



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ



ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ – ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ»

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΕ
ΕΔΑΦΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ QuEChERS ΣΕ
ΣΥΝΔΥΑΣΜΟ ΜΕ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΜΕ
ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΑΣ**

ΜΑΡΙΑ ΛΑΙΜΟΥ-ΓΕΡΑΝΙΟΥ
ΧΗΜΙΚΟΣ

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2020



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ



ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ – ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ»

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΕ
ΕΔΑΦΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ QuEChERS ΣΕ
ΣΥΝΔΥΑΣΜΟ ΜΕ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΜΕ
ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΑΣ**

ΛΑΙΜΟΥ-ΓΕΡΑΝΙΟΥ ΜΑΡΙΑ

ΧΗΜΙΚΟΣ

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2020

ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΕ
ΕΔΑΦΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ QuEChERS ΣΕ
ΣΥΝΔΥΑΣΜΟ ΜΕ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΜΕ
ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΑΣ**

ΛΑΙΜΟΥ-ΓΕΡΑΝΙΟΥ ΜΑΡΙΑ
ΧΗΜΙΚΟΣ

Επιβλέπουσα: Λαμπροπούλου Δήμητρα
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

Εργαστήριο Ελέγχου Ρύπανσης Περιβάλλοντος, Τομέας Φυσικής, Αναλυτικής
και Περιβαλλοντικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, ΑΠΘ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Λαμπροπούλου Δήμητρα
2. Καθηγήτρια, Σαμαρά-Κωνσταντίνου Κωνσταντίνη
3. Καθηγήτρια, Σαμανίδου Βικτωρία

Στην οικογένειά μου που πάντα με στηρίζει.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο του Διιδρυματικού Προγράμματος Μεταπτυχιακών σπουδών «Χημική ανάλυση – Έλεγχος ποιότητας». Το θέμα της εργασίας αυτής υποδείχθηκε από την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Εργαστηρίου Ελέγχου Ρύπανσης Περιβάλλοντος, του τμήματος Χημείας, του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης κ. Λαμπροπούλου Δήμητρα, την οποία ευχαριστώ θερμά για την καθοδήγηση, τις γνώσεις και την εμπειρία που μου μετέδωσε. Την ευχαριστώ επίσης για την εξαιρετική συνεργασία, την συνεχή επίβλεψη, την υπομονή και τις εποικοδομητικές συμβουλές της, καθώς και για την στήριξή της καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής, προκειμένου να ολοκληρωθεί επιτυχώς η παρούσα εργασία.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τις Καθηγήτριες του Τμήματος Χημείας Α.Π.Θ και μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής, κ. Σαμανίδου Βικτωρία και κ. Κωνσταντίνη Σαμαρά-Κωνσταντίνου, για τις πολύτιμες γνώσεις που παρείχαν κατά τη διάρκεια των μαθημάτων του μεταπτυχιακού προγράμματος, το χρόνο που αφιέρωσαν, και τις χρήσιμες συμβουλές και παρατηρήσεις τους κατά τη διόρθωση της διπλωματικής.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή του Τμήματος Χημείας Α.Π.Θ, κ. Δημήτριο Μπικιάρη και όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Χημείας και Τεχνολογίας Πολυμερών του τμήματος Χημείας ΑΠ.Θ, που μου επέτρεψαν να χρησιμοποιήσω τη συσκευή λυοφιλίωσης του εργαστηρίου τους.

Ξεχωριστές ευχαριστίες εκφράζω στη Δρ. Μυρσίνη Παπαγεωργίου, στη Δρ. Αναστασία Κολτσακίδου και στην υποψήφια Διδάκτορα Άννα Οφρυδοπούλου για την εξαιρετική συνεργασία, την αμέριστη βοήθεια και υποστήριξη που μου προσέφεραν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων και την επεξεργασία των αποτελεσμάτων. Ευχαριστώ επίσης, τη Δρ. Χριστίνα Νάννου για τις πολύτιμες συμβουλές και διορθώσεις της. Θα ήθελα ακόμα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου και ιδιαίτερα την υποψήφια διδάκτορα Neda Malesic και την Άντα Ιωαννίδου για τη βοήθεια τους όποτε χρειάστηκε, τη συνεργασία και για το άριστο κλίμα που υπήρχε στο εργαστήριο.

Κλείνοντας, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια και τους φίλους μου για τη στήριξη, την εμπιστοσύνη και την αγάπη τους καθώς και για την υπομονή που έδειξαν όλα αυτά τα χρόνια.

Θεσσαλονίκη, 2020

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	1
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΡΥΠΑΝΣΗ ΤΟΥ ΕΔΑΦΟΥΣ	2
1.1 Εισαγωγή.....	2
1.2 Ταξινόμηση ρύπων και πηγές ρύπανσης	3
1.3 Περιβαλλοντική τύχη οργανικών ρύπων	5
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ	7
2.1 Ιστορική Αναδρομή	7
2.2 Σκοπός και χρήση φυτοπροστατευτικών ενώσεων	9
2.3 Κατηγορίες φυτοπροστατευτικών προϊόντων	10
2.4 Χημική σύσταση και περιγραφή φυτοπροστατευτικών προϊόντων	14
2.5 Μεταβολίτες και προϊόντα μετασχηματισμού φυτοπροστατευτικών προϊόντων	16
2.6 Οφέλη και κίνδυνοι από τη χρήση φυτοπροστατευτικών προϊόντων	18
2.7 Νομοθετικό πλαίσιο για τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα	20
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΕΠΙΛΟΓΗ ΕΝΩΣΕΩΝ	23
3.1 Επιλεγμένες φυτοπροστατευτικές ενώσεις	23
3.1.1 Επιλεγμένα Εντομοκτόνα	23
3.1.2 Επιλεγμένα Ακαρεοκτόνα	38
3.1.3 Επιλεγμένα Νηματωδοκτόνα	39
3.1.4 Επιλεγμένα Ζιζανιοκτόνα	39
3.1.5 Επιλεγμένα Μυκητοκτόνα	40
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ	45
4.1 Εισαγωγή.....	45
4.2 Τεχνικές εκχύλισης οργανικών μικρορύπων	46
4.2.1 Κύριες τεχνικές εκχύλισης οργανικών μικρορύπων από υγρά υποστρώματα	47
4.2.1.1 Εκχύλιση Υγρού-Υγρού (Liquid-Liquid Extraction, LLE).....	47
4.2.1.2 Εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction, SPE)	48
4.2.1.3 Μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Micro-Extraction, SPME)	49
4.2.1.4 Εκχύλιση με χρήση ράβδου προσρόφησης (Stir Bar Sorptive Extraction, SBSE)	51
4.2.2 Κύριες τεχνικές εκχύλισης οργανικών μικρορύπων από στερεά υποστρώματα	51
4.2.2.1 Εκχύλιση με υπερήχους (Ultra-sound assisted extraction, UAE).....	53
4.2.2.2 Διασπορά στερεάς φάσης-υποστρώματος (Matrix Solid Phase Dispersion, MSPD) ..	53
4.2.2.3 Εκχύλιση με μικροκύματα (Microwave-Assisted Extraction, MAE	54
4.2.2.4 Ταχεία εκχύλιση με διαλύτες (Accelerated Solvent Extraction, ASE).....	54
4.2.2.5 QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe).....	55

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ-ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ	62
5.1 Υγρή Χρωματογραφία	62
5.1.1 Αναλυτικές στήλες	64
5.1.2 Ανιχνευτές	65
5.2 Φασματομετρία Μάζας	65
5.2.1 Γενική Περιγραφή του Οργάνου	67
5.3 Τεχνικές ιοντισμού	69
5.3.1 Ιοντισμός σε αέρια φάση	70
5.3.1.1 Ιοντισμός με Ηλεκτροψεκασμό (ESI)	71
5.3.1.2 Φάσματα ESI	73
5.3.2 Ιοντισμός με εκρόφηση	73
5.4 Αναλυτές μαζών	74
5.4.1 Τετραπολικός Αναλυτής (Quadrupole)	76
5.4.1.1 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα του τετραπολικού αναλυτή	77
5.5 Τεχνικές ανάλυσης φασματομετρίας μάζας	77
5.6 Σύζευξη υγρής χρωματογραφίας και φασματομετρίας μάζας	78
5.6.1 Σύζευξη LC–ESI	79
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	81
B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	82
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	83
7.1 Πρότυπες ενώσεις-Διαλύτες-Αντιδραστήρια-Υλικά	83
7.1.1 Πρότυπες ενώσεις και πρότυπα διαλύματα	83
7.1.2 Διαλύτες	84
7.1.3 Αντιδραστήρια	84
7.1.4 Προσροφητικά Υλικά	84
7.1.5 Υλικά και Σκεύη	84
7.1.6 Συσκευές	85
7.1.7 Χρωματογραφικό σύστημα	85
7.2 Δείγματα	86
7.2.1 Δείγματα για την ανάπτυξη της αναλυτικής μεθόδου	86
7.2.2 Ποσότητα δείγματος	86
7.2.3 Εμβολιασμός δειγμάτων εδάφους	86
7.3 Μέθοδοι	87
7.3.1 Εκχύλιση QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe)	87
7.3.2 Ανάλυση με υγρή χρωματογραφία και φασματομετρία μάζας	88
7.4 Επικύρωση μεθόδου	93
7.5 Επίδραση υποστρώματος (matrix effect)	94

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	96
Βελτιστοποίηση και Επικύρωση της μεθόδου QuEChERS	96
Α. Βελτιστοποίηση	96
8.1 Εισαγωγή.....	96
8.2 Μελέτη παραμέτρων που επηρεάζουν την εκχύλιση QuEChERS	97
8.2.1 Προσθήκη νερού/Επανενυδάτωση πριν από την εκχύλιση	98
8.2.2 Άλατα εκχύλισης	98
8.2.3 Διαλύτης εκχύλισης.....	102
8.2.4 Προσθήκη EDTA και κεραμικών ομογενοποιητών στην υδατική φάση.....	105
8.2.5 Άλλες παράμετροι που επηρεάζουν την εκχύλιση	108
8.3 Επιλογή του κατάλληλου προσροφητικού στο στάδιο καθαρισμού	109
Β. Επικύρωση	116
8.4 Αναλυτικά χαρακτηριστικά επίδοσης της μεθόδου QuEChERS.....	116
8.4.1 Όρια ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού.....	116
8.4.2 Γραμμικότητα	119
8.4.3 Ορθότητα, επαναληψιμότητα και αναπαραγωγιμότητα	122
8.5 Επίδραση υποστρώματος	125
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	128
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	130
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	136
ABSTRACT	137
ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΟ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΕΡΓΟ	138

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΡΥΠΑΝΣΗ ΤΟΥ ΕΔΑΦΟΥΣ

1.1 Εισαγωγή

Το έδαφος είναι βασικό συστατικό των χερσαίων οικοσυστημάτων, απαραίτητο για την ανάπτυξη των φυτών, καθώς και για την αποσύνθεση και ανακύκλωση της νεκρής βιομάζας. Πρόκειται για ένα πολύπλοκο, ετερογενές μέσο, το οποίο είναι μίγμα οργανικών και ανόργανων στερεών, υδατικών και αέριων συστατικών. Αποτελεί το ενδιαίτημα για πολλούς οργανισμούς, αλλά και το μέσο στο οποίο αναπτύσσονται οι ρίζες των φυτών, λαμβάνουν νερό, οξυγόνο και διάφορα ιόντα. Το έδαφος είναι ένα δυναμικό σύστημα, το οποίο υπόκειται σε βραχυπρόθεσμες διακυμάνσεις ως προς τα επίπεδα της υγρασίας, το pH και τις οξειδοαναγωγικές συνθήκες. Επίσης, υποβάλλεται σε σταδιακή μεταβολή ως αντίδραση στις αλλαγές των περιβαλλοντικών παραγόντων [1].

Ως έδαφος θεωρούνται οι άνω στρώσεις του φλοιού της γης που μπορούν να υποστηρίξουν την ανάπτυξη φυτών. Το υπέδαφος είναι οι υποκείμενες στρώσεις του εδάφους του ανώτερου φλοιού. Η σύσταση των εδαφών προσδιορίζει τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες, οι οποίες με τη σειρά τους καθορίζουν τη συμπεριφορά του εδάφους σχετικά με τις αλληλεπιδράσεις με το νερό και άλλα στερεά και υγρά. Το έδαφος είναι άρρηκτα συνδεδεμένο με τη ρύπανση των υπόγειων νερών και την ποιοτική τους υποβάθμιση. Η έκταση και το μέγεθος της υδατικής ρύπανσης έχει άμεση σύνδεση με την εδαφική ρύπανση καθώς συνήθως προέρχεται από αυτή. Από τη στιγμή που η έκθεση των υποδοχέων (χλωρίδα, πανίδα, άνθρωπος) στους ρύπους γίνεται κυρίως μέσω του νερού, αυτό συνεπάγεται ότι και η αντιμετώπιση της ρύπανσης στην πηγή (έδαφος) οδηγεί στη μείωση του κινδύνου έκθεσης των ευαίσθητων υποδοχέων. Κατά συνέπεια, η Οδηγία 2000/60/EK, εντάσσει, στα πλαίσια της προστασίας της ποιότητας των επιφανειακών και υπόγειων υδάτων, και την παρακολούθηση της ρύπανσης του εδάφους και της ατμόσφαιρας, ως πηγές επιβλαβών ουσιών [2].

Η ταχύτατη τεχνολογική και επιστημονική πρόοδος παρέχει σημαντικά οφέλη στην ανθρωπότητα, εντούτοις φαίνεται να έχει μεγάλο αντίκτυπο στα οικοσυστήματα και κατά συνέπεια στον άνθρωπο. Σύμφωνα με την οδηγία 2000/60/EK ρύπανση, ως συνέπεια ανθρώπινων δραστηριοτήτων, ορίζεται η άμεση ή έμμεση εισαγωγή στον αέρα, το νερό ή το έδαφος, ουσιών ή θερμότητας που μπορούν να είναι επιζήμια για την υγεία του ανθρώπου ή για την ποιότητα των υδατικών οικοσυστημάτων ή των χερσαίων οικοσυστημάτων που εξαρτώνται άμεσα από υδατικά οικοσυστήματα [3]. Είναι σημαντικό να κατανοηθεί η διαφορά

μεταξύ των όρων ρύπανση και μόλυνση, που συχνά χρησιμοποιείται λανθασμένα, καθώς η μόλυνση αναφέρεται μόνο στη μορφή ρύπανσης, η οποία χαρακτηρίζεται από την παρουσία παθογόνων μικροοργανισμών ή δεικτών, που υποδηλώνουν την πιθανότητα παρουσίας τους στο περιβάλλον.

1.2 Ταξινόμηση ρύπων και πηγές ρύπανσης

Σύμφωνα με την οδηγία 2000/60/ΕΚ [3] ως ρύπος ορίζεται κάθε ουσία που εμπεριέχει τον κίνδυνο να προκαλέσει ρύπανση. Πιο αναλυτικά, οι ρύποι είναι ουσίες ικανές να δράσουν βλαπτικά στους οργανισμούς, ή ακόμη και να προκαλέσουν το θάνατο και περιλαμβάνουν διάφορες ουσίες ή ομάδες ουσιών, όπως επικίνδυνες χημικές ενώσεις, τοξικά αέρια, αιωρούμενα σωματίδια, φυτοφάρμακα, κ.ά. Ένας ρύπος μπορεί να χαρακτηριστεί ως τοξικός όταν μπορεί να προκαλέσει σοβαρή βλάβη ή θάνατο σε ανθρώπους ή ζώα.

Οι πηγές ρύπανσης διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, όπου η καθεμία μπορεί να διαχωριστεί σε επιμέρους υποκατηγορίες. Οι κύριες κατηγορίες είναι οι φυσικές και οι ανθρωπογενείς πηγές ρύπανσης. Στις φυσικές πηγές ρύπανσης περιλαμβάνονται εκείνες που υπάρχουν στη φύση και προέρχονται από φυσικές διεργασίες, για παράδειγμα η ηφαιστειακή δραστηριότητα και η διάβρωση των πετρωμάτων. Αντίθετα, στις ανθρωπογενείς πηγές ρύπανσης, όπως προκύπτει και από την ονομασία τους, περιλαμβάνονται όλες οι πηγές ρύπανσης που οφείλονται στην ανθρώπινη δραστηριότητα. Χαρακτηριστικά αναφέρονται η βιομηχανία, τα αστικά λύματα και στερεά απορρίμματα, η παραγωγή λιπασμάτων, χημικών και χρωμάτων, η εξόρυξη ορυκτών, οι γεωργικές δραστηριότητες κ.ά. Οι ανθρωπογενείς πηγές ρύπανσης αποτελούν την κύρια αιτία επιβάρυνσης και κατά συνέπεια υποβάθμισης του εδάφους και των υδάτων. Επίσης, οι ανθρωπογενείς πηγές ρύπανσης μπορούν να ταξινομηθούν περαιτέρω σε σημειακές και μη σημειακές. Ως σημειακές πηγές, ονομάζονται εκείνες που εντοπίζονται σε μια σταθερή τοποθεσία ή εγκατάσταση που απελευθερώνει στο περιβάλλον επιβαρυντικές για αυτό ουσίες. Οι μη σημειακές πηγές, είναι διάχυτες στο χώρο και δεν εντοπίζονται σε συγκεκριμένο σημείο, γεγονός που καθιστά δύσκολο τον εντοπισμό και την αντιμετώπισή τους [4].

Το σύνολο των ρύπων, ανάλογα με την προέλευσή τους και επιπτώσεις που μπορεί να προκαλέσουν στους αποδέκτες, διακρίνονται σε: (α) συμβατικούς ρύπους, (β) μη συμβατικούς ρύπους και (γ) μικροβιακούς ρύπους. Πιο αναλυτικά, με τον όρο συμβατικοί ρύποι αναφερόμαστε σε ουσίες όπως οργανική ύλη (αμμωνιακά, νιτρικά και φωσφορικά άλατα), που

μπορούν να υπάρχουν σε ένα σύστημα και όταν οι συγκεντρώσεις τους είναι κάτω από κρίσιμες οριακές τιμές δεν αποτελούν ρύπανση. Η αύξηση των συγκεντρώσεών τους πάνω από τις οριακές αυτές τιμές οδηγεί σε ρύπανση του οικοσυστήματος. Οι μη συμβατικοί ρύποι είναι κυρίως τοξικές ουσίες, οι οποίες υπό συνθήκες απουσίας ρύπανσης συναντώνται σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις ή και καθόλου. Όσον αφορά τη μικροβιακή ρύπανση, κύρια πηγή παθογόνων μικροοργανισμών είναι τα αστικά και κτηνοτροφικά λύματα, τα οποία περιέχουν περιττώματα ανθρώπων και ζώων [4].

Πλέον, οι έρευνες σχετικά με την περιβαλλοντική ρύπανση εστιάζονται περισσότερο στους «αναδυόμενους ρύπους» (Emerging Contaminants, ECs) σε αντίθεση με παλιότερα, όπου η χημική ρύπανση επικεντρωνόταν στην επίδραση των συμβατικών ρύπων [3]. Αυτό οφείλεται όχι μόνο στην αβεβαιότητα για τους πιθανούς κινδύνους που ενέχει η συνεχής χρήση τους, αλλά και στην ανάπτυξη νέων αναλυτικών τεχνικών, με μεγαλύτερη ευαισθησία και εκλεκτικότητα, που είναι ικανές να ανιχνεύσουν τις ενώσεις αυτές ακόμα και σε εξαιρετικά χαμηλό επίπεδο συγκεντρώσεων, που μέχρι πρότινος δεν ήταν εφικτό [5]. Με τον όρο «αναδυόμενοι ρύποι» ορίζονται οι σύνθετες οργανικές χημικές ενώσεις οι οποίες ανιχνεύονται συχνά σε μη αναμενόμενες συγκεντρώσεις, θεωρούνται εν δυνάμει επιβλαβείς για το περιβάλλον και την ανθρώπινη υγεία και οι επιπτώσεις τους στο περιβάλλον δεν έχουν μελετηθεί διεξοδικά. Συνιστούν μία μεγάλη και σχετικά καινούργια ομάδα σημαντικών και επίμονων ρύπων οι οποίοι μέχρι πρότινος δεν είχαν κατηγοριοποιηθεί [3, 4].

Οι αναδυόμενοι ρύποι παρουσιάζουν ενδιαφέρον, κυρίως λόγω της υψηλής πολικότητάς τους και της συνεχούς χρήσης τους και εισαγωγής τους στο περιβάλλον. Επίσης, χαρακτηρίζονται για την ανθεκτικότητά τους, για τη δυνατότητα μεταφοράς τους σε μεγάλες αποστάσεις και για τη δυνατότητα βιοσυσσώρευσής τους στην τροφική αλυσίδα, στον άνθρωπο και στην πανίδα [6]. Στην κατηγορία των αναδυόμενων ρύπων περιλαμβάνονται μεταξύ άλλων, ουσίες όπως οι ενδοκρινικοί διαταράκτες, πλαστικοποιητές, λιπαντικά και απορρυπαντικά, επιβραδυντές φλόγας, φαρμακευτικές ουσίες, προϊόντα προσωπικής φροντίδας, εντομοαπωθητικά, προϊόντα μετασχηματισμού φυτοπροστατευτικών ενώσεων, εντομοαπωθητικά, γαλακτωματοποιητές και σταθεροποιητές τροφίμων και ποτών και διάφορα άλλα. Τέλος, συμπεριλαμβάνονται τα βαρέα μέταλλα και άλλα ελαφρύτερα στοιχεία (αργίλιο και βηρύλλιο), καθώς και ορισμένα μεταλλοειδή όπως το αντιμόνιο και το αρσενικό [4, 6].

Οι αναδυόμενοι ρύποι έχουν ανιχνευθεί πρακτικά παντού, και κυρίως σε υγρά αστικά νοσοκομειακά ή βιομηχανικά απόβλητα, αλλά και σε διάφορα περιβαλλοντικά δείγματα, όπως επιφανειακά και υπόγεια ύδατα, έδαφος, ιζήματα καθώς και στο πόσιμο νερό. Οι

συγκεντρώσεις τους, ανάλογα με την περίοδο της δειγματοληψίας, την περιοχή και το είδος του δείγματος μπορεί να κυμαίνονται από μερικά ng/L έως εκατοντάδες µg/L [7].

Το έδαφος γίνεται καθημερινά αποδέκτης μεγάλων ποσοτήτων από τοξικές και επιβλαβείς ουσίες με αποτέλεσμα την υποβάθμισή του. Μαζί με τα υδάτινα συστήματα αποτελούν τους κύριους αποδέκτες της ανθρωπογενούς ρύπανσης. Πρόσθετες αιτίες υποβάθμισης του εδάφους αποτελούν οι ακατάλληλες γεωργικές και κτηνοτροφικές πρακτικές, η εντατική χρήση της γης, η αστική και βιομηχανική επέκταση κ.α. Ακόμη, το έδαφος γίνεται αποδέκτης και των ατμοσφαιρικών ρύπων, που κατακρημνίζονται με αργούς ρυθμούς, ανάλογα με τις συνθήκες και τη γεωμορφολογία των περιοχών. Ορισμένες από τις βασικές αιτίες ρύπανσης των εδαφών είναι [8]:

- Τα λιπάσματα και τα φυτοφάρμακα των γεωργικών εκμεταλλεύσεων.
- Τα υγρά και στερεά απόβλητα των κτηνοτροφικών εκμεταλλεύσεων.
- Τα υγρά και στερεά απόβλητα των χημικών βιομηχανιών.
- Τα αστικά και νοσοκομειακά απόβλητα που διατίθενται σε χώρους υγειονομικής ταφής και αποτέφρωσης σε υψηλές θερμοκρασίες.
- Η ρύπανση από την εκμετάλλευση του πετρελαίου, λιπαντικών υλών και ελαστικών τροχοφόρων
- Η ρύπανση από απόβλητα μεταλλευτικών και λατομικών επιχειρήσεων.
- Η ρύπανση από βαρέα μέταλλα, που προέρχονται από χημικές βιομηχανίες, καύση στερεών και υγρών ορυκτών καυσίμων και άλλες διεργασίες εμπλουτισμού ή καθαρισμού μεταλλευμάτων.

1.3 Περιβαλλοντική τύχη οργανικών ρύπων

Οι ρύποι εισέρχονται στο περιβάλλον είτε άμεσα είτε έμμεσα. Στην πρώτη περίπτωση η εισαγωγή τους γίνεται μέσω απευθείας απόθεσης, όπως η εφαρμογή φυτοφαρμάκων, ενώ στη δεύτερη περίπτωση μπορεί να εισχωρήσουν εξαιτίας της έκπλυσης και της επιφανειακής απορροής από αγρούς, λόγω ατυχημάτων σε σημειακές πηγές κ.ά.

Η τύχη και η παραμονή των οργανικών ρύπων στο φυσικό περιβάλλον εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως οι φυσικοχημικές τους ιδιότητες, ιδιαίτερα η πτητικότητα και η διαλυτότητα στο νερό, τα φυσικοχημικά και βιολογικά χαρακτηριστικά του υποστρώματος στο οποίο βρίσκονται και οι κλιματολογικές και μορφολογικές συνθήκες της εκάστοτε περιοχής [4].

Οι οργανικοί ρύποι, μετά την απελευθέρωσή τους στο περιβάλλον μπορεί να υποστούν διάφορες φυσικές, χημικές ή βιολογικές διεργασίες μεταφοράς, συγκράτησης και μετατροπής, με συνέπεια την ανίχνευση υπολειμμάτων τους σε διάφορα περιβαλλοντικά υποστρώματα αλλά και σε ανώτερα είδη της τροφικής αλυσίδας και τελικά στον άνθρωπο. Στα υπολείμματα που ανιχνεύονται συμπεριλαμβάνονται και τα προϊόντα μεταβολισμού, διάσπασης ή χημικής αντίδρασης εφόσον η τοξικότητά τους κρίνεται σημαντική. Στις φυσικές διεργασίες με τις οποίες κατανέμονται οι οργανικοί μικρορύποι στο περιβάλλον ανήκουν η προσρόφηση, η εξάτμιση και η ιζηματοποίηση. Η προσρόφηση είναι μια φυσικοχημική διεργασία κατά την οποία τα μόρια ή ιόντα μιας χημικής ουσίας έλκονται και συγκρατούνται από την επιφάνεια ενός στερεού σώματος. Μια ποσοτική έκφραση της προσρόφησης ενός ρύπου στο έδαφος είναι ο συντελεστής κατανομής του στην οργανική ύλη του εδάφους (Organic Carbon Partition Coefficient, K_{oc}) και αποτελεί δείκτη της κινητικότητάς του στο έδαφος. Όσο χαμηλότερη είναι η τιμή K_{oc} τόσο μεγαλύτερη είναι η πιθανότητα έκπλυσης των ρύπων, αυξάνοντας την πιθανότητα ρύπανσης των υπογείων υδάτων. Η αποικοδόμηση των οργανικών ρύπων μπορεί να πραγματοποιηθεί επίσης μέσω χημικών και βιολογικών διεργασιών, οι οποίες μπορεί να είναι αντιδράσεις οξείδωσης, αναγωγής, υδρόλυσης ή και φωτοδιάσπασης [9, 10].

Επίσης, τα ιζήματα παίζουν σημαντικό ρόλο στη μεταφορά και την τύχη των οργανικών ρύπων, καθώς αποτελούν τις κύριες λεκάνες απορροής, συσσωρεύοντας πολύ μεγάλο ποσοστό των ρύπων που εισχωρούν στο περιβάλλον. Ακόμη, τα ιζήματα θεωρούνται ένα ιδιαίτερα χρήσιμο υπόστρωμα, που μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης ρύπανσης, καθώς είναι ικανό να προσφέρει πληροφορίες για την ποιότητα των μελετώμενων συστημάτων, παρέχοντας αξιόπιστα δεδομένα για το επίπεδο της ρύπανσης. Αυτό οφείλεται στη χαμηλή ικανότητα ανανέωσης των ιζημάτων, σε σύγκριση με τα υδάτινα υποστρώματα ή την ατμόσφαιρα [4].

ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ

2.1 Ιστορική Αναδρομή

Οι ανθρωπογενείς δραστηριότητες έχουν μεγάλο αντίκτυπο στο περιβάλλον, καθώς η ρύπανση που προκαλείται επιφέρει ανεπανόρθωτες ζημιές. Μια μεγάλη κατηγορία προϊόντων που χρησιμοποιείται ευρέως τις τελευταίες δεκαετίες προκαλώντας σοβαρά περιβαλλοντικά προβλήματα είναι οι φυτοπροστατευτικές ενώσεις ή αλλιώς φυτοφάρμακα. Για την προστασία των καλλιεργειών τους, οι άνθρωποι έχουν χρησιμοποιήσει φυτοφάρμακα ήδη από πολύ παλιά. Η πρώτη γνωστή καταγραφή ήταν η χρήση στοιχειακού θείου από τους αρχαίους Σουμερίους, στην αρχαία Μεσοποταμία, περίπου 4500 χρόνια πριν [12]. Μέχρι τον 15ο αιώνα, τοξικές χημικές ουσίες, όπως ο υδράργυρος, το αρσενικό, και ο μόλυβδος εφαρμόζονταν στις καλλιέργειες ώστε να σκοτώσουν τα παράσιτα. Τον 17ο αιώνα, ξεκίνησε η απομόνωση της θειικής νικοτίνης από φύλλα καπνού, για να χρησιμοποιηθεί ως εντομοκτόνο. Τον 19ο αιώνα εισάγονται δύο νέα φυσικά φυτοφάρμακα, το πύρεθρο και η ροτενόνη, που προέρχονταν από τα χρυσάνθεμα και από τις ρίζες τροπικών λαχανικών (εκχύλισμα από τις ρίζες του φυτού Derris) αντίστοιχα [11].

Το 1930 θεωρείται ορόσημο της εποχής των σύγχρονων οργανικών γεωργικών φαρμάκων, με την ανακάλυψη των χλωριωμένων υδρογονανθράκων. Η ανάπτυξη των νέων συνθετικών οργανικών παρασιτοκτόνων κατά τη διάρκεια του Β' Παγκοσμίου Πολέμου, έφερε την επανάσταση στον έλεγχο των παρασίτων. Οι χημικοί αναζητούσαν μία φθηνή χημική ουσία με μεγάλη ανθεκτικότητα στο ηλιακό φως και μικρή τοξικότητα για τον άνθρωπο, που να σκοτώνει τα επιβλαβή έντομα, και έτσι το 1939 ο Paul Müller έδειξε πως το DDT πληρούσε αυτές τις προδιαγραφές. Ο συγκεκριμένος χλωριωμένος υδρογονάνθρακας (DDT, χλωροδιφαινυλο-τριχλωροαιθάνιο) παρασκευάστηκε το 1873 από το Γερμανό Zeidler, όμως η ιδιότητά του ως εντομοκτόνο ανακαλύφθηκε το 1939 από τον Ελβετό Müller, που πήρε και το βραβείο Νόμπελ, ενώ το 1942 κυκλοφόρησε στο εμπόριο και σύντομα ήταν το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο εντομοκτόνο τόσο για την προστασία της δημόσιας υγείας όσο και της αγροτικής παραγωγής [12]. Το 1940, παράγονται και χρησιμοποιούνται ευρέως πολλά οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα ενώ αργότερα, το 1975, αντικαθίστανται από οργανοφωσφορικά και καρβαμιδικά φυτοφάρμακα, δίνοντας τον κυρίαρχο ρόλο, ως εντομοκτόνα, στα πυρεθροειδή. Το 1960, άρχισαν να χρησιμοποιούνται ευρέως οι τριαζίνες και τα καρβοξυλικά οξέα, ως ζιζανιοκτόνα [13].

Τη δεκαετία του 1960 ανακαλύφθηκε ότι το DDT λειτουργούσε ανασταλτικά στην αναπαραγωγή πολλών πουλιών που τρέφονταν με ψάρια, γεγονός που αποτελούσε ιδιαίτερα σοβαρή απειλή για τη βιοποικιλότητα. Το 1962, με τη δημοσίευση του βιβλίου της Rachel Carson «Σιωπηλή Άνοιξη», σχετικά με τη βιολογική μεγέθυνση, η παγκόσμια εμπιστοσύνη στη χρήση των φυτοπροστατευτικών ενώσεων κλονίστηκε. Η Αμερικανίδα θαλάσσια βιολόγος επισήμανε πως αν εξαιρεθεί το ενδεχόμενο ενός πυρηνικού πολέμου, η μεγαλύτερη απειλή για την ανθρωπότητα είναι η ρύπανση του ανθρώπινου περιβάλλοντος. Το βιβλίο δημιούργησε πολλές ανησυχίες και οδήγησε στην αλλαγή της εθνικής πολιτικής των ΗΠΑ για τη χρήση των εντομοκτόνων, και συγκεκριμένα απαγορεύτηκε η χρήση του DDT καθώς και άλλων εντομοκτόνων. Σήμερα, σύμφωνα με τη Σύμβαση της Στοκχόλμης για τους έμμονους οργανικούς ρύπους, η γεωργική χρήση του DDT έχει απαγορευθεί αλλά εξακολουθεί να χρησιμοποιείται σε ορισμένες αναπτυσσόμενες χώρες για την πρόληψη της ελονοσίας και άλλων τροπικών ασθενειών [14].

Στα τέλη της δεκαετίας του 1960 εμφανίστηκαν στην αγορά και άλλα αποτελεσματικά μυκητοκτόνα, όπως οι πυριμιδίνες (pyrimidines). Την περίοδο 1970-1980 εμφανίστηκε η τρίτη γενιά φυτοφαρμάκων, στην οποία ανήκουν οι σουλφονυλουρίες (sulfonylureas) και τα πυρεθροειδή (pyrethroids). Η παρασκευή τους βασίστηκε σε μια πιο λεπτομερή κατανόηση των βιολογικών και βιοχημικών μηχανισμών δράσης τους. Κατά τις δεκαετίες 1980 και 1990 υπάρχει αυξημένη ανάπτυξη ουσιών που αποτελούν παράγωγα φυσικών ενώσεων, με τα νεονικοτινοειδή να αποτελούν ένα τέτοιο παράδειγμα. Επίσης το ίδιο διάστημα αναπτύσσονται τα εντομοκτόνα σπινουσύνες, που αποτελούν δευτερογενείς μεταβολίτες του ακτινομύκητα *Saccharopolyspora spinosa*, και οι αβερμεκτίνες που είναι προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού ειδών του γένους *Streptomyces*. Αργότερα εμφανίστηκαν και οι φερομόνες (feromones), τα αποστειρωτικά (sterilants) και οι αναστολείς χιτίνης (chitin inhibitors) [15].

Συνοπτικά, η ιστορία της χρήσης των φυτοφαρμάκων μπορεί να χωριστεί σε τρεις φάσεις. Η πρώτη φάση, λαμβάνει χώρα πριν την δεκαετία του 1870, και περιλαμβάνει μόνο φυσικά γεωργικά φάρμακα, που χρησιμοποιούνταν για τον έλεγχο των παρασίτων. Ακολουθεί η δεύτερη φάση (1870-1945) η οποία χαρακτηρίζεται ως η «εποχή των ανόργανων συνθετικών γεωργικών φαρμάκων», και η τρίτη και τελευταία φάση, την οποία διανύουμε από το 1945 έως σήμερα, είναι η «εποχή των συνθετικών γεωργικών φαρμάκων» [4].

2.2 Σκοπός και χρήση φυτοπροστατευτικών ενώσεων

Οι φυτοπροστατευτικές ενώσεις (pesticides/ agrochemicals) είναι «χημικές ή βιολογικές ουσίες που χρησιμοποιούνται για την πρόληψη, την καταστροφή, την απώθηση ή τη μείωση κάθε παρασίτου που έχει επιβλαβή επίδραση στις καλλιέργειες μειώνοντας την απόδοσή τους». Αντίστοιχοι ορισμοί έχουν δοθεί και από άλλους οργανισμούς. Συγκεκριμένα, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO, World Health Organization), ως «φυτοπροστατευτικά προϊόντα» ονομάζει τις χημικές ουσίες, που εφαρμόζονται στην αγροτική παραγωγή για να ελεγχθούν τα παράσιτα, τα ζιζάνια ή τα έντομα καθώς και οι ασθένειες των φυτών. Ο Αγγλικός Οργανισμός Προστασίας Περιβάλλοντος (Food and Environment Protection Act, FEPA) ως φυτοφάρμακο ορίζει «οποιαδήποτε ουσία, παρασκεύασμα ή οργανισμό που παρασκευάζεται ή χρησιμοποιείται για την προστασία των φυτών, των ξύλων ή άλλων φυτικών προϊόντων από επιβλαβείς οργανισμούς, για τη ρύθμιση της ανάπτυξης των φυτών, για την προστασία κατά των επιβλαβών πλασμάτων ή τη μετατροπή αυτών σε αβλαβή». Ο αντίστοιχος Αμερικάνικος Οργανισμός (U.S. Environmental Protection Agency, USEPA) ως φυτοφάρμακο ορίζει «οποιαδήποτε ουσία ή μίγμα ουσιών προορίζεται για την πρόληψη, την καταστροφή, την απώθηση ή την μείωση των παρασίτων» [16, 17].

