



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ  
Εθνικόν και Καποδιστριακόν  
Πανεπιστήμιον Αθηνών  
———— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 ————

**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»  
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ  
«ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»**

**ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

**Ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδων προσδιορισμού  
υπολειμμάτων πολικών γεωργικών φαρμάκων σε  
ρύζι με υγροχρωματογραφία-φασματομετρία μαζών  
σε σειρά**

**ΘΩΜΑ ΝΙΚΗ-ΑΙΜΙΛΙΑ  
ΧΗΜΙΚΟΣ**

**ΑΘΗΝΑ**

**ΙΟΥΝΙΟΣ 2019**



## **ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

Ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδων προσδιορισμού υπολειμμάτων πολικών γεωργικών φαρμάκων σε ρύζι με υγροχρωματογραφία-φασματομετρία μαζών σε σειρά

**ΘΩΜΑ ΝΙΚΗ-ΑΙΜΙΛΙΑ**

**A.M.: 11703**

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:**

Αναστάσιος Οικονόμου, Καθηγητής ΕΚΠΑ

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ ΟΙΚΟΝΟΜΟΥ**

**ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ ΜΠΑΚΕΑΣ**

**ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΘΩΜΑΙΔΗΣ**

**ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ**

**21-06-2019**



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία αναπτύχθηκαν και επικυρώθηκαν δύο υπολειμματικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό καταλοίπων 6 φυτοφαρμάκων υψηλής πολικότητας, τα chlormequat, meququat, paraquat, glyphosate, glufosinate, etherphon σε δείγματα ρυζιού. Συγκεκριμένα, ως τεχνική προετοιμασίας του δείγματος εφαρμόστηκε η μέθοδος QuPPE (Quick Polar Pesticides Extraction) και τα εκχυλίσματα αναλύθηκαν με υγροχρωματογραφία-φασματομετρία μαζών σε σειρά (LC-MS/MS) για την ανίχνευση και τον προσδιορισμό 6 πολικών φυτοφαρμάκων. Στη συνέχεια, οι δύο μέθοδοι επικυρώθηκαν και αξιολογήθηκαν, σύμφωνα με την οδηγία της Ευρωπαϊκής Επιτροπής SANTE/11813/2017, ως προς τα χαρακτηριστικά της γραμμικότητας, ορθότητας και πιστότητας (τόσο υπό συνθήκες επαναληψιμότητας όσο και ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας), προσδιορίστηκαν τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης και εκτιμήθηκε η επίδραση μήτρας.

Η ταυτοποίηση και η ποσοτικοποίηση των αναλυτών-στόχων πραγματοποιήθηκε με LC-ESI-MS/MS με ιοντισμό με ηλεκτροδιάχυση (LC-ESI-MS/MS). Η αναλυτική μέθοδος αποδείχτηκε κατάλληλη για τον προσδιορισμό των φυτοφαρμάκων που μελετήθηκαν σε δείγματα ρυζιού, καθώς εμφάνισε ικανοποιητική απόδοση κατά την επικύρωση ενώ είναι επίσης απλή, οικονομική και γρήγορη.

**ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ:** Αναλυτική Χημεία

**ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ:** πολικά φυτοφάρμακα, ρύζι, υγροχρωματογραφία, φασματομετρία μαζών, επικύρωση, QuPPE



## **ABSTRACT**

In this work two single-residue methods for the determination of 6 polar pesticide residues, chlormequat, mepiquat, paraquat, glyphosate, glufosinate, ethephon, in rice were developed and validated. The sample preparation was performed using the QuPPE method (Quick Polar Pesticides Extraction) and the extracts were analyzed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for the detection and quantification of 6 polar pesticides mentioned above. The method was validated according to the EU Guidelines for pesticide residues SANTE/11813/2017 for linearity, accuracy and precision (repeatability and reproducibility) while the limit of detection and quantification were evaluated along with the matrix effect.

The detection and the quantification of the analytes was performed with LC-MS/MS with electro-spray ionisation (LC-ESI-MS/MS). The analytical method proved fit-for-purpose for the determination of the six polar pesticides in rice samples, as it has satisfactory analytical performance and is also simple, rapid and cost-effective.

**SUBJECT AREA:** Analytical Chemistry

**KEYWORDS:** polar pesticides, rice, liquid chromatography, mass spectrometry, validation, QuPPE



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

|                                                                        |           |
|------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....</b>                                                   | <b>17</b> |
| <b>1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ.....</b>                   | <b>18</b> |
| 1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....                                                     | 18        |
| 1.2 ΟΡΙΣΜΟΙ .....                                                      | 18        |
| 1.3 ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ.....                                         | 20        |
| 1.3.1 ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟ ΣΤΟΧΟ .....                                | 20        |
| 1.3.2 ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΗ ΔΡΑΣΤΙΚΗ ΤΟΥΣ ΟΥΣΙΑ.....                              | 21        |
| 1.3.3 ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΗΝ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥΣ.....                                 | 23        |
| 1.4 ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ .....                                                    | 24        |
| 1.4.1 ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΝΟΜΟΘΕΤΙΚΑ ΟΡΙΑ.....                              | 24        |
| 1.4.2 ΣΕ ΕΥΡΩΠΑΙΚΟ ΕΠΙΠΕΔΟ .....                                       | 25        |
| 1.4.3 ΣΥΣΤΗΜΑ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ .....                                        | 26        |
| <b>2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ .....</b> | <b>27</b> |
| 2. 1 ΠΟΛΥ-ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ.....                                  | 27        |
| 2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΜΕΜΟΝΩΜΕΝΩΝ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ.....           | 34        |
| 2.2.1 QUATS.....                                                       | 35        |
| 2.2.2 GLYPHOSATE.....                                                  | 37        |
| 2.2.3 GLUFOSINATE.....                                                 | 40        |
| 2.2.4 ETHERPHON .....                                                  | 41        |
| <b>3. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ.....</b>             | <b>43</b> |
| 3.1 QUPPE.....                                                         | 43        |
| 3.2 SPE .....                                                          | 44        |

|                                                                            |           |
|----------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.3 ΠΑΡΑΓΩΓΟΠΟΙΗΣΗ ΓΙΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ GLYPHOSATE .....                       | 44        |
| <b>4.ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΚΑΙ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ .....</b> | <b>47</b> |
| 4.1 ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HPLC) .....                         | 47        |
| 4.1.1 ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ .....                                    | 49        |
| 4.1.2 HYDROPHILIC INTERACTION LIQUID CHROMATOGRAPHY .....                  | 50        |
| 4.2 ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ .....                                              | 54        |
| 4.2.1 ΙΟΝΤΙΣΜΟΣ ΜΕ ΗΛΕΚΤΡΟΨΕΚΑΣΜΟ .....                                    | 54        |
| 4.2.2 ΤΕΤΡΑΠΟΛΙΚΟΣ ΑΝΑΛΥΤΗΣ .....                                          | 55        |
| 4.2.3 ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ ΤΡΙΠΛΟΥ ΤΕΤΡΑΠΟΛΟΥ (QQQ) .....                            | 55        |
| 4.2.4 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΣΑΡΩΣΗΣ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΩΝ .....                          | 56        |
| <b>5. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ – ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ .....</b>                  | <b>57</b> |
| 5.1. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟΣ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ .....                                     | 57        |
| 5.2. ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΜΕΣΩ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΑΣ .....                           | 57        |
| 5.3. ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗΣ ΚΑΙ ΚΡΙΤΗΡΙΑ .....                              | 59        |
| 5.3.1. ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΜΠΥΛΩΝ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗΣ .....                            | 59        |
| 5.3.2. ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΜΗΤΡΑΣ .....                                     | 59        |
| 5.3.3 ΟΡΘΟΤΗΤΑ ΜΕΘΟΔΟΥ .....                                               | 59        |
| 5.3.4 ΠΙΣΤΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ .....                                          | 60        |
| 5.3.4.1 ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑ ΜΕΘΟΔΟΥ .....                                      | 60        |
| 5.3.4.2 ΕΝΔΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΜΟΤΗΤΑ .....                           | 60        |
| 5.3.7 ΟΡΙΑ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ .....                                           | 61        |
| 5.3.8 ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ .....                                                     | 61        |
| 5.4 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΑΒΕΒΑΙΟΤΗΤΑΣ .....                                            | 61        |
| ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ .....                                                  | 68        |

|                                                                                 |           |
|---------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>6. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΟΡΓΑΝΑ, ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ .....</b>  | <b>69</b> |
| 6.1 ΟΡΓΑΝΟ, ΣΤΗΛΕΣ, ΛΟΓΙΣΜΙΚΟ .....                                             | 69        |
| 6.1.1 ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ.....                                           | 69        |
| 6.1.2 ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΣΤΗΛΕΣ .....                                                   | 69        |
| 6.1.3 ΛΟΓΙΣΜΙΚΟ ΓΙΑ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ..                       | 70        |
| 6.2 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ .....                                              | 70        |
| 6.3 ΔΙΑΛΥΤΕΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ .....                                            | 70        |
| 6.4 ΠΡΟΤΥΠΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΚΑΙ ΠΡΟΤΥΠΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ .....                                 | 71        |
| 6.4.1 ΠΡΟΤΥΠΑ ΠΥΚΝΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΠΑΡΑΚΑΤΑΘΗΚΗΣ ΜΕΜΟΝΩΜΕΝΩΝ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ .....      | 71        |
| 6.4.2 ΠΡΟΤΥΠΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ ΜΙΓΜΑΤΩΝ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ.....                     | 72        |
| 6.4.3 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗΣ ΜΙΓΜΑΤΟΣ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ .....                        | 72        |
| <b>7. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7. ΜΕΛΕΤΗ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ LC-MS/MS, ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ .....</b> | <b>74</b> |
| 7.1 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ, ΕΠΙΛΟΓΗ ΒΕΛΤΙΣΤΩΝ ΣΥΝΘΗΚΩΝ .....                    | 74        |
| 7.1.1 ΕΠΙΛΟΓΗ ΣΤΗΛΩΝ .....                                                      | 75        |
| 7.1.2 ΕΠΙΛΟΓΗ ΚΙΝΗΤΩΝ ΦΑΣΕΩΝ .....                                              | 77        |
| 7.2 ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ .....                                                   | 81        |
| 7.2.1 ΜΕΛΕΤΗ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΗΛΕΚΤΡΟΨΕΚΑΣΜΟΥ (ESI).....                              | 81        |
| 7.2.2 ΜΕΛΕΤΗ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΘΡΑΥΣΜΑΤΟΠΟΙΗΣΗΣ (MS/MS) .....                          | 84        |
| 7.3 ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ – ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΡΥΖΙΟΥ .....                        | 86        |
| <b>8. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8. ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ .....</b>                                   | <b>87</b> |
| 8.1 ΧΡΟΝΟΙ ΚΑΤΑΚΡΑΤΗΣΗΣ .....                                                   | 87        |

|                                                |           |
|------------------------------------------------|-----------|
| 8.2 ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΜΠΥΛΩΝ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗΣ.....    | 87        |
| 8.3 ΟΡΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ.....   | 88        |
| 8.4 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΦΑΙΝΟΜΕΝΟΥ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΜΗΤΡΑΣ ..... | 90        |
| 8.5 ΟΡΘΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ.....                  | 91        |
| 8.6 ΠΙΣΤΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ.....                 | 93        |
| 8.6.1 ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑ ΜΕΘΟΔΟΥ.....             | 93        |
| 8.6.2 ΕΝΔΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΜΟΤΗΤΑ.....  | 93        |
| <b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....</b>                       | <b>95</b> |
| ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ .....                  | 97        |
| ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ.....                         | 104       |
| ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ.....      | 105       |

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 2.1 Απεικονίσεις των ενώσεων της κατηγορίας των Quats**Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.**5

Σχήμα 2.2 : Απεικόνιση του glyphosate**Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.**7

Σχήμα 2.3 : Απεικόνιση του glufosinate .....40

Σχήμα 2.4 : Απεικόνιση του ethephon.....41

Σχήμα 4.1: Παράδειγμα διάταξης HPLC**Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.**9

Σχήμα 4.2: Μηχανισμός αλληλεπίδρασης αναλύτη-στατικής φάσης χρωματογραφίας HILIC.....50

Σχήμα 4.3: Στήλη Polar RP .....52

Σχήμα 4.4: Στήλη Hypercarb.....53

Σχήμα 4.5: Διάγραμμα Τετραπολικού Αναλυτή μαζών.....55

Σχήμα 4.6: Ανιχνευτής Τριπλού Τετραπόλου (QqQ).....55

Σχήμα 7.1: χρωματογραφήματα των ενώσεων CQ, MQ, PQ συγκέντρωσης 200ppb μετά από χρήση στηλών: a) Obelisc R, b) Polar-RP.....75

Σχήμα 7.2: χρωματογραφήματα των ενώσεων GLY, GLU, Ethephon συγκέντρωσης των 200ppb μετά από χρήση στηλών: a) Polar-RP, b) Hypercarb .....76

Σχήμα 7.3: χρωματογραφήματα των ενώσεων CQ, MQ, PQ συγκέντρωσης 200ppb μετά από χρήση κινητών φάσεων A: a) νερό, 20 mM φορμικό αμμώνιο, 1% (w/v) φορμικό οξύ, b) νερό, 10 mM φορμικό αμμώνιο, 0,1% (w/v) φορμικό οξύ.....77

Σχήμα 7.4: χρωματογραφήματα των ενώσεων GLY, GLU, Ethephon συγκέντρωσης 200ppb μετά από χρήση κινητών φάσεων A: a) νερό, 20 mM φορμικό αμμώνιο, 1% (w/v) φορμικό οξύ, b) νερό, 10 mM φορμικό αμμώνιο, 2% (w/v) φορμικό οξύ .....78

Σχήμα 7.5: Σύγκριση αποτελεσμάτων για το glyphosate μεταξύ των τιμών προς μελέτη για την παράμετρο IV σε μίγμα glyphosate, glufosinate, ethephon 1ppm σε διαλύτη .....84

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

|                                                                                                                                                                                                                            |                                                |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| <u>Πίνακας 1.1: Παραδείγματα κατηγοριών φυτοφαρμάκων βάση οργανισμού στόχου</u> .....                                                                                                                                      | 20                                             |
| <u>Πίνακας 1.2: Παραδείγματα κατηγοριών φυτοφαρμάκων βάση τοξικότητας</u> .....                                                                                                                                            | <b>Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.</b> |
| <u>Πίνακας 2.1: Αντιπροσωπευτικές εφαρμογές χρωματογραφικού προσδιορισμού φυτοφαρμάκων σε χυμό με διάφορες τεχνικές προκατεργασίας</u> .....                                                                               | 29                                             |
| <u>Πίνακας 4.1: Παραδείγματα στηλών για χρήση σε συνθήκες HILIC</u> .....                                                                                                                                                  | 51                                             |
| <u>Πίνακας 5.1: Απαιτήσεις ταυτοποίησης</u> .....                                                                                                                                                                          | 58                                             |
| <u>Πίνακας 5.2: Παραδείγματα μεθόδων υπολειμμάτων μεμονωμένων γεωργικών φαρμάκων</u> .....                                                                                                                                 | 64                                             |
| <u>Πίνακας 6.1: Διαλύματα παρακαταθήκης των 6 φυτοφαρμάκων που μελετώνται</u> .....                                                                                                                                        | 71                                             |
| <u>Πίνακας 6.2: Παρασκευή διαλυμάτων βαθμονόμησης εκχυλισμάτων ρυζιού από εφαρμογή της QuPPE (6 επίπεδα)</u> .....                                                                                                         | 73                                             |
| <u>Πίνακας 7.1: Στήλες και κινητές φάσεις που μελετήθηκαν κατά τη βελτιστοποίηση της χρωματογραφικής ανάλυσης α) στήλες, b) κινητές φάσεις για τις επιλεχθείσες στήλες</u> .....                                           | 74                                             |
| <u>Πίνακας 7.2: Συνθήκες βαθμιδωτής έκλουσης</u> .....                                                                                                                                                                     | 79                                             |
| <u>Πίνακας 7.3: Χρόνοι κατακράτησης (rt) των 3 φυτοφαρμάκων</u> .....                                                                                                                                                      | 79                                             |
| <u>Πίνακας 7.4: Εντολές διαδικασίας εισαγωγής δείγματος</u> .....                                                                                                                                                          | 80                                             |
| <u>Πίνακας 7.5: Συνθήκες βαθμιδωτής έκλουσης</u> .....                                                                                                                                                                     | 81                                             |
| <u>Πίνακας 7.6: χρόνοι κατακράτησης (rt) των 3 φυτοφαρμάκων</u> .....                                                                                                                                                      | 81                                             |
| <u>Πίνακας 7.7: Συνθήκες ηλεκτροψεκασμού και παράμετροι ανίχνευσης για την αναλυτική μέθοδο 1</u> .....                                                                                                                    | 82                                             |
| <u>Πίνακας 7.8: Συνθήκες ηλεκτροψεκασμού και παράμετροι ανίχνευσης για την αναλυτική μέθοδο 2</u> .....                                                                                                                    | 83                                             |
| <u>Πίνακας 7.9: Ιόντα και ενέργειες που επιλέχθηκαν</u> .....                                                                                                                                                              | 85                                             |
| <u>Πίνακας 8.1: Παράμετροι βαθμονόμησης σε διαλύτη και οργανολογικό όριο ανίχνευσης (LOD) για το σύστημα LC-MS/MS (περιοχή βαθμονόμησης 2 έως 500 µg L-1, 9 πρότυπα)</u> .....                                             | 89                                             |
| <u>Πίνακας 8.2: Παράμετροι βαθμονόμησης σε ρύζι με τη μέθοδο QuPPE και τα όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ) της μεθόδου για το σύστημα LC-MS/MS (περιοχή βαθμονόμησης 2 έως 100 µg L-1, 6 πρότυπα)</u> ..... | 90                                             |
| <u>Πίνακας 8.3: Επίδραση φαινομένου της μήτρας</u> .....                                                                                                                                                                   | 91                                             |
| <u>Πίνακας 8.4: Τιμές μέσης ανάκτησης 10 μετρήσεων με τις αντίστοιχες σχετικές τυπικές αποκλίσεις σε 3 επίπεδα εμβολιασμού σε δείγμα ρυζιού</u> .....                                                                      | 92                                             |

|                                                                                                                                                                                     |            |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <u>Πίνακας 8.5: Τιμές των σχετικών τυπικών αποκλίσεων των ανακτήσεων 5 επαναλήψεων για καθένα από τα 3 επίπεδα εμβολιασμού στην ίδια μέρα, σε δείγμα ρυζιού .....</u>               | <u>93</u>  |
| <u>Πίνακας 8.6: Τιμές των σχετικών τυπικών αποκλίσεων των ανακτήσεων 5 επαναλήψεων για καθένα από τα 3 επίπεδα εμβολιασμού μεταξύ 2 διαφορετικών ημερών, σε δείγμα ρυζιού .....</u> | <u>94</u>  |
| <u>Πίνακας 1: Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων.....</u>                                                                                   | <u>104</u> |
| <u>Πίνακας 2: Ακρωνύμια και ανάπτυξή τους .....</u>                                                                                                                                 | <u>105</u> |



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε εξ' ολοκλήρου στο Εργαστήριο Υπολειμμάτων Φυτοφαρμάκων της Α' Χημικής Υπηρεσίας Αθηνών του Γενικού Χημείου του Κράτους.

Καταρχάς θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή του Τμήματος Χημείας Αναστάσιο Οικονόμου, τόσο για την ανάθεση αυτού του ενδιαφέροντος θέματος, καθώς και για τη βοήθειά του στα προβλήματα που προέκυπταν κατά την εκπόνησή της εργασίας.

Επίσης θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στη Διευθύντρια της Α' Χημικής Υπηρεσίας του Γενικού Χημείου του κράτους, Δρ. Δέσποινα Τσίπη, την προϊσταμένη του Εργαστηρίου Υπολειμμάτων Φυτοφαρμάκων, Δρ. Ελένη Μποτίτση και το Δρ. Σπύρο Αντωνίου για τη βοήθειά τους, όσον αφορά στην επιστημονική καθοδήγηση την υποστήριξη καθώς και τη συμβολή της στην περάτωση των πειραματικών μετρήσεων.

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

## ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ

### 1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα αγροχημικά προϊόντα έχουν οδηγήσει σε σημαντική αύξηση της παραγωγής τροφίμων κατά τον περασμένο αιώνα. Η χρήση τους είναι απαραίτητη λόγω της ταχείας ανάπτυξης του ανθρώπινου πληθυσμού που συνεπάγεται και την ανάγκη για περαιτέρω αύξηση της παραγωγής τροφίμων.

Έρευνες σε παγκόσμιο επίπεδο έχουν επιβεβαιώσει την επίδραση των αγροχημικών υπολειμμάτων σε εδάφη, χερσαία και υδάτινα οικοσυστήματα, καθώς και τις τοξικές τους συνέπειες στους ζώντανους οργανισμούς. Παρότι κάποιες ανθεκτικές οργανικές χημικές ουσίες έχουν αντικατασταθεί από άλλες περισσότερο βιοαποικοδομήσιμες, η επιμόλυνση από παλαιότερα ή νέα υπολείμματα των ουσιών αυτών εξακολουθεί να επηρεάζει την ποιότητα του νερού, των τροφίμων, του περιβάλλοντος [1].

### 1.2 ΟΡΙΣΜΟΙ

#### ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΑ ΠΡΟΙΟΝΤΑ Η ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ

Ο όρος «φυτοφάρμακο» περιλαμβάνει κάθε ουσία ή μείγμα ουσιών των οποίων η χρήση στοχεύει στην πρόληψη, καταστροφή, απώθηση ή μείωση της παρουσίας παρασίτων. Προορίζονται για χρήση ως ρυθμιστές φυτών, αποφυλλωτικά, ξηραντικά και σταθεροποιητές αζώτου [2].

#### “ΕΝΕΡΓΑ” ΚΑΙ “ΑΔΡΑΝΗ” ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ

Τα φυτοφάρμακα περιέχουν τουλάχιστον ένα ενεργό συστατικό και άλλα "αδρανή" συστατικά.

#### ΕΝΕΡΓΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ

Στα ενεργά συστατικά ανήκουν οι χημικές ουσίες των φυτοφαρμάκων, η δράση των οποίων στοχεύει στον έλεγχο των παρασίτων και σε αυτά οφείλονται οι προαναφερθείσες χρήσεις των φυτοφαρμάκων και η επίτευξη των παραπάνω διαδικασιών, σημαντικών για την προστασία του προϊόντος.

## **ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΕΝΕΡΓΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ**

Τα ενεργά συστατικά μπορούν να κατηγοριοποιηθούν στις παρακάτω ομάδες:

Συμβατικά: όλα τα συστατικά εκτός των βιολογικών και των αντιμικροβιακών παρασιτοκτόνων.

Αντιμικροβιακά: ουσίες ή μείγματα ουσιών χρήσιμα για την καταστροφή ή την καταστολή της ανάπτυξης επιβλαβών μικροοργανισμών (βακτήρια, ιοί, μύκητες).

Βιοπαρασιτοκτόνα: συστατικά προερχόμενα από φυσικά υλικά.

Η ονομασία των ενεργών συστατικών πρέπει να αναφέρεται στην ετικέτα του προϊόντος φυτοφαρμάκου για ταυτοποίηση, μαζί με το ποσοστό κατά βάρος του καθενός. Τα δραστικά συστατικά συνδυάζονται με αδρανή συστατικά για να παραχθεί ένα παρασιτοκτόνο.

## **ΑΔΡΑΝΗ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ**

Στα αδρανή συστατικά συμπεριλαμβάνονται χημικές και άλλες ουσίες, όπως κοινά τρόφιμα (π.χ. μπαχαρικά, βότανα) και φυσικά υλικά (π.χ. κερί μέλισσας). Ο χαρακτηρισμός ενός συστατικού ως αδρανές δεν πρέπει να ταυτίζεται με την έννοια του μη τοξικού. Γι αυτό και όλα τα αδρανή συστατικά πρέπει να εγκρίνονται από την EPA (Environmental Protection Agency) πριν τη χρήση τους.

Τα αδρανή συστατικά παίζουν βασικό ρόλο στην αποτελεσματικότητα των φυτοφαρμάκων, και στην απόδοση του προϊόντος:

Λειτουργούν ως διαλύτες, διευκολύνοντας το δραστικό συστατικό να διεισδύσει στην επιφάνεια του φύλλου του φυτού, κάνοντας έτσι πιο αποτελεσματική την εφαρμογή του. Επεκτείνουν τη διάρκεια ζωής του προϊόντος. Εξασφαλίζουν μεγαλύτερη ασφάλεια για αυτόν που εφαρμόζει το προϊόν. Αποτρέπουν την αποικοδόμηση του φυτοφαρμάκου. (Το συνολικό ποσοστό όλων των αδρανών συστατικών πρέπει να αναγράφεται στην ετικέτα του φυτοφαρμάκου) [3].

### 1.3 ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ

Υπάρχουν διάφοροι τρόποι κατάταξης των φυτοφαρμάκων. Παρακάτω παρατίθενται παραδείγματα αυτών καθώς και κάποιες από τις αντίστοιχες κατηγορίες που προκύπτουν.

#### 1.3.1 ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟ ΣΤΟΧΟ

Κατηγοριοποίηση των φυτοφαρμάκων μπορεί να γίνει με βάση τον οργανισμό-στόχους δράσης τους. Παραδείγματα ομάδων φυτοφαρμάκων αυτού του τρόπου κατηγοριοποίησης παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 1.1: Παραδείγματα κατηγοριών φυτοφαρμάκων βάση οργανισμού στόχου

| Κατηγορία Φυτοφαρμάκου    | Οργανισμός-Στόχος |
|---------------------------|-------------------|
| εντομοκτόνα               | έντομα            |
| ζιζανιοκτόνα              | ζιζάνια           |
| μυκητοκτόνα               | μύκητες           |
| ακαρεοκτόνα               | ακάρεα            |
| μαλακιοκτόνα              | μαλάκια           |
| νηματοδοκτόνα             | -                 |
| Φερομόνες                 | -                 |
| ρυθμιστές ανάπτυξης φυτών | -                 |
| Απωθητικά                 | -                 |
| Τρωκτικοκτόνα             | τρωκτικά          |

Οι κυριότερες από τις παραπάνω κατηγορίες είναι τα εντομοκτόνα που χρησιμοποιούνται για την εξουδετέρωση εντόμων και άλλων αρθροπόδων, τα ζιζανιοκτόνα για τον έλεγχο των ζιζανίων, καθώς και τα μυκητοκτόνα για τον έλεγχο των μυκήτων.

Τα ζιζανιοκτόνα απορροφούνται από τις ρίζες ή από τους ιστούς φύλλων, ανάλογα το σημείο που εφαρμόζονται. Ανάλογα με τον τρόπο δράσης τους τα ζιζανιοκτόνα μπορούν να χαρακτηριστούν είτε ως εκλεκτικά είτε ως μη

εκλεκτικά. Στην πρώτη περίπτωση υπάρχει το πλεονέκτημα ότι πραγματοποιείται έλεγχος ζιζανίων χωρίς να επηρεαστεί η καλλιέργεια ενώ τα μη εκλεκτικά ζιζανιοκτόνα μπορούν να εξοντώσουν όλη τη βλάστηση. Τα ζιζανιοκτόνα μπορούν να ταξινομηθούν ανάλογα με τη χημική τους σύνθεση. Σε αυτά ανήκουν μεταξύ άλλων οι ομάδες των καρβαμιδικών και των οργανοφωσφορικών ενώσεων, των τριαζινών, των πυριδινών, των αμιδίων, των ενώσεων τεταρτοταγούς αμμωνίου [4].

### **1.3.2 ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΗ ΔΡΑΣΤΙΚΗ ΤΟΥΣ ΟΥΣΙΑ**

Ένας άλλος τρόπος κατάταξης των φυτοφαρμάκων είναι με βάση τον τύπο ένωσης των δραστικών τους συστατικών. Παραδείγματα κατηγοριών:

#### **ΟΡΓΑΝΟΧΛΩΡΙΩΜΕΝΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ**

Παραδείγματα της κατηγορίας αποτελούν τα: DDT, Dieldrin, endosulfan, heptachlor, dicofolmethoxychlor κ.α. Οι ενώσεις αυτές, έχουν συνδεθεί με επιπτώσεις στην υγεία, όπως ενδοκρινικές διαταραχές, επιδράσεις στην εμβρυϊκή ανάπτυξη, αιματολογικές και ηπατικές μεταβολές, ενώ υπάρχουν ανησυχίες για πιθανή καρκινογόνο δράση [5]. Επίσης εξαιτίας της μεγάλης τους ανθεκτικότητας στην υδρόλυση, έχουν δημιουργηθεί ανησυχίες για την για την πιθανότητα βιοσυσσώρευσης τους και συνεπώς για την επίδραση τους στο περιβάλλον [6].

Το πιο γνωστό παρασιτοκτόνο αυτής της κατηγορίας είναι το διχλωροδιφαινυλτριχλωροαιθάνιο (DDT) το οποίο ανήκει στην κατηγορία των εντομοκτόνων. Η μη ελεγχόμενη χρήση του συνδέεται με θέματα περιβαλλοντικά και ανθρώπινης υγείας, καθώς υπάρχουν και ενδείξεις καρκινογόνους δράσης. Υποστηρίζεται ότι κάθε ζωντανός οργανισμός στον πλανήτη φέρει κάποιο φορτίο DDT. Κάποιες χώρες εξακολουθούν να το χρησιμοποιούν [5].

