

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



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«Παρακολούθηση της υποβάθμισης του εντομοκτόνου thiamethoxam σε τομάτες σε πείραμα αγρού»

Αναστασιάδου Βηθλεέμ

Πτυχιακή διατριβή που υποβλήθηκε στο Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος ως μερική υποχρέωση για τη λήψη του πτυχίου του Γεωπόνου.

ΒΟΛΟΣ, 2008



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ & ΚΕΝΤΡΟ ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.: 6797/1
Ημερ. Εισ.: 07-01-2009
Δωρεά: Συγγραφέας
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ – ΦΠΑΠ
2008
ΑΝΑ

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

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

"Παρακολούθηση της υποβάθμισης του εντομοκτόνου thiamethoxam σε τομάτες σε πείραμα αγρού"

Αναστασιάδου Βηθλεέμ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Τσιρόπουλος Νικόλαος; Αναπληρωτής Καθηγητής Π.Θ., Επιβλέπων Καθηγητής

Χα Αβραάμ, Αναπληρωτής Καθηγητής Π.Θ., Μέλος

Παπαδόπουλος Νικόλαος, Επίκουρος Καθηγητής Π.Θ., Μέλος

Η παρούσα πτυχιακή εργασία αφιερώνεται...

*Στους γονείς μου που είναι πάντα δίπλα μου και με στηρίζουν σε ότι κάνω,
και στο νέο μέλος της οικογένειάς μου που πρόκειται να έρθει στο κόσμο σε λίγους μήνες!*

*Στους φίλους και φίλες μου που ήταν κοντά μου αυτά τα πέντε χρόνια
και ζήσαμε μαζί αξέχαστες στιγμές!*

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Μετά την ολοκλήρωση της παρούσας πτυχιακής μου διατριβής αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα Καθηγητή μου κύριο Τσιρόπουλο Νικόλαο, Αναπληρωτή Καθηγητή του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφερε κατά τη διεξαγωγή του πειράματος και των μετρήσεων, για τον 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 τους κυρίους Παπαδόπουλο Νικόλαο Επίκουρο Καθηγητή και Χα Αβραάμ, Αναπληρωτή Καθηγητή του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για τις χρήσιμες υποδείξεις τους καθώς επίσης και για τον χρόνο που αφιέρωσαν για τη διόρθωση της διατριβής μου.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Λύκα Δημήτριο για την τεχνική υποστήριξη που μου προσέφερε καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου για την ψυχική, οικονομική και ηθική υποστήριξη που μου προσέφεραν όλα τα χρόνια των σπουδών μου και όχι μόνο!!!

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<i>ΠΡΟΛΟΓΟΣ</i>	7
<i>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</i>	8
A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	9
1. <i>ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΟΜΑΤΑΣ</i>	9
1.1 Γενικά.....	9
1.2 Ποικιλίες Τομάτας.....	10
1.3 Εκτάσεις καλλιέργειας τομάτας στην Ευρώπη και στην Ελλάδα.....	11
1.4 Εχθροί και Ασθένειες Τομάτας.....	12
2. <i>ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ</i>	13
2.1 Γενικά.....	13
2.2 Ουσίες Ρυθμιστικές της ανάπτυξης των εντόμων- Μιμητικές ορμονών.....	13
2.2.1 Νεονικοτινοειδή.....	14
2.2.2 Thiamethoxam.....	16
2.2.3 Imidacloprid.....	17
3. <i>ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΟΥΣ</i>	19
3.1 Γενικά.....	19
3.2 Προσδιορισμός των υπολειμμάτων-Μέγιστα Αποδεκτά Όρια Υπολειμμάτων	21
3.3 Πειράματα Υπολειμμάτων	21
3.3.1 Καμπύλες Αποικοδόμησης	22
3.4 Σχετικές Νομοθεσίες.....	23
3.5 Μέτρηση Υπολειμμάτων Φυτοπροστατευτικών Προϊόντων.....	24
3.5.1 Δειγματοληψία.....	24
3.5.2 Επεξεργασία δειγμάτων και Αποθήκευση.....	25
3.5.3 Επιλογή αναλυτικής μεθόδου.....	26
3.6 Αναλύσεις Υπολειμμάτων.....	26
3.7 Εκτέλεση Μεθόδου Ανάλυσης.....	28
3.7.1 Προσδιορισμός υπολειμμάτων.....	29
3.8 Εκτίμηση Αποτελεσμάτων.....	31

B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	32
1. <i>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</i>	32
1.1 Πειραματικός αγρός.....	32
1.2 Δειγματοληψία.....	32
1.3 Υλικά και Χημικά Αντιδραστήρια.....	33
2. <i>ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ</i>	34
2.1 Διαδικασία Εκχύλισης Φύλλων.....	34
2.2 Διαδικασία Εκχύλισης Καρπών	34
2.3 Διαδικασία καθαρισμού (clean up) με χρήση φουσιγγίων SPE.....	35
3. <i>ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ</i>	35
3.1 Ποιοτική Ανάλυση.....	36
3.2 Ποσοτική Ανάλυση.....	36
3.3 Έλεγχος και αξιολόγηση της αναλυτικής μεθόδου.....	38
3.4 Μεταβολή υπολειμμάτων του thiamethoxam σε καρπούς και σε φύλλα τομάτας υπαίθριας καλλιέργειας.....	40
3.5 Συμπεράσματα.....	44
<i>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</i>	46

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία, στα πλαίσια υλοποίησης της πτυχιακής μου διατριβής, πραγματοποιήθηκε με στόχο την παρακολούθηση της πορείας των υπολειμμάτων του Thiamethoxam σε καρπούς τομάτας σε πείραμα αγρού σε υπαίθρια καλλιέργεια που αναπτύχθηκε με τις συνήθειες καλλιεργητικές φροντίδες και με τις κλιματολογικές συνθήκες της χώρας μας. Το Thiamethoxam, είναι εντομοκτόνο το οποίο ανήκει στην νέα οικογένεια των νεονικοτινοειδών και χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση εντόμων αγροτικής, αλλά και υγειονομικής σημασίας, σε υπαίθριες αλλά και θερμοκηπιακές καλλιέργειες διαφόρων ειδών λαχανικών, όπως και της τομάτας. Το Thiamethoxam μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως προϊόν επεξεργασίας σπόρου, εφαρμογής εδάφους ή εφαρμογής φυλλώματος. Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκε ως εντομοκτόνο φυλλώματος, σε μορφή βρέξιμων κόκκων και στις συνιστώμενες δόσεις.

Η διεξαγωγή του πειραματικού σταδίου πραγματοποιήθηκε το καλοκαίρι του 2007 στο Αγρόκτημα του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας σε υπαίθρια καλλιέργεια τομάτας, ενώ οι αναλύσεις για την παρακολούθηση των υπολειμμάτων στους καρπούς αλλά και τα φύλλα τομάτας έγιναν στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας και Γεωργικής Φαρμακολογίας του Τμήματος Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος της Γεωπονικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Το κείμενο της εργασίας έχει οργανωθεί σε δύο μέρη, το Θεωρητικό μέρος και στο Πειραματικό. Στο θεωρητικό μέρος (Κεφ.1) δίνονται γενικές πληροφορίες για την καλλιέργεια της τομάτας, δίνονται πληροφορίες για τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα (Φ.Π.) και το τρόπο δράσης τους και μία ιδιαίτερη αναφορά στην οικογένεια των νεονικοτινοειδών και του παρασκευάσματος που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα (Κεφ.2). Επίσης γίνεται μνεία για την επικινδυνότητα των υπολειμμάτων των Φ.Π. και τις μεθόδους προσδιορισμού τους (Κεφ.3) και γίνεται αναφορά στις σχετικές νομοθεσίες με τα υπολείμματα Φ.Π. στα γεωργικά προϊόντα (Κεφ.4).

Στο πειραματικό μέρος παρουσιάζεται η πορεία του πειράματος που ακολουθήθηκε, η αναλυτική μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των υπολειμμάτων του thiamethoxam στα συλλεχθέντα δείγματα καρπών και φύλλων και τέλος, γίνεται παρουσίαση, σχολιασμός και συζήτηση για την πορεία του thiamethoxam στους καρπούς και στα φύλλα των φυτών τομάτας της καλλιέργειάς μας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της μελέτης ήταν η παρακολούθηση της πορείας των υπολειμμάτων του εντομοκτόνου thiamethoxam σε καρπούς τομάτας σε πείραμα αγρού που πραγματοποιήθηκε στο Αγρόκτημα του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στο Βελεστίνο σε υπαίθρια καλλιέργεια τομάτας, το Σεπτέμβριο του 2007 με σκοπό τον προσδιορισμό των υπολειμμάτων του thiamethoxam σε καρπούς αλλά και φύλλα φυτών τομάτας, σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα μετά τον ψεκασμό της καλλιέργειας με το εμπορικό σκεύασμα Actara 25 WG (thiamethoxam 25%) στη συνιστώμενη δόση.

Για τον προσδιορισμό των υπολειμμάτων χρησιμοποιήθηκε σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) με ανίχνευση του thiamethoxam στα 255nm μετά την επεξεργασία των δειγμάτων καρπών και φύλλων τομάτας με εκχύλιση με υδατομεθανολικό διάλυμα με ομοιογενοποίηση σε Ultra Turrax, καθαρισμό με κατανομή σε διχλωρομεθάνιο και αλλαγή διαλύτη σε ακετονιτρίλιο νερό 1:9. Η ορθότητα και η ακρίβεια της αναλυτικής μεθόδου προσδιορισμού υπολειμμάτων thiamethoxam σε φυτικούς ιστούς τομάτας ελέγχθηκαν με πειράματα ανακτήσεων. Οι ανακτήσεις που προέκυψαν κυμαίνονταν για τη τομάτα από 97-105 % με σχετική τυπική απόκλιση 4-10%, και για τα φύλλα από 94-107% με σχετική τυπική απόκλιση 8-13 %, τιμές ικανοποιητικές για τις αναλύσεις υπολειμμάτων. Σαν όριο ποσοτικού προσδιορισμού (Limit of Quantification – LOQ) της μεθόδου θεωρήθηκε το 0,02 mg/Kg για τα δείγματα του φυτικού ιστού (φύλλα και καρποί).

Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν για τις συνθήκες του πειράματος μας φαίνεται οι τιμές των υπολειμμάτων του thiamethoxam να παρουσιάζουν μια πτωτική πορεία στους καρπούς της τομάτας, η οποία οδηγεί τη μείωση των αρχικών αποθέσεων στο μισό περίπου σε επτά ημέρες μετά την επέμβαση με το εντομοκτόνο σκεύασμα. Αναλυτικότερα, στα φύλλα μετρήθηκαν υπολείμματα thiamethoxam από 12.1 mg/kg (0 ημέρα), μέχρι 7,1 mg/kg στις 7 ΗΑΕ και 3.2 mg/kg την τελευταία ημέρα δειγματοληψίας (14 ΗΑΕ). Στους καρπούς οι συγκεντρώσεις των υπολειμμάτων μειώνονται σταθερά στο χρόνο από 0,09 mg/kg (0 ημέρα) μέχρι 0,07 mg/kg στις 7 ΗΑΕ και 0,05 mg/kg την τελευταία ημέρα δειγματοληψίας (14 ΗΑΕ).

Σε καμία περίπτωση κατά τη διάρκεια του πειράματος μας τα υπολείμματα του thiamethoxam στους καρπούς τομάτας δεν υπερέβησαν την τιμή του εθνικού και κοινοτικού Ανώτατου Επιτρεπτού Ορίου (MRL), που είναι 0.2 mg/kg, ακόμη και λίγες ώρες μετά την εφαρμογή του σκευάσματος.

Α. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Καλλιέργεια Τομάτας

1.1 Γενικά

Η τομάτα είναι κατά κανόνα ετήσιο λαχανικό, αρκετά διαδεδομένο και πολύ δημοφιλές. Η δημοτικότητά της ποικίλλει στις διάφορες χώρες, αλλά είναι πολύ λίγες αυτές στις οποίες δεν καλλιεργείται με κάποια από τις μορφές καλλιέργειάς της. Καλλιεργείται για τον καρπό της, ο οποίος καταναλώνεται ώριμος, νωπός, αποξηραμένος, σε άλμη, ακέραιος ή σε πολτό. Ακόμη και οι άωροι καρποί (τοξικοί, εάν καταναλωθούν νωποί) συντηρούνται σε άλμη ή ξύδι (τουρσί). Είναι γνωστοί οι φόβοι που επικρατούσαν μέχρι τον 20^ο αιώνα στις περιοχές της Μεσογείου, Β. Ευρώπης και στην Β. Αμερική, ότι οι τομάτες περιέχουν ουσίες τοξικές, γεγονός που εμπόδιζε την κατανάλωσή τους. Οι φόβοι αυτοί οφείλονταν στην παρουσία δηλητηριωδών γλυκοαλκαλοειδών στα φύλλα και στους καρπούς άλλων μελών της ίδιας οικογένειας. Αυτό ξεπεράστηκε στις αρχές του 20^{ου} αιώνα, και από τότε η κατανάλωση αυξήθηκε σημαντικά.

Οι λόγοι που καθιστούν την τομάτα δημοφιλές λαχανικό είναι πολλοί. Οι σπουδαιότεροι είναι ότι εφοδιάζει τον ανθρώπινο οργανισμό με βιταμίνες, και ιδίως τη βιταμίνη C, έχει ελκυστικό χρώμα και ιδιαίτερο άρωμα, γεγονός που την καθιστά αρεστή στη διατροφή. Ποικιλίες της έχουν εγκλιματιστεί σε ένα 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 περιόδους "εκτός εποχής" καλλιεργείται σε θερμοκήπια και άλλες κατασκευές υπό προστασία. Η μορφή καλλιέργειας της τομάτας ποικίλει από την εκτατική έως την εντατική.



1.2 Ποικιλίες Τομάτας

Οι ποικιλίες ή καλύτερα υβρίδια που καλλιεργούνται στα διακρίνονται βασικά σε δύο κατηγορίες:

- α) αυτές που η ανάπτυξη τους σταματά από μόνη τους όταν φθάσουν σε ένα ορισμένο στάδιο (determinate) και
- β) τις ποικιλίες ή υβρίδια που αναπτύσσονται συνέχεια όσο διαρκεί η καλλιέργεια (indeterminate). Στην Ελλάδα καλλιεργούνται κυρίως οι ποικιλίες και υβρίδια που ανήκουν στη δεύτερη κατηγορία.

Υβρίδια και ποικιλίες τομάτας κυκλοφορούν σήμερα στο εμπόριο κατά εκατοντάδες. Στη δεύτερη κατηγορία μπορούμε να διακρίνουμε 4 υποκατηγορίες, ανάλογα με το μέγεθος του καρπού:

- i) Πολύ μικρός καρπός βάρους 10-20 g γνωστός με το όνομα Cherry.
- ii) μικρόκαρπες με βάρος καρπού μεταξύ 60-100 g
- iii) μεσόκαρπες με βάρος καρπού μεταξύ 100-150 g και
- iv) μεγαλόκαρπες με βάρος καρπού 150 g και άνω.