Τα φυτοφάρμακα χωρίζονται κυρίως σε φυτοπροστατευτικές ενώσεις και βιοκτόνα, δύο όροι που χρησιμοποιούνται αδιάκριτα και διέπονται από τις ίδιες οδηγίες και κανονισμούς. Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Οδηγία 91/414/ΕΟΚ του Συμβουλίου της Ευρώπης και το άρθρο 2 του Ελληνικού Προεδρικού Διατάγματος 115/1997, καθώς και την αναθεωρημένη οδηγία 1107/2009, που είναι πλέον σε εφαρμογή, τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα (plant protection products), είναι προϊόντα συγκεκριμένης δομής, τα οποία περιέχουν μία ή περισσότερες δραστικές ουσίες και χρησιμοποιούνται για να:

- Προστατεύουν τα φυτά ή τα φυτικά προϊόντα από κάθε είδους επιβλαβή οργανισμό ή να προλαμβάνουν τη δράση των οργανισμών αυτών.
- Επιβραδύνουν ή να προλαμβάνουν την ανεπιθύμητη ανάπτυξη φυτών.
- Επεμβαίνουν στις φυσιολογικές διεργασίες των φυτών, όπου αυτό είναι απαραίτητο.
- Καταστρέφουν ανεπιθύμητα φυτά ή μέρη φυτών.
- Συμβάλλουν στη διαφύλαξη των φυτικών προϊόντων, σύμφωνα πάντα με τις ειδικές κοινοτικές διατάξεις σχετικές με τα προσθετικά.

Η χρήση των φυτοφαρμάκων αυξήθηκε κατά πολύ τις τελευταίες δεκαετίες. Οι κυριότεροι παράγοντες που ήταν υπεύθυνοι για την ταχύτατη αύξηση της χρήσης φυτοπροστατευτικών προϊόντων είναι οι παρακάτω:

- α) Εμφάνιση ανθεκτικότητας σε μερικά είδη εντόμων και ζιζανίων.
- β) Επέκταση των καλλιεργούμενων εκτάσεων (αποξηράνσεις των λιμνών) ειδικότερα των αρδευόμενων γεωργικών καλλιεργειών.
- γ) Εισαγωγή νέων μεθόδων καλλιέργειας.
- δ) Εισαγωγή νέων ποικιλιών φυτών με μεγαλύτερες απαιτήσεις για φυτοπροστασία.
- ε) Απαίτηση μεγάλων αποδόσεων γεωργικής παραγωγής.

Η χρήση των φυτοφαρμάκων είναι εκτεταμένη στις αγροτικές περιοχές, συμβάλλοντας έτσι στην εξασφάλιση επαρκών ποσοτήτων γεωργικών προϊόντων υψηλής ποιότητας σε προσιτές τιμές. Λαμβάνοντας υπόψη τα οικονομικά οφέλη, η χρήση τους, ως ένα βαθμό, είναι αποδεκτή από την κοινωνία. Τα φυτοφάρμακα χρησιμοποιούνται σε ευρεία κλίμακα και θεωρούνται εν γένει απαραίτητα για τα σύγχρονα καλλιεργητικά συστήματα. Ωστόσο, η είσοδός τους στο περιβάλλον είτε από λανθασμένη πρακτική είτε από παράνομη χρήση, μπορεί να οδηγήσει σε ρύπανση του εδάφους, των υπόγειων και επιφανειακών νερών, προκαλώντας ανεπιθύμητες επιπτώσεις στο περιβάλλον, τους οργανισμούς μη-στόχους αλλά και τον άνθρωπο. Έχει ήδη αποδειχτεί ότι μέσω πολλών βιοχημικών και βιολογικών διεργασιών, πολλά φυτοφάρμακα ή προϊόντα διάσπασής τους μπορούν να εισέλθουν σε όλα σχεδόν τα οικοσυστήματα και τελικά την τροφική αλυσίδα [16].

2.3 Κατηγορίες φυτοπροστατευτικών προϊόντων

Η ύπαρξη μεγάλου αριθμού φυτοπροστατευτικών σκευασμάτων δημιουργεί την ανάγκη κατάταξής τους σε διάφορες κατηγορίες. Η κατάταξη αυτή μπορεί να γίνει με βάση διαφορετικά κριτήρια. Συνήθως ταξινομούνται ανάλογα με τη φύση τους, τον τρόπο επαφής και δράσης τους, το είδος του οργανισμού-στόχου, την εκλεκτικότητά τους και τη χημική τους δομή [10].

Ανάλογα με τη φύση τους, τα φυτοφάρμακα διακρίνονται σε ανόργανα και οργανικά. Πλέον, τα περισσότερα φυτοφάρμακα είναι συνθετικές οργανικές ενώσεις και μόνο ένα μικρό

ποσοστό είναι παράγωγο φυσικών προϊόντων. Ανάλογα με τον τρόπο επαφής τους, τα φυτοφάρμακα χωρίζονται σε συστημικά και μη συστημικά. Τα μη συστημικά φυτοφάρμακα δεν διεισδύουν αισθητά στο φυτικό ιστό και έτσι ούτε μεταφέρονται ούτε μετατοπίζονται εντός του αγγειακού συστήματος των φυτών. Κύριο μειονέκτημά τους είναι η ευαισθησία τους στα καιρικά φαινόμενα. Τα περισσότερα από τα σύγχρονα φυτοφάρμακα εμφανίζουν συστημική δράση. Διεισδύουν, δηλαδή, στην επιδερμίδα των φυτών και μεταφέρονται μέσω του αγγειακού τους συστήματος. Οι συστηματικοί παράγοντες δεν δρουν μόνο προστατευτικά από τα παράσιτα, αλλά αναστέλλουν ή θεραπεύουν τυχόν μολύνσεις. Δεν επηρεάζονται από τις καιρικές συνθήκες και προσφέρουν ανοσία σε όλα τα υπό ανάπτυξη φυτά. Ανάλογα με το είδος του οργανισμού-στόχου, τα φυτοφάρμακα διακρίνονται σε [10]:

- Εντομοκτόνα (insecticides)

Καταπολεμούν τα έντομα και άλλα αρθρόποδα, τα οποία καταστρέφουν τα φυτά και τον καρπό τους. Προστίθενται είτε στο χώμα, είτε στην εναέρια περιοχή του φυτού.

- Ζιζανιοκτόνα (herbicides)

Χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση των ζιζανίων και άλλων φυτών, που δεν είναι επιθυμητά.

- Μυκητοκτόνα (fungicides)

Χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση των ασθενειών που οφείλονται σε μύκητες. Ο όρος μυκητοκτόνο χρησιμοποιείται και στην περίπτωση ενώσεων που δεν θανατώνουν, αλλά δρουν παρεμποδιστικά στην αύξηση των φυτοπαθογόνων, έχουν δηλαδή μυκητοστατική δράση.

- Ακαρεοκτόνα (Acaricides)

Χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση των ακάρεων.

- Νηματωδοκτόνα (Nematicides)

Χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση νηματωδών, τα οποία δρουν ως παράσιτα των φυτών.

- Βακτηριοκτόνα (Bacteriocides)

Χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση βακτηριδίων.

- Μαλακιοκτόνα (Molluscicides)

Χρησιμοποιούνται για να αναστέλλουν ή καταστρέφουν μαλάκια, όπως το σαλιγκάρι.

- Φερομόνες (Pheromones)

Χρησιμοποιούνται για την παρεμπόδιση της σύζευξης των εντόμων.

- Ρυθμιστές ανάπτυξης φυτών (Plant Growth Regulators)

Χρησιμοποιούνται για τη βελτίωση της ανάπτυξης των φυτών και του ριζικού τους συστήματος, ειδικά σε δύσκολες συνθήκες.

- Απωθητικές ούσες (Repellents)

Χρησιμοποιούνται για να απωθούν τους στόχους από τη γεύση ή τη μυρωδιά των φυτών.

- Τρωκτικοκτόνα (Rodenticides)

Χρησιμοποιούνται για να σκοτώνουν ή να αποτρέπουν τρωκτικά, όπως αρουραίους ή ποντίκια.

Τα φυτοφάρμακα ανάλογα με τον τρόπο δράσης τους, δηλαδή ανάλογα με τη συμπεριφορά τους ως προς τα φυτά στα οποία εφαρμόζονται διακρίνονται σε επιφανειακά, διεισδυτικά τοπικής δράσης, διασυστηματικά και εδάφους. Η πρόσληψη των φυτοφαρμάκων μπορεί να γίνει από τις ρίζες, τα φύλλα ή το βλαστό του φυτού. Η κίνηση των φυτοφαρμάκων μέσα στο φυτό μπορεί να είναι αποπ्लाστική (προς τα επάνω), συμπλαστική (προς τα κάτω) ή ακόμα να μην κινούνται καθόλου [10]. Πιο συγκεκριμένα:

- Επιφανειακά ή επαφής

Εφαρμόζονται επάνω στο φυτό, δρουν στο σημείο επαφής χωρίς όμως να εισχωρούν στο εσωτερικό του.

- Διεισδυτικά, τοπικής δράσης

Δρουν εντός των ιστών των φυτών αλλά δε διακινούνται με τους χυμούς τους.

- Διασυστηματικά

Εφαρμόζονται στο φυτό ή στο έδαφος, εισέρχονται μέσα στο φυτικό ιστό, κυκλοφορούν και διασπείρονται στο φύλλωμα, ενώ πριν απορροφηθούν από το φυτό κάποια από αυτά δρουν και ως επαφής.

Επίσης, με βάση τη δραστική ουσία που περιέχουν, ανάλογα δηλαδή με την χημική τους δομή, τα φυτοφάρμακα μπορούν να ταξινομηθούν σε διάφορες χημικές ομάδες. Η κατηγοριοποίηση αυτού του είδους είναι ιδιαίτερα σημαντική, επειδή οι λειτουργικές ομάδες αποτελούν δείκτες των φυσικοχημικών ιδιοτήτων του κάθε φυτοφαρμάκου. Οι βασικότερες είναι [4]:

- χλωριωμένοι υδρογονάνθρακες (chlorinated hydrocarbons)
- οργανοφωσφορικοί εστέρες (OP-esters)
- καρβαμιδικά οξέα και οι εστέρες τους (carbamates acids and their esters)
- τριαζίνες, χλωρο- και αμινο- τριαζινών (triazines, chloro-, amino- triazines derivatives)
- ενώσεις της ομάδας των ουριών (urea derivatives)
- φαίνοξυ–οξέα (phenoxies)
- βενζοϊκά οξέα (benzoic acids)
- φαινυλουρίες (phenylureas)
- χλωροακεταμίδια και ανιλίδια (chloroacetamides/ anilides and derivatives)
- (δι)νιτρο–ανιλίνες (dinitroanilines)
- θειοκαρβαμικοί εστέρες (thiocarbamates)
- διπυριδύλια (bipyridyl)
- πυρεθροειδή και οι φυσικές πυρεθρίνες (pyrethroids)
- φερομόνες (pheromones)
- αζόλες (azoles)
- φθαλιμιδικά (phthalimides)
- νικοτινοειδή (nicotinoids)
- ανόργανα άλατα των μετάλλων As, Zn, Cu

Συμπληρωματικά, τα φυτοφάρμακα έχουν κάποιους επιπλέον τρόπους ταξινόμησης, όπως το φάσμα δραστηριοτήτων τους, τον τρόπο και το χρόνο εφαρμογής τους και την τοξική τους δράση. Σύμφωνα με το φάσμα δραστηριοτήτων τους, κατατάσσονται σε δύο ομάδες, τα εκλεκτικά και τα καθολικά φυτοφάρμακα. Τα εκλεκτικά μπορούν να δρουν επιλεκτικά και να παρεμποδίζουν ή να μειώνουν την ανάπτυξη συγκεκριμένης καλλιέργειας χωρίς να βλάπτουν άλλα φυτά ή μικροοργανισμούς, ενώ αντίθετα τα μη εκλεκτικά δρουν αδιακρίτως, έχοντας δυσμενείς επιδράσεις και σε οργανισμούς και φυτά

μη στόχους. Ανάλογα με τον τρόπο και το χρόνο εφαρμογής τους, τα φυτοφάρμακα διακρίνονται σε προφυτευτικά, προφυτρωτικά και μεταφυτρωτικά. Συγκεκριμένα, τα προφυτευτικά εφαρμόζονται στο έδαφος πριν τη σπορά ή φύτευση, τα προφυτρωτικά εφαρμόζονται στον αγρό πριν την έναρξη της φύτρωσης, και τα μεταφυτρωτικά εφαρμόζονται στα φυτά μετά την εκβλάστηση. Η τοξική δράση των φυτοπροστατευτικών ενώσεων πάνω στα φυτά ποικίλει. Συνηθέστερα, δρουν στις φωτοχημικές διεργασίες, ως αναστολείς της φωτοσύνθεσης, αναστολείς των διεργασιών του μεταβολισμού, ή επηρεάζοντας τη διαίρεση και την αύξηση των κυττάρων. Ανάλογα με την επικινδυνότητα για την ανθρώπινη υγεία, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (World Health Organization, WHO) διαμόρφωσε ένα σύστημα ταξινόμησης των φυτοφαρμάκων σε 5 κατηγορίες: Class Ia: εξαιρετικά επικίνδυνα, Class Ib: υψηλής επικινδυνότητας, Class II: μέτριας επικινδυνότητας, Class III: μικρής επικινδυνότητας και Class IV: προϊόντα που είναι απίθανο να παρουσιάσουν κίνδυνο όταν χρησιμοποιούνται κανονικά [10].

2.4 Χημική σύσταση και περιγραφή φυτοπροστατευτικών προϊόντων

Κάθε φυτοπροστατευτικό προϊόν περιέχει την δραστική ουσία, δηλαδή το καθαρό δρών συστατικό, η οποία είναι υπεύθυνη για τη δράση του και δίνει στο προϊόν την ιδιότητα να αντιμετωπίζει κάποιο συγκεκριμένο οργανισμό στόχο, δηλαδή κάποιο συγκεκριμένο φυτικό εχθρό ή ασθένεια. Ωστόσο, πρέπει να είναι όσον το δυνατόν λιγότερο τοξική για τους οργανισμούς μη στόχους, να είναι αποτελεσματική σε χαμηλές συγκεντρώσεις, να αποδομείται εύκολα προς μη τοξικά παράγωγα σε ασφαλές χρονικό διάστημα και να μην αφήνει τοξικά υπολείμματα στα γεωργικά προϊόντα, τουλάχιστον σε συγκεντρώσεις επικίνδυνες για τον άνθρωπο και τα ζώα. Η δραστική ουσία μπορεί να είναι φυσική ή συνθετική χημική ένωση ή κάποιος βιολογικός παράγοντας, στην περίπτωση των βιολογικών σκευασμάτων. Σπάνια χρησιμοποιείται αυτούσια, αλλά αναμιγνύεται και επεξεργάζεται με τις βοηθητικές ουσίες ώστε να προκύψει η τελική μορφή του σκευάσματος.

Οι υπόλοιπες ουσίες ενός φυτοπροστατευτικού προϊόντος ονομάζονται βοηθητικές ουσίες του σκευάσματος και είναι ουσίες που δρουν είτε ως διαλύτες της δραστικής ουσίας, είτε χρειάζονται να προστεθούν για τη σταθερότητα του σκευάσματος είτε προστίθεται ως διαβρεκτικά ή προσκολλητικά για την αποτελεσματικότερη δημιουργία των σταγονιδίων ψεκασμού. Τέτοιες ουσίες είναι κυρίως επιφανειοδραστικές ενώσεις και άλλοι βοηθητικοί παράγοντες, ανάλογα με τα χαρακτηριστικά της δραστικής ουσίας και τις επιζητούμενες

φυσικοχημικές ιδιότητες του τελικού προϊόντος. Μερικές από τις βασικές βοηθητικές ουσίες (adjuvants) είναι [18]:

- Επιφανειοδραστικές ενώσεις

Μπορεί να είναι σε ιοντική ή μη ιοντική μορφή, και έχουν την ιδιότητα να επηρεάζουν την επιφανειακή τάση που αναπτύσσεται στη μεσοεπιφάνεια διφασικών συστημάτων.

- Προσκολλητικοί παράγοντες

Ουσίες που βοηθούν στην προσκόλληση των σταγονιδίων του ψεκαστικού υγρού ή των στερεών τεμαχιδίων των σκονών επίπασης στις φυτικές επιφάνειες, ώστε να μην ξεπλένονται εύκολα με τη βροχή, ή να παρασύρονται από τον αέρα

- Γαλακτωματοποιητικοί παράγοντες ή γαλακτωματοποιητές

Ουσίες που διευκολύνουν τη διασπορά ελαιωδών ουσιών στο νερό, με αποτέλεσμα το σχηματισμό γαλακτώματος, το οποίο έχει καλές διαβρεκτικές ιδιότητες.

- Διασπορικές ουσίες

Χρησιμοποιούνται στην παρασκευή των βρέξιμων σκονών και μειώνουν τις δυνάμεις συνοχής που αναπτύσσονται μεταξύ στερεών τεμαχιδίων, κατά τη διασπορά της κόνης μέσα σε υγρό μέσο.

Η διαδικασία παρασκευής των σκευασμάτων λέγεται τυποποίηση (formulation) και με αυτή τη διαδικασία δημιουργείται η τελική μορφή με την οποία το φυτοπροστατευτικό προϊόν φτάνει στον τελικό καταναλωτή για χρήση [19]. Η τυποποίηση επιδιώκει [20]:

- Βελτίωση της βιολογικής δράσης της δραστικής ουσίας με στόχο τη γρήγορη και σταθερή δράση, τη μεγάλη διάρκεια και εκλεκτικότητα της δράσης, την πλήρη κάλυψη, την καλή διαβροχή και προσκόλληση και τη βαθμιαία έκλυση της δραστικής ουσίας.
- Βελτίωση της τεχνικής εφαρμογής με στόχο τη δυνατότητα εφαρμογής μη υδροδιαλυτών ή πτητικών ουσιών και την ευκολότερη και ασφαλέστερη εφαρμογής και διαχείριση των συσκευασιών των φυτοπροστατευτικών προϊόντων.
- Διασπορά μικρής ποσότητας δραστικής ουσίας σε μεγάλες εκτάσεις.
- Βελτίωση της σταθερότητας και ασφάλειας του προϊόντος κατά την αποθήκευση και μεταφορά.
- Βελτίωση των τοξικολογικών χαρακτηριστικών της δραστικής ουσίας με στόχο τη μείωση της οξείας τοξικότητας, την αποφυγή ερεθισμών και την ασφάλεια του χρήστη γενικότερα.

- Μείωση των περιβαλλοντικών επιπτώσεων με τη μείωση της διαφυγής της δραστικής ουσίας λόγω εξάτμισης και αερομεταφοράς και τη μείωση της κίνησης στο έδαφος και της ρύπανσης των υπόγειων και επιφανειακών υδάτων.

2.5 Μεταβολίτες και προϊόντα μετασχηματισμού φυτοφαρμάκων

Μετά την απελευθέρωση των φυτοφαρμάκων στο περιβάλλον, ακολουθεί μια σειρά αλληλοεξαρτώμενων διαδικασιών που ονομάζεται χημειοδυναμική των φυτοφαρμάκων. Οι φυσικοχημικές ιδιότητες του φυτοφαρμάκου και οι περιβαλλοντικές παράμετροι όπως το pH, η θερμοκρασία, η υγρασία, η βροχόπτωση, η αλατότητα, η ένταση του φωτός και η τοπογραφία είναι αυτοί που καθορίζουν τις διαδικασίες. Τα φυτοφάρμακα, μετά την εφαρμογή τους, είναι δυνατό να διασπαστούν μέσω διάφορων αβιοτικών ή και βιοτικών διεργασιών σε χημικές ενώσεις, με μικρότερο μοριακό βάρος, διαφορετική τοξικότητα και διαφορετική περιβαλλοντική συμπεριφορά από την αρχική ένωση. Οι διεργασίες που λαμβάνουν χώρα μπορεί να οφείλονται τόσο σε μεταβολικές αντιδράσεις, όσο και σε χημικές διεργασίες. Στην πρώτη περίπτωση προκύπτουν οι λεγόμενοι μεταβολίτες, ενώ στη δεύτερη περίπτωση παράγονται τα προϊόντα διάσπασης ή μετασχηματισμού [10].

Πολλές φορές ο όρος μεταβολίτης χρησιμοποιείται για να περιγράψει οποιοδήποτε παράγωγο διάσπασης της αρχικής χημικής ένωσης, το οποίο σχηματίζεται αμέσως μετά την χρήση της. Ένας μεταβολίτης θεωρείται ότι έχει περιβαλλοντική σημασία όταν υπάρχουν αρκετά στοιχεία που να αποδεικνύουν ότι αν ο άνθρωπος εκτεθεί στα μέγιστα επίπεδα αυτού, μπορεί να προκληθούν αρνητικές επιδράσεις στον ίδιο ή στις μελλοντικές γενιές ή να θέσει σε κίνδυνο την επιβίωση ή ανάπτυξη των ειδών του ζωικού βασιλείου [4].

Συνήθως, τα προϊόντα διάσπασης ή μετασχηματισμού των φυτοφαρμάκων εμφανίζουν χαμηλότερη τοξικότητα σε σχέση με τις αρχικές ενώσεις από τις οποίες προέρχονται. Υπάρχουν όμως και περιπτώσεις που μπορεί να είναι πιο τοξικά. Σε αυτή την περίπτωση, η επικινδυνότητα για το περιβάλλον είναι μεγαλύτερη από αυτή που προκαλείται από τις αρχικές ενώσεις. Αξίζει να αναφερθεί ότι τα προϊόντα μετασχηματισμού ενός φυτοφαρμάκου μπορεί να εμφανίζουν μεγαλύτερη υπολειμματική δράση και κινητικότητα, ώστε τελικά να επιδρούν αρνητικά στο περιβάλλον, σε σχέση με τη μητρική ένωση [21]. Οι πιθανές αιτίες για να είναι ένα προϊόν διάσπασης εξίσου ή περισσότερο τοξικό από την μητρική ένωση είναι οι εξής [22]:

α. Η δραστική ομάδα της μητρικής ένωσης να υπάρχει ακόμα στο προϊόν μετατροπής, εμφανίζοντας τον ίδιο μηχανισμό τοξικότητας με την μητρική ένωση.

β. Ο συντελεστής βιοσυγκέντρωσης του προϊόντος διάσπασης να είναι μεγαλύτερος από αυτόν της μητρικής ένωσης και συνεπώς προσεγγίζει περισσότερο το σημείο δράσης.

γ. Το προϊόν μετασχηματισμού να είναι το δραστικό στοιχείο ενός προ-φυτοφαρμάκου, στο οποίο η εφαρμοζόμενη ένωση έχει σχεδιαστεί να απορροφάται και στη συνέχεια να μεταβολίζεται σε μια δραστική ένωση που επιφέρει την επιθυμητή επίδραση.

δ. Ο μετασχηματισμός καταλήγει σε ένα προϊόν με διαφορετικό και περισσότερο ικανό τρόπο δράσης από τη μητρική ένωση.

Παρόλο που ο προσδιορισμός των μεταβολιτών και των προϊόντων μετατροπής των φυτοφαρμάκων είναι πολύ σημαντικός, παραμένει δύσκολος και περίπλοκος, εξαιτίας της έλλειψης διαθεσιμότητας υλικών αναφοράς για τις περισσότερες ενώσεις. Στην Ευρώπη, σύμφωνα με το ισχύον νομοθετικό πλαίσιο, θα πρέπει να παρέχονται δεδομένα για όλους τους μεταβολίτες και τα προϊόντα διάσπασης ή μετασχηματισμού. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με τον ορισμό της οδηγίας της ΕΕ ως «κατάλοιπα ή υπολείμματα φυτοφαρμάκων» ορίζονται τα κατάλοιπα, συμπεριλαμβανομένων των δραστικών ουσιών, των μεταβολιτών ή/και των προϊόντων αποδόμησης ή αντίδρασης δραστικών ουσιών που χρησιμοποιούνται ή έχουν χρησιμοποιηθεί σε φυτοπροστατευτικά προϊόντα, ή υπάρχουν εντός των προϊόντων που περιλαμβάνονται στο παράρτημα Ι του κανονισμού, συμπεριλαμβανομένων ιδίως εκείνων, τα οποία ενδέχεται να προκύψουν από τη χρήση τους στη φυτοπροστασία, στην κτηνιατρική και ως βιοκτόνων [23].

Η υπολειμματική δράση είναι η χρονική διάρκεια που παραμένει δραστικό ένα φυτοπροστατευτικό προϊόν στο έδαφος και εξαρτάται από την αρχική δόση και την ταχύτητα απομάκρυνσης από το έδαφος. Η απομάκρυνση του από το έδαφος επιτυγχάνεται είτε μέσω της φυσικής οδού (εξάτμιση, απορρόφηση από τις ρίζες, προσρόφηση, έκπλυση στα βαθύτερα στρώματα), είτε μέσω της μικροβιακής, χημικής και φωτοχημικής διάσπασης. Η διαφορά της υπολειμματικής διάρκειας από την υπολειμματική δράση (residual activity) έγκειται στο ότι η δεύτερη αναφέρεται στο χρόνο που παραμένει το φυτοπροστατευτικό προϊόν στο έδαφος σε συγκεντρώσεις που είναι αποτελεσματικές εναντίον των εχθρών-στόχων. Οι κυριότεροι παράγοντες από τους οποίους επηρεάζεται η υπολειμματική διάρκεια ενός φυτοπροστατευτικού προϊόντος στο έδαφος εξαρτάται από πολλούς παράγοντες σχετικά με το σύστημα «κλίμα - έδαφος - φυτό - φυτοπροστατευτικό προϊόν». Η υπολειμματική αυτή δράση ενός φυτοφαρμάκου σχετίζεται με πολλούς παράγοντες, όπως το πόσο εύκολα αποδομείται, τον τρόπο εφαρμογής του, τη χημική σύσταση, από το είδος του σκευάσματος και τις εδαφοκλιματικές συνθήκες που επικρατούν τη δεδομένη χρονική στιγμή και επηρεάζουν

τη δράση του. Μεγάλη υπολειμματική δράση σημαίνει αποτελεσματικότερη αντιμετώπιση του οργανισμού-στόχου και έτσι αποφεύγονται υπερβολικές επεμβάσεις. Σε ορισμένες περιπτώσεις όμως, η μεγάλη υπολειμματική δράση ενός φυτοφαρμάκου αποτελεί κίνδυνο για το περιβάλλον και τη δημόσια υγεία. Φυτοπροστατευτικά προϊόντα με μεγάλο χρόνο ημιζωής, θεωρούνται αυτά που δεν αποδομούνται στο περιβάλλον και όταν εισέρχονται στην τροφική αλυσίδα, υφίσταται βιομεγένθυση, δηλαδή σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσης στο τελευταίο κρίκο της τροφικής αλυσίδας [24].

2.6 Οφέλη και κίνδυνοι από τη χρήση φυτοπροστατευτικών προϊόντων

Σε παγκόσμια κλίμακα, η απόδοση των καλλιεργειών απειλείται από περίπου 50000 είδη παθογόνων των φυτών, 9000 είδη εντόμων και ακάρεων και 8000 είδη ζιζανίων, ενώ σε περίπτωση μη εφαρμογής φυτοφαρμάκων, η απώλεια στην παραγωγή λαχανικών, φρούτων και σιτηρών, αναμένεται να φτάσει το 54%, 78% και 32% αντίστοιχα. Είναι γνωστό ότι τις τελευταίες δεκαετίες, οι παραγωγοί αγροτικών προϊόντων πέτυχαν σημαντική πρόοδο στην παραγωγή τροφίμων με τη χρήση φυτοφαρμάκων. Τα κύρια οφέλη από τη χρήση των φυτοφαρμάκων, πέρα από την άμεση επίδρασή τους, είναι η βελτίωση της απόδοσης των καλλιεργειών και η διασφάλιση της ποιότητας των γεωργικών προϊόντων [25].

Η αύξηση της παραγωγικότητας οφείλεται σε διάφορους παράγοντες, όπως είναι η χρήση λιπασμάτων, οι καλύτερες ποικιλίες καθώς και η χρήση μηχανημάτων. Τα φυτοφάρμακα αποτελούν αναπόσπαστο μέρος της διαδικασίας, ελαχιστοποιώντας τον απαιτούμενο χρόνο εργασίας για τις καλλιέργειες και ελαττώνοντας τις απώλειες από τα ζιζάνια, τις ασθένειες και τα παράσιτα των εντόμων, που μπορούν να μειώσουν σημαντικά την ποσότητα των γεωργικών προϊόντων. Συνεπώς, είναι δυνατή η αποφυγή των διακυμάνσεων της ετήσιας απόδοσης και η εξασφάλιση της διαθεσιμότητας τροφίμων σε λογικές τιμές, καθώς και σε όλες τις εποχές [26].

Σε ορισμένες περιπτώσεις, τα φυτοφάρμακα θα μπορούσαν να λειτουργήσουν και για την προστασία τη δημόσιας υγείας. Μια τέτοια περίπτωση είναι η εφαρμογή φυτοπροστατευτικών προϊόντων, και συγκεκριμένα εντομοκτόνων, για τον έλεγχο των κουνουπιών, τα οποία δρουν ως φορείς διάφορων ασθενειών, όπως για παράδειγμα της ελονοσίας [26]. Τέλος, η βιομηχανία φυτοπροστατευτικών προϊόντων αποτελεί ένα βασικό οικονομικό παράγοντα στην παγκόσμια αγορά [27].

Όμως, η μη ορθή χρήση των φυτοφαρμάκων εγείρει περιβαλλοντικές ανησυχίες καθώς αποδεδειγμένα προκαλεί αρνητικές επιπτώσεις. Ειδικότερα, ορισμένες από αυτές είναι η ρύπανση του εδάφους, των επιφανειακών και υπογείων νερών, ο περιορισμός της βιοποικιλότητας, αλλά και η αύξηση του κινδύνου για την ανθρώπινη υγεία. Σύμφωνα με τον ορισμό της GESAMP (Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Pollution) με τον όρο ρύπανση ορίζεται «η άμεση ή έμμεση εισαγωγή, από τον άνθρωπο ουσιών και ενέργειας που έχουν ή θα μπορούσαν να έχουν επιβλαβή δράση στο φυσικό περιβάλλον». Η έκθεση στα φυτοφάρμακα μπορεί να είναι είτε άμεση, είτε έμμεση, μέσω δηλαδή των υπολειμμάτων τους στα τρόφιμα και το νερό [28].

Το μέγεθος των επιπτώσεων εξαρτάται τόσο από την εγγενή τοξικότητα του φυτοφαρμάκου όσο και από το βαθμό ευαισθησίας των οργανισμών που εκτίθενται σε αυτό. Ιδανικά, ένα φυτοπροστατευτικό προϊόν πρέπει να έχει δράση μόνο εναντίον του παράσιτου-στόχου, χωρίς καμία επίδραση στους οργανισμούς μη-στόχους, συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου και της μη στοχευόμενης βλάστησης. Δυστυχώς, αυτό δεν γίνεται πάντα καθώς, έχει υπολογιστεί ότι πάνω από το 98% των ψεκαζόμενων εντομοκτόνων και πάνω από το 95% των ζιζανιοκτόνων, δε φτάνουν τον οργανισμό-στόχο και καταλήγουν να αποτίθενται στην ατμόσφαιρα, το νερό και το έδαφος [25].

Δεν υπάρχει αμφιβολία ότι η χρήση των φυτοφαρμάκων αυξάνει τους πιθανούς κινδύνους για τον άνθρωπο καθώς επίσης μπορεί να προσβάλλουν και άλλες μορφές ζωής. Οι κίνδυνοι για την υγεία του ανθρώπου από τα γεωργικά φάρμακα μπορεί να εμφανιστούν μέσω άμεσης (εισπνοή, κατάποση, δερματική διείσδυση) και έμμεσης έκθεσης και η εμφάνιση τοξικών εκδηλώσεων στον οργανισμό μπορεί να είναι οξεία ή χρόνια. Τα συμπτώματα από την έκθεση σε φυτοφάρμακα μπορεί να είναι σχετικά ήπια, όπως απλός ερεθισμός του δέρματος και των ματιών, αλλά και πολύ πιο σοβαρά, όπως νευρολογικές διαταραχές και ενδοκρινικές επιδράσεις που μπορεί να επηρεάζουν την αναπαραγωγική ικανότητα και να έχουν καρκινογόνο δράση. Συνεπώς, σε Ευρωπαϊκό επίπεδο, για την έγκριση της κυκλοφορίας γεωργικών φαρμάκων στην αγορά, απαιτούνται δεδομένα σχετικά με τις πιθανές αρνητικές επιπτώσεις των δραστικών ενώσεων των φυτοφαρμάκων στην ανθρώπινη υγεία [29].

Επιπλέον, η απελευθέρωση υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων στα διάφορα περιβαλλοντικά υποστρώματα, μπορεί να οδηγήσει σε δυσμενείς επιπτώσεις και σε οργανισμούς μη-στόχους όλων των τροφικών επιπέδων, όπως χαρακτηριστικά είναι οι μικροοργανισμοί του εδάφους, αρθρόποδα, υδρόβιοι οργανισμοί και θηλαστικά ή πτηνά. Τέλος, λόγω κακής εφαρμογής ή μη ευνοούμενων περιβαλλοντικών συνθηκών, τα

φυτοπροστατευτικά προϊόντα είναι πιθανό να προκαλέσουν βλάβη στην καλλιέργεια στην οποία εφαρμόζονται [29, 30].

2.7 Νομοθετικό πλαίσιο για τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα

Στο παρελθόν, ήταν λίγες οι χώρες που είχαν νομοθεσία σχετική με τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα, όμως οι αρνητικές επιπτώσεις που παρατηρήθηκαν από την ανεξέλεγκτη χρήση τους είχε σαν αποτέλεσμα τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα να ελέγχονται πλέον από νομοθεσίες. Σήμερα, στις περισσότερες ανεπτυγμένες χώρες, οι πωλήσεις και η εφαρμογή των φυτοφαρμάκων ελέγχονται αυστηρά, λόγω της ευρείας χρήσης τους και της δυνητικής επικινδυνότητας τους για την υγεία του ανθρώπου και το περιβάλλον. Οι κανονισμοί που αφορούν την εμπορία και χρήση των φυτοφαρμάκων έχουν γίνει πιο αυστηροί και περίπλοκοι, με αποτέλεσμα η βιομηχανία των φυτοφαρμάκων να διέπεται από πολλές κοινοτικές, εθνικές και διεθνείς οδηγίες.

Στην Ελλάδα ο πρώτος νόμος σχετικά με τον έλεγχο της χρήσης των φυτοφαρμάκων κατατέθηκε το 1977 (Νόμος 721/77), ο οποίος περιλάμβανε τον ορισμό της έννοιας του φυτοφαρμάκου και όριζε τις απαιτήσεις που απαιτείται να πληροί, ώστε να καθίσταται δυνατή η κυκλοφορία του στο εμπόριο [31].

Πριν το 1991, τα κράτη μέλη της Ευρωπαϊκής Ένωσης λειτουργούσαν αυτόνομα στην επιβολή κανόνων για την κυκλοφορία και χρήση των φυτοφαρμάκων. Ωστόσο, η επιμέρους εθνική νομοθεσία αντικαταστάθηκε το 1991, με την Οδηγία 91/414/ΕΟΚ και όπως διατυπώθηκε, η Ευρωπαϊκή Επιτροπή προχώρησε σε έλεγχο, σε όλες τις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης, όλων των δραστικών ουσιών που χρησιμοποιούνται στα προϊόντα φυτοπροστασίας. Σε αυτή τη διαδικασία αναθεώρησης, κάθε ουσία έπρεπε να εκτιμηθεί σε σχέση με το αν θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί με ασφάλεια ως προς την ανθρώπινη υγεία και το περιβάλλον, ιδίως στα υπόγεια ύδατα και τους μη στοχευμένους οργανισμούς, όπως πτηνά, θηλαστικά, γαιοσκώληκες και μέλισσες. Έκτοτε, η Ευρωπαϊκή Ένωση έχει υιοθετήσει ενιαία στρατηγική για να εξασφαλίσει τη βιώσιμη και αειφόρο χρήση των φυτοπροστατευτικών ενώσεων και απαιτεί αυτά να είναι αποτελεσματικά, χωρίς επιβλαβείς επιπτώσεις [31].