#### **ΟΡΓΑΝΟΦΩΣΦΟΡΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ**

Παραδείγματα της κατηγορίας αποτελούν τα: azinphosmethyl, μαλαθείο, παραθείο καθώς και το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο φυτοφάρμακο αυτής της ομάδας το glyphosate. Πρόκειται για μια μεγάλη και πιο οικολογική, σε σχέση με την προηγούμενη, ομάδα φυτοφαρμάκων. Οι ενώσεις αυτής της κατηγορίας χαρακτηρίζονται από μικρότερη ανθεκτικότητα και είναι διαλυτές

στο νερό μειώνοντας έτσι την πιθανότητα βιοσυσσώρευσής τους [5], [6]. Παρόλα αυτά έχουν συσχετιστεί με αρνητικές επιπτώσεις στην υγεία. Αναφορικά, έχουν σύνδεθεί με γενετοξικές επιδράσεις, προβλήματα στο νευρικό και ενδοκρινικό σύστημα κ.α. Επίσης τα φυτοφάρμακα αυτά έχουν συσχετιστεί με εκδήλωση καρδιαγγειακών παθήσεων, άνοιας, καθώς και με εμφάνιση νευρολογικών προβλημάτων σε παιδιά, σε περίπτωση προγενετικής έκθεσης [5].

### **ΚΑΡΒΑΜΙΔΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ**

Παραδείγματα αυτής της κατηγορίας αποτελούν τα: aldicarb, carbofuran, ziram κ.α.

Οι ενώσεις της κατηγορίας αυτής υδρολύονται σχετικά εύκολα και χαρακτηρίζονται από μικρή ανθεκτικότητα. Γενικά δεν δημιουργούν σημαντικές περιβαλλοντικές ανησυχίες [5], [6]. Παρόλα τα παρασιτοκτόνα καρβαμιδικού άλατος, έχουν συσχετιστεί με επιπτώσεις στην υγεία όπως ενδοκρινικές διαταραχές, επιδράσεις σε κυτταρικούς μεταβολικούς μηχανισμούς, επιδράσεις στην λειτουργία των μιτοχονδρίων κ.α. Επίσης υπάρχουν ενδείξεις για πιθανή συσχέτιση των παρασιτοκτόνων αυτών με αυξημένο κίνδυνο εκδήλωσης άνοιας [5].

### **ΤΡΙΑΖΙΝΕΣ**

Παραδείγματα αυτής της κατηγορίας αποτελούν: η σιμαζίνη, η αμετρίνη, η ατραζίνη κ.α. Έχουν συσχετιστεί με ενδοκρινικές διαταραχές, τοξικότητα στην αναπαραγωγική ικανότητα και καρκίνο του μαστού. Οι τριαζίνες χρησιμοποιούνται ως ζιζανιοκτόνα. Το σημαντικότερο μέλος της ομάδας αυτής αποτελεί η ατραζίνη. Χρησιμοποιείται ως προφυτρωτικό ζιζανιοκτόνο, ενώ έχει συσχετιστεί με οξειδωτικό στρες, κυτταροτοξικότητα κ.α. [5], [6].

### **ΣΥΝΘΕΤΙΚΑ ΠΥΡΕΘΡΟΕΙΔΗ**

Παραδείγματα φυτοφαρμάκων αυτής της ομάδας είναι το φενβαλερικό, η περμεθρίνη και η σουμεθρίνη. Συγκαταλέγονται στα ασφαλέστερα εντομοκτόνα που χρησιμοποιούνται στη γεωργία και σε τομείς δημόσιας υγείας. Ωστόσο, υπάρχουν ενδείξεις για πρόκληση ενδοκρινικών διαταραχών, ενώ μεταβολίτες κάποιων πυρεθροειδών έχουν συσχετιστεί με πρόκληση βλαβών του DNA.

## **ΝΕΟΝΙΚΟΤΙΝΟΕΙΔΗ ΠΑΡΑΣΙΤΟΚΤΟΝΑ**

Παραδείγματα αυτής της ομάδας είναι η ιμιδακλοπρίδη, η θειακλοπρίδη, η guadipyg. Είναι μια σχετικά καινούργια κατηγορία και αποτελείται από εντομοκτόνα, ευρέως χρησιμοποιημένα, λόγω του χαμηλού κινδύνου επίδρασής τους σε άλλους οργανισμούς, εκτός του οργανισμού στόχου. Ωστόσο, υπάρχουν ενδείξεις για πιθανές επιδράσεις στο ενδοκρινικό και αναπαραγωγικό σύστημα των ζώων, ενώ έχουν συνδεθεί και με την εμφάνιση καρκίνου του μαστού [5].

## **ΠΑΡΑΓΩΓΑ ΦΑΙΝΟΞΥΑΛΚΑΝΟΪΚΟΥ ΟΞΕΟΣ**

Οι ενώσεις αυτού του τύπου, βρίσκουν χρήση ως ζιζανιοκτόνα, τόσο στη γεωργία όσο και για μη παραγωγικούς σκοπούς σε περιοχές όπως δρόμους και γραμμές μετάδοσης ηλεκτρικής ενέργειας. Δεν είναι ιδιαίτερα σταθερές ενώσεις, με αποτέλεσμα να κατανέμονται ομοιόμορφα στην κύρια περιοχή-στόχο.

## **ΥΠΟΚΑΤΕΣΤΗΜΕΝΕΣ ΟΥΡΙΕΣ**

Οι ενώσεις αυτές χρησιμοποιούνται κυρίως ως ζιζανιοκτόνα. Παρόλο που χαρακτηρίζονται από μικρή υδατοδιαλυτότητα, δεν οδηγούν σε προβλήματα συσσώρευσης, ως αποτέλεσμα των απλών περιβαλλοντικών τους αντιδράσεων. Επίσης είναι ενώσεις μέτρια ασταθείς, από περιβαλλοντική άποψη [6].

### **1.3.3 ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΗΝ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥΣ**

Σύμφωνα με τον οργανισμό WHO (World Health Organization) τα φυτοφάρμακα κατατάσσονται με βάση την τοξικότητα των δραστικών ουσιών τους στις κατηγορίες που φαίνονται παρακάτω (Πίνακας 1.2):

Πίνακας 1.2: Παραδείγματα κατηγοριών φυτοφαρμάκων βάση τοξικότητας [7]

| Ανάλογα την τοξικότητά τους σύμφωνα με τον WHO | LD50 για αρουραίους (mg/ kg σωματικού βάρους) |                        |
|------------------------------------------------|-----------------------------------------------|------------------------|
|                                                | Πρόσληψη μέσω στόματος                        | Πρόσληψη μέσω δέρματος |
| Ia.Εξαιρετικά επικίνδυνο                       | <5                                            | <50                    |
| Ib.Πολύ επικίνδυνο                             | 5-50                                          | 50-200                 |
| II.Μέτρια επικίνδυνο                           | 50-2000                                       | 200-2000               |
| III.Ελαφρώς επικίνδυνο                         | > 2000                                        |                        |
| U. Είναι απίθανο να παρουσιάσει οξύ κίνδυνο    | >= 5000                                       |                        |

## 1.4 ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ

### 1.4.1 ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΝΟΜΟΘΕΤΙΚΑ ΟΡΙΑ

Η Επιτροπή Codex Alimentarius (CAC), η οποία αποτελεί κοινό όργανο των οργανισμών FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) και WHO, εκπονεί εναρμονισμένα πρότυπα τροφίμων. Τα πρότυπα αυτά αναγνωρίζονται από τον WTO (World Trade Organization).

Η CCPR (Codex Committee on Pesticide Residues) αποτελεί επικουρικό όργανο της CAC, το οποίο είναι υπεύθυνο για τον καθορισμό των προτύπων για τα ανώτατα όρια υπολειμμάτων, MRLs (Maximum Residue Limits), ιδιαίτερα σημαντικά για τη διαχείριση των φυτοφαρμάκων. Τα MRLs αφορούν φυτοφάρμακα και παρεμφερείς χημικές ενώσεις, ενώ αυτά εγκρίνονται από τη CAC [8].

Ως **MRL** ορίζεται το υψηλότερο, νομικά αποδεκτό επίπεδο υπολείμματος φυτοφαρμάκου, στο εσωτερικό ή στην επιφάνεια τροφίμων ή ζωοτροφών όταν η χρήση των φυτοφαρμάκων πραγματοποιείται σύμφωνα με τους κανόνες της ορθής γεωργικής πρακτικής (GAP, Good Agricultural Practice) [9] [10]. Οι ποσότητες υπολειμμάτων σε τρόφιμα πρέπει να είναι όσο το δυνατόν χαμηλότερες και ασφαλείς για τους καταναλωτές. Η CAC ορίζει MRLs για όλα

τα τρόφιμα και τις ζωοτροφές, ενώ στην ιστοσελίδα της CAC διατίθενται δημόσια τα MRLs για όλες τις καλλιέργειες και για όλα τα φυτοφάρμακα [10].

Αρμοδιότητα της CAC είναι επίσης να εξετάζει τις μεθόδους ελέγχου των MRLs καθώς και να αναπτύσσει λίστες προτεραιότητας φυτοφαρμάκων οι οποίες αξιολογούνται από τη JMPR (Joint FAO/ WHO Meeting on Pesticide Residues). Από το 2014, έχουν οριστεί MRLs για περισσότερα από 271 δραστικά συστατικά. Ορισμένες κυβερνήσεις, με σκοπό τη διασφάλιση της συμμόρφωσης των εθνικών τους προτύπων με τη διεθνή συναίνεση για τα MRLs, υιοθέτησαν τα MRLs της CAC ως πρότυπα νομικώς δεσμευτικά [8].

#### **1.4.2 ΣΕ ΕΥΡΩΠΑΙΚΟ ΕΠΙΠΕΔΟ**

Όσον αφορά στην Ευρώπη τα MRLs για όλα τα τρόφιμα και τις ζωοτροφές ρυθμίζονται από την Ευρωπαϊκή επιτροπή. Στην ιστοσελίδα της Επιτροπής, στη βάση δεδομένων MRL βρίσκονται διαθέσιμα τα MRLs για όλες τις καλλιέργειες και όλα τα φυτοφάρμακα [9].

Για τον καθορισμό των MRLs ζητείται από τους αιτούντες (παραγωγοί φυτοπροστατευτικών προϊόντων, γεωργοί, χώρες της ΕΕ ή χώρες που δεν ανήκουν σε αυτή κλπ) να υποβάλουν(submit) κάποιες πληροφορίες, όπως τη χρησιμοποιούμενη ποσότητα του φυτοφαρμάκου κατά την εφαρμογή του στις καλλιέργειες, τοξικολογικές τιμές αναφοράς για αυτό κ.α.

Με βάση τις πληροφορίες που λαμβάνονται, γίνεται σύγκριση μεταξύ της πρόσληψης υπολειμμάτων του φυτοφαρμάκου που προκύπτει από κατανάλωση όλων των τροφίμων στα οποία αυτό χρησιμοποιείται, με την ARfD (Acute Reference Dose) και με την ADI (Average Daily Intake) για μακροπρόθεσμη και βραχυπρόθεσμη πρόσληψη, για όλες τις ομάδες καταναλωτών της Ευρώπης [11].

Ως **ADI** ορίζεται η εκτίμηση της ποσότητας ενός προσθέτου τροφίμων σε τρόφιμα ή ποτά, η οποία αν προσλαμβάνεται από τον καταναλωτή καθημερινά εφ' όρου ζωής δεν συνεπάγεται σημαντικό κίνδυνο για την υγεία του. Εκφράζεται σε χιλιοστόγραμμα (mg) του προσθέτου ανά κιλό σωματικού βάρους σε καθημερινή βάση [12].

Εάν το ζητούμενο MRL δεν είναι ασφαλές, αυτό ορίζεται στο LOD (lowest limit of analytical determination), ενώ το ίδιο συμβαίνει και για τα MRLs για

καλλιέργειες όπου δεν έχει γίνει χρήση των αντίστοιχων φυτοφαρμάκων, ή έχει γίνει χρήση αλλά τα υπολείμμά τους δεν είναι ανιχνεύσιμα. Το προκαθορισμένο LOD σύμφωνα με τη νομοθεσία της ΕΕ είναι στο 0,01 mg/kg [11].

#### **1.4.3 ΣΥΣΤΗΜΑ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ**

Η νομοθεσία της ΕΕ ορίζει ένα κοινό σύστημα αξιολόγησης για όλα τα γεωργικά προϊόντα, για τρόφιμα και ζωοτροφές, εναρμονίζοντας και απλουστεύοντας τα MRLs των φυτοφαρμάκων.

Τα MRLs ισχύουν για 315 νωπά προϊόντα και για τα ίδια προϊόντα μετά την επεξεργασία, όμως πρέπει να προσαρμόζονται κατάλληλα ώστε οι αραιώσεις ή οι προσυγκεντρώσεις που πραγματοποιούνται να λαμβάνονται υπόψη.

Από τη νομοθεσία καλύπτονται περίπου 1100 φυτοφάρμακα. Σε αυτά ανήκουν φυτοφάρμακα που χρησιμοποιούνται στη γεωργία είτε επί του παρόντος είτε παλαιότερα, εντός ή εκτός της ΕΕ. Ισχύει μια γενική προκαθορισμένη τιμή MRL στα 0,01 mg/kg, σε φυτοφάρμακα για τα οποία δεν υπάρχει κάποια συγκεκριμένη αναφορά. Απαραίτητη είναι φυσικά η εξασφάλιση της ασφάλειας όλων των ομάδων καταναλωτών (πχ. παιδιά, χορτοφάγοι).

Τα Κράτη Μέλη, η EFSA (European Food Safety Authority) και η Επιτροπή έχουν σαφείς ρόλους στον καθορισμό των MRLs. Η EFSA αξιολογεί την ασφάλεια των καταναλωτών σύμφωνα με την τοξικότητα του φυτοφαρμάκου, τα αναμενόμενα μέγιστα επίπεδα σε τρόφιμα καθώς και τις διαφορετικές διατροφικές συνήθειες των Ευρωπαίων.

Ο κανονισμός EC 396/2005 περιλαμβάνει τα MRLs φυτοφαρμάκων σε τρόφιμα και ζωοτροφές φυτικής και ζωικής προέλευσης καθώς και τους κανόνες εφαρμογής της Επιτροπής [13].

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

### ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

#### 2.1 ΠΟΛΥ-ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Η ανάλυση υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων είναι μια αρκετά δύσκολη διαδικασία καθώς υπάρχει μεγάλη ποικιλία δειγμάτων και μεγάλος αριθμός αναλυτών.

Για το σκοπό αυτό έχουν αναπτυχθεί πολυ-υπολειμματικές μέθοδοι κατάλληλες ώστε να καλύπτουν εκατοντάδες φυτοφάρμακα σε μια μέτρηση, οι λεγόμενες MRM μέθοδοι (multi-residue methods). Συνήθως οι μέθοδοι αυτές βασίζονται σε εκχύλιση και υγρό-υγρό διαχωρισμό, ενώ ακολουθεί χρωματογραφική ανάλυση συνήθως σε συνδυασμό με MS ανιχνευτή. Παρά το μεγάλο κόστος των οργάνων που απαιτούνται, ο συνδυασμός μιας απλής προετοιμασίας δείγματος με τη δυνατότητα για ταυτόχρονη ανίχνευση πολλών φυτοφαρμάκων κάνει την όλη διαδικασία αποδοτικότερη [14].

Χαρακτηριστικό παράδειγμα πολυ-υπολειμματικής μεθόδου αποτελεί η ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος προετοιμασίας δείγματος ονόματι “QuEChERS” (Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe), ακολουθούμενη από (LC)-MS/MS ανάλυση του εκχυλίσματος του δείγματος που προκύπτει. Κατά την εφαρμογή της QuEChERS πραγματοποιείται εκχύλιση με ακετονιτρίλιο, προσθήκη μίγματος αλάτων και φυγοκέντρηση για διαχωρισμό των φάσεων και ρύθμιση του pH. Μετά τη φυγοκέντρηση, πραγματοποιείται d-SPE (dispersive SPE clean up), με την προσθήκη  $MgSO_4$  και προσροφητικού υλικού (πχ PSA), ενώ ακολουθεί (LC)-/MS/MS ανάλυση του εκχυλίσματος ακετονιτριλίου [14], [15].

Εναλλακτικά, για την προετοιμασία του δείγματος χρησιμοποιείται επίσης, είτε ως στάδιο εκχύλισης είτε ως στάδιο καθαρισμού, η τεχνική της εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE), καθώς και άλλες τεχνικές βασισμένες σε αυτήν όπως οι τεχνικές SPME (solid phase micro-extraction), MSPD (matrix solid-phase dispersion) και SBSE (stir-bar sorptive extraction), ενώ ακολουθεί συνήθως χρωματογραφική ανάλυση (LC, GC/MS κ.α) [16].

Παραδείγματα πολυ-υπολειμματικών μεθόδων που έχουν χρησιμοποιηθεί σε διάφορα δείγματα παρατίθενται παρακάτω (Πίνακας 2.1):

Πίνακας 2.1: Παραδείγματα πολυ-υπολλειματικών μεθόδων

| ΑΝΑΛΥΤΗΣ                                                                        | ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ               | ΠΡΟΕΤΟΙΜ.<br>ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ-<br>ΚΑΘΑΡΙΣΜ. | ΔΙΑΛΥΤΗΣ<br>ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ | ΤΕΧΝΙΚΗ<br>ΠΡΟΣΔΙΟΡ. | ΑΝΑΚΤΗΣΗ<br>% | LOD<br>(mg/l)           | LOQ<br>(mg/l)    | ΑΝΑΦΟΡΕΣ |
|---------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|--------------------------------------|-----------------------|----------------------|---------------|-------------------------|------------------|----------|
| Azole, insect<br>growth regulator,<br>pyrethroid,<br>pyrrole: (1),triazole(4)   | Φρούτα,<br>Λαχανικά     | MFE                                  | DCM                   | CE                   | 31–106        | -                       | 0.2-0.5<br>mg/kg | [16]     |
| Azole, insect<br>growth regulator,<br>pyrethroid, pyrrole: (1),<br>triazole (4) | Ροδάκινα,<br>νεκταρίνια | SPE                                  | DCM                   | CE/MS                | 58–99         | 0.05–<br>0.2(CE–<br>MS) | -                |          |
| Carbamates                                                                      | Νερό                    | SPE                                  | ACN                   | GC/MS                | 64–85         | 0.02–<br>0.038          | -                |          |
| Organochlorine<br>pesticides (13)                                               | Επιφανειακό<br>νερό     | SPE                                  | ethyl acetate         | LC/MS/MS             | 72–119        | 0.0008–<br>0.083        | -                |          |
| Organophosphoric<br>pesticides(OCPs),<br>OPPs                                   | Αυγό                    | SLE, SPE                             | n-hexane:<br>DCM      | LC/DAD               | 89            | -                       | 0.005            | [17]     |

|                                                                                                                                                                              |                                                 |                                    |          |                  |        |                  |                |      |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|------------------------------------|----------|------------------|--------|------------------|----------------|------|
| Pesticides (171)                                                                                                                                                             | Φρούτα,<br>Λαχανικά,<br>Δημητριακά              | LLE                                | DCM      | LC/MS/MS         | >=90   | -                | 0.01           | [18] |
| Pesticides (300)                                                                                                                                                             | Πόσιμο νερό                                     | Απευθείας<br>εισαγωγή<br>δείγματος | -        | LC/MS/MS         | >=90   | -                | 0.0001         |      |
| Pesticides (160)                                                                                                                                                             | Φρούτα,<br>Λαχανικά                             | QuEChERS<br>(LLE, dSPE)            | ACN      | LC/MS/MS         | >=90   | 0.0001–<br>0.025 | -              |      |
| Carbendazim, imazalil,<br>iprodion,<br>thiabendazole,<br>flutriafo, tridemorph,<br>prochloraz,<br>bitertanol, triadimefon,<br>myclobutanil,<br>procymidone,<br>diphenylamine | Παιδικές<br>τροφές<br>(βασισμένες<br>σε φρούτα) | QuEChERS<br>(LLE, dSPE)            | ACN      | LC–TOF-MS        | >=90   | 0.0001–<br>0.004 | -              |      |
| Pesticides (100) &<br>Metabolites                                                                                                                                            | Φρούτα,<br>Λαχανικά                             | QuEChERS<br>(LLE, dSPE)            | ACN      | LC–TOF-MS        | >=90   | -                | 0.01           |      |
| Pesticides (12)                                                                                                                                                              | Έλαια από<br>εσπεριδοειδή                       | FL-PR                              | DCM      | LC/MS            | 50–115 | 0.02–<br>0.06    | -              | [16] |
| Organochlorines (11),<br>pyrethroids (5)                                                                                                                                     | Τσάι                                            | SPE                                | n-hexane | GC/ECD,<br>GC/MS | 69–96  | -                | 0.004–<br>0.09 |      |

|                                                                 |                                 |              |                            |          |                       |   |                           |      |
|-----------------------------------------------------------------|---------------------------------|--------------|----------------------------|----------|-----------------------|---|---------------------------|------|
| Organophosphor. pesticides (OCPs) (20)                          | Λάδι Ψαριού                     | SLE, GPC     | Ethyl acetate: c-hexane    | GC/MS/MS | 65–103                | - | 0.06                      | (17) |
| Organophosphor. pesticides (OCPs) (19)<br>Pyrethrines (PYRs)(6) | Βοδινό κρέας                    | SLE, SPE     | ACN                        | GC/MS    | 70–110<br>(HCB 49-57) | - | 0.05–0.125                |      |
| Organophosphoric pesticides (OCPs) (10)                         | Ψάρι                            | Soxhlet, SPE | n-Hexane                   | GC/ECD   | 94–103                | - | 0.01                      |      |
| Organophosphoric pesticides (OCPs) (24)                         | Χοιρινό κρέας, προϊόντα κρέατος | SLE, GPC     | DCM:c-hexane               | GC–MS    | 65–104                | - | 0.002–0.0025<br>μg/g λίπ. |      |
| Pesticides (277)                                                | Μπύρα / Βύνη                    | LLE, SPE     | -                          | LC/MS/MS | >=90                  | - | < 0.02                    | [18] |
| Pesticides (183)                                                | Φρούτα, Λαχανικά                | LLE          | Ethyl acetate              | LC/MS/MS | >=90                  | - | < 0.02                    |      |
| Pyrethrines(PYRs) (4)                                           | Βοδινό κρέας                    | SLE, SPE     | n-Hexane: toluene          | GC/ECD   | 87–110                | - | 0.05–0.25                 | [17] |
| Organophosphoric pesticides(OCPs) (16)                          | Ζωικό λίπος                     | SLE, GPC     | Toluene: acetone: n-hexane | GC/ECD   | 77–90                 | - | -                         |      |
| Organophosphor. pesticides (OCPs) (22)<br>OPPs (23)             | αρνίσιο κρέας                   | GPC          | nHexane: ethyl Acetate     | GC/MS/MS | 72–91                 | - | -                         |      |

|                                                                                                                                                                                                    |                                                             |                      |                         |            |        |            |             |      |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|----------------------|-------------------------|------------|--------|------------|-------------|------|
| Pesticides (300) & Metabolites                                                                                                                                                                     | Φρούτα, Λαχανικά                                            | QuEChERS (LLE, dSPE) | ACN                     | LC-TOF-MS  | >= 90  | -          | 0.01        | [18] |
| Pesticides (108)                                                                                                                                                                                   | Φρούτα, Λαχανικά, Δημητριακά                                | LLE, SPE             | (MeOH/H <sub>2</sub> O) | LC/MS/MS   | >=90   | -          | 0.01        |      |
| Urea (3), 2,4-D, amitrine                                                                                                                                                                          | Νερό                                                        | SPE                  | ACN                     | LC/UV      | 98-104 | 0.01-0.03  | 0.035-0.100 | [16] |
| Triazines (6)                                                                                                                                                                                      | Νερό                                                        | SPE                  | MeOH                    | TLC plates | 88-95  | 0.01       | 0.030       |      |
| Cyromazine, carbendazim, thiabendazole, methomyl, lufenuron, imidacloprid, acetamiprid, thiacloprid, spinosyn A, spinosyn D, azoxystrobin, triflumizole, hexaflumuron, teflubenzuron, flufenoxuron | Πεπόνι, μπρόκολο, ντομάτα, πορτοκάλι, λεμόνι, πιπέρι, μήλο, | LLE                  | Ethyl acetate           | LC-TOF-MS  | >=90   | 0.005-0.03 | -           | [18] |

|                                            |                                        |                                 |                                        |          |        |                         |                  |      |
|--------------------------------------------|----------------------------------------|---------------------------------|----------------------------------------|----------|--------|-------------------------|------------------|------|
| Pesticides (8)<br>Triazine metabolites (3) | Νερό βροχής                            | SPME                            | -                                      | GC/MS/MS | -      | 0.00001<br>–<br>0.00005 | -                | [16] |
| 236 multiresidues                          | παιδικές<br>τροφές με<br>βάση το κρέας | SLE,<br>QuEChERS<br>(LLE, dSPE) | Acetonitrile:<br>acetic acid<br>[99:1] | GC–ITMS  | 70–121 | -                       | 0.0003–<br>0.045 | [17] |

## **2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΜΕΜΟΝΩΜΕΝΩΝ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ**

Η χρήση πολυ-υπολειμματικών μεθόδων δεν καλύπτει τον προσδιορισμό όλων των φυτοφάρμακων. Πολλά, ευρέως χρησιμοποιούμενα φυτοφάρμακα χαρακτηρίζονται από υψηλή πολικότητα με αποτέλεσμα να υφίστανται σημαντικές απώλειες κατά το στάδιο της προετοιμασίας του δείγματος (δεν εκχυλίζονται σε ικανοποιητικό βαθμό στην οργανική φάση), ενώ δεν παρουσιάζουν επίσης ικανοποιητική κατακράτηση σε στήλες, οι οποίες χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο στην υγροχρωματογραφία αντίστροφης φάσης [14], [19].

Συγκεκριμένα, στη σύγχρονη γεωργική πρακτική χρησιμοποιούνται συχνά ζιζανιοκτόνα υψηλής πολικότητας (High polar herbicides, HPH) σε καλλιέργειες δημητριακών, καλαμποκιού, ελαιοκράμβης, στην παραγωγή λαχανικών κ.α. καθώς πλεονεκτούν σε αποδοτικότητα και σε κόστος. Παραδείγματα τέτοιων ζιζανιοκτόνων αποτελούν τα: glufosinate, glyphosate, maleichydrazide, chlormequat, diquat, meriquat, paraquat. Οι ενώσεις αυτής της κατηγορίας έχουν μεγάλο εύρος εφαρμογής και χαρακτηρίζονται ως μη εκλεκτικές. Θεωρούνται χαμηλής τοξικότητας για τα θηλαστικά ενώ δεν εμφανίζουν δυσμενείς επιπτώσεις στους ανθρώπους (εκτός του paraquat), καθώς αυτές και οι μεταβολίτες τους είναι πολύ διαλυτές στο νερό και αδιάλυτες στους περισσότερους οργανικούς διαλύτες.

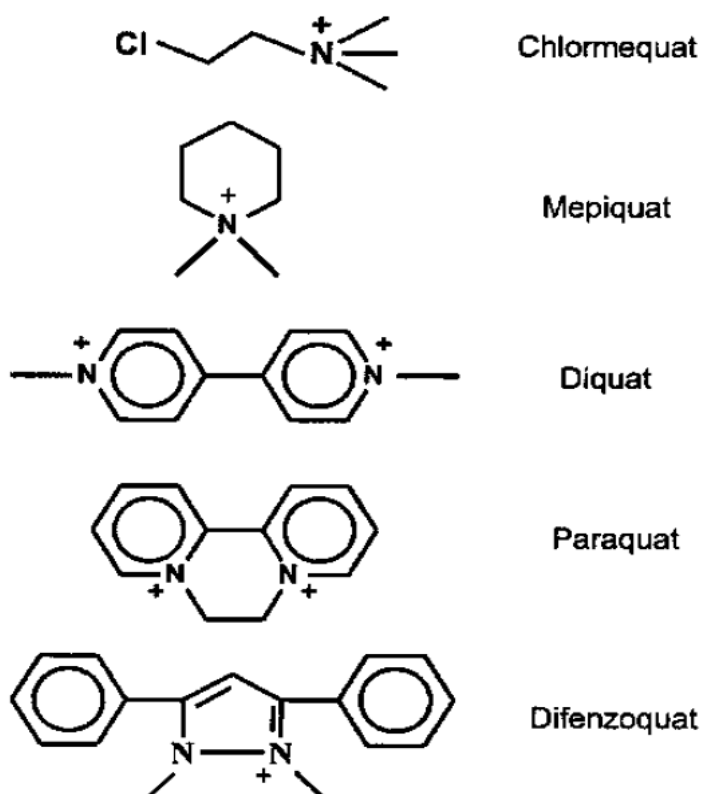
Παρόλα αυτά υπάρχουν μελέτες που υποδηλώνουν εμφάνιση αρνητικών επιδράσεων, όσον αφορά στην υγεία και στο περιβάλλον. Έτσι, τα ζιζανιοκτόνα αυτά (συμπεριλαμβανομένων και των μεταβολιτών τους) πρέπει να προσδιορίζονται τόσο σε περιβαλλοντικά όσο και σε δείγματα τροφίμων [20].