Στην Ελλάδα προτιμούνται οι μεγαλόκαρπες ποικιλίες και υβρίδια. Από τις πολυάριθμες ποικιλίες και υβρίδια που έχουν εισαχθεί και δοκιμαστεί στην Ελλάδα, σήμερα καλλιεργούνται τα πιο κάτω:

- Dombo
- Concreto F1
- Caruso F1
- Jolly F1
- Fantastic F1
- Vision F1
- Angela F1
- Daniella F1
- Garnet F1
- Preveza F1

1.3 Εκτάσεις καλλιέργειας τομάτας στην Ευρώπη και στην Ελλάδα

Η τομάτα καλλιεργείται σε όλα τα μήκη και πλάτη του κόσμου. Στην Ευρώπη, την Ασία και την Αμερική καλλιεργείται το μεγαλύτερο ποσοστό.

Ήπειρος	Έκταση ⁽¹⁾ (X 1.000 στρ.)	Παραγωγή ⁽¹⁾ (X 1.000 τόν.)	Ποσοστό % συνόλου παραγωγής
Αφρική	3.820	5.380	9,98
Β.&Κ. Αμερική	3.320	10.502	19,48
Ν. Αμερική	1.330	3.179	5,90
Ασία	7.480	12.966	24,13
Ευρώπη	4.630	14.269	26,47
Ωκεανία	110	266	0,50
Ε.Σ.Σ.Δ.	4.100	7.300	13,54
Παγκόσμια	24.790	53.862	100.0

Χώρες Ε.Ε.	2.671	8.233	15,27
Ελλάδα	440	1.918	3,55

Γεωγραφικό διαμέρισμα	Καλλιεργ. Έκταση %	Παραγωγή (τόνοι)	Αποδόσεις (κιλά / στρ.)
Αν. Μακεδονία-Θράκη	3,52	3.454	7,0
Δ. – Κ. Μακεδονία	15,85	18.395	8,3
Ήπειρος	8,7	10.516	8,7
Θεσσαλία	2,36	2.431	7,4
Πελοπόννησος-Δ.Στερεά	23,23	33.443	10,4
Αττική – Νήσοι	3,00	3.354	8,0
Κρήτη	43,30	53.100	8,8
Σύνολο χώρας	100,0	124.693	9,0

*Για την χρονική περίοδο 2003-2006

Πηγή: Αγρότυπος

1.4 Εχθροί και Ασθένειες Τομάτας

1. Νηματώδεις- *Meloidogyne* spp και *Heterodera rostochiensis*
2. Σιδηροσκώληκες- *Agriotes obscurus*
3. Αφίδες- διάφορα είδη
4. Θρίπες- *Thrips tabaci*
5. Φυλλορρύκτης της τομάτας- *Liriomyza solani*
6. Τετράνυχος- *Tetranychus urticae*
7. Αλευρώδεις- *Trialeurodes vaporariorum*
8. Αδρομυκώσεις- *Verticillium dahlia*, *F. Albo-atrum*, *Fusarium oxysporum*
9. Καστανή σήψη των ριζών ή φελλώδης σηψιρριζία- *Pyrenochaeta lycopersici*
10. Ντιντιμέλλα- *Didymella lycopersici*
11. Φαιά σήψη- *Botrytiw cinerea*
12. Όψιμος περονόσπορος- *Phytophthora infestans*
13. Πρώιμος περονόσπορος- *Alternaria solani*
14. Κλαδοσπορίαση- *Cladosporium fulvum* και *Fulvia fulva*
15. Ωίδιο- *Leveillula taurica*
16. Σκληρωτινίαση- *Sclerotinia sclerotiorum*
17. Βακτηριακός καρκίνος- *Corynebacterium michiganense*
18. Μωσαϊκό του καπνού- TMV
19. Κίτρινο καρούλιασμα των φύλλων- TYLCV

2. Φυτοπροστατευτικά Προϊόντα

2.1 Γενικά

Πολλές φορές ο φυσικός περιορισμός, είτε με τη χρήση παγίδων ή άλλων μέσων, δεν είναι αρκετός ώστε να περιορίσει τα βλαβερά έντομα στο βαθμό που επιθυμούμε. Για το λόγο αυτό, απαιτείται η λήψη και άλλων μέτρων, τα οποία και αποτελούν την καταπολέμηση. Μία τέτοια μέθοδος καταπολέμησης είναι και η χημική, στην οποία χρησιμοποιούνται τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα.

Ως Φυτοπροστατευτικό Προϊόν (Φ.Π.) καλούμε κάθε ουσία ή μίγμα ουσιών συμπεριλαμβανομένων και επεξεργασμένων ή μη φυτικών προϊόντων, δυναμένη να χρησιμοποιηθεί ως μέσον καταπολέμησης των εχθρών και των ασθενειών των φυτών ή να βελτιώσει την αποτελεσματικότητα των εν λόγω ουσιών (Νόμος, 721/1977).

Τα Φ.Π. διατίθενται σε σκευάσματα με διάφορες μορφές (Παπαδοπούλου-Μουρκίδου, 1991), όπως:

- Υγρά σκευάσματα
- Ξηρά σκευάσματα
- Καπνογόνα
- Αεροζόλ
- Λοιπά σκευάσματα (δενδροκομικοί κηροί κ.λ.π.)

Πρέπει να τονίσουμε βέβαια πως από όλους τους παράγοντες μόλυνσεως, τα φυτοφάρμακα απασχολούν πλέον καθημερινά όλους τους ανθρώπους καταναλωτές, χρήστες, πολιτικούς, οικολόγους, οικονομολόγους, βιομηχάνους παραγωγής φυτοφαρμάκων ή επεξεργασμένων τροφών, ερευνητικά ιδρύματα, ιατρούς κ.τ.λ. είτε ζουν στις ανεπτυγμένες ή στις αναπτυσσόμενες χώρες. Είναι πλέον παγκόσμιο γεγονός αλλά και πρόβλημα αφού έχει διχάσει την επιστημονική κοινότητα, τους πολιτικούς, τους περιβαλλοντολόγους και γενικά τους παγκόσμιους οργανισμούς που είναι υπεύθυνοι για το περιβάλλον, τη διατροφή και την ομαλή ανάπτυξη του πληθυσμού του Πλανήτη μας.

2.2 Ουσίες Ρυθμιστικές της ανάπτυξης των εντόμων-Μιμητικές ορμονών

Στην προσπάθεια να βρεθούν εντομοκτόνες ουσίες με λιγότερα μειονεκτήματα και προ παντός λιγότερο επικίνδυνες από τα ως τώρα χρησιμοποιούμενα σε μεγάλη κλίμακα

ανόργανα και οργανικά συνθετικά εντομοκτόνα, αναζητήθηκαν ουσίες που να ζημιώνουν ζωτικούς για τα έντομα φυσιολογικούς μηχανισμούς που δεν τους έχουν τα Σπονδυλωτά και τα Θηλαστικά. Έτσι λοιπόν, δοκιμάστηκαν ορισμένες ορμόνες ή ουσίες, οι οποίες έχουν παρόμοια ή πολλές φορές και όμοια με ορμόνες του οργανισμού οι οποίες ελέγχουν φυσιολογικούς μηχανισμούς, όπως η έκδυση, η μεταμόρφωση κ.α. Αποτέλεσμα αυτής της προσπάθειας είναι να χρησιμοποιούνται ουσίες-ρυθμιστές της ανάπτυξης των εντόμων ως μέσα καταπολέμησης.

Τέτοιες ουσίες είναι και οι μιμητικές ορμόνες από τις ορμόνες αυτές ελπίδες πρακτικής χρησιμότητας στην καταπολέμηση έδωσαν πρώτα οι νεανικές ορμόνες και άλλες ουσίες παρόμοιες με αυτές δράσεις. Όταν η νεανική ορμόνη είναι παρούσα, η προνύμφη κατά την έκδυση δίνει πάλι προνύμφη του επόμενου σταδίου, ενώ όταν η νεανική ορμόνη λείπει, από προνύμφη θα βγει νύμφη και από νύμφη ενήλικο. Όταν λοιπόν στο τελευταίο προνυμφικό στάδιο εφαρμόσουμε νεανική ορμόνη, η νύμφη (pupa) που θα προκύψει θα έχει ορισμένα προνυμφικά χαρακτηριστικά. Θα έχουμε δηλαδή μία ενδιάμεση μεταξύ προνύμφης και νύμφης μορφή, ένα τέρας, που δεν ωριμάζει και που δεν μπορεί να εξελιχθεί και να δώσει κανονικό ενήλικο. Κάτι ανάλογο συμβαίνει και όταν επέμβουμε στο νυμφικό στάδιο. Αλλά και ουσίες ανταγωνιστικές των νεανικών ορμονών μπορούν να διαταράξουν τη φυσιολογία του εντόμου σε βαθμό που να το κάνουν να εξελιχθεί και να ζήσει.

Πλεονεκτήματα των μιμητικών των ορμονών των εντόμων ουσιών που δοκιμάστηκαν ως τώρα, είναι η έλλειψη τοξικότητας για τα θερμόαιμα ζώα. Μειονεκτήματα είναι ότι απαιτούν εφαρμογή σε ορισμένο στάδιο του εντόμου. Αυτό μειώνει την αποτελεσματικότητα τους για πληθυσμούς ανομοιογενείς ως προς την ηλικία. Οι μιμητικές των νεανικών ορμονών παρατείνουν το προνυμφικό στάδιο που για πολλά είδη εντόμων είναι το βλαβερό στάδιο. Γι' αυτό πιστεύεται ότι οι μιμητικές των νεανικών ορμονών θα έχουν πρακτική αξία κυρίως για είδη εντόμων όπου το ενήλικο κάνει τη ζημία και η προνύμφη είναι εκτεθειμένη ώστε να μπορεί να έρθει σε επαφή με την ουσία.

2.2.1 Νεονικοτινοειδή

Τα νεονικοτινοειδή είναι η νεότερη σημαντική κατηγορία εντομοκτόνων και είναι τα πρώτα εντομοκτόνα που παρήχθησαν από φυτά. Η ανακάλυψή τους ως σημαντικά νέα εντομοκτόνα αντιπροσωπεύει ένα κύριο σημείο στην έρευνα των εντομοκτόνων κατά τη

διάρκεια των προηγούμενων τριών δεκαετιών. Το πρώτο εντομοκτόνο που ανήκει στην οικογένεια αυτή εισήχθη στην αγορά το 1991 και ήταν το imidacloprid. Κατόπιν ακολούθησαν και άλλα εντομοκτόνα που ανήκουν στην ίδια χημική κατηγορία και έχουν τον ίδιο τρόπο δράσης, όπως το nitenpyram, το thiacloprid, το nitiazine, το thiamethoxam, το acetamiprid κ.α.

Οι παγκόσμιες ετήσιες πωλήσεις των νεονικοτινοειδών είναι περίπου ένα δισεκατομμύριο δολάρια και αποτελούν το 11%-15% της συνολικής αγοράς εντομοκτόνων, δηλαδή αρκετά παραπάνω από 600 εκατομμύρια ευρώ ετησίως, με το imidacloprid να είναι πρώτο σε πωλήσεις παγκοσμίως. Σαν διασυστηματικά εντομοκτόνα αντικαθιστούν όλο και περισσότερο τα οργανοφωσφορικά και τα καρβαμιδικά στον έλεγχο μυζητικών εντόμων.

Η ανάπτυξη των νεονικοτινοειδών παρέχει στους καλλιεργητές ένα χρήσιμο εργαλείο για μερικά από τα πιο επικίνδυνα έντομα παγκοσμίως, όπως τα Ημίπτερα και τα Κολεόπτερα, συμπεριλαμβανομένων ειδών στα οποία έχει αναπτυχθεί ανθεκτικότητα από προηγούμενη χρήση άλλων προϊόντων.

Τα νεονικοτινοειδή έχουν άριστη αποτελεσματικότητα και έχουν καθιερωθεί ως βασικά συστατικά των εντομοκτόνων λόγω της εκλεκτικότητάς τους, η οποία οφείλεται στον τρόπο δράσης τους. Τα νεονικοτινοειδή παρέχουν προστασία ευρέος φάσματος από μυζητικά και μασητικά έντομα. Χρησιμοποιούνται πρώτιστα ως διασυστηματικά εντομοκτόνα στις καλλιέργειες και εφαρμόζονται σε σπόρους, στο χώμα ή στο φύλλωμα. Απορροφώνται εύκολα από τα φυτά και ενεργούν γρήγορα σε χαμηλές δόσεις για μυζητικά έντομα (π.χ. αφίδες και τζίτζικια) σημαντικών καλλιεργειών. Τα νεονικοτινοειδή είναι λιγότερο αποτελεσματικά ως εντομοκτόνα επαφής και για τον έλεγχο των προνυμφών λεπιδοπτέρων.

Μέχρι σήμερα, η ανθεκτικότητα που εμφανίζουν τα έντομα στα νεονικοτινοειδή είναι σχετικά χαμηλή και έχουν αποδειχθεί ελαστικά στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας ειδικά για αφίδες, όπως η *Myzus persicae* και το *Phorodon humuli*. Ως αποτέλεσμα του τρόπου δράσης των νεονικοτινοειδών, υπάρχει ελάχιστη ή καθόλου διασταυρωτή ανθεκτικότητα σε παλαιότερες κατηγορίες εντομοκτόνων, όπως τα πυρεθροειδή, οι χλωριωμένοι υδρογονάνθρακες, τα οργανοφωσφορικά (OPs) και τα καρβαμιδικά, τα οποία αντικαθίστανται σήμερα από τα νεονικοτινοειδή για τον έλεγχο εντόμων σε πολλές σημαντικές καλλιέργειες.

Τα νεονικοτινοειδή είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικά και ταχείας δράσης, γεγονός που μειώνει τον κίνδυνο μετάδοσης ασθενειών. Διατυπώνεται ο ισχυρισμός ότι, για την

καταπολέμηση του αλευρώδους, τα νεονικοτινοειδή είναι τα μόνα διαθέσιμα αυτή τη στιγμή αποτελεσματικά εντομοκτόνα. Τα άλλα προϊόντα που έχουν εγκριθεί για τη χρήση κατά του αλευρώδους έχουν είτε προβλήματα αποτελεσματικότητας (πρόκειται για παλαιότερα προϊόντα στα οποία υπάρχει ήδη αντοχή στο φάρμακο) ή ταχύτητας εξολόθρευσης.

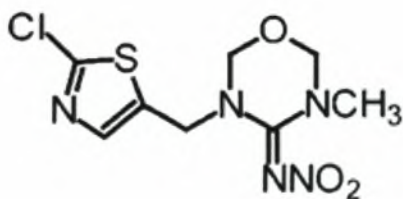
Επίσης τα νεονικοτινοειδή καθίστανται εκλεκτικά ως προς τη δράση τους στα ασπόνδυλα. Εκτενείς τοξικολογικές μελέτες ασφαλείας δεν έχουν καταδείξει ουσιαστικά καμία επίδραση στα σπονδυλωτά και τα θηλαστικά και φαίνεται ότι δεν παρουσιάζουν για αυτά κανένα κίνδυνο.