Θεμέλιο για την εκτίμηση, την παρακολούθηση και τη διαχείριση της οικολογικής και χημικής κατάστασης όλων των επιφανειακών και υπόγειων υδάτων αποτέλεσε η οδηγία 2000/60/ΕΚ, γνωστή και ως οδηγία πλαίσιο για τα νερά. Έτσι, η Ευρωπαϊκή Ένωση έθεσε νομικά όρια για

τις διαφορετικές παραμέτρους του νερού, το οποίο πρόκειται να χρησιμοποιηθεί προς ανθρώπινη κατανάλωση, με σκοπό την προστασία της ανθρώπινης υγείας. Ένας από τους γενικότερους κανόνες που θεσπίστηκαν θέτει ως όριο την τιμή 0,1 mg/L όσον αφορά μεμονωμένα φυτοφάρμακα, ενώ όταν πρόκειται για το άθροισμα των ανιχνευθέντων φυτοφαρμάκων η τιμή αυτή ορίζεται στα 0,5 mg/L [31]. Η παραπάνω οδηγία έχει τροποποιηθεί από την 2013/39/EK, η οποία θέτει όρια για 45 διαφορετικές ενώσεις σε ηπειρωτικά υδάτινα σώματα και σε επιφανειακά, μεταβατικά, παράκτια και υπόγεια νερά [4].

Με την ψήφιση του «νομοθετικού πακέτου για τα φυτοφάρμακα», η κοινή Ευρωπαϊκή Νομοθεσία άλλαξε ολοκληρωτικά. Πιο αναλυτικά, θεσπίστηκαν και δημοσιεύτηκαν τέσσερα νομοθετήματα που περιλαμβάνουν νέες διαδικασίες για την άδεια κυκλοφορίας των φυτοφαρμάκων, νέο πλαίσιο για τη βιώσιμη χρήση τους, νέα προσέγγιση στις στατιστικές μελέτες και νέους κανόνες για τον εξοπλισμό με τον οποίο εφαρμόζονται. Η νομοθεσία αυτή βασίζεται στην «αρχή της προφύλαξης» και καλύπτει όλες τις πτυχές που μπορεί να επηρεάσουν το περιβάλλον και τον καταναλωτή. Πριν την κυκλοφορία του φυτοφαρμάκου, απαιτούνται έγκυρα αποδεικτικά στοιχεία σχετικά με την ασφάλεια, κατάλληλη επισήμανση, και ορίζονται μέγιστα ανώτατα όρια υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων στα τρόφιμα. Επίσης, εφαρμόζεται η αρχή της Ορθής Γεωργικής Πρακτικής (Good Agricultural Practice) που ορίζεται ως «η σε εθνικό επίπεδο συνιστώμενη, εγκεκριμένη ή καταχωρισμένη ασφαλής χρήση φυτοπροστατευτικών προϊόντων υπό πραγματικές συνθήκες σε οποιοδήποτε στάδιο της παραγωγής, της αποθήκευσης, της μεταφοράς, της διανομής και της μεταποίησης τροφίμων και ζωοτροφών και διέπεται από την οδηγία 2009/128/EK» [4].

Άλλοι διεθνείς οργανισμοί, που ασχολούνται με την ορθή χρήση των φυτοφαρμάκων, είναι οι ακόλουθοι [4]:

1. Ο Οργανισμός Οικονομικής Συνεργασίας και Ανάπτυξης (ΟΟΣΑ), ο οποίος με το Πρόγραμμα για τα Φυτοφάρμακα (Pesticides Programme of the OECD) συμβάλλει στη συνεργασία μεταξύ των κυβερνήσεων και ενισχύει την προσπάθειά τους για την εκτίμηση και τη μείωση των κινδύνων από τη χρήση των φυτοφαρμάκων.
2. Ο Διεθνής Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας (Food Agricultural Organization, FAO) έχοντας εκδώσει το «Διεθνή Κώδικα Δεοντολογίας για τη διανομή και χρήση των φυτοφαρμάκων» (International Code of Conduct on the Distribution and Use of Pesticides) και προάγοντας την ανταλλαγή πληροφοριών και καλύτερων πρακτικών.

3. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (World Health Organization, WHO), ο οποίος ασχολείται με τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα στο «Διεθνές Πρόγραμμα για την ασφάλεια των χημικών ουσιών» (International Programme on Chemical Safety) και διαχειρίζεται το «Σύστημα Αξιολόγησης των φυτοφαρμάκων» (Pesticides Evaluation Scheme).
4. Η συνεργασία των FAO και WHO για τη διοργάνωση κοινής συνάντησης με σκοπό τη συνεργασία των ειδικών σε παγκόσμιο επίπεδο, σχετικά με τα υπολείμματα των φυτοφαρμάκων.

ΕΠΙΛΟΓΗ ΕΝΩΣΕΩΝ

3.1 Επιλεγμένες φυτοπροστατευτικές ενώσεις

Στην παρούσα εργασία, οι φυτοπροστατευτικές ενώσεις που επιλέχθηκαν καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα δράσης σε καλλιέργειες σε όλη την Ελλάδα και εν γένει στην Ευρώπη. Οι επιλεγμένες ενώσεις είναι στην πλειοψηφία τους εγκεκριμένες και είναι πιθανή η ανίχνευσή τους σε ίχνη στο έδαφος, σε ιζήματα αλλά και σε επιφανειακά ύδατα. Επιπλέον, συμπεριλήφθηκαν και ενώσεις οι οποίες δεν κατέχουν πλέον άδεια κυκλοφορίας στην Ελλάδα, καθώς συχνά αναφέρονται κρούσματα μη σύννομης και ορθής χρήσης τους. Επίσης, καταγράφηκαν οι φυσικοχημικές ιδιότητες των υπό μελέτη ενώσεων, ώστε η μέθοδος να καλύπτει ένα εύρος πολικότητας και οξεοβασικών ιδιοτήτων των ενώσεων. Στον Πίνακα 3.1 φαίνονται οι επιλεγμένες φυτοπροστατευτικές ενώσεις, ο αριθμός CAS, η χημική δομή, ο μοριακός τύπος, το μοριακό βάρος τους, καθώς και ορισμένες φυσικοχημικές τους ιδιότητες.

3.1.1 Επιλεγμένα εντομοκτόνα

Το A-Cypermethrin είναι ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο πυρεθροειδές εντομοκτόνο επαφής και στομάχου για την καταπολέμηση του δάκου της ελιάς, που έχει εγκριθεί για χρήση στην ΕΕ. Δρα στο νευρικό σύστημα των εντόμων παρεμποδίζοντας το κλείσιμο των διαύλων Na^+ στους νευροάξονες των νευρικών κυττάρων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα μια συνεχή νευρομυϊκή μεταφορά μηνυμάτων, που οδηγεί σε υπερδιέγερση, παράλυση και θάνατο των εντόμων.

Το Acetamiprid είναι διασυστηματικό εντομοκτόνο επαφής και στομάχου της ομάδας των νεονικοτινοειδών με ευρύ φάσμα δράσης εναντίον κυρίως μυζητικών εντόμων. Δρα δεσμεύοντας τους μετασυναπτικούς (νικοτινικούς) υποδοχείς της ακετυλοχολίνης στο κεντρικό νευρικό σύστημα του εντόμου. Εγκρίθηκε για πρώτη φορά το 2011.

Το Buprofezin αποσύρθηκε από την ελληνική αγορά το 2008. Είναι εντομοκτόνο, που δρα ως παρεμποδιστής βιοσύνθεσης χιτίνης των εντόμων. Επιδρά δι' επαφής και στομάχου κατά των προνυμφών που βρίσκονται στην επιφάνεια των φύλλων. Δε σκοτώνει άμεσα αλλά εμποδίζει την εξέλιξη των προνυμφών έτσι που τελικά παύουν να δημιουργούνται νέα έντομα. Ακμαία που έχουν ψεκάστεί με το σκεύασμα γεννούν στείρα αυγά. Χρησιμοποιείται σε πολλές

καλλιέργειες για την καταπολέμηση του αλευρώδη και των κοκκοειδών είτε μόνο του είτε στα πλαίσια ολοκληρωμένης καταπολέμησης.

Το Carbaryl είναι καρβαμιδικό εντομοκτόνο επαφής και στομάχου με ορισμένες διασυστηματικές ιδιότητες. Καταπολεμά μασητικά και μυζητικά έντομα. Εμφανίζει χαμηλή υδατοδιαλυτότητα και είναι πτητικό. Είναι πολύ τοξικό για τα θηλαστικά, μέτρια τοξικό για τα πουλιά, τα ψάρια και τα φύκια αλλά λιγότερο τοξικό για τα υδρόβια φυτά και δεν αναμένεται να βιοσυσσωρεύεται. Αποσύρθηκε οριστικά από την ελληνική αγορά το 2007.

Το Cyromazine είναι διασυστηματικό εντομοκτόνο επαφής, το οποίο απορροφάται από τα φύλλα και τις ρίζες. Δρα ως ρυθμιστής ανάπτυξης των εντόμων για την καταπολέμηση των *Liriomyza* spp και *Phytomyza* sp σε θερμοκηπιακά λαχανικά και ανθοκομικά.

Το Diazinon είναι οργανοφωσφωρικό εντομοκτόνο επαφής, στομάχου και αναπνοής με ασθενή ακαρεοκτόνο δράση. Αποσύρθηκε από την ελληνική αγορά το 2007. Είναι μέτρια διαλυτό στο νερό και εξαιρετικά πτητικό. Εμφανίζει χαμηλό κίνδυνο έκπλυσης στα υπόγεια ύδατα, ωστόσο έχουν σημειωθεί περιστατικά ρύπανσης, που το καθιστούν πιθανό ρύπο υπογείων υδάτων. Θεωρείται τοξικό στους περισσότερους υδρόβιους οργανισμούς, μέλισσες και πουλιά, ενώ σε ανθρώπους και άλλα θηλαστικά είναι νευροτοξικό.

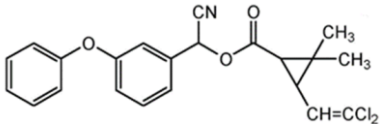
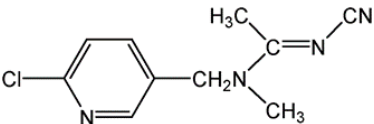
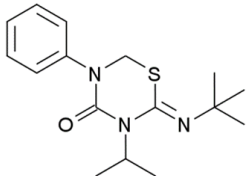
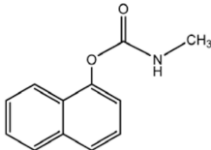
Το Ethiofencarb είναι καρβαμιδικό εντομοκτόνο, το οποίο εφαρμόζεται κυρίως σε φρούτα. λαχανικά, ζαχαρότευτλα, βαμβάκι, πατάτες και καπνό.

Το Fenthion είναι οργανοφωσφωρικό εντομοκτόνο επαφής και στομάχου για την καταπολέμηση μασητικών και μυζητικών εντόμων. Παρόλο που δεν είναι πλέον εγκεκριμένο για χρήση στην ΕΕ, στην Ελλάδα μπορεί να χρησιμοποιείται μόνο στην καλλιέργεια της ελιάς και μόνο με δολωματικές εφαρμογές από το έδαφος. Είναι πτητικό και εμφανίζει μικρή υδατοδιαλυτότητα, αλλά είναι γενικά εξαιρετικά διαλυτό σε οργανικούς διαλύτες.

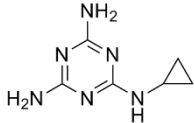
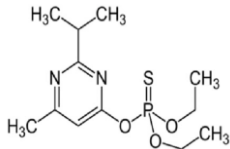
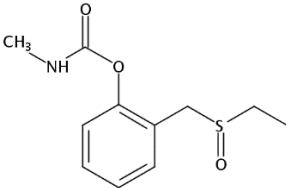
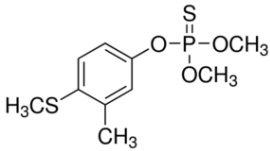
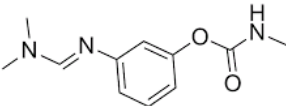
Το Formetanate είναι μη διασυστηματικό καρβαμιδικό εντομοκτόνο, με δράση επαφής και στομάχου, για την καταπολέμηση των θριπών., κυρίως σε καλλιέργειες φρούτων. Δρα στο νευρικό σύστημα των εντόμων ως παρεμποδιστής της ακετυλοχολινεστεράσης. Κυκλοφορεί στην αγορά με την εμπορική ονομασία Carzol.

Το Methomyl είναι διασυστηματικό καρβαμιδικό εντομοκτόνο επαφής και στομάχου για την καταπολέμηση μασητικών και μυζητικών εντόμων. Είναι ιδιαίτερα διαλυτό στο νερό αλλά έχει χαμηλή πτητικότητα. Από το 2008, έχει απαγορευτεί η χρήση του σε καλλιέργειες μαρουλιού, ενώ χρησιμοποιείται μέχρι σήμερα σε καλλιέργειες άλλων λαχανικών

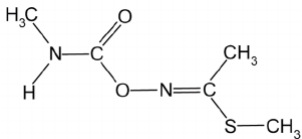
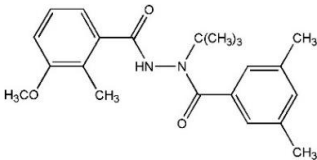
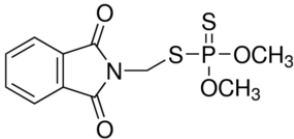
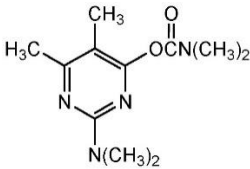
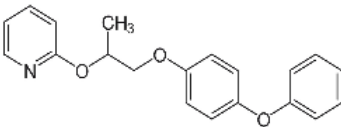
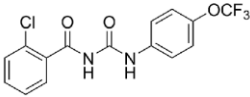
Πίνακας 3.1 Ιδιότητες επιλεγμένων φυτοπροστατευτικών ενώσεων.

Ένωση	Αριθμός CAS	Δομή ^[α]	Χημικός τύπος ^[β]	Μοριακό βάρος	pKa ^[β] (25°C)	pKow ^[β]	Τάση ατμών (mmHg)
Εντομοκτόνα							
A-Cypermethrin	67375-30-8		C ₂₂ H ₁₉ Cl ₂ NO ₃	416,30	-	5,80	1,73×10 ⁻⁵
Acetamiprid	35410-20-7		C ₁₀ H ₁₁ ClN ₄	222,68	0,70	0,80	4,4×10 ⁻⁵
Buprofezin ^[γ]	69327-76-0		C ₁₆ H ₂₃ N ₃ OS	305,44	6,70	4,93	9,4×10 ⁻⁶
Carbaryl ^[γ]	63-25-2		C ₁₂ H ₁₁ NO ₂	201,23	10,40	2,30	3,12×10 ⁻⁷

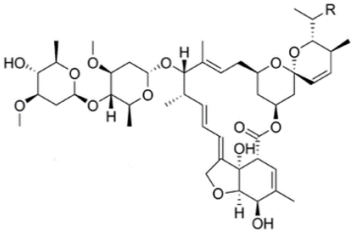
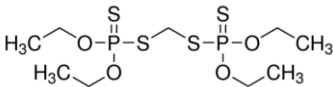
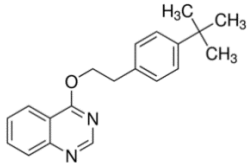
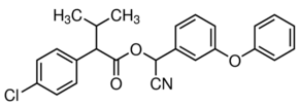
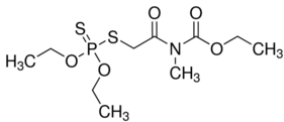
Πίνακας 3.1 (συνέχεια) *Ιδιότητες επιλεγμένων φυτοπροστατευτικών ενώσεων.*

Ένωση	Αριθμός CAS	Δομή ^[α]	Χημικός τύπος ^[β]	Μοριακό βάρος	pKa ^[β] (25°C)	pKow ^[β]	Τάση ατμών (mmHg)
Cyromazine	66215-27-8		C ₆ H ₁₀ N ₆	166,18	5,22	0,069	3,36×10 ⁻⁹
Diazinon ^[γ]	333-41-5		C ₁₂ H ₂₁ N ₂ O ₃ PS	304,35	2,60	3,69	8,98×10 ⁻⁵
Ethiofencarb	29973-13-5		C ₁₁ H ₁₅ NO ₂ S	225,31	-	2,04	7,1×10 ⁻⁶
Fenthion	55-38-9		C ₁₀ H ₁₅ O ₃ PS ₂	278,33	-	4,84	2,8×10 ⁻⁶
Formetanate	22259-30-9		C ₁₁ H ₁₅ N ₃ O ₂	221,26	8,10	-0,0014	-

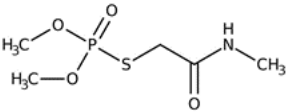
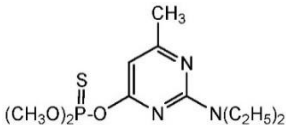
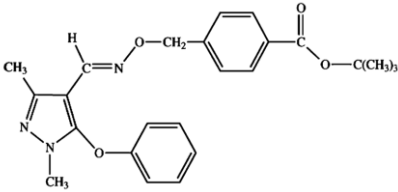
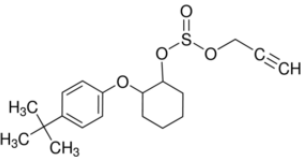
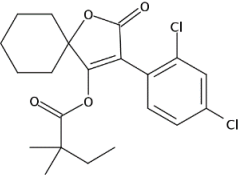
Πίνακας 3.1 (συνέχεια) *Ιδιότητες επιλεγμένων φυτοπροστατευτικών ενώσεων.*

Ένωση	Αριθμός CAS	Δομή ^[α]	Χημικός τύπος ^[β]	Μοριακό βάρος	pKa ^[β] (25°C)	pKow ^[β]	Τάση ατμών (mmHg)
Methomyl	16752-77-5		C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₂ S	162,21	-	0,09	5,4×10 ⁻⁶
Methoxyfenozide	161050-58-4		C ₂₂ H ₂₈ N ₂ O ₃	368,47	12,20	3,72	3,5×10 ⁻¹¹
Phosmet	732-11-6		₁₁ H ₁₂ NO ₄ PS ₂	317,33	-	2,80	4,9×10 ⁻⁷
Pirimicarb	23103-98-2		C ₁₁ H ₁₈ N ₄ O ₂	238,39	4,40	1,70	7,28×10 ⁻⁶
Pyriproxyfen	95737-68-1		C ₂₀ H ₁₉ NO ₃	321,37	6,87	5,37	9,8×10 ⁻⁸
Triflumuron ^[γ]	64628-44-0		C ₁₅ H ₁₀ ClF ₃ N ₂ O ₃	358,70	-	4,90	1,5×10 ⁻⁹

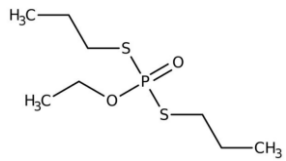
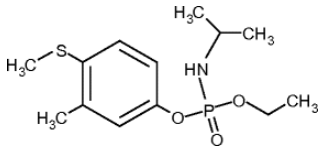
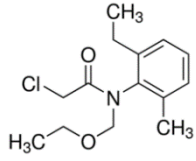
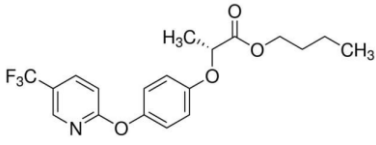
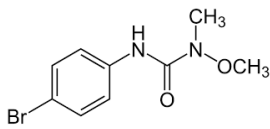
Πίνακας 3.1 (συνέχεια) *Ιδιότητες επιλεγμένων φυτοπροστατευτικών ενώσεων.*

Ένωση	Αριθμός CAS	Δομή ^[α]	Χημικός τύπος ^[β]	Μοριακό βάρος	pKa ^[β] (25°C)	pKow ^[β]	Τάση ατμών (mmHg)
Εντομοκτόνα/Ακαρεοκτόνα							
Abamectin	65195-55-3		C ₄₈ H ₇₂ O ₁₄	873,09	-	4,40	2,7×10 ⁻⁷
Ethion	563-12-2		C ₉ H ₂₂ O ₄ P ₂ S ₄	384,48	-	5,07	1,5×10 ⁻⁶
Fenazaquin	120928-09-8		C ₂₀ H ₂₂ N ₂ O	306,40	2,44	5,51	2,55×10 ⁻⁸
Fenvalerate	51630-58-1		C ₂₅ H ₂₂ ClNO ₃	419,90	-	5,01	1,5×10 ⁻⁹
Mecarbam ^[v]	2595-54-2		C ₁₀ H ₂₀ NO ₅ PS ₂	329,37	-	2,29	-

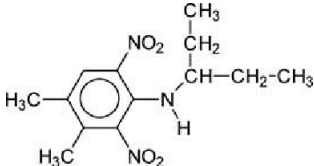
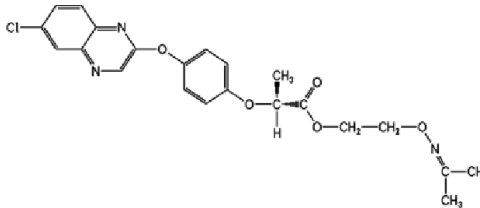
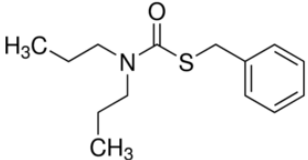
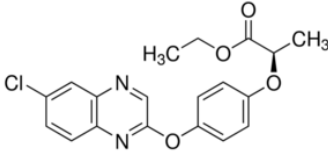
Πίνακας 3.1 (συνέχεια) *Ιδιότητες επιλεγμένων φυτοπροστατευτικών ενώσεων.*

Ένωση	Αριθμός CAS	Δομή ^[α]	Χημικός τύπος ^[β]	Μοριακό βάρος	pKa ^[β] (25°C)	pKow ^[β]	Τάση ατμών (mmHg)
Omethoate ^[γ]	1113-02-6		C ₅ H ₁₂ NO ₄ PS	213,20	-	-0,90	2,48×10 ⁻⁵
Pirimiphos methyl	29232-93-7		C ₁₁ H ₂₀ N ₃ O ₃ PS	305,33	4,30	3,90	1,50×10 ⁻⁸
Ακαρεοκτόνα							
Fenpyroximate	134098-61-6		C ₂₄ H ₂₇ N ₃ O ₄	421,49	1,72	5,01	5,58×10 ⁻⁸
Propargite ^[γ]	2312-35-8		C ₁₉ H ₂₆ O ₄ S	350,47	-	5,70	3×10 ⁻⁷
Spirodiclofen	148477-71-8		C ₂₁ H ₂₄ Cl ₂ O ₄	411,32	-	5,83	5,25×10 ⁻⁹

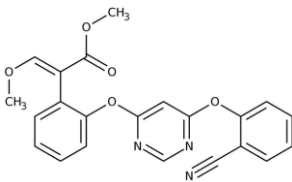
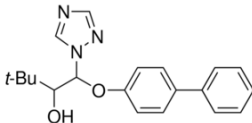
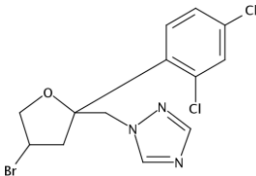
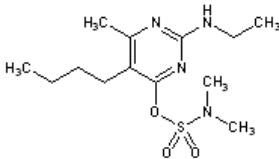
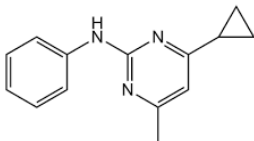
Πίνακας 3.1 (συνέχεια) *Ιδιότητες επιλεγμένων φυτοπροστατευτικών ενώσεων.*

Ένωση	Αριθμός CAS	Δομή ^[α]	Χημικός τύπος ^[β]	Μοριακό βάρος	pKa ^[β] (25°C)	pKow ^[β]	Τάση ατμών (mmHg)
Νηματωδοκτόνα							
Ethoprophos	13194-48-4		C ₈ H ₁₉ O ₂ PS ₂	242,30	-	2,99	3,8×10 ⁻⁴
Fenamiphos	22224-92-6		C ₁₃ H ₂₂ NO ₃ PS	303,36	10,50	3,30	9,0×10 ⁻⁶
Ζιζανιοκτόνα							
Acetochlor ^[γ]	34256-82-1		C ₁₄ H ₂₀ ClNO ₂	269,77	-	4,14	1,67×10 ⁻⁷
Fluazifop-P-butyl	79241-46-6		C ₁₉ H ₂₀ F ₃ NO ₄	383,36	3,53	4,50	9,0×10 ⁻⁷
Metobromuron	3060-89-7		C ₉ H ₁₁ BrN ₂ O ₂	259,10	12,00	2,48	3×10 ⁻⁶

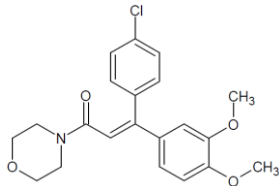
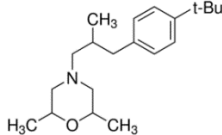
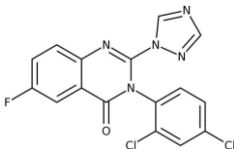
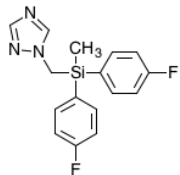
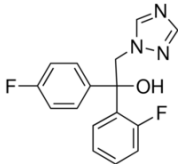
Πίνακας 3.1 (συνέχεια) *Ιδιότητες επιλεγμένων φυτοπροστατευτικών ενώσεων.*

Ένωση	Αριθμός CAS	Δομή ^[α]	Χημικός τύπος ^[β]	Μοριακό βάρος	pKa ^[β] (25°C)	pKow ^[β]	Τάση ατμών (mmHg)
Pendimethalin	40487-42-1		C ₁₃ H ₁₉ N ₃ O ₄	281,31	2,80	5,40	9,4×10 ⁻⁶
Propaquizafop	111479-05-1		C ₂₂ H ₂₂ ClN ₃ O ₅	443,88	-	4,78	3,3×10 ⁻¹²
Prosulfocarb	52888-80-9		C ₁₄ H ₂₁ NOS	251,39	-	4,48	5,9×10 ⁻⁶
Quizalofop-P-ethyl	100646-51-3		C ₁₉ H ₁₇ ClN ₂ O ₄	372,81	-	4,61	6,49×10 ⁻⁹

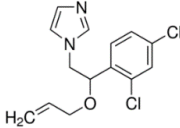
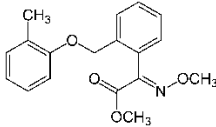
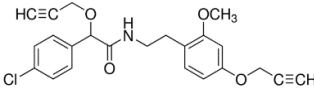
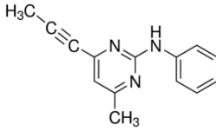
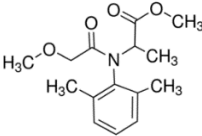
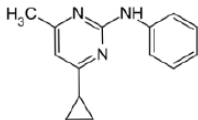
Πίνακας 3.1 (συνέχεια) *Ιδιότητες επιλεγμένων φυτοπροστατευτικών ενώσεων.*

Ένωση	Αριθμός CAS	Δομή ^[α]	Χημικός τύπος ^[β]	Μοριακό βάρος	pKa ^[β] (25°C)	pKow ^[β]	Τάση ατμών (mmHg)
Μυκητοκτόνα							
Azoxystrobin	131860-33-8		C ₂₂ H ₁₇ N ₃ O ₅	403,39	-	2,50	8,3×10 ⁻¹³
Bitertanol ^[v]	55179-31-2		C ₂₀ H ₂₃ N ₃ O ₂	337,42	-	4,10	1,02×10 ⁻¹¹
Bromuconazole	116255-48-2		C ₁₃ H ₁₂ BrCl ₂ N ₃ O	377,06	2,75	3,24	3×10 ⁻⁸
Bupirimate	41483-43-6		C ₁₃ H ₂₄ N ₄ O ₃ S	316,42	4,40	3,68	4,28×10 ⁻⁷
Cyprodinil	121552-61-2		C ₁₄ H ₁₅ N ₃	225,29	4,44	4,01	3,68×10 ⁻⁶

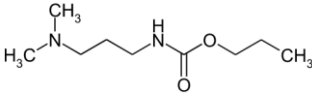
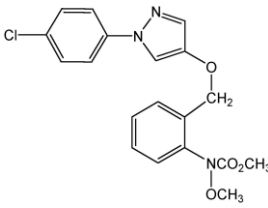
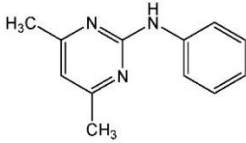
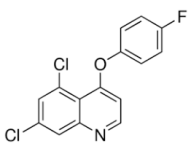
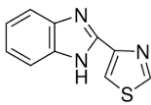
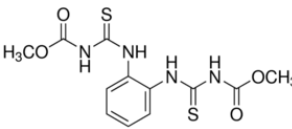
Πίνακας 3.1 (συνέχεια) *Ιδιότητες επιλεγμένων φυτοπροστατευτικών ενώσεων.*

Ένωση	Αριθμός CAS	Δομή ^[α]	Χημικός τύπος ^[β]	Μοριακό βάρος	pKa ^[β] (25°C)	pKow ^[β]	Τάση ατμών (mmHg)
Dimethomorph	110488-70-5		C ₂₁ H ₂₂ ClNO ₄	387,86	-	2,69	7,39×10 ⁻⁶
Fenpropimorph	67564-91-4		C ₂₀ H ₃₃ NO	303,48	6,98	4,50	2,9×10 ⁻⁵
Fluquinconazole	136426-54-5		C ₁₆ H ₈ Cl ₂ FN ₅ O	376,17	0,90	3,24	4,8×10 ⁻¹¹
Flusilazole	85509-19-9		C ₁₆ H ₁₅ F ₂ N ₃ Si	315,39	2,50	3,87	2,9×10 ⁻⁷
Flutriafol	76674-21-0		C ₁₆ H ₁₃ F ₂ N ₃ O	301,29	2,30	2,30	3,0×10 ⁻⁹

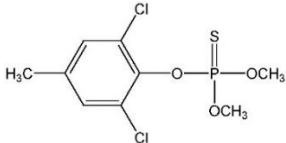
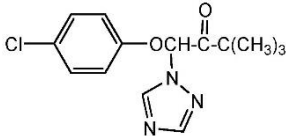
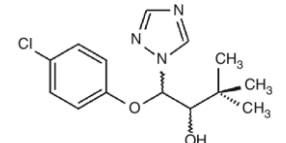
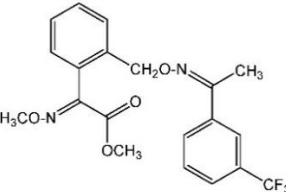
Πίνακας 3.1 (συνέχεια) *Ιδιότητες επιλεγμένων φυτοπροστατευτικών ενώσεων.*

Ένωση	Αριθμός CAS	Δομή ^[α]	Χημικός τύπος ^[β]	Μοριακό βάρος	pKa ^[β] (25°C)	pKow ^[β]	Τάση ατμών (mmHg)
Imazalil	35554-44-0		C ₁₄ H ₁₄ Cl ₂ N ₂ O	297,18	6,49	3,82	1,2×10 ⁻⁶
Kresoxim methyl	143390-89-0		C ₁₈ H ₁₉ NO ₄	313,35	-	3,40	1,72×10 ⁻⁸
Mandipropamid	374726-62-2		C ₂₃ H ₂₂ ClNO ₄	411,90	-	3,20	7,1×10 ⁻⁹
Mepanipirim	110235-47-7		C ₁₄ H ₁₃ N ₃	223,27	2,70	3,28	1,74×10 ⁻⁷
Metalaxyl	57837-19-1		C ₁₅ H ₂₁ NO ₄	279,33	-	1,75	5,62×10 ⁻⁶
Myclobutanil	88671-89-0		C ₁₅ H ₁₇ ClN ₄	288,78	2,30	2,89	1,6×10 ⁻⁶

Πίνακας 3.1 (συνέχεια) *Ιδιότητες επιλεγμένων φυτοπροστατευτικών ενώσεων.*

Ένωση	Αριθμός CAS	Δομή ^[α]	Χημικός τύπος ^[β]	Μοριακό βάρος	pKa ^[β] (25°C)	pKow ^[β]	Τάση ατμών (mmHg)
Propamocarb	24579-73-5		C ₉ H ₂₀ N ₂ O ₂	188,30	9,50	0,84	5,5×10 ⁻³
Pyraclostrobin	175013-18-0		C ₁₉ H ₁₈ ClN ₃ O ₄	387,80	-	3,99	1,95×10 ⁻¹⁰
Pyrimethanil	53112-28-0		C ₁₂ H ₁₃ N ₃	199,11	3,52	2,84	1,65×10 ⁻⁵
Quinoxifen	124495-18-7		C ₁₅ H ₈ Cl ₂ FNO	308,13	-	4,66	1,50×10 ⁻⁷
Thiabendazole	148-79-8		C ₁₀ H ₇ N ₃ S	201,25	4,73	2,39	4×10 ⁻⁹
Thiophanate methyl	23564-05-8		C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₄ S ₂	342,39	7,28	1,40	7,13×10 ⁻⁸

Πίνακας 3.1 (συνέχεια) *Ιδιότητες επιλεγμένων φυτοπροστατευτικών ενώσεων.*

Ένωση	Αριθμός CAS	Δομή ^[α]	Χημικός τύπος ^[β]	Μοριακό βάρος	pKa ^[β] (25°C)	pKow ^[β]	Τάση ατμών (mmHg)
Tolclofos methyl	57018-04-9		C ₉ H ₁₁ Cl ₂ O ₃ PS	301,13	-	4,56	6,58×10 ⁻⁶
Triadimefon	43121-43-3		C ₁₄ H ₁₆ ClN ₃ O ₂	293,80	-	3,18	1,5×10 ⁻⁸
Triadimenol A	70585-35-2		C ₁₄ H ₁₈ ClN ₃ O ₂	295,77	-	3,18	3,75×10 ⁻⁹
Trifloxystrobin	141517-21-7		C ₂₀ H ₁₉ F ₃ N ₂ O ₄	408,37	-	4,50	2,55×10 ⁻⁸

[α] Δεδομένα από <https://chemicalize.com/>

[β] Δεδομένα από Agricultural Substances Database, Agriculture & Environment Research Unit, University of Hertfordshire, <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/index.htm>

[γ] Έχει αποσυρθεί από την ελληνική αγορά (Πηγή: Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων)

Το Methoxyfenozide είναι εντομοκτόνο επαφής και στομάχου της ομάδας των διακυλυδραζινών. Κυκλοφορεί στην αγορά με την εμπορική ονομασία Gladiator 240 SC. Καταπολεμά τις προνύμφες των λεπιδοπτέρων σε εσπεριδοειδή (πορτοκάλια, μανταρίνια), μηλοειδή (μήλα, αχλάδια), πυρηνόκαρπα (βερίκοκα, ροδάκινα, νεκταρίνια), αμπέλι και τομάτες και πιπεριές θερμοκηπίου. Το Methoxyfenozide είναι ρυθμιστής της ανάπτυξης των εντόμων και δρα ως μιμητικό της ορμόνης έκδυσης της εκδυσόνης, στις προνύμφες των λεπιδοπτέρων. Λόγω της δέσμευσης του methoxyfenozide στη θέση-δέκτη της εκδυσόνης, προκαλείται πρώιμη και ατελής έκδυση, με αποτέλεσμα το θάνατο του εντόμου.

Το Phosmet είναι οργανοφωσφορικό εντομοκτόνο επαφής και στομάχου για την καταπολέμηση μασητικών και μυζητικών εντόμων. Εφαρμόζεται κυρίως σε καλλιέργειες εσπεριδοειδών, μηλοειδών, πυρηνόκαρπων και ελιάς.

Το Pirimicarb είναι εκλεκτικό εντομοκτόνο επαφής και στομάχου με παράλληλη δράση ατμών για καταπολέμηση των αφίδων σε ένα ευρύ φάσμα καλλιεργειών. Έχει διελασματική δράση και εισέρχεται στα φύλλα με περιορισμένη όμως κινητικότητα.

Το Pyriproxyfen είναι εντομοκτόνο που ανήκει στην κατηγορία των ρυθμιστών ανάπτυξης. Είναι μιμητικό της ορμόνης νεότητας των εντόμων, καθώς επιδρά στη μορφογένεση, την αναπαραγωγή και την εμβρυογένεση των εντόμων, ανάλογα με το στάδιο της ανάπτυξής τους (ωό, προνύμφη, νύμφη, ακμαίο), παρεμποδίζοντας την ομαλή εξέλιξη και ενηλικίωσή τους. Η αποτελεσματικότητα του σκευάσματος στα έντομα-στόχους εμφανίζεται πιο αργά και σταδιακά συγκρινόμενη με αυτήν των εντομοκτόνων που δρουν στο νευρικό σύστημα των εντόμων.

Το Triflumuron είναι και αυτό εντομοκτόνο που ανήκει στην κατηγορία των ρυθμιστών ανάπτυξης. Η δράση του είναι επαφής και στομάχου. Παρεμποδίζει τη σύνθεση της χιτίνης και τις μεταμορφώσεις των προνυμφών των εντόμων, ενώ μπορεί και να επηρεάσει τη γονιμότητα των θηλυκών εντόμων. Αποσύρθηκε από την ελληνική αγορά το 2009.