Συνεπώς, η χρήση των παραπάνω ζιζανιοκτόνων και γενικότερα των ενώσεων που ανήκουν στην “ιδιαίτερη” αυτή κατηγορία των πολικών φυτοφαρμάκων, δημιουργούν την ανάγκη ανάπτυξης ειδικών μεθόδων προσδιορισμού τους, τις λεγόμενες μεθόδους υπολειμμάτων μεμονωμένων γεωργικών φαρμάκων (single-residue methods) [14], [19].

Μεγάλος αριθμός ενώσεων ανήκει στην παραπάνω κατηγορία φυτοφαρμάκων. Στην παρούσα εργασία θα μελετηθούν τα ακόλουθα φυτοφάρμακα αυτής της ομάδας: από την ομάδα των ενώσεων τεταρτοταγούς αμμωνίου τα paraquat (PQ), chlormequat (CQ), mepiquat (MQ) και ακόμη τα ευρέως χρησιμοποιούμενα glyphosate (GLY), glufosinate (GLU), ethephon.

### 2.2.1 QUATS

Τα φυτοφάρμακα της ομάδας των quats αποτελούν ενώσεις τεταρτοταγούς αμμωνίου [21]. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι ενώσεις: paraquat (PQ), diquat (DQ), τα οποία είναι 2 μη εκλεκτικής επαφής ζιζανιοκτόνα και το εκλεκτικό ζιζανιοκτόνο difenzoquat (DF). Επίσης στην κατηγορία αυτή ανήκουν και 2 παράγοντες ανάπτυξης των φυτών, τα chlormequat (CQ) και mepiquat (MQ) [22].



Σχήμα 2.1: Απεικονίσεις των ενώσεων της κατηγορίας των Quats [21]

Το Paraquat (PQ) και το diquat (DQ) χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο των ζιζανίων (αγρωστωδών, υδρόβιων κλπ), ως απολιπαντικά και ως ξηραντικά [24]. Χαρακτηρίζονται από υψηλή πολικότητα και διαλυτότητα στο νερό. Το

PQ χρησιμοποιείται σε σχεδόν 90 χώρες, όπως στην Κίνα, την Ταϊλάνδη και τη Βραζιλία, είτε για την προετοιμασία του εδάφους που προορίζεται για φύτευση, είτε για τον έλεγχο των ζιζανίων σε τουλάχιστον 100 είδη καλλιεργειών, όπως αυτές του καλαμποκιού, του ρυζιού, της σόγιας, του σιταριού, της πατάτας, των πορτοκαλιών, του καφέ, του κακάο, του βαμβακιού, του φοινικέλαιου.

Τα CQ, (chloroethyltrimethylammonium cation) και το MQ (1,1-dimethylpiperidinium cation) είναι χημικές ουσίες οι οποίες, έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως στη γεωργία -συνήθως ως χλωρίδια, με σκοπό τη ρύθμιση της ανάπτυξης των φυτών όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, προάγοντας το σχηματισμό άνθων, βελτιώνοντας τη ρύθμιση των καρπών σε φρούτα και λαχανικά [23], [24], [25] πραγματοποιώντας μείωση της ανεπιθύμητης επιμήκους ανάπτυξης των βλαστών, χωρίς να υποβιβασθεί η παραγωγικότητα των φυτών. Χρησιμοποιούνται στη γεωργία σε διάφορες καλλιέργειες τροφίμων, ειδικότερα σε δημητριακά και σε κάποια φρούτα και λαχανικά [26], είτε μαζί με άλλα φυτοφάρμακα ως μείγματα, είτε μεμονωμένα. Το CQ είναι καταχωρημένο σε τουλάχιστον 17 χώρες. Συμβάλλει στην ανάπτυξη καλλιεργιών όπως σιταριού, σίκαλης, βρώμης [22], στην προώθηση του σχηματισμού άνθων και τη βελτίωση της ρύθμισης των καρπών σε φρούτα και λαχανικά. Το (MQ) είναι επίσης ρυθμιστής ανάπτυξης φυτών και χρησιμοποιείται για τη ρύθμιση της βλαστικής ανάπτυξης και για την αναστολή της ανεπιθύμητης βλάστησης [27].

Τα PQ, DQ και DF έχουν χαρακτηριστεί από τον WHO ως μετρίως επικίνδυνα, ενώ τα CQ, MQ ως ελαφρώς επικίνδυνα [21]. Η χρήση του PQ έχει απαγορευτεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση. Παρόλα αυτά όπως αναφέρθηκε και παραπάνω χρησιμοποιείται σε αρκετές χώρες προκαλώντας προβλήματα κατά τις διαδικασίες εισαγωγής/εξαγωγής προϊόντων παγκοσμίως [23]. Το CQ προκαλεί αρνητικές επιπτώσεις στην αναπαραγωγή των ζώων και έχει καταχωρηθεί στη βάση δεδομένων των τοξικών χημικών ουσιών ως πιθανός ενδοκρινικός διαταράκτης από το Εθνικό Ινστιτούτο για την Επαγγελματική Ασφάλεια και Υγεία (NIOSH) [24].

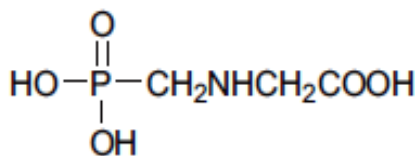
Κάποιες από τις ενώσεις της ομάδας των quats, έχουν συμπεριληφθεί σε λίστες προτεραιότητας και επί του παρόντος έχουν τεθεί κανονισμοί γι αυτές

σε πολλές χώρες. Η υπηρεσία νερού της EPA (Environmental Protection Agency) έχει ορίσει για το πόσιμο νερό: για το DQ μέγιστο επίπεδο επιμόλυνσης  $20 \mu\text{gL}^{-1}$  και για το PQ  $3 \mu\text{gL}^{-1}$  [21]. Η Ευρωπαϊκή Κοινότητα (EC) δεν έχει ορίσει επίπεδα για αυτές τις ενώσεις στο νερό, αλλά εφαρμόζονται οι τιμές:  $100 \text{ ngL}^{-1}$  για μεμονωμένα φυτοφάρμακα και  $500 \text{ ngL}^{-1}$  για ολικά φυτοφάρμακα [21], [24].

Όσον αφορά στα τρόφιμα, ενδεικτικά, τα ανώτατα όρια καταλοίπων (MRLs) για το CQ είναι 3 ppm σε σιτάρι και σίκαλη (2 ppm σε αλεύρι σίτου) και 10 ppm σε βρώμη. Τα όρια αυτά έχουν τεθεί από την Επιτροπή Codex Alimentarius. Στις οδηγίες της Ευρωπαϊκής Επιτροπής έχουν ορισθεί τιμές ανώτατων ορίων για το CQ, παραδείγματα των οποίων είναι:  $0,5 \text{ mg / kg}$  σε αχλάδια,  $0,05 \text{ mg / kg}$  σε τομάτες και  $0,5\text{-}5 \text{ mg / kg}$  σε δημητριακά,  $0,01 \text{ mg / kg}$  σε ρύζι [28], [29]. Για το MQ το MRL σε ρύζι είναι  $0,02 \text{ mg / kg}$ , ενώ για το PQ  $0,05 \text{ mg / kg}$  [29].

Για τη συμμορφωση με τους κανονισμούς που έχουν αναφερθεί, πρέπει να αναπτυχθούν αναλυτικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό των quats. Δεδομένου ότι τα quats υπάρχουν ως φορτισμένες κατιονικές ενώσεις, η ανάλυσή τους είναι δύσκολη. Οι φυσικοχημικές ιδιότητες των ενώσεων της ομάδας αυτής απαιτούν τον προσδιορισμό τους με μέθοδο υπολειμμάτων μεμονωμένων γεωργικών φαρμάκων [23], [27]. Παραδείγματα τέτοιων μεθόδων που έχουν χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό των ενώσεων της ομάδας των quats παρατίθενται στον πίνακα 5.2.

### 2.2.2 Glyphosate



Σχήμα 2.2: Απεικόνιση του glyphosate

Το glyphosate ή αλλιώς N-(phosphonomethyl)glycine, (συμβολικά GLY) ανήκει στην ομάδα των αμινοξέων, και περιέχει φώσφορο στο μόριό του [30], [31]. Αποτελεί το ενεργό συστατικό των σκευασμάτων ζιζανιοκτόνων. Η δράση του κατά των ζιζανίων ανακαλύφθηκε το 1970 [32]. Ο υποκείμενος μηχανισμός με τον οποίο δρα στα φυτά είναι η αναστολή των ενζύμων.

Συγκεκριμένα το glyphosate επηρεάζει την βιοσυνθετική οδό των αρωματικών αμινοξέων (τυροσίνη, τρυπτοφάνη, φαινυλαλανίνη) αναστέλλοντας το ένζυμο EPSPS (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase), ένζυμο το οποίο εμπλέκεται στην σύνθεση των αμινοξέων αυτών. Ο κύριος μεταβολίτης του glyphosate είναι το αμινομεθυλοφωσφονικό οξύ (AMPA) [30], [33].

Η Monsanto Company παρήγαγε το glyphosate από το 1974 [34]. Είναι διαδεδομένο σε διάφορες μορφές [33]. Η χρήση του αρχικά ήταν περιορισμένη λόγω της έλλειψης εκλεκτικότητας. Το 1996 εισήχθησαν γενετικά τροποποιημένες καλλιέργειες ανθεκτικές στα ζιζανιοκτόνα (GMHT, genetically modified herbicide-tolerant), σχεδιασμένες να καλλιεργούνται με εφαρμογή του glyphosate. Με την ευρεία χρήση των καλλιεργειών αυτών, η κατανάλωση του glyphosate αυξήθηκε παγκοσμίως από περίπου 67.000 τόνους το 1995 σε 826.000 τόνους το 2014 (στις τιμές αυτές συμπεριλαμβάνονται και οι χρήσεις που δεν αφορούν στη γεωργία), ορίζοντας έτσι το glyphosate ως το φυτοφάρμακο με την πιο ευρεία και εντατική χρήση στην ιστορία [32].

Το φυτοφάρμακο αυτό βρίσκει εφαρμογή στην γεωργία, τη δασοκομία, την κηπουρική, για τον έλεγχο διαφόρων φυτών όπως χόρτα, σπαθόχορτα, πλατύφυλλα δέντρα, και ξυλώδη φυτά. Χρησιμοποιείται κυρίως σε καλλιέργειες δημητριακών όπως το καλαμπόκι, η σόγια, το κριθάρι, το σιτάρι, το ρύζι κ.α., σε φυτείες καφέ, για αστικό εξωραϊσμό, καθώς και σε βιομηχανικούς χώρους για τον έλεγχο της εμφάνισης ζιζανίων [33], [35], [36], [37]. Το glyphosate είναι το ζιζανιοκτόνο με τις περισσότερες πωλήσεις παγκοσμίως [31] και αυτό ωφείλεται στην αποτελεσματικότητά του, το χαμηλό του κόστους και στο ότι οι περιβαλλοντικές επιπτώσεις που επιφέρει, δεν δημιουργούν πολλές ανησυχίες [38]. Θεωρείται περιβαλλοντικά ασφαλές φυτοφάρμακο, εξαιτίας της ταχείας αποδόμησής του στο νερό και στο έδαφος [38].

Η χρήση του glyphosate, πέρα από τα πλεονεκτήματα που εμφανίζει, εγκυμονεί και κάποιους κινδύνους. Αρχικά, το φυτοφάρμακο αυτό μπορεί να είναι τοξικό για τα ίδια τα φυτά στα οποία εφαρμόζεται [36]. Επίσης, ποσότητες glyphosate έχουν ανιχνευτεί σε έδαφος, φυτά και τρόφιμα [35], συνεπώς υπάρχει η πιθανότητα πρόσληψης μικρών ποσοτήτων glyphosate

από τους ανθρώπους και τα ζώα μέσω της διατροφής, ενώ είναι πιθανή και η απευθείας έκθεση του ανθρώπου σε glyphosate κατά τον ψεκασμό του στις καλλιέργειες [39]. Για τα ζώα και τους ανθρώπους, το ζιζανιοκτόνο αυτό θεωρείται μέτριας τοξικότητας, όμως η συχνή χρήση του δημιουργεί ανησυχίες για την μακροπρόθεσμη επίδρασή του, στην ανθρώπινη υγεία και στο περιβάλλον [34]. Έχει αποδειχθεί ότι η πρόσληψή του σε μεγάλες ποσότητες οδηγεί σε συμπτώματα όπως αναπνευστικά και γαστρεντερικά προβλήματα, αλλοιωμένη συνείδηση, υπόταση, μεταβολική οξέωση, νεφρική ανεπάρκεια. Επίσης έχει σημειωθεί σημαντικός αριθμός αυτοκτονιών και δηλητηριάσεων με χρήση του glyphosate [40].

Εξαιτίας όλων των προαναφερθέντων είναι σημαντική η παρακολούθησή και ο έλεγχός του [33]. Το MACP (Multiannual Control Program) απαιτεί την παρακολούθηση του glyphosate σε διάφορα τρόφιμα [34]. Σε πολλές χώρες ακολουθούνται αυστηροί κανονισμοί για το glyphosate σε τρόφιμα φυτικής προέλευσης [41]. Οι μεγαλύτεροι αρμόδιοι οργανισμοί για την διαχείριση των κινδύνων για την υγεία έχουν εγκαθιδρύσει παγκοσμίως τα MRLs (Maximum Residue Levels) του ζιζανιοκτόνου αυτού σε διάφορα τρόφιμα. Τα MRLs κυμαίνονται μεταξύ των τιμών 1,0-5 mg/kg [42].

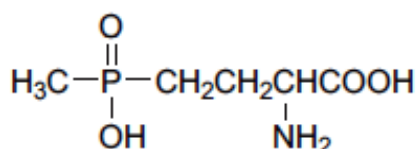
Όσον αφορά στην παρακολούθηση του glyphosate από την Ευρωπαϊκή Ένωση, για τα MRLs του σε πρώτες ύλες γεωργίας ισχύει ο κανονισμός (EC) No 396/2005 [43]. Αναφορικά κάποια παραδείγματα των τιμών των MRLs αυτών είναι: 20 mg/kg για το κριθάρι, τη βρώμη, το ζαχαρόχορτο, τους ηλιόσπορους και 10 mg/kg για το λιναρόσπορο, το κραμβέλαιο, τους σπόρους μουστάρδας, τους σπόρους βαμβακιού, τις φακές, τον αρακά [39], τη σίκαλη και το σιτάρι [44]. Γενικά για διάφορα δημητριακά τα MRLs κυμαίνονται μεταξύ των τιμών 0,1-20 mg/kg, με τιμή 0,1 mg/kg συγκεκριμένα για το ρύζι [29], [43]. Επίσης, για τα περισσότερα φυτικά προϊόντα ισχύει η τιμή LOQ (limit of quantification) 0.1 mg/kg, για τα περισσότερα ζωικά προϊόντα ισχύει η τιμή 0.05 mg/kg [39], ενώ για παιδικές τροφές ισχύει η τιμή LOQ 5 mg/kg.

Το glyphosate είναι ένα μόριο με μικρή μάζα, μη πτητικό, χωρίς χρωμοφόρες ή φθοροφόρες ομάδες, με χαμηλή διαλυτότητα σε οργανικούς διαλύτες. Έχει την τάση να σχηματίζει σύμπλοκα με μέταλλα, να απορροφάται σε γυάλινα σκεύη, και να αλληλεπιδρά με επιφάνειες από ανοξείδωτο ατσάλι. Είναι μια

υδρόφιλη, πολική ( $K_{ow} \log P < -3.2$  στους 20 °C, pH 2–5) και αμφοτερική ένωση, με 4 τιμές  $pK_a = 2.0, 2.6, 5.6$ , και 10.6 [34], [35],[36], [38], [44], [45].

Οι παραπάνω ιδιότητες του glyphosate, εκτός του ότι οδηγούν στην ανάγκη εφαρμογής SRM μεθόδου για τον προσδιορισμό του [39], καθιστούν δύσκολη την όλη διαδικασία, ειδικότερα σε χαμηλά επίπεδα συγκέντρωσης, ακόμη και με χρήση SRM μεθόδου. Μία επιπλέον δυσκολία στην ανάλυσή του είναι το ότι τα προϊόντα στα οποία μελετάται η παρουσία του φυτοφαρμάκου είναι πλούσια σε σάκχαρα και χρωστικές –όπως φρούτα και λαχανικά- καθώς και σε πρωτεΐνες και λίπη –όπως γάλα τυρί κ.α.- είναι δηλαδή περίπλοκες μήτρες που οδηγούν σε παρεμποδίσσεις και δυσκολίες στην ανάλυσή του [35]. Συνεπώς καθίσταται δύσκολη η ανάπτυξη ευαίσθητων μεθόδων προσδιορισμού υπολειμμάτων glyphosate, οι οποίες απαιτούνται για την εναρμόνιση με τις αυστηρές οδηγίες της Ευρωπαϊκής Ένωσης [38]. Παραδείγματα μεθόδων που έχουν χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό glyphosate παρατίθενται στον πίνακα 5.2.

### 2.2.3 Glufosinate



Σχήμα 2.3: Απεικόνιση του glufosinate [30]

Το Glufosinate [DL-homoalanine-4-yl [methyl] phosphonic acid] εισήχθη στις ΗΠΑ το 1993. Μέχρι το 2004 είχε καταχωρηθεί σε περισσότερες από 80 χώρες. Με την καθιέρωση των γενετικά τροποποιημένων καλλιεργειών, σημειώθηκε σημαντική αύξηση της χρήσης του glufosinate, οδηγώντας το στη δεύτερη θέση μετά το glyphosate στην κατάταξη με τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα φυτοφάρμακα παγκοσμίως.

Το glufosinate-ammonium αποτελεί ζιζανιοκτόνο μη εκλεκτικής επαφής με συστημική δράση, ευρέως χρησιμοποιούμενο στην γεωργία για τον έλεγχο των ζιζανίων. Μεταφέρεται μέσω των φύλλων [46], [47]. Δρα κατά των ζιζανίων, αναστέλλοντας ανταγωνιστικά τη σύνθεση της γλουταμίνης [46].

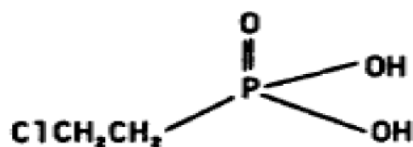
Βρίσκει χρήση στον έλεγχο ετήσιων και πολυετών πλατύφυλλων και αγροστωδών ζιζανίων, σε οπωρώνες, αμπελώνες, φυτείες καουτσούκ και φοινικέλαιου, βαμβακιού, σόγιας, διακοσμητικών δέντρων, σε μη καλλιεργούμενη γη, σε κήπους, θερμοκήπια, φυτώρια και ως προφυτρωτικό σε καλλιέργειες λαχανικών.

Είναι μετρίως ανθεκτικό σε ορισμένα εδάφη ενώ μπορεί να διέλθει, ειδικά στην περίπτωση αμμώδους εδάφους, σε υπόγεια ύδατα. Μεταβολίτες του αποτελούν οι ενώσεις MPP [3-methylphosphinicopropionic acid] και MPA [2-methylphosphinicoacetic acid], και ενδεχομένως και το διοξείδιο του άνθρακα κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες.

Η ευρεία χρήση του ζιζανιοκτόνου εγκυμονεί κινδύνους για τη γεωργική βιοποικιλότητα, για το περιβάλλον καθώς και για τον ίδιο τον άνθρωπο [που αφορούν κυρίως στη νευρολογική ανάπτυξη των εμβρύων]. Έχουν αναφερθεί περιπτώσεις δηλητηριάσεων μετά από σκόπιμη κατάποση του glufosinate-ammonium [κυρίως στην Ιαπωνία], ενώ δεν υπάρχει αντίδοτο για τις συνέπειες της οξείας τοξικότητας του. Οι χρόνιες επιδράσεις του αφορούν κυρίως το νευρολογικό και αναπαραγωγικό σύστημα.

Το ζιζανιοκτόνο αυτό δεν είναι απαγορευμένο σε κάποια χώρα ενώ χαρακτηρίζεται από τον WHO ως ελαφρώς επικίνδυνο [47]. Στο ρύζι η τιμή MRL είναι 0,9 mg/kg [29]. Οι φυσικοχημικές του ιδιότητες [πχ ιοντικός και αμφοτερικός χαρακτήρας, υψηλή πολικότητα, χαμηλή πτητικότητα, μικρή μάζα και έλλειψη χρωμοφόρων, καθιστούν δύσκολη την ανίχνευσή του σε χαμηλά επίπεδα[46]. Παραδείγματα μεθόδων που έχουν χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό glufosinate παρατίθενται στον πίνακα 5.2.

#### 2.2.4 Ethephon



Σχήμα 2.4: Απεικόνιση του ethephon

Το Ethephon [2-χλωροαιθυλοφωσφονικό οξύ] είναι οργανοφωσφορικό παρασιτοκτόνο το οποίο ανακαλύφθηκε το 1965 και καταχωρήθηκε ως

φυτοφάρμακο πρώτη φορά το 1973 στις Ηνωμένες Πολιτείες. Αποτελεί ρυθμιστή ανάπτυξης φυτών και βρίσκει εφαρμογή σε διάφορες καλλιέργειες μη εδώδιμων φυτών, ζωοτροφών και τροφίμων, όπως καλλιέργειες φρούτων, λαχανικών, σιτηρών, χρησιμοποιείται σε φυτώρια, θερμοκήπια, για φροντίδα υπαίθριων διακοσμητικών φυτών, ενώ η βασική του χρήση είναι σε καλλιέργειες χρησιμοποιείται κυρίως σε βαμβακιού. Εφαρμόζεται στο φύλλωμα των φυτών. Δρα εντίνοντας την παραγωγή ενδωγενούς αιθυλενίου και απελευθερώνοντας αιθυλένιο, επηρεάζοντας φυσιολογικές διεργασίες, όπως είναι η επαγωγή των λουλουδιών, η ωρίμανση, η πτώση των καρπών [48], [49].

Το etherphon δεν είναι ανθεκτικό στο περιβάλλον, ενώ χαρακτηρίζεται από μέτρια έως και χαμηλή κινητικότητα στο έδαφος, έχει μικρό συντελεστή κατανομής οκτανόλης/ νερού και  $pH < 2$ . Τα βασικά προϊόντα αποικοδόμησής του είναι αέριο αιθυλένιο και 2-υδροξυαιθυλοφωσφονικό οξύ [48]. Από την εφαρμογή του, δεν αναμένονται σημαντικές επιπτώσεις σε πτηνά, θηλαστικά, ψάρια, ασπόνδυλα γλυκού νερού, θαλάσσιους και εκβολικούς οργανισμούς [49].

Όσον αφορά τις επιπτώσεις στον άνθρωπο το etherphon προκαλεί ερεθισμό στα μάτια ενώ χαρακτηρίζεται ως μέτρια τοξική ένωση όταν εισάγεται στον οργανισμό από τη στοματική, δερματική και αναπνευστική οδό. Προκαλεί αναστολή της χοληνεστεράσης στο πλάσμα [49]. Το etherphon δεν εμφανίζεται να έχει καρκινογόνο δράση, σύμφωνα με μελέτες γενετοξικότητας και καρκινογένεσης [48]. Ο άνθρωπος μπορεί να εκτεθεί σε αυτό μέσω της διατροφής καθώς και να εκτεθεί άμεσα κατά την εφαρμογή του φυτοφαρμάκου.

Οι οργανισμοί FAO/WHO έχουν ορίσει για το etherphon τιμή ADI 0,05 mg/ kg σωματικού βάρους [bw]. Έχουν οριστεί επίσης MRLs από την επιτροπή Codex για διάφορα τρόφιμα όπως μήλα, βατόμουρα, κεράσια, ανανά, καρύδια, με τιμή 0,05 mg/kg στο ρύζι [29], [48], [49]. Παραδείγματα μεθόδων που έχουν χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό glufosinate παρατίθενται στον πίνακα 5.2.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

### ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΓΙΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΜΕΜΟΝΩΜΕΝΩΝ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

Για τον προσδιορισμό των παραπάνω ενώσεων έχουν εφαρμοστεί ποικίλες μέθοδοι προετοιμασίας δείγματος για διάφορες μήτρες [παραδείγματα αυτών αναφέρονται στον πίνακα 5.2. Συχνά χρησιμοποιούμενες μέθοδοι για τον καθαρισμό του δείγματος προς ανάλυση είναι η QuPPE και η SPE [20], [37].

#### 3.1 QuPPE [QUICK POLAR PESTICIDES EXTRACTION]

Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει εκχύλιση με οξινισμένη μεθανόλη ενώ ακολουθεί μέτρηση LC-MS/ MS για τον προσδιορισμό των αναλυτών. Είναι χαρακτηριστική για την απλότητα και την ταχύτητά της [50]. Μια γενική περιγραφή της μεθόδου είναι η ακόλουθη:

1. Το δείγμα ομογενοποιείται [ανάλογα το είδος του δείγματος επιλέγεται και ο τρόπος ομογενοποίησης]
2. ζυγίζεται ποσότητα ομογενοποιημένου δείγματος [η ποσότητα εξαρτάται από την περιεκτικότητα του τροφίμου σε νερό]
3. προστίθεται νερό [επιλέγεται ανάλογα την περιεκτικότητα του τροφίμου σε νερό. Η ποσότητα του νερού, στο μίγμα νερού-τροφίμου, πρέπει να φτάνει συνολικά τα 10g]
4. προστίθενται 10 mL οξινισμένης, με 1% φορμικό οξύ, μεθανόλης
5. προστίθενται 100μL κατάλληλου εσωτερικού προτύπου αν αυτό είναι διαθέσιμο
6. Ακολουθεί έντονη ανάδευση μηχανικά [ο χρόνος ανάδευσης εξαρτάται από το δείγμα].
7. ακολουθεί ψύξη
8. Το δείγμα φυγοκεντρείται
9. Ποσότητα εκχυλίσματος φιλτράρεται μέσω φίλτρου H-PTFE για σύριγγες σε πλαστικά autosampler vials [51]

### **3.2 SPE [SOLID PHASE EXTRACTION]**

Γενικότερα, στην SPE οι προσδιοριζόμενες ουσίες κατακρατούνται σε προσροφητικό υλικό μορφής στήλης, φίλτρου ή δίσκου και ακολουθεί η έκλουσή τους με χρήση κατάλληλου διαλύτη ή μίγματος διαλυτών. Έτσι πραγματοποιείται διαχωρισμός των αναλυτών από το δείγμα. Η διαβίβαση διαλυτών και διαλυμάτων από τη στερεά φάση μπορεί να γίνει υπό κενό, με φυγοκέντρηση ή με μηχανική άσκηση πίεσης [52].

Ο μηχανισμός διαχωρισμού των προσδιοριζόμενων ενώσεων επηρεάζεται από τη δομή και τις φυσικοχημικές ιδιότητες του προσροφητικού υλικού.

Τα στάδια εκχύλισης στερεάς φάσης είναι τα ακόλουθα:

1. Ενεργοποίηση-εξισορρόπηση προσροφητικού υλικού
2. Διέλευση-φόρτωση δείγματος, κατακράτηση ουσιών
3. Έκπλυση
4. Ξήρανση προσροφητικού υλικού
5. Εκλεκτική έκλυση επιθυμητών ουσιών

Η επιλογή των διαλυτών εξαρτάται από το είδος του προσροφητικού υλικού και την ουσία προς απομόνωση και είναι ιδιαίτερα σημαντική για μια αποδοτική και εκλεκτική εκχύλιση. Οι διαλύτες, είτε επιλέγονται πειραματικά, είτε δίνονται από τους κατασκευαστές των στηλών. Χρησιμοποιούνται στα στάδια της εξισορρόπησης του προσροφητικού υλικού, της έκπλυσης και της έκλυσης των ουσιών από τη στήλη. Συχνά χρησιμοποιούμενοι διαλύτες είναι το νερό και η μεθανόλη [52], [53].

### **3.3 ΠΑΡΑΓΩΓΟΠΟΙΗΣΗ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΟΥ GLYPHOSATE**

Χρήσιμη είναι, κατά την κατεργασία δείγματος, η εφαρμογή τεχνικών οι οποίες καθιστούν δυνατό τον προσδιορισμό, πολικών φυτοφαρμάκων όπως τα παραπάνω, με χρήση κοινών αναλυτικών μεθόδων όπως η υγρή χρωματογραφία αντίστροφης φάσης με ικανοποιητική κατακράτηση στη στήλη. Κατά τον προσδιορισμό του glyphosate, για αυτό τον σκοπό, συχνά εφαρμόζεται κατά την κατεργασία του δείγματος η τεχνική της

παραγωγοποίησης, η οποία πραγματοποιείται με χρήση του αντιδραστηρίου FMOCl [9-fluorenylmethylchloroformate], ενώ ακολουθεί κατά βάση LC–MS/MS ανάλυση [36].