Σε πειράματα που έγιναν με διάφορα φάρμακα της οικογένειας των νεονικοτινοειδών προέκυψε ότι το acetamiprid, το imidacloprid και το thiacloprid είναι τα πιο τοξικά για τα πουλιά, ενώ το thiacloprid είναι τοξικό για τα ψάρια. Διάφορα νεονικοτινοειδή είναι επιβλαβή στις μέλισσες, είτε με άμεση επαφή είτε με κατάποση, αλλά τα πιθανά προβλήματα μπορούν να ελαχιστοποιηθούν ή να αποφευχθούν με τη μεταχείριση των σπόρων και την αποφυγή εφαρμογής ψεκασμών σε ανθισμένες καλλιέργειες (Tomizana *et al*, 2005).

2.2.2 Thiamethoxam

Το thiamethoxam συντέθηκε για πρώτη φορά το 1991. Το χημικό του όνομα είναι 3-(2-chloro-thiazol-5-ylmethyl)-5-methyl-[1,3,5]oxadiazinan-4-ylidene-*N*-nitroamine, ο χημικός τύπος είναι $C_8H_{10}ClN_5O_3S$, ενώ ο μοριακός τύπος φαίνεται στην **Εικόνα 1**.

Το Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων στις 16-1-2007 με ανακοίνωση του εγκρίνει την διάθεση στην αγορά του φυτοπροστατευτικού προϊόντος Actara 25WG, το οποίο περιέχει τη δραστική ουσία thiamethoxam σε ποσοστό 25% καθώς και βοηθητικές ουσίες σε ποσοστό 74,5 %. Η παρασκευάστρια εταιρία της δραστικής ουσίας είναι η Syngenta Crop Protection AG στην Ελβετία.



Εικόνα 1. Ο μοριακός τύπος του εντομοκτόνου thiamethoxam.

Το thiamethoxam είναι δραστικό έναντι μυζητικών εντόμων, αποφυλλωτικών και εδαφοδίαιτων εντόμων. Δραστικό και σε χαμηλές δόσεις το προϊόν αυτό εξασφαλίζει τη γρήγορη θανάτωση. Το thiamethoxam είναι διασυστηματικό εντομοκτόνο ευρέως φάσματος για εφαρμογή στο έδαφος με ριζοπότισμα ή μέσω του συστήματος στάγδην άρδευσης, όσο αλλά και στο φύλλωμα με ψεκασμό σε πολλές καλλιέργειες. Όσον αφορά τον ψεκασμό φυλλώματος συνίσταται η πολύ καλή κάλυψη του φυλλώματος και η αποφυγή ψεκασμών κατά την διάρκεια των ζεστών ωρών της ημέρας ή όταν αναμένονται βροχές μέσα στις επόμενες τέσσερις ώρες.

Το thiamethoxam καταπολεμά μυζητικά έντομα, όπως αφίδες και αλευρώδεις σε κηπευτικά θερμοκηπίου και υπαίθρου, αφίδες σε πολυετείς καλλιέργειες (εσπεριδοειδή, πυρηνόκαρπα, γιγατόκαρπα), αφίδες σε ετήσιες καλλιέργειες (καπνός, βαμβάκι και καλλωπιστικά φυτά), τον δορυφόρο της πατάτας (*Lepinotarsa decemlineata*), τα τζιτζικάκια στο αμπέλι και τον φυλλοκνίστη των εσπεριδοειδών (*Phyllocnistis citrella*). Δρα στα έντομα τόσο με επαφή (διαπερνά την επιδερμίδα των εντόμων), όσο και από στομάχου με κατάποση (μέσω των φυτικών χυμών), επιδρώντας στο νευρικό τους σύστημα. Είναι ισχυρά διασυστηματικό, απορροφάται από τα φύλλα και τις ρίζες, μετακινείται μέσω του αγγειακού συστήματος και μεταφέρεται σε όλα τα μέρη του φυτού. Είναι πολύ αποτελεσματικό και προσφέρει μεγάλη διάρκεια δράσης, ιδιαίτερα όταν εφαρμόζεται από εδάφους με ριζοπότισμα.

Η tMRL (mg/kg) για το thiamethoxam στην τομάτα στην Ελλάδα είναι 0,2mg/kg, όπως και στις υπόλοιπες Ευρωπαϊκές χώρες.

Τέλος, το Actara έχει χαμηλή τοξικότητα για τα θηλαστικά και δεν είναι ερεθιστικό για τα μάτια και το δέρμα. Δεν είναι τοξικό για τα πουλιά, είναι, όμως, πολύ τοξικό για τους υδρόβιους οργανισμούς και τις μέλισσες.

2.2.3 Imidacloprid

Το Imidacloprid χρειάστηκε μόνο 6 χρόνια για να αναπτυχθεί. Διατίθεται στην αγορά από το 1991 με τις επωνυμίες Gaucho, Confidor, Admire και Provado. Πωλείται σε περισσότερες από 80 χώρες και χρησιμοποιείται σε περισσότερα από 60 διαφορετικά είδη καλλιεργειών. Το Imidacloprid είναι ένα ενεργό συστατικό με διασυστηματική δράση. Ο όρος αυτός σημαίνει ότι η ουσία είναι ενεργή μέσα στο φυτό, σε αντίθεση με τις μη διασυστηματικές ουσίες που εφαρμόζονται στην επιφάνεια του φυτού. Το Imidacloprid

μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως προϊόν επεξεργασίας σπόρου, εφαρμογής εδάφους ή εφαρμογής φυλλώματος. Στην επεξεργασία σπόρου, ο σπόρος καλύπτεται με τη δραστική ουσία, που κινείται μέσα στο αναπτυσσόμενο φυτό και το προστατεύει έναντι των προσβολών από παράσιτα στα πρώτα στάδια της ανάπτυξης. Όταν εφαρμόζεται στην επεξεργασία εδάφους, η δραστική ουσία μεταφέρεται από το έδαφος στις ρίζες και από εκεί στα φύλλα μέσω του χυμού. Στην επεξεργασία σπόρου και εδάφους, το Imidacloprid προστατεύει τις καλλιέργειες κατά τη διάρκεια των ευπαθέστερων φάσεων της ανάπτυξής τους. Όταν εφαρμόζεται στην επεξεργασία φυλλώματος, το Imidacloprid προστατεύει τα φυτά από τα έντομα, ακόμη και με την παρουσία μικρών ποσοτήτων της δραστικής ουσίας στο φύλλο. Παρεμποδίζει τη λήψη τροφής και επιβραδύνει το ρυθμό αναπαραγωγής των επιβλαβών οργανισμών. Το Imidacloprid χρησιμοποιείται επίσης σε νέους τομείς όπως η επεξεργασία ριζών. Στην επεξεργασία ριζών το Imidacloprid εφαρμόζεται στον κορμό του δένδρου, όπου η δραστική ουσία κατανέμεται με τον ανερχόμενο χυμό. Το Imidacloprid είναι πολύ αποτελεσματικό και με ευρύ φάσμα δράσης. Παρέχει προστασία μακράς διάρκειας για μερικές εβδομάδες ή μήνες, κυρίως έναντι μυζητικών εντόμων όπως οι αφίδες, τα τζιτζίκια της μελίας, οι αλευρώδεις, ορισμένοι θρίπες, τα κοκκοειδή έντομα, και οι ψευδόκοκκοι. Είναι δραστικό έναντι ορισμένων μασητικών εντόμων, όπως διάφορα είδη κολεόπττερων (σκαθάρια όπως η δορυφόρος μύγα του Colorado και οι βρούχοι), μερικά δίπτερα (μύγες) και ενός περιορισμένου αριθμού λεπιδοπτέρων (φυλλοδέτες). Το Imidacloprid δεν δρα έναντι των νηματωδών (έντομα εδάφους) ή των ακάρεων (μυζητικά έντομα). Το Imidacloprid έχει ικανοποιητική τοξικολογική συμπεριφορά και γίνεται ιδιαίτερα καλά ανεκτό από τα φυτά. Η διασυστηματική του δράση προφυλάσσει τους επωφελείς οργανισμούς.

3. Υπολειμματικότητα Φυτοπροστατευτικών Προϊόντων και Μέθοδοι Προσδιορισμού τους

3.1 Γενικά

Τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται στη γεωργία, για να εγκριθούν ως κατάλληλα και ασφαλή έχουν μελετηθεί εις βάθος, τόσο από απόψεως τοξικολογικής και επιδράσεως στο περιβάλλον όσο και από απόψεως καρκινογένεσης, τερατογένεσης και μεταλλαξιγένεσης, επιδράσεως επί της πανίδας του εδάφους (σκώληκες κ.τ.λ.), μολύνσεως των επιφανειακών και των υπόγειων υδάτων και τέλος έχει παρακολουθηθεί η αποικοδόμησή τους σε άλλα μόρια (μεταβολίτες) και ο χρόνος διάρκειας ζωής τους στο περιβάλλον. Οι δόσεις χρήσεις των φυτοφαρμάκων επί των φυτών περιέχουν ένα μεγάλο συντελεστή ασφάλειας τόσο για τον άνθρωπο και τα θηλαστικά γενικότερα όσο και για το περιβάλλον.

3.2 Προσδιορισμός των υπολειμμάτων-Μέγιστο Όριο Υπολειμμάτων

Ως υπολειμματικότητα φυτοπροστατευτικών προϊόντων ορίζουμε όλες εκείνες τις ουσίες ή μίγματα που βρίσκονται στην τροφή των ανθρώπων ή των ζώων, τα οποία έχουν παραμείνει από τη χρήση Φ.Π. Στην κατηγορία αυτή μπορεί να περιλαμβάνονται και ουσίες που είναι προϊόντα διάσπασης, μεταβολισμού ή χημικής αντίδρασης εφόσον είναι τοξικολογικά σημαντικές (FAO, 1981). Έτσι λοιπόν κατά τις διαδικασίες αποδόμησης των Φ.Π. σχηματίζονται χημικές ενώσεις οι οποίες μπορεί να έχουν μικρότερη ή μεγαλύτερη τοξικότητα σε σύγκριση με τις ενώσεις από τις οποίες και προήλθαν. Ένας όρος που μας δίνει μία εκτίμηση της τοξικότητας για κάθε ουσία είναι η Ημερήσια Αποδεκτή Δόση (Acceptable Daily Intake-ADI) και ορίζεται ως η ποσότητα της ουσίας σε mg/kg σωματικού βάρους ανά ημέρα που μπορεί να καταναλωθεί ένας άνθρωπος ή ζώο για όλη του τη ζωή χωρίς βλάβη της υγείας με βάση τα δεδομένα της επιστήμης. Για τα περισσότερα φυτοφάρμακα που κυκλοφορούσαν προ του 1991 στην Ε.Ε. και υποχρεωτικά σε όσα παλαιά ή νέα εγκρίνονται μετά τις νέες οδηγίες της Ε.Ε., έχουν θεσπισθεί τα ανώτατα επιτρεπόμενα όρια υπολειμμάτων (MRL) για κάθε καλλιέργεια στην οποία επιτρέπεται να χρησιμοποιηθεί το δεδομένο φυτοφάρμακο. Εάν βρεθούν υπολείμματα ανώτερα των επιτρεπόμενων από τη νομοθεσία η τροφή θεωρείται ακατάλληλη προς κατανάλωση. **Μέγιστο Όριο Υπολειμμάτων (MRL)** είναι η μέγιστη



ποσότητα υπολείμματος που αναμένεται κατά την εφαρμογή ενός φυτοπροστατευτικού προϊόντος σύμφωνα με την Ορθή Γεωργική Πρακτική. Η Ορθή Γεωργική Πρακτική είναι ο τρόπος εφαρμογής ενός εγκεκριμένου φυτοπροστατευτικού προϊόντος σε μία καλλιέργεια, ο οποίος εξασφαλίζει την αποτελεσματικότητα στην χρήση, έχοντας ως κύριες παραμέτρους τη δόση ανά επιφάνεια (γρ. ή κ. εκ. φυτοπροστατευτικού προϊόντος ανά στρέμμα ή εκτάριο), τον αριθμό των εφαρμογών του φυτοπροστατευτικού προϊόντος, τον ψεκαστικό όγκο (λίτρα νερού ανά στρέμμα ή εκτάριο), καθώς και την τελευταία επέμβαση πριν τη συγκομιδή (ημέρες). Τα MRL εκφράζονται σε ppm δηλαδή μέρη ανά εκατομμύριο ή 1mg ανά χιλιόγραμμο τροφής. Αυτό σημαίνει ότι αν ευρεθούν π.χ. σε τομάτα 0,05 ppm υπολείμματα ενός φυτοφαρμάκου εγκεκριμένου για χρήση σε τομάτα, τότε ένα χιλμο τομάτας θα περιέχει 0,05mg από το φυτοφάρμακο αυτό. Ο καθορισμός του ανώτατου ορίου υπολειμμάτων ενός φυτοφαρμάκου βασίζεται σε 4 παράγοντες:

- **Ελάχιστη θανατηφόρα δόση (MLD)** : η δόση (σε mg / Kg βάρους πειραματόζωου) που αν χορηγηθεί σε μια ομάδα πειραματόζωων βάρους 1 Kg προκαλεί το θάνατο ενός πειραματόζωου.
- **Μέση θανατηφόρα δόση (LD₅₀)** : η μοναδική δόση (σε mg / Kg βάρους πειραματόζωου) που αναμένεται να προκαλέσει το θάνατο του 50 % των εκτιθέντων πειραματόζωων.
- **Μέση θανατηφόρα συγκέντρωση (LC₅₀)** : η συγκέντρωση της ουσίας η οποία αναμένεται να προκαλέσει το θάνατο κατά την έκθεση σε 50 % των εκτιθέντων πειραματόζωων.
- **Μέση τοξική δόση (TD₅₀)** : η μέση δόση η οποία προκαλεί τοξικά φαινόμενα και ανεπιθύμητες ενέργειες στο 50 % των ελεγχόμενων ατόμων ή πειραματόζωων.

Με τον συντελεστή ασφάλειας 100, καλύπτουμε τις διαφορές μεταξύ ανθρώπου και πειραματόζωων, τις τυχόν διαφορές που υπάρχουν στους ανθρώπους όπως ηλικία, υγιεινή κατάσταση, τυχόν ευαισθησίες κ.τ.λ. και τέλος σε διαφορές ως προς την διατροφή των ανθρώπων. Άλλος π.χ. τρώει πάρα πολλές τομάτες π.χ 0,5 κιλό ανά ημέρα και άλλος ανά μήνα. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Τροφίμων (FAO) και ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) θέσπισαν οριακές τιμές για υπολείμματα γεωργικών φαρμάκων στα νωπά φυτικά προϊόντα. Ο έλεγχος για την τήρηση των ορίων αυτών είναι ζωτικής σημασίας για τη δημόσια υγεία αλλά και για τα κράτη που η οικονομία τους στηρίζεται στα γεωργοκτηνοτροφικά προϊόντα. Σε πολλές περιπτώσεις οι αγρότες, προκειμένου τα προϊόντα τους να είναι ανταγωνιστικά και διαθέσιμα όλο το έτος υπερβαίνουν τις προτεινόμενες

δόσεις φαρμάκων με αποτέλεσμα να τα καθιστούν τελικά μη εμπορεύσιμα λόγω των υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων που περιέχουν. Είναι λοιπόν αναγκαίο, ο αγρότης να ενημερωθεί για τις συνθήκες καλλιέργειας έτσι όπως διαμορφώνονται στις απαιτήσεις της ευρωπαϊκής κυρίως αγοράς.