Το Abamectin είναι εκλεκτικό εντομοκτόνο-ακαρεοκτόνο στομάχου και επαφής, με ιδιαίτερο τρόπο δράσης, που καταπολεμά τετρανύχους και μερικά έντομα. Προκαλεί παράλυση στα έντομα με αποτέλεσμα το θάνατό τους από αστία.

Το Ethion είναι ένα οργανοφωσφορικό εντομοκτόνο-ακαρεοκτόνο που χρησιμοποιείται για τον έλεγχο μιας σειράς εντόμων και παρασίτων. Το Ethion είναι γνωστό ότι επηρεάζει το ένζυμο ακετυλοχολινεστεράση, εμποδίζοντας τη δράση του.

Εφαρμόζεται κυρίως σε φρούτα όπως μήλα, αχλάδια, σε εσπεριδοειδή, βαμβάκι και σιτηρά.

Τα εντομοκτόνα- ακαρεοκτόνα Fenazaquin και Fenvalerate χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο μιας σειράς κόκκινων ακάρεων και εντόμων, ειδικά εκείνων με αντοχή σε οργανοχλωριωμένα, οργανοφωσφορικά και καρβαμιδικά φυτοφάρμακα. Εφαρμόζονται κυρίως σε καλλιέργειες βαμβακιού; σόγιας; λαχανικών, εσπεριδοειδών αλλά και ξηρών καρπών.

Το Mecarbam είναι οργανοφωσφορικό εντομοκτόνο-ακαρεοκτόνο επαφής και στομάχου για την καταπολέμηση μασητικών και μυζητικών εντόμων. Το 2009 αποσύρθηκε τόσο από την ελληνική όσο και από την ευρωπαϊκή αγορά.

Το Omethoate είναι συστηματικό οργανοφωσφορικό εντομοκτόνο και ακαρεοκτόνο, το οποίο είναι διαθέσιμο ως διαλυτό συμπύκνωμα. Χρησιμοποιείται για τον έλεγχο ευρέου φάσματος εντόμων και ακαρέων σε καλλιέργειες φρούτων, συμπεριλαμβανομένων εσπεριδοειδών, λυκίσκου και σιτηρών. Αποσύρθηκε οριστικά από την ελληνική αγορά το 2003.

Το Pirimiphos-methyl, γνωστό και με την εμπορική ονομασία Actellic, είναι ένα οργανοφωσφορικό εντομοκτόνο-ακαρεοκτόνο, που δρα δια επαφής, κατάποσης και δια ατμών και ενδείκνυται για την καταπολέμηση επιβλαβών οργανισμών των αποθηκευμένων σπόρων. Δρα στο νευρικό σύστημα των εντόμων και των ακαρέων ως παρεμποδιστής της ακετυλοχολινεστεράσης.

3.1.2 Επιλεγμένα ακαρεοκτόνα

Το Fenpyroximate ανήκει χημικά στα πυραζόλια και είναι μη διασυστηματικό ακαρεοκτόνο που δρα δια επαφής και από στομάχου σε όλα τα στάδια ανάπτυξης των ακάρεων και κυρίως στις κινητές μορφές τους. Δρα παρεμποδίζοντας τη μεταφορά ηλεκτρονίων στη μιτοχονδριακή αλυσίδα και παρεμβαίνει μπλοκάροντας τη λειτουργία του συμπλόκου I, αναστέλλοντας κατά συνέπεια τη μιτοχονδριακή αναπνοή των κυττάρων. Πρόκειται για ένα από τα παλαιότερα εγκεκριμένα σκευάσματα στην Ελλάδα καθώς έχει άδεια από το 1993.

Το Propargite είναι ακαρεοκτόνο που δρα δι' επαφής και με ατμούς, με εκλεκτική δράση. Χρησιμοποιείται κυρίως για καλλιέργειες φρούτων, λαχανικών, ξηρών καρπών

και καλλωπιστικών φυτών. Το 2012 ανακλήθηκε η άδεια διάθεσης και κυκλοφορίας του στην ελληνική αγορά.

Το Spirodiclofen είναι ακαρεοκτόνο φυλλώματος, το οποίο χρησιμοποιείται για την προστασία των μηλοειδών (μήλα-αχλάδια), εσπεριδοειδών, πυρηνόκαρπων και του αμπελιού από τα ακάρεα. Ανήκει στη νέα χημική ομάδα των τετρονικών οξέων και δρα ως παρεμποδιστής της βιοσύνθεσης των λιπιδίων. Εμφανίζει αποτελεσματική δράση σε όλα τα στάδια των ακάρεων, όμως τα νεαρά στάδια είναι πιο ευαίσθητα από τα ακμαία. Δρα αποκλειστικά στα θηλυκά ενήλικα άτομα και ο θάνατος των ακάρεων επέρχεται μετά από 3-7 ημέρες από την εφαρμογή του.

3.1.3 Επιλεγμένα Νηματωδοκτόνα

Το Ethoprophos είναι οργανοφωσφορικό νηματωδοκτόνο και εντομοκτόνο εδάφους, με δράση επαφής. Ο τρόπος δράσης του σχετίζεται με το νευρικό σύστημα των εντόμων και των νηματωδών. Συγκεκριμένα, αναστέλλει την ακετυλοχολινεστεράση, ένα ένζυμο υπεύθυνο για την υδρόλυση της ακετυλοχολίνης στις χολινεργικές συνάψεις του κεντρικού νευρικού συστήματος, προκαλώντας συνεχή μετάδοση ερεθισμάτων και μπλοκάροντας το κεντρικό νευρικό σύστημα.

Το Fenamiphos είναι διασυστηματικό οργανοφωσφορικό νηματωδοκτόνο που δρα δι' επαφής και εφαρμόζεται μόνο στο έδαφος. Χρησιμοποιείται για τον έλεγχο των οικοπαράσιτικών και ενδοπαράσιτικών νηματωδών. Χρησιμοποιείται κυρίως για τις καλλιέργειες φρούτων, συμπεριλαμβανομένων εσπεριδοειδών, σταφυλιών και ανανά, λαχανικών, καπνού και καλλωπιστικών φυτών.

3.1.4 Επιλεγμένα Ζιζανιοκτόνα

Το Acetochlor είναι ένα εκλεκτικό προφυτρωτικό και μεταφυτρωτικό (στα πρώτα στάδια του αραβοσίτου) ζιζανιοκτόνο για την καταπολέμηση ετησίων αγρωστωδών και πλατύφυλλων ζιζανίων στον αραβόσιτο. Η άδεια έγκρισης και κυκλοφορίας του στη Ελλάδα έχει ανακληθεί από το 2012.

Το Fluazifop-p-butyl είναι εκλεκτικό διασυστηματικό ζιζανιοκτόνο φυλλώματος για την μεταφυτρωτική καταπολέμηση αγρωστωδών ζιζανίων σε καλλιέργειες εσπεριδοειδών. Απορροφάται από τα φύλλα και το στέλεχος των φυτών, μετακινείται μέσα στους υπέργειους και υπόγειους ιστούς τους, παρεμποδίζοντας την ανάπτυξη των

μεριστωμάτων στα φύλλα και στο ρίζωμα. Κυκλοφορεί στην Ελλάδα εγκεκριμένα από το 2008.

Το Metobromuron είναι εκλεκτικό προφυτρωτικό ζιζανιοκτόνο, που χρησιμοποιείται στην καλλιέργεια της πατάτας. Απορροφάται κυρίως από τις ρίζες και τα φύλλα, καταστρέφοντας τα ζιζάνια μέσω αναστολής της φωτοσύνθεσης. Στην ελληνική αγορά κυκλοφορεί από το 2016, με τις εμπορικές ονομασίες Proman, Praxim και Acamos 500.

Το Pendimethalin είναι εκλεκτικό ζιζανιοκτόνο επαφής, που χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση ετήσιων αγρωστωδών και πλατύφυλλων ζιζανίων κατά το φύτευμά τους, σε διάφορες καλλιέργειες. Επίσης εφαρμόζεται και ως αντιφυλλιζιακό καπνού. Εφαρμόζεται ανάλογα με την καλλιέργεια, προσπαρτικά με ενσωμάτωση, προφυτρωτικά επιφανειακά ή νωρίς μεταφυτρωτικά.

Το Propaquizafop είναι διασυστηματικό, μεταφυτρωτικό ζιζανιοκτόνο για την καταπολέμηση ετήσιων και πολυετών αγρωστωδών ζιζανίων. Απορροφάται από τα φύλλα των ζιζανίων και μεταφέρεται στις ρίζες. Τα ψεκασμένα ζιζάνια σταματούν να αναπτύσσονται 1-2 μέρες μετά την εφαρμογή. Τα νεότερα φύλλα γίνονται κίτρινα και το χαμηλότερο μέρος των βλαστών νεκρώνεται. Τελικά, όλο το ζιζάνιο καταστρέφεται μέσα σε 10-20 ημέρες, ανάλογα με τις κλιματικές συνθήκες.

Το Prosulfocarb ανήκει στην ομάδα των θειοκαρβαμιδικών και είναι εκλεκτικό ζιζανιοκτόνο επαφής για την καταπολέμηση ετήσιων αγρωστωδών και πλατύφυλλων ζιζανίων. Δρα δια της αναστολής της βιοσύνθεσης των λιπαρών οξέων και απορροφάται από τα φύλλα και τις ρίζες. Χρησιμοποιείται στην καλλιέργεια της πατάτας και των σιτηρών.

Το Quizalofop-p-ethyl είναι διασυστηματικό ζιζανιοκτόνο ετησίων και πολυετών αγρωστωδών ζιζανίων. Απορροφάται από τα φύλλα και το στέλεχος των φυτών και παρεμποδίζει την ανάπτυξη των μεριστωμάτων στα φύλλα και στο ρίζωμα.

3.1.5 Επιλεγμένα Μυκητοκτόνα

Το Azoxystrobin είναι διασυστηματικό μυκητοκτόνο με προστατευτική και θεραπευτική δράση κατά διαφόρων μυκητολογικών ασθενειών. Ανήκει στην ομάδα των στρομπιλουρινών, είναι προστατευτικό με μερική διελασματική δράση και παρεμποδίζει τη βλάστηση των σπορίων, την ανάπτυξη του μυκηλίου και την

παραγωγή των σπορίων, ελέγχοντας ένα μεγάλο εύρος μυκήτων. Σε βιοχημικό επίπεδο η δράση του είναι στο σύμπλοκο III της αναπνευστικής αλυσίδας. Χρησιμοποιείται σε διάφορες καλλιέργειες αρωματικών φυτών και λαχανικών

Το Bitertanol ανήκει στην ομάδα των τριαζολών και είναι διασυστηματικό μυκητοκτόνο, με προληπτική, θεραπευτική και εξοντωτική δράση σε ευρύ φάσμα μυκήτων. Σε βιοχημικό επίπεδο δρα παρεμποδίζοντας τη βιοσύνθεση εργοστερόλης. Έχει ευρεία χρήση σε καλλιέργειες φρούτων, σιτηρών, σόγιας και καλλωπιστικών φυτών. Αποσύρθηκε από την ευρωπαϊκή αγορά το 2009.

Το Bupirimate είναι διασυστηματικό μυκητοκτόνο με προληπτική, θεραπευτική και εξοντωτική δράση κατά του ωϊδίου στο αμπέλι. Ανήκει στην ομάδα των αμινοπυριμιδινών και απορροφάται από τα φύλλα του φυτού. Η μετακίνηση του προϊόντος στους αναπτυσσόμενους βλαστούς γίνεται διελασματικά ή μέσω ατμών, και συμβάλλει στην προστασία των νέων φύλλων, ενώ ταυτόχρονα αναστέλλει και την παραγωγή σπορίων. Το προϊόν μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε καλλιέργειες υπαίθρου και θερμοκηπίου.

Το Cyprodinil ανήκει στην ομάδα των ανιλινοπυριμιδινών και είναι διασυστηματικό μυκητοκτόνο φυλλώματος ευρέος φάσματος που χρησιμοποιείται για τον έλεγχο μιας σειράς παθογόνων μικροοργανισμών κυρίως στους καρπούς. Εμφανίζει προληπτική και θεραπευτική δράση για την καταπολέμηση του φουζικλάδιου στα μηλοειδή και του βοτρύτη στο αμπέλι (οινοποιήσιμα και επιτραπέζια σταφύλια). Παρουσιάζει αποπλαστική κίνηση και διελασματική δράση. Παρεμποδίζει την βιοσύνθεση των αμινοξέων, αναστέλλοντας την επιμήκυνση του μυκηλίου και την διείσδυση του στην φυλλική επιφάνεια.

Το Dimethomorph είναι διασυστηματικό μυκητοκτόνο με αποπλαστική και διελασματική κίνηση, για την αντιμετώπιση του περονόσπορου σε αμπέλι και πατάτα. Ανήκει στην ομάδα των μορφολινών και εμφανίζει αξιόλογη προληπτική, θεραπευτική και αντισποριογόνο δράση. Δρα παρεμποδίζοντας τη βιοσύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος των ωομυκήτων, προκαλώντας το θάνατο των παθογόνων.

Το Fenproimorph και το Fluquinconazole είναι διασυστηματικά μυκητοκτόνα με προστατευτική και θεραπευτική δράση, που χρησιμοποιούνται κυρίως σε καλλιέργειες σιτηρών και αρωματικών φυτών. Το Fenproimorph ανήκει στην χημική ομάδα των μορφολινών και παρεμποδίζει τη βιοσύνθεση της εργοστερόλης, ενώ το Fluquinconazole ανήκει στην ομάδα των τριαζολών.

Το Flutriafol είναι διασυστηματικό μυκητοκτόνο της ομάδας των DMI's (υποομάδα τριαζολών), με προληπτική, θεραπευτική και εξοντωτική δράση σε ευρύ φάσμα μυκήτων (Βασιδιομύκητες, Ασκομύκητες, Δευτερομύκητες). Σε βιοχημικό επίπεδο δρα παρεμποδίζοντας τη βιοσύνθεση εργοστερόλης στη θέση της απομεθυλίωσης του C-14. Απορροφάται από τα φύλλα και τους πράσινους ιστούς και μεταφέρεται ακροπεταλικά στα φύλλα και τους νεαρούς βλαστούς.

Το Imazalil είναι διασυστηματικό μυκητοκτόνο της ομάδας των ιμιδαζολών, με προληπτική, θεραπευτική και αντισποριογόνο δράση. Σε βιοχημικό επίπεδο δρα παρεμποδίζοντας τη βιοσύνθεση εργοστερόλης και εφαρμόζεται αποκλειστικά μετά τη συγκομιδή των εσπεριδοειδών για την αποφυγή των σήψεων από *Penicillium*. Στην Ελλάδα κυκλοφορεί εγκεκριμένα από το 2011.

Το Kresoxim-methyl είναι μη διασυστηματικό μυκητοκτόνο με προληπτική και θεραπευτική δράση καθώς και αξιόλογη διάρκεια δράσης, περίπου 15 ημερών. Έχει διελασματική και τοπικά δεισδυτική δράση και η αποτελεσματικότητά του δεν επηρεάζεται από ενδεχόμενη βροχόπτωση, δύο ώρες μετά την εφαρμογή του. Δρα παρεμποδίζοντας τη παραγωγή και την βλάστηση των σπορίων καθώς και την ανάπτυξη του μυκηλίου. Χρησιμοποιείται κυρίως σε καλλιέργειες ζαχαρότευτλων, σπωροκηπευτικών και λαχανικών.

Το Mandipropamid είναι μυκητοκτόνο για την καταπολέμηση του περονόσπορου και της αλτερνάριας στις καλλιέργειες ντομάτας, πατάτας και αμπελιού. Ανήκει στην ομάδα των αμιδίων καρβοξυλικών οξέων (CAA). Παρεμποδίζει την βλάστηση των σπορίων, την ανάπτυξη του μυκηλίου και τη σποριογένεση εμφανίζοντας προληπτική και θεραπευτική δράση κατά τη διάρκεια της περιόδου επώασης..

Το Meranipyrim ανήκει στην ομάδα των ανιλινοπυριμιδινών και είναι μυκητοκτόνο με προστατευτική δράση για την αντιμετώπιση της τεφράς σήψης της αμπέλου. Δεν επηρεάζει τη βλάστηση των σπορίων αλλά την επιμήκυνση του βλαστικού σωλήνα και τη διείσδυση του παθογόνου στον ξενιστή. Δεν κινείται διασυστηματικά αλλά εμφανίζει διελασματική δράση. Η αντιμικροβιακή του δράση οφείλεται στην παρεμπόδιση της βιοσύνθεσης ή της απέκκρισης λυτικών ενζύμων από το παθογόνο.

Το Metalaxyl είναι εκλεκτικό διασυστηματικό μυκητοκτόνο κατά του περονόσπορου στις καλλιέργειες αμπελιού, πατάτας, καπνού, τομάτας, αγγουριού, πεπονιού, μαρουλιού (υπαίθρου) και κρεμμυδιού (υπαίθρου). Η δράση του εστιάζεται κατά των ωομυκήτων που κινείται μέσα στο φυτό με αποπλαστική κυρίως κίνηση

παρεμποδίζοντας την ανάπτυξη του παθογόνου μέσα στους ιστούς του φυτού. Η χρήση του στην Ελλάδα εγκρίθηκε το 2015.

Το Myclobutanil είναι παράγωγο τριαζόλης που κυκλοφορεί εγκεκριμένα στη χώρα μας από το 2008 και είναι διασυστηματικό μυκητοκτόνο με προστατευτική και θεραπευτική δράση. Δρα ως αναστολέας απομεθυλίωσης στεροειδών, συγκεκριμένα της βιοσύνθεσης της εργοστερόλης, ενός κρίσιμου συστατικού των κυτταρικών μεμβρανών των μυκήτων. Όταν θερμαίνεται αποσυντίθεται για να παράγει διαβρωτικούς και τοξικούς καπνούς, συμπεριλαμβανομένων μονοξειδίου του άνθρακα, διοξειδίου του άνθρακα, υδροχλωρίου, υδροκυανίου και οξειδίων του αζώτου.

Το Propamocarb ανήκει στην ομάδα των καρβαμιδικών και είναι διασυστηματικό μυκητοκτόνο με προληπτική και προστατευτική δράση. Παρουσιάζει μικρή διασυστηματική κίνηση και απορροφάται από τις ρίζες και μεταφέρεται στα φύλλα και σε όλο το φυτό. Η δράση του φαίνεται να επηρεάζει το σχηματισμό των κυτταρικών μεμβρανών με συνέπεια την παρεμπόδιση της μυκηλιακής ανάπτυξης καθώς και της παραγωγής και βλάστησης των σπορίων των παθογόνων μυκήτων.

Το Pyraclostrobin ανήκει στη χημική ομάδα των μεθόξυ-καρβαμιδικών και είναι μυκητοκτόνο με προστατευτική και θεραπευτική δράση κατά των ασθενειών που προσβάλλουν την ελιά και τα πορτοκάλια. Παρεμποδίζει την κυτταρική αναπνοή στη θέση Qo του συμπλόκου III της αναπνευστικής αλυσίδας, εμφανίζοντας αποπ्लाστική και διελασματική κίνηση.

Το Pyrimethanil ανήκει στη χημική ομάδα των ανιλινοπυριμιδινών και είναι τοπικά διασυστηματικό μυκητοκτόνο με προληπτική και θεραπευτική δράση. Εμφανίζει διελασματική και αποπ्लाστική κίνηση. Σε βιοχημικό επίπεδο, παρεμποδίζει τη βιοσύνθεση της μεθειονίνης και κατά συνέπεια την έκκριση υδρολυτικών ενζύμων από τους μύκητες που είναι απαραίτητα για τη διαδικασία προσβολής των φυτών. Προορίζεται για την καταπολέμηση του Βοτρύτη σε αμπέλι, φράουλα, αγγούρι, κολοκύθι, μαρούλι, τομάτα, μελιτζάνα και του Φουζικλαδίου στα μηλοειδή.

Το Thiabendazole είναι συστηματικό μυκητοκτόνο με προληπτική και θεραπευτική δράση, εναντίον των σημαντικότερων μυκήτων που προκαλούν μετασυλλεκτικές σήψεις στους καρπούς. Χρησιμοποιείται κυρίως σε καλλιέργειες μηλοειδών, εσπεριδοειδών, πατάτας, σιτηρών και καλαμποκιού.

Το Tolclofos-methyl είναι οργανικό μυκητοκτόνο επαφής για την καταπολέμηση μυκήτων του γένους *Rhizoctonia* σε κονδύλους πατάτας, μαρούλι και λαχανικά θερμοκηπίου, καλλωπιστικά φυτά θερμοκηπίου και βολβούς-ριζώματα ανθοκομικών

Το Triadimenol A είναι διασυστηματικό μυκητοκτόνο της ομάδας των τριαζολών, με προληπτική, θεραπευτική και εξοντωτική δράση σε ευρύ φάσμα μυκήτων. Απορροφάται άμεσα από τους φυτικούς ιστούς και κινείται ακροπέταλα μέσω του ξύλου σε όλους τους νέους αναπτυσσόμενους ιστούς. Σε βιοχημικό επίπεδο δρα παρεμποδίζοντας τη βιοσύνθεση εργοστερόλης στη θέση της απομεθυλίωσης του C-14. Εφαρμόζεται σε ευρύ φάσμα καλλιεργειών όπως τομάτα, μελιτζάνα, αγγούρι, κολοκύθι, πεπόνι, καρπούζι, κολοκύθα, πιπεριά και αγκινάρα.

Το Trifloxystrobin είναι συνθετικό παράγωγο των φυσικών στρομπιλουρινών με διελασματική δράση. Εμφανίζει κυρίως προληπτική αλλά και θεραπευτική δράση. Σε βιοχημικό επίπεδο, δρα παρεμποδίζοντας τη μιτοχονδριακή αναπνοή, διακόπτοντας τη μεταφορά των ηλεκτρονίων στην κυτοχρωμική αλυσίδα. Εφαρμόζεται σε ευρύ φάσμα καλλιεργειών όπως σιτηρά, λαχανικά, μηλοειδή, σταφύλια και φράουλες.

ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ

4.1 Εισαγωγή

Κάθε αναλυτική διαδικασία συνήθως περιλαμβάνει πέντε στάδια: δειγματοληψία και ομογενοποίηση, ώστε το δείγμα να είναι αντιπροσωπευτικό, προκατεργασία του δείγματος, σωστό διαχωρισμό, ανίχνευση (ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση) των ενώσεων και τέλος ανάλυση των δεδομένων. Κάθε στάδιο είναι απαραίτητο για την απόκτηση αξιόπιστων αποτελεσμάτων, όμως τα στάδια της δειγματοληψίας και προκατεργασίας του δείγματος αποτελούν ιδιαίτερα σημαντικά και αναπόσπαστα τμήματα της αναλυτικής διαδικασίας.

Η μέθοδος προκατεργασίας εξαρτάται από την πολυπλοκότητα του υποστρώματος του προς ανάλυση δείγματος, τις ιδιότητές του και το αναμενόμενο επίπεδο συγκέντρωσης της προς ανάλυση ένωσης. Πρόκειται για ένα χρονοβόρο και ιδιαίτερα απαιτητικό στάδιο. Τα τυπικά στάδια της προκατεργασίας του δείγματος περιλαμβάνουν:

- εκχύλιση, για την απομόνωση των προσδιοριζόμενων ενώσεων
- καθαρισμό, για την απομάκρυνση των παρεμποδίσεων
- συμπύκνωση, αν είναι απαραίτητη, για να επιτευχθεί προσυγκέντρωση

Όλα τα παραπάνω στάδια είναι διαδοχικά και αλληλεξαρτώμενα, συνεπώς στην περίπτωση που κάποιο από αυτά δεν ολοκληρωθεί σωστά, τα σφάλματα μεταφέρονται από το ένα στάδιο στο άλλο με αποτέλεσμα την εξαγωγή λανθασμένων αποτελεσμάτων [32].

Ο προσδιορισμός υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών ενώσεων σε περιβαλλοντικά δείγματα είναι αρκετά πολύπλοκος, καθώς η ανάλυση περιλαμβάνει ενώσεις ή ομάδες ενώσεων με διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες. Επίσης, οι ενώσεις αυτές συνήθως απαντώνται στο περιβάλλον σε ίχνη, δηλαδή σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με άλλους οργανικούς ρύπους. Επιπλέον, η επίδραση του υποστρώματος δυσκολεύει την ανάλυση των δειγμάτων και τον προσδιορισμό των επιθυμητών ενώσεων [33]. Έτσι, τα περιβαλλοντικά υποστρώματα όπως το έδαφος, τα ιζήματα, η ιλύς, τα επιφανειακά ύδατα, τα υγρά απόβλητα κ.ά., συχνά χαρακτηρίζονται ως πολύπλοκα. Οι αναλυτικές μέθοδοι προσδιορισμού υπολειμμάτων χαρακτηρίζονται μονοδύναμες (single-residue), όταν προσδιορίζεται ένας ρύπος, και πολύ-υπολειμματικές (multi-residue) όταν προσδιορίζονται ταυτόχρονα πολλοί ρύποι ή ομάδες αυτών [34].

Τις τελευταίες δεκαετίες παρατηρούνται συνεχείς εξελίξεις στον τομέα της προκατεργασίας των δειγμάτων καθώς είναι επιτακτική η ανάγκη ανάπτυξης γρήγορων, απλών, φιλικών προς το περιβάλλον και χαμηλού κόστους μεθόδων που είναι ικανές να παρέχουν αναλυτικά χαρακτηριστικά όπως υψηλή ευαισθησία και ακρίβεια, επαναληψιμότητα και χαμηλά όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης. Συνεπώς, έχουν αναπτυχθεί διάφορες «σύγχρονες» τεχνικές αντικαθιστώντας πολλές φορές τις κλασικές τεχνικές εκχύλισης [34].

4.2 Τεχνικές εκχύλισης οργανικών μικρορύπων

Με τον όρο εκχύλιση καλείται η μεταφορά ενός συγκεκριμένου συστατικού από μια φάση (αιώρημα ή διάλυμα) σε μια άλλη (υγρή). Χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό, την απομόνωση και την παραλαβή ενός ή περισσότερων συστατικών από ένα χημικό σύστημα. Η εκχύλιση των ενώσεων στερεά και υγρά περιβαλλοντικά υποστρώματα βασίζεται είτε στην κατανομή αυτών μεταξύ της υδατικής φάσης και ενός μη αναμίξιμου με το νερό διαλύτη, είτε στην προσρόφηση των ενώσεων πάνω σε υπόστρωμα στερεάς φάσης [10].

Οι παλαιότερες και πιο κλασικές τεχνικές είναι η εκχύλιση Υγρού-Υγρού (Liquid-Liquid Extraction, LLE) και η εκχύλιση Soxhlet, στις οποίες καταναλώνονται μεγάλες ποσότητες οργανικών διαλυτών. Ωστόσο, οι σύγχρονες τάσεις στοχεύουν στη χρήση αναλυτικών τεχνικών με περιορισμένη κατανάλωση οργανικών διαλυτών και με δυνατότητα αυτοματοποίησης, που θα μπορούν να παρέχουν αξιόπιστα και επαναλήψιμα αποτελέσματα. Από την εξέλιξη της κλασικής τεχνικής εκχύλισης προέκυψε μια σειρά τεχνικών με χρήση στερεού προσροφητικού υλικού. Βασική αρχή όλων αυτών των τεχνικών, είναι η εκλεκτική συγκράτηση της προσδιοριζόμενης ένωσης στο προσροφητικό υλικό και στη συνέχεια η εκλεκτική παραλαβή της από αυτό [10].

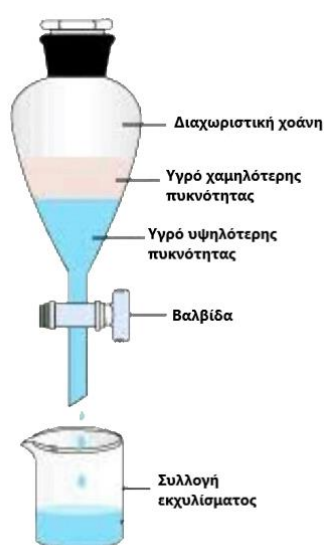
Οι σύγχρονες τεχνικές εκχύλισης είναι η εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction, SPE), η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Microextraction, SPME), η εκχύλιση με χρήση ράβδου προσρόφησης (Stir Bar Sorption Extraction, SBSE), η μικροεκχύλιση σταγόνας (Single Drop Micro Extraction, SDME), η εκχύλιση μέσω μεμβρανών (Membrane Extraction), η QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe), η εκχύλιση με υπερήχους (Ultra-Sound-Assisted Extraction, USE), η εκχύλιση μέσω μεμβρανών (Membrane Extraction), η επιταχυνόμενη εκχύλιση διαλύτη (Accelerated-Solvent Extraction, ASE) γνωστή και ως εκχύλιση με υγρό υπό

πίεση (Pressurized Liquid Extraction, PLE), η εκχύλιση με μικροκύματα (Microwave-Assisted Extraction, MAE), η διασπορά στερεάς φάσης-υποστρώματος (Matrix Solid Phase Dispersion, MSPD) και η εκχύλιση στερεάς φάσης με διασπορά (dispersive Solid Phase Extraction, dSPE).

4.2.1 Κύριες τεχνικές εκχύλισης οργανικών μικρορύπων από υγρά υποστρώματα

4.2.1.1 Εκχύλιση Υγρού-Υγρού (Liquid-Liquid Extraction, LLE)

Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα κλασικής τεχνικής εκχύλισης ενώσεων από υγρά υποστρώματα είναι η εκχύλιση υγρού-υγρού (LLE). Η βασική αρχή στην οποία στηρίζεται είναι η κατανομή των οργανικών ενώσεων μεταξύ του υδατικού δείγματος και ενός οργανικού διαλύτη μη αναμίξιμου με το νερό. Η επιλογή του οργανικού διαλύτη αποτελεί έναν από τους πιο σημαντικούς παράγοντες, που καθορίζει την εκλεκτικότητα και την αποδοτικότητα της εκχύλισης. Η αποτελεσματικότητα του διαλύτη στην εκχύλιση εξαρτάται από τον συντελεστή κατανομής, ο οποίος εκφράζει την χημική συγγενεία του με την οργανική ένωση που αναλύεται. Η εκχύλιση υγρού-υγρού πραγματοποιείται σε διαχωριστικές χοάνες (separating funnels) όπου οι προς ανάλυση ενώσεις κατανέμονται μεταξύ της υδατικής φάσης και ενός μη πολικού, οργανικού διαλύτη (Σχήμα 4.1). Ο συντελεστής κατανομής των ενώσεων πρέπει να είναι μεγάλος, καθώς υπάρχει περιορισμός τόσο στον αριθμό των εκχυλίσεων, όσο και στην αναλογία όγκου διαλύτη/δείγματος [35, 36].



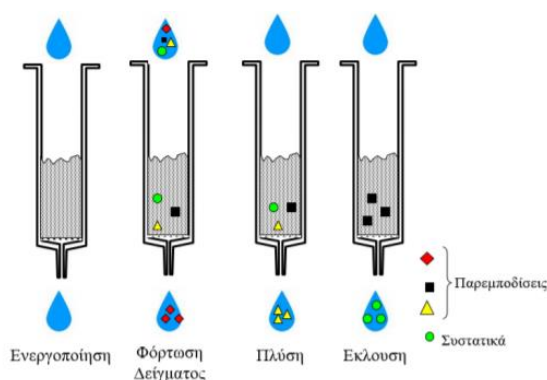
Σχήμα 4.1 Πειραματική πορεία LLE.

Η εκχύλιση υγρού-υγρού αν και έχει πολλές εφαρμογές στην εκχύλιση διαφόρων κατηγοριών φυτοφαρμάκων από φυσικά νερά, παρουσιάζει διάφορα μειονεκτήματα. Αρχικά καταναλώνονται πολύ μεγάλοι όγκοι οργανικών διαλυτών, οι οποίοι είναι τοξικοί για τον άνθρωπο και το περιβάλλον και συνήθως έχουν υψηλό κόστος. Οι μεγάλοι όγκοι διαλυτών με τη σειρά τους προϋποθέτουν ένα ακόμη στάδιο απομάκρυνσης των οργανικών διαλυτών με εξάτμιση, αυξάνοντας έτσι το χρόνο προκατεργασίας και καθιστώντας την τεχνική ιδιαίτερα χρονοβόρα. Ακόμη ένας περιορισμός της LLE είναι η συνεκχύλιση άλλων συστατικών του υποστρώματος με παρόμοιες ιδιότητες, καθώς οι διαλύτες δεν είναι εκλεκτικοί. Τέλος, η δυνατότητα αυτοματοποίησης είναι περιορισμένη, ενώ συχνά παρουσιάζονται πρακτικά προβλήματα, όπως ο σχηματισμός γαλακτωμάτων [37].

4.2.1.2 Εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction, SPE)

Η εκχύλιση στερεάς φάσης είναι μια απλή και αποτελεσματική τεχνική προκατεργασίας, η οποία έχει αντικαταστήσει την LLE, υπερέχοντας σε σχέση με αυτή, ως προς την κατανάλωση διαλυτών, την ικανότητα αυτοματοποίησης, το κόστος και το χρόνο της εκχύλισης. Εφαρμόζεται για την εκλεκτική απομόνωση, παραλαβή και προσυγκέντρωση των επιθυμητών ενώσεων, τόσο από υδατικά όσο και από στερεά δείγματα, τα οποία μετά από επεξεργασία καταλήγουν σε υγρή μορφή για την περαιτέρω εκχύλιση των ενώσεων [26, 38]. Τα βασικά στάδια της SPE (Σχήμα 4.2) είναι τα εξής:

- 1) Ενεργοποίηση και προετοιμασία του προσροφητικού υλικού
- 2) Φόρτωση του δείγματος
- 3) Έκπλυση για την απομάκρυνση ανεπιθύμητων συστατικών του δείγματος
- 4) Έκλουση του δείγματος με τον κατάλληλο διαλύτη ή μίγμα διαλυτών



Σχήμα 4.2 Πειραματική πορεία SPE με τη χρήση μικροστηλών εκχύλισης.

Πιο αναλυτικά, στο πρώτο στάδιο, πραγματοποιείται η ενεργοποίηση του προσροφητικού υλικού, που περιλαμβάνει την επιδιεύτωση των δραστικών ομάδων του προσροφητικού και την προετοιμασία του να αλληλεπιδράσει με το δείγμα. Στη συνέχεια, το υδατικό δείγμα διέρχεται από το στερεό πληρωτικό υλικό της μικροστήλης, όπου και συγκρατούνται οι προς ανάλυση ενώσεις. Ακολουθεί έκπλυση της μικροστήλης για την άρση των παρεμποδίσσεων. Ο διαλύτης που επιλέγεται για την έκπλυση πρέπει να είναι ασθενής, ώστε τα επιθυμητά συστατικά να μην εκροφηθούν από το προσροφητικό υλικό. Στη συνέχεια εφαρμόζεται η ξήρανση του προσροφητικού υλικού έτσι ώστε να απομακρυνθεί το νερό σε περίπτωση που ο διαλύτης έκλουσης είναι μη αναμίξιμος. Η ξήρανση μπορεί να επιτευχθεί με την εφαρμογή κενού, με διαβίβαση ρεύματος αζώτου ή με φυγοκέντρηση. Η διαδικασία ολοκληρώνεται με το στάδιο της έκλουσης του δείγματος, όπου πραγματοποιείται η ποσοτική παραλαβή των επιθυμητών συστατικών, με τη χρήση μικρής ποσότητας κατάλληλου οργανικού διαλύτη [26, 38].

Η τεχνική βασίζεται στους μηχανισμούς της προσρόφησης και της κατανομής των εκχυλιζόμενων ενώσεων ανάμεσα σε δύο φάσεις, τη στατική φάση (προσροφητικό υλικό) και την κινητή φάση (διαλύτης έκλουσης). Οι διάφοροι μηχανισμοί της εκχύλισης είναι αποτέλεσμα ανταγωνιστικών αλληλεπιδράσεων που λαμβάνουν χώρα ανάμεσα στα προσδιοριζόμενα συστατικά, τις ενεργές ομάδες στην επιφάνεια του προσροφητικού και του διαλύτη έκλουσης. Τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα προσροφητικά υλικά είναι ο ενεργός άνθρακας και τα πορώδη πολυμερή, τα οποία είναι εμπορικά διαθέσιμα είτε σε μικροστήλες (extraction cartridges), οι οποίες περιέχουν κατάλληλο προσροφητικό υλικό, είτε σε δίσκους εκχύλισης (extraction disks), στους οποίους το προσροφητικό υλικό έχει ενσωματωθεί σε πολυμερή μεμβράνη [26, 38].

