufmann, B., Christen, B., 2002.** Recent Extraction Techniques for Natural Products: Microwave-assisted Extraction and Pressurised Solvent Extraction. *Phytochemical Analysis*, 13: 105–113.
23. **Lehotay, S., Mastovska, K., Lightfield, A., 2005.** Use of Buffering and Other Means to Improve Results of Problematic Pesticides in a Fast and Easy Method for Residue Analysis of Fruits and Vegetables. *Journal of AOAC International*, 88 (2): 615-629.
24. **Masque N., Marce, M., Borrul, F., 1998.** New polymeric and other type of sorbents for solid-phase extraction of polar organic micropollutants from environmental water. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 17: 384.
25. **Mayer, L., M., 1994.** Identification of the procedural steps that affect recovery of the semi-volatile compounds by solid phase extraction using cartridge and particle loaded membrane (disk) devices. *Analytica Chimica Acta*, 294: 113.
26. **McKinlay, R., Plant, A. J., Bell, J.N.B., Voulvoulis, N., 2008.** Endocrine disrupting pesticides: Implications for risk assessment. *Environment International*, 34: 168–183.
27. **Miliadis, E. G., Liapis, S. K., Malatou, Th. P., 2004.** Assessment of the performance of nine Greek laboratories through a proficiency test on the analysis of

grapes for the determination of residues of pesticides. *International Journal Environmental Analytical Chemistry*, 84: 193-197.

28. **Nastreddine, L., Parent-Massin, D., 2002.** Food contamination by metals and pesticides in the European Union. Should we worry?. *Toxicology Letters*, 127: 29–41.
29. **Pensado, L., Casais, M. C., Mejuto, M. C., Cela, R., 2005.** Application of matrix solid-phase dispersion in the analysis of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in fish samples. *Journal of Chromatography A*, 1077: 103.
30. **Pichon, V., 2000.** Solid-phase extraction for multiresidue analysis of organic contaminants in water. *Journal of Chromatography A*, 885: 195.
31. **Rakitsky, N.V., Koblyakov, A.V., Turusov, S.V., 2000.** Nongenotoxic (Epigenetic) Carcinogens: Pesticides as an example. A critical Review. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, 20: 229–240.
32. **Seed, J., Brown, R. P., Olin, S. S., and Foran, J. A., 1995.** Chemical mixtures: Current risk assessment methodologies and future directions. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 22: 76–94.
33. **Sherma, J., 1989.** Analytical methods for pesticides and plant growth regulators. Advanced analytical techniques, Volume XVII, Academic Press Inc.
34. **Tanaka, T., Hori, T., Asada, T., Oikawa, K., Kawata, K., 2007.** Simple one-step extraction and cleanup by pressurized liquid extraction for gas chromatographic–mass spectrometric determination of pesticides in green leafy vegetables. *Journal of Chromatography A*, 1175: 181–186.
35. **Thurman, E. M., Mills, M. S., 1998.** Solid-phase extraction. Principles and Practice. Wiley, New York.
36. **Thacker, J.R.M., 2002.** Arthropod pest control. Cambridge University Press, United Kingdom.
37. **Wilkinson, F. C., Christoph, R. G., Julien, E., Kelley, J. M., Kronenberg, J., McCarthy, J., Reiss, R., 2000.** Assessing the Risks of Exposures to Multiple Chemicals with a Common Mechanism of Toxicity: How to Cumulate?. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 31: 30–43.
38. **Zweig, G., Sherma, J., 1986.** Analytical methods for pesticides and plant growth regulators. Principles, Statistics and Applications, Volume XV, Academic Press Inc., California.