Τα φυτικά προϊόντα είναι δυνατόν να περιέχουν υπολείμματα φυτοφαρμάκων είτε εξαιτίας της εφαρμογής τους κατά την καλλιέργεια, είτε εξαιτίας της αποθήκευσής τους. Τέλος, πρέπει να τονίσουμε πως το επίπεδο των υπολειμμάτων που παραμένουν στα φυτά μετά την εφαρμογή Φ.Π. εξαρτάται κυρίως από την αρχική συγκέντρωση (δόση), τη μέθοδο εφαρμογής, τη πτητικότητα, τη πυκνότητα του φυτού και τη θέση του στο χώρο, το στάδιο ανάπτυξης και την ταχύτητα αύξησης του φυτού, τις κλιματολογικές συνθήκες καθώς επίσης και το χρονικό διάστημα μεταξύ εφαρμογής του Φ.Π. και του δείγματος.

3.3 Πειράματα υπολειμμάτων

Όπου εφαρμόζεται Ορθή Γεωργική Πρακτική, αυτό που χρειάζεται αμέσως μετά, για τον προσδιορισμό των MRLs, είναι να εφαρμοστεί η εν λόγω ουσία στις συγκεκριμένες καλλιέργειες για τις οποίες έχει έγκριση. Αποβλέπετε στο να προσδιοριστούν με τα πειράματα υπολειμμάτων τα υψηλότερα πιθανά υπολείμματα που είναι δυνατόν να προκύψουν από την εγκεκριμένη χρήση κάποιας ουσίας. Κατά την εκτέλεσή των πειραμάτων αυτών ακολουθούνται οι δυσμενέστερες συνθήκες χρήσεως της ουσίας (χειρίστη περίπτωση, worst case, least favorable trial conditions, critical GAP) που μπορούν να παρουσιαστούν στην πράξη, δηλαδή πολλαπλές επεμβάσεις, μέγιστη δόση εφαρμογής, μικρό χρονικό μεσοδιάστημα μεταξύ τελευταίας επέμβασης και συγκομιδής (PHI, Pre-Harvest Interval). Οι πολλαπλές όμως επεμβάσεις και η μέγιστη δόση θα πρέπει να είναι τεκμηριωμένες και να απορρέουν από στοιχεία για το είδος των καταπολεμούμενων εχθρών και ασθενειών και τη βιολογία της καλλιέργειας (ταχύτητα ωρίμανσης των προϊόντων, συγκομιδή σε ένα ή πολλά χέρια κ.λπ.). Βέβαια η ρύθμιση αυτή, που αποσκοπεί στο να αναγνωρισθούν οι ανάγκες φυτοπροστασίας κάθε χώρας και να διευκολυνθούν οι εμπορικές συναλλαγές, δε σημαίνει ότι πρέπει να ενθαρρύνονται αυτές οι ακραίες περιπτώσεις χρήσεως.

Τα υπολείμματα που προσδιορίζονται στα εδάδιμα μέρη της καλλιέργειας, κατά τη δειγματοληψία που θα γίνει στο μικρότερο μεσοδιάστημα μεταξύ τελευταίας επέμβασης και συγκομιδής, στη μέγιστη συνιστώμενη δόση εφαρμογής και με το μεγαλύτερο αριθμό επεμβάσεων προτείνονται σαν **καταρχήν όρια υπολειμμάτων** (προτεινόμενα MRLs).

Για να είναι αποδεκτά τα Ανώτατα επιτρεπτά όρια υπολειμμάτων που θεσπίζονται από την κοινότητα πρέπει να την αντιπροσωπεύουν ολόκληρη. Για το λόγο αυτό η Ευρώπη έχει χωριστεί σε 2 ζώνες (Βορράς - Νότος). Απαιτούνται επαρκή πειράματα και από τις 2 ζώνες, εάν κάποιος συνδυασμός φυτοπροστατευτικού προϊόντος - γεωργικού προϊόντος έχει έγκριση και σε Βόρειες και σε Νότιες χώρες.

Τα στοιχεία θα προέρχονται από πειράματα δύο τουλάχιστον ετών ή δύο καλλιεργητικών περιόδων. Σε περιοχές όπου οι άλλες παράμετροι είναι κοινές (π.χ. Βόρεια Ευρώπη) ο αριθμός των πειραμάτων είναι το λιγότερο οκτώ. Για μικρές γεωγραφικές περιοχές της Ευρώπης δίνεται η δυνατότητα να μειωθεί ο αριθμός των πειραματικών θέσεων, αλλά να αυξηθεί ο αριθμός των επαναλήψεων σε κάθε τοποθεσία πειραματισμού. Έτσι αντί για 8 πειράματα σε διαφορετικές περιοχές ορίζονται 6 πειράματα με 2 επαναλήψεις ανά περίπτωση ή 4 πειράματα με 4 επαναλήψεις ανά περίπτωση. Επειδή η ανομοιογένεια εμφανίζεται κυρίως μεταξύ διαφορετικών πειραματικών θέσεων μάλλον παρά μεταξύ των επαναλήψεων στην ίδια θέση, στις περιπτώσεις μειωμένου αριθμού πειραμάτων τα αποτελέσματα θα πρέπει να δείχνουν ομοιογένεια μεταξύ των διαφόρων περιοχών για να γίνουν αποδεκτά.

3.3.1 Καμπύλες αποικοδόμησης

Όταν αναμένονται υπολείμματα στο συγκομιζόμενο προϊόν, τότε ένα μέρος των πειραμάτων υπολειμμάτων θα πρέπει να περιλαμβάνει τις καμπύλες αποικοδόμησης (degradation curves) των φυτοπροστατευτικών προϊόντων στην σχετική καλλιέργεια. Με αυτές καταδεικνύεται η επίδραση του χρόνου στη συγκέντρωση των υπολειμμάτων. Θα πρέπει να γίνονται τουλάχιστον 5 δειγματοληψίες στο ίδιο πειραματικό τεμάχιο. Από αυτές η πρώτη γίνεται στο χρόνο μηδέν, λίγη ώρα μετά την ημέρα της εφαρμογής, αμέσως μόλις στεγνώσει το ψεκαστικό υγρό, η δε τελευταία δειγματοληψία γίνεται κατά την ημέρα της συγκομιδής.

Σε καλλιέργειες με παρατεταμένη περίοδο συγκομιδής είναι δυνατόν ο σχεδιασμός των πειραμάτων να γίνει με διαφορετικό τρόπο. Δηλαδή, το φυτοπροστατευτικό προϊόν εφαρμόζεται σε γειτονικά πειραματικά τεμάχια και σε ημερομηνίες και διαστήματα που να αντιστοιχούν σε πιθανούς χρόνους εφαρμογής της ουσίας. Στο τέλος τα δείγματα από όλα τα πειραματικά τεμάχια συλλέγονται την ίδια μέρα, που είναι και η ημέρα της συγκομιδής. Για την ομοιόμορφη αναφορά των στοιχείων των πειραμάτων υπολειμμάτων προς την ΕΕ, έχει εκπονηθεί ειδικό έντυπο.

Όπως ορίζεται διεθνώς, για πειράματα που άπτονται θέματα δημόσιας υγείας, όπως τα υπολείμματα των φυτοπροστατευτικών προϊόντων, θα πρέπει να τηρούνται οι αρχές της Ορθής Εργαστηριακής Πρακτικής (Good Laboratory Practice, GLP, applied to field studies), ώστε να είναι υψηλής ποιότητας και αξιόπιστα. Μόνον έτσι θα μας δώσουν αξιόπιστα στοιχεία για καθορισμό MRLs.

Τα πειράματα υπολειμμάτων για την παραγωγή αυτών των στοιχείων διενεργούνται από τις παράγουσες εταιρείες. Στις χώρες που έχουν παράδοση στην έγκριση κυκλοφορίας, όπως η Γερμανία, η κοινοτική διαδικασία είναι επανάληψη σχεδόν της εθνικής τους διαδικασίας. Η ύπαρξη πειραματικών δεδομένων υπολειμμάτων, για προϊόντα στα οποία έχει χορηγηθεί έγκριση κυκλοφορίας, διευκολύνει τον άμεσο καθορισμό κοινοτικού MRL.

Αντίθετα δημιουργείται πρόβλημα για ορισμένες χώρες που παρήγαγαν (και έκαναν εξαγωγή) γεωργικά προϊόντα και δεν είχαν απαιτήσει από τις αιτούσες εταιρείες πειράματα υπολειμμάτων, ούτε οι εθνικοί τους ερευνητικοί φορείς παρήγαγαν τέτοια στοιχεία. Σ' αυτές δόθηκε μια προθεσμία 4 ετών για την παραγωγή απαραίτητων στοιχείων που θα τεκμηριώνε ένα MRL που να απορρέει από την εγκεκριμένη χρήση. Σε περίπτωση που δεν υπήρχε δυνατότητα παραγωγής τέτοιων στοιχείων, τότε οριζόταν ως MRL το όριο αναλυτικού προσδιορισμού (quantitation limit) που είναι πρακτικά μηδέν.

3.4 Σχετικές Νομοθεσίες

Για τον έλεγχο και τον προσδιορισμό των υπολειμμάτων (MRLs) στα αγροτικά προϊόντα οι αρμόδιοι 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 αναλύσεις για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων σε τρόφιμα φυτικής προέλευσης γίνονται στα εργαστήρια του Τμήματος Ελέγχου Γεωργικών Φαρμάκων και Φυτοφαρμακευτικής του Μπενάκιου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου, ενώ η διοικητική πλευρά και ο έλεγχος της εφαρμογής της σχετικής νομοθεσίας είναι αρμοδιότητα της Διεύθυνσης Προστασίας Φυτικής Παραγωγής του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης, όπου λειτουργεί και το Ανώτατο Συμβούλιο Γεωργικών Φαρμάκων. Η Επιτροπή των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων ορίζει ανεκτά

υπολείμματα ορισμένων Φ.Π. στα κυριότερα γεωργικά προϊόντα και απαιτεί από τα κράτη-μέλη της Ε.Ε. να ακολουθούν καθορισμένες διαδικασίες ελέγχου. (Γζανακάκης,1995).

Μία άλλη παράμετρος που ορίζεται από το Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων στην Ελλάδα είναι και η διαδικασία ελέγχου του εκάστοτε Φ.Π. ώστε να δοθεί η έγκριση για την ελεύθερη κυκλοφορία του και να οριστούν οι Δόσεις χωρίς Παρατηρήσιμες Επιπτώσεις (NOAEL) για κάθε αγροτικό προϊόν.

3.5 Μέτρηση Υπολειμμάτων Φυτοπροστατευτικών Προϊόντων

Στις μελέτες υπολειμμάτων, πρωταρχικής σημασίας είναι ο σχεδιασμός του πειράματος προκειμένου να έχουμε δείγματα γεωργικού προϊόντος που περιέχουν υπολείμματα αντιπροστατευτικά ανάλογα με τη χρήση που έγινε.

Τα πειράματα γίνονται με τη χρήση εμπορικών σκευασμάτων και όχι εργαστηριακών παρασκευασμάτων επειδή η μορφή του σκευάσματος επηρεάζει την υποβάθμιση.

Η εφαρμογή πρέπει να γίνεται ομοιόμορφα και με τρόπο ανάλογο της γεωργικής πρακτικής. Οι διάφοροι παράγοντες που επηρεάζουν τα υπολείμματα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη και απαιτείται ένας αριθμός επαναλήψεων για τη στατιστική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων. Απαραίτητη προϋπόθεση για να είναι ορθό το πείραμα είναι να μάρτυρας, δηλαδή πειραματικό τεμάχιο στο οποίο δεν γίνεται εφαρμογή.

Παρακάτω δίνονται κάποια στοιχεία για ορισμένα απαραίτητα στάδια για τη διεξαγωγή του πειράματος.

3.5.1 Δειγματοληψία

Πολλές φορές η παραγωγή σε ένα πείραμα μπορεί να είναι πολύ μεγάλη με αποτέλεσμα να μην μπορεί να γίνει η ανάλυση της, είτε λόγω του ότι είναι δαπανηρή, είτε γιατί δεν υπάρχουν τα κατάλληλα εργαστήρια ή το κατάλληλα εκπαιδευμένο προσωπικό. Έτσι λοιπόν η γεωργική παραγωγή ελέγχεται δειγματοληπτικά.

Η δειγματοληψία είναι ίσως το σημείο που πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στην ανάλυση, ώστε το δείγμα μας να είναι αντιπροστατευτικό. Δε θα υπήρχε άλλωστε καμία αξία εάν υπάρχει βελτίωση των μεθόδων ανάλυσης και μείωση του ορίου ευαισθησίας όταν το σφάλμα της ανάλυσης υπάρχει ήδη μέσα στην αντιπροσωπευτικότητα του δείγματος. Λόγω της σημαντικότητας λοιπόν της ορθής δειγματοληψίας οι FAO/WHO (Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας, Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας) έχουν εκδώσει

δύο κατευθυντήριες οδηγίες για τη δειγματοληψία. Η μία αφορά τις πειραματικές εφαρμογές φυτοπροστατευτικών προϊόντων και τις δειγματοληψίες που γίνονται για να μελετηθεί η συμπεριφορά του φυτοπροστατευτικού προϊόντος από πλευράς υπολειμμάτων, με βάση την οποία θα καθοριστεί ο χρόνος αναμονής μεταξύ τελευταίας επέμβασης και συγκομιδής. Είναι γενικές μέθοδοι για όλα τα γεωργικά προϊόντα φυτικής προέλευσης. Αντίθετα η μέθοδος δειγματοληψίας που προτείνεται από την Ε.Ε. εφαρμόζεται μόνο σε φρούτα και λαχανικά του εμπορίου.

Οι πληροφορίες τις οποίες θέλουμε να αποκτήσουμε για τα υπολείμματα ενός συνόλου προϊόντων καθορίζουν τη μέθοδο δειγματοληψίας την οποία θα ακολουθήσουμε καθώς και τη μέθοδο ανάλυσης των προϊόντων. Κατά συνέπεια, είναι φανερό ότι η διαδικασία δειγματοληψίας πρέπει να επιλεγεί ανάλογα με τον στόχο της κάθε εξέτασης.

Κύριος σκοπός της διαδικασίας δειγματοληψίας είναι η λήψη κατάλληλης ποσότητας γεωργικού προϊόντος για να χρησιμοποιηθεί στην ανάλυση. Τονίζεται ότι τα δείγματα πρέπει να είναι αντιπροσωπευτικά και τυχαία. Αυτό δεν σημαίνει ότι λαμβάνονται τυχαία αλλά ότι υπάρχει η ίδια πιθανότητα να περιέχεται σε αυτά κάθε μονάδα του όλου πειραματικού τεμαχίου ή φορτίου.

Στην περίπτωση μας, σε κάθε ημερομηνία δειγματοληψίας συλλέχθηκαν τρία δείγματα, ένα από κάθε επανάληψη. Το κάθε δείγμα περιλάμβανε κατά τις πρώτες δύο δειγματοληψίες από έξι καρπούς και έξι φύλλα και στις επόμενες από πέντε. Οι καρποί βρίσκονταν είτε στο στάδιο του γαλανίσματος, είτε σε εμπορική, είτε σε πλήρη ωρίμανση κατά τη συλλογή τους. Το βάρος του κάθε δείγματος στους καρπούς κυμαινόταν στο 0,5-1kg και στα φύλλα σε 50-70gr.