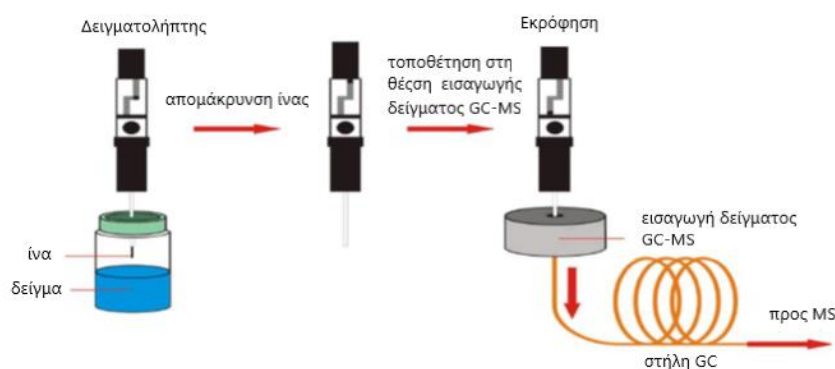
4.2.1.3 Μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Micro-Extraction, SPME)

Η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (SPME) αναπτύχθηκε το 1990 από τους Arthur και Pawliszyn και επιτρέπει την επίτευξη ορίων ανίχνευσης της τάξης των ng/L για πτητικά, ημιπτητικά και μη πτητικά συστατικά, με καλή γραμμικότητα και ευαισθησία. Είναι αποτελεσματική τόσο για πολικές όσο και για μη πολικές ενώσεις αλλά και για διαφορετικά υποστρώματα, ενώ μπορεί να εφαρμοστεί απευθείας στο πεδίο της δειγματοληψίας. Είναι μια γρήγορη, ευαίσθητη, εύκολα αυτοματοποιούμενη, οικονομική και χωρίς χρήση διαλυτών (solvent-free), τεχνική προκατεργασίας. Παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα έναντι άλλων συμβατικών τεχνικών, καθώς

συνδυάζει ταυτόχρονη εκχύλιση και προσυγκέντρωση των επιθυμητών ενώσεων από αέρια, υγρά ή στερεά δείγματα, με άμεση μεταφορά τους για ανάλυση σε ένα κλασικό σύστημα αέριας χρωματογραφίας [26].

Η SPME περιλαμβάνει δύο διεργασίες: α) την προσρόφηση (κατανομή) των προσδιοριζόμενων ενώσεων στο υλικό επίστρωσης και β) την εκρόφηση τους. Οι επιθυμητές ενώσεις προσροφώνται εκλεκτικά σε μια οπτική ίνα μικρής διαμέτρου από τηγμένο πυρίτιο επιστρωμένο με πολυμερές υλικό, η οποία είναι προσαρμοσμένη σε μικροσύριγγα. Η μικροσύριγγα αυτή εισάγεται στο προς εξέταση δείγμα, η οπτική ίνα εκτείνεται μέσα στο δείγμα και τα προσδιοριζόμενα συστατικά προσροφώνται σε αυτήν (Σχήμα 4.3). Η προσρόφηση όμως δε γίνεται ποσοτικά, αλλά αποκαθίσταται μια ισορροπία κατανομής των συστατικών ανάμεσα στο δείγμα και στη στατική φάση της ίνας. Στη συνέχεια η ίνα απομακρύνεται από το δείγμα κι επανέρχεται στο εσωτερικό της μικροσύριγγας. Στην περίπτωση αναλύσεων με αέριο χρωματογράφο ή με αέριο χρωματογράφο σε σύζευξη με φασματόμετρο μάζας (GC-MS) η εκρόφηση των προσροφημένων στην ίνα συστατικών πραγματοποιείται με απευθείας εισαγωγή της ίνας στο σύστημα και θερμική εκρόφηση των συστατικών. Στην περίπτωση διαχωρισμού των συστατικών με υγρή χρωματογραφία (LC), αυτή συνδέεται με κατάλληλη βαλβίδα δύο θέσεων, στην οποία όταν εισαχθεί η ίνα, τα συστατικά παραλαμβάνονται με τη βοήθεια της κινητής φάσης [4, 26].

Η προσρόφηση των συστατικών, καθορίζει την ακρίβεια, την ευαισθησία, την ταχύτητα, και την εκλεκτικότητα της εκχύλισης, ενώ από την εκρόφηση εξαρτώνται η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων και η αποτελεσματικότητα του χρωματογραφικού διαχωρισμού. Η ευαισθησία και η εκλεκτικότητα της τεχνικής καθορίζεται επίσης από τα χαρακτηριστικά του υλικού επίστρωσης και από το πάχος της ίνας [26].



Σχήμα 4.3 Πειραματική πορεία SPME συζευγμένης με GC-MS [39].

4.2.1.4 Εκχύλιση με χρήση ράβδου προσρόφησης (Stir Bar Sorptive Extraction, SBSE)

Η χρήση της τεχνικής SBSE εισήχθη για πρώτη φορά από τους Baltussen et al. το 1999. Είναι μια νέα, γρήγορη και απλή τεχνική η οποία επιτρέπει την απομόνωση ουσιών, που βρίσκονται σε ίχνη, από υδατικά και άλλα υγρά διαλύματα [40].

Η βασική αρχή της μεθόδου έχει πολλά κοινά με την SPME, με ορισμένες διαφορές ως προς την ποσότητα του υλικού επίστρωσης. Είναι μια τεχνική προσροφητικής εκχύλισης υδατικών δειγμάτων. Ένας μαγνήτης ανάδευσης (stir bar), εμπεριέχεται σε γυάλινο περίβλημα και είναι επικαλυμμένος με το πολυμερικό υλικό PDMS (polydimethylsiloxane). Ο μαγνήτης ανάδευσης εισάγεται στο υδατικό διάλυμα και η προσροφητική εκχύλιση επιτυγχάνεται κατά την διάρκεια της ανάδευσης. Ο μαγνήτης αφαιρείται από το δείγμα, στεγνώνεται και εισάγεται σε έναν γυάλινο σωλήνα εκρόφησης. Ο γυάλινος σωλήνας ο οποίος περιέχει το μαγνήτη ανάδευσης, τοποθετείται μέσα στη μονάδα θερμικής εκρόφησης (Thermal Desorption Unit, TDU), ώστε να πραγματοποιηθεί η θερμική εκρόφηση των ενώσεων που εκχυλίστηκαν από το μαγνήτη. Στη συνέχεια οι ενώσεις εκροφώνται θερμικά και μεταφέρονται σε (αέριο) χρωματογράφο [40].

Ένα από τα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι η ανίχνευση οργανικών ουσιών σε υδατικά διαλύματα με αέρια χρωματογραφία, αποφεύγοντας το στάδιο προκατεργασία του δείγματος. Επίσης εμφανίζει πολύ χαμηλά όρια ανίχνευσης, έως και 1000 φορές χαμηλότερα από αυτά της SPME. Εφαρμόζεται στην ανάλυση χυμών, κρασιών, και άλλων αλκοολούχων ποτών, αρωματικών ουσιών, φυτοφαρμάκων, εντομοκτόνων, νερών, υγρών αποβλήτων κ.ά. [40].

4.2.2 Κύριες τεχνικές εκχύλισης οργανικών μικρορύπων από στερεά υποστρώματα

Η πολύπλοκη φύση των περισσότερων στερεών υποστρωμάτων, όπως είναι το έδαφος και τα ιζήματα, είναι ένας από τους παράγοντες που δυσκολεύει την ανάλυσή τους. Η διαδικασία εκχύλισης ενώσεων από στερεά υποστρώματα πραγματοποιείται γενικά σε πέντε στάδια:

1. Εκρόφηση των προς ανάλυση ενώσεων από το υπόστρωμα
2. Διάχυση στο υπόστρωμα
3. Διαλυτοποίηση των ενώσεων στον διαλύτη έκλουσης

4. Διάχυση των ενώσεων στον διαλύτη έκλουσης

5. Συλλογή του εκλούσματος

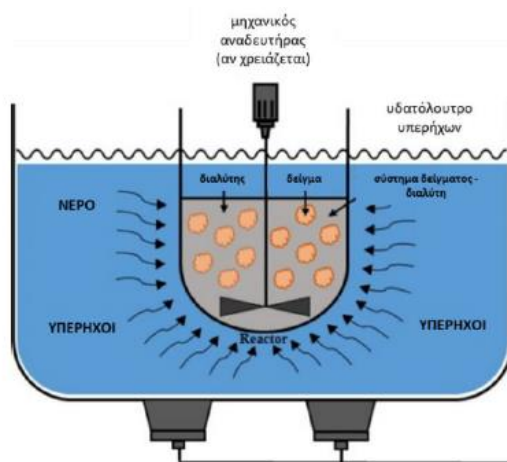
Ο προσδιορισμός ιχνών διαφόρων ρύπων από πολύπλοκα υποστρώματα απαιτεί συνήθως δύσκολες και χρονοβόρες διαδικασίες προκατεργασίας του δείγματος, εκχύλισης αλλά και καθαρισμού (clean-up). Το μέγεθος των σωματιδίων είναι ένας σημαντικός παράγοντας που μπορεί να επηρεάσει την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης, καθώς επιδρά στην επαναληψιμότητα της μεθόδου. Η προσδιοριζόμενη ένωση εκροφάται από το υπόστρωμα και διαλύεται στον κατάλληλο διαλύτη. Συνεπώς, η εκχύλισή της εξαρτάται από τη διεισδυτικότητα του διαλύτη στο δείγμα, τη διαλυτότητα και την επίδραση του υποστρώματος. Τα στερεά δείγματα αρχικά ομογενοποιούνται και στη συνέχεια ακολουθεί η υδατική εκχύλιση ή εκχύλιση με κατάλληλο, συνήθως οργανικό, διαλύτη [10].

Για να είναι αποτελεσματική η εκχύλιση στερεών δειγμάτων με υψηλά ποσοστά υγρασίας, είναι απαραίτητο να προηγηθεί ένα στάδιο λυοφιλίωσης των δειγμάτων, ώστε να απομακρυνθεί η υγρασία. Πρόκειται για μία ήπια τεχνική, που πραγματοποιείται υπό κενό και σε χαμηλή θερμοκρασία. Η λυοφιλίωση χρησιμοποιείται πολλές φορές για βιολογικά δείγματα που είναι ασταθή, για θερμικά ευαίσθητα φυτοφάρμακα, καθώς και για ουσίες, που μετουσιώνονται εύκολα, όπως οι πρωτεΐνες [10].

Οι πιο συμβατικές τεχνικές εκχύλισης ρύπων από στερεά υποστρώματα είναι η εκχύλιση με υπερήχους (Ultra-sound-Assisted Extraction, UAE), η ανατάραξη (shake-flask) και η εκχύλιση Soxhlet. Πιο πρόσφατες μέθοδοι είναι η εκχύλιση με τη μέθοδο διασποράς στερεάς φάσης-υποστρώματος (Matrix Solid Phase Dispersion, MSPD), η εκχύλιση υπερκρίσιμου ρευστού (Supercritical Fluid Extraction, SFE), η εκχύλιση με χρήση μικροκυμάτων (Microwave-Assisted Extraction, MAE) καθώς και η επιταχυνόμενη εκχύλιση με διαλύτη ή εκχύλιση πεπιεσμένου υγρού (Accelerated Solvent Extraction, ASE ή Pressurized Liquid Extraction, PLE), οι οποίες όμως έχουν μεγαλύτερο κόστος. Διάφοροι περιορισμοί και προβλήματα οδήγησαν στην ανάπτυξη νέων μεθόδων, που καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα αναλυτών και πραγματοποιούνται σε λίγα μόνο αναλυτικά βήματα, μειώνοντας έτσι τυχόν σφάλματα. Μία από αυτές τις τεχνικές είναι η QuEChERS η οποία περιγράφεται αναλυτικά σε επόμενη παράγραφο καθώς αποτελεί και το αντικείμενο μελέτης της συγκεκριμένης εργασίας.

4.2.2.1 Εκχύλιση με υπέρηχους (Ultra-sound assisted extraction, UAE)

Κατά την εκχύλιση με υπέρηχους, το δείγμα τοποθετείται με κατάλληλο οργανικό διαλύτη σε λουτρό υπερήχων. Η διάδοση των υπερήχων χαρακτηρίζεται από ελάχιστη συχνότητα 16kHz και προκαλείται κίνηση του υγρού λόγω αραιώσης και συμπίεσης. Με την αύξηση της πίεσης λαμβάνουν χώρα φαινόμενα μεταφορά και διείσδυσης, ενώ με την αύξηση της θερμοκρασίας επιτυγχάνονται φαινόμενα διάχυσης και διαλυτοποίησης (Σχήμα 4.4). Με την χρήση των υπερήχων ο χρόνος εκχύλισης μειώνεται αισθητά, είναι δυνατή η ταυτόχρονη εκχύλιση πολλών δειγμάτων και χρησιμοποιούνται μικρότεροι όγκοι διαλυτών. Η εκχύλιση με υπέρηχους εφαρμόζεται για τον προσδιορισμό ενώσεων που είναι θερμικά ασταθείς [4].



Σχήμα 4.4 Σχηματική απεικόνιση εκχύλισης με υπέρηχους (UAE).

4.2.2.2 Διασπορά στερεάς φάσης-υποστρώματος (Matrix Solid Phase Dispersion, MSPD)

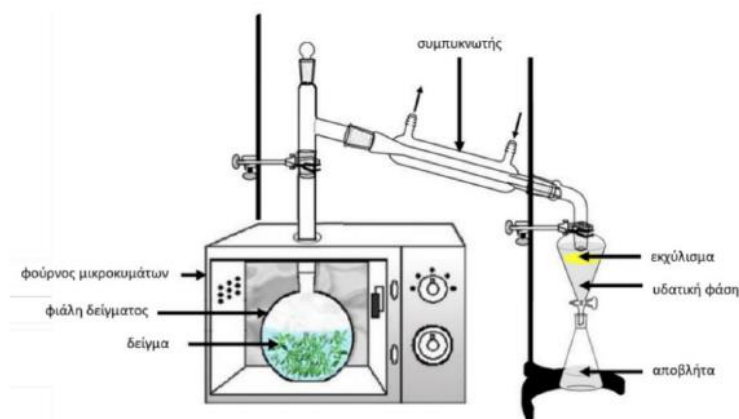
Η διασπορά στερεάς φάσης-υποστρώματος (MSPD), είναι μία σχετικά πρόσφατη τεχνική προκατεργασίας που βρίσκει κυρίως εφαρμογή στην κατεργασία στερεών δειγμάτων ή υγρών με υψηλό ιξώδες. Είναι ευέλικτη και απλή, προσφέροντας τη δυνατότητα διεξαγωγής της εκχύλισης και του καθαρισμού σε ένα βήμα, με αποτέλεσμα μικρότερους χρόνους ανάλυσης και χαμηλότερη κατανάλωση διαλυτών. Έχει αρκετές ομοιότητες με την SPE, με τη διαφορά ότι τα προσδιοριζόμενα συστατικά αναμιγνύονται με το κατάλληλο προσροφητικό υλικό και έτσι έρχονται σε επαφή.

Αρχικά το δείγμα ομογενοποιείται σε ιγδίο μαζί με το προσροφητικό υλικό με αποτέλεσμα να προσροφώνται σε αυτό οι επιθυμητές ενώσεις. Στη συνέχεια το μίγμα που έχει προκύψει μεταφέρεται σε μικροστήλη, όπου πακτώνεται καλά ώστε να μην υπάρχουν κενά. Για την καλύτερη συγκράτηση του υλικού τοποθετούνται φρίτες στο

πάνω και κάτω άκρο. Τέλος, όπως και στην SPE, ακολουθεί έκπλυση για την απομάκρυνση των παρεμποδίσεων και τελικά, οι προς ανάλυση ενώσεις εκλούνται με τη χρήση κατάλληλου διαλύτη. Το εκχύλισμα που προκύπτει από την MSPD μπορεί να αναλυθεί απευθείας, σε ορισμένες όμως περιπτώσεις μπορεί να χρειαστεί μία επιπλέον διαδικασία ώστε να απομακρυνθούν συστατικά που τυχόν συνεκλώσθηκαν με τις προσδιοριζόμενες ενώσεις [4].

4.2.2.3 Εκχύλιση με μικροκύματα (Microwave-Assisted Extraction, MAE)

Η χρήση των μικροκυμάτων στην εκχύλιση έχει συμβάλει σημαντικά στη μείωση του χρόνου εκχύλισης, σε σχέση με τις κλασικές μεθόδους. Με τις συμβατικές μεθόδους η θερμότητα μεταδίδεται από την θερμαντική πλάκα στο δοχείο θέρμανσης και από εκεί στο διάλυμα, ενώ με τα μικροκύματα η θέρμανση ξεκινάει από το δείγμα, αφού το δοχείο δεν απορροφά την ακτινοβολία των μικροκυμάτων (Σχήμα 4.5). Η θερμότητα που παράγεται από τα μικροκύματα εξαρτάται από το διάλυμα. Αυτό συμβαίνει καθώς υπάρχουν διαλύτες που απορροφούν τα μικροκύματα (π.χ. μεθανόλη) και εκείνοι που δεν τα απορροφούν, και κατά συνέπεια δε θερμαίνονται (π.χ. εξάνιο). Η απόδοση της εκχύλισης με μικροκύματα είναι ιδιαίτερα υψηλή, ενώ ταυτόχρονα παρατηρείται και σημαντική μείωση τόσο του όγκου του δείγματος όσο και της ποσότητας των διαλυτών που χρησιμοποιούνται [4].

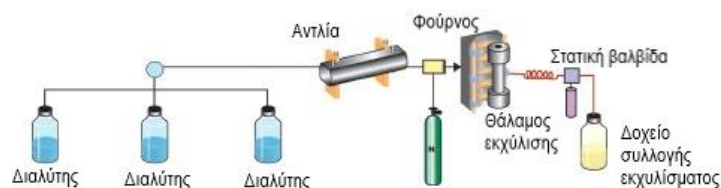


Σχήμα 4.5 Σχηματική απεικόνιση εκχύλισης με μικροκύματα (MAE).

4.2.2.4 Επιταχυνόμενη εκχύλιση με διαλύτη (Accelerated Solvent Extraction, ASE)

Η επιταχυνόμενη εκχύλιση με διαλύτη είναι μία πρόσφατη τεχνική, η οποία χρησιμοποιεί κλασικά συστήματα διαλυτών για την εκχύλιση ενώσεων, κάτω από

διάφορες παραμέτρους εκχύλισης, όπως πίεση, θερμοκρασία και όγκος. Η ASE είναι γρήγορη, αυτοματοποιημένη τεχνική, και καταναλώνει πολύ μικρούς όγκους διαλυτών. Λόγω των υψηλών πιέσεων που χρησιμοποιούνται στη διαδικασία, οι ενώσεις εκχυλίζονται σε θερμοκρασίες υψηλότερες από το σημείο βρασμού του διαλύτη. Ενισχύεται έτσι η διαλυτοποίηση και η διάχυση των αναλυτών από τα δείγματα στο διαλύτη, μειώνοντας έτσι σημαντικά τόσο το χρόνο εκχύλισης όσο και την κατανάλωση του διαλύτη [4]. Η τεχνική απεικονίζεται στο Σχήμα 4.6.



Σχήμα 4.6 Σχηματική απεικόνιση ταχείας εκχύλισης με διαλύτες (ASE).

4.2.2.5 QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe)

Η QuEChERS είναι μία σχετικά νέα «τεχνική» με ευρύ φάσμα αναφορών, που έχει πάνω από μία δεκαετία εφαρμογής. Αποτελεί ακρωνύμιο των λέξεων 'Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe' δηλαδή, γρήγορη, εύκολη, οικονομική, αποτελεσματική, ανθεκτική και ασφαλής. Δημοσιεύτηκε πρώτη φορά το 2003 από τους Anastassiades et al. και στόχευε στον προσδιορισμό υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε φρούτα και λαχανικά με τη χρήση της αέριας χρωματογραφίας σε σύζευξη με φασματομετρία μάζας (GC–MS) [41]. Από τότε, έχει τροποποιηθεί, βελτιστοποιηθεί και εξελιχθεί ώστε πλέον να μπορεί να εφαρμόζεται και για τον υπολειμματικό προσδιορισμό περισσότερων ενώσεων, αλλά και διαφορετικών υποστρωμάτων, όπως έδαφος, ίζημα, ιλύς, ζωικοί ιστοί, αίμα κ.ά. Η χρήση της QuEChERS πρόσφατα άρχισε να γίνεται δημοφιλής για την εκχύλιση φυτοπροστατευτικών ενώσεων από δείγματα εδάφους και ιζήματα [42, 43].

Βιβλιογραφική ανασκόπηση

Στον Πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 4.1) δίνονται συνοπτικά πληροφορίες βιβλιογραφικής ανασκόπησης για τις τεχνικές εκχύλισης φυτοπροστατευτικών ενώσεων από στερεά περιβαλλοντικά δείγματα (έδαφος και ιζήματα) τα τελευταία χρόνια (2013-2019).

Πίνακας 4.1 Πρόσφατη βιβλιογραφία για την εκχύλιση φυτοπροστατευτικών ενώσεων από στερεά περιβαλλοντικά δείγματα (έδαφος και ιζήματα).

Αριθμός ενώσεων	Εκχύλιση	Καθαρισμός	Ανάλυση	Έτος	Πηγή
13 φυτοφάρμακα	QuEChERS	dSPE	UHPLC–MS/MS	2019	[44]
2 φυτοφάρμακα	QuEChERS	dSPE	LC-ESI-MS/MS	2019	[45]
1 φυτοφάρμακο	SLE	GCB-SPE	UPLC-ESI-MS/MS	2019	[46]
6 φυτοφάρμακα	QuEChERS	dSPE	UPLC-ESI-MS/MS	2019	[47]
4 φυτοφάρμακα	QuEChERS	dSPE	LC-ESI-MS/MS	2019	[48]
76 φυτοφάρμακα	QuEChERS	dSPE	LC-ESI-MS/MS,GC-HRMS	2019	[49]
1 φυτοφάρμακο και μεταβολίτες	QuEChERS	dSPE	GC-ECD, GC-MS/MS	2019	[50]
23 φυτοφάρμακα	Soxhlet	alumina/silica	GC-MS	2018	[51]
18 φυτοφάρμακα	QuEChERS	dSPE	UHPLC–LTQ/ ORBITRAP MS	2018	[9]
2 φυτοφάρμακα	QuEChERS	dSPE	LC-QqLIT-MS/MS	2018	[52]
31 φυτοφάρμακα	QuEChERS	dSPE	GC-MS/MS	2018	[53]
12 φυτοφάρμακα	SLE, Soxhlet, QuEChERS,	dSPE, silica	GC-MS	2018	[54]
2 φυτοφάρμακα	QuEChERS	dSPE	LC-ESI-MS/MS	2018	[55]
18 φυτοφάρμακα	MSPE	-	LC-ESI-MS/MS	2018	[56]
8 φυτοφάρμακα	MSPD	DLLME	LC-ESI-MS/MS	2018	[57]
36 φυτοφάρμακα	QuEChERS	dSPE	GC–TOF-MS	2017	[58]
9 φυτοφάρμακα	MSPD	filtration (διήθηση)	LC-ESI-MS/MS	2017	[59]
6 φυτοφάρμακα	QuEChERS	dSPE	GC-MS	2017	[60]
1 φυτοφάρμακο	QuEChERS	dSPE	UHPLC-ESI-MS/MS	2017	[61]
22 φυτοφάρμακα	QuEChERS	dSPE	GC-MS	2016	[62]
4 φυτοφάρμακα	QuEChERS	dSPE	LC-ESI–MS/MS	2016	[63]
26 φυτοφάρμακα	QuEChERS	dSPE	LC-ESI-MS/MS	2016	[64]
15 φυτοφάρμακα	QuEChERS	dSPE	APGC-QTOF-MS	2016	[65]

Πίνακας 4.1 (συνέχεια) Πρόσφατη βιβλιογραφία για την εκχύλιση φυτοπροστατευτικών ενώσεων από στερεά περιβαλλοντικά δείγματα (έδαφος και ιζήματα).

Αριθμός ενώσεων	Εκχύλιση	Καθαρισμός	Ανάλυση	Έτος	Πηγή
2 φυτοφάρμακα	QuEChERS	dSPE	LC-Q-TOF/MS	2016	[66]
9 φυτοφάρμακα	QuEChERS	dSPE	GC-MS	2016	[67]
22 φυτοφάρμακα	UAE	alumina/silica	LC-ESI-MS/MS	2015	[68]
12 φυτοφάρμακα	UAE	SPE	LC-ESI-MS/MS	2015	[69]
10 φυτοφάρμακα	ASE, MAE, UAE, QuEChERS	SPE, dSPE	GC-ECD, GC-MS/MS	2015	[70]
50 φυτοφάρμακα	PLE, QuEChERS	dSPE	LC-ESI-MS/MS	2015	[71]
253 φυτοφάρμακα	MAE	filtration (διήθηση)	LC-TQD-MS/MS	2014	[72]
54 φυτοφάρμακα	QuEChERS	dSPE	UHPLC/LTQ-Orbitrap-MS	2014	[73]
2 φυτοφάρμακα	UAE	SPE	LC-MS/MS	2014	[74]
4 φυτοφάρμακα	QuEChERS	dSPE	LC-ESI-MS/MS	2014	[75]
26 φυτοφάρμακα	PLE	SPE	LC-ESI-MS/MS	2013	[33]
18 φυτοφάρμακα	Soxhlet	silica	GC-MS	2013	[76]
50 φυτοφάρμακα	QuEChERS	dSPE	LC-ESI-MS/MS	2013	[77]
9 φυτοφάρμακα	QuEChERS	dSPE	UPLC-ESI-MS/MS	2013	[78]
36 φυτοφάρμακα	QuEChERS	dSPE, DPX tips	GC-MS/MS	2013	[79]
14 φυτοφάρμακα	QuEChERS	dSPE	GC-ECD, GC-MS/MS	2012	[80]

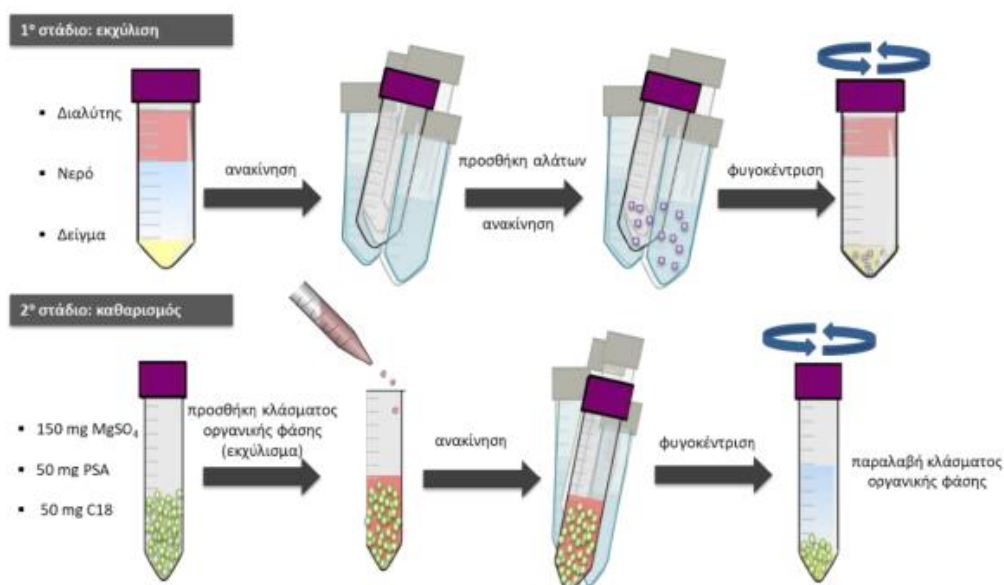
Όπως φαίνεται και από τη βιβλιογραφική ανασκόπηση η QuEChERS αποτελεί σημαντική και ευρέως χρησιμοποιούμενη και αποτελεσματική μέθοδο εκχύλισης ενώσεων από στερεά υποστρώματα, όπως δείγματα εδάφους και ιζημάτων. Στη συνέχεια δίνεται η περιγραφή της μεθόδου QuEChERS.

Πειραματική πορεία

Η πειραματική πορεία της QuEChERS (Σχήμα 4.7) είναι αρκετά απλή και αποτελείται από δύο βασικά στάδια. Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει την εκχύλιση των ενώσεων-

στόχων από το υπόστρωμα και την κατανομή τους με τη χρήση μίγματος αλάτων, και το δεύτερο στάδιο είναι ο καθαρισμός του εκχυλίσματος. Πιο αναλυτικά, στην αρχή, τα προς ανάλυση δείγματα ομογενοποιούνται και συγκεκριμένη ποσότητα αυτών ζυγίζεται και μεταφέρεται σε πλαστικούς σωλήνες φυγοκέντρησης. Ακολουθεί προσθήκη νερού, αν είναι απαραίτητο, και στη συνέχεια προστίθεται οργανικός διαλύτης (συνήθως ακετονιτρίλιο) ώστε να πραγματοποιηθεί η εκχύλιση των ενώσεων-στόχων από το υπόστρωμα. Τέλος προστίθεται το μίγμα των αλάτων, το δείγμα ανακινείται έντονα και φυγοκεντρείται. Το μίγμα των αλάτων συνήθως αποτελείται από άνυδρο θειικό μαγνησίου (MgSO_4) μαζί με χλωριούχο νατρίου (NaCl) ή οξικό νάτριο (NaOAc) ή μαζί με κάποιο ρυθμιστικό διάλυμα, όπως τα κιτρικά άλατα (trisodium citrate, sodium citrate dibasic sesquihydrate) ή συνδυασμός αυτών.

Στο δεύτερο στάδιο, παραλαμβάνεται ένα μέρος της υπερκείμενης φάσης, το οποίο καθαρίζεται με εκχύλιση διασποράς στερεάς φάσης (dispersive Solid Phase Extraction, dSPE) με τη χρήση MgSO_4 και μικρής ποσότητας προσροφητικών ουσιών, όπως πρωτοταγή-δευτεροταγή αμίνη (Primary Secondary Amine, PSA), πυριτία C_{18} ή γραφίτοποιημένο άνθρακα (graphitized carbon black, GCB). Στην περίπτωση που χρειάζεται εξισορρόπηση του pH, μπορεί να προστεθεί μικρή ποσότητα αμμωνίας ή μυρμηκικού οξέος. Ακολουθεί πάλι ανακίνηση και φυγοκέντρηση του δείγματος, πριν την έγχυση σε υγρό ή αέριο χρωματογράφο σε σύζευξη με φασματογράφο μάζας. Το τελικό εκχύλισμα αν είναι απαραίτητο συμπυκνώνεται και επαναδιαλύεται στον επιθυμητό διαλύτη πριν την τελική ανάλυση του δείγματος [42, 43].



Σχήμα 4.7 Πειραματική πορεία QuEChERS [4].

Γίνεται αντιληπτό ότι, η QuEChERS συμφωνεί απόλυτα με τους στόχους της προκατεργασίας ενός δείγματος έχοντας τον ελάχιστο αριθμό βημάτων, μειώνοντας τον απαιτούμενο χρόνο και καθιστώντας παράλληλα δυνατή την αυτοματοποίησή της. Βασικό πλεονέκτημα της τεχνικής είναι η ικανότητα ανάκτησης τόσο όξινων, όσο και βασικών ενώσεων, ακόμα και σε τιμές pH που αναμένεται να υφίστανται ιοντισμό. Αυτό μπορεί να σχετίζεται με τη σχετικά υψηλή περιεκτικότητα της οργανικής φάσης σε νερό μετά το στάδιο του διαχωρισμού [4, 42, 43].

Κρίσιμο αντιδραστήριο στην QuEChERS αποτελεί ο οργανικός διαλύτης εκχύλισης, καθώς από αυτόν εξαρτάται το ποσοστό των αναλυτών που θα παραλάβουμε, και επομένως τα ποιοτικά χαρακτηριστικά της μεθόδου. Συνήθως χρησιμοποιείται ακετονιτρίλιο, καθώς διαχωρίζεται εύκολα από την υδατική φάση με την προσθήκη του μίγματος των αλάτων, παρέχοντας υψηλές ανακτήσεις ακόμα και για πολικές ενώσεις. Παράλληλα, τα εκχυλίσματα του είναι σχετικά καθαρά, χωρίς να υπάρχουν πολλές ενώσεις που μπορεί να δράσουν ως παρεμποδιστές [42, 43]. Επίσης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ακετόνη ή οξικός αιθυλεστέρας, αν και συνήθως αποφεύγονται, επειδή η ακετόνη αναμειγνύεται εύκολα με το νερό και ο οξικός αιθυλεστέρας, αν και είναι λιγότερο αναμίξιμος με το νερό, δεν παραλαμβάνει ποσοτικά τα πολικά φυτοφάρμακα [4].

Η προσθήκη των αλάτων κατά το στάδιο της εκχύλισης έχει ως στόχο τον καλύτερο διαχωρισμό των φάσεων, έτσι ώστε να επιτευχθούν υψηλές ανακτήσεις και εκλεκτικότητα για ευρύ φάσμα αναλυτών. Το θειικό μαγνήσιο (MgSO_4), μειώνοντας τον όγκο της υδατικής φάσης, βοηθά στην κατανομή των πολικών ενώσεων στην οργανική φάση. Το χλωριούχο νάτριο (NaCl) βελτιώνει την εκλεκτικότητα της εκχύλισης καθώς με μεταβολή της ποσότητας αυτού μπορεί να ελεγχθεί η πολικότητα της μεθόδου [4].

Κατά την εφαρμογή της QuEChERS, ο καθαρισμός του δείγματος είναι απαραίτητος καθώς η πολυπλοκότητα της φύσης ορισμένων υποστρωμάτων έχει ως συνέπεια τα εκχυλίσματα να περιέχουν συχνά πλήθος από άλλες ενώσεις που μπορεί να δράσουν ως παρεμποδιστές. Κατά τη διάρκεια του καθαρισμού, πραγματοποιείται μια δεύτερη εκχύλιση, η οποία, πέρα από την απομάκρυνση του νερού, στοχεύει και στην απομάκρυνση όσο το δυνατόν περισσότερων παρεμποδιστών από το υπόστρωμα. Κατά συνέπεια, τα προσροφητικά που χρησιμοποιούνται διαφέρουν ανάλογα με το προς ανάλυση υπόστρωμα και τις παρεμποδίζουσες ενώσεις. Τα προσροφητικά υλικά ή τα μίγματα προσροφητικών που χρησιμοποιούνται ευρέως είναι [42, 43]:

- ❖ **MgSO₄**: το θειικό μαγνήσιο απομακρύνει τυχόν επιπλέον υγρασία.
- ❖ **PSA**: η πρωτοταγής–δευτεροταγής αμίνη, ως ασθενής ιονταλλάκτης, ελαττώνει ή πλήρως απομακρύνει παρεμποδίσεις, όπως σάκχαρα, πολικά οργανικά οξέα και λιπαρά οξέα.
- ❖ **C₁₈ (octadecyl silica)**: η πυριτία C₁₈ απομακρύνει τις μη πολικές ενώσεις και τα λιπίδια.
- ❖ **GCB**: ο γραφίτοποιημένος άνθρακας απομακρύνει χρωστικές ουσίες, όπως χλωροφύλλη και καροτενοειδή.

Η QuEChERS μπορεί να τροποποιηθεί και να προσαρμοστεί ανάλογα με τις ανάγκες της κάθε ανάλυσης. Υπάρχουν τρεις βασικές «προσεγγίσεις–παραλλαγές» της μεθόδου (Σχήμα 4.8), και συγκεκριμένα:

1. Η «αυθεντική» μέθοδος ('Original' QuEChERS)

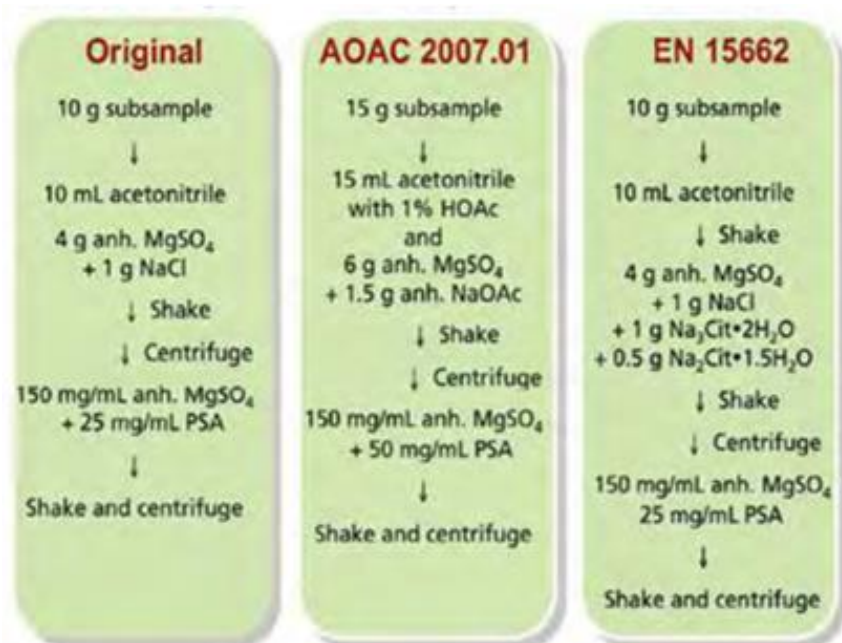
Ως διαλύτης εκχύλισης χρησιμοποιείται ακετονιτρίλιο. Η σύνθεση της 'Original' QuEChERS περιλαμβάνει επίσης χλωριούχο νάτριο (NaCl) για τη βελτίωση της αποτελεσματικότητας της εκχύλισης και τη μείωση των παρεμποδίσεων που οφείλονται σε πολικές ενώσεις [42, 43, 81].