Μια γενική περιγραφή της πειραματικής πορείας που ακολουθείται για την κατεργασία του δείγματος με ενδιάμεσο στάδιο παραγωγοποίησης είναι η εξής:

1. Ομογενοποίηση δείγματος
2. Ζύγιση κατάλληλης ποσότητας
3. Προσθήκη μίγματος νερού-διχλωρομεθανίου στο δείγμα
4. Φυγοκέντρηση
5. Παραγωγοποίηση υδατικού εκχυλίσματος με προσθήκη ποσότητας FMOCl [σε ακετονιτρίλιο], IS και ρυθμιστικό διάλυμα [ρυθμιστικό συστημα βορικών, pH 9.0]
6. Ανάδευση
7. overnight σε θ δωματίου
8. Τερματισμός παραγωγοποίησης με οξίνιση: προσθήκη HCl [για προσαρμογή pH 1,5]
9. Εφαρμογή SPE για τον καθαρισμό [φισίγγιο SPE-C18, χρήση κατάλληλων διαλυτών]
10. Εξάτμιση εκχυλίσματος μέχρι ξηρού
11. Ανασύσταση σε μίγμα: οξιν. MeOH– νερού

Τα βήματα αυτά είναι ενδεικτικά μιας τέτοιας μεθόδου, ενώ υπάρχουν στην βιβλιογραφία διάφορες παραλλαγές και επιπρόσθετα βήματα ανάλογα και τη σύσταση του μητρικού υλικού και τις απαιτήσεις καθαρότητας του εκχυλίσματος. Παραδείγματα παραλλαγών είναι η προσθήκη περίσσειας αντιδραστηρίου FMOCl αντί της προσθήκης συγκεκριμένης ποσότητας του αντιδραστηρίου, ο καθαρισμός με εφαρμογή LLE ή άλλων τεχνικών αντί της SPE μετά την παραγωγοποίηση, χρήση διαφορετικών στηλών και διαλυτών κατά την SPE [34], [35], [44], [45].

Εκτός από τα πλεονεκτήματά της, η τεχνική της παραγωγοποίησης εμφανίζει

επίσης και κάποια μειονεκτήματα που αφορούν κυρίως στον απαιτούμενο χρόνο της όλης διαδικασίας [η παραγωγοποίηση αυτή καθ' αυτή αποτελεί μια χρονοβόρα διαδικασία], ενώ και ο χρόνος της χρωματογραφικής ανάλυσης είναι επίσης μεγάλος. Απαιτείται επίσης κατάλληλος εξοπλισμός και αντιδραστήρια για την εφαρμογή της ενώ χαρακτηρίζεται επίσης και από έλλειψη επαναληψιμότητας και αναπαραγωγιμότητας [45].

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

### ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΚΑΙ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ

Η χρωματογραφία περιλαμβάνει μεθόδους διαχωρισμού μιγμάτων ανόργανων, οργανικών ή οργανομεταλλικών ουσιών στα συστατικά τους. Ο διαχωρισμός βασίζεται σε διαφορές φυσικοχημικής συγγένειας των ουσιών ως προς δύο φάσεις, τη στατικήφάση η οποία αποτελείται από μία ακίνητη στιβάδα μεγάλης επιφάνειας που είναι καθηλωμένη σε μία στήλη ή σε μία στερεά επιφάνεια, και την κινητή φάση η οποία αποτελείται από ένα ρευστό που κινείται κατά μήκος της στατικής φάσης. Τα συστατικά του δείγματος διαχωρίζονται καταλαμβάνοντας το καθένα ξεχωριστές ζώνες, ως αποτέλεσμα της διαφορετικής ευκινήσις μεταξύ τους, καθώς δεν κατακρατούνται όλα, το ίδιο ισχυρά από τη στατική φάση. Αυτά που κατακρατούνται ισχυρότερα, κινούνται πιο αργά κατά τη ροή της κινητής φάσης, ενώ αυτά που κατακρατούνται ασθενέστερα κινούνται ταχύτερα. Έτσι καθίσταται δυνατός ο ποιοτικός ή/και ποσοτικός προσδιορισμός των συστατικών του δείγματος.

Οι χρωματογραφικές τεχνικές αποτελούν τη σημαντικότερη κατηγορία αναλυτικών τεχνικών διαχωρισμού με κατανομή μεταξύ δύο φάσεων [53], [54].

#### 4.1 ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HPLC)

Στην υγροχρωματογραφία χρησιμοποιείται υγρή κινητή φάση και στερεή ή υγρή στατική φάση ακινητοποιημένη σε αδρανές υπόστρωμα. Κατά τον χρωματογραφικό διαχωρισμό κάθε ουσία κατανέμεται μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης, ενώ με τη ροή του διαλύτη μετακινείται προς την έξοδο της στήλης. Δημιουργείται έτσι, μέσα στη στήλη, μία μετακινούμενη ζώνη, η οποία αποδίδεται ως μία κορυφή στο χρωματογράφημα. Το ύψος της κορυφής και το εμβαδόν της επιφάνειάς της είναι ανάλογα της συγκέντρωσης ή της μάζας της ουσίας οδηγώντας έτσι στην δυνατότητα ποσοτικοποίησης.

Η Υγροχρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography) αποτελεί μιας ευρέως χρησιμοποιούμενη αναλυτική τεχνική διαχωρισμού και ποσοτικού προσδιορισμού, κατάλληλη για μη πτητικές ή

θερμοευαίσθητες ουσίες. Βρίσκει εφαρμογή στον προσδιορισμό μεγάλου αριθμού ενώσεων συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών, των υδατανθράκων, των φυτοπροστατευτικών ουσιών, των αντιβιοτικών και πολλών άλλων. Υπάρχουν διάφορα είδη χρωματογραφίας τα οποία ταξινομούνται, ανάλογα με την κατηγορία ενώσεων όπου εφαρμόζονται και ανάλογα το μηχανισμό αλληλεπίδρασης των δύο φάσεων με τις ουσίες προς διαχωρισμό (μέγεθος, σχήμα, πυκνότητα φορτίου των σωματιδίων στο διάλυμα). Με βάση το μηχανισμό αλληλεπίδρασης υφίστανται:

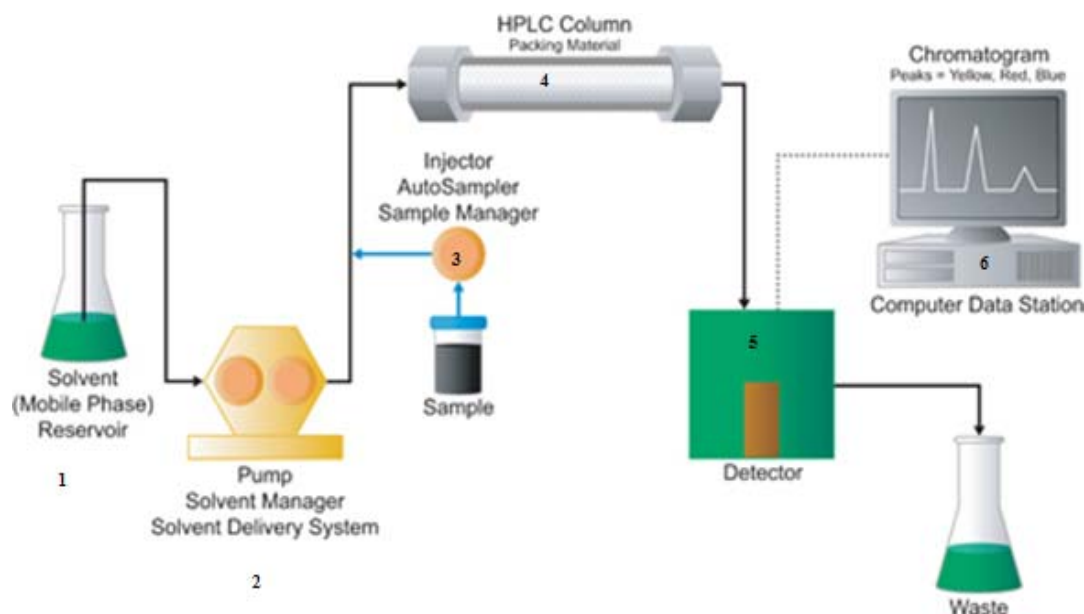
- Η χρωματογραφία προσρόφησης (διαχωρισμός μη πολικών ενώσεων)
- Η χρωματογραφία κατανομής (διαχωρισμός μη ιοντικών πολικών ενώσεων)
- Η χρωματογραφία ιονανταλλαγής (διαχωρισμός ιοντικών ενώσεων)
- Η χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (διαχωρισμός ενώσεων με μοριακό βάρος μεγαλύτερο από 10.000)
- Η χρωματογραφία συγγένειας

Συχνά υπάρχει αλληλοεπικάλυψη μεταξύ των πεδίων εφαρμογών του κάθε είδους υγροχρωματογραφίας.

Ένα σύστημα HPLC αποτελείται από:

1. Δοχεία κινητής φάσης: Υάλινα δοχεία που περιέχουν τους διαλύτες που αποτελούν την κινητή φάση, εφοδιασμένα συχνά με μέσα απομάκρυνσης διαλυμένων αερίων, σκόνης και αιωρούμενων σωματιδίων.
2. Αντλία: Η ροή της κινητής φάσης μέσα από τη στήλη επιτυγχάνεται μέσω του συστήματος άντλησης όπου αναπτύσσονται πιέσεις μέχρι 600 psi.
3. Σύστημα έγχυσης δείγματος: Αποτελείται από βρόχο συγκεκριμένου όγκου.
4. Αναλυτική στήλη: Ευθύγραμμοι σωλήνες από ανοξείδωτο χάλυβα πληρωμένοι με το υλικό που αποτελεί τη στατική φάση. Για την προστασία της αναλυτικής στήλης προηγείται αυτής προστήλη η οποία συγκρατεί αιωρούμενα σωματίδια, προσμίξεις του διαλύτη και συστατικά του δείγματος τα οποία μπορεί να συνδεθούν μη αντιστρεπτά με τη στατική φάση.
5. Ανιχνευτής.

6. Σύστημα επεξεργασίας και παρουσίασης δεδομένων (προσωπικός υπολογιστής).



Σχήμα 4.1: Παράδειγμα διάταξης HPLC

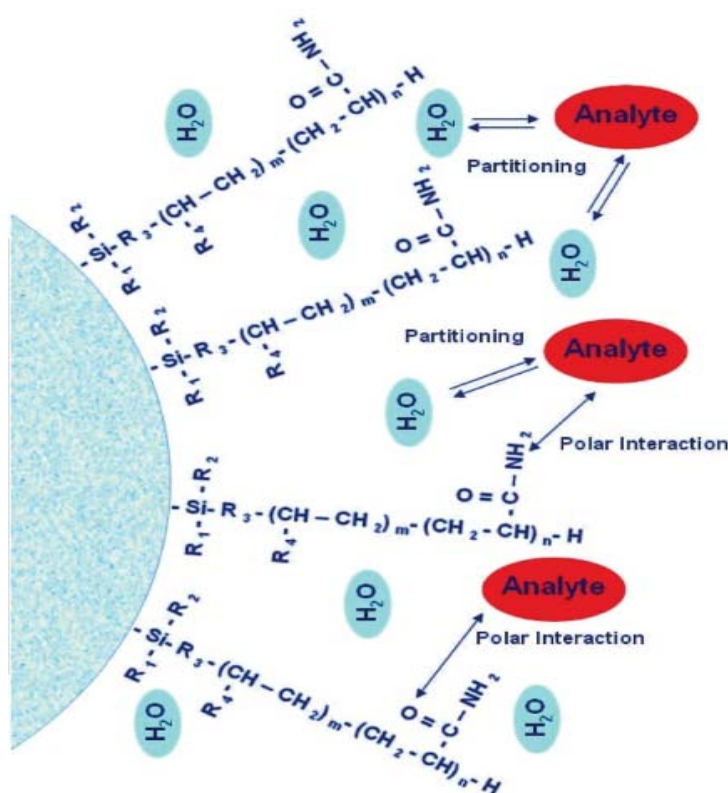
#### 4.1.1 ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ

Η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη κατηγορία χρωματογραφίας είναι η υγρή χρωματογραφία κατανομής, στην οποία συμπεριλαμβάνεται η υγροχρωματογραφία κανονικής φάσης, όπου χρησιμοποιείται πολική στατική φάση και σχετικά άπολος διαλύτης ως κινητή φάση και την υγροχρωματογραφία αντίστροφης φάσης, όπου χρησιμοποιείται μη πολική στατική φάση και ως κινητή φάση ένας σχετικά πολικός διαλύτης [53].

Η υγροχρωματογραφία αντίστροφης φάσης βρίσκει χρήση σε αναλύσεις ποικίλων δειγμάτων για τον προσδιορισμό ενός μεγάλου αριθμού ενώσεων, στις οποίες συγκαταλέγονται και αρκετές φυτοπροστατευτικές ενώσεις. Παρόλα αυτά, πολικές ενώσεις, όπως είναι και τα φυτοφάρμακα που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία, δεν συγκρατούνται επαρκώς στην εκάστοτε στατική φάση ακόμη και σε κινητή φάση με χαμηλό ποσοστό οργανικού διαλύτη, ή ακόμη και σε 100% υδατική κινητή φάση. Τη δυνατότητα αποτελεσματικού διαχωρισμού τέτοιων ενώσεων με HPLC δίνει η υγροχρωματογραφία HILIC (hydrophilic interaction liquid chromatography).

#### 4.1.2 HYDROPHILIC INTERACTION LIQUID CHROMATOGRAPHY

Η HILIC βρίσκει εφαρμογή κατά βάση στον διαχωρισμό πολικών και υδρόφιλων ενώσεων, όπως σακχαριτών και ολιγοσακχαριτών, γλυκοσίδων, πεπτιδίων και υδρόφιλων φαρμάκων. Όσον αφορά τη στατική φάση που χρησιμοποιείται, η HILIC εμφανίζει ομοιότητες με τη χρωματογραφία κανονικής κατανομής. Τυπικές στατικές φάσεις της HILIC αποτελούν σωματίδια διοξειδίου του πυριτίου ή πολυμερών, τα οποία φέρουν πολικές λειτουργικές ομάδες (πχ. αμινομάδες). Αντίθετα χρησιμοποιούνται κινητές φάσεις παρόμοιες με αυτές της χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης, όπως μίγματα ακετονιτριλίου-νερού και υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα. Η διαφορά όμως με τη χρωματογραφία αντίστροφης φάσης, είναι ότι στη HILIC σε εφαρμογή βαθμιδωτής έκλουσης οι αναλογίες μεταξύ οργανικού και υδατικού διαλύτη μεταβάλλονται με αντίθετο τρόπο, ξεκινώντας δηλαδή με υψηλό ποσοστό οργανικού διαλύτη και φτάνοντας σε υψηλό ποσοστό υδατικού διαλύτη και συνεπώς η εκλεκτικότητά της είναι διαφορετική από αυτήν της χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης.



**Σχήμα 4.2: Μηχανισμός αλληλεπίδρασης αναλύτη-στατικής φάσης χρωματογραφίας HILIC**

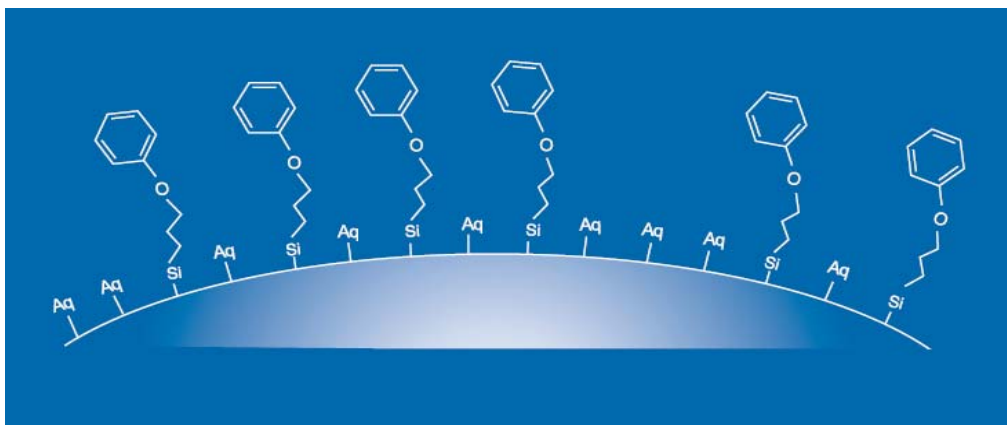
Βασικοί μηχανισμοί κατακράτησης των αναλυτών αποτελούν οι αλληλεπιδράσεις με δεσμούς υδρογόνου και δίπολου διπόλου, ενώ η σειρά της έκλουσης των ενώσεων καθορίζεται από τον αριθμό των πολικών ομάδων που περιέχουν στο μόριό τους καθώς και από τη σύσταση και τη διαλυτότητα του δείγματος στην κινητή φάση. Θεωρείται ότι μέρος της κινητής φάσης δημιουργεί μια υδατική στοιβάδα στην επιφάνεια της στατικής φάσης, επιτρέποντας έτσι το διαχωρισμό των αναλυτών μεταξύ της υδατικής αυτής στιβάδας και της οργανικής κινητής φάσης [55].

Παραδείγματα στηλών που χρησιμοποιούνται με συνθήκες HILIC παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα.

**Πίνακας 4.1: Παραδείγματα στηλών για χρήση σε συνθήκες HILIC**

| <b>ΣΤΗΛΕΣ</b>                                       | <b>ΑΝΑΦΟΡΕΣ</b> |
|-----------------------------------------------------|-----------------|
| Pack Diol-NP                                        | [56]            |
| Pack Polyamine II                                   |                 |
| Cosmosil HILIC Packed column                        | [57]            |
| Acclaim HILIC-10                                    | [58]            |
| Cosmosil PBr                                        |                 |
| Kromasil HILIC-D                                    |                 |
| Sielc Obelisc N (Mixed-Mode HILIC, Zwitterion & NP) | [59]            |
| MN Nucleosil NH <sub>2</sub> _ Anion Exchange HILIC |                 |
| MN Nucleodur HILIC _ Zwitterion HILIC               |                 |
| Hypercarb                                           | [60]            |
| AS 11                                               |                 |
| Obelisc R                                           |                 |
| Synergy Polar-RP                                    | [61]            |

## POLAR\_RP



Σχήμα 4.3: Στήλη Polar\_RP

Η στήλη Polar-RP αποτελεί στατική φάση που διαθέτει φαινυλικές ομάδες συνδεδεμένες με αιθερικές ομάδες καθώς και κατάλληλη επικάλυψη με υδρόφιλες ομάδες, επιτυγχάνοντας εκλεκτικότητα ως προς πολικούς και αρωματικούς αναλύτες. Χαρακτηρίζεται από καλή αναπαραγωγιμότητα, και δίνει οξείες, στενές κορυφές, ενώ είναι και ανθεκτική στην υδρόλυση ακόμα και σε χαμηλές τιμές pH. Η στήλη αυτή όπως αναφέρθηκε είναι επικαλυμμένη με πολικές ομάδες προσφέροντας τη δυνατότητα κατακράτησης κατιόντων και συνεπώς οδηγώντας στην συγκράτηση ιονισμένων βάσεων.

Στην χρωματογραφία αντίστροφης φάσης, η υδροφοβικότητα αποτελεί βασικό μηχανισμό κατακράτησης των ενώσεων, άρα είναι και σημαντική παράμετρος για την μελέτη της εκλεκτικότητας των αντίστοιχων στηλών. Παρόλα αυτά στην περίπτωση της στήλης Polar\_RP η εκλεκτικότητα επηρεάζεται έντονα από άλλες παραμέτρους δύο από τις οποίες περιγράφονται παρακάτω.

### — Δεσμοί υδρογόνου

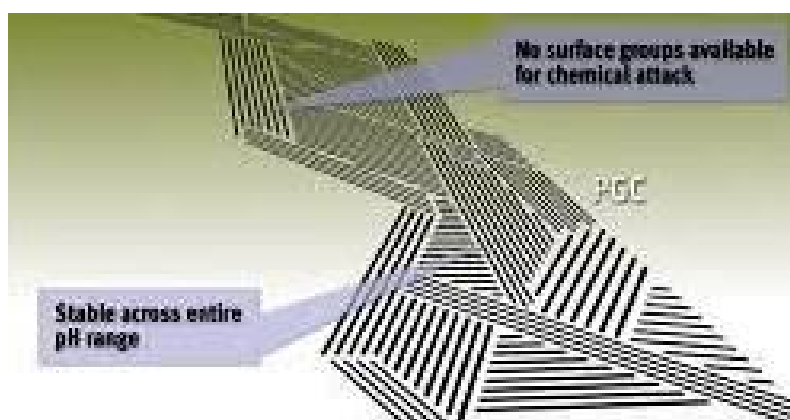
Η στήλη Polar\_RP μπορεί να σχηματίσει δεσμούς υδρογόνου και να αλληλεπιδρά με δότες πρωτονίων (όξινη ομάδα) όπως καρβοξυλικά οξέα ή αλκοόλες.

### — Ουδέτερο pH

Σε τιμές pH κοντά στο 7 οι ελεύθερες ομάδες σιλανόλης στην επιφάνεια του διοξειδίου του πυριτίου παραμένουν ιοντισμένες, συμβάλλοντας στην

εκλεκτικότητα της στήλης προς κατιοντικές ενώσεις. [62]

## HYPERCARB



Σχήμα 4.4: Στήλη Hypercarb

Η στατική φάση αυτή αποτελείται από 100% πορώδη γραφίτη (PGC). Η κρυσταλλική επιφάνεια του γραφίτη αποτελείται από επίπεδα φύλλα άτομων άνθρακα σε εξαγωνική διευθέτηση.

Η στήλη Hypercarb χαρακτηρίζεται από σταθερότητα ανεξαρτήτως τιμών pH, ενώ είναι συμβατή με ένα μεγάλο εύρος διαλυτών. Δίνει τη δυνατότητα διαχωρισμού ενώσεων διαφόρων πολικοτήτων σε μια μόνο χρωματογραφική ανάλυση, ενώ είναι χαρακτηριστική η ικανότητα κατακράτησης ιδιαίτερας πολικών ενώσεων.

Η κατακράτηση ενώσεων από τη στήλη Hypercarb ωφείλεται στο συνδυασμό των παρακάτω μηχανισμών:

- αλληλεπιδράσεις διασποράς μεταξύ αναλύτη- κινητής φάσης και αναλύτη- επιφάνειας γραφίτη, όπου η κατακράτηση αυξάνεται με την υδροφοβικότητα του μορίου
- επαγόμενες αλληλεπιδράσεις πολικών αναλυτών με την πολωμένη επιφάνεια του γραφίτη

Οι πολικές ενώσεις εμφανίζουν συγγένεια με την επιφάνεια του γραφίτη και έτσι επιτυγχάνεται η κατακράτηση τους στη στήλη. Είναι κατάλληλη για διαχωρισμό πολικών ενώσεων με κινητές φάσεις συμβατές με φασματομετρία

μάζας. Εμφανίζει σταθερότητα με οποιαδήποτε κινητή φάση [63].

## **4.2 ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ**

Η χρήση της φασματομετρίας μαζών φέρει πολλά πλεονεκτήματα. Πολλές ενώσεις διαθέτουν μοναδικά φάσματα μαζών συνεπώς είναι δυνατή η ταυτοποίηση αυτών με υψηλό βαθμό αξιοπιστίας.

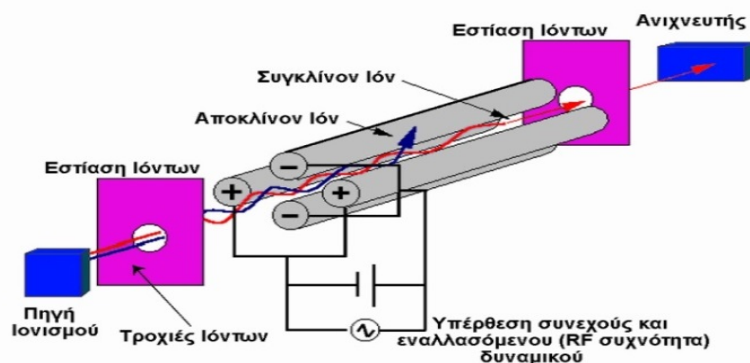
Η σύζευξη χρωματογραφικών τεχνικών με φασματομετρία μαζών επιτρέπει τον διαχωρισμό ουσιών μίγματος και την εισαγωγή τους στο φασματόμετρο μαζών, με τη χρήση του οποίου ταυτοποιούνται και προσδιορίζονται ποσοτικά. Η ταυτοποίηση είναι αξιόπιστη ακόμα και σε περιπτώσεις μη ικανοποιητικού διαχωρισμού καθώς ουσίες με παρόμοιους χρόνους ανάσχεσης θα παρουσιάζουν διαφοροποίηση στο φάσμα μαζών [54].

### **4.2.1 ΙΟΝΤΙΣΜΟΣ ΜΕ ΗΛΕΚΤΡΟΨΕΚΑΣΜΟ**

Η τεχνική ιοντισμού με ψεκασμό σε ηλεκτρικό πεδίο (electron-spray ionization, ESI), μεταξύ άλλων τεχνικών, επιτρέπει τον συνδυασμό υγρής χρωματογραφίας με φασματομετρία μαζών [64, 65]. Αποτελεί 'μαλακή' πηγή ιονισμού και είναι η πιο βασική μέθοδος σύζευξης υγρής χρωματογραφίας με φασματομετρία μαζών.

Όταν ένα υγρό ψεκάζεται μέσω ενός τριχοειδούς σωλήνα υπό την επίδραση ενός ηλεκτρικού πεδίου μερικών χιλιάδων Volts, τότε το υγρό διασπείρεται σε νέφος πολύ μικρών φορτισμένων σταγόνων. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται εξάτμιση με ιονισμό και σε αυτό βασίζεται και η τεχνική ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό [53].

## 4.2.2 ΤΕΤΡΑΠΟΛΙΚΟΣ ΑΝΑΛΥΤΗΣ

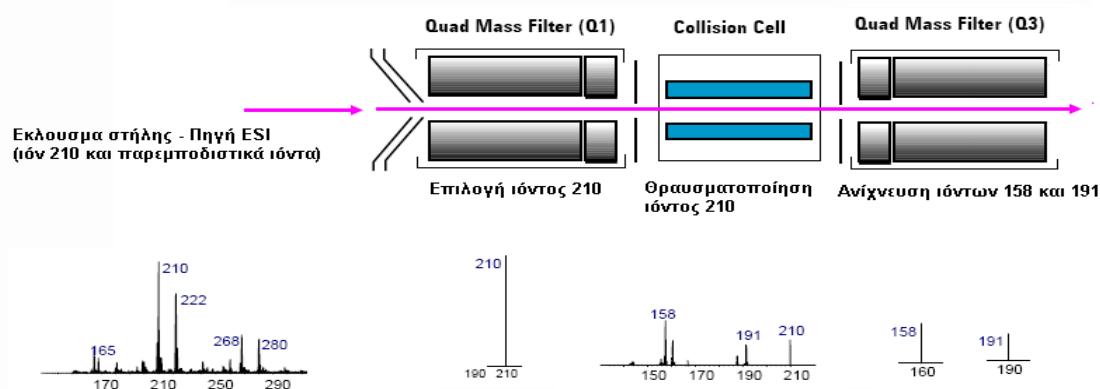


Σχήμα 4.5: Διάγραμμα Τετραπολικού Αναλυτή μαζών

Ο τετραπολικός αναλυτής μαζών (ή συχνά αποκαλούμενος και ως φίλτρο μαζών) είναι ο πιο διαδεδομένος λόγω των πλεονεκτημάτων που φέρει (ανθεκτικότητα, ταχεία σάρωση, άμεση συμβατότητα με χρωματογραφικές τεχνικές κ.α) [54, 66]. Το φάσμα μαζών της ουσίας προς προσδιορισμό παρουσιάζεται ως διάγραμμα της αφθονίας του σήματος ή της σχετικής έντασης κάθε ιόντος με το λόγο  $m/z$  (μάζα/ φορτίο).

Ο τετραπολικός αναλυτής, σε συνδυασμό με τα φίλτρα εστίασης της δέσμης, επιτρέπει μόνο σε ένα στενό εύρος τιμών  $m/z$  να φτάσουν στον ανιχνευτή, ενώ τα υπόλοιπα ιόντα απορρίπτονται και απομακρύνονται.

## 4.2.3 ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ ΤΡΙΠΛΟΥ ΤΕΤΡΑΠΟΛΟΥ (QQQ)



Σχήμα 4.6: Ανιχνευτής Τριπλού Τετραπόλου (QqQ)

Σε έναν αναλυτή τριπλού τετραπόλου (QqQ), το πρώτο τετράπολο λειτουργεί ως φίλτρο μαζών καθώς επιλεγμένη μόνο μάζα εισέρχεται στο δεύτερο

τετράπολο όπου πραγματοποιείται βομβαρδισμός με άτομα He ή Ar. Στο τρίτο τετράπολο διαχωρίζονται τα θυγατρικά ιόντα τα οποία και ανιχνεύονται από τον ανιχνευτή.