3.5.2 Επεξεργασία δειγμάτων και Αποθήκευση

Μόλις το αντιπροσωπευτικό δείγμα έφτανε στο εργαστήριο, ακολουθούσε ζύγιση, καταγραφή του βάρους του κάθε δείγματος, μείωση του αρχικού δείγματος με τη μέθοδο των τεταρτημορίων, τεμαχισμός (με αφαίρεση των ποδίσκων) και έπειτα ομογενοποίηση του δείγματος με τη χρήση κοινού blender. Στη συνέχεια, ένα μέρος αυτού μεταφέρθηκε σε ειδικά σακουλάκια στα οποία και αναγράφηκαν τα στοιχεία του κάθε δείγματος και έπειτα αποθηκεύτηκαν σε καταψύκτες σε κατάλληλη θερμοκρασία.

3.5.3 Επιλογή αναλυτικής μεθόδου

Για την επιλογή της μεθόδου ανάλυσης πρέπει να 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 τα απαραίτητα όργανα.
- Ο σκοπός της ανάλυσης, αν δηλαδή η ανάλυση γίνεται για έλεγχο, έρευνα κ.α. καθώς και οι απαιτήσεις για ακρίβεια και ταχύτητα.

Σίγουρα όμως απαραίτητες προϋποθέσεις για την ορθή διεκπεραίωση της μεθόδου είναι και η ύπαρξη κατάλληλου εργαστηρίου και εξειδικευμένου επιστημονικού και τεχνικού προσωπικού και τέλος η επιλογή της κατάλληλης αναλυτικής μεθόδου προσδιορισμού υπολειμμάτων.

3.6 Αναλύσεις υπολειμμάτων

Οι μέθοδοι προσδιορισμού υπολειμμάτων εντομοκτόνου διακρίνονται σε πολυδύναμες (multi-residue methods) και εξειδικευμένες (specific methods). Πολυδύναμες ή πολύ-υπολειμματικές μέθοδοι είναι αυτές που επιτρέπουν τον ταυτόχρονο προσδιορισμό πολλών εντομοκτόνων (μέχρι και 200 μορίων). Εξειδικευμένες ή μόνο-υπολειμματικές μέθοδοι είναι αυτές με τις οποίες προσδιορίζεται ένα μόνο εντομοκτόνο ή και ορισμένες μόνο συγγενείς ουσίες.

Οι πολυδύναμες αναπτύχθηκαν για να διευκολύνουν το συνεχή έλεγχο των γεωργικών προϊόντων και μ' αυτές προσδιορίζονται κυρίως εντομοκτόνα της ίδιας οικογένειας. Είναι ιδιαίτερα χρήσιμες για προκαταρκτικό έλεγχο (screening) των γεωργικών προϊόντων. Όμως μόνες τους οι πολυδύναμες μέθοδοι δεν αρκούν για την επισήμανση και τον προσδιορισμό του συνολικού ρυπαντικού φορτίου ενός δείγματος.

Τα επίπεδα των υπολειμμάτων των γεωργικών φαρμάκων είναι συνήθως της τάξης των 0,01-10mg/kg ή ppb (μέρη ανά δισεκατομμύριο). Η ανάλυση υπολειμμάτων είναι δηλαδή ιχνοανάλυση αφού προσδιορίζονται σε κάθε γραμμάριο του δείγματος ένα έως χίλια

νανογραμμάρια της ουσίας. Χρήσιμο είναι να παρατηρηθεί ότι οι δυνατότητες του εργαστηρίου αναλύσεων υπολειμμάτων είναι περιορισμένες. Για παράδειγμα είναι αδύνατον να γνωματεύσει την πλήρη απουσία γεωργικών φαρμάκων σε κάποιο φυτικό δείγμα. Αυτό γιατί υπάρχουν περίπου 500 δραστικές ουσίες που χρησιμοποιούνται στην Ελλάδα σε διάφορες μορφές σκευασμάτων. Θα πρέπει λοιπόν να υπάρχει υπόνοια για συγκεκριμένα γεωργικά φάρμακα που πιθανόν χρησιμοποιήθηκαν στο συγκεκριμένο προϊόν, προκειμένου να προσανατολιστεί η ανάλυση του εργαστηρίου προς αυτά τα φάρμακα. (Λέντζα-Ρίζου, 1997.)

Η Επιτροπή των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων ορίζει ανεκτά υπολείμματα ορισμένων εντομοκτόνων στα κυριότερα γεωργικά προϊόντα και απαιτεί από τα κράτη μέλη της Ε.Ε. να ακολουθούν καθορισμένες διαδικασίες ελέγχου. Επίσης, υπό τους διεθνείς οργανισμούς FAO και WHO λειτουργεί η Codex Committee on Pesticide Residues, που προσπαθεί να εναρμονίσει τα μέγιστα ανεκτά υπολείμματα στις χώρες - μέλη τους. Τέλος η τάση που επικρατεί σήμερα από τους διεθνείς οργανισμούς FAO και WHO, όσον αφορά τη διευκόλυνση του διεθνούς εμπορίου και την προστασία των καταναλωτών, είναι να γίνουν αποδεκτές μέθοδοι ελεγμένες από μελέτες συνεργαζόμενων εργαστηρίων από όσο το δυνατό περισσότερα κράτη.

Η προσέγγιση μια αναλυτικής μεθόδου από ένα εργαστήριο υπολειμμάτων καθορίζεται από τους εξής παράγοντες:

- ▶ Εξειδίκευση (specificity), δηλαδή ο αριθμός των ουσιών που μπορούν να ανιχνευθούν με την ίδια μέθοδο.
- ▶ Εκλεκτικότητα (selectivity), που αναφέρεται στην ανίχνευση κατά προτίμηση μιας ή περισσότερων ουσιών.
- ▶ Ευαισθησία (sensitivity), που αναφέρεται στη μικρότερη ποσότητα μιας ουσίας που μπορεί να ανιχνευθεί.
- ▶ Όριο ανίχνευσης (Limit of Detection, IO), που είναι η μικρότερη ποσότητα της ουσίας που αξιόπιστα ανιχνεύεται ποιοτικά με τη μέθοδο.
- ▶ Όριο αναλυτικού προσδιορισμού (Limit of Determination /Quantitation, LOD, LOC), που είναι η ελάχιστη συγκέντρωση που μπορεί να προσδιοριστεί ποσοτικά με ικανοποιητικό βαθμό αξιοπιστίας.
- ▶ Επαναληψιμότητα (repeatability) της μεθόδου, δηλαδή η δυνατότητα να επιτυγχάνονται επαναλήψιμα αποτελέσματα από τον ίδιο αναλυτή κάτω από τις ίδιες συνθήκες (ίδια όργανα, αντιδραστήρια, κ.λ.π.). Για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας

πρέπει να γίνουν τουλάχιστον πέντε ίδιες αναλύσεις. Η επαναληψιμότητα εκτιμάται με την % σχετική τυπική απόκλιση (αποδεκτές τιμές μέχρι 25%) (Λέντζα-Ρίζου, 1999.)

- ▶ Απόδοση της μεθόδου, δηλαδή η ανάκτηση ή επανάκτηση (recovery) επί τοις εκατό για τη δραστική ουσία. Η απόδοση ελέγχεται με ανάλυση φυσικών δειγμάτων, στα οποία γίνεται τεχνητή προσθήκη φυτοφαρμάκου σε διάφορες συγκεντρώσεις που είναι κοντά στο ανώτατο ανεκτό όριο. Τα δείγματα αυτά ονομάζονται φορτισμένα ή εμβολιασμένα δείγματα (fortified samples ή spiked samples). Τα δείγματα αναλύονται με την υπό δοκιμή μέθοδο και γίνεται ο ποσοτικός προσδιορισμός των υπολειμμάτων που ανιχνεύθηκαν. Η προσδιορισθείσα ποσότητα συγκρίνεται με εκείνη που είχε προστεθεί και εκφράζεται η ανάκτηση από το λόγο αυτό. Ποσοστό επανάκτησης 100% είναι η ιδανική περίπτωση, το οποίο όμως δεν είναι πάντα δυνατό. Για να είναι αποδεκτή η μέθοδος, η απόδοση πρέπει να κυμαίνεται από 70-110%, με μέσο όρο μεγαλύτερο από 80% (FAO/WHO, 1994).

Οι μέθοδοι επιτρέπουν την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό υπολειμμάτων που υπάρχουν στο δείγμα πάνω από κάποια συγκέντρωση. Εάν ο αναλυτής δεν έχει από το όργανο απόκριση για κάποιο φυτοφάρμακο σε κάποιο δείγμα, αυτό δεν σημαίνει ότι το δείγμα δεν περιέχει καθόλου το εν λόγω φυτοφάρμακο αλλά ότι το φυτοφάρμακο ίσως βρίσκεται σε τέτοια συγκέντρωση που δεν μπορεί να ανιχνευθεί. Επομένως δεν χρησιμοποιούμε ποτέ τον όρο "*μηδέν υπολείμματα*", αλλά τον όρο "*μη ανιχνεύσιμα υπολείμματα*".

3.7 Εκτέλεση της μεθόδου ανάλυσης

Από τη στιγμή που φθάνει το δείγμα στο εργαστήριο και μέχρι τον προσδιορισμό των υπολειμμάτων, ακολουθείται μια διαδικασία που περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

1. Προετοιμασία αναλυτικού δείγματος,
2. Εκχύλιση,
3. Καθαρισμός,
4. Συμπύκνωση και
5. Προσδιορισμός.

3.7.1 Προσδιορισμός υπολειμμάτων

Η ουσία στο τελικό συμπύκνωμα προσδιορίζεται ποσοτικά με κάποια από τις παρακάτω μεθόδους: αέριο χρωματογραφία (Gas Chromatography, GC), φασματοφωτομετρία (spectrophotometry), υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) και φασματομετρία μάζας (mass spectrometry). Πολύ πρόσφατα γνωρίζουν ανάπτυξη οι βιοτεχνολογικές μέθοδοι (ανοσοδοκιμασίες- immunoassays) (Λέντζα-Ρίζου, 1997).

Η αέριος χρωματογραφία είναι μια σημαντική μέθοδος προσδιορισμού υπολειμμάτων. Ο χρόνος παραμονής κάθε ουσίας στη στήλη (χρόνος κατακράτησης- retention time) αποτελεί τη βάση για τον ποιοτικό προσδιορισμό. Το μέγεθος του σήματος που καταγράφεται από κατάλληλα όργανα (ανιχνευτές) στην έξοδο της στήλης υπό μορφή κορυφής χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό. Αυτό που υπολογίζεται είναι το ύψος της κορυφής (peak) ή η επιφάνεια υπό την κορυφή έπειτα από 'ολοκλήρωση'.

Με τη χρήση εξειδικευμένων ανιχνευτών, π.χ. δέσμευσης ηλεκτρονίων (electron capture detector, ECD), θερμιονικό ανιχνευτή αζώτου-φωσφόρου (NPD) και άλλων, ανιχνεύονται και προσδιορίζονται εκλεκτικά μόνο οι ουσίες που ενδιαφέρουν. Σε περιπτώσεις που η ουσία προς προσδιορισμό δεν ικανοποιεί τις συνθήκες του αεριοχρωματογράφου, όπως συμβαίνει με μη πτητικές ή θερμοευαίσθητες ουσίες, είναι δυνατός ο σχηματισμός παραγώγου της ουσίας που να ανταποκρίνεται στις απαιτήσεις της τεχνικής της αεριοχρωματογραφίας.

Η αέρια χρωματογραφία προτείνεται για το διαχωρισμό αεριοποιημένων συστατικών ή πτητικών μορίων, τα οποία εισέρχονται με έγχυση στη κορυφή της χρωματογραφικής στήλης (κολώνας). Η συσκευή έγχυσης και η στήλη ευρίσκονται σε θερμαινόμενη ζώνη (έως 300°C). ώστε να επιτυγχάνεται αεριοποίηση των προς ανάλυση ουσιών, οι οποίες κατόπιν παρασύρονται από τη κινητή φάση, η οποία συνήθως είναι ένα αδρανές αέριο και λέγεται φέρον αέριο ή αέριο μεταφοράς. Η στήλη είναι γεμισμένη με αδρανές πορώδες υλικό, διαποτισμένο με κατάλληλη υγρή, αδρανή, θερμοάντοχη ουσία (συνιστά έτσι την στατική υγρή φάση και έχουμε αέρια χρωματογραφία αερίου υγρού). Ο διαχωρισμός οφείλεται κύρια στην διαφορετική κατανομή των ουσιών ανάμεσα στο υλικό της στατικής φάσης και της κινητής φάσης, αλλά και στη διαφορετική τους προσρόφηση από τη στερεά φάση. Οι ουσίες εξερχόμενες χωριστά από τη στήλη διέρχονται από τον ανιχνευτή, όπου ανιχνεύονται. Στη συνέχεια το σήμα του ανιχνευτή

καταγράφεται στον καταγραφέα. Η καταγραφή που παρέχει την κατανομή των ουσιών κατά την έξοδο τους από τη χρωματογραφική στήλη σε συνάρτηση με τη διανυθείσα απόσταση των ουσιών από το σημείο εκκίνησης (σημείο έκχυσης) ονομάζεται χρωματογράφημα.

Βασικοί όροι που χρησιμοποιούνται στη χρωματογραφία είναι ο χρόνος ανάσχεσης ή χρόνος κατακράτησης (retention time). Ως χρόνος ανάσχεσης (tR) ορίζεται ο χρόνος που μεσολαβεί μεταξύ της έκχυσης του δείγματος στη στήλη και της εμφάνισης της ουσίας στον ανιχνευτή.

Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης,- HPLC:

Το χρωματογραφικό σύστημα της HPLC αποτελείται από τα εξής επιμέρους τμήματα (Παπαδογιάννης , 1992) :

- ⇒ Φιάλες αποθήκευσης διαλυτών,
- ⇒ Αντλία υψηλής πίεσης, σταθερής ροής (reciprocating pumps),
- ⇒ Σύστημα εισαγωγής δείγματος (injector),
- ⇒ Χρωματογραφική στήλη (σε θάλαμο ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας),
- ⇒ Ανιχνευτή (απορρόφησης UV συνήθως),
- ⇒ Καταγραφέα.