2. Η μέθοδος AOAC 2007.01 (AOAC Official Method 2007.01)

Ως διαλύτης εκχύλισης χρησιμοποιείται ακετονιτρίλιο με προσθήκη 1% οξικού οξέος. Επίσης χρησιμοποιείται άνυδρο οξικό νάτριο (CH₃COONa) ως ρυθμιστής pH ώστε να αποφευχθεί η αποδόμηση ενώσεων που είναι ευαίσθητες σε βασικό περιβάλλον και παράλληλα βοηθά στην καλύτερη ανάκτηση των ενώσεων που είναι ευαίσθητες σε ακραίες μεταβολές pH [42, 81, 82].

3. Η μέθοδος EN 15662 (European Standard Method EN 15662)

Ως διαλύτης εκχύλισης χρησιμοποιείται ακετονιτρίλιο. Εκτός από NaCl για την απομάκρυνση των πολικών παρεμποδίσεων, χρησιμοποιούνται και ρυθμιστικά άλατα του κιτρικού οξέος για τη συντήρηση των ενώσεων που είναι ευαίσθητες σε βασικό pH [41, 42, 81].



Σχήμα 4.8 Οι παραλλαγές της μεθόδου QuEChERS [81].

Ανεξάρτητα από ποια προσέγγιση χρησιμοποιείται κάθε φορά, η QuEChERS έχει πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με τις περισσότερες κλασικές τεχνικές εκχύλισης για στερεά υποστρώματα, και συγκεκριμένα [41, 83]:

- Χρησιμοποιείται μικρή ποσότητα οργανικών διαλυτών.
- Απαιτείται ελάχιστος εργαστηριακός εξοπλισμός.
- Το κόστος αντιδραστηρίων και αναλωσίμων είναι χαμηλό.
- Η εκτέλεση είναι απλή, χωρίς να απαιτείται μεγάλη κατάρτιση ή τεχνικές δεξιότητες από τον αναλυτή.
- Είναι συμβατή με αέρια και υγρή χρωματογραφία.
- Παρέχει υψηλές ανακτήσεις (>85%).
- Η έκθεση του χειριστή σε διαλύτες είναι ελάχιστη.
- Παράγεται μικρή ποσότητα αποβλήτων.

ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ-ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ

5.1 Υγρή Χρωματογραφία

Η υγρή χρωματογραφία (Liquid Chromatography, LC) είναι μία από τις πιο διαδεδομένες αναλυτικές τεχνικές διαχωρισμού παγκοσμίως. Ανήκει στις χρωματογραφικές τεχνικές και ο διαχωρισμός των ενώσεων είναι αποτέλεσμα της συνδυαστικής δράσης μιας κινητής και μιας στατικής φάσης. Πρόκειται για μία δυναμική μέθοδο, ποιοτικού και ποσοτικού προσδιορισμού, με πολλές δυνατότητες, η οποία έχει εφαρμοστεί με επιτυχία σε αναλύσεις διαφορετικής κλίμακας, παρέχοντας αξιόπιστα αποτελέσματα για πολύ μεγάλη ποικιλία χημικών ενώσεων. Οι κύριοι λόγοι για την ευρεία χρήση της είναι η υψηλή ακρίβεια και ευαισθησία της, η καταλληλότητά της για διαχωρισμούς μη πτητικών ή θερμικά ευαίσθητων συστατικών και η εφαρμογή της για τον προσδιορισμό ενώσεων που έχουν επιστημονικό ενδιαφέρον, όπως τα αμινοξέα, οι πρωτεΐνες, τα στεροειδή, τα αντιβιοτικά, τα φυτοφάρμακα, οι υδρογονάνθρακες, τα προϊόντα ατομικής περιποίησης, οι οργανομεταλλικές ενώσεις και ένα πλήθος ανόργανων ενώσεων [84, 85].

Η κινητή φάση είναι υγρή, ενώ η στατική φάση είναι στερεή ή υγρή, ακινητοποιημένη πάνω σε αδρανές υπόστρωμα. Κατά το διαχωρισμό, κάθε ένωση κατανέμεται μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης ενώ παράλληλα μετακινείται προς την έξοδο της στήλης, λόγω της ροής του διαλύτη. Με αυτό τον τρόπο, δημιουργείται μια μετακινούμενη ζώνη μέσα στη στήλη, η οποία τελικά αποδίδεται ως μια κορυφή στο χρωματογράφημα. Όταν οι συνθήκες είναι ιδανικές, τότε ανιχνεύονται από τον ανιχνευτή οι ταινίες των διάφορων συστατικών και αποτυπώνονται στο καταγραφικό σύστημα ως καμπύλες Gauss. Η ποσοτικοποίηση γίνεται με βάση το ύψος της κορυφής ή το εμβαδόν της επιφάνειας, μεγέθη τα οποία είναι ανάλογα με την ποσότητα ή τη συγκέντρωση της προσδιοριζόμενης ένωσης [85, 86].

Ο διαχωρισμός των ουσιών ενός μίγματος, βασίζεται στη διαφορετική αλληλεπίδραση του κάθε συστατικού με την κινητή και τη στατική φάση, με συνέπεια κάθε ένωση να εμφανίζει διαφορετικό χρόνο έκλουσης από τη στήλη. Η αλληλεπίδραση αυτή σχετίζεται με το σχήμα, το μέγεθος και την πυκνότητα φορτίου των σωματιδίων στο διάλυμα. Στην υγρή χρωματογραφία είναι δυνατόν να εφαρμοστούν όλα τα είδη των μηχανισμών που λαμβάνουν χώρα στους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς χρησιμοποιώντας τον κατάλληλο συνδυασμό στατικής φάσης και του διαλύτη έκλουσης (κινητή φάση) [85].

Με βάση τους συνδυασμούς στατικής/κινητής φάσης, που χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό ενός μίγματος, τα κυριότερα είδη χρωματογραφίας και το πεδίο εφαρμογών τους είναι τα εξής [85]:

- Χρωματογραφία προσρόφησης (Adsorption Chromatography)

Εφαρμόζεται για το διαχωρισμό μη πολικών ενώσεων και βασίζεται στο διαφορετικό βαθμό προσρόφησης τους στη στατική φάση. Οι αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα οφείλονται κυρίως σε αλληλεπιδράσεις διπόλου-διπόλου, van der Waals και σε δεσμούς υδρογόνου.

- Χρωματογραφία κατανομής (Partition chromatography)

Εφαρμόζεται για το διαχωρισμό μη ιοντικών πολικών ενώσεων. Στην επιφάνεια του αδρανούς στερεού υποστρώματος υπάρχει ακινητοποιημένη λεπτή στοιβάδα υγρού (υψηλού σημείου ζέσεως). Ο διαχωρισμός στηρίζεται στη διαφορετική κατανομή των συστατικών ενός μίγματος μεταξύ της κινητής και της στατικής φάσης.

- Χρωματογραφία ιονανταλλαγής (Ion exchange chromatography)

Εφαρμόζεται για το διαχωρισμό ιοντικών ενώσεων. Ο διαχωρισμός οφείλεται στις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των προσδιοριζόμενων ιόντων και των φορτισμένων ομάδων της στατικής φάσης.

- Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (Size exclusion chromatography)

Εφαρμόζεται για το διαχωρισμό ενώσεων με μοριακή μάζα μεγαλύτερη από 10000. Ο διαχωρισμός γίνεται με βάση το μέγεθος και το σχήμα των μορίων των προσδιοριζόμενων ενώσεων και βρίσκει εφαρμογές στην ανάλυση και το χαρακτηρισμό των πολυμερών ενώσεων (συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών). Η διαδικασία του διαχωρισμού έχει ως εξής: τα μεγάλα μόρια εξέρχονται πρώτα από τη στήλη, ενώ τα μικρά μόρια καθυστερούν, καθώς εισέρχονται και στους πόρους των σωματιδίων της στατικής φάσης, και έτσι βγαίνουν αργότερα.

- Χρωματογραφία χημικής συγγένειας (Affinity chromatography)

Εφαρμόζεται στο διαχωρισμό εναντιομερών ενώσεων. Οι προσδιοριζόμενες ενώσεις δεσμεύονται εκλεκτικά σε υποκαταστάτες, οι οποίοι είναι ακινητοποιημένοι στη στατική φάση.

Σήμερα, ο συχνότερα και ευρύτερα χρησιμοποιούμενος τύπος υγρής χρωματογραφίας είναι η υγρή χρωματογραφία κατανομής. Με βάση τη σχετική πολικότητα της κινητής και της στατικής φάσης, διακρίνονται δύο υποκατηγορίες για την υγρή χρωματογραφία κατανομής:

(α) Υγρή χρωματογραφία κανονικής φάσης, όπου η στατική φάση είναι υψηλής πολικότητας (συνήθως SiO_2 ή Al_2O_3) και η κινητή φάση αποτελείται από μη πολικούς διαλύτες, όπως εξάνιο ή χλωροφόρμιο.

(β) Υγρή χρωματογραφία αντίστροφης φάσης, όπου η στατική φάση είναι μη πολική και η κινητή είναι ένας σχετικά πολικός διαλύτης.

Στην περίπτωση της αντίστροφης φάσης, η στατική φάση είναι λιγότερο πολική από την κινητή και αποτελείται από SiO_2 , συζευγμένο με διάφορες ομάδες (bonded phase), όπως αλκύλια, φαινύλια, διόλες, αμινομάδες, κυανομάδες κ.ά. Η κινητή φάση συνήθως αποτελείται από πολικούς διαλύτες, κυρίως μίγματα νερού ή ρυθμιστικών υδατικών διαλυμάτων, με διάφορους οργανικούς διαλύτες αναμίξιμους με το νερό όπως ακετονιτρίλιο και μεθανόλη [85].

5.1.1 Αναλυτικές στήλες

Η αναλυτική στήλη είναι η καρδιά ενός χρωματογραφικού συστήματος και πρέπει να είναι υψηλής ποιότητας, ώστε να δίνει ακριβή και επαναλήψιμα αποτελέσματα. Η χρωματογραφική στήλη αποτελείται από τον εξωτερικό κύλινδρο και το υλικό πλήρωσης. Ο εξωτερικός κύλινδρος μπορεί να είναι κατασκευασμένος από μέταλλο, ανοξείδωτο ατσάλι, γυαλί ή πολυμερές. Το υλικό πλήρωσης (ή στατική φάση) βρίσκεται στο εσωτερικό του κυλίνδρου και επιλέγεται ανάλογα με τις ενώσεις που θα διαχωριστούν [92]. Η επιλογή του κατάλληλου υλικού πλήρωσης παίζει σημαντικό ρόλο στη βελτιστοποίηση της αναλυτικής διαδικασίας. Τα διάφορα υλικά πλήρωσης που υπάρχουν στο εμπόριο παρέχουν διαφορετικής απόδοσης διαχωρισμούς, εξαιτίας των διαφορετικών φυσικοχημικών ιδιοτήτων του υλικού πλήρωσης. Τα περισσότερα υλικά πλήρωσης χρησιμοποιούν ως βάση την πηκτή διοξειδίου του πυριτίου (silica gel) λόγω του χαμηλού κόστους και της υψηλής ανθεκτικότητας [87].

Η επιλογή της κατάλληλης αναλυτικής στήλης είναι ιδιαίτερα σημαντική και καθορίζεται από τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά της στήλης, το μέγεθος των μορίων και τη διάμετρο των πόρων του υλικού πλήρωσης, τον τύπο του υποστρώματος, ο οποίος πρέπει να είναι χημικά αδρανής, τη φύση της ομάδας που είναι δεσμευμένη στο υπόστρωμα, από την οποία καθορίζεται και η εκλεκτικότητα της στατικής φάσης, και τέλος την περιεκτικότητα της στήλης σε ελεύθερα σιλανολικά υδροξύλια, καθώς όσο μεγαλύτερο είναι το ποσοστό τους, τόσο πιο πολική είναι η στήλη, με συνέπεια την ασθενέστερη συγκράτηση των μη πολικών ενώσεων. Οι αναλυτικές στήλες μπορούν επίσης να

κατηγοριοποιηθούν με βάση την εσωτερική τους διάμετρο και χωρίζονται στις συμβατικές, στις τριχοειδείς και στις στήλες στενού διαμετρήματος [88].

5.1.2 Ανιχνευτές

Ο ανιχνευτής σε ένα σύστημα Υγρής Χρωματογραφίας χρησιμοποιείται για το συνεχή έλεγχο του υγρού που βγαίνει από τη στήλη. Ένας ανιχνευτής Υγρής Χρωματογραφίας, ανεξάρτητα από την αρχή στην οποία βασίζεται η λειτουργία του, πρέπει να πληροί ορισμένες προϋποθέσεις, και συγκεκριμένα [85]:

1. Χαμηλό επίπεδο θορύβου.
2. Υψηλή ευαισθησία και μεγάλο εύρος γραμμικής περιοχής.
3. Μικρός χρόνος απόκρισης.
4. Μικρός νεκρός όγκος.
5. Ανεξαρτησία στις μεταβολές της θερμοκρασίας και της ροής.
6. Ευελιξία στις μεταβολές της σύστασης της κινητής φάσης.
7. Αξιοπιστία και ευκολία στη χρήση.
8. Δυνατότητα ανίχνευσης διαφορετικών ενώσεων και παροχή στοιχείων για την ταυτοποίησή τους.
9. Μη καταστροφή του αναλυόμενου δείγματος.

Οι πιο συνηθισμένοι ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται στην Υγρή Χρωματογραφία είναι οι παρακάτω [85]:

- Ανιχνευτές υπεριώδους-ορατού
- Ανιχνευτές παράταξης φωτοδιόδων
- Αγωγιμομετρικοί ανιχνευτές
- Ανιχνευτές δείκτη διάθλασης
- Φασματογράφοι μάζας
- Ηλεκτροχημικοί ανιχνευτές
- Φθορισμομετρικοί ανιχνευτές

5.2 Φασματομετρία Μάζας

Φασματομετρία μάζας (Mass Spectrometry, MS) καλείται η αναλυτική τεχνική κατά την οποία τα μόρια (συστατικά) ενός δείγματος μετατρέπονται σε ταχύτατα κινούμενα ιόντα

και στη συνέχεια διαχωρίζονται σε σχέση με το λόγο της μάζας προς το φορτίο τους (m/z). Πρόκειται για μια τεχνική προσδιορισμού της δομής αλλά και ποσοτικού προσδιορισμού ενώσεων και στοιχείων βασιζόμενη στον ιοντισμό ατόμων ή μορίων, ή στην παραγωγή ιοντικών θραυσμάτων μορίων και την καταγραφή της σχετικής έντασης του ιοντικού ρεύματος που αντιστοιχεί σε κάθε λόγο μάζας προς φορτίο (m/z) [89]. Η μορφή του φάσματος μαζών, που λαμβάνεται κάτω από αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες, είναι χαρακτηριστική της αρχικής ένωσης και χρησιμοποιείται για την ταυτοποίησή της. Οι μέθοδοι φασματομετρίας μάζας είναι κατάλληλες για ποσοτικοποίηση μόνο αφού έχει προηγηθεί χρωματογραφικός διαχωρισμός.

Από το 1995 και μετά, η ανάπτυξη της φασματομετρίας μάζας είναι ταχύτατη και εφαρμόζεται ευρέως σε πολλούς τομείς τεχνολογίας και έρευνας. Η πρόοδος στη μικροηλεκτρονική και οι αυξανόμενες απαιτήσεις στη χημική ανάλυση, έχουν προωθήσει σημαντικά την ανάπτυξη της τεχνικής και την έχουν καταστήσει απαραίτητο εργαλείο για μεγάλο φάσμα ερευνητικών δραστηριοτήτων, καθώς η φασματομετρία μάζας προσφέρει πληροφορίες για [89]:

- (α) την ποιοτική και ποσοτική σύσταση αγνώστων μειγμάτων
- (β) τη χημική δομή πολύ μεγάλου αριθμού ενώσεων
- (γ) την παρουσία και το ποσοστό ισοτόπων
- (δ) τη δομή και τη σύσταση επιφανειών με μορφή απεικόνισης (MS Imaging).

Η δυναμική της φασματομετρίας μάζας στην αναλυτική χημεία μπορεί να αποδοθεί σε πολλά χαρακτηριστικά της, τα οποία την κατατάσσουν πολύ υψηλά σε σχέση με τις υπόλοιπες αναλυτικές τεχνικές. Αρχικά, με την ακριβή μέτρηση των σχετικών μοριακών μαζών επιτυγχάνεται μεγάλη εκλεκτικότητα που επιτρέπει την απόλυτη ταυτοποίηση ενώσεων ακόμη και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, ενώ παράλληλα εμφανίζει εξαιρετική ευαισθησία, που φτάνει έως τα 10^{-18} mol. Επίσης, το γεγονός ότι η φασματομετρία μάζας μπορεί θεωρητικά να δράσει σαν ολικός ανιχνευτής (universal detector), την καθιστά κατάλληλη για την ανάλυση οποιασδήποτε ένωσης, ενώ, παρέχει και τη δυνατότητα εύρεσης της δομής αγνώστων ενώσεων, συνεισφέροντας στην επίλυση βιοχημικών προβλημάτων [89, 90].

5.2.1 Γενική Περιγραφή του Οργάνου

Ένας τυπικός φασματογράφος μαζών, όπως φαίνεται στο Σχήμα 5.1, αποτελείται από τα εξής επιμέρους τμήματα [85]:

1) Το σύστημα της εισαγωγής του δείγματος

Σκοπός αυτού του τμήματος της διάταξης είναι η εισαγωγή του δείγματος σε αέρια ή υγρή μορφή χωρίς τη διατάραξη του κενού. Υπάρχουν διαφορετικά συστήματα για την εισαγωγή αερίων, υγρών ή στερεών δειγμάτων. Στην περίπτωση όπου η φασματομετρία μάζας είναι σε σύζευξη με σύστημα υγρής χρωματογραφίας, η εισαγωγή δείγματος γίνεται μέσω μιας διάταξης σύζευξης. Για την εισαγωγή στερεών ή μη πτητικών υγρών χρησιμοποιείται ειδικό σύστημα εισαγωγής δείγματος με ακροφύσιο (direct probe), το οποίο εισέρχεται στην πηγή ιόντων. Το ακροφύσιο συχνά είναι μεταλλικός ή υάλινος σωλήνας, ο οποίος, συνήθως, καταλήγει σε μικροδοχείο όπου και βρίσκεται το προς ανάλυση δείγμα.

2) Την πηγή ιόντων

Εδώ, τα εισερχόμενα μόρια μετατρέπονται σε ιόντα είτε με βομβαρδισμό με ηλεκτρόνια ή ιόντα ή μόρια ή φωτόνια, είτε με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου ή υψηλής θερμοκρασίας. Συχνά το σύστημα εισαγωγής συνενώνεται με την πηγή ιόντων. Το προϊόν του ενιαίου αυτού τμήματος είναι ένα ρεύμα ιόντων (συνήθως θετικά φορτισμένων) τα οποία στη συνέχεια επιταχύνονται και εισέρχονται στον αναλυτή μαζών.

3) Έναν ή περισσότερους αναλυτές μάζας

Εδώ λαμβάνει χώρα διαχωρισμός των ιόντων σύμφωνα με το λόγο της μάζας προς φορτίο (m/z). Υπάρχουν διάφορες κατηγορίες αναλυτών μαζών των οποίων η λειτουργία βασίζεται σε διαφορετικές αρχές.

4) Τον ανιχνευτή

Σκοπός της διάταξης αυτής είναι να συλλάβει τα διαχωριζόμενα ιόντα και να τα μετατρέψει σε ηλεκτρικό σήμα.

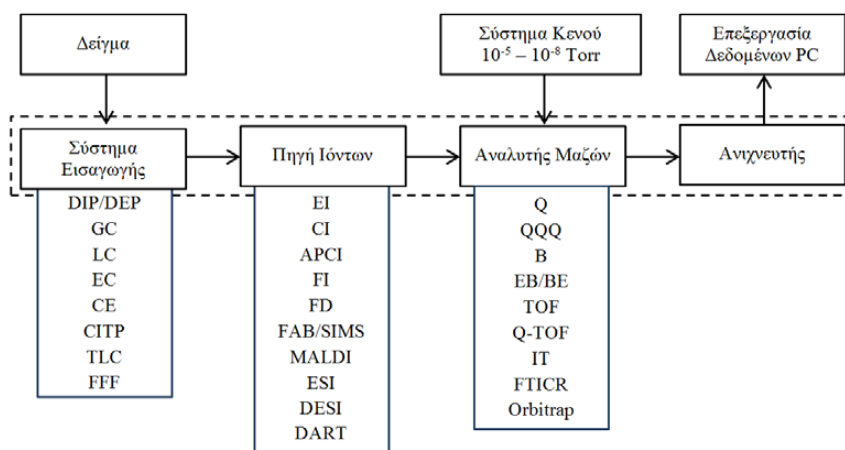
5) Το σύστημα κενού

Όλα τα φασματόμετρα μάζας λειτουργούν υπό υψηλό κενό, επομένως η λειτουργία τους εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό από την πίεση. Το υψηλό κενό εξασφαλίζει τη χαμηλή πίεση που είναι απαραίτητη ώστε να αποτραπεί τυχόν σύγκρουση των ιόντων με άλλα αέρια μόρια πριν φτάσουν στον ανιχνευτή. Τυχόν συγκρούσεις θα

προκαλούσαν απόκλιση της τροχιάς του μετρούμενου ιόντος, το οποίο θα έχανε το φορτίο του εξαιτίας της πρόσκρουσης με τα τοιχώματα του οργάνου. Επίσης, τέτοιες συγκρούσεις θα μπορούσαν να προκαλέσουν ανεπιθύμητη θραυσματοποίηση του ιόντος, με αποτέλεσμα την εξαγωγή πολύπλοκων φασμάτων. Μεταξύ της πηγής ιόντων και του ανιχνευτή η εφαρμοζόμενη πίεση κυμαίνεται μεταξύ 10^{-4} – 10^{-7} Pa, και ρυθμίζεται μέσω ισχυρού συστήματος παραγωγής κενού, το οποίο αποτελείται από μηχανικές αντλίες, οι οποίες δημιουργούν αρχικά ένα κενό έως και 0,13 Pa. Το κενό αυτό μπορεί να μειωθεί περισσότερο σε συνδυασμό με στροβιλομοριακές αντλίες, αντλίες διάχυσης ή κρυογονικές [85, 88]. Το σύστημα των οπτικών φακών είναι ένα επίσης σημαντικό τμήμα του φασματομέτρου μάζας, καθώς ο ρόλος του είναι να περιορίζει την απόκλιση της δέσμης ιόντων και να βοηθά στην εστίασή της προς συγκεκριμένη κατεύθυνση. Η αποκλίνουσα δέσμη ιόντων ελέγχεται μέσω προ- και μετα- φίλτρων, με ειδικούς δακτυλιοειδείς φακούς, στην είσοδο και στην έξοδο του αναλυτή μάζας, αντίστοιχα. Τα οπτικά αυτά συστήματα ονομάζονται αλλιώς και συσκευές εστίασης ή οδηγοί ιόντων [85, 90, 91].

6) Έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή εξοπλισμένο με το κατάλληλο λογισμικό

Με τη βοήθεια κατάλληλου λογισμικού το σήμα του ανιχνευτή μετατρέπεται σε χρωματογράφημα και σε φάσμα μάζας. Αυτό ελέγχει όλη λειτουργία του οργάνου καθ' όλη τη διάρκεια των αναλύσεων, ενώ επίσης καταχωρεί και επεξεργάζεται τα δεδομένα. Οι σύγχρονες διατάξεις χρησιμοποιούν πολύ εξελιγμένα λογισμικά, τα οποία εκτός των άλλων εκτελούν ταχύτατη βαθμονόμηση του φασματομέτρου, ταυτοποιούν τα ιοντικά θραύσματα με βάση τις ακριβείς τιμές m/z ή από τις σχετικές τιμές των ισοτοπικών κορυφών και τέλος, με βάση τα φασματικά δεδομένα κάνουν προκαταρκτικές για την ταυτότητα της εξεταζόμενης ένωσης.



Σχήμα 5.1 Σχηματική απεικόνιση της διάταξης του φασματομέτρου μάζας.

5.3 Τεχνικές ιοντισμού

Το πρώτο βήμα στη φασματομετρία μάζας είναι η μετατροπή των μορίων των προσδιοριζόμενων ενώσεων σε αέρια ιόντα με τη βοήθεια κάποιας τεχνικής ιοντισμού. Η επιλογή της τεχνικής ιοντισμού που θα εφαρμοστεί είναι πολύ σημαντική για την ανάλυση που θα ακολουθήσει, καθώς για την ίδια ένωση, με την εφαρμογή διαφορετικών τεχνικών και συνθηκών ιοντισμού, το λαμβανόμενο φάσμα μπορεί να είναι τελείως διαφορετικό [89]. Συνεπώς, η τεχνική ιοντισμού είναι η βασική παράμετρος που καθορίζει τη μορφή του φάσματος μαζών. Η επιλογή της κατάλληλης τεχνικής ιοντισμού εξαρτάται από τη φύση και τις φυσικοχημικές ιδιότητες του αναλύτη που πρόκειται να προσδιοριστεί, από την ενόργανη διάταξη που θα χρησιμοποιηθεί, καθώς και από το είδος της αναλυτικής πληροφορίας που θέλουμε να εξάγουμε [85].

Μία πρώτη ταξινόμηση των τεχνικών ιοντισμού μπορεί να γίνει σε «ήπιες ή μαλακές» και σε «σκληρές» τεχνικές. Στις σκληρές τεχνικές ιοντισμού μεταδίδεται στα μόρια του αναλύτη υψηλή ενέργεια, ώστε αυτά να βρεθούν σε έντονα διεγερμένη ενεργειακή κατάσταση, έτσι ώστε κατά την αποδιέγερσή τους να προκληθεί σπάσιμο δεσμών και εκτενής θραυσματοποίηση των μορίων, με τελικό αποτέλεσμα την παραγωγή ιοντικών θραυσμάτων με λόγους m/z μικρότερους από το μητρικό ιόν. Αντίθετα, στις ήπιες τεχνικές, ο ιοντισμός επιτυγχάνεται με ηπιότερες συνθήκες, προκαλώντας περιορισμένη θραυσματοποίηση των μορίων του αναλύτη, και κατά συνέπεια, το λαμβανόμενο φάσμα μαζών αποτελείται από την κύρια μορφή του μοριακού ιόντος και ένα μικρό πλήθος επιπλέον κορυφών, που αντιστοιχούν στα προϊόντα θραύσης [85, 89].

Οι πληροφορίες που αντλούνται από τα φάσματα που προκύπτουν είτε από τις σκληρές είτε από τις ήπιες τεχνικές είναι ιδιαίτερα χρήσιμες. Στην πρώτη περίπτωση, ο μεγάλος αριθμός των κορυφών μας δίνει πληροφορίες για το ποιες χαρακτηριστικές ομάδες υπήρχαν στο αρχικό μόριο και άρα μπορούμε να αποκτήσουμε μια σαφή εικόνα της δομής του, ενώ, στη δεύτερη περίπτωση τα φάσματα μας δίνουν την δυνατότητα να υπολογίσουμε με μεγαλύτερη ακρίβεια τη σχετική μοριακή μάζα των μορίων του αναλύτη [85].

Με βάση τις φυσικοχημικές ιδιότητες των προσδιοριζόμενων ενώσεων, οι πηγές ιοντισμού μπορούν επίσης να ταξινομηθούν σε δύο βασικές κατηγορίες: (α) στις πηγές αέριας φάσης και (β) στις πηγές εκρόφησης. Στην πρώτη κατηγορία, το αναλυόμενο δείγμα αρχικά εξαερώνεται και στη συνέχεια ιονίζεται, ενώ στη δεύτερη, το δείγμα απορροφά ενέργεια από κάποια πηγή, τα μόρια του εκροφόνται και μετατρέπονται κατευθείαν σε ιόντα που βρίσκονται στην αέρια φάση. Οι πηγές εκρόφησης μπορούν

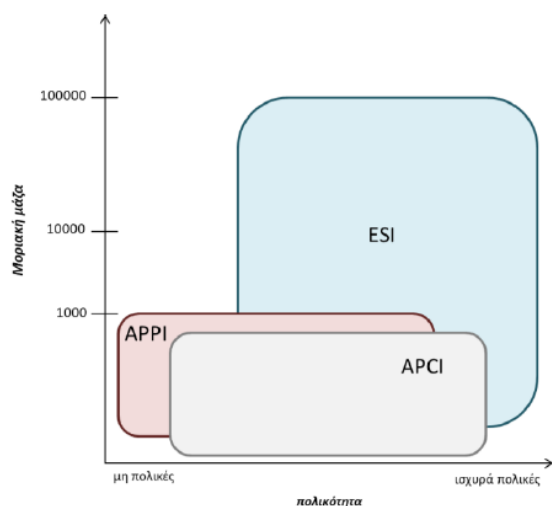
να ταξινομηθούν περαιτέρω σε δύο υποκατηγορίες, στις πηγές ιοντισμού υγρής φάσης και στις πηγές ιοντισμού στερεάς κατάστασης [85, 88].

5.3.1 Ιοντισμός σε αέρια φάση

Ο ιοντισμός σε αέρια φάση είναι μία από τις πιο συνηθισμένες πρακτικές. Συνήθως εφαρμόζεται σε ενώσεις θερμικά σταθερές, με σημεία ζέσεως μικρότερα από 500 °C, οπότε υπάρχουν περιορισμοί, όσον αφορά τη σχετική μοριακή μάζα των προσδιοριζόμενων ενώσεων, η οποία δε μπορεί να ξεπεράσει τα 1000 Da [85, 89].

Οι τεχνικές ιοντισμού σε αέρια φάση διαχωρίζονται σε αυτές που εφαρμόζονται σε συνθήκες κενού, και συνδυάζονται κυρίως με την αέρια χρωματογραφία, όπως ο ιοντισμός με ηλεκτρόνια, και στις τεχνικές ατμοσφαιρικής πίεσης, οι οποίες έχουν κυριαρχήσει στη φασματομετρία μάζας σε σύζευξη με τεχνικές διαχωρισμού στην υγρή φάση (LC-MS, CE-MS) και αντιπροσωπεύουν το μεγαλύτερο τμήμα των εφαρμογών και της αγοράς οργάνων [89].

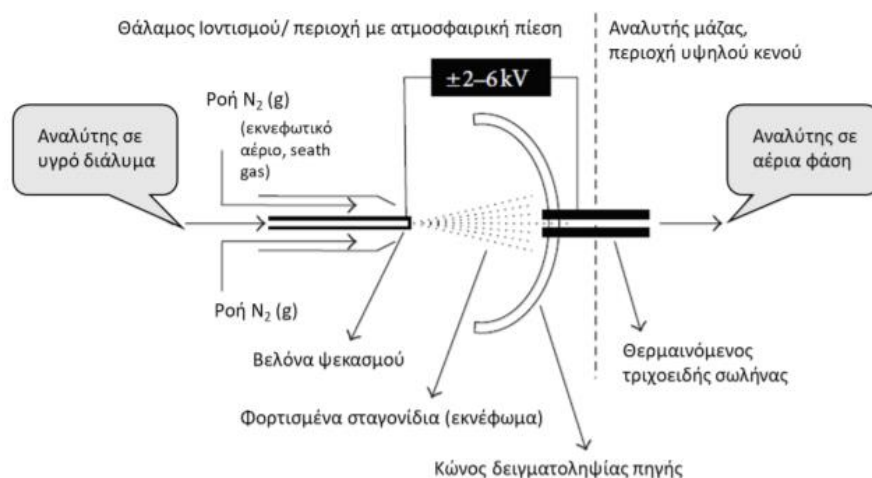
Οι τεχνικές ιοντισμού ατμοσφαιρικής πίεσης περιλαμβάνουν τον Ηλεκτροψεκασμό (Electrospray Ionization, ESI), το Χημικό Ιοντισμό σε ατμοσφαιρική πίεση (Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI), το Φωτοϊονισμό σε ατμοσφαιρική πίεση (Atmospheric Pressure Photo Ionization, APPI). Η επιλογή της τεχνικής ή των διάφορων μορφών αυτής εξαρτάται από την απόδοση ιοντισμού ανά περίπτωση. Η τεχνική του ηλεκτροψεκασμού μπορεί να εφαρμοστεί για την ανάλυση ενώσεων μέσης έως υψηλής πολικότητας και με μοριακά βάρη έως 100.000, ενώ οι APCI και APPI εφαρμόζονται σε πιο μικρά και πιο άπολα μόρια, όπως λιπίδια, στεροειδή, ορμόνες κλπ. Στην παρούσα εργασία, επιλέχθηκε η τεχνική ESI που θα περιγραφεί αναλυτικότερα παρακάτω, στην παράγραφο 4.3.1.1. Στο Σχήμα 5.2 παρουσιάζεται η καταλληλότητα και η χρήση των τεχνικών ιοντισμού ατμοσφαιρικής πίεσης σε σχέση με την πολικότητα (άξονας x) και τις μοριακές μάζες (άξονας y) των προσδιοριζόμενων ενώσεων [89].



Σχήμα 5.2 Το πεδίο εφαρμογής των τεχνικών ιοντισμού σε ατμοσφαιρική πίεση [89].

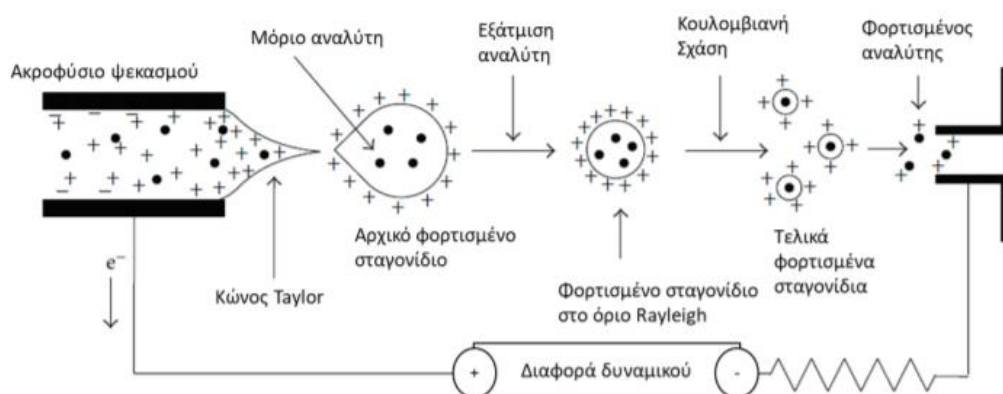
5.3.1.1 Ιοντισμός με Ηλεκτροψεκασμό (ESI)

Η τεχνική του Ηλεκτροψεκασμού (ESI) αποτελεί την κυριότερη και πλέον διαδεδομένη μέθοδο σύζευξης υγρής χρωματογραφίας με φασματομετρία μάζας (LC–MS). Ανήκει στις ήπιες τεχνικές ιοντισμού και επιτρέπει την ανάλυση ενώσεων με σχετικές μοριακές μάζες μεγαλύτερες από 100.000Da, βρίσκοντας έτσι εφαρμογή και στον προσδιορισμό βιομορίων, όπως πρωτεΐνες και νουκλεοτίδια. Βασίζεται στην παρατήρηση ότι όταν ένα υγρό ψεκάζεται μέσω ενός τριχοειδούς σωλήνα μέσα σε πεδίο μερικών χιλιάδων βολτ, το υγρό διασπείρεται σε ένα νέφος από πολύ μικρές φορτισμένες σταγόνες, όπως φαίνεται στο Σχήμα 5.3.



Σχήμα 5.3 Συνοπτικό σχήμα της πηγής ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό.