Το σύστημα τριπλού τετραπόλου χρησιμοποιείται ευρέως καθώς παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα όπως καλή γραμμικότητα (3 τάξεις μεγέθους) και ακρίβεια (επαναληψιμότητα των κορυφών < 10 %), ενώ με τη δυνατότητα εναλλαγής της πολικότητας του ηλεκτροψεκασμού κατά τη διάρκεια του χρωματογραφήματος επιτυγχάνεται ο προσδιορισμός συστατικών με διαφορετική χημική δομή [67].

#### **4.2.4 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΣΑΡΩΣΗΣ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΩΝ**

Τεχνικές ανάλυσης που χρησιμοποιούνται ευρέως στην φασματομετρία μάζας είναι:

- ο Η τεχνική πλήρους σάρωσης (Full Scan, FS), όπου λαμβάνονται πλήρη φάσματα μεταξύ δύο ακραίων τιμών  $m/z$  για καθορισμένο χρόνο
- ο Η τεχνική επιλεκτικής παρακολούθησης ιόντων (Single Ion Monitoring, SIM) όπου για ένα κάποιο συστατικό επιλέγονται συγκεκριμένα ιόντα αυτού, ώστε ο αναλυτής μεταβαίνει από τη μια μάζα στην άλλη ταχύτατα. Η ανάλυση αυτή αποσκοπεί στην ανίχνευση, με μέγιστη ευαισθησία, συστατικών γνωστών αναλυτικών φασματικών χαρακτηριστικών
- ο Η τεχνική παρακολούθησης συγκεκριμένης αντίδρασης (Selected Reaction Monitoring, SRM), για την παρακολούθηση συγκεκριμένου αναλύτη σε μικρό χρόνο και ταυτόχρονη παρακολούθηση πολλών αντιδράσεων [53, 68-71].

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

### ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ – ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ

Η Γενική Διεύθυνση Υγείας και Καταναλωτών της Ευρωπαϊκής Επιτροπής ορίζει με την οδηγία SANTE/11813/2017 (σε ισχύ από την 1/1/2018), κατευθυντήριες γραμμές που αφορούν τις διαδικασίες ποιοτικού ελέγχου για την ανάλυση υπολειμμάτων παρασιτοκτόνων σε τρόφιμα και ζωοτροφές.

#### 5.1 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟΣ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ

Χρησιμοποιείται κατάλληλη στήλη GC ή LC. Ο ελάχιστος αποδεκτός χρόνος κατακράτησης για τον/τους αναλύτη/-ες, πρέπει να είναι τουλάχιστον διπλάσιος του νεκρού χρόνου της στήλης. Ο χρόνος κατακράτησης του αναλύτη στο εκχύλισμα πρέπει να αντιστοιχεί σε εκείνον του προτύπου βαθμονόμησης (μπορεί να χρειαστεί χρήση προτύπων προσαρμοσμένων στη μήτρα του δείγματος) με ανοχή  $\pm 0,1$  min. Όταν υπάρχουν στοιχεία από μελέτες επικύρωσης, ή όταν ο χρόνος κατακράτησης και το σχήμα κορυφής του αναλύτη ταιριάζουν με εκείνους ενός κατάλληλου ισοτοπικά, επισημασμένου εσωτερικού προτύπου (isotopically labelled internal standard, IL-IS, χρήσιμο όταν εμφανίζονται μετατοπίσεις χρόνου κατακράτησης ή όταν το μητρικό υλικό επηρεάζει το σχήμα της κορυφής), γίνονται αποδεκτές και μεγαλύτερες αποκλίσεις στο χρόνο κατακράτησης. Ο εμβολιασμός του δείγματος με την ουσία προς προσδιορισμό, συμβάλλει στην αύξηση της εμπιστοσύνης στην αναγνώριση.

#### 5.2 ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΜΕΣΩ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΑΣ

Τα εργαστήρια που χρησιμοποιούν φασματική αντιστοίχιση για την ταυτοποίηση των ενώσεων πρέπει να θέτουν δικά τους κριτήρια και να αποδεικνύουν ότι αυτά είναι κατάλληλα για χρήση. Αυτό είναι απαραίτητο γιατί, παρόλο που τα φάσματα μάζας μπορούν να είναι πολύ συγκεκριμένα για έναν αναλύτη, οι τιμές αντιστοίχισης διαφέρουν για το εκάστοτε λογισμικό. Καθίσταται έτσι αδύνατη η ανάπτυξη γενικών οδηγιών για τις τιμές

αντιστοίχισης για ταυτοποίηση. Συνεπώς, στην περίπτωση ταυτοποίησης με βάση επιλεγμένα ιόντα παρέχονται λεπτομερή κριτήρια.

Οι απαιτήσεις για ταυτοποίηση δίδονται στον πίνακα Πίνακα 5.1. Αποτελούν κριτήρια καθοδήγησης για την ταυτοποίηση και όχι απόλυτα κριτήρια για την απόδειξη της παρουσίας ή απουσίας του αναλύτη. Συνίσταται να μην εφαρμόζονται τυφλά καθώς και να μην χρησιμοποιούνται αποκλειστικά, χωρίς συμπληρωματική ερμηνεία από έμπειρο αναλυτή, για αυτοματοποιημένη ερμηνεία δεδομένων.

**Πίνακας 5.1: Απαιτήσεις ταυτοποίησης**

| <b>ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ<br/>ΦΑΣ/ΜΕΤΡΙΑΣ<br/>ΜΑΖΑΣ/<br/>ΧΑΡΑΚΤΗΡ.</b> | <b>ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ</b>                                                        | <b>ΤΡΟΠΟΙ ΣΑΡΩΣΗΣ</b>                                                                                                                                                                                                             | <b>ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ</b>          |                                                                                                                |
|------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                            |                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                   | <b>ΕΛΑΧΙΣΤΟΣ<br/>ΑΡΙΘΜΟΣ<br/>ΙΟΝΤΩΝ</b> | <b>ΑΛΛΕΣ<br/>ΠΡΟΫΠΟΘΕΣΕΙ<br/>Σ</b>                                                                             |
| MS                                                         | Τετράπολο,<br>παγίδα ιόντων,<br>TOF                                        | Πλήρης σάρωση,<br>περιορισμένη<br>περιοχή εύρους m/<br>z, SIM                                                                                                                                                                     | 3 ιόντα                                 | S/N $\geq 3^5$<br>Πλήρης<br>επικάλυψη<br>των κορυφών<br>των<br>αναλυτών στα<br>χρωματογραφήμ<br>ατα των ιόντων |
| MS/MS                                                      | Τριπλό<br>τετράπολο,<br>παγίδα ιόντων,<br>Q-trap,<br>Q-TOF ,<br>Q-Orbitrap | Επιλεγμένη<br>παρακολούθηση<br>αντίδρασης (SRM)<br>πολλαπλή<br>παρακολούθηση<br>αντίδρασης (MRM)<br>(Διαχωριστική<br>ικανότητα<br>για την απομόνωση<br>του<br>πρόδρομου ιόντος<br>ανάλογη ή<br>μεγαλύτερη από<br>ταμονοβάθμια MS) | 2 θυγατρικά ιόντα                       |                                                                                                                |

<sup>1</sup> κατά προτίμηση συμπεριλαμβανομένου του μοριακού ιόντος, απόπρωτονιωμένου ή ιόντος προσθήκης

<sup>2</sup> συμπεριλαμβανομένου τουλάχιστον ενός θυγατρικού ιόντος

<sup>3</sup> <1 mDa για m / z <200

<sup>4</sup> καμία ειδική απαίτηση για ακρίβεια μάζας

<sup>5</sup> σε περίπτωση απουσίας θορύβου, θα πρέπει να υπάρχει σήμα σε τουλάχιστον 5 επόμενες ανιχνεύσεις

### **5.3 ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗΣ ΚΑΙ ΚΡΙΤΗΡΙΑ**

#### **5.3.1 ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΜΠΥΛΩΝ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗΣ**

Χρησιμοποιούνται τουλάχιστον πέντε πρότυπα για τον έλεγχο της γραμμικότητας. Για να είναι αποδεκτή πρέπει οι τιμές των υπολοίπων- των αποκλίσεων των τιμών μέτρησης από τις τιμές τους- (προβλέπονται από τη γραμμή παλινδρόμησης), να κυμαίνονται από -20% έως +20%. Για το χαμηλότερο επίπεδο βαθμονόμησης πρέπει να εξασφαλίζεται ότι είναι  $\leq RL$  (Reporting Limit, το επίπεδο βαθμονόμησης που αντιστοιχεί στο όριο αναφοράς, το χαμηλότερο επίπεδο, με το οποίο τα υπολείμματα θα αναφέρονται ως απόλυτοι αριθμοί). Ο συντελεστής απόκρισης των προτύπων βαθμονόμησης κάθε επιπέδου δεν πρέπει να διαφέρει περισσότερο από 20% (η υψηλότερη απόκριση λαμβάνεται ως 100%). Η καμπύλη βαθμονόμησης δεν θα έπρεπε να εξαναγκάζεται να περάσει από την αρχή των αξόνων, αν δεν υπάρχει σημαντική αιτία. Συνιστάται η χρήση σταθμισμένης γραμμικής παλινδρόμησης ( $1/x$ ), αντί της γραμμικής παλινδρόμησης.

Στη ρουτίνα γενικά προτιμάται η βαθμονόμηση πολλαπλών επιπέδων (τρεις ή περισσότερες συγκεντρώσεις). Αν υπάρχουν υπολείμματα που αποκλίνουν από την καμπύλη βαθμονόμησης στην αντίστοιχη περιοχή περισσότερο από  $\pm 20\%$ , πρέπει να χρησιμοποιηθεί εναλλακτική λειτουργία βαθμονόμησης. Η βαθμονόμηση με χρήση δύο επιπέδων και ενός επιπέδου είναι επίσης αποδεκτές, αν πληρούνται κάποιες προϋποθέσεις.

#### **5.3.2 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΜΗΤΡΑΣ**

Αξιολογείται στο στάδιο της επικύρωσης της αρχικής μεθόδου. Μια συχνή μέθοδος αντιμετώπισης της επίδρασης του μητρικού υλικού είναι η βαθμονόμηση προσαρμοσμένη στη μήτρα, όπου προτιμούνται για βαθμονόμηση εκχυλίσματα τυφλών δειγμάτων ίδιου τύπου με το δείγμα. Αρκετά αποτελεσματική μέθοδος είναι επίσης η χρήση πρόσθετων προτύπων ή ισοτοπικά επισημασμένων εσωτερικών προτύπων. Η χρήση καμπύλης προσαρμοσμένης στη μήτρα του δείγματος είναι απαραίτητη στην περίπτωση όπου το φαινόμενο της μήτρας ξεπερνά τα όρια του  $\pm 20\%$ .

#### **5.3.3 ΟΡΘΟΤΗΤΑ ΜΕΘΟΔΟΥ**

Αφορά την εγγύτητα μεταξύ της αποδεκτής τιμής αναφοράς και του μέσου

όρου που λαμβάνεται από τα αποτελέσματα μιας σειράς δοκιμών. Γι αυτό το σκοπό η αληθής τιμή λαμβάνεται σε σχέση με την ποσότητα που προστίθεται σε εμβολιασμένο δείγμα. Η ορθότητα ελέγχεται με μέτρηση της ανάκτησης για κάθε φυτοπροστατευτική ουσία μετά από επεξεργασία των εμβολιασμένων δειγμάτων.

Μια αναλυτική μέθοδος πρέπει αποδεδειγμένα να παρέχει αποδεκτές μέσες τιμές ανάκτησης σε κάθε επίπεδο εμβολιασμού. Για να μελετηθεί η απόδοση της ανάλυσης σε ένα εύρος συγκεντρώσεων μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένα άλλο επίπεδο εμβολιασμού. Ιδιαίτερα σημαντική είναι η ανάκτηση των αντίστοιχων επιπέδων των τιμών RL και MRL. Για να είναι αποδεκτές οι μέσες ανακτήσεις πρέπει να κυμαίνονται μεταξύ των τιμών 70-120% για όλους τους αναλύτες εντός του πεδίου εφαρμογής μίας μεθόδου. Υπάρχουν περιπτώσεις, κατά βάση σε μεθόδους πολλαπλών υπολειμμάτων, όπου ανακτήσεις εκτός των παραπάνω τιμών εύρους μπορεί να γίνουν δεκτές. Επίσης, κατ' εξαίρεση, εάν η ανάκτηση είναι χαμηλή αλλά συνεπής, μία μέση ανάκτηση κάτω από 70% μπορεί να γίνει αποδεκτή, όμως αν είναι εφικτό θα έπρεπε να χρησιμοποιηθεί μία πιο ακριβής μέθοδος.

#### **5.3.4 ΠΙΣΤΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ**

Αφορά την εγγύτητα μεταξύ αποτελεσμάτων ανεξάρτητων δοκιμών κάτω καθορισμένες συνθήκες. Υπολογίζεται ως η τυπική απόκλιση των αποτελεσμάτων μίας σειράς μετρήσεων, σε συνθήκες επαναληψιμότητας και ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας.

##### **5.3.4.1 ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑ ΜΕΘΟΔΟΥ**

Η επαναληψιμότητα μιας μεθόδου εκφράζεται από την τυπική απόκλιση (SD) της ανάκτησης. Η εκατοστιαία σχετική τυπική απόκλιση τιμών ανάκτησης επαναλαμβανόμενων μετρήσεων σε κάθε επίπεδο την ίδια ημέρα (%RSDr) πρέπει να είναι  $\leq 20\%$  για όλους τους αναλύτες εντός του πεδίου εφαρμογής μίας μεθόδου, σύμφωνα με τα κριτήρια της SANTE.

##### **5.3.4.2 ΕΝΔΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΜΟΤΗΤΑ**

Η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα εκφράζεται από την σχετική τυπική απόκλιση τιμών ανάκτησης επαναλαμβανόμενων μετρήσεων σε κάθε επίπεδο

σε τρεις διαφορετικές ημέρες ( $RSD_{WR}$ ). Σε αναλύσεις ρουτίνας η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα μπορεί να προσδιοριστεί και από τα συνεχή δεδομένα QC και πρέπει να ισχύει  $\%RSD_{WR} \leq 20\%$ , εξαιρουμένης της επίδρασης της ετερογένειας του υποστρώματος.

### **5.3.5 ΟΡΙΑ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ**

Όριο ποσοτικοποίησης (limit of quantitation, LOQ) αποτελεί το ελάχιστο επίπεδο συγκέντρωσης μιας ουσίας, το οποίο μπορεί να προσδιοριστεί ποσοτικά με συγκεκριμένη στάθμη εμπιστοσύνης. Για την νομοθεσία ως όριο ποσοτικοποίησης ορίζεται το χαμηλότερο επίπεδο εμβολιασμού κατά την επικύρωση, όπου πληρούνται τα κριτήρια αποδοχής των επιδόσεων της μεθόδου. (Οι τιμές RL και MRL πρέπει να είναι υψηλότερες του ορίου ποσοτικοποίησης).

### **5.3.6 ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ**

Αποτελεί την ικανότητα παροχής σημάτων που προσδιορίζουν αποτελεσματικά την αναλυόμενη ουσία από τον ανιχνευτή (υποστηριζόμενη από την εκλεκτικότητα της εκχύλισης, καθαρισμός, παραγωγοποίηση ή διαχωρισμός, εάν χρειάζεται). Για να είναι αποδεκτή η ειδικότητα του ανιχνευτή για έναν αναλύτη πρέπει η απόκριση του λευκού αντιδραστηρίων και μήτρας να είναι μικρότερη από το RL κατά 30%. Σε περίπτωση όπου δεν πληρούνται οι απαραίτητες προϋποθέσεις, οι ανακτήσεις υπολογίζονται με αφαίρεση της απόκρισης του τυφλού κατά τη βαθμονόμηση, διαδικασία η οποία πρέπει να αναφέρεται στα αποτελέσματα.

## **5.4 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΑΒΕΒΑΙΟΤΗΤΑΣ**

Η αβεβαιότητα ενός αναφερόμενου ή πειραματικού αποτελέσματος περιγράφει το εύρος εντός του οποίου θα βρίσκεται η τιμή με ορισμένη πιθανότητα (στάθμη εμπιστοσύνης) το οποίο θα πρέπει να λαμβάνει υπόψη όλες τις πηγές σφαλμάτων. Τα εργαστήρια πρέπει να καθορίζουν και να διαθέτουν την αβεβαιότητα που σχετίζεται με τα αναλυτικά αποτελέσματα (ISO/IEC 17025). Συνεπώς, πρέπει να διατίθενται επαρκή δεδομένα, για τον καθορισμό των αβεβαιοτήτων, από επικύρωση/επαλήθευση μεθόδου, διεργαστηριακές μελέτες και εσωτερικό έλεγχο ποιότητας. Η αβεβαιότητα

αποτελεί ποσοτικό δείκτη εμπιστοσύνης στα αναλυτικά δεδομένα. Η αβεβαιότητα που αφορά την ανάλυση ενός τωρινού δείγματος δεν αντικατοπτρίζεται από εκτιμήσεις της τυπικής αβεβαιότητας οι οποίες βασίζονται σε προηγούμενα δεδομένα.

Για την εκτίμηση της τυπικής αβεβαιότητας εφαρμόζονται οι προσεγγίσεις:

- Eurachem (EURACHEM/CITAC, Guide, Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, 2nd edition)
- Nordtest (Nordtest Report TR 537: Handbook for Calculation of Measurement Uncertainty In environmental Laboratories)
- EUROLAB (EUROLAB Technical report 1/ 2007: Measurement uncertainty revised: alternative approaches to uncertainty evaluation, European Federation of National Associations of Measurement, Testing Analytical Laboratories, Paris 2007)
- Codex Alimentarius Commission Guidelines, CAC/GL 59-2006 (Amendment 1-2011, Rome 2006 and 2011).

Οι τιμές που χρησιμοποιούνται μπορούν να ληφθούν από εσωτερικά δεδομένα επικύρωσης, ανάλυση υλικών αναφοράς, διεργαστηριακά δεδομένα ανάπτυξης μεθόδου ή να εκτιμηθούν με βάση την προσωπική κρίση. Η RSD% (επί τοις εκατό αναπαραγωγιμότητα ή επί τοις εκατό επαναληψιμότητα, αν δεν υπάρχουν δεδομένα αναπαραγωγιμότητας) μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βάση, συμπεριλαμβανομένης της συνεισφοράς επιπρόσθετων πηγών αβεβαιότητας (ετερογένεια του δείγματος- λόγω των διαφορετικών διαδικασιών της προετοιμασίας του δείγματος, της επεξεργασίας και της υποδειγματοληψίας, αποτελεσματικότητα εξαγωγής, διαφορές σε συγκεντρώσεις προτύπων). Αυτές οι τιμές RSD μπορούν να ληφθούν από δεδομένα ανάκτησης ή από την ανάλυση υλικών αναφοράς. Απαραίτητη είναι η ανάπτυξη δεδομένων αβεβαιότητας για ένα εύρος συγκεντρώσεων αν θα διατεθεί η τυπική αβεβαιότητα για ένα ευρύ φάσμα δεδομένων υπολειμμάτων. Εναλλακτικά η χρήση δοκιμών ικανότητας για την αξιολόγηση της απόδοσης ενός εργαστηρίου, επιτρέπει σε αυτό τον υπολογισμό της αβεβαιότητας μέτρησης καθώς και την επιβεβαίωση του υπολογισμού βάσει των δικών του εσωτερικών δεδομένων. Τα αποτελέσματα από τις δοκιμές αυτές υποδεικνύουν τη συνεισφορά διεργαστηριακών σφαλμάτων στην

αβεβαιότητα μέτρησης ενός μεμονωμένου εργαστηρίου και δικαιολογούν  
εμμέσως την αβεβαιότητα μέτρησης που αναφέρεται [72,73].

Πίνακας 5.2: Παραδείγματα μεθόδων υπολειμμάτων μεμονωμένων γεωργικών φαρμάκων

| Φ/Φ                | ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ       | ΤΕΧΝΙΚΗ ΠΡΟΕΤΟΙΜ. ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ & ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ | Δ/ΤΗΣ ΕΚΧΥΛ.     | ΤΕΧΝΙΚΗ ΠΡΟΣΔΙΟΡ., (ΣΤΗΛΗ) | ΜΕΣΗ ΑΝΑΚΤΗΣΗ %                                                                 | LOD (mg/ kg)           | LOQ (mg/ kg)                                                             | ΑΝΑΦ. |
|--------------------|-----------------|------------------------------------------|------------------|----------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|------------------------|--------------------------------------------------------------------------|-------|
| Paraquat, Meriquat | ελιά, ελαιόλαδο | QuPPE (με μικρές παραλλαγές)             | H <sub>2</sub> O | LC/MS/MS (RRHD HILIC Plus) | στο ελαιόλαδο: PQ: 71.5/ MQ: 74.7<br>Στην ελιά: PQ: χαμηλή ανάκτηση<br>MQ: 68.6 | -                      | στο ελαιόλ.: PQ: 0,005<br>MQ: 0,001<br>Στην ελιά: PQ: 0,015<br>MQ: 0,001 | (74)  |
| Chlorm., meriquat  | αχλάδι, πατάτα  | QuEChERS (με μικρές παραλλαγές)          | MeCN             | LC-MS/MS (XBridge™ HILIC)  | CQ: 87,6-103,8<br>MQ: 83,4-119,4                                                | CQ:0,021<br>MQ: 0,21   | CQ: 0,070<br>MQ: 0,70                                                    | (75)  |
| Chlorm., meriquat  | νερό πηγής      | Φιλτράρισμα, SPE με φυσίγγιο WCX         | -                | LC-MS (CAPCELL PAK CR 1:4) | CQ: 97<br>MQ:114                                                                | CQ: 0,014<br>MQ: 0,022 | 0,028                                                                    | (24)  |
| Glyphos.           | μπύρα           | SPE: με φυσίγγιο Strata-X                | -                | LC-MS/MS (Luna® NH2)       | 90-119                                                                          | 0,2                    | 0,5                                                                      | (37)  |

|                        |                                                            |                                                                                                                                |                                        |                                                                  |                        |                       |      |      |
|------------------------|------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|------------------------------------------------------------------|------------------------|-----------------------|------|------|
| Glyphos.,<br>Glufosin. | μπύρα, τσάι<br>κριθαριού,<br>βύνη,<br>καλαμπόκι            | υγρά δείγματα:<br>Φυγοκέντρωση,<br>SPE: φυσίγγιο<br>InertSepSAX<br>στερεά δείγ.:<br>Φυγοκέντρωση,<br>SPE: φυσίγγιο<br>MCX+ SAX | H <sub>2</sub> O                       | LC-MS/MS<br>(DIONEX<br>IonPac AS12A)                             | 89,2-97,5              | -                     | 0,01 | (42) |
| Chlorm.,<br>mepiquat   | σιτάρι                                                     | Υγρό υγρό<br>εκχύλιση,<br>διέλευση<br>από φυσίγγιο<br>C18                                                                      | MeOH-<br>H <sub>2</sub> O-οξικό<br>οξύ | LC/MS/MS<br>(Spherisorp<br>S5 ODS1)                              | -                      | CQ: 0.004<br>MQ:0.001 | -    | (76) |
| Glyphos.               | σιτάρι                                                     | Υγρό υγρό<br>εκχύλιση,<br>φυγοκέντρωση,<br>φιλτράρισμα                                                                         | H <sub>2</sub> O                       | LC/MS/MS<br>(PLRP-S-<br>Shodex IEC<br>QA- 824 anion<br>exchange) | 87                     | 0.01                  | -    |      |
| Chlorm.,<br>mepiquat   | παιδικές<br>τροφές,<br>αλεύρι σίτου,<br>άλλα<br>δημητριακά | PLE<br>(Pressurized<br>Liquid<br>Extraction)                                                                                   | EtOH                                   | LC-MS/MS<br>(spherisorb<br>SCX)                                  | CQ: 90-97<br>MQ: 89-96 | <0,1                  | 0,3  | (22) |

|                                |                                                       |       |                  |                               |                                              |   |                                               |      |
|--------------------------------|-------------------------------------------------------|-------|------------------|-------------------------------|----------------------------------------------|---|-----------------------------------------------|------|
| Ethephon, Glyphos., Glufosin.  | σταφύλι                                               | QuPPE | H <sub>2</sub> O | LC/MS/MS (Hypercarb)          | Ethephon: 104<br>GLY: 102<br>GLU:96          | - | Ethephon: 0,01<br>GLY: 0,02<br>GLU: 0,05      | (51) |
| Ethephon, Glyphos., Glufosin.  | Μήλο, σταφύλι, αλεύρι σόγιας, φακές                   | QuPPE | H <sub>2</sub> O | LC/MS/MS (Acclaim Trinity Q1) | Ethephon: 95<br>GLY: 107<br>GLU:95           | - | Ethephon: 0,02<br>GLY: 0,02<br>GLU: 0,02      |      |
| Ethephon, Glyphos. , Glufosin. | αγγούρι                                               | QuPPE | H <sub>2</sub> O | LC/MS/MS (Waters Torus™DEA)   | Ethephon: 80-97<br>GLY: 98-106<br>GLU:94-106 | - | Ethephon: 0.01<br>GLY: 0.02<br>GLU: 0.05      |      |
| Paraquat                       | κριθάρι, αβοκάντο, μήλο, πατάτα                       | QuPPE | H <sub>2</sub> O | LC/MS/MS (Obelisc R)          | PQ: 83-106<br>CQ: 93-103<br>MQ: 95-018       | - | PQ: 0,01-0,05<br>CQ: 0,01-0,2<br>MQ: 0,01-0,1 |      |
| Chlorm.                        | αλεύρι σίτου, μήλο,κριθάρι, αβοκάντο σταφύλι, πατάτα, |       |                  |                               |                                              |   |                                               |      |
| Mepiquat                       | σταφύλι, αγγούρι πορτοκάλι, κριθάρι, πατάτα,μήλο      |       |                  |                               |                                              |   |                                               |      |
| Chlorm., mepiquat              | αγγούρι, λεμόνι, μέντα, μήλο                          | QuPPE | H <sub>2</sub> O | LC/MS/MS (BEH Amide)          | CQ: 101-119<br>MQ: 96-114                    | - | CQ:0,01-0,02<br>MQ:0,01-0,02                  |      |

|                        |                     |                                                    |      |       |             |            |      |      |
|------------------------|---------------------|----------------------------------------------------|------|-------|-------------|------------|------|------|
| Glyphos.,<br>Glufosin. | 136 food<br>samples | Φυγοκέντρωση,<br>παραγωγή.<br>με FMOG,<br>SPE: C18 | MeOH | GC/MS | 91% to 114% | 0,01- 0,02 | 0,05 | (35) |
|------------------------|---------------------|----------------------------------------------------|------|-------|-------------|------------|------|------|

## **ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ**

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η ανάπτυξη και η επικύρωση μεθόδων υπολειμμάτων μεμονωμένων γεωργικών φαρμάκων για τον προσδιορισμό καταλοίπων φυτοφαρμάκων σε δείγματα ρυζιού με υγρή χρωματογραφία – φασματομετρία μαζών σε σειρά (LC-MS/MS). Η συγκεκριμένη μελέτη αποσκοπεί στη ανάπτυξη μίας γρήγορης κ οικονομικής προσέγγισης, συμπεριλαμβάνοντας την εφαρμογή της μεθόδου QuPPE (Quick Polar Pesticides Extraction).

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6**

### **ΟΡΓΑΝΑ, ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ**

#### **6.1. ΟΡΓΑΝΟ, ΣΤΗΛΕΣ, ΛΟΓΙΣΜΙΚΟ**

##### **6.1.1. ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ**

Το όργανο που χρησιμοποιήθηκε ήταν της εταιρίας Shimadzu με χαρακτηριστικά:

- Φασματόμετρο μαζών με τρία τετράπολα (triple stage quadrupole analyzer) TSQ, Shimadzu, LCMS-8040 με πηγή ιοντισμού ESI
- Αντλία υγροχρωματογραφίας Nexera X2 LC-30AD
- Αυτόματο δειγματολήπτη Surveyor Nexera X2 SIL-30AC
- Φούρνος στήλης Nexera X2 CTO-30A
- Απαερωτής DGU-20A5R
- Γεννήτρια αζώτου CLAIND BREZZA LCMS 40-1
- Λογισμικό διαχείρισης δεδομένων: LabSolutions LCMS, Version 5 (Shimadzu)

##### **6.1.2. ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΣΤΗΛΕΣ**

Αναπτύχθηκαν 2 αναλυτικές μέθοδοι. Για την αναλυτική μέθοδο 1 όπου πραγματοποιήθηκε θετικός ιοντισμός (αναλυτική μέθοδος 1, positive ionization) για την ανίχνευση των αναλυτών στο MS, για τον προσδιορισμό των ενώσεων chlormequat, meriquat, paraquat ο χρωματογραφικός διαχωρισμός έγινε σε αναλυτική στήλη Phenomenex Synergi Polar-RP 100A, 50 x 2.00 mm x 2,5 μm, με αντίστοιχη προστήλη μήκους 20 mm. Για την αναλυτική μέθοδο 2 όπου πραγματοποιήθηκε αρνητικός ιοντισμός (αναλυτική μέθοδος 2, negative ionization) για τον προσδιορισμό των ενώσεων glyphosate, glufosinate, ethephon, ο χρωματογραφικός διαχωρισμός έγινε σε αναλυτική στήλη Thermo SCIENTIFIC Hypercarb, 2.1 x 100 mm x 3 μm με

αντίστοιχη προστήλη μήκους 10 mm. Επίσης μελετήθηκε προς χρήση και η στήλη SIELC ObeliscR 2.1 x 150 mm x 5  $\mu$ m.