Η στήλη είναι μικρών διαστάσεων, χαλύβδινη γεμισμένη ασφυκτικά από πορώδες υλικό διαποτισμένο με τη υγρή σταθερή φάση, η οποία με αυτό τον τρόπο ακινητοποιείται. Η ροή του διαλυτικού μέσου (κινητής φάσης) δια μέσου της στήλης πετυχαίνεται με τη βοήθεια ισχυρής αντλίας που εξασκεί υψηλή πίεση ώστε να υπερνικήσει την αντίσταση του πορώδους υλικού. Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται με ταυτόχρονο συνδυασμό χρωματογραφίας κατανομής, εκλεκτικής προσρόφησης και ιοντανταλλαγής. Στην έξοδο τα συστατικά του μίγματος ανιχνεύονται και το σήμα, του ανιχνευτή καταγράφεται στον καταγραφέα. Χρησιμοποιείται κυρίως ο ανιχνευτής απορρόφησης ορατού/υπεριώδους (UV/VIS) σταθερού ή ποικίλου μήκους κύματος (από 200-350 nm). Μειονεκτεί σε σχέση με τους ανιχνευτές της GC κατά το ότι είναι μη εκλεκτικός και όχι αρκετά ευαίσθητος. Μια σύγχρονη μορφή του, ο ανιχνευτής φωτοδιόδων (DAD), είναι περισσότερο εκλεκτικός, μικρής όμως ευαισθησίας. Ο φθορισμετρικός ανιχνευτής (Fluorescence detector) είναι αρκετά ευαίσθητος, μπορεί όμως να χρησιμοποιηθεί μόνο για φθορίζουσες ουσίες. Ορισμένα φυτοφάρμακα έχουν αυτή την ιδιότητα. Τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιούνται ειδικές τεχνικές μετατροπής

ορισμένων φυτοφαρμάκων σε φθορίζοντα παράγωγα, τα οποία και προσδιορίζονται φθορισμομετρικά.

Η απόδοση του συστήματος στο διαχωρισμό εξαρτάται από το κατάλληλο συνδυασμό του υλικού της στήλης και του διαλύτη έκλουσης. Το κύριο προσόν της HPLC είναι η λειτουργία της σε χαμηλές θερμοκρασίες. Γι' αυτό χρησιμοποιείται στο διαχωρισμό ευπαθών στις υψηλές θερμοκρασίες της αερίου χρωματογραφίας δειγμάτων, όπως για παράδειγμα βιολογικών μορίων (πρωτεΐνες, νουκλεοτίδια κα.) καθώς και δειγμάτων, που δεν μπορούν να αεριοποιηθούν. Σήμερα εφαρμόζεται σε ανάλυση δειγμάτων που περιέχουν ορμόνες, φάρμακα, βιταμίνες, εντομοκτόνα, τοξίνες κα. (Τσιρόπουλος, 1999)

3.8 Εκτίμηση αποτελεσμάτων

Κάθε στάδιο της αναλυτικής μεθόδου, όπως προαναφέρθηκε, περικλείει σειρά από κινδύνους για πιθανό σφάλμα. Για τον έλεγχο τέτοιων σφαλμάτων, παράλληλα με την ανάλυση του κυρίως δείγματος αναλύονται και:

α) τυφλό δείγμα αντιδραστηρίων (reagent blank), που περιέχει μόνο του διαλύτες και τα αντιδραστήρια,

β) μάρτυρας (control sample), δηλαδή δείγμα χωρίς καθόλου γεωργικό φάρμακο και

γ) φορτισμένα δείγματα (spiked ή fortified samples), που είναι μάρτυρες με ορισμένη περιεκτικότητα στην ουσία του φαρμάκου που αναλύεται. Για να είναι ικανοποιητική η μέθοδος πρέπει η ανάκτηση να είναι της τάξεως του 70-110% και η επαναληψιμότητα < 20% σαν σχετική τυπική απόκλιση (relative standard deviation, R.S.D.) (Council Directive 94/43/EC). Επίσης, μια άγνωστη ουσία θα πρέπει να ταυτοποιείται με περισσότερες από μία αναλυτικές μεθόδους.

B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1.1 Πειραματικός αγρός

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε στο Αγρόκτημα του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας σε υπαίθρια καλλιέργεια τομάτας από το Σεπτέμβριο του 2007. Η φύτευση έγινε σε δέκα γραμμές οι οποίες απείχαν 80 εκ. μεταξύ τους, ενώ οι αποστάσεις των φυτών επί της γραμμής ήταν 50 εκ. Η καλλιέργεια χωρίστηκε σε 4 πειραματικά τεμάχια των 12 φυτών το καθένα. Από αυτά τα τρία πειραματικά τεμάχια δέχτηκαν εφαρμογή με thiamethoxam, ενώ το τέταρτο έμεινε αψέκαστο να χρησιμοποιηθεί σαν μάρτυρας. Γύρω από το πειραματικό αγρό αφέθηκε από μια γραμμή περιθώριο σε κάθε πλευρά. Το ίδιο έγινε και ανάμεσα στα πειραματικά τεμάχια. Η καλλιέργεια από τη φύτευση της έως και την εκτέλεση του πειράματος δέχθηκε όλες τις συνήθεις καλλιεργητικές φροντίδες.

Για την επέμβαση με το εντομοκτόνο χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό σκεύασμα Actara 25% WP, το οποίο είναι βρέξιμοι κόκκοι με περιεκτικότητα 25% σε δραστική ουσία (thiamethoxam). Ο ψεκασμός πραγματοποιήθηκε με υδατικό εναιώρημα του παραπάνω σκευάσματος, σε δόση 2,2 gr εντομοκτόνου/10lt νερού, στις 6 Σεπτεμβρίου 2007. Χρησιμοποιήθηκε χειροκίνητο ψεκαστικό πλάτης και ο ψεκασμός έγινε μέχρι απορροής ομοιόμορφα σε όλο το φυτό.

1.2 Δειγματοληψία

Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες δειγματοληψίας των FAO/WHO όπως προαναφέρθηκε και στη παράγραφο 3.5.1., δηλαδή συλλέγοντας 8-9 καρπούς τομάτας που βρίσκονταν στο στάδιο του γαλανιάσματος έως και το στάδιο της εμπορικής ωριμότητας από διάφορα φυτά από κάθε πειραματικό τεμάχιο, ώστε κάθε δείγμα τα έχει συνολικό βάρος 1-1,2 kg. Κάθε δειγματοληψία καρπών ακολουθούσε και δειγματοληψία φύλλων (8 φύλλα από κάθε πειραματικό τεμάχιο με ένα φύλλο ανά φυτό σε μέσο ύψος φυτού).

Τα πρώτα δείγματα συλλέχτηκαν 4 ώρες μετά το ψεκασμό (0 ημέρες) ώστε να στεγνώσει το ψεκαστικό υγρό, ενώ τα υπόλοιπα δείγματα συλλέχτηκαν 1,3,5,7,9,12 και 14 ημέρες μετά τον ψεκασμό. Τα συλλεχθέντα δείγματα ζυγίστηκαν και ακολούθησε

μείωση του δείγματος με τεμαχισμό σε τέσσερα τεταρτημόρια κάθε καρπού τομάτας και ομογενοποίηση των δύο απέναντι τερτημορίων με οικιακό blender. Το ομογενοποιημένο υλικό χωρίστηκε σε αναλυτικά υποδείγματα τα οποία αποθηκεύτηκαν στους -18°C μέχρι την ανάλυσή τους.

Τα συλλεχθέντα δείγματα των φύλλων μεταφέρονταν στο εργαστήριο, όπου τεμαχίζονταν και ομογενοποιούνταν σε κοινό οικιακό blender. Κατόπιν, μέρος του δείγματος των φύλλων φυλάσσονταν σε ειδικό σακουλάκι ως αναλυτικό δείγμα στην κατάψυξη σε θερμοκρασία -18°C μέχρι την ανάλυσή τους.

Η δειγματοληψία, η μεταφορά στο εργαστήριο, η ομογενοποίηση και η αποθήκευση έγιναν αυθημερόν.

1.3 Υλικά και χημικά αντιδραστήρια

Τα υλικά και τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα παρακάτω:

- **Διαλύτες:** οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: μεθανόλη τύπου analytical reagent και τύπου HPLC, διχλωρομεθάνιο τύπου analytical reagent, νερό τύπου HPLC και ακετονιτρίλιο τύπου HPLC
- **Πρότυπη ουσία** thiamethoxam (καθαρότητας 99%)
- **Πρότυπα διαλύματα** της παραπάνω ουσίας. Παρασκευάστηκε μητρικό διάλυμα σε μεθανόλη συγκέντρωσης 550,4mg/l και από αυτό παρασκευάστηκαν διαλύματα εργασίας και πρότυπα διαλύματα βαθμονόμησης με αραιώση. Τα πρότυπα διαλύματα και τα διαλύματα εργασίας παρασκευάστηκαν σε νερό/ακετονιτρίλιο (9:1)
- **Φυσίγγια** εκχύλισης στερεάς φάσης τύπου C-18 (50 mg/6ml) της εταιρίας IST Isolute.
- **Διαχωριστικές χοάνες** των 100 ml
- **Σύστημα περιστροφικού εξατμιστήρα (Rotary Evaporator).**
- **Φυγόκεντρος**

2. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

2.1 Διαδικασία εκχύλισης δειγμάτων φύλλων

2-5g δείγματος τοποθετούνται σε σωλήνα φυγοκέντρου και προστίθενται 15-25ml διαλύματος νερό/μεθανόλη 1/1. Ακολουθεί ομοιογενοποίηση στο Ultra turrax για 30sec και έπειτα φυγοκέντρηση για 10min σε 3500 rpm. Στη συνέχεια, 10 έως 20ml από το υπερκείμενο εκχύλισμα μεταφέρονται σε διαχωριστική χοάνη και προστίθενται 10-20ml νερό και 20-25ml διχλωρομεθάνιο. Ακολούθως η διαχωριστική φιάλη ανακινείται με το χέρι και αφήνεται λίγα λεπτά ώστε να «ηρεμήσει» το διάλυμα. Τέλος, 15-20ml από την οργανική φάση ξηραίνονται στον περιστροφικό εξατμιστήρα, προστίθεται 1ml νερό/ακετονιτρίλιο (9/1) και παραλαμβάνεται σε φιαλίδιο χρωματογραφίας για έκχυση.

2.2 Διαδικασία εκχύλισης δειγμάτων καρπών

5g δείγματος ομογενοποιημένου καρπού τομάτας τοποθετούνται σε σωλήνα φυγοκέντρου και προστίθενται 25ml διαλύματος νερό/μεθανόλη 1/1. Ακολουθεί ομοιογενοποίηση στο Ultra turrax για 30sec και έπειτα φυγοκέντρηση για 10min. Στη συνέχεια, 20ml από το υπερκείμενο, 20ml νερό και 25ml διχλωρομεθάνιο τοποθετούνται σε διαχωριστική χοάνη, η οποία ανακινείται και αφήνεται λίγα λεπτά ώστε να «ηρεμήσει» το διάλυμα. Έπειτα, 20ml από την οργανική φάση ξηραίνονται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το υπόλειμμα συλλέγεται με διχλωρομεθάνιο σε γυάλινο φιαλίδιο όπου συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού με ρεύμα αζώτου. Ακολουθεί ξήρανση σε άζωτο και τέλος προστίθεται 0,5ml νερό/ακετονιτρίλιο (9/1).

Με την ως άνω διαδικασία τόσο στα φύλλα όσο και στους καρπούς ακολουθείται ο καθαρισμός του εκχυλίσματος με κατανομή υγρού-υγρού (Liquid/Liquid extraction) σε διχλωρομεθάνιο. Στη συνέχεια παρουσιάζονται επίσης οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για την εκχύλιση δειγμάτων καρπών και φύλλων ακολουθώντας τη διαδικασία καθαρισμού με χρήση φυσιογγίων στερεάς φάσης (SPE) που έχουν χρησιμοποιηθεί στο εργαστήριο για τον προσδιορισμό του thiamethoxam και άλλων παρασιτοκτόνων σε υδατικά διαλύματα και δείγματα.

2.3 Διαδικασία καθαρισμού (clean up) με χρήση φυσιγγίωνSPE

5g δείγματος ομογενοποιημένου καρπού τομάτας τοποθετούνται σε σωλήνα φυγοκέντρου και προστίθενται 25ml διαλύματος νερό/μεθανόλη 1/1. Ακολουθεί ομογενοποίηση στο Ultra turrax για 30sec και έπειτα φυγοκέντρηση για 10min. Στη συνέχεια, παραλαμβάνονται 20ml από το υπερκείμενο εκχύλισμα και συμπληρώνονται σε ογκομετρική φιάλη με 80ml νερό μέχρι συνολικού όγκου 100ml. Ακολουθεί η διαδικασία εκχύλισης στερεάς φάσης σε φυσιγγία αντίστροφης φάσης που περιγράφεται με τα παρακάτω στάδια:

- Ενεργοποίηση φυσιγγίου στερεάς φάσης C-18 με διαδοχική διέλευση 5ml μεθανόλης και 10ml νερού
- Διέλευση 5-25ml δείγματος ακολουθούμενη από 5ml νερό
- Ξήρανση φυσιγγίου με διέλευση αέρα για περίπου 15min
- Έκλουση του φυσιγγίου με 1ml μεθανόλη για την παραλαβή του αναλύτη
- Ξήρανση του εκχυλίσματος σε άζωτο
- Αλλαγή του διαλύτη με προσθήκη 1ml νερό/ακετονιτρίλιο (9/1)
- Χρωματογραφική ανάλυση

3.ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

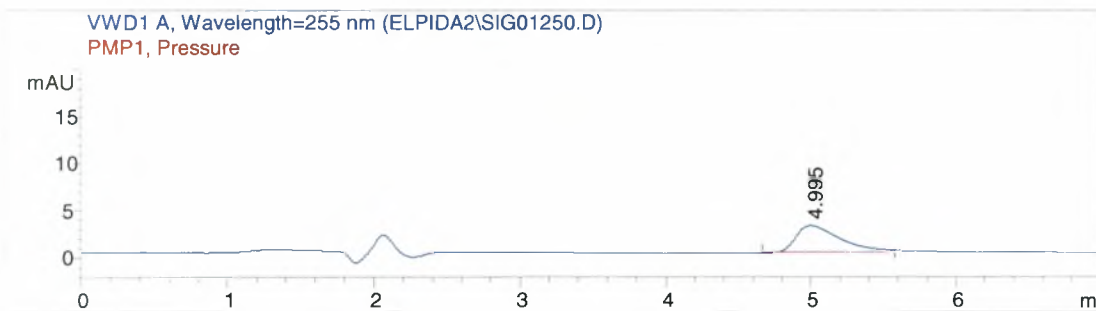
Για την ανίχνευση του thiamethoxam στα τελικά εκχυλίσματα των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε σύστημα της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC – High Performance liquid chromatography), HP-1100 με ανιχνευτή UV και με βρόγχο έκχυσης 20μl. Η επεξεργασία έγινε με το πρόγραμμα HP Chem Station.

Η κινητή φάση ήταν νερό και ακετονιτρίλιο σε αναλογία 9:1 και το μήκος κύματος στο οποίο έγινε η ανίχνευση και ο προσδιορισμός ήταν τα 255nm.

3.1 Ποιοτική ανάλυση

Η ταυτοποίηση του εντομοκτόνου thiamethoxam έγινε με βάση τον χρόνο κατακράτησης του (retention time), ο οποίος ήταν 4,9min (εικόνα 1).

Τα δείγματα του μάρτυρα, τόσο τα φύλλα όσο και καρποί, δεν εμφάνισαν κορυφές, όπως ήταν αναμενόμενο, στον συγκεκριμένο χρόνο κατακράτησης οπότε δεν υπήρχε δυσκολία στην επεξεργασία των χρωματογραφημάτων για τα δείγματα που αναλύθηκαν.



Εικόνα 1. Χρωματογράφημα πρότυπης ουσίας thiamethoxam συγκέντρωσης 1mg/l σε διαλύτη νερό/ακετονιτρίλιο (9/1).

3.2 Ποσοτική ανάλυση

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του thiamethoxam έγινε με τη μέθοδο του εξωτερικού προτύπου, χρησιμοποιώντας την καμπύλη αναφοράς (calibration curve), η οποία κατασκευάστηκε με τα πρότυπα διαλύματα thiamethoxam σε διαλύτη νερό:ακετονιτρίλιο (9:1) και σε συγκεντρώσεις 0,25 mg/l, 0,5 mg/l, 1 mg/l, 2 mg/l και 5 mg/l. Οι συγκεντρώσεις αυτές επιλέχθηκαν με βάση τις συγκεντρώσεις ενέσιμου διαλύματος-εκχυλίσματος που αντιστοιχούν σε συγκεντρώσεις σε ιστούς τομάτας αντίστοιχους με τα MRLs που δίνονται για το thiamethoxam στην καλλιέργεια της τομάτας.

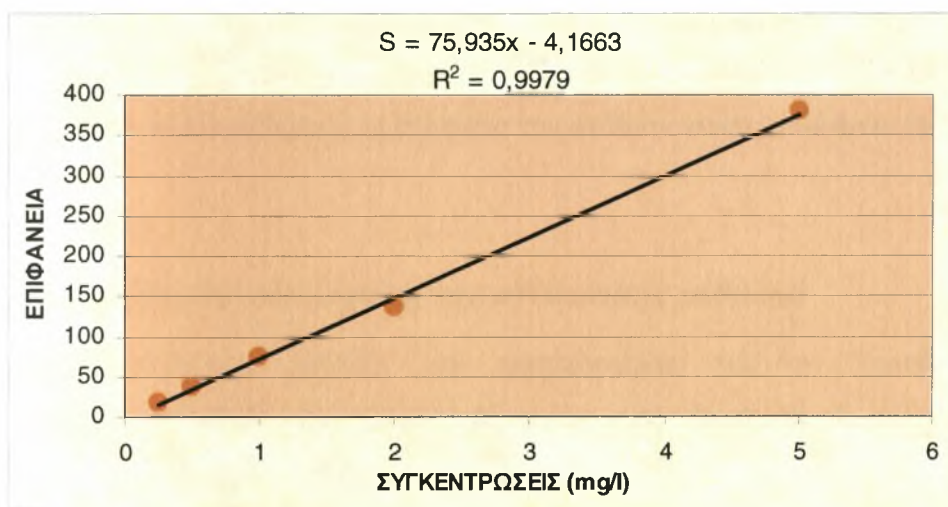
Η καμπύλη αναφοράς περιγράφει τη μεταβολή του μεγέθους των κορυφών (εμβαδόν και ύψος κορυφής) σε συνάρτηση με την εγχυόμενη μάζα της ουσίας αναφοράς.

Η καμπύλη αναφοράς περιγράφεται από την εξίσωση:

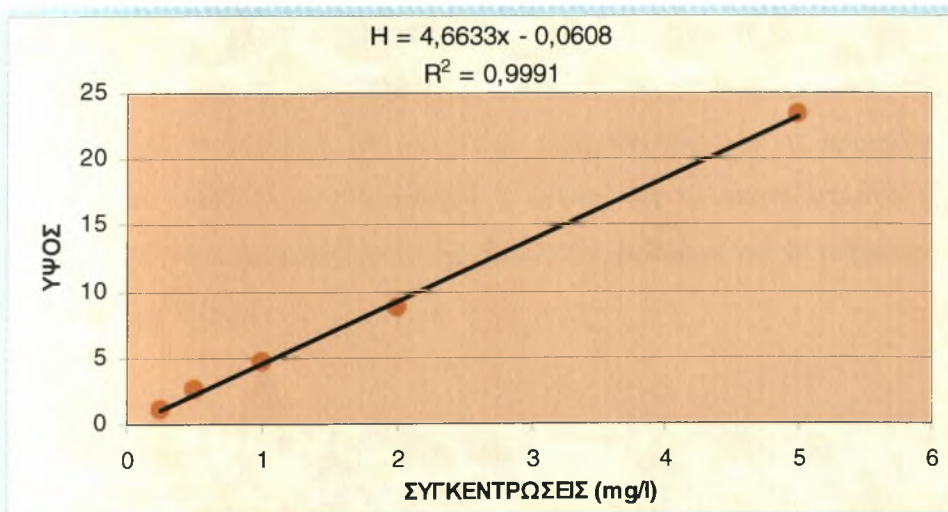
$$y = ax + b$$

- y : η επιφάνεια ή το ύψος της κορυφής της ουσίας στο χρωματογράφημα
- x : η συγκέντρωση της ουσίας στα πρότυπα διαλύματα
- a, b : σταθερές

Οι καμπύλες αναφοράς που προέκυψαν για το thiamethoxam μετά από τις εκχύσεις των πρότυπων διαλυμάτων παρουσιάζονται στα διαγράμματα 1 και 2. Στο **διάγραμμα 1** παρουσιάζεται η καμπύλη αναφοράς που δημιουργήθηκε με βάση το εμβαδόν της κορυφής της ουσίας που προκύπτει από το χρωματογράφημα, ενώ στο **διάγραμμα 2** η καμπύλη αναφοράς προκύπτει από το ύψος της κορυφής.



Διάγραμμα 1. Καμπύλη αναφοράς για το thiamethoxam με βάση το εμβαδόν της κορυφής.



Διάγραμμα 2. Καμπύλη αναφοράς για το thiamethoxam με βάση το ύψος της κορυφής.

Οι εξισώσεις των ευθειών και οι συντελεστές συσχέτισης (correlation coefficient – R^2) που παρουσιάζονται στα διαγράμματα προκύπτουν από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων. Οι τιμές των συντελεστών συσχέτισης είναι 0,99 και θεωρούνται πολύ καλές καθώς επιβεβαιώνουν τη γραμμικότητα του σήματος του ανιχνευτή.

Σε ένα χρωματογράφημα το εμβαδόν και το ύψος της κορυφής αποτελεί μέτρο της ποσότητας του προς εξέταση συστατικού σε ένα δείγμα. Έτσι, η συγκέντρωση του thiamethoxam στα δείγματα των φύλλων και των καρπών υπολογίστηκε από την επιφάνεια και το ύψος των κορυφών του χρωματογραφήματος, με τη χρήση της καμπύλης αναφοράς. Οι συγκεντρώσεις του γεωργικού σκευάσματος στους καρπούς και τα φύλλα της τομάτας εκφράζονται σε mg δ.ο./Kg νωπού βάρους.

Σαν όριο ποσοτικού προσδιορισμού (Limit of Quantification – LOQ) της μεθόδου θεωρήθηκε το 0,02 mg/Kg για τα δείγματα του φυτικού ιστού (φύλλα και καρποί).

3.3 Έλεγχος και αξιολόγηση της αναλυτικής μεθόδου

Οι αναλυτικές μέθοδοι που εφαρμόστηκαν για τον προσδιορισμό των υπολειμμάτων του thiamethoxam ελέγχθηκαν ως προς την αξιοπιστία τους (ακρίβεια και η ορθότητα) με πειράματα ανάκτησης.

Δείγματα μάρτυρα καρπών τομάτας εμβολιάστηκαν με ποσότητα δραστικής ουσίας σε επίπεδο 0,02, 0,08 και 0,16mg/l. Η αξιοπιστία των αναλυτικών μεθόδων που εφαρμόστηκαν σε φύλλα τομάτας ελέγχθηκε σε επίπεδο 0,2 και 5,0 mg/l, Σε κάθε επίπεδο φόρτισης έγιναν 5 επαναλήψεις (n=5).

Στη συνέχεια μετά τον εμβολιασμό ακολουθήθηκε η προαναφερόμενη μέθοδος εκχύλισης και ανάλυσης του δείγματος, προσδιορίστηκε η ποσότητα εντομοκτόνου που ανακτήθηκε και συγκρίθηκε με αυτή που εφαρμόστηκε για να προκύψει το ποσοστό ανάκτησης. Το πείραμα επαναλήφθηκε 5 φορές και τα αποτελέσματά του, δηλαδή η ανάκτηση (%) και η επαναληψιμότητα (RSD) της μεθόδου για το εντομοκτόνο, φαίνεται στους Πίνακες 1 και 2.

Πίνακας 1. Μέση τιμή ανάκτησης και σχετική τυπική απόκλιση για το thiamethoxam σε φορτισμένα δείγματα καρπών τομάτας.

Επίπεδο φόρτισης (mg kg ⁻¹)	Ανάκτηση %	RSD %
0,02	105	10
0,08	99	8
0,16	97	7
0,20	101	4

Πίνακας 2. Μέση τιμή ανάκτησης και σχετική τυπική απόκλιση για το thiamethoxam σε φορτισμένα δείγματα καρπών τομάτας.

Επίπεδο φόρτισης (mg kg ⁻¹)	Ανάκτηση %	RSD %
0,2	107	13
1,0	99	8
2,0	----	----
5,0	94	5

Οι τιμές ανάκτησης που προέκυψαν είναι ικανοποιητικές, καθώς είναι γνωστό ότι όταν η ανάκτηση κυμαίνεται μεταξύ 70% και 110% της συγκέντρωσης με την οποία φορτίστηκε ο μάρτυρας τότε θεωρείται αποδεκτή και τα αποτελέσματα αξιόπιστα (Council Directive 94/43/EC, Greve, 1984). Επίσης οι τιμές των σχετικών τυπικών αποκλίσεων είναι πολύ καλές και οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η μέθοδος που εφαρμόσαμε παρουσιάζει καλή επαναληψιμότητα.

Η αξιολόγηση αυτή αφορά τη μεθοδολογία που ακολουθήθηκε σχετικά με την επεξεργασία (εκχύλιση και καθαρισμό του εκχυλίσματος) του δείγματος με τον καθαρισμό με κατανομή υγρού-υγρού. Οι δοκιμασίες που έγιναν ακολουθώντας τη διαδικασία καθαρισμού με φυσίγγια στερεάς φάσης αν και σε υδατικά υποστρώματα έχουν δώσει πολύ καλά αποτελέσματα, όπως προκύπτει από την εμπειρία του

Εργαστηρίου Αναλυτικής Χημείας και Γεωργικής Φαρμακολογίας δεν παρουσίασαν ούτε πολύ καλές αποδόσεις ούτε ικανοποιητικές επαναληψιμότητες (Πίνακες Β 3 και Β4) και για το λόγο αυτό δεν προτιμήθηκε τελικά η μεθοδολογία αυτή.

Πίνακας 3. Μέση τιμή ανάκτησης και σχετική τυπική απόκλιση για το thiamethoxam σε φορτισμένα δείγματα καρπών τομάτας μετά από καθαρισμό με SPE αντίστροφης φάσης.

Επίπεδο φόρτισης (mg kg ⁻¹)	Ανάκτηση %	RSD %
0,02	136	36
0,08	129	38
0,16	---	---
0,20	117	25

Πίνακας 4. Μέση τιμή ανάκτησης και σχετική τυπική απόκλιση για το thiamethoxam σε φορτισμένα δείγματα φύλλων τομάτας μετά από καθαρισμό με SPE αντίστροφης φάσης.

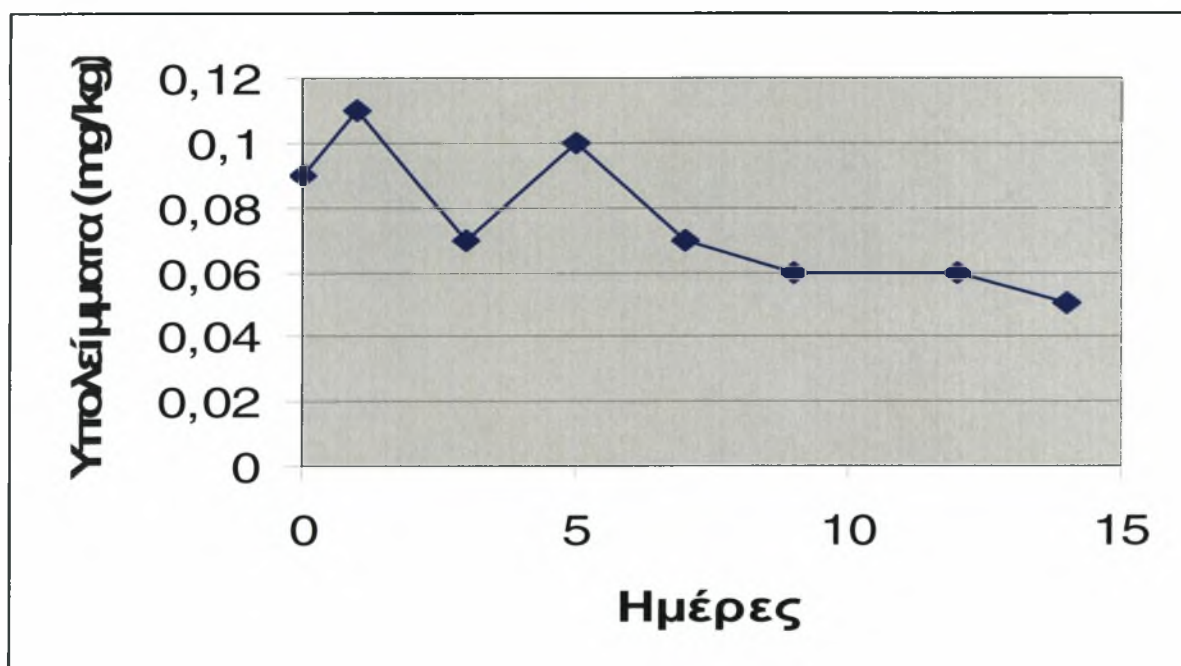
Επίπεδο φόρτισης (mg kg ⁻¹)	Ανάκτηση %	RSD %
0,2	127	42
1,0	124	39
2,0	---	---
5,0	97	29

3.4 Μεταβολή υπολειμμάτων του thiamethoxam σε καρπούς και σε φύλλα τομάτας υπαίθριας καλλιέργειας

Οι μέσες τιμές των υπολειμμάτων του εντομοκτόνου σε καρπούς τομάτας και σε φύλλα τομάτας που συλλέχθηκαν σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα από την εφαρμογή του στην υπαίθρια καλλιέργεια στο Αγρόκτημα του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στο Βελεστίνο το Σεπτέμβριο του 2007 παρουσιάζονται στους Πίνακες 5 και 6, αντίστοιχα καθώς επίσης και στα διαγράμματά τους 3 και 4, αντίστοιχα για καρπούς και φύλλα τομάτας.

Πίνακας 5. Υπολείμματα (mg kg^{-1}) thiamethoxam σε δείγματα καρπών τομάτας και σχετική τυπική απόκλιση ($n=3$) σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα από το ψεκασμό (Σεπτέμβριος 2007).

Ημέρες από την εφαρμογή	Υπολείμματα (mg kg^{-1})	RSD %
0	0,09	17
1	0,11	14
3	0,07	13
5	0,10	21
7	0,07	11
9	0,06	13
12	0,06	22
14	0,05	17



Διάγραμμα 3. Καμπύλη αναφοράς των υπολειμμάτων του Thiamethoxam στους καρπούς σε σχέση με την ημέρα συλλογής τους

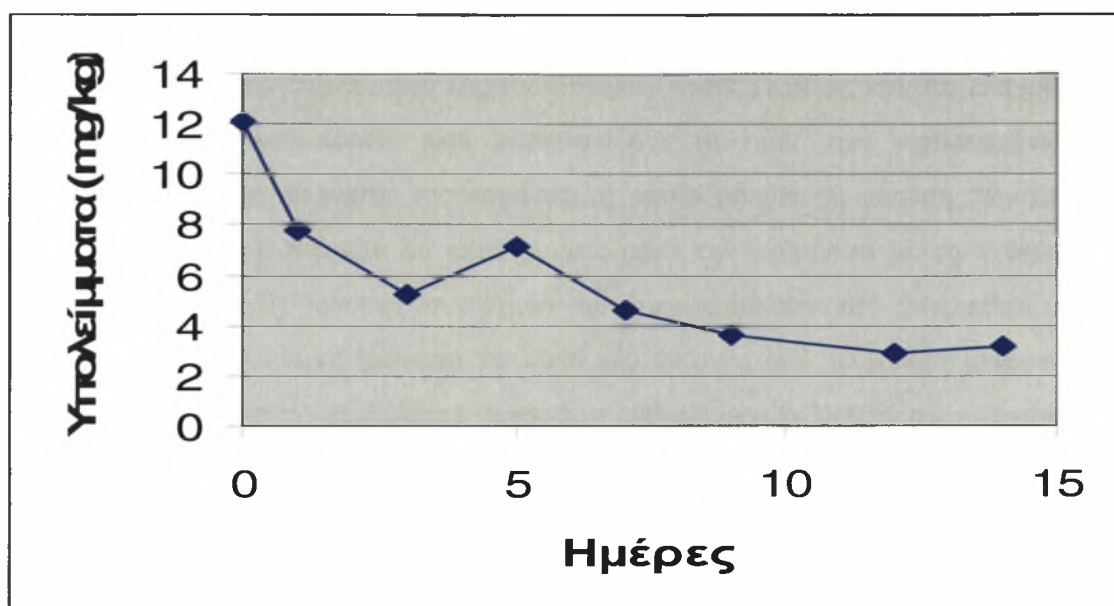
Παρατηρούμε πως η συγκέντρωση του thiamethoxam κατά την ημέρα της εφαρμογής του εντομοκτόνου κυμαινόταν σε συγκεντρώσεις γύρω στο 0,09mg/kg, με υψηλότερη συγκέντρωση κατά την πρώτη ημέρα μετά την εφαρμογή του εντομοκτόνου (0,11mg/kg) και έπειτα ακολούθησε ελαφρώς πτωτική πορεία (έως 0,05mg/kg) με μία εξαίρεση κατά την πέμπτη ημέρα όπου είχαμε 0,10mg/kg.

Επίσης στον Πίνακα 6 και στο Διάγραμμα 4 παρουσιάζεται σε απεικόνιση η πορεία των υπολειμμάτων του thiamethoxam σε φύλλα τομάτας που συλλέχθηκαν σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα από την εφαρμογή του σκευάσματος.

Πίνακας 6. Υπολείμματα (mg kg^{-1}) thiamethoxam σε δείγματα φύλλων τομάτας και σχετική τυπική απόκλιση ($n=3$) σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα από τον ψεκασμό (Σεπτέμβριος 2007).

Ημέρες από την εφαρμογή	Υπολείμματα (mg kg^{-1})	RSD %
0	12,1	22
1	7,8	18
3	5,2	26
5	7,1	32
7	4,6	21
9	3,6	12
12	2,9	20
14	3,2	14

Η συγκέντρωση του thiamethoxam στα φύλλα των φυτών την ημέρα του ψεκασμού είναι σε πολύ υψηλά επίπεδα (περίπου 12 mg/Kg). Με το πέρασμα των ημερών όμως η συγκέντρωση ακολουθεί πτωτική πορεία μέχρι την τελευταία δειγματοληψία όπου μειώνεται αρκετά (3-4 mg/Kg). Η διακύμανση αυτή της συγκέντρωσης του thiamethoxam είναι αναμενόμενη καθώς με την πάροδο των ημερών το φάρμακο μεταβολίζεται από το φυτό.



Διάγραμμα 4. Καμπύλη αναφοράς των υπολειμμάτων του Thiamethoxam στα φύλλα σε σχέση με την ημέρα συλλογής τους (ημέρες από την εφαρμογή, ΗΑΕ)

Συγκεκριμένα την ημέρα της εφαρμογής, μερικές ώρες μετά το ψεκασμό (0 ΗΑΕ, Ημέρες Από την Εφαρμογή), οι μέσες συγκεντρώσεις που παρατηρήθηκαν ήταν κοντά στα 12 mg/Kg με εύρος τιμών από 9,6-14,6 mg/Kg. Με το πέρασμα των ημερών η συγκέντρωση ακολουθεί πτωτική πορεία μέχρι την τελευταία δειγματοληψία (~3 mg/Kg). Η μισή της αρχικής συγκέντρωσης εμφανίζεται μετά από 3-5 ημέρες περίπου από την εφαρμογή του γεωργικού φαρμάκου.

Η πορεία αυτή μείωσης των υπολειμμάτων του Thiamethoxam στους καρπούς αλλά κυρίως στα φύλλα, αποδίδεται αφενός στο μεταβολισμό του thiamethoxam εντός του φυτού και αφετέρου στην έκθεσή του σε περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως για παράδειγμα η ηλιακή ακτινοβολία και η θερμότητα.

3.5 Συμπεράσματα

Από τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν στους Πίνακες και στα Διαγράμματα φαίνεται μια πτωτική πορεία που παρουσιάζουν οι τιμές των υπολειμμάτων του thiamethoxam στους καρπούς της τομάτας, η οποία οδηγεί τη μείωση των αρχικών αποθέσεων στο μισό περίπου σε επτά ημέρες μετά την επέμβαση με το εντομοκτόνο σκεύασμα. Ο ρυθμός μείωσης των τιμών των υπολειμμάτων του thiamethoxam στα φύλλα που παρατηρήθηκε φαίνεται να είναι πιο έντονος από το ρυθμό μείωσης τους στους καρπούς και αυτό αποδίδεται, εκτός του ρυθμού μεταβολισμού στους ιστούς, στο ότι η έκθεσή του εντομοκτόνου σε περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως για παράδειγμα η ηλιακή ακτινοβολία είναι μεγαλύτερη από την έκθεση των καρπών. Στη μείωση των υπολειμμάτων συμμετέχει εκτός των περιβαλλοντικών παραμέτρων και ο μεταβολισμός του εντομοκτόνου στους φυτικούς ιστούς, αφού το thiamethoxam είναι έντονα διασυστηματική ουσία .

Οι τιμές της συγκεντρώσεως του thiamethoxam στα φύλλα παρατηρήθηκε να είναι σαφώς και σταθερά υψηλότερες από αυτές στους καρπούς της τομάτας. Αυτό παρατηρήθηκε τόσο στην αρχική απόθεση (0 Ημέρες από την επέμβαση, ΗΑΕ), όπου η μέση συγκέντρωση στα φύλλα βρέθηκε 12,1 mg/kg και στους καρπούς 0,09 mg/kg, όσο και σε όλη τη διάρκεια των μετρήσεων του πειράματος, όπως για παράδειγμα στις 5 ΗΑΕ όπου η μέση συγκέντρωση στα φύλλα βρέθηκε 7,1 mg/kg, ενώ στους καρπούς 0,10 mg/kg. Αυτό αποδίδεται στο γεγονός ότι στα φύλλα η τιμή του λόγου επιφάνεια προς μάζα είναι πολύ μεγαλύτερη από αυτή στους καρπούς και επομένως οι συγκεντρώσεις εκφραζόμενες σε mg δ.ο. ανά kg ιστού παρουσιάζουν σημαντική διαφοροποίηση.

Αναλυτικότερα, στα φύλλα μετρήθηκαν υπολείμματα thiamethoxam από 12.1 mg/kg (0 ημέρα), τα οποία σταδιακά μειώνονταν στο χρόνο μέχρι 7,1 mg/kg στις 7 ΗΑΕ και 3.2 mg/kg την τελευταία ημέρα δειγματοληψίας (14 ΗΑΕ). Στους καρπούς οι συγκεντρώσεις των υπολειμμάτων αν και δεν παρουσιάζουν μεγάλη πτώση για το χρονικό διάστημα του πειράματος μας, μειώνονται σταθερά στο χρόνο από 0,09 mg/kg (0 ημέρα) μέχρι 0,07 mg/kg στις 7 ΗΑΕ και 0,05 mg/kg την τελευταία ημέρα δειγματοληψίας (14 ΗΑΕ).

Οι τιμές της συγκέντρωσης των υπολειμμάτων του thiamethoxam που μετρήθηκαν στους καρπούς τομάτας του πειράματός μας συγκρίθηκαν με τις τιμές MRL που εφαρμόζονται σε διάφορες χώρες (Πίνακας 7).

Πίνακας 7. Τιμές MRL (mg/kg) για το thiamethoxam στην τομάτα

Χώρα	Ιαπωνία	Αμερική	Ευρώπη	Εθνικό
Τιμή MRL	0.5	0.25	0.2	0.2

Σε καμία περίπτωση κατά τη διάρκεια του πειράματος μας τα υπολείμματα του thiamethoxam στους καρπούς τομάτας δεν υπερέβησαν την τιμή του εθνικού και κοινοτικού Ανώτατου Επιτρεπτού Ορίου (MRL), που είναι 0.2 mg/kg, ακόμη και λίγες ώρες μετά την εφαρμογή του σκευάσματος. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η εφαρμογή του νεονικοτενοειδούς εντομοκτόνου σκευάσματος Actara 25WG με τις συνιστώμενες δόσεις σε υπαίθρια καλλιέργεια τομάτας στις συνθήκες του πειράματος μας είναι ασφαλής όσον αφορά τα επίπεδα των υπολειμμάτων του thiamethoxam στους καρπούς τομάτας.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Γκαγκούλια Αθανασία, 2004.** Πτυχιακή διατριβή « Παρακολούθηση της πορείας των υπολειμμάτων του εντομοκτόνου flufenoxuron σε σταφύλια της περιοχής Νέας Αγχιάλου Μαγνησίας και στη διάρκεια οινοποίησης τους. » Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Βόλος.
2. **ΕΟΚ, 1991.** Residues data from supervised trials. Document αριθ. 5395/VI/91
3. **Κουππαρή Άννα.** Παρουσίαση από συνέδριο με θέμα «Αξιολόγηση κινδύνου από τα φυτοφάρμακα προσδιορισμός υπολειμμάτων στα φρούτα και λαχανικά – Σημείο συγκομιδής.» Λευκωσία, Φεβρουάριος, 2007.
4. **Λεγάκης Φοίβος, 2006.** Δημοσίευση σε περιοδικό με θέμα « Γεωργία και Τροφές.»
5. **Λέντζα-Ρίζου Χ., 1999.** Μέθοδοι προσδιορισμού υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων. Μεταβολισμός των Φυτοφαρμάκων- Αποικοδόμηση. Γεωργική Φαρμακολογία. Πανεπιστημιακές Σημειώσεις, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.
6. **Λέντζα-Ρίζου Χ., 1997.** Γεωργική Φαρμακολογία, Διδακτικές Σημειώσεις, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής και Ζωικής Παραγωγής, Βόλος.
7. **Λόλας Χ. Πέτρος, 2003.** Ζιζανιολογία, Ζιζάνια- Ζιζανιοκτόνα, Τύχη και συμπεριφορά στο περιβάλλον. Εκδόσεις Σύγχρονη Παιδεία, Θεσσαλονίκη.
8. **Μηλιάδης Γ.Ε., 1985.** Αναλύσεις για προσδιορισμό υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων. Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο
9. **Μπελή Αικατερίνη, 2005.** Πτυχιακή διατριβή «Συγκριτική παρακολούθηση υποβάθμισης υπολειμμάτων δύο σκευασμάτων fenitrothion σε σταφύλια σε αμπελώννα της περιοχής Ν. Αγχιάλου.» Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Βόλος.
10. **Ολύμπιος Μ. Χρίστου, 2001.** Η Τεχνική της Καλλιέργειας των Κηπευτικών στα Θερμοκήπια. Εκδόσεις Αθ. Σταμούλης, Αθήνα.
11. **Παπαδή-Ψύλλου Ασημίνα, 2007.** Πτυχιακή διατριβή «Ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού υπολειμμάτων του εντομοκτόνου pyriproxyfen σε λαχανικά. Παρακολούθηση της υποβάθμισης του pyriproxyfen σε λαχανικά σε πειράματα αγρού.» Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Βόλος.
12. **Παναγόπουλος Γ. Σ., 1984.** Βασικές γνώσεις Φυτοπαθολογίας. Αθήνα.
13. **Σταμόπουλος Κ. Δημ., 1999.** Έντομα αποθηκών μεγάλων καλλιεργειών και λαχανικών. Εκδόσεις Ζήτη, Θεσσαλονίκη.
14. **Τζανακάκης Ε. Μίνως, 1995.** Εντομολογία. Εκδόσεις University Studio Press, Θεσσαλονίκη.

ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

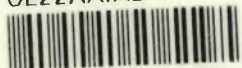
1. **Benton Jones, J. Jr., 1999.** Tomato plant culture. U.S.A.
2. **Council Directive 94/43/EC. Off. J. Eur. Com. L227 (1994).**
3. **FAO/WHO, 1994.** Guide to Codex Recommendations concerning pesticide residues.
4. **Ishaaya I., Cock A. and Degheele D., 1994.** Pyriproxyfen, a potent suppressor of egg hatch and adult formation of the greenhouse whitefly. *Journal of Economic Entomology*, 87 (5): 1185-1189
5. **Lundehn J.R., 1993.** Guidelines for the establishment of Community Maximum Residues Levels (MRLs) of plant protection products in food and foodstuffs of plant and animal origin. Study prepared for the DGVI of the Commission of European Communities.
6. **Zidan Z. H., Selim A. A., Afifi F. A., Abdel-Daim Y. A. and Mohamed K. A., 1996.** Decontamination of insecticide residues from vegetables through laboratory processing. *Annals of Agricultural Science Cairo*, 41 (2): 1051-1064.
7. **Sarlis-Aplada P., Liapis K. And Miliadis G., 1994.** Study of procymidone and propargite residue levels resulting from application to greenhouse tomatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42 (7): 1575-1577
8. **Tomizawa, T., Casida, E. J., 2005.** Neonicotinoid insecticide toxicology: Mechanisms of Selective Action. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* vol. 45, 247-68.
9. **The pesticide manual**, 10 Ed., British crop protection council and the royal society of chemistry, London, UK

Ηλεκτρονικές Διευθύνσεις

1. <http://europa.eu.int/eur-lex/lex/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:32004D0304:EL:NOT>
2. <http://www.minagric.gr/Greek/data/ACTARA.pdf>
3. http://www.agro.bayer.gr/productsinfo.asp?pr_category_id=9&product_id=22
4. http://www.teilar.gr/schools/steg/agriculture/lessons/lessons_online/internet%20papadopoulos/28a.htm
5. <http://www.froutonea.gr/gr/main/week.asp>
6. <http://geoplexus.net/2007/06/page/2/>



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000097437