Ο ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό βασίζεται στην εφαρμογή ενός ισχυρού ηλεκτρικού πεδίου, υπό συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης, σε ένα υγρό που διέρχεται με χαμηλή ροή (1-10 $\mu\text{L}/\text{min}$) μέσα από ένα μεταλλικό τριχοειδή σωλήνα. Για την παραγωγή του ηλεκτρικού πεδίου απαιτείται εφαρμογή υψηλού δυναμικού (3-6 kV), μεταξύ του μεταλλικού τριχοειδούς και ενός παρακείμενου αντιηλεκτροδίου, τα οποία βρίσκονται σε απόσταση 0,3–2 cm. Με τον τρόπο αυτό προκαλείται στην άκρη του τριχοειδούς ένα αερόλυμα πολλαπλά φορτισμένων σταγόνων. Οι σταγόνες αυτές, όπως διασχίζουν την πηγή ιοντισμού και οδηγούνται προς το φασματόμετρο μάζας υφίστανται αποδιαλύτωση [91]. Σταδιακά, το μέγεθος των σταγόνων ελαττώνεται και τα φορτισμένα σωματίδια αναγκάζονται να συνυπάρξουν σε όλο και μικρότερο χώρο, με αποτέλεσμα τη δημιουργία κλιμακούμενων απωστικών δυνάμεων μεταξύ τους. Οι δυνάμεις που καθορίζουν τη σταθερότητα των παραγόμενων σταγονιδίων κατά τον ηλεκτροψεκασμό είναι οι απωστικές δυνάμεις που αναπτύσσονται μεταξύ των ομοίως φορτισμένων ιόντων που τείνουν να «σπάσουν» τη σταγόνα και η επιφανειακή τάση της σταγόνας που τείνει να την κρατήσει σταθερή. Με τη μείωση της διαμέτρου της σταγόνας, η επιφανειακή της τάση δεν αλλάζει δραματικά, όμως οι απωστικές δυνάμεις αυξάνονται μέχρι να φτάσουν την επιφανειακή τάση. Το σημείο αυτό ονομάζεται όριο Rayleigh, και τη στιγμή που ξεπεραστεί αυτό το όριο, δηλαδή όταν οι απωστικές δυνάμεις μεταξύ των φορτίων στην επιφάνεια κάθε σταγόνας υπερिशύουν των συνεκτικών δυνάμεων της επιφανειακής τάσης, λαμβάνει χώρα η έκρηξη Coulomb με αποτέλεσμα το σχηματισμό πολλών μικρότερων σταγονιδίων [88, 91], όπως φαίνεται και στο Σχήμα 5.4.



Σχήμα 5.4 Ο μηχανισμός του ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI).

Ακολουθεί αλληλουχία παρόμοιων εκρήξεων που τελικά οδηγούν στην παραγωγή αέριων ιόντων των ενώσεων που προσδιορίζονται. Όπως κατευθύνονται προς το φασματόμετρο μάζας, τα φορτισμένα σταγονίδια, περνούν μέσα από μια οπή δειγματοληψίας. Με αυτό το τρόπο απομακρύνονται και τα τελευταία μόρια διαλύτη, είτε μέσω θερμαινόμενου τριχοειδούς, είτε μέσω κουρτίνας θερμαινόμενου αδρανούς αερίου, το οποίο είναι συνήθως N_2 . Στο στάδιο αυτό συνήθως παρατηρείται βαθμιαία ελάττωση της πίεσης [88, 91].

5.3.1.2 Φάσματα ESI

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, ο ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό αποτελεί μια ήπια τεχνική ιοντισμού και επομένως τα φάσματα που παρέχονται αποτελούνται συνήθως από μοριακά ιόντα. Ειδικότερα, οι βασικές ενώσεις πρωτονιώνονται, φορτίζονται δηλαδή θετικά, συνεπώς ο παρακολουθούμενος λόγος m/z είναι $M+1$ και το φάσμα έχει τη μορφή $[M+H]^+$, όπου M είναι η μοριακή μάζα της ένωσης. Αντίθετα, τα οξέα αποπρωτονιώνονται, φορτίζονται δηλαδή αρνητικά, με το λόγο m/z να είναι $M-1$, και τα φάσματα της μορφής $[M-H]^-$. Ωστόσο, αν το μόριο διαθέτει περισσότερα από ένα σημεία που μπορεί να πραγματοποιηθεί πρωτονίωση ή αποπρωτονίωση, παρατηρούνται στο φάσμα και πολυφορτισμένα μοριακά ιόντα της ένωσης.

Στη μέθοδο θετικού ιοντισμού, ο ιοντισμός με ESI, μπορεί να προκαλέσει επίσης το σχηματισμό ιόντων προσθήκης (adduct ions). Τα συχνότερα εμφανιζόμενα ιόντα προσθήκης είναι τα παρακάτω: $[M+Na]^+$, $[M+NH_4]^+$, $[M+K]^+$, $[M+MeOH+H]^+$ και $[M+ACN+H]^+$. Παρόλο που στη μέθοδο αρνητικού ιοντισμού δεν είναι ιδιαίτερα πιθανός ο σχηματισμός ιόντων προσθήκης, μπορεί καμιά φορά να παρατηρηθούν ιόντα προσθήκης με οξικό και μυρμηκικό οξύ, $[M+HCOOH-H]^-$ και $[M+CH_3COOH-H]^-$ αντίστοιχα [88].

5.3.2 Ιοντισμός με εκρόφηση

Οι τεχνικές ιοντισμού με εκρόφηση εφαρμόζονται σε υγρά ή στερεά δείγματα, τα οποία δέχονται ενέργεια από πηγές, όπως δέσμη σωματιδίων, laser, κλπ. Με την απορρόφηση της ενέργειας, τα μόρια της αναλυόμενης εκροφόνται και μετατρέπονται απευθείας σε αέρια ιόντα. Τα φάσματα που λαμβάνονται είναι απλά και συχνά αποτελούνται μόνο από το μοριακό, το πρωτονιωμένο ή το αποπρωτονιωμένο ιόν. Ο ιοντισμός με εκρόφηση μπορεί να εφαρμοστεί και σε θερμικώς ασταθείς, μη πτητικές

ενώσεις, με μοριακές μάζες έως και 10^5 Da, καθώς δεν απαιτείται εξάτμιση των μορίων του αναλύτη. Οι πηγές εκρόφησης μπορούν να ταξινομηθούν στις εξής κατηγορίες [88, 89]:

- ❖ πηγές ιοντισμού υγρής φάσης
- ❖ πηγές στερεάς κατάστασης
- ❖ πηγές δευτερογενούς ιόντος σε ατμοσφαιρική πίεση,

5.4 Αναλυτές μαζών

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, μετά την παραγωγή αέριων ιόντων στη πηγή ιοντισμού, αυτά οδηγούνται προς τον αναλυτή μαζών, όπου διαχωρίζονται σύμφωνα με το λόγο μάζας προς φορτίο (m/z). Ο ιδανικός αναλυτής μάζας πρέπει να μπορεί να διαχωρίσει όσο το δυνατόν μικρότερες διαφορές m/z και να επιτρέπει την ανάλυση μεγάλου αριθμού ιόντων, έτσι ώστε να έχει τη μεγαλύτερη ευαισθησία και να είναι συμβατός με όλες τις τεχνικές εισαγωγής δείγματος και ιοντισμού [89].

Υπάρχουν διάφορα είδη αναλυτών μαζών, σε καθένα από τα οποία ο διαχωρισμός των ιόντων βασίζεται σε διαφορετικές αρχές. Παρόλο που όλοι οι αναλυτές μάζας χρησιμοποιούν στατικά ή δυναμικά, ηλεκτρικά και μαγνητικά πεδία, παρουσιάζουν μεταξύ τους διαφοροποιήσεις οι οποίες έγκεινται στον τρόπο με τον οποίο χρησιμοποιούν τα εν λόγω πεδία ώστε να πραγματοποιηθεί ο διαχωρισμός. Αυτές οι διαφοροποιήσεις είναι κριτήριο για την εκάστοτε επιλογή του καταλληλότερου αναλυτή για την επιθυμητή εφαρμογή [88, 89].

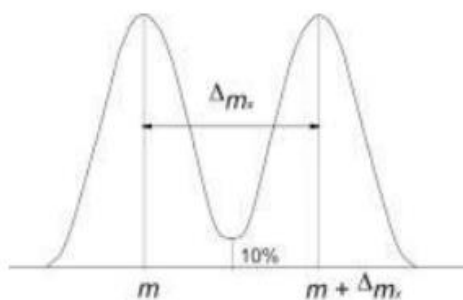
Οι αναλυτές μαζών μπορούν να διακριθούν σε τρεις μεγάλες κατηγορίες: (α) τους αναλυτές σάρωσης, όπως ο τετραπολικός αναλυτής μαζών (Q), (β) τους παλμικούς αναλυτές μαζών, όπως οι αναλυτές χρόνου πτήσης (TOF), η τετραπολική παγίδα ιόντων (ion trap, IT) και ο αναλυτής κυκλοτρονικού συντονισμού ιόντων με μετασχηματισμό Fourier (FT-ICR) και (γ) τους υβριδικούς αναλυτές που περιλαμβάνουν συνδυασμό αναλυτών σε σειρά, ώστε να αυξηθούν οι δυνατότητες χρήσεις και να είναι δυνατή η εκτέλεση πολλαπλών πειραμάτων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα υβριδικών αναλυτών αποτελούν το Orbitrap και το Q-TOF [85,88]. Ο τετραπολικός αναλυτής μαζών (Q) που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία περιγράφεται αναλυτικότερα στην παράγραφο 4.4.1.

Βασικά χαρακτηριστικά των αναλυτών μαζών είναι η διαχωριστική ή διακριτική ικανότητα (resolution ή resolving power, R), η ταχύτητα ανάλυσης, το εύρος μαζών και η διαπερατότητα των ιόντων. Η διαχωριστική ικανότητα, η οποία αποτελεί το σημαντικότερο από τα παραπάνω μεγέθη, από την Εξίσωση 5.1:

$$R = \frac{m}{\Delta m} \quad (5.1)$$

Όπου: Δm διαφορά μαζών m_1 και m_2 , μεταξύ δύο μόλις διαχωριζόμενων κορυφών και m είναι η τιμή της μάζας της πρώτης κορυφής ή η μέση τιμή των δύο κορυφών του φάσματος.

Αν δύο κορυφές έχουν παρόμοια ένταση, τότε, θεωρείται ότι διαχωρίζονται ικανοποιητικά όταν το ύψος της βασικής γραμμής μεταξύ τους είναι μικρότερο του 10% του ύψους τους (Σχήμα 5.5). Στην περίπτωση που δεν υπάρχει γειτονική κορυφή με παρόμοια ένταση ώστε να προκύψει σύγκριση και να οριστεί επαρκώς η αλληλοεπικάλυψη, τότε ως Δm χρησιμοποιείται το πλήρες εύρος στο μισό του μέγιστου της κορυφής ενδιαφέροντος (Full Width Half Minimum, FWHM) [88, 89].



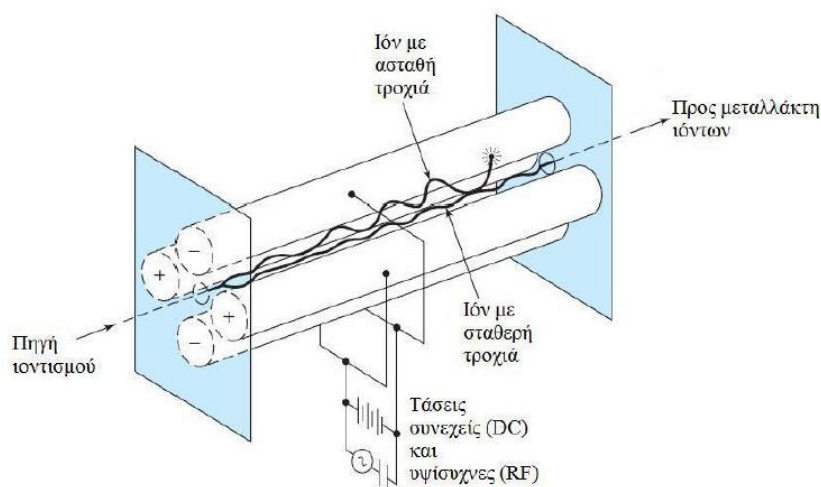
Σχήμα 5.5 Διαχωριστική ικανότητα στη φασματομετρία μαζών.

Πρακτικά, ένας φασματογράφος μαζών με διαχωριστική ικανότητα 1000 μπορεί να διαχωρίσει το ιόν με τιμή m/z 100,1 από το 100,2 ή το ιόν με τιμή m/z 1001 από το 1000. Με βάση τη διαχωριστική τους ικανότητα, τα φασματομέτρα μαζών διακρίνονται σε χαμηλής και υψηλής διαχωριστικής ικανότητας. Η ταυτόχρονη επίτευξη υψηλής διαχωριστικής ικανότητας και υψηλής ευαισθησίας δεν είναι εφικτή. Συνεπώς, σε όργανα πολύ υψηλής διακριτικής ικανότητας, όταν απαιτείται υψηλή ευαισθησία, επιλέγεται συχνά η λειτουργία σε χαμηλότερη διαχωριστική ικανότητα [89].

5.4.1 Τετραπολικός Αναλυτής (Quadrupole)

Ο τετραπολικός αναλυτής μάζας (Quadrupole mass analyzer) παρέχει τη δυνατότητα διαχωρισμού των προϊόντων της θραυσματοποίησης βάσει του λόγου m/z , απουσία μαγνητικού πεδίου. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιεί τη σταθερότητα της τροχιάς ιόντων, που βρίσκονται μέσα σε κυματοειδές ηλεκτρικό πεδίο, για να διαχωρίσει ιόντα με βάση τους λόγους m/z .

Οι τετραπολικοί αναλυτές αποτελούνται από τέσσερις παράλληλες ράβδους με κυλινδρική διατομή, συμμετρικά τοποθετημένες ως προς τη δέσμη ιόντων και διαγωνίως συνδεδεμένες μεταξύ τους. Η διάμετρος της κάθε ράβδου είναι περίπου 6mm και το μήκος της κυμαίνεται περί τα 10cm. Κάθε ζεύγος ράβδων συνδέεται με τον πόλο πηγής τάσεως, που περιέχει μια συνεχή (DC) και μια εναλλασσόμενη υψηλής συχνότητας, στην περιοχή των ραδιοσυχνοτήτων, συνιστώσα (RF). Τα εξερχόμενα από την πηγή ιόντα επιταχύνονται προς τον κεντρικό χώρο, που αποτελεί το τετράπολο ηλεκτρικό πεδίο κατά μήκος του άξονα, που οδηγεί στον ανιχνευτή (άξονας z). Βάσει των παραμέτρων του εναλλασσόμενου δυναμικού, της έντασης του συνεχούς ρεύματος και του εύρους του πεδίου καθορίζεται ο λόγος m/z των θραυσμάτων, που τελικώς θα εξέλθουν από το φίλτρο μάζας. Κατά συνέπεια, μόνο τα ιόντα με ορισμένη τιμή m/z θα εξέλθουν από το τετραπολικό φίλτρο, ενώ τα υπόλοιπα θα προσκρούσουν στους πόλους, θα χάσουν το φορτίο τους και θα απομακρυνθούν από το σύστημα με εφαρμογή ισχυρού κενού. Στο Σχήμα 5.6 απεικονίζεται η διάταξη του τετραπολικού αναλυτή μάζας και παριστάνονται οι πιθανές πορείες των ιόντων [85,88].



Σχήμα 5.6 Τετραπολικός ανιχνευτής μάζας.

5.4.1.1 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα του τετραπολικού αναλυτή

Ένα από τα κύρια πλεονεκτήματα του τετραπολικού αναλυτή μάζας είναι η μεγάλη ταχύτητα σάρωσης, η οποία επιτρέπει τη λήψη φάσματος σε λίγα χιλιοστά του δευτερολέπτου. Κατά συνέπεια διευκολύνεται η σύζευξη με χρωματογραφικές τεχνικές, καθώς τα φάσματα μαζών των διαχωριζόμενων ενώσεων λαμβάνονται τη στιγμή της έκλουσής τους. Ένα ακόμα πλεονέκτημα του τετραπολικού αναλυτή είναι οι μέτριες απαιτήσεις κενού (10^{-5} Torr), που τον καθιστούν ιδανικό για σύζευξη με πηγές ιοντισμού ατμοσφαιρικής πίεσης. Ακόμη, είναι αξιόπιστος, φθηνός, μικρός σε μέγεθος και εύκολος στη χρήση. Τέλος, είναι κατάλληλος για ποσοτική ανάλυση και έχει τη δυνατότητα σύζευξης με διαδοχικούς αναλυτές, όπως το τριπλό τετράπολο [88, 89].

Στα μειονεκτήματα του τετραπολικού αναλυτή μάζας περιλαμβάνεται η σχετικά χαμηλή διαχωριστική ικανότητα, οποία κυμαίνεται μεταξύ 1000 – 2000, που όμως μπορεί να φτάσει έως και 5000. Επίσης, οι τετραπολικοί αναλυτές έχουν περιορισμένο εύρος μαζών με τη μέγιστη τιμή m/z να φτάνει τα 4000 u και ακρίβεια μάζας περίπου 0,5 u [88, 89].

5.5 Τεχνικές ανάλυσης φασματομετρίας μάζας

Οι κύριες τεχνικές ανάλυσης που χρησιμοποιούνται στη φασματομετρία μαζών είναι [89]:

- 1) η τεχνική πλήρους σάρωσης (Full Scan, FS)
- 2) η τεχνική της επιλεκτικής παρακολούθησης ιόντων (Single Ion Monitoring, SIM)
- 3) η φασματομετρία μαζών σε σειρά (Tandem Mass Spectrometry, MS/MS), η οποία διακρίνεται σε περαιτέρω υποκατηγορίες τεχνικών σάρωσης.

Στην πρώτη περίπτωση, στην τεχνική πλήρους σάρωσης (FS) λαμβάνεται το ολικό φάσμα μεταξύ δύο τιμών m/z για καθορισμένο χρόνο. Η μέθοδος χρησιμοποιείται ευρέως για τον προσδιορισμό της δομής και την επιβεβαίωση της ταυτότητας μιας άγνωστης ένωσης, είτε με προσδιορισμό του μοριακού της βάρους, είτε μέσω σύγκρισης με πρότυπα φάσματα. Με την αύξηση του χρόνου σάρωσης, αυξάνεται και ο συνολικός αριθμός των ιόντων που φθάνουν στον ανιχνευτή, συνεπώς αυξάνεται και η ευαισθησία της μέτρησης. Η αύξηση της ευαισθησίας μπορεί επίσης να επιτευχθεί

με μείωση του εύρους σάρωσης ή με αύξηση του χρόνου σάρωσης, ωστόσο υπάρχει ο κίνδυνος να χαθούν πληροφορίες [89, 90].

Η τεχνική της επιλεκτικής παρακολούθησης ιόντων (SIM) είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για την ανάλυση ουσιών που απαντώνται σε ίχνη και εφαρμόζεται όταν η ανάλυση στοχεύει στη μέτρηση ενώσεων με γνωστά φάσματα. Επιλέγονται κάποια χαρακτηριστικά ιόντα του φάσματος μιας συγκεκριμένης ένωσης και ο αναλυτής μεταβαίνει τάχιστα από τη μια μάζα στην άλλη, μετρώντας μόνο τις επιλεγμένες. Τα χαμηλότερα όρια ανίχνευσης και η μεγαλύτερη ταχύτητα που εμφανίζει η SIM σε σχέση με την ολική σάρωση οφείλεται ακριβώς στον έλεγχο και την παρατήρηση ενός πολύ μικρού αριθμού ιόντων, και συνεπώς χρησιμοποιείται περισσότερο στην ποσοτική ανάλυση. Η τεχνική αυτή έχει μεγάλη ευαισθησία, αλλά υπάρχει ο κίνδυνος για ψευδώς θετικά αποτελέσματα (false positives), καθώς οποιαδήποτε ένωση δίνει τα ίδια ιόντα με τα επιλεγμένα μπορεί να συμπροσδιοριστεί [89, 90].

Η φασματομετρία μάζας σε σειρά (MS/MS) περιλαμβάνει δύο ή περισσότερα επίπεδα φασματομετρικής ανάλυσης και σε σχέση με τις υπόλοιπες τεχνικές φασματομετρίας μαζών, αποτελεί τη συχνότερα χρησιμοποιούμενη. Σε τριπλά τετράπολα ή υβρίδια τα επιμέρους τμήματα μπορούν να επιλέξουν αν θα περάσει ένα ιόν ή αν θα μεταφερθούν όλα τα ιόντα. Μεταξύ των επιπέδων MS τα ιόντα μπορούν να υποβληθούν σε διάφορες διαδικασίες, όπως σύγκρουση με αδρανή ή δραστικά αέρια, ηλεκτρόνια ή άλλα ιόντα, επιτάχυνση, επιβράδυνση, σταθεροποίηση κ.α. Με την επιλογή ανάμεσα στους διάφορους αναλυτές MS σάρωσης ή μη σάρωσης και ανάμεσα στις διάφορες διαδικασίες στις οποίες υποβάλλονται τα ιόντα μεταξύ των αναλυτών, δίνεται η δυνατότητα πραγματοποίησης πολυάριθμων πειραμάτων MS/MS, τα οποία μπορούν να προσφέρουν πολύτιμες πληροφορίες για τη δομή της αναλυόμενης ένωσης και να αυξήσουν την ειδικότητα και την ευαισθησία της μέτρησης [89].

5.6 Σύζευξη υγρής χρωματογραφίας και φασματομετρίας μάζας

Τις τελευταίες δεκαετίες, στο χώρο της εργαστηριακής χημείας, άρχισαν να χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο συζευγμένες τεχνικές, έτσι ώστε να συνδυάζονται οι δυνατότητες και τα πλεονεκτήματά τους με σκοπό τα καλύτερα δυνατά αποτελέσματα. Η πιο πρόσφατα εξελιγμένη τεχνική διαχωρισμού και προσδιορισμού στην ανάλυση των υπολειμμάτων οργανικών μικρορύπων είναι ο συνδυασμός των τεχνικών υγρής χρωματογραφίας και φασματομετρίας μάζας (LC-MS). Η τεχνική συνδυάζει την εγκυρότητα της ταυτοποίησης των υπολειμμάτων που προσδίδει η

φασματομετρία μάζας και την ευελιξία του διαχωρισμού πλήθους ενώσεων που παρέχει η υγρή χρωματογραφία [89, 91].

Κατά το διαχωρισμό ενός μίγματος ενώσεων με τη χρήση ανιχνευτών απορρόφησης και φθορισμού, η ταυτοποίηση των κορυφών βασίζεται στη σύγκριση των χρόνων κατακράτησης των προσδιοριζόμενων ενώσεων στο δείγμα, με τους αντίστοιχους χρόνους κατακράτησης σε ένα πρότυπο διάλυμα, υπό τις ίδιες πειραματικές συνθήκες. Ωστόσο, ο μεγάλος αριθμός ενώσεων με παρόμοιους χρόνους κατακράτησης καθιστά αδύνατη την ταυτοποίηση των ενώσεων με βεβαιότητα. Επίσης, με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας σε πολύπλοκα υποστρώματα δεν είναι πάντα εφικτός ο πλήρης διαχωρισμός όλων των συστατικών, καθώς μπορεί να εμφανιστούν φαινόμενα αλληλοεπικάλυψης των χρωματογραφικών κορυφών, με αποτέλεσμα ο ποσοτικός προσδιορισμός να μην είναι ιδιαίτερα αξιόπιστος, ή και σε ορισμένες περιπτώσεις ανέφικτος [91].

Από την άλλη, η φασματομετρία μάζας έχει την ικανότητα ταυτοποίησης ενώσεων με υψηλό βαθμό αξιοπιστίας, καθώς για πολλές ενώσεις τα φάσματα μαζών είναι μοναδικά. Παρόλα αυτά, αν η προσδιοριζόμενη ένωση αποτελεί συστατικό ενός μίγματος, και εισαχθεί στο φασματόμετρο μάζας, χωρίς να έχει προηγηθεί ο διαχωρισμός, τότε το φάσμα θα περιέχει και τα ιόντα των υπόλοιπων συστατικών, δυσκολεύοντας έτσι την ταυτοποίηση. Ειδικά σε περιπτώσεις που οι προσδιοριζόμενες ενώσεις βρίσκονται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις ή ίχνη, τότε ο προσδιορισμός είναι αδύνατος [91].

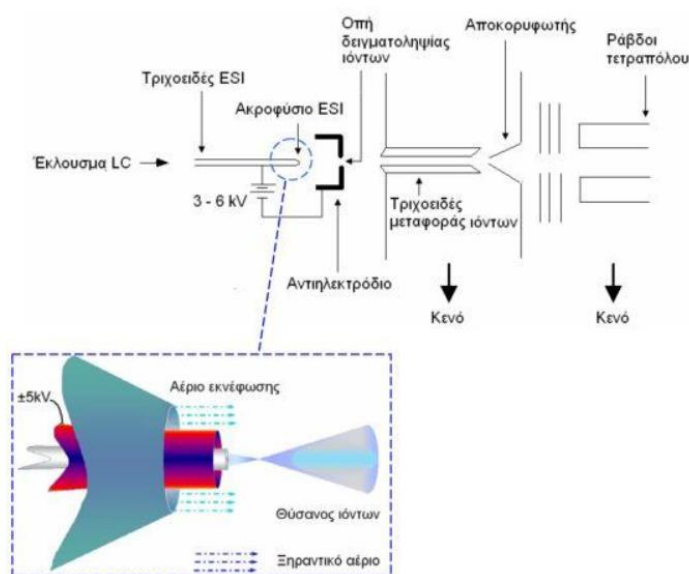
Συνεπώς, η σύζευξη των δύο τεχνικών επιτρέπει την εισαγωγή διαχωρισμένων ουσιών μίγματος στο φασματόμετρο μαζών, προσφέροντας αξιόπιστη ταυτοποίηση, ακόμα και εάν δεν είναι πλήρης ο διαχωρισμός, καθώς ενώσεις που έχουν παρόμοιους χρόνους κατακράτησης θα παρουσιάζουν διαφοροποίηση στο φάσμα μαζών τους. Τέλος, ο ποσοτικός προσδιορισμός γίνεται με ακόμα μεγαλύτερη ακρίβεια, καθώς λαμβάνονται καλύτερα χρωματογραφήματα είτε από την παρακολούθηση ενός μόνο χαρακτηριστικού ιόντος (SIM) στην απλή φασματομετρία μαζών, ή χαρακτηριστικών μεταπτώσεων (SRM και MRM) όταν χρησιμοποιείται δίδυμη φασματομετρία μάζας [91].

5.6.1 Σύζευξη LC–ESI

Οι ροές που χρησιμοποιούνταν για την καλύτερη απόδοση των πρώτων πηγών ηλεκτροψεκασμού ήταν πολύ χαμηλές για να μπορέσουν να εφαρμοσθούν στην υγρή

χρωματογραφία. Για την αντιμετώπιση αυτής της ασυμβατότητας, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν οι συνήθεις τιμές ροής, η σύζευξη της υγρής χρωματογραφίας με πηγή ESI απαιτούσε τη χρήση είτε διαμοιραστών ροής μετά τη στήλη είτε τη χρήση τριχοειδών στηλών τηγμένης πυριτίας. Επίσης, η υψηλή αγωγιμότητα και η επιφανειακή τάση ορισμένων από τους κοινώς χρησιμοποιούμενους διαλύτες της υγρής χρωματογραφίας έχουν υψηλή αγωγιμότητα ή επιφανειακή τάση, είναι παράγοντες που δυσκολεύουν ακόμα περισσότερο τη σύζευξη. Για να αντιμετωπιστούν αυτά τα εμπόδια, ώστε να υπάρξει μια αποτελεσματική σύζευξη του LC με το ESI, χρησιμοποιούνται σύγχρονες υποβοηθούμενες ενδιάμεσες πηγές ESI, με την εσωτερική διάμετρο του ακροφυσίου του τριχοειδούς ηλεκτροψεκασμού να κυμαίνεται μεταξύ μερικών δεκάδων μm . Η χρήση τους επιτρέπει την εφαρμογή ροών στο LC μέχρι και 2 mL/min , με πνευματικά υποβοηθούμενη εκνέφωση (Ionspray, ISP) σε συνδυασμό με θερμαινόμενη πηγή εισόδου, προαιρετικά [92].

Η υποβοηθούμενη εκνέφωση πραγματοποιείται με παροχή αερίου ομοαξονικά στη ροή της κινητής φάσης (Σχήμα 5.7) ενισχύοντας τη δημιουργία των σταγόνων από την κύρια μάζα του υγρού και επιτρέποντας την εφαρμογή ροής περίπου 200 mL/min . Στην περίπτωση χρησιμοποίησης θερμαινόμενης πηγής εισόδου, ένα θερμαινόμενο τριχοειδές είναι τοποθετημένο στη σειρά, μετά το ακροφύσιο του ηλεκτροψεκασμού, έτσι ώστε να μπορούν οι παραγόμενες σταγόνες να εισχωρήσουν σε αυτό οδεύοντας προς τους φακούς εστίασης και το φασματόμετρο μάζας. Κάποιες φορές, για την αποδιαλύτωση των σταγόνων, χρησιμοποιείται επιπλέον ξηραντικό αέριο N_2 , που παρέχεται ομοαξονικά με τη ροή της κινητής φάσης, πιο μακριά από το εκνεφωτικό αέριο [92].



Σχήμα 5.7 Διάγραμμα LC-ESI-MS με πνευματικά υποβοηθούμενη εκνέφωση.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η παρουσία φυτοπροστατευτικών ενώσεων στο περιβάλλον αποτελεί σημαντικό ζήτημα και καθιστά αναγκαία την ανάπτυξη ευαίσθητων και αξιόπιστων αναλυτικών μεθόδων για τον έλεγχο της υπολειμματικότητάς τους σε διάφορα περιβαλλοντικά υποστρώματα. Τα τελευταία χρόνια, ο αριθμός των μελετών που αφορούν την ανάπτυξη και την εφαρμογή αναλυτικών μεθόδων για την εκτίμηση των επιπέδων συγκεντρώσεων και την τύχη τέτοιων ξеноβιοτικών ενώσεων στο περιβάλλον αυξάνεται συνεχώς. Στην πλειοψηφία τους, οι μελέτες αυτές ασχολούνται με επιφανειακά και υπόγεια νερά, με νερά από τις εισόδους και εξόδους των Μονάδων Επεξεργασίας Υγρών Αποβλήτων και λιγότερο με στερεά περιβαλλοντικά υποστρώματα, όπως έδαφος και ιζήματα.

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα, αντικείμενο της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας ήταν η ανάπτυξη, η βελτιστοποίηση και η επικύρωση μιας αναλυτικής μεθοδολογίας με στόχο τον ταυτόχρονο προσδιορισμό υπολειμμάτων 60 φυτοπροστατευτικών ενώσεων σε εδαφικά δείγματα. Πιο συγκεκριμένα, οι στόχοι που τέθηκαν ήταν:

1. Η ανάπτυξη και επικύρωση μιας πολύ-υπολειμματικής μεθόδου σε σύστημα Υγρής Χρωματογραφίας συζευγμένη με Φασματομετρία Μάζας για τον προσδιορισμό των φυτοπροστατευτικών ενώσεων σε δείγματα εδάφους, και
2. Η βελτιστοποίηση της μεθόδου QuEChERS στα στάδια εκχύλισης, κατανομής και καθαρισμού και τελικά η επικύρωσή της ως μέθοδος προκατεργασίας εδαφικών δειγμάτων.

Η σύγχρονη αναλυτική μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε είναι γρήγορη, εύκολη στη χρήση, φιλική προς το περιβάλλον, με σχετικά χαμηλό κόστος, αυξημένη ευαισθησία, καλύπτοντας ένα ευρύ φάσμα αναλυτών. Για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό, χρησιμοποιήθηκε σύστημα υγρής χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματομετρία μάζας (LC-MS). Η επικύρωση της μεθόδου πραγματοποιήθηκε με βάση την ισχύουσα νομοθεσία της ΕΕ, όπως αυτή ορίζεται στην οδηγία SANTE 11813/2017 [93].

B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

7.1 Πρότυπες ενώσεις- Διαλύτες- Αντιδραστήρια- Υλικά

7.1.1 Πρότυπες ενώσεις και πρότυπα διαλύματα

Οι πρότυπες ενώσεις των φυτοπροστατευτικών προϊόντων ήταν υψηλής καθαρότητας (>97%) και προμηθεύτηκαν από την εταιρία Merck (Darmstadt, Germany). Οι επιλεγμένες ενώσεις ήταν οι εξής:

A-Cypermethrin, Abamectin, Acetamiprid, Acetochlor, Azoxystrobin, Bitertanol mix , Bromuconazole, Bupirimate, Buprofezin, Carbaryl, Cyprodinil, Cyromazine, Diazinon, Dimethomorph, Ethiofencarb, Ethion, Ethoprophos, Fenamiphos, Fenazaquin, Fenpropimorph, Fenpyroximate, Fenthion, Fenvalerate, Fluazifop-P-butyl, Fluquinconazole, Flusilazole, Flutriafol, Formetanate, Imazalil, Kresoxim methyl, Mandipropamid, Mecarbam, Mepanipyrim, Metalaxyl, Methomyl, Methoxyfenozide, Metobromuron, Myclobutanil, Omethoate, Pendimethalin, Phosmet, Pirimicarb, Pirimiphos methyl, Propamocarb, Propaquizafop, Propargite, Prosulfocarb, Pyraclostrobin, Pyrimethanil, Pyriproxyfen, Quinoxifen, Quizalofop-P-ethyl, Spirodiclofen, Thiabendazole, Thiophanate methyl, Tolclofos methyl, Triadimefon, Triadimenol A, Trifloxystrobin, Triflumuron.

- *Πρότυπα διαλύματα*

Τα πυκνά πρότυπα διαλύματα (stock solutions) για κάθε προσδιοριζόμενη ένωση παρασκευάστηκαν ξεχωριστά, σε συγκέντρωση 2000 mg/L, σε διαλύτη ακετονιτρίλιο, και μεταφέρθηκαν σε γυάλινα φιαλίδια των 8 mL. Από τα παραπάνω πυκνά πρότυπα διαλύματα παρασκευάστηκε μίγμα των προσδιοριζόμενων φυτοπροστατευτικών ενώσεων σε συγκέντρωση 10 mg/L, σε διαλύτη ακετονιτρίλιο. Τόσο τα πυκνά πρότυπα διαλύματα, όσο και το μίγμα των φυτοπροστατευτικών ενώσεων κλείστηκαν αεροστεγώς με πώμα. και αποθηκεύτηκαν απουσία ηλιακής ακτινοβολίας στους -20°C.

Τα αραιωμένα πρότυπα διαλύματα εργασίας (working solutions) του μίγματος των φυτοπροστατευτικών ενώσεων παρασκευάζονταν σε διαλύτη ακετονιτρίλιο και σε διάφορες συγκεντρώσεις, κάθε φορά πριν από τη χρήση για την αποφυγή τυχόν διάσπασης ή αποσύνθεσης των ενώσεων.

7.1.2 Διαλύτες

- ❖ Υπερκάθαρο νερό milli-Q ειδικής αντίστασης 18,2 MΩ cm στους 25°C.
- ❖ Ακετονιτρίλιο (Acetonitrile, ACN) και μεθανόλη (Methanol, MeOH) υψηλής καθαρότητας, κατάλληλοι για ανάλυση με υγρή χρωματογραφία με φασματομετρία μάζας (LC/MS-grade) του οίκου Merck (Darmstadt, Germany).

7.1.3 Αντιδραστήρια

- ❖ Μυρμηκικό οξύ (HCOOH) καθαρότητας 98–100%, του οίκου Merck (Darmstadt, Germany).
- ❖ Οξικό οξύ (HAc) καθαρότητας 98–100%, του οίκου Merck (Darmstadt, Germany).
- ❖ Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (Ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) υψηλής καθαρότητας (>98%) του οίκου Merck (Darmstadt, Germany).
- ❖ Άνυδρο θειικό μαγνήσιο (magnesium sulfate anhydrous, MgSO₄) καθαρότητας 99,5% του οίκου Agilent Technologies (USA)
- ❖ Χλωριούχο νάτριο (sodium chloride, NaCl) του οίκου του οίκου Riedel de Haën (Hannover, Germany).
- ❖ Κιτρικό νάτριο (tri-sodium citrate dehydrate,) καθαρότητας 99% του οίκου Agilent Technologies (USA).
- ❖ Σεσκιυδρίτης διβασικού κιτρικού νατρίου (sodium citrate dibasic sesquihydrate) καθαρότητας 99% του οίκου Agilent Technologies (USA).

7.1.4 Προσροφητικά Υλικά

Για τον καθαρισμό των εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα εξής προσροφητικά υλικά:

- ❖ Πρωτοταγής Δευτεροταγής Αμίνη, (Primary Secondary Amine, PSA, 40 μm), του οίκου Agilent Technologies (USA).
- ❖ Γραφίτοποιημένος ενεργός άνθρακας (graphitized carbon black, GCB), του οίκου Agilent Technologies (USA).
- ❖ C₁₈ Endcapped, του οίκου Agilent Technologies (USA).
- ❖ Florisil (0,150-0,250 mm) του οίκου Merck (Darmstadt, Germany).