### **6.1.3. ΛΟΓΙΣΜΙΚΟ ΓΙΑ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ**

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με χρήση του Microsoft Excel.

## **6.2. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ**

Στον εργαστηριακό εξοπλισμό περιλαμβάνονται τα εξής: διακριβωμένος αναλυτικός ζυγός ακρίβειας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων (Mettler Toledo, AB204-S/FACT), αναλυτικός ζυγός δύο δεκαδικών ψηφίων (Mark), συσκευή παραγωγής υπερκάθολου νερού ειδικής αντίστασης 18,2 M $\Omega$  cm<sup>-1</sup> (Nex Power 1000). Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν ογκομετρικές φιάλες (πλαστικές και γυάλινες) των 10, 20, 50, 100 mL ποτήρια ζέσεως των 50, 100, 250 mL, ογκομετρικοί κύλινδροι των 10, 25, 50, 100 και 500 mL, σιφώνια βαθμονομημένα και πληρώσεως των 1, 5, 10 mL, σπάτουλες ζύγισης, γυάλινες και πλαστικές πιπέτες Pasteur, διακριβωμένες μικροπιπέτες (Brand) των 100 και 1000  $\mu$ L, διακριβωμένη γυάλινη σύριγγα των 10  $\mu$ L, πλαστικές σύριγγες μίας χρήσης, φίλτρα για σύριγγες μεμβράνης PTFE με μέγεθος πόρων 0,45 $\mu$ m και διαστάσεις 48mm, καθώς και γυάλινα φιαλίδια (vials) των 2 mL.

## **6.3. ΔΙΑΛΥΤΕΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ**

Οι διαλύτες (ειδικής καθαρότητας, pesticidegrade) και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής:

- Μεθανόλη Pestanal (Riedel – De Haen)
- Ακετονιτρίλιο Pestanal (Riedel – De Haen)
- Μεθανόλη (Merck), LC-MS grade
- Φορμικό οξύκαθαρότητας 85% (Sigma)
- Φορμικό αμμώνιο (Fluka)

- Ακετόνη Pestanal (Sigma)
- Νερό υψηλής καθαρότητας, από συσκευή υπερκάθαρου ύδατος (Nex Power 1000, Human Corporation, South Korea) ειδικής αντίστασης  $18,2 \pm 0,2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$

#### 6.4. ΠΡΟΤΥΠΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΚΑΙ ΠΡΟΤΥΠΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

Οι 6 πρότυπες ουσίες των φυτοπροστατευτικών προς προσδιορισμό είναι των εταιρειών Dr. Ehrenstorfer GmbH, Sigma-Aldrich και ChemService καθαρότητας 98,9 - 99,5 %.

##### 6.4.1. ΠΡΟΤΥΠΑ ΠΥΚΝΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΠΑΡΑΚΑΤΑΘΗΚΗΣ ΜΕΜΟΝΩΜΕΝΩΝ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ

Χρησιμοποιούνται διαλύματα παρακαταθήκης της κάθε πρότυπης ουσίας, συγκέντρωσης  $298,98 - 849,96 \text{ mgL}^{-1}$  σε διαλύτες 10% ακετονιτρίλιο σε νερό, 10% ακετονιτρίλιο σε νερό + 0,1% υδροχλωρικό οξύ και μεθανόλη (for pesticide analysis grade). Τα διαλύματα φυλάσσονται σε ψυγείο.

Πίνακας 6.1: Διαλύματα παρακαταθήκης των 6 φυτοφαρμάκων που μελετώνται

| ΕΝΩΣΗ       | ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ( $\text{mgL}^{-1}$ ) | ΔΙΑΛΥΤΗΣ                                                                                                                  |
|-------------|-----------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| CHLORMEQUAT | 849.96                            | 10% ακετονιτρίλιο σε νερό + 0,1% υδροχλωρικό οξύ και μεθανόλη                                                             |
| MERQUAT     | 754,21                            |                                                                                                                           |
| PARAQUAT    | 379,78                            | 10% ακετονιτρίλιο σε νερό                                                                                                 |
| GLYPHOSATE  | 298,98                            |                                                                                                                           |
| GLUFOSINATE | 326,36                            |                                                                                                                           |
| ETHEPHON    | 264,60                            | 10% ακετονιτρίλιο σε νερό (+ προσθήκη 100 $\mu\text{L}$ πυκνό HCL 37% w/w, $\rho = 1,18 \text{ kg/l}$ στο τελικό διάλυμα) |

#### **6.4.2. ΠΡΟΤΥΠΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ ΜΙΓΜΑΤΩΝ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ**

Από τα διαλύματα παρακαταθήκης παρασκευάστηκαν 2 ενδιάμεσα πρότυπα διαλύματα εργασίας συγκέντρωσης  $10 \text{ mgL}^{-1}$  σε μίγμα  $\text{H}_2\text{O}$ -MeOH 50:50 (MeOH οξιν. με 1% formic acid) που διατηρούνται σε καταψύκτη (ενδιάμεσο πρότυπο διάλυμα εργασίας 1: chlormequat, meriquat, paraquat/ ενδιάμεσο πρότυπο διάλυμα εργασίας 2: glyphosate, glufosinate, ethephon).

Από τα παραπάνω διαλύματα των  $10 \text{ mgL}^{-1}$  παρασκευάζονται 2 διάλυμα εργασίας μίγματος των 6 φυτοφαρμάκων, συγκέντρωσης 1 και  $0,1 \text{ mgL}^{-1}$  σε μίγμα  $\text{H}_2\text{O}$ -MeOH

50:50 (MeOH οξιν. με 1% formic acid)

#### **6.4.3. ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗΣ ΜΙΓΜΑΤΟΣ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ**

Από τα ανωτέρω διαλύματα φυτοφαρμάκων, παρασκευάσθηκαν 2 σειρές προτύπων

διαλυμάτων βαθμονόμησης για τις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν στο LC-MS όργανο.

##### **LC-MS**

- Διαλύματα βαθμονόμησης σε διαλύτη: τα 6φυτοπροστατευτικά σε συγκεντρώσεις 1, 2, 5, 10, 25, 50, 100, 200, 500  $\mu\text{g L}^{-1}$  σε μίγμα  $\text{H}_2\text{O}$ -MeOH 50:50 (MeOH οξιν. με 1% formic acid).
- Διαλύματα βαθμονόμησης σε υδατικά εκχυλίσματα ρυζιού: τα 6 φυτοπροστατευτικά σε συγκεντρώσεις 2, 5, 10, 25, 50, 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ . (Χρησιμοποιήθηκανμήτρες ρυζιού που δεν περιείχαν φυτοπροστατευτικά και είχαν επεξεργαστεί με τη μέθοδο QuPPE.Η παρασκευή των διαλυμάτων βαθμονόμησης σε εκχυλίσματα ρυζιού που προέκυψαν από την εφαρμογή της μεθόδου QuPPE για τα διάφορα επίπεδα συγκέντρωσης, περιγράφεται στον παρακάτωπίνακα.

**Πίνακας 6.2: Παρασκευή διαλυμάτων βαθμονόμησης εκχυλισμάτων ρυζιού από  
εφαρμογή της QuPPE (6 επίπεδα)**

| Συγκέντρωση<br>προτύπων<br>βαθμονόμησης<br>( $\mu\text{gL}^{-1}$ ) | Όγκος<br>προτύπου<br>εργασίας<br>( $\mu\text{L}$ ) | Συγκέντρωση<br>προτύπου<br>εργασίας<br>( $\text{mgL}^{-1}$ ) | Όγκος διαλύτη<br>$\text{H}_2\text{O}$ οξιν. $\text{MeOH}$<br>50: 50 ( $\mu\text{L}$ ) | Όγκος<br>εκχυλίσματος<br>τυφλού<br>δείγματος<br>ρυζιού ( $\mu\text{L}$ ) | Συνολικός<br>όγκος<br>( $\text{mL}$ ) |
|--------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|
| 2                                                                  | 20                                                 | 0,1                                                          | 80                                                                                    | 1000                                                                     | 1,100                                 |
| 5                                                                  | 50                                                 | 0,1                                                          | 50                                                                                    | 1000                                                                     | 1,100                                 |
| 10                                                                 | 100                                                | 0,1                                                          | 0                                                                                     | 1000                                                                     | 1,100                                 |
| 25                                                                 | 25                                                 | 1                                                            | 75                                                                                    | 1000                                                                     | 1,100                                 |
| 50                                                                 | 50                                                 | 1                                                            | 50                                                                                    | 1000                                                                     | 1,100                                 |
| 100                                                                | 100                                                | 1                                                            | 0                                                                                     | 1000                                                                     | 1,100                                 |

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

### ΜΕΛΕΤΗ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ LC-MS/MS, ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

#### 7.1. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ, ΕΠΙΛΟΓΗ ΒΕΛΤΙΣΤΩΝ ΣΥΝΘΗΚΩΝ

Η απόδοση του συστήματος εξαρτάται και από τις χρωματογραφικές παραμέτρους, καθώς η ροή και η σύσταση της κινητής φάσης καθορίζει την έκλυση των ουσιών και τη διαδικασία εκνέφωσης και σχηματισμού των μοριακών ιόντων  $[M+H]^+$  των εξεταζόμενων ενώσεων. Για αυτή τη διαδικασία, απαιτείται η προσθήκη άλατος ή/ και οξέος στην κινητή φάση.

Για την επιλογή των βέλτιστων συνθηκών κατά τη χρωματογραφική ανάλυση μελετήθηκαν διαφορετικές στήλες και κινητές φάσεις. Οι στήλες αυτές και οι κινητές φάσεις φαίνονται στον παρακάτω πίνακα, ενώ παρατίθενται επίσης ενδεικτικά, χρωματογραφήματα που προέκυψαν μετά από ανάλυση με τις αυτές στήλες και κάποιες από τις κινητές φάσεις που δοκιμάστηκαν.

Πίνακας 7.1: στήλες και κινητές φάσεις που μελετήθηκαν κατά τη βελτιστοποίηση της χρωματογραφικής ανάλυσης α) στήλες, β) κινητές φάσεις για τις επιλεχθείσες στήλες

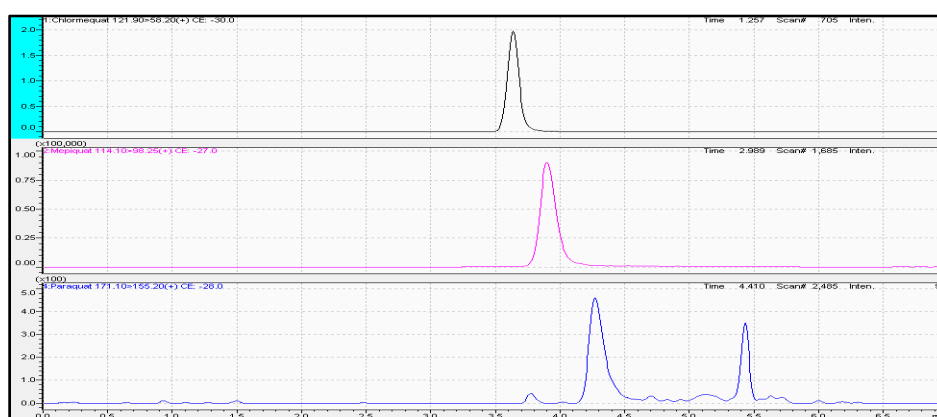
| ΣΤΗΛΗ      | ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ 1<br>(CQ, MQ, PQ) | ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ 2<br>(GLY, GLU, Ethephon) |
|------------|-------------------------------------|---------------------------------------------|
| ΕΠΙΛΟΓΗ 1) | Obelisc R                           | Polar-RP                                    |
| ΕΠΙΛΟΓΗ 2) | Polar-RP                            | Hypercarb                                   |

a)

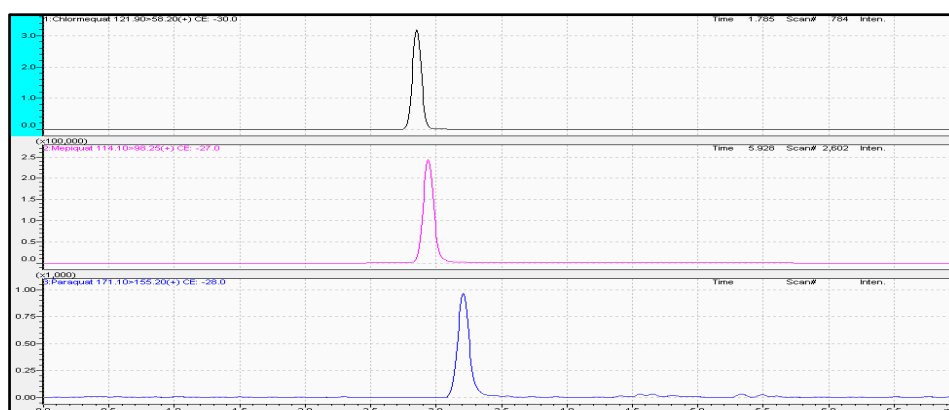
| ΚΙΝΗΤΗ ΦΑΣΗ Α | ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ 1<br>(CQ, MQ, PQ)                 | ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ 2<br>(GLY, GLU, Ethephon)       |
|---------------|-----------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| ΕΠΙΛΟΓΗ 1)    | Οξικό οξύ 1%                                        | Οξικό οξύ 1%                                      |
| ΕΠΙΛΟΓΗ 2)    | νερό, 20 mM φορμικό αμμώνιο, 1% (w/v) φορμικό οξύ   | νερό, 20 mM φορμικό αμμώνιο, 1% (w/v) φορμικό οξύ |
| ΕΠΙΛΟΓΗ 3)    | νερό, 10 mM φορμικό αμμώνιο, 0,1% (w/v) φορμικό οξύ | νερό, 2% (w/v) φορμικό οξύ                        |
| ΕΠΙΛΟΓΗ 4)    | νερό, 50 mM φορμικό αμμώνιο, 1% (w/v) φορμικό οξύ   | νερό, 50 mM φορμικό αμμώνιο, 1% (w/v) φορμικό οξύ |

b)

### 7.1.1. ΕΠΙΛΟΓΗ ΣΤΗΛΩΝ



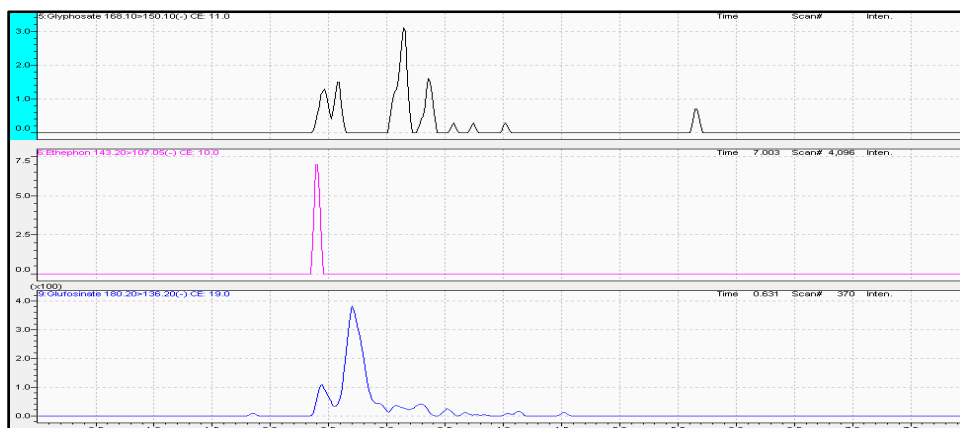
a) 1. Chlormequat, 2.Mepiquat, 3.Paraquat



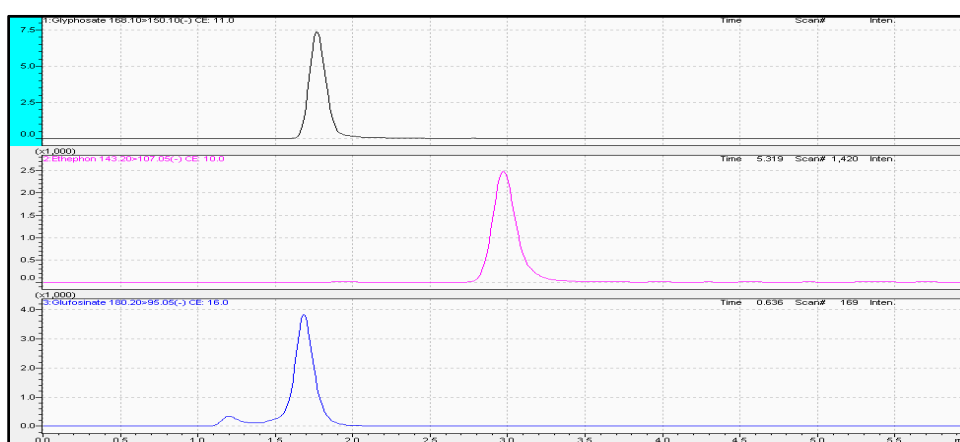
b) 1. Chlormequat, 2.Mepiquat, 3.Paraquat

**Σχήμα 7.1: χρωματογραφήματα των ενώσεων CQ, MQ, PQ συγκέντρωσης 200ppb μετά από χρήση στηλών: a) ObeliscR, b) Polar-RP**

Παρατηρείται ότι για τις ενώσεις CQ, MQ και οι δύο στήλες δίνουν ικανοποιητικά αποτελέσματα με μικρές διαφορές, με την ανάλυση με χρήση στήλης Polar-RP να πλεονεκτεί στο ότι δίνει μεγαλύτερο σήμα. Αυτό όμως που καθορίζει την τελική επιλογή είναι η αποτελεσματικότητα των δύο στηλών ως προς τον προσδιορισμό του PQ. Παρατηρούμε ότι η ανάλυση με χρήση Obelisc R δεν είναι ικανοποιητική ούτε για ποσοτικοποίηση ούτε ποιοτικά- η προκύπτουσα τιμή  $t_R$  δεν συμφωνεί με την αναμενόμενη- πιθανόν λόγω ισχυρότερης κατακράτησης της ένωσης από τη στήλη Obelisc R. Ετσι από τις δύο παραπάνω στήλες επιλέχθηκε η στήλη Polar-RP.



a) 1. Glyphosate, 2. Glufosinate, 3. Ethephon

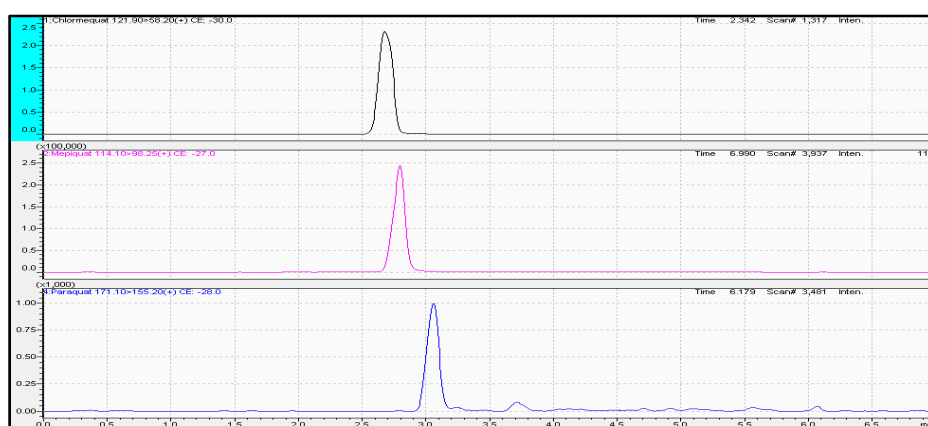


b) 1. Glyphosate, 2. Glufosinate, 3. Ethephon

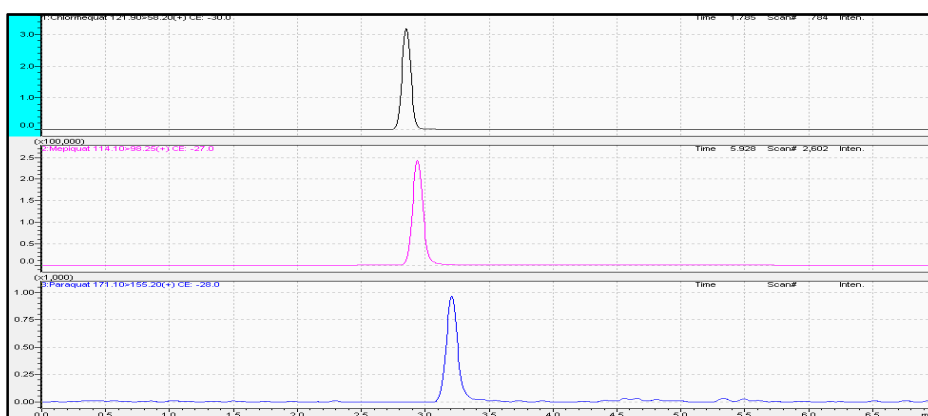
**Σχήμα 7.2: χρωματογραφήματα των ενώσεων GLY, GLU, Ethephon συγκέντρωσης 200ppb μετά από χρήση στηλών: a) Polar-RP, b) Hypercarb**

Αντίθετα, παρατηρείται ότι για τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις GLY, GLU, και Ethephon η στήλη Polar-RP δεν δίνει ικανοποιητικά αποτελέσματα για ποσοτικοποίηση, ούτε ποιοτικά- οι τιμές  $t_R$  δεν συμφωνούν με τις αναμενόμενες και για τα τρία φυτοφάρμακα με το ethephon να εκλύεται νωρίτερα από ότι αναμένεται ενώ τα glyphosate, glufosinate εκλύονται αργότερα από το αναμενόμενο πιθανόν ως αποτέλεσμα ισχυρής κατακράτησης των ενώσεων αυτών λόγω μεγάλης πολικότητας της στήλης Polar-RP. Με χρήση της στήλης Hypercarb παρότι το σήμα που προκύπτει και για τις τρεις ενώσεις είναι αρκετά χαμηλό η χρωματογραφία είναι ικανοποιητική καθώς οι χρόνοι κατακράτησης είναι οι αναμενόμενοι ενώ και οι κορυφές είναι συμμετρικές. Συνεπώς από τις δύο παραπάνω στήλες επιλέχθηκε η στήλη Hypercarb.

## 7.1.2. ΕΠΙΛΟΓΗ ΚΙΝΗΤΩΝ ΦΑΣΕΩΝ



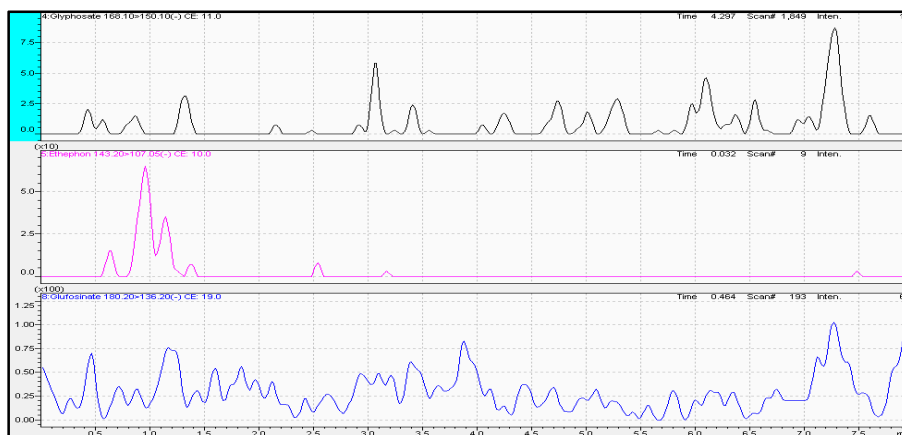
a) 1. Chlormequat, 2.Mepiquat, 3.Paraquat



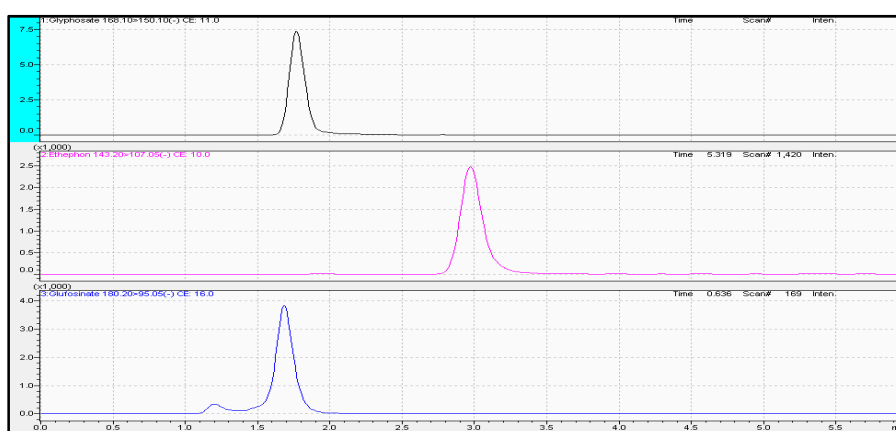
b) 1. Chlormequat, 2.Mepiquat, 3.Paraquat

**Σχήμα 7.3:** χρωματογραφήματα των ενώσεων CQ, MQ, PQ συγκέντρωσης 200ppb μετά από χρήση κινητών φάσεων A: a)νερό, 20 mM φορμικό αμμώνιο, 1% (w/v) φορμικό οξύ, b) νερό, 10 mM φορμικό αμμώνιο, 0,1% (w/v) φορμικό οξύ

Κάποιες από τις κινητές φάσεις που μελετήθηκαν καθώς και τα χρωματογραφήματα που προέκυψαν με τη χρήση τους, για την πρώτη ομάδα ενώσεων παρατίθενται ενδεικτικά στο παραπάνω σχήμα. Μεταξύ αυτών, ενώ δεν υπάρχει σημαντική διαφορά στο σήμα που προέκυψε, επιλέχθηκε η δεύτερη κινητή φάση καθώς με τη χρήση της προκύπτουν στενές κορυφές ενώ στην περίπτωση της πρώτης κινητής φάσεις παρατηρείται μικρή διεύρυνση των κορυφών.



a) 1. Glyphosate, 2. Glufosinate, 3. Ethephon



b) 1. Glyphosate, 2. Glufosinate, 3. Ethephon

**Σχήμα 7.4:** χρωματογραφήματα των ενώσεων GLY, GLU, Ethephon συγκέντρωσης 200ppb μετά από χρήση κινητών φάσεων A: a) νερό, 20 mM φορμικό αμμώνιο, 1% (w/v) φορμικό οξύ, b) νερό, 10 mM φορμικό αμμώνιο, 2% (w/v) φορμικό οξύ

Αντίστοιχα, στο παραπάνω σχήμα, παρατίθενται ενδεικτικά κάποιες από τις κινητές φάσεις που μελετήθηκαν με τα χρωματογραφήματα που προέκυψαν με τη χρήση τους στην περίπτωση της δεύτερης ομάδας ενώσεων. Μεταξύ αυτών επιλέχθηκε η δεύτερη κινητή φάση καθώς με τη χρήση της πρώτης δεν προκύπτουν αξιοποιήσιμα αποτελέσματα.

## ΣΥΝΟΨΗ

Συνοψίζοντας, με βάση τα αποτελέσματα των διαφόρων δοκιμών επιλέχθηκαν: η στήλη Polar-RP για τα φυτοφάρμακα της αναλυτικής μεθόδου 1 (positive ionization) και η στήλη Hypercarb για τα φυτοφάρμακα της

αναλυτικής μεθόδου 2 (negative ionization). Η τελική χρωματογραφική ανάλυση έγινε με τις παρακάτω συνθήκες:

➤ **Αναλυτική μέθοδος 1** (ενώσεις chlormequat, mepiquat, paraquat)

- Όγκος έγχυσης: 5  $\mu$ L
- Βαθμιδωτή έκλουση
- Αναλυτική στήλη: Polar-RP 100A, 50 x 2.00 mm x 2,5  $\mu$ m
- Κινητή φάση A: νερό, 10 mM φορμικό αμμώνιο, 0, 1% (w/v) φορμικό οξύ.
- Κινητή φάση B: Ακετονιτρίλιο
- Ροή (mL/min): 0.6

**Πίνακας 7.2: Συνθήκες βαθμιδωτής έκλουσης**

| <b>ΧΡΟΝΟΣ<br/>(min)</b> | <b>A(%)</b> | <b>B(%)</b> |
|-------------------------|-------------|-------------|
| 0.00                    | 2           | 98          |
| 1.00                    | 2           | 98          |
| 3.00                    | 20          | 80          |
| 4.00                    | 80          | 20          |
| 5.00                    | 80          | 20          |
| 5.10                    | 2           | 98          |
| 7.50                    | 2           | 98          |

**Πίνακας 7.3: Χρόνοι κατακράτησης ( $R_t$ ) των 3 φυτοφαρμάκων**

| <b>ΟΥΣΙΕΣ</b> | <b>RT<br/>(min)</b> | <b>Sd*10<sup>-2</sup><br/>(min)</b> |
|---------------|---------------------|-------------------------------------|
| CHLORMEQUAT   | 2.84                | 1.24                                |
| MEPIQUAT      | 2.93                | 0.47                                |
| PARAQUAT      | 3.19                | 1.78                                |

➤ **Αναλυτική μέθοδος 2** (ενώσεις glyphosate, glufosinate, ethephon)

- Όγκος έγχυσης: 25 µL
- Βαθμιδωτή έκλουση
- Αναλυτική στήλη: Hypercarb, 2.1 x 100 mm x 3 µm
- Κινητή φάση A: νερό, 2% (w/v) φορμικό οξύ
- Κινητή φάση B: MeOH
- Ροή (mL/min): 0.3
- Για καλύτερα αποτελέσματα το εκχύλισμα του δείγματος ρυζιού διήλθε από τη στήλη μετά από αραίωση με νερό. Συγκεκριμένα η διαδικασία αυτή έχει ως εξής: ποσότητα δείγματος (5µL) αραώνεται με νερό, το βήμα αυτό πραγματοποιείται άλλες τρεις φορές ενώ ακολουθεί και η τελευταία έγχυση δείγματος ποσότητας 5µL (συνολικός όγκος έγχυσης δείγματος: 25µL). Παρακάτω παρατίθενται σε πίνακα οι αντίστοιχες εντολές της διαδικασίας που περιγράφηκε.

**Πίνακας 7.5: Εντολές διαδικασίας εισαγωγής δείγματος**

| <b>ΕΝΤΟΛΕΣ ΓΙΑ ΑΠΛΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ</b>                                                                       | <b>ΕΝΤΟΛΕΣ ΓΙΑ ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΑΡΑΙΩΜΕΝΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ</b>                                                                  |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| d.rinse<br>vial.n rn,sn<br>n.strk ns<br>aspir iv,ss<br>inj.p<br>s.inj<br>purge.ml mv,rs<br>purge.rp rv,rs<br>end | d.rinse<br>vial.n rn,sn<br>n.strk ns<br>aspir iv,ss<br>d.rinse<br>vial.n 0,3<br>n.strk ns<br>aspir a0,ss<br>(x 4) |
|                                                                                                                  | d.rinse<br>vial.n rn,sn<br>n.strk ns<br>aspir iv,ss<br>inj.p<br>s.inj<br>purge.ml mv,rs<br>purge.rp rv,rs<br>end  |

**Πίνακας 7.5: Συνθήκες βαθμιδωτής έκλουσης**

| <b>ΧΡΟΝΟΣ<br/>(min)</b> | <b>A(%)</b> | <b>B(%)</b> |
|-------------------------|-------------|-------------|
| 0.00                    | 98          | 2           |
| 1.50                    | 98          | 2           |
| 3.00                    | 75          | 25          |
| 4.00                    | 0           | 100         |
| 5.00                    | 0           | 100         |
| 5.10                    | 98          | 2           |
| 7.50                    | 98          | 2           |

**Πίνακας 7.6: χρόνοι κατακράτησης (rt) των 3 φυτοφαρμάκων**

| <b>ΟΥΣΙΕΣ</b> | <b>RT<br/>(min)</b> | <b>Sd*10<sup>-2</sup><br/>(min)</b> |
|---------------|---------------------|-------------------------------------|
| GLYPHOSATE    | 1.77                | 0.38                                |
| GLUFOSINATE   | 1.68                | 2.23                                |
| ETHEPHON      | 2.97                | 1.07                                |

## **7.2. ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ**

### **7.2.1 ΜΕΛΕΤΗ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΗΛΕΚΤΡΟΨΕΚΑΣΜΟΥ (ESI)**

Η ορθή επιλογή διαφόρων παραμέτρων στο φασματόμετρο μαζών είναι κεφαλαιώδους σημασίας για την επίτευξη όσο το δυνατόν μεγαλύτερης έντασης κορυφών και άρα την αύξηση της ευαισθησίας της μεθόδου. Πρωταρχικό ρόλο στην όλη διεργασία παίζει η επιλογή της κατάλληλης τεχνικής ιοντισμού για την παραγωγή ιόντων σε υψηλές συγκεντρώσεις. Σε ό,τι αφορά την τεχνική ιοντισμού μέσω ηλεκτροδιάχυσης, αυτή επιτυγχάνεται με εφαρμογή υψηλής τάσης κατάλληλης πολικότητας (positive or negative)

στο τριχοειδές ιοντισμού καθώς εισέρχεται το ρεύμα υγρού (electrospray ionization, ESI). Για την ανάλυση των επιλεγμένων φυτοφαρμάκων επιλέχτηκε η τεχνική ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό. Η τεχνική αυτή έχει τη δυνατότητα να παράγει ιόντα της υπό προσδιορισμό ένωσης (αναλύτη) στην υγρή φάση και να τα μετατρέπει σε ιόντα στην αέρια φάση.

Εκτός από την επιλογή κατάλληλης τεχνικής ιοντισμού στη διεργασία παραγωγής ιόντων σημαντικό ρόλο παίζουν και μία σειρά άλλων παραμέτρων όπως:

- Η θέση του ακροσωλήνιου ιοντισμού (probe)
- Η τιμή του εφαρμοζόμενου δυναμικού (Interface Voltage)
- Οι παροχές του αερίου εκνέφωσης N<sub>2</sub> (nebulizing gas) και του αερίου ξήρανσης (drying gas)
- Θερμοκρασία εισόδου (heating block temperature)
- Η θερμοκρασία του αγωγού μεταφοράς των ιόντων από τον κώνο εισόδου στο εσωτερικό του φασματόμετρου (desolvation line)

Για την αναλυτική μέθοδο 1, χρησιμοποιήθηκαν, για τις παραπάνω παραμέτρους οι προκαθορισμένες τιμές του οργάνου και κάποιες από αυτές παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.6.

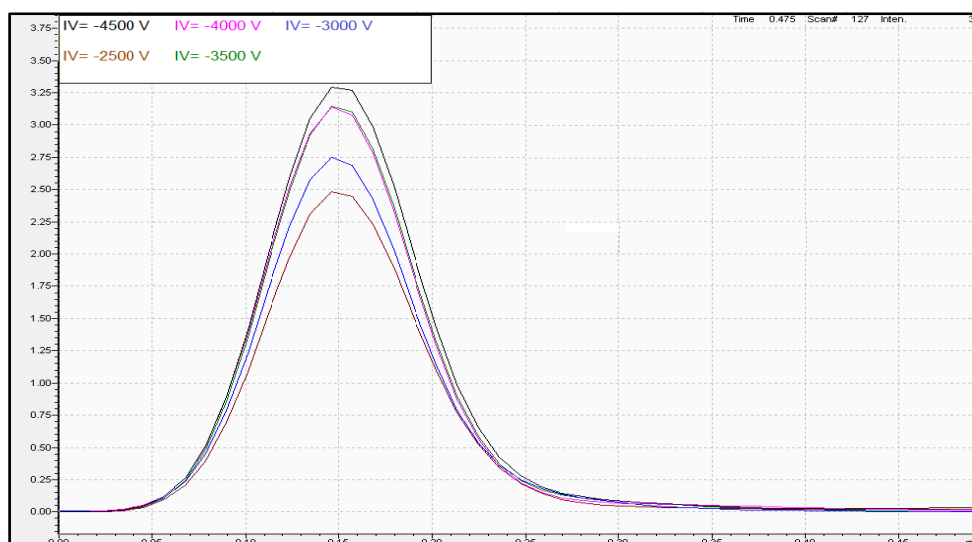
**Πίνακας 7.7: Συνθήκες ηλεκτροψεκασμού για την αναλυτική μέθοδο 1**

| Παράμετρος                                             | Μονάδες | Τιμή |
|--------------------------------------------------------|---------|------|
| Δυναμικό (Interface voltage)                           | V       | 0    |
| αέριο ξήρανσης (drying gas)                            | V       | 15   |
| αέριο εκνέφωσης Nebulizing gas                         | V       | 3    |
| Θερμοκρασία αγωγού μεταφοράς ιόντων (desolvation line) | °C      | 250  |
| Θερμοκρασία εισόδου (heating block temperature)        | °C      | 350  |

Όσον αφορά την αναλυτική μέθοδο 2, για βελτίωση του σήματος μελετήθηκαν διάφορες τιμές για τις παραμέτρους αυτές. Συγκεκριμένα, παρασκευάστηκε μίγμα των glyphosate, glufosinate, ethephon συγκέντρωσης 1 ppm σε διαλύτη, ενώ η εισαγωγή στο σύστημα πραγματοποιήθηκε με τεχνική FIA (flow injection analysis). Έγινε απευθείας εισαγωγή στο LC-MS/MS και πραγματοποιήθηκε σάρωση full scan. Η επιλογή των τελικών τιμών για την εκάστοτε παράμετρο έγινε με βάση την επίδραση κάθεμιας από αυτές στην απόκριση του glyphosate καθώς τα υπόλοιπα 2 φυτοφάρμακα, glufosinate και ethephon δεν εμφάνιζαν σημαντικές διαφορές με την αλλαγή των τιμών αυτών. Οι επιλεγθείσες τιμές παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα, ενώ στο σχήμα 7.5 παρατίθενται ενδεικτικά, τα αποτελέσματα που προέκυψαν για το glyphosate, για κάθε διαφορετική τιμή δυναμικού που μελετήθηκε.

**Πίνακας 7.8: Συνθήκες ηλεκτροψεκασμού για την αναλυτική μέθοδο 2**

| <b>Παράμετρος</b>                                               | <b>Μονάδες</b> | <b>Τιμή</b> |
|-----------------------------------------------------------------|----------------|-------------|
| Δυναμικό<br>(Interface voltage)                                 | V              | -4.500      |
| αέριο ξήρανσης<br>(drying gas)                                  | V              | 15          |
| αέριο εκνέφωσης<br>(Nebulizing gas)                             | V              | 2.25        |
| Θερμοκρασία<br>αγωγού μεταφοράς<br>ιόντων<br>(desolvation line) | °C             | 300         |
| Θερμοκρασία εισόδου<br>(heating block<br>temperature)           | °C             | 250         |



**Σχήμα 7.5:** Σύγκριση αποτελεσμάτων για το glyphosate μεταξύ των τιμών προς μελέτη για το δυναμικό σε μίγμα glyphosate, glufosinate, ethephon 1ppm σε διαλύτη

### 7.2.2 ΜΕΛΕΤΗ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΘΡΑΥΣΜΑΤΟΠΟΙΗΣΗΣ (MS/MS)

Εξίσου σημαντικό βήμα στη διαδικασία βελτιστοποίησης μεθόδου στο φασματομέτρο μαζών είναι η διαδικασία εύρεσης των μητρικών και θυγατρικών ιόντων των φυτοφαρμάκων και η γενικότερη ρύθμιση διαφόρων συναφών παραμέτρων προς την κατεύθυνση αυτή (ενέργεια, πίεση θραυσματοποίησης). Η τεχνική αυτή, γνωστή ως Selected Reaction Monitoring (SRM), αποτελεί την πιο διαδεδομένη τεχνική λειτουργίας των συστημάτων LC-MS/MS για ποιοτική ανάλυση. Χαρακτηριστικό της τεχνικής αυτής είναι η δυνατότητα ταυτόχρονης παρακολούθησης της θραυσματοποίησης πολλαπλών (επιλεγμένων) μητρικών ιόντων και καταγραφής του σήματος των αντίστοιχων θυγατρικών ιόντων τους.

Στους φασματογράφους τριπλού τετραπόλου, στο πρώτο τετράπολο επιλέγονται τα μητρικά ιόντα τα οποία θραυσματοποιούνται στο δεύτερο τετράπολο και τα θραύσματά τους (θυγατρικά ιόντα) ανιχνεύονται στο τρίτο τετράπολο. Ο συνδυασμός επιλεγμένου μητρικού και θυγατρικού ή θυγατρικών ιόντων αποτελεί ένα είδος αποτυπώματος για την κάθε χημική ουσία, ικανού σε συνδυασμό με το χρόνο ανάσχεσης ( $t_R$ ), να οδηγήσει στην ταυτοποίησή της. Επιπλέον, η απόρριψη και μη καταγραφή όλων των άλλων ιόντων που μπορεί να παράγονται από τον ιοντισμό ενώσεων που τυχόν βρίσκονται στο υπόστρωμα ή στην κινητή φάση οδηγεί σε υψηλούς λόγους σήματος/θορύβου με επακόλουθη συνέπεια την αύξηση της ευαισθησίας της

μεθόδου.

Πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση των παραμέτρων θραυσματοποίησης και βελτιστοποίηση της ακρίβεια μάζας στο πρώτο δεκαδικό ψηφίο. Συγκεκριμένα, για κάθε ουσία παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα των 10 ppm σε διαλύτη, ενώ η εισαγωγή στο σύστημα πραγματοποιήθηκε με τεχνική FIA (flow injection analysis). Έγινε απευθείας εισαγωγή του εκάστοτε διαλύματος στο LC-MS/MS και πραγματοποιήθηκε σάρωση full scan. Έτσι έγινε η επιλογή του κύριου ιόντος για τη κάθε ουσία και ρυθμίστηκε το πρώτο τετράπολο (Q1) ώστε να επιτρέπει τη διέλευση μόνο αυτού του ιόντος. Ακολούθησε η καταγραφή των φασμάτων των παραγόμενων ιόντων (productscan) στο τρίτο τετράπολο (Q3) όπου παρείχε μια απεικόνιση των δευτερογενών προϊόντων θραυσματοποίησης του κύριου ιόντος που δραματοποιήθηκε στο δεύτερο τετράπολο (Q2). Οι βέλτιστες συνθήκες θραυσματοποίησης επιλέχθηκαν βάσει της έντασης των προϊόντων- ιόντων ως προς την ενέργεια θραυσματοποίησης. Από τη μελέτη θραυσματοποίησης των ουσιών επιλέχθηκαν τα ιόντα και οι βέλτιστες ενέργειες θραυσματοποίησης που παρατίθενται στον Πίνακα 7.9.

**Πίνακας 7.9: ιόντα και ενέργειες που επιλέχθηκαν α) για τις ενώσεις της αναλυτικής μεθόδου 1, b) για τις ενώσεις της αναλυτικής μεθόδου 2**

a)

| <b>ΑΝΑΛΥΤΗΣ<br/>Κύριο Ιόν</b> | <b>Ιόντα</b> | <b>Χρόνος<br/>σάρωσης (msec)</b> | <b>Δυναμικό<br/>εισ. Q1(V)</b> | <b>Ενέργεια<br/>θραυσ/σης (V)</b> | <b>Δυναμικό<br/>εισ. Q3(V)</b> |
|-------------------------------|--------------|----------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|
| Chlormequat,<br>121           | Ιόν 1:58     | 10                               | -12                            | -30                               | -24                            |
|                               | Ιόν 2:59     | 10                               | -12                            | -22                               | -24                            |
|                               | Ιόν 3:63     | 10                               | -13                            | -23                               | -25                            |
| Mepiquat,<br>114              | Ιόν 1:98     | 20                               | -12                            | -27                               | -18                            |
|                               | Ιόν 2:58     | 20                               | -12                            | -30                               | -24                            |
| Paraquat,<br>171              | Ιόν 1:155    | 100                              | -18                            | -28                               | -27                            |
|                               | Ιόν 2:77     | 100                              | -10                            | -36                               | -14                            |
|                               | Ιόν 3:128    | 50                               | -27                            | -36                               | -24                            |
|                               | Ιόν 3:101    | 50                               | -19                            | -36                               | -17                            |

b)

| Προσδιοριζ.<br>Ουσία,<br>Κύριο Ιόν | Ιόντα         | Χρόνος σάρωσης<br>(Dwell time, msec) | Δυναμικό<br>εισόδου Q1<br>(V) | Ενέργεια<br>θραυσ/σης<br>(V) | Δυναμικό<br>εισόδου Q3<br>(V) |
|------------------------------------|---------------|--------------------------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| Glyphosate,<br>168                 | Ιόν 1:<br>150 | 100                                  | 17                            | 11                           | 13                            |
|                                    | Ιόν 2:<br>63  | 50                                   | 18                            | 22                           | 21                            |
|                                    | Ιόν 3:<br>124 | 20                                   | 10                            | 15                           | 18                            |
| Glufosinate,<br>180                | Ιόν 1:<br>95  | 100                                  | 11                            | 16                           | 13                            |
|                                    | Ιόν 2:<br>85  | 100                                  | 11                            | 20                           | 29                            |
|                                    | Ιόν 3:<br>136 | 20                                   | 11                            | 19                           | 25                            |
| Ethephon,<br>1)143<br><br>2)145    | Ιόν 1:<br>107 | 100                                  | 28                            | 10                           | 21                            |
|                                    | Ιόν 1:<br>107 | 100                                  | 28                            | 10                           | 21                            |

### 7.3. ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ – ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΡΥΖΙΟΥ

#### QuPPE

Ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα:

10. Ομογενοποίηση (άλεση) δείγματος
11. Ζύγιση 5 g αλεσμένου ρυζιού
12. Προσθήκη 10 mL νερό
13. Προσθήκη 10 mL οξινισμένης, με 1% φορμικό οξύ, μεθανόλης
14. Έντονη ανακίνηση για είκοσι λεπτά μηχανικά
15. Φυγοκέντρωση στις 4000 στροφές/λεπτό για 5 λεπτά
16. Ποσότητα εκχυλίσματος μεταγγίζεται σε φίλτρο σύριγγας και από εκεί  
όλο το εκχύλισμα φιλτράρεται σε πλαστικό κωνικό φιαλίδιο
17. 1mL του τελικού εκχυλίσματος μεταφέρεται σε vials των 2 mL

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8**

### **ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ**

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε ο προσδιορισμός 6 φυτοπροστατευτικών ουσιών με τη μέθοδο QuPPE με χρήση της υγρής χρωματογραφίας σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας σε σειρά.

Η επικύρωση πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις απαιτήσεις της κατευθυντήριας οδηγίας SANTE/11813/2017 για τις διαδικασίες της ταυτοποίησης, της ποσοτικοποίησης και του τρόπου εφαρμογής της επικύρωσης.

#### **8.1. ΧΡΟΝΟΙ ΚΑΤΑΚΡΑΤΗΣΗΣ**

Οι χρόνοι κατακράτησης του αναλυτών στα εκχυλίσματα που προέκυψαν από τη μέθοδο είναι ίδιοι με τους αντίστοιχους χρόνους των προτύπων βαθμονόμησης, με ανοχή 0,1min, όπως ορίζει η νομοθεσία.

#### **8.2. ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΜΠΥΛΩΝ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗΣ**

Η γραμμικότητα της μεθόδου, ελέγχθηκε με την παρασκευή προτύπων διαλυμάτων βαθμονόμησης. Παρασκευάστηκαν 9 πρότυπα σε διαλύτη, συγκεντρώσεων 1, 2, 5, 10, 25, 50, 100, 200, 500  $\mu\text{g L}^{-1}$  ως προς κάθε αναλύτη, και 6 πρότυπα στα αντίστοιχα εκχυλίσματα της μεθόδου συγκεντρώσεων 2, 5, 10, 25, 50, 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Στη συνέχεια, κατασκευάστηκαν καμπύλες αναφοράς με το εμβαδόν της κάθε κορυφής σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση.

Η ευθείες παλινδρόμησης προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων, και ήταν της μορφής:

$$E = (a \pm S_a) + (b \pm S_b) \cdot C$$

όπου,

*E*: το εμβαδόν της κορυφής κάθε πρότυπης ουσίας (μονάδες οργάνου).

C: η συγκέντρωση της κάθε πρότυπης ουσίας ( $\mu\text{gL}^{-1}$ )

a: η τομή της ευθείας με τον άξονα y.

b: η κλίση της ευθείας παλινδρόμησης.

$S_a$ : η τυπική απόκλιση της τομής α.

$S_b$ : η τυπική απόκλιση της κλίσης.

Επίσης, υπολογίστηκε ο συντελεστής συσχέτισης  $R^2$  για κάθε καμπύλη. Η παράμετρος κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 0.9875-0,9993, συνεπώς παρατηρείται ικανοποιητική γραμμικότητα.

### 8.3. ΟΡΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ

Σύμφωνα με την οδηγία SANTE/11813/2017 ως όριο ποσοτικοποίησης ορίζεται το χαμηλότερο επίπεδο εμβολιασμού της επικύρωσης στο οποίο η μέθοδος πληροί τα κριτήρια αποδοχής των επιδόσεων της μεθόδου και πρέπει να είναι χαμηλότερο από το MRL ή το RL.

Στην παρούσα εργασία υπολογίστηκαν επίσης τα θεωρητικά όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης.

Ως θεωρητικό όριο ανίχνευσης (LOD), ορίζεται η ελάχιστη ποσότητα αναλύτη που μπορεί να ανιχνευτεί με αξιοπιστία. Το όριο ανίχνευσης υπολογίστηκε με τον τύπο:

$$\text{LOD} = 3,3 \times S_a/b$$

όπου

a: η τομή της αντίστοιχης καμπύλης βαθμονόμησης με τον άξονα των y

$S_a$ : η τυπική απόκλιση της τομής της καμπύλης βαθμονόμησης με τον άξονα των y

b: η κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης

Το θεωρητικό όριο ποσοτικοποίησης υπολογίστηκε με τον τύπο:

$$\text{LOQ} = 10 \times S_a/b$$

Κατασκευάστηκαν καμπύλες βαθμονόμησης σε διαλύτη για το σύνολο των 6 φυτοφαρμάκων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα, (μαζί με τις παραμέτρους γραμμικότητας και το οργανολογικό όριο ανίχνευσης, LOD).

**Πίνακας 8.1: Παράμετροι βαθμονόμησης σε διαλύτη και οργανολογικό όριο ανίχνευσης (LOD) για το σύστημα LC-MS/MS (περιοχή βαθμονόμησης 2 έως 500  $\mu\text{g L}^{-1}$ , 9 πρότυπα)**

| <b>ΈΝΩΣΗ</b>                     | <b>b</b> | <b>S<sub>b</sub></b> | <b>A</b> | <b>S<sub>a</sub></b> | <b>r<sup>2</sup></b> | <b>LOD<br/>(<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</b> |
|----------------------------------|----------|----------------------|----------|----------------------|----------------------|--------------------------------------------------|
| CHLORMEQUAT<br>( $\times 10^3$ ) | 34,9     | 1,1                  | -10      | 12                   | 0,9968               | 1,1                                              |
| MEPIQUAT<br>( $\times 10^3$ )    | 37,9     | 1,2                  | 25       | 15                   | 0,9955               | 1,3                                              |
| PARAQUAT<br>( $\times 10^1$ )    | 5,92     | 0,38                 | 17,9     | 9,4                  | 0,9875               | 5,2                                              |
| GLYPHOSATE<br>( $\times 10^1$ )  | 36,3     | 1,8                  | -20      | 19                   | 0.9925               | 1,7                                              |
| GLUFOSINATE<br>( $\times 10^1$ ) | 14,07    | 0,89                 | -14,8    | 9,2                  | 0.9981               | 2,2                                              |
| ETHEPHON<br>( $\times 10^1$ )    | 18,64    | 0,61                 | -19      | 28                   | 0.9978               | 5,0                                              |

Ομοίως με παραπάνω, κατασκευάστηκαν καμπύλες βαθμονόμησης με τη μέθοδο QuPPE χρησιμοποιώντας πρότυπα βαθμονόμησης που παρασκευάστηκαν με προσθήκη φυτοφαρμάκων σε εκχύλισμα τυφλού δείγματος που είχαν υποστεί τις αντίστοιχες διαδικασίες εκχύλισης. Ορίστηκαν 6 επίπεδα συγκέντρωσης για τον σχηματισμό της καμπύλης βαθμονόμησης κάθε φυτοφαρμάκου εκτός του paraquat, για το οποίο ορίστηκαν 5 επίπεδα συγκέντρωσης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.10, όπου παρατίθενται οι παράμετροι βαθμονόμησης και τα όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ).

**Πίνακας 8.2: Παράμετροι βαθμονόμησης σε ρύζι με τη μέθοδο QuPPE και τα όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ) της μεθόδου για το σύστημα LC-MS/MS (περιοχή βαθμονόμησης 2 έως 100 µg L<sup>-1</sup>, 6 πρότυπα, 5 πρότυπα για το PQ)**

| ΈΝΩΣΗ                              | b     | S <sub>b</sub> | A    | S <sub>a</sub> | r <sup>2</sup> | LOD<br>(µg L <sup>-1</sup> ) | LOQ<br>(µg L <sup>-1</sup> ) |
|------------------------------------|-------|----------------|------|----------------|----------------|------------------------------|------------------------------|
| CHLORMEQUAT<br>(×10 <sup>3</sup> ) | 13.40 | 0.17           | -5.1 | 8.1            | 0,9993         | 2,0                          | 3,8                          |
| MEPIQUAT<br>(×10 <sup>3</sup> )    | 16,23 | 3,8            | 3,8  | 7,9            | 0,9989         | 1,6                          | 2,3                          |
| PARAQUAT<br>(×10 <sup>1</sup> )    | 6,10  | 0,36           | -35  | 10             | 0,9932         | 16                           | 19                           |
| GLYPHOSATE<br>(×10 <sup>1</sup> )  | 16,68 | 0,34           | -9,6 | 8,8            | 0,9987         | 1,7                          | 5,8                          |
| GLUFOSINATE<br>(×10 <sup>1</sup> ) | 4,13  | 0,13           | 7,6  | 3,3            | 0,9971         | 2,6                          | 18                           |
| ETHEPHON<br>(×10 <sup>1</sup> )    | 9,56  | 0,33           | 14   | 15             | 0,9954         | 5,2                          | 15                           |

#### **8.4. ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΦΑΙΝΟΜΕΝΟΥ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΜΗΤΡΑΣ**

Για τον έλεγχο αυτό, κατασκευάστηκαν καμπύλες βαθμονόμησης σε εκχυλίσματα ρυζιού που προέκυψαν με εφαρμογή της μεθόδου QuPPE. Για τη μελέτη της επίδρασης του φαινομένου μήτρας χρησιμοποιήθηκε ο παρακάτω τύπος για την εκατοστιαία αύξηση ή μείωση του σήματος, C%:

$$C\% = 100 \times \left( \frac{b_m}{b_s} - 1 \right)$$

όπου,

*b<sub>m</sub>*: η κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης προτύπων προσαρμοσμένων στο δείγμα ρυζιού

*b<sub>s</sub>*: η κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης διαλυμάτων σε διαλύτη.

Η επίδραση του φαινομένου μήτρας μπορεί να θεωρηθεί ότι είναι ισχυρή όταν ME% < -50 % ή ME% > +50 %, μέτρια όταν -50% < ME% < -20% ή +20% < ME% < +50% και ασθενής όταν -20% < ME% < +20 %. Τα αποτελέσματα της μελέτης για την επίδραση του φαινομένου μήτρας παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα.

**Πίνακας 8.3: Επίδραση φαινομένου της μήτρας**

| ΈΝΩΣΗ       | ME% (QuPPE) |
|-------------|-------------|
| CHLORMEQUAT | -62         |
| MEPIQUAT    | -57         |
| PARAQUAT    | 3,0         |
| GLYPHOSATE  | -54         |
| GLUFOSINATE | -71         |
| ETHEPHON    | -4,8        |

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα η επίδραση του φαινομένου της μήτρας είναι ισχυρή στην περίπτωση του chlormequat, του glyphosate και του glufosinate, meriquat μέτρια για το ethephon και ασθενής για το paraquat. Καθώς η επίδραση του φαινομένου μήτρας είναι ασθενής μόνο για το paraquat η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε με χρήση καμπύλης βαθμονόμησης σε μητρικό υλικό.

## **8.5. ΟΡΘΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ**

Στον παρακάτω πίνακα παρατίθεται η ληφθείσα μέση ανάκτηση 10 επαναλήψεων, που πραγματοποιήθηκαν ανά 5, μεταξύ 2 ημερών για καθένα από τα 6 φυτοφάρμακα, σε διάφορα επίπεδα εμβολιασμού τους σε ρύζι, καθώς και οι αντίστοιχες τιμές RSD% (intra-day precision, μεταξύ 2 ημερών) των ανακτήσεων. Οι ενώσεις chlormequat, meriquat, paraquat δίνουν τιμές ανάκτησης από 81,9-102,6%, δηλαδή συμβαδίζουν με τα όρια που προβλέπονται από τη νομοθεσία για την ανάκτηση (70-120%). Όσον αφορά τα glyphosate, glufosinate, ethephon οι τιμές ανάκτησης που προέκυψαν είναι επίσης εντός νομοθετικών ορίων καθώς κυμαίνονται από 76,3-95%, με το ethephon να εμφανίζει μια μικρή απόκλιση (69%) από το κατώτερο όριο ανάκτησης σε επίπεδο συγκέντρωσης 50 ppb. Και για τις δύο ομάδες ενώσεων παρατηρείται κατά βάση μείωση της ανάκτησης με αύξηση του επιπέδου εμβολιασμού. Η συμπεριφορά πιθανόν οφείλεται στο ότι τα εμβολιασμένα με υψηλότερη συγκέντρωση δείγματα εγχέονται τελευταία στο

χρωματογραφικό σύστημα, αφού δηλαδή έχουν συσσωρευτεί προοδευτικά στο σύστημα εισαγωγής δείγματος μη πτητικές ενώσεις προηγούμενων ενέσεων. Οι μη πτητικές ενώσεις αυτές μπορούν να αυξήσουν τον αριθμό των ενεργών θέσεων στις όποιες μπορούν να προσροφηθούν οι αναλύτες και να μειωθεί η ανάκτηση.

**Πίνακας 8.4: Τιμές μέσης ανάκτησης 10 μετρήσεων με τις αντίστοιχες σχετικές τυπικές αποκλίσεις σε 3 επίπεδα εμβολιασμού σε δείγμα ρυζιού**

| <b>ΕΝΩΣΗ</b>       | <b>ΕΠΙΠΕΔΟ ΕΜΒΟΛ.<br/>(ppb), n= 10 (μεταξύ<br/>2 ΗΜΕΡΩΝ)</b> | <b>ΜΕΣΗ<br/>ΑΝΑΚΤΗΣΗ<br/>%</b> | <b>RSD%</b> |
|--------------------|--------------------------------------------------------------|--------------------------------|-------------|
| <b>CHLORMEQUAT</b> | 10                                                           | 102.6                          | 6.6         |
|                    | 50                                                           | 91.5                           | 8.6         |
|                    | 200                                                          | 81.9                           | 2.8         |
| <b>MEPIQUAT</b>    | 10                                                           | 93                             | 12          |
|                    | 50                                                           | 91.8                           | 3.0         |
|                    | 200                                                          | 88.6                           | 3.6         |
| <b>PARAQUAT</b>    | 50                                                           | 87,5                           | 2,8         |
|                    | 200                                                          | 85,0                           | 3,2         |
| <b>GLYPHOSATE</b>  | 10                                                           | 95                             | 10          |
|                    | 50                                                           | 78,9                           | 7,7         |
|                    | 200                                                          | 76,3                           | 4,3         |
| <b>GLUFOSINATE</b> | 10                                                           | 89,3                           | 5,8         |
|                    | 50                                                           | 84,1                           | 3,3         |
|                    | 200                                                          | 93,9                           | 5,8         |
| <b>ETHEPHON</b>    | 10                                                           | 91                             | 24          |
|                    | 50                                                           | 69                             | 13          |
|                    | 200                                                          | 85,3                           | 7,9         |

## 8.6. ΠΙΣΤΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Για την πιστότητα της μεθόδου μελετήθηκε η επαναληψιμότητα και η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα αυτής.

### 8.6.1. ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑ ΜΕΘΟΔΟΥ

Για την εκτίμηση της επαναληψιμότητας των μεθόδων μελετήθηκαν οι τιμές RSDr% των υπολογιζόμενων ανακτήσεων που προέκυψαν από μετρήσεις 5 δειγμάτων ρυζιού εμβολιασμένα στο ίδιο επίπεδο συγκέντρωσης μέσα σε μια ημέρα για 3 επίπεδα συγκεντρώσεων (συνολικά 15 δείγματα). Οι τιμές της σχετικής τυπικής απόκλισης παρατίθενται στον Πίνακα 7.13. Οι ενώσεις της πρώτης ομάδας δίνουν τιμές από 1,4-11%, δηλαδή είναι σύμφωνες με τα όρια που προβλέπονται από τη νομοθεσία για την σχετική τυπική απόκλιση (RSD <20%), ενώ το ίδιο ισχύει και για τις ενώσεις της δεύτερης ομάδας όπου η τυπική απόκλιση κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 1,8-14%, εκτός από την ένωση Ethephon όπου η τιμή RSD ξεπερνά την ανώτατη επιθυμητή (29%).

Πίνακας 8.5: Τιμές των σχετικών τυπικών αποκλίσεων των ανακτήσεων 5 επαναλήψεων για καθένα από τα 3 επίπεδα εμβολ. στην ίδια μέρα, σε δείγμα ρυζιού

| ΕΝΩΣΗ    | ΕΠΙΠΕΔΟ ΕΜΒΟΛ. (ppb), n= 5 (1 ΜΕΡΑ) | RSD% | ΕΝΩΣΗ       | ΕΠΙΠΕΔΟ ΕΜΒΟΛ. (ppb), n= 5 (1 ΜΕΡΑ) | RSD% |
|----------|-------------------------------------|------|-------------|-------------------------------------|------|
| CHLORM.  | 10                                  | 11   | GLYPHOSATE  | 10                                  | 12   |
|          | 50                                  | 3.2  |             | 50                                  | 4,8  |
|          | 200                                 | 2.9  |             | 200                                 | 14   |
| MEPIQUAT | 10                                  | 2.8  | GLUFOSINATE | 10                                  | 7,6  |
|          | 50                                  | 1.4  |             | 50                                  | 1,8  |
|          | 200                                 | 4.0  |             | 200                                 | 6,7  |
| PARAQUAT | -                                   |      | ETHEPHON    | 10                                  | 29   |
|          | 50                                  | 9,4  |             | 50                                  | 11   |
|          | 200                                 | 1,9  |             | 200                                 | 6,3  |

### 8.6.2 ΕΝΔΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΜΟΤΗΤΑ

Η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα εκτιμήθηκε με μελέτη των τιμών RSD<sub>WR</sub>% των υπολογιζόμενων ανακτήσεων κατά την μελέτη της ορθότητας

της μεθόδου. Στον Πίνακα 7.14 φαίνονται οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις μεταξύ των τιμών των ανακτήσεων που λήφθηκαν από μετρήσεις 5 δειγμάτων ρυζιού στο ίδιο επίπεδο εμβολιασμού (συνολικά 3 επίπεδα εμβολιασμού, 15 δείγματα), δύο διαφορετικών ημερών. Η απόκλιση για τις ενώσεις της πρώτης ομάδας κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 2,8-12%, δηλαδή είναι αποδεκτή, σύμφωνα με τα όρια που προβλέπονται από τη νομοθεσία ( $RSD_{WR} < 20\%$ ). Όσον αφορά τις ενώσεις της δεύτερης ομάδας οι τιμές της απόκλισης (3,3-13%) είναι εντός νομοθετικών ορίων, με εξαίρεση την απόκλιση του etherphon στο υψηλότερο επίπεδο συγκέντρωσης (200ppb,  $RSD_{WR} = 24\%$ ) που ξεπερνά το νομοθετικό όριο, όπου η μεγαλύτερη τιμή αυτή της ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας, ωφείλεται στην σημαντική διασπορά των τιμών ανάκτησης μεταξύ των δύο διαφορετικών παρτίδων που αναλύθηκαν.

**Πίνακας 8.6: Τιμές των σχετικών τυπικών αποκλίσεων ανακτήσεων 5 επαναλήψεων για καθένα από τα 3 επίπεδα εμβολιασμού μεταξύ 2 ημερών, σε δείγμα ρυζιού**

| ΕΝΩΣΗ           | ΕΠΙΠΕΔΟ ΕΜΒΟΛ.<br>(ppb), n= 10<br>(2 ΜΕΡΕΣ) | RSD%<br>1 <sup>η</sup> μέρα,<br>n= 5 | RSD%<br>2 <sup>η</sup> μέρα,<br>n= 5 | RSD <sub>WR</sub> %<br>n= 10 |
|-----------------|---------------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------|
| <b>CQ</b>       | 10                                          | 11                                   | 3.2                                  | 6.6                          |
|                 | 50                                          | 3.2                                  | 3.1                                  | 8.6                          |
|                 | 200                                         | 2.9                                  | 3.5                                  | 2.8                          |
| <b>MQ</b>       | 10                                          | 2.8                                  | 3.3                                  | 12                           |
|                 | 50                                          | 1.4                                  | 2.0                                  | 3.0                          |
|                 | 200                                         | 4.0                                  | 5.0                                  | 3.6                          |
| <b>PQ</b>       | 50                                          | 9,4                                  | 5,4                                  | 2,8                          |
|                 | 200                                         | 1,9                                  | 6,4                                  | 3,2                          |
| <b>GLY</b>      | 10                                          | 14                                   | 6,4                                  | 10                           |
|                 | 50                                          | 12                                   | 3,7                                  | 7,7                          |
|                 | 200                                         | 4,8                                  | 3,7                                  | 4,3                          |
| <b>GLU</b>      | 10                                          | 7,6                                  | 4,0                                  | 5,8                          |
|                 | 50                                          | 1,8                                  | 4,8                                  | 3,3                          |
|                 | 200                                         | 6,7                                  | 4,8                                  | 5,8                          |
| <b>ETHEPHON</b> | 10                                          | 29                                   | 20                                   | 24                           |
|                 | 50                                          | 11                                   | 14                                   | 13                           |
|                 | 200                                         | 6,3                                  | 9,5                                  | 7,9                          |

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία επικυρώθηκαν 2 μέθοδοι μεμονωμένων υπολλειμάτων με υγροχρωματογραφία– φασματομετρία μαζών σε σειρά (με ιονισμό με ηλεκτροδιάχυση) για τον προσδιορισμό καταλοίπων 6 φυτοφαρμάκων, τα chlormequat, mepiquat, paraquat, glyphosate, glufosinate, etherphon σε δείγματα ρυζιού. Μελετήθηκε η ανάλυση με προκατεργασία του δείγματος χρησιμοποιώντας τη μέθοδο QuPPE. Ακολούθησε επικύρωση των μεθόδων (μελέτη γραμμικότητας, ορθότητας και πιστότητας, η οποία εξετάστηκε τόσο υπό συνθήκες επαναληψιμότητας όσο και ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας), προσδιορίσθηκαν τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης και εκτιμήθηκε το φαινόμενο μήτρας.

Συνοψίζοντας οι δύο μέθοδοι έδωσαν ικανοποιητικά αποτελέσματα εντός των προδιαγραφών και νομοθετικών ορίων όσων αφορά την ορθότητα ( 70-120%) και πιστότητα (<20%) της μεθόδου εκτός από την φυτοπροστατευτική ένωση etherphon όπου παρατηρήθηκαν μικρές αποκλίσεις από τα όρια.



## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Fernando P. Carvalho “Pesticides, environment, and food safety” Food and Energy Security 6(2) (2017) 48–60
2. <https://www.govinfo.gov/content/pkg/USCODE-2012-title7/html/USCODE-2012-title7-chap6-subchapII-sec136.htm>
3. <https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/basic-information-about-pesticide-ingredients>
4. José L. Tadeo, Consuelo Sánchez-Brunete, Lorena González “Analysis of Pesticides in Food and Environmental Samples” CRC Press Chapter 1 “Pesticides: Classification and Properties” (2008)
5. Polyxeni Nicolopoulou-Stamati, Sotirios Maipas, Chrysanthi Kotampasi, Panagiotis Stamatis, Luc Hens “Chemical Pesticides and Human Health: The Urgent Need for a New Concept in Agriculture” frontiers in Public Health Vol. 4 (2016)
6. Alfred S. Y. Chau, B. K. Afghan “ANALYSIS OF PESTICIDES IN WATER” CRC Press Vol. I (2018)
7. World Health Organization “The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard And Guidelines to Classification 2009” IPCS (2009)
8. WHO/FAO, International Code of Conduct on Pesticide Management, Guidelines on Pesticide Legislation, September 2015
9. [https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/max\\_residue\\_levels\\_en](https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/max_residue_levels_en)
10. <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/maximum-residue-limits/en/>
11. [https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/max\\_residue\\_levels/application\\_en](https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/max_residue_levels/application_en)
12. “GUIDELINES FOR THE SIMPLE EVALUATION OF DIETARY EXPOSURE TO FOOD ADDITIVES CAC/GL 3-1989” Codex Alimentarius Adopted 1989. Revision 2014
13. [https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/max\\_residue\\_levels/eu\\_rules\\_en](https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/max_residue_levels/eu_rules_en)
14. Hans G. J. Mol & Ruud C. J. van Dam “Rapid detection of pesticides not amenable to multi-residue methods by flow injection–tandem mass spectrometry”, Anal Bioanal Chem (2014) 406:6817–6825
15. <http://quechers.cvua-stuttgart.de/>
16. Yolanda Picó, Mónica Fernández, Maria Jose Ruiz, Guillermina “Font Current trends in solid-phase-based extraction techniques for the determination of pesticides in food and environment” J. Biochem. Biophys. Methods 70 (2007) 117–131

17. Martial Le Doux "Analytical methods applied to the determination of pesticide residues in foods of animal origin. A review of the past two decades" *Journal of Chromatography A*, 1218 (2011) 1021–1036
18. Amadeo R. Fernandez-Alba, Juan F. Garcia-Reyes "Large-scale multi-residue methods for pesticides and their degradation products in food by advanced LC-MS" *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 27, No. 11, (2008)
19. José Robles-Molina, Bienvenida Gilbert-López, Juan F. García-Reyes, Antonio Molina-Díaz "Simultaneous liquid chromatography/mass spectrometry determination of both polar and "multi residue" pesticides in food using parallel hydrophilic interaction/reversed-phase liquid chromatography and a hybrid sample preparation approach" *Journal of Chromatography A*, 1517 (2017) 108-116.
20. Piotr Kaczynski "Clean-up and matrix effect in LC-MS/MS analysis of food of plant origin for high polar herbicides" *Food Chemistry*, 230 (2017) 524-531
21. R. Castro, E. Moyano, M.T. Galceran "Ion-Trap versus Quadrupole for Analysis of Quaternary Ammonium Herbicides by LC-MS" *Chromatographia* 53 (2001) 273-278 No 5/6
22. Stefano Marchese, Daniela Perret, Eleonora Bafile, Alessandra Gentili, Fulvia Caretti Marco Berardino "Pressurized Liquid Extraction Coupled with LC–ESI–MS–MS for the Determination of Herbicides Chlormequat and Mepiquat Flours" *Chromatographia* 70 (2009) 761-767
23. Ionara R. Pizzutti, Giovana M.E. Vela, André de Kok, Jos M. Scholten, Jonatan V. Dias, Carmem D. Cardoso, Germani Concenço, Rafael Vivian "Determination of paraquat and diquat: LC-MS method optimization and Validation" *Food Chemistry*, 209 (2016) 248-255
24. Zhiyong Yu, Fen Jin, Jianying Hu, Xi Zhang, Jingfang Sun, Min Yang "An improved method for analyzing chlormequat and mepiquat in source waters by solid-phase extraction and liquid chromatography–mass spectrometry" *Analytica Chimica Acta* 678 (2010) 90-95
25. LUTZALDER, JAMES R. STARTIN "Determination of Chlormequat and Mepiquat in Foods by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry or Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry: Interlaboratory Study" *JOURNAL OF AOAC INTERNATIONAL* VOL. 88, (2005), NO. 6
26. X. Esparza, E. Moyano, M.T. Galceran "Analysis of chlormequat and mepiquat by hydrophilic interaction chromatography coupled to tandem mass spectrometry in food samples" *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009) 4402–4406

27. R. Castro, E. Moyano, M.T. Galceran "On-line ion-pair solid-phase extraction–liquid chromatography–mass spectrometry for the analysis of quaternary ammonium herbicides" *Journal of Chromatography A*, 869 (2000) 441–449
28. Sonja Riediker, Heinrich Obrist, Natalia Varga, Richard H. Stadler "Determination of chlormequat and mepiquat in pear, tomato, and wheat flour using on-line solid-phase extraction (Prospekt) coupled with liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry" *Journal of Chromatography A*, 966 (2002) 15–23
29. <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=pesticide.residue.selection&language=EN>
30. Naoki Yoshioka, Migiwa Asano, Azumi Kuse, Takao Mitsuhashi, Yasushi Nagasaki, Yasuhiro Ueno "Rapid determination of glyphosate, glufosinate, bialaphos, and their major metabolites in serum by liquid chromatography–tandem mass spectrometry using hydrophilic interaction chromatography" *Journal of Chromatography A*, 1218 (2011) 3675-3680
31. A.M. Botero-Coy, M. Ibañez, J.V. Sancho, F. Hernandez "Direct liquid chromatography–tandem mass spectrometry determination of underivatized glyphosate in rice, maize and soybean" *Journal of Chromatography A*, 1313 (2013) 157-165
32. Charles M. Benbrook "Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally" *Benbrook Environ Sci Eur* (2016) 28:3
33. Chunyan Hao, David Morse, Franca Morra, Xiaoming Zhao, Paul Yang, Brian Nunn "Direct aqueous determination of glyphosate and related compounds by liquid chromatography/tandem mass spectrometry using reversed-phase and weak anion-exchange mixed-mode column" *Journal of Chromatography A*, 1218 (2011) 5638-5643
34. Philippe Szternfeld & Svetlana V. Malysheva & Vincent Hanot & Laure Joly "A Robust Transferable Method for the Determination of Glyphosate Residue in Liver After Derivatization by Ultra-high Pressure Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry" *Food Anal. Methods* (2016) 9: 1173–1179
35. Yang Liao, Jean-Marie Berthion, Isabelle Colet, Mathilde Merlo, Alexandre Nougadère, Renwei Hu. "Validation and application of analytical method for glyphosate and glufosinate in foods by liquid chromatography-tandem mass Spectrometry" *Journal of Chromatography A*, 1549 (2018) 31–38.
36. Lars C.Schrübbbers, Mario Masís-Mora, Elizabeth Carazo Rojas, Bernal E. Valverde, Jan H.Christensen, Nina Cedergreen "Analysis of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in leaves from *Coffea Arabica* using high

- performance liquid chromatography with quadrupole mass spectrometry detection" *Talanta*, 146 (2016) 609-620
37. Mārtiņš Jansons, Iveta Pugajeva and Vadims Bartkevičs "Occurrence of glyphosate in beer from the Latvian market" *FOOD ADDITIVES & CONTAMINANTS: PART A* (2018), VOL. 35, NO. 9, 1767–1775
  38. Hongyue Guo, Leah S. Riter, Chad E. Wujcik, Daniel W. Armstrong "Direct and sensitive determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in environmental water samples by high performance liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry" *Journal of Chromatography A*, 1443 (2016) 93-100.
  39. Angelika Steinborn, Lutz Alder, Britta Michalski, Paul Zomer, Paul Bendig, Sandra Aleson Martinez, Hans G. J. Mol, Thomas J. Class, and Nathalie Costa Pinheiro "Determination of Glyphosate Levels in Breast Milk Samples from Germany by LC-MS/MS and GC-MS/MS" *J. Agric. Food Chem.* (2016), 64, 1414–1421
  40. Hao Guo, Huijun Wang, Jing Zheng, Wenwen Liu, Jian Zhong, Qingbiao Zhao "Sensitive and rapid determination of glyphosate, glufosinate, bialaphos and metabolites by UPLC–MS/MS using a modified Quick Polar Pesticides Extraction method" *Forensic Science International*, 283 (2018) 111-117
  41. Junjie Ding & Gehui Jin & Gaowa Jin & Aijin Shen & Zhimou Guo & Bing Yu & Yang Jiao & Jingyu Yan & Xinmiao Liang "Determination of Underivatized Glyphosate Residues in Plant-Derived Food with Low Matrix Effect by Solid Phase Extraction-Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry", *Food Anal. Methods* (2016) 9: 2856–2863
  42. Yasushi NAGATOMI, Toshiaki YOSHIOKA, Mayumi YANAGISAWA, Atsuo UYAMA & Naoki MOCHIZUKI "Simultaneous LC-MS/MS Analysis of Glyphosate, Glufosinate, and Their Metabolic Products in Beer, Barley Tea, and Their Ingredients" *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 77 (11) (2013), 2218–2221
  43. <http://data.europa.eu/eli/reg/2005/396/oj>
  44. Anneli Kruve, Ragne Auling, Koit Herodes and Ivo Leito "Study of liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry matrix effect on the example of glyphosate analysis from cereals" *Rapid Commun. Mass Spectrom.* (2011), 25, 3252–3258
  45. Dasharath P. Oulkar, Sandip Hingmire, Arnab Goon, Manjusha Jadhav, Bharat Ugare, Ahammed Shabeer Thekkumpurath, and Kaushik Banerjee "Optimization and Validation of a Residue Analysis Method for Glyphosate, Glufosinate, and

- Their Metabolites in Plant Matrixes by Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry” Journal of AOAC International Vol. 100, No. 3, (2017)
46. Yongtao Han, Le Song, Pengyue Zhao, Yanjie Li, Nan Zou, Yuhong Qin, Xuesheng Li, Canping Pan “Residue determination of glufosinate in plant origin foods using modified Quick Polar Pesticides (QuPPE) method and liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry” Food Chemistry 197 (2016) 730–736
  47. Dr. Meriel Watts “Glufosinate – ammonium” PANAP (2008)
  48. G. Wolterink, K. Inoue, J.Zarn “ETHEPHON” JMPR (2015) 227–273
  49. [https://www3.epa.gov/pesticides/chem\\_search/reg\\_actions/reregistration/fs\\_PC-099801\\_1-Apr-95.pdf](https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/reregistration/fs_PC-099801_1-Apr-95.pdf)
  50. [http://www.eurlpesticides.eu/docs/public/tmpl\\_article.asp?CntID=887&LabID=200&Lang=EN](http://www.eurlpesticides.eu/docs/public/tmpl_article.asp?CntID=887&LabID=200&Lang=EN)
  51. [http://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlSRM/meth\\_QuPPE-PO\\_EurlSRM](http://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlSRM/meth_QuPPE-PO_EurlSRM)
  52. Botitsi HV, Garbis SD, Economou A, Tsipi DF “Current Mass Spectrometry Strategies For The Analysis of Pesticides and their Metabolites in Foods” Mass Spectrom R, Article in press, 2010
  53. Skoog A., Holler F., Nieman T.A., Απόδοση στα ελληνικά Καραγιάννης Μ.Ι., Ευσταθίου Κ.Η., Χανιωτάκης Ν., Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης, Εκδόσεις Κωσταράκη, Αθήνα, (2002) 301-323, 785-841
  54. Σίσκος Π.Α., Νικολέλης Δ.Π., Αναλυτικές μέθοδοι διαχωρισμού, ΕΚΠΑ, Σχολή Θετικών Επιστημών, Τμήμα Χημείας, Αθήνα, (1991), 39-84, 122-174
  55. Atis Chakrabarti and Roy Eksteen “Separation of Polar Molecules using a Stable Amino-bonded Phase HILIC Column” Tosoh Bioscience LLC, (2011)
  56. Regina Roemling, M. Sakata, Y. Kawai, H. Yamasaki and H. Moriyama, Tosoh Bioscience, Stuttgart, Germany, Tosoh Corporation, Tokyo, Japan <https://ymc.de/>
  57. <https://www.nacalai.co.jp/global/cosmosil/>
  58. <https://www.hplc.eu/hilic.htm>
  59. <http://www.columnex.com/hilic.php>
  60. [http://www.eurlpesticides.eu/userfiles/file/EurlSRM/meth\\_QuPPE\\_PO\\_V10\\_1\(1\)](http://www.eurlpesticides.eu/userfiles/file/EurlSRM/meth_QuPPE_PO_V10_1(1))
  61. [https://www.sielc.com/Products\\_Obelisc.html](https://www.sielc.com/Products_Obelisc.html)
  62. “Full range selectivity for reversed phase separation” Phenomenex, Synergi, (2015)
  63. “Method Development Guide for Hypercarb Columns” Thermo Scientific, (2007) ([www.thermo.com/columns](http://www.thermo.com/columns))

64. Cappiello A, Famiglini G, Pierini E, Palma P, Trufelli H. "Advanced Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Interface Based on Electron Ionization" *Anal Chem* 79 (2007) 5364-5372
65. D. Zimmer. *Chromatographia*, 57 (2003) S325
66. Notes from the Thermo Electron European Training Institute, (2008)
67. Fernández-Alba AR, García-Reyes JF., "Large-scale multi-residue methods for pesticides and their degradation products in food by advanced LC-MS" *Trends Anal Chem* vol. 27 (2008) pp. 973-990
68. Peter M. van Galen, "Mass Spectrometry, the Organic Chemistry Department (A guide for novel users)" Organic Chemistry Department Nijmegen University September 2005
69. P. Marriott and R. Shellie "Principles and applications of comprehensive two-dimensional gas chromatography" *TrAC Trends in Analytical Chemistry* Vol. 21 Nos 9–10 (2002) pp. 573–583
70. [http://forensicscienceeducation.org/wpcontent/uploads/2013/04/Fundamental\\_GC-MS\\_Introduction.pdf](http://forensicscienceeducation.org/wpcontent/uploads/2013/04/Fundamental_GC-MS_Introduction.pdf)
71. H.H. Maurer and S. Bouchonnet "Introduction to GC-MS coupling" *Analytical and Bioanalytical Chemistry* Vol. 405 No 26 (2013) pp 8385-8386
72. DG SANTE, European Commission, Document No SANTE/11945/2015: "Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed", <http://www.eurl-pesticides.eu>
73. DG SANTE, European Commission, Document No SANTE/11813/2017: "Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed", <http://www.eurl-pesticides.eu>
74. Rocío Nortes-Méndez, José Robles-Molina, Rafael López-Blanco, Andrea Vass, Antonio Molina-Díaz, Juan F. Garcia-Reyes "Determination of polar pesticides in olive oil and olives by hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry and high resolution mass spectrometry", *Talanta*, 158 (2016) 222-228
75. Jieying Gao, Jian Wang, Ming Zuo, Li Ma, Yue Cui, Ting Yang and Min Ding "A highly sensitive method for simultaneous determination of the quaternary ammonium pesticides chlormequat and mepiquat in pears and potatoes by modified QuEChERS-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry" *RSC Adv.*, 5, (2015), 5895

76. Kit Granby and Martin Vahl "Investigation of the herbicide glyphosate and the plant growth regulators chlormequat and mepiquat in cereals produced in Denmark" Food Additives and Contaminants, Vol. 18, No. 10, (2001), 898-905

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

**Πίνακας1 : Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων**

| <b>Ξενόγλωσσος όρος</b>        | <b>Ελληνικός Όρος</b>                     |
|--------------------------------|-------------------------------------------|
| Breakdown Curves               | Καμπύλες θραυσματοποίησης                 |
| Conditioning                   | Ενεργοποίηση/εξισορρόπηση                 |
| Drying                         | Ξήρανση                                   |
| Electron capture detector      | Δέσμευση ηλεκτρονίων                      |
| Electron-spray ionization      | Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό               |
| Elution                        | Έκλουση                                   |
| Full Scan                      | Τεχνική πλήρους σάρωσης                   |
| Gas chromatography             | Αέρια χρωματογραφία                       |
| Hydrophilic-Lipophilic Balance | Υδρόφιλη – λιπόφιλη εξισορρόπηση          |
| Liquid Chromatography          | Υγροχρωματογραφία                         |
| Liquid-liquid extraction       | Εκχύλιση υγρού-υγρού                      |
| Loading                        | Διέλευση                                  |
| Mass Spectrometry              | Φασματομετρία μαζών                       |
| Matrix Effect                  | Επίδραση μήτρας                           |
| Matrix solid phase dispersion  | Διασπορά στερεάς φάσης υποστρώματος       |
| Maximum Residue Level          | Ανώτατο επίπεδο υπολείμματος              |
| Multi-residue method           | Πολυυπολειμματική μέθοδος                 |
| Pesticides                     | Φυτοφάρμακα                               |
| Quadrupole                     | Τετράπολο                                 |
| Relative Abundance             | Σχετική αφθονία                           |
| Residue                        | Υπόλειμμα                                 |
| Retention                      | Κατακράτηση                               |
| Selected Reaction Monitoring   | Τεχνική παρακολούθησης συγκεκριμένης      |
| Sheath gas                     | Εκνεφωτικό αέριο                          |
| Single Ion Monitoring          | Τεχνική επιλεκτικής παρακολούθησης ιόντων |
| Solid Phase Extraction         | Εκχύλιση Στερεάς φάσης                    |
| Solid Phase MicroExtraction    | Μικρο-εκχύλιση στερεάς φάσης              |
| Washing                        | Έκπλυση                                   |

## ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

**Πίνακας 2 :** Ακρωνύμια και ανάπτυξή τους

|          |                                                  |
|----------|--------------------------------------------------|
| ADI      | Acceptable daily intake                          |
| EC       | European comission                               |
| ESI      | Electron spray ionisation                        |
| FS       | Full scan                                        |
| GC       | Gas chromatography                               |
| HPLC     | High performance liquid chromatography           |
| ISO      | International Organization for Standardization   |
| LC-MS/MS | Tandem liquid chromatography – mass spectrometry |
| LLE      | Liquid–liquid extraction                         |
| LOD      | Level of Detection                               |
| LOQ      | Level of Quantitation                            |
| MRL      | Maximum residue limit                            |
| MRM      | Multiple reaction monitoring                     |
| MSPD     | Matrix solid phase dispersion                    |
| NRL      | National reference laboratories                  |
| QqQ      | Triple quadrupole mass spectrometry              |
| QuEChERS | Quick easy cheap effective rugged safe           |
| QuEChERS | Quick, easy, cheap, effective, rugged, safe      |
| RL       | Reporting limit                                  |
| SIM      | Single ion monitoring                            |
| SPE      | Solid phase extraction                           |
| SPME     | Solid phase micro extraction                     |
| SRM      | Single reaction monitoring                       |
| WHO      | World health organization                        |
| ΓΧΚ      | Γενικό Χημείο του Κράτους                        |
| ΕΚΠΑ     | Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών     |