7.1.5 Υλικά και Σκεύη

- ❖ OECD έδαφος αναφοράς για δοκιμές φυτοτοξικότητας (Reference OECD soil for Phytotoxkit tests)

- ❖ Κεραμικοί ομογενοποιητές (Ceramic Homogenizers) 15 mL tubes, του οίκου Agilent Technologies (USA).
- ❖ Πλαστικοί σωλήνες φυγόκεντρου από πολυπροπυλένιο (falcon), χωρητικότητας 50 mL και 15 mL.
- ❖ Φίλτρα σύριγγας με πληρωτικό υλικό πολυτετραφθοροαιθυλένιο (PTFE), με διάμετρο πόρων 0,45 μm , του οίκου Millipore (Cork, Ireland).
- ❖ Αποστειρωμένες σύριγγες μιας χρήσης όγκου 5 mL.
- ❖ Γυάλινα φιαλίδια δειγμάτων (2 mL) με βιδωτό πώμα και septa, κατάλληλα για χρωματογραφία.

7.1.6 Συσκευές

- ❖ Ηλεκτρονικός Αναλυτικός Ζυγός Ακρίβειας Τεσσάρων Δεκαδικών Ψηφίων, Kern and Sohn GmbH, ABS 80-4.
- ❖ Αυτόματες πιπέτες ρυθμιζόμενου όγκου της Eppendorf (Hamburg, Germany).
- ❖ Συσκευή λυοφιλίωσης του οίκου Jouan, μοντέλο LP3 (Saint-Herblain, France).
- ❖ Συσκευή περιδίνησης IKA VORTEX 4 digital.
- ❖ Φυγόκεντρος Universal 16, Hettich Zentrifugen.
- ❖ Συσκευή παραγωγής υπερκάθαρου νερού της εταιρείας Millipore (Cork, Ireland).
- ❖ Λουτρό Υπερήχων Elma.
- ❖ Πεχάμετρο: Knick PH-Meter 766

7.1.7 Χρωματογραφικό σύστημα

Το σύστημα της Υγρής Χρωματογραφίας- Φασματομετρίας Μάζας (LC-MS) αποτελούνταν από έναν αυτόματο δειγματολήπτη SIL 20A και μία αντλία LC-20AB της εταιρείας Shimadzu (Kyoto, Japan). Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός επετεύχθη με στήλη Athena C₁₈, 120 Å (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) της εταιρείας CNW Technologies, ενώ δοκιμάστηκε επίσης η στήλη Eclipse XDB-C₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) της εταιρείας Agilent Technologies, η οποία όμως απορρίφθηκε καθώς ο διαχωρισμός δεν ήταν ικανοποιητικός, λόγω του μικρότερου μήκους της στήλης. Ο όγκος εισαγωγής δείγματος ρυθμίστηκε στα 20 μL . Η ανίχνευση πραγματοποιήθηκε με ανιχνευτή SPD 20A° DAD, συνδεδεμένο με σύστημα Φασματομετρίας Μάζας LC MS-2010-EV της εταιρείας Shimadzu (Kyoto, Japan), με πηγή ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI), που λειτουργεί σε μέθοδο θετικού ή αρνητικού ιοντισμού.

7.2 Δείγματα

7.2.1 Δείγματα για την ανάπτυξη της αναλυτικής μεθόδου

Η ανάπτυξη και η επικύρωση της μεθόδου εκχύλισης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση OECD εδάφους αναφοράς, το οποίο χρησιμοποιείται για δοκιμές φυτοτοξικότητας (OECD Reference soil for Phytotoxkit tests). Η σύνθεσή του περιέχει 20% άργιλο καολινίτη (kaolinite clay), 74% χαλαζιακή άμμο (quartz sand), 1% ανθρακικό ασβέστιο (CaCO_3) και 5% τύρφη (peat) [94].

7.2.2 Ποσότητα δείγματος

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε 1 g λυοφιλιωμένου δείγματος εδάφους για την πραγματοποίηση των πειραμάτων. Η χρήση 1 g εδαφικού δείγματος είχε ως αποτέλεσμα διαυγή εκχυλίσματα και καθόλου επιβαρυμένα χρωματογραφήματα, παρουσιάζοντας και άλλα πλεονεκτήματα. Πιο συγκεκριμένα, η παραλαβή σχετικά μικρού όγκου εκχυλίσματος για καθαρισμό συνεπάγεται μικρότερη κατανάλωση αντιδραστηρίων και μικρότερο κόστος για την ανάλυση, κάτι που είναι σύμφωνο με την τάση για απλοποίηση και «σμίκρυνση» (miniaturization) των μεθόδων.

7.2.3 Εμβολιασμός δειγμάτων εδάφους

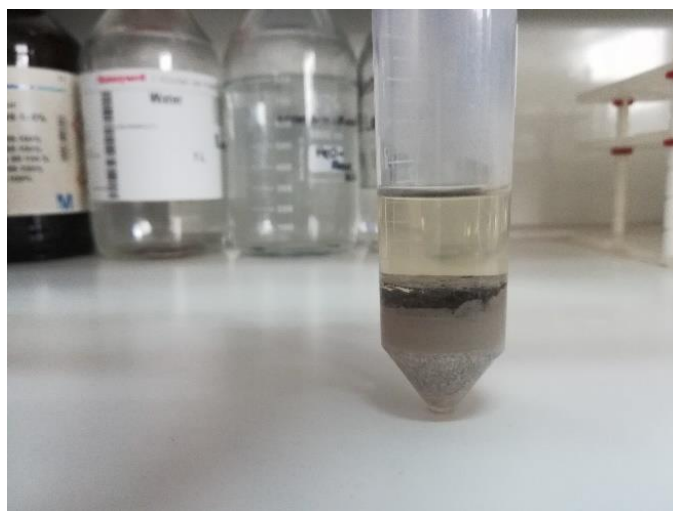
Τα δείγματα εδάφους εμβολιάστηκαν με το μίγμα των επιλεγμένων φυτοπροστατευτικών ενώσεων σε επίπεδο συγκέντρωσης 50 ng/g για τη βελτιστοποίηση της QuEChERS, ενώ για την επικύρωση της αναλυτικής μεθόδου ο εμβολιασμός των δειγμάτων έγινε σε δύο επίπεδα συγκέντρωσης, 25 ng/g και 50 ng/g.

Για τον εμβολιασμό, 1 mL πρότυπου μίγματος των επιλεγμένων φυτοπροστατευτικών ενώσεων προστέθηκε σε 1 g ξηρού δείγματος εδάφους μέσα φυγοκεντρικό σωλήνα από πολυαιθυλένιο (τύπου falcon), ώστε η τελική συγκέντρωση στο δείγμα εδάφους να είναι 25 ng/g και 50 ng/g αντίστοιχα. Έτσι, αφού πρώτα τα εμβολιασμένα δείγματα αναδεύτηκαν ισχυρά στη συσκευή περιδίνησης για 30 min, στη συνέχεια αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 24 h, ώστε να εξασφαλιστεί η επαρκής αλληλεπίδραση των αναλυτών με το υπόστρωμα. Πριν την εκχύλιση, το εμβολιασμένο δείγμα παρέμεινε ανοιχτό, σε θερμοκρασία δωματίου, για να εξασφαλιστεί η πλήρης εξάτμιση όλου του διαλύτη. Μετά το τέλος της προκατεργασίας, τα δείγματα ήταν έτοιμα για εκχύλιση με τη μέθοδο QuEChERS.

7.3 Μέθοδοι

7.3.1 Εκχύλιση QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe)

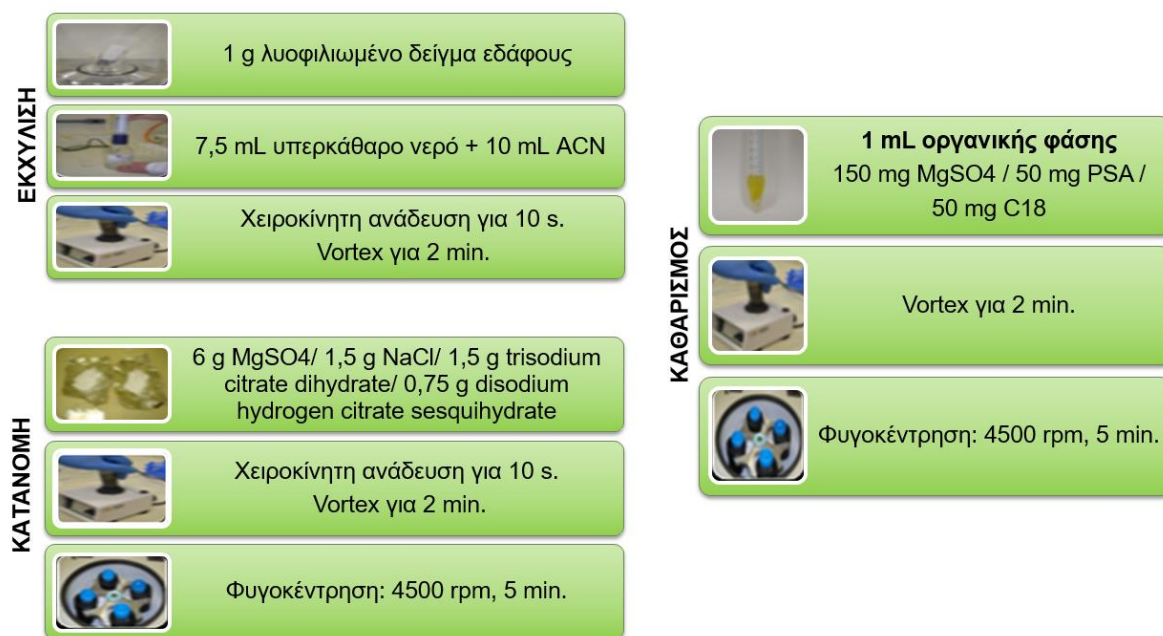
Στο πρώτο στάδιο της εκχύλισης, 1 g λυοφιλιωμένου και ομογενοποιημένου δείγματος εδάφους ζυγίστηκε και τοποθετήθηκε σε φυγοκεντρικό σωλήνα πολυπροπυλενίου με κωνικό πυθμένα, τύπου falcon, χωρητικότητας 50 mL. Έπειτα, προστέθηκαν 7,5 mL υπερκάθαρου νερού. Για επαρκή ενυδάτωση, το δείγμα ανακινήθηκε έντονα, αρχικά χειροκίνητα για 10 s και στη συνέχεια σε συσκευή περιδίνησης (vortex) για 2 min, και αφέθηκε σε ηρεμία για 10 min. Ύστερα, προστέθηκαν 10 mL ACN και το δείγμα ανακινήθηκε χειροκίνητα για 10 s, για να εξασφαλιστεί η επαρκής αλληλεπίδραση του διαλύτη με όλο το δείγμα, και έπειτα σε vortex για 2 min. Ακολούθως, προστέθηκαν 6 g άνυδρου MgSO_4 , 1,5 g NaCl , 1,5 g κιτρικού νατρίου και 0,75 g σεσκιυδρίτη διβασικού κιτρικού νατρίου. Αμέσως μετά την προσθήκη, ο σωλήνας ανακινήθηκε έντονα, στην αρχή χειροκίνητα για 10 s, έτσι ώστε να αποφευχθεί ο σχηματισμός κρυσταλλικών συσσωματωμάτων, και στη συνέχεια ανακινήθηκε για 2 min στο vortex. Ακολουθούσε φυγοκέντρηση για 5 min σε 4500 στροφές ανά λεπτό (Reps per minute ή RPM).



Σχήμα 7.1 Δείγμα εδάφους αμέσως μετά τη φυγοκέντρηση και πριν το στάδιο καθαρισμού.

Για το στάδιο του καθαρισμού (clean-up) εφαρμόστηκε η εκχύλιση στερεάς φάσης με διασπορά (d-SPE). Κατά τη φάση αυτή, 1 mL από το υπερκείμενο διάλυμα μεταφέρθηκε σε σωλήνα φυγοκέντρησης των 15 mL ο οποίος περιείχε 150 mg MgSO_4 , 50 mg PSA, 50 mg C_{18} για κάθε mL εκχυλίσματος. Ακολούθησε έντονη ανάδευση στο vortex για 2 min και φυγοκέντρηση για 5 min σε 4500 rpm. Τα τελικά εκχυλίσματα

λήφθηκαν με πιπέτες pasteur και διηθήθηκαν με φίλτρα σύριγγας με μεμβράνη PTFE, 0,45 μm για να μεταφερθούν τελικά σε υάλινα φιαλίδια των 2 mL με βιδωτά πώματα με septa τεφλόν–σιλικόνης, συμβατά με αυτόματους δειγματολήπτες για τη χρωματογραφική ανάλυση. Η πειραματική πορεία συνοψίζεται στο Σχήμα 7.2.



Σχήμα 7.2 Τελικό πρωτόκολλο προκατεργασίας των δειγμάτων με τη μέθοδο QuEChERS.

7.3.2 Ανάλυση με υγρή χρωματογραφία και φασματομετρία μάζας

Κατά το χρωματογραφικό διαχωρισμό, οι επιλεγμένες φυτοπροστατευτικές ενώσεις μελετήθηκαν και αναλύθηκαν σε μίγμα. Για την επιλογή του κατάλληλου εκλουστικού συστήματος επιλέχθηκαν το νερό και η μεθανόλη, καθώς σε προκαταρκτικές δοκιμές με άλλους διαλύτες τα αποτελέσματα δεν ήταν ικανοποιητικά. Επίσης, για την επιλογή του καταλληλότερου προγράμματος έκλουσης των ενώσεων, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές με διαφορετικές αναλογίες όγκων των διαλυτών, έτσι ώστε να επιτευχθεί ο καλύτερος δυνατός διαχωρισμός και η καλύτερη δυνατή μορφή των κορυφών. Τελικά, η χρωματογραφική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με βαθμωτό πρόγραμμα έκλουσης, όπου η κινητή φάση αποτελούνταν από (Α) νερό με 0,1% μυρμηκικό οξύ και (Β) μεθανόλη. Η προσθήκη του μυρμηκικού οξέος στην κινητή φάση βελτιώνει την απόκριση των περισσότερων ενώσεων, μετατοπίζοντας την ισορροπία διάστασης των ιόντων προς την πρωτονιωμένη τους μορφή μέσα στο διάλυμα, διευκολύνοντας έτσι τον ιοντισμό. Ο όγκος έγχυσης του δείγματος (injection volume) ήταν 20 μL , η

ταχύτητα ροής (flow rate) ήταν σταθερή στα 0,4 mL/min και η θερμοκρασία του φούρνου (oven temperature) ήταν σταθεροποιημένη στους 40 °C.

Για το διαχωρισμό των φυτοπροστατευτικών ενώσεων, χρησιμοποιήθηκε πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης, στο θετικό ιοντισμό, συνολικής διάρκειας 28 λεπτών. Η αρχική σύσταση διαλυτών ήταν 90% (A) και 10% (B). Η σύσταση αυτή παρέμεινε σταθερή για 1 min και στη συνέχεια το ποσοστό της μεθανόλης αυξήθηκε μέχρι το 30% στα 2min. Ακολούθησε περαιτέρω αύξηση του ποσοστού της μεθανόλης έως ότου φτάσει το 100% στα 6 min, οπότε και διατηρήθηκε σταθερή για 15 min. Έπειτα, το ποσοστό της μεθανόλης μειώθηκε στο 30% στα 26 min και τελικά το σύστημα επανήλθε στις αρχικές συνθήκες. Το πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης που χρησιμοποιήθηκε φαίνεται στον Πίνακα 7.1.

Πίνακας 7.1 Πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης φυτοπροστατευτικών ενώσεων.

Χρόνος (min)	% A (H ₂ O-0,1% FA)	% B (MeOH)	Ταχύτητα ροής (μL/min)
1	90	10	0,4
2	70	30	0,4
6	0	100	0,4
21	0	100	0,4
26	70	30	0,4
28	90	10	0,4

Για τον προσδιορισμό και την ταυτοποίηση των προσδιοριζόμενων ουσιών επιλέχθηκαν τα ψευδομοριακά ιόντα [M+H]⁺ για το θετικό ιοντισμό, στη μέθοδο ανίχνευσης επιλεγμένων ιόντων (Selected Ion Monitoring). Στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 7.2) παρουσιάζονται, τα ψευδομοριακά ιόντα και οι χρόνοι συγκράτησης των επιλεγμένων φυτοπροστατευτικών ενώσεων.

Πίνακας 7.2 Χρόνοι συγκράτησης και ψευδομοριακά ιόντα για τον θετικό ιοντισμό.

Ένωση	[M+H] ⁺	RT (min)
A- Cypermethrin	417	16,56
Abamectin	874	18,09
Acetamiprid	223	9,99

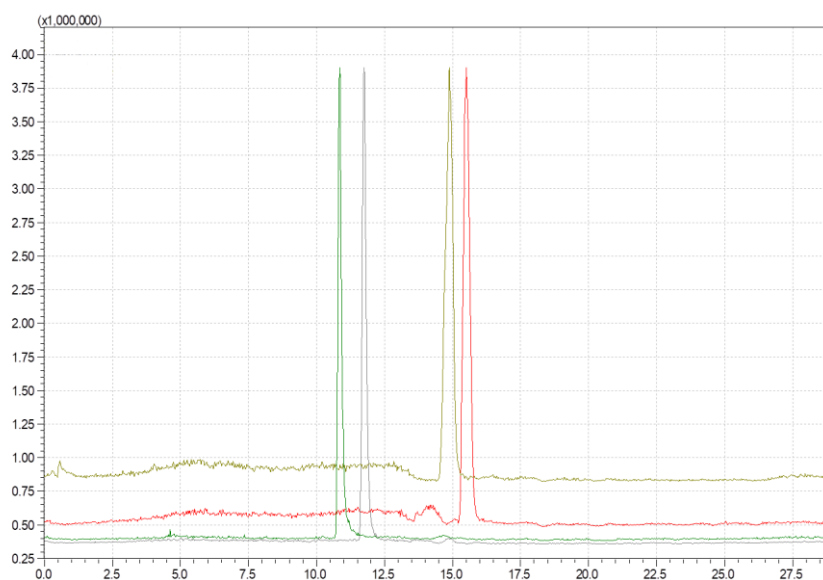
Πίνακας 7.2 (συνέχεια) Χρόνοι συγκράτησης και ψευδομοριακά ιόντα για τον θετικό ιοντισμό.

Ένωση	[M+H] ⁺	RT (min)
Acetochlor	270	14,85
Azoxystrobin	404	14,46
Bitertanol	338	20,13
Bromuconazole	378	17,01
Bupirimate	317	14,76
Buprofezin	306	15,87
Carbaryl	202	11,16
Cyprodinil	226	15,51
Cyromazine	167	9,57
Diazinon	305	15,36
Dimethomorph	388	10,38
Ethiofencarb	226	13,59
Ethion	385	16,63
Ethoprophos	243	15,03
Fenamiphos	304	14,7
Fenazaquin	307	19,29
Fenpropimorph	304	12,48
Fenpyroximate	422	17,01
Fenthion	279	11,88
Fenvalerate	420	17,52
Fluazifop - P- butyl	384	15,27
Fluquinconazole	377	13,98
Flusilazole	316	14,64
Flutriafol	302	13,02
Formetanate	222	10,65
Imazalil	298	12,54
Kresoxim methyl	314	15,24
Mandipropamid	412	20,64

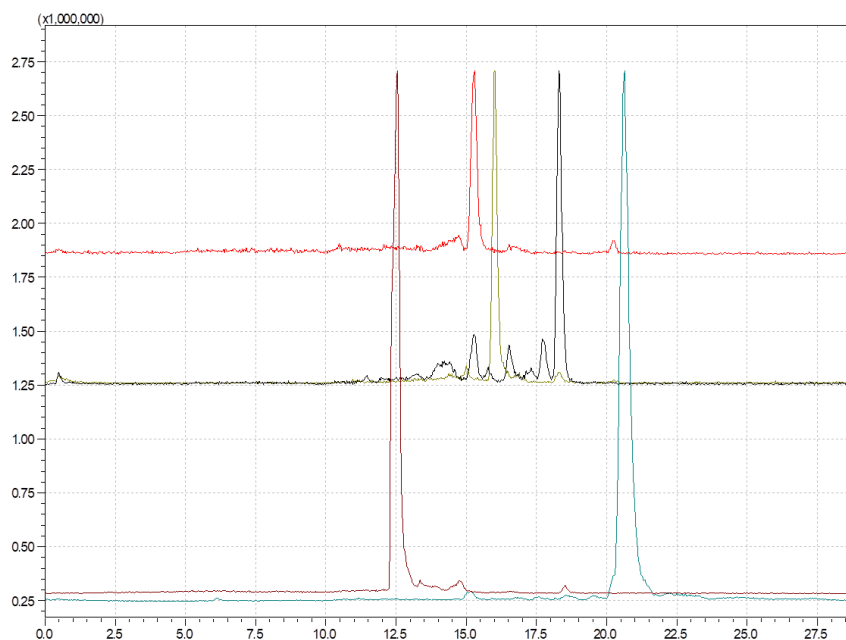
Πίνακας 7.2 (συνέχεια) Χρόνοι συγκράτησης και ψευδομοριακά ιόντα για τον θετικό ιοντισμό.

Ένωση	[M+H] ⁺	RT (min)
Mecarbam	330	15,27
Mepanipyrim	224	15,12
Metalaxyl	280	14,37
Methomyl	163	11,31
Methoxyfenozide	369	19,62
Metobromuron	260	11,85
Myclobutanil	289	17,73
Pendimethalin	282	18,51
Phosmet	318	16,77
Pirimicarb	239	13,47
Pirimiphos methyl	306	15,51
Propamocarb	189	10,83
Propaquizafop	444	20,58
Propargite	351	16,65
Prosulfocarb	252	16,26
Pyraclostrobin	388	14,82
Pyrimethanil	200	14,88
Pyriproxyfen	322	16,47
Quinoxifen	309	17,46
Quizalofop-P-ethyl	373	16,92
Spirodiclofen	412	15,15
Thiabendazole	202	11,73
Thiophanate methyl	343	14,58
Tolclofos methyl	302	20,04
Triadimefon	294	6,27
Triadimenol A	296	12,27
Trifloxystrobin	409	15,06
Triflumuron	359	23,22

Στα Σχήματα 7.3 και 7.4 δίνονται ενδεικτικά χρωματογραφήματα ορισμένων ιόντων, από το σύνολο του μίγματος των φυτοπροστατευτικών ενώσεων, σε πρότυπο διάλυμα και σε εκχυλισμένο πρότυπο διάλυμα. Και στις δύο περιπτώσεις, τα δείγματα (πρότυπο διάλυμα και εκχυλισμένο πρότυπο διάλυμα) εμβολιάστηκαν με το μίγμα των επιλεγμένων φυτοπροστατευτικών ενώσεων σε επίπεδο συγκέντρωσης 50 ng/g.



Σχήμα 7.3 Ενδεικτικό χρωματογράφημα προτύπου διαλύματος σε επίπεδο εμβολιασμού 50 ng/g. Από αριστερά προς τα δεξιά οι ενώσεις: Propanatocarb, Thiabendazole, Pyrimethanil και Cyprodinil.



Σχήμα 7.4 Ενδεικτικό χρωματογράφημα εκχυλισμένου προτύπου διαλύματος σε επίπεδο εμβολιασμού 50 ng/g. Από αριστερά προς τα δεξιά οι ενώσεις: Fenproimorph, Fluazifor-p-butyl, Prosulfocarb, Pendimethalin και Mandipropamid.

7.4 Επικύρωση μεθόδου

Η επικύρωση των αναλυτικών μεθόδων στις εργαστηριακές συνθήκες πραγματοποιήθηκε σε εμβολιασμένα δείγματα με βάση τις ισχύουσες οδηγίες της SANTE 11813/2017 [93]. Η αναλυτική επίδοση της μεθόδου βασίστηκε σε πρωτόκολλα διασφάλισης ποιότητας και ελέγχου ποιότητας (QA/QC).

Η ακρίβεια της μεθόδου μελετήθηκε ως συνδυασμός της επί τοις εκατό ανάκτησης (%Recovery, %R) και της πιστότητας. Η πιστότητα είναι εκφρασμένη ως επαναληψιμότητα εντός της ίδιας ημέρας (repeatability, RSD_r) και ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα (within-lab-reproducibility, RSD_R). Μελετήθηκαν επίσης τα όρια ανίχνευσης (limit of detection, LOD) και τα όρια ποσοτικοποίησης (limit of quantification, LOQ) της μεθόδου, η γραμμικότητα (linearity) και η επίδραση του υποστρώματος (matrix effect).

Η γραμμικότητα της μεθόδου εκφράστηκε με την καμπύλη αναφοράς προσομοιωμένου υποστρώματος (matrix-matched calibration curves) πέντε σημείων. Για τον έλεγχο της γραμμικότητας εξετάστηκε αν η ευθεία ακολουθεί τη γραμμική παλινδρόμηση, της οποίας οι συντελεστές υπολογίζονται με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων.

Οι ανακτήσεις προσδιορίστηκαν με την πραγματοποίηση πέντε διαδοχικών εκχυλίσεων (n=5) δειγμάτων εμβολιασμένων σε δύο επίπεδα συγκέντρωσης (25 ng/g και 50 ng/g). Ταυτόχρονα εκχυλίστηκε και ένα τυφλό δείγμα, ώστε η συγκέντρωση τυχόν αναλυτών που υπήρχαν στο δείγμα πριν τον εμβολιασμό να αφαιρεθεί από τις συγκεντρώσεις που υπολογίστηκαν για τα εμβολιασμένα δείγματα. Για τον υπολογισμό της % ανάκτησης συγκρίθηκε η συγκέντρωση μετά την εφαρμογή της εκχύλισης με την αρχική συγκέντρωση εμβολιασμού, με βάση την Εξίσωση 7.1:

$$\%R = \frac{C_{\text{πειραματική}} - C_{\text{τυφλού}}}{C_{\text{θεωρητική (εμβολιασμού)}}} \times 100 \quad (7.1)$$

Η πιστότητα της μεθόδου προσδιορίστηκε ως η σχετική τυπική απόκλιση (Relative Standard Deviation, RSD) που προκύπτει για πέντε διαδοχικές εκχυλίσεις (n=5) εμβολιασμένου δείγματος την ίδια ημέρα, από τον ίδιο αναλυτή, οπότε εκφράζει την επαναληψιμότητα (repeatability, RSD_r) καθώς και για την ίδια διαδικασία σε τρεις διαφορετικές μέρες, οπότε εκφράζει την αναπαραγωγιμότητα (reproducibility, RSD_R). Οι τιμές της σχετικής τυπικής απόκλισης που θεωρούνται αποδεκτές είναι $\leq \pm 20\%$.

7.5 Επίδραση υποστρώματος (matrix effect)

Η απόκριση των αναλυτών στο εκχύλισμα μπορεί να είναι αυξημένη (ενίσχυση σήματος, signal enhancement) ή μειωμένη (καταστολή σήματος, signal suppression) σε σχέση με το σήμα τους στο διαλύτη. Πρόκειται για το ανεπιθύμητο φαινόμενο της «επίδρασης του υποστρώματος» (matrix effect), το οποίο δυσκολεύει την ανάλυση και μπορεί να επηρεάσει σημαντικά την ανθεκτικότητα της μεθόδου, και κατά συνέπεια την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων [95].

Με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματομετρία μάζας, όπου χρησιμοποιείται ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό, η επίδραση του υποστρώματος είναι σημαντική, αφού η πηγή ιοντισμού με ψεκασμό ηλεκτρονίων (ESI) εμφανίζει την τάση να ιονίζει άλλες ενώσεις. Η επίδραση υποστρώματος προκαλείται κυρίως από τη συνέκλωση συστατικών από το υπόστρωμα, τα οποία επηρεάζουν την ικανότητα ιοντισμού των αναλυτών. Συγκεκριμένα, τα συστατικά του υποστρώματος ανταγωνίζονται με τους αναλύτες για την πρόσβαση στην επιφάνεια των σταγονιδίων. Επίσης, έχει αναφερθεί επίδραση υποστρώματος σε περιπτώσεις όπου οι αναλύτες προσροφώνται στην περιεχόμενη οργανική ύλη των δειγμάτων, με αποτέλεσμα τη μείωση της συγκέντρωσης των ελεύθερα διαλυμένων ουσιών και την παρεμπόδιση της ανίχνευσής τους. Τα συστατικά του υποστρώματος μπορεί επίσης να μεταβάλλουν το ιξώδες και την επιφανειακή τάση του εκλούσματος της στήλης, να επηρεάσουν τον σχηματισμό σταγονιδίων και συνεπώς τη διαδικασία εξάτμισης, επηρεάζοντας έτσι τον αριθμό των φορτισμένων ιόντων. Επίσης, τα μη πτητικά συστατικά μπορούν να σχηματίσουν στερεά σωματίδια συμπεριλαμβάνοντας και τις αναλυόμενες ενώσεις.

Σε μερικές περιπτώσεις, τα συστατικά του υποστρώματος μπορούν να δρουν ως αντιδραστήρια σύζευξης ιόντων με ήδη ιοντισμένους αναλύτες. Τέλος, η ύπαρξη διαφόρων παρεμποδιστών στο αρχικό υπόστρωμα έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της γραμμής αναφοράς, (baseline) και κατά συνέπεια λανθασμένες μετρήσεις των εμβαδών τους. Η επίδραση του υποστρώματος εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως ο τύπος του δείγματος, η προκατεργασία που υφίσταται, η τεχνική εκχύλισης ή/και καθαρισμού, η σύσταση της κινητής φάσης, η γεωμετρία και ο σχεδιασμός της πηγής ιοντισμού ηλεκτροψεκασμού κ.ά. Γενικότερα, έχει παρατηρηθεί ότι τα μικρά, μέτρια πολικά μόρια, όπως αρκετά σύγχρονα φυτοφάρμακα, είναι πιο ευαίσθητα στη μείωση του σήματος [4].

Η επίδραση του υποστρώματος εκτιμήθηκε με την ακόλουθη εξίσωση (Εξίσωση 7.2):

$$ME (\%) = \left(\left(\frac{\text{Απόκριση προτύπων στο υπόστρωμα}}{\text{Απόκριση προτύπων σε καθαρό διαλύτη}} \right) - 1 \right) \times 100 \quad (7.2)$$

Όταν η ME είναι 0% δεν υφίσταται καμία επίδραση μεταξύ υποστρώματος και αναλύτη. Όταν οι τιμές της ME είναι μικρότερες του 0% η επίδραση του υποστρώματος μειώνει το χρωματογραφικό σήμα, ενώ όταν είναι μεγαλύτερες το ενισχύει. Για τιμές ME% μεταξύ -20% και 20% θεωρείται πως το υπόστρωμα προκαλεί ελαφριά μείωση ή ενίσχυση του σήματος και η επίδραση θεωρείται μη σημαντική. Για τιμές μεταξύ -50% και -20% ή 20% έως 50% η επίδραση θεωρείται μέτρια, ενώ για τιμές μικρότερες του -50% ή μεγαλύτερες του 50% η επίδραση θεωρείται ισχυρή [9].

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Βελτιστοποίηση και επικύρωση της μεθόδου QuEChERS

A. Βελτιστοποίηση

8.1 Εισαγωγή

Η εκχύλιση των επιλεγμένων φυτοπροστατευτικών ενώσεων από δείγματα εδάφους πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο QuEChERS, η οποία είναι απλή και γρήγορη, ακολουθούμενη από καθαρισμό των δειγμάτων με d-SPE. Η QuEChERS είναι κατάλληλη για στερεά, ημι-στερεά, υγρά με μεγάλο ιξώδες. Δημοσιεύονται συνεχώς παραλλαγές της, καθώς γίνονται προσπάθειες ώστε να είναι κατάλληλη και αποτελεσματική για όλο και μεγαλύτερο εύρος αναλυτών και διαφορετικών υποστρωμάτων. Επίσης, έχει χαρακτηριστεί ως μέθοδος “just enough”, καθώς οι ποσότητες των αλάτων και των προσροφητικών που χρησιμοποιούνται είναι τέτοιες ώστε να απομακρύνονται αποτελεσματικά οι παρεμποδίσσεις με την ελάχιστη δυνατή απώλεια αναλυτών [4, 96].

Η QuEChERS αρχικά αναπτύχθηκε για τον προσδιορισμό φυτοφαρμάκων σε φρούτα και λαχανικά, υποστρώματα που έχουν αρκετά υψηλή περιεκτικότητα σε νερό (>75%). Κατά συνέπεια, για να είναι δυνατή η εφαρμογή της σε υποστρώματα, όπως έδαφος, ιζήματα, καπνός, ξηρά φρούτα, δημητριακά, τσάι κλπ., δηλαδή υποστρώματα με περιεκτικότητα σε νερό χαμηλότερη από 25%, θα πρέπει να γίνουν ορισμένες τροποποιήσεις και να εξεταστούν οι διάφοροι παράγοντες που την επηρεάζουν. Η ανάλυση πολύπλοκων και επιβαρυνμένων υποστρωμάτων, όπως το έδαφος, τα ιζήματα και η ιλύς, απαιτεί κατάλληλη προκατεργασία του δείγματος ώστε να επιτευχθεί μία επαναλήψιμη και επαρκώς ευαίσθητη ανάλυση με χαμηλά όρια ανίχνευσης (στην περιοχή ng/g). Επειδή οι 60 φυτοπροστατευτικές ενώσεις που μελετήθηκαν παρουσιάζουν διαφορετικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά, η βελτιστοποίηση της μεθόδου προκατεργασίας απαιτεί πολύ λεπτό χειρισμό. Συνεπώς, μελετήθηκαν το στάδιο της εκχύλισης και το στάδιο του καθαρισμού (clean-up) έτσι ώστε να επιτευχθεί καλύτερη επίδοση της μεθόδου για τις προσδιοριζόμενες ενώσεις. Η βελτίωση της επίδοσης αφορά στη βελτίωση του διαχωρισμού των χρωματογραφικών κορυφών, στην αύξηση της γραμμικής περιοχής, στη βελτίωση της επαναληψιμότητας και αναπαραγωγιμότητας, και στη μείωση άλλων παραμέτρων,

όπως τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης καθώς και η επίδραση του υποστρώματος [4, 96].

Για τη βελτιστοποίηση και την αύξηση της αποτελεσματικότητας της μεθόδου QuEChERS μελετήθηκαν τόσο οι παράμετροι που επηρεάζουν την εκχύλιση (επίδραση της υδατικής φάσης, άλατα εκχύλισης, επίδραση του διαλύτη εκχύλισης) όσο και οι παράμετροι που επηρεάζουν το στάδιο καθαρισμού των εκχυλισμάτων, όπως η επιλογή του κατάλληλου προσροφητικού μέσου.

8.2 Μελέτη παραμέτρων που επηρεάζουν την εκχύλιση QuEChERS

Οι παράμετροι που επηρεάζουν την εκχύλιση μελετήθηκαν ξεχωριστά για το μίγμα των φυτοπροστατευτικών ενώσεων, εξετάζοντας μία μόνο παράμετρο κάθε φορά και διατηρώντας τις υπόλοιπες σταθερές σε όλη την πειραματική πορεία. Το κριτήριο επιλογής των βέλτιστων παραμέτρων της εκχύλισης ήταν η ανάκτηση (%R) των ενώσεων. Για αυτό το λόγο «τυφλά» δείγματα εδάφους εμβολιάζονταν με το μίγμα των φυτοπροστατευτικών ενώσεων σε συγκέντρωση 50 ng/g και ακολουθούσε ανάλυση των δειγμάτων στο σύστημα LC-DAD-ESI-MS, υπό τις συνθήκες που περιγράφηκαν στο Κεφάλαιο 7.

Αξίζει να σημειωθεί, πως κατά τη διάρκεια της εκχύλισης, για την αποφυγή σχηματισμού συσσωματωμάτων, απαιτείται έντονη ανάδευση, έτσι ώστε να εξασφαλιστούν υψηλές ανακτήσεις και επαναλήψιμα αποτελέσματα. Η προσθήκη του $MgSO_4$ μπορεί να προκαλέσει σχηματισμό κρυσταλλικών συσσωματωμάτων και να παρεμποδίσει την ομαλή διαδικασία της εκχύλισης, καθιστώντας αβέβαιη την αποτελεσματικότητα της. Για την αποφυγή σχηματισμού συσσωματωμάτων το μίγμα των αλάτων προστέθηκε αργά και συνεχόμενα στο φυγοκεντρικό σωλήνα που περιείχε το δείγμα, το νερό και το διαλύτη εκχύλισης. Στη συνέχεια, ο σωλήνας κλείστηκε ερμητικά και ακολούθησε η έντονη ανάδευση του, αρχικά χειροκίνητα και μετά στη συσκευή περιδίνησης. Επίσης, για την αποφυγή σχηματισμού συσσωματωμάτων ήταν σημαντική η πολύ καλή ομογενοποίηση του δείγματος κατά την προκατεργασία, καθώς οι μικροί σε διάμετρο πόροι αυξάνουν την επιφάνεια επαφής.

8.2.1 Προσθήκη νερού/Επανενυδάτωση πριν από την εκχύλιση

Η προσθήκη νερού στο δείγμα πριν τη διαδικασία της εκχύλισης αποσκοπεί στη μείωση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των αναλυτών του υποστρώματος. Επίσης, όταν οι πόροι του εδάφους έχουν ενυδατωθεί πραγματοποιείται καλύτερη κατανομή των αναλυτών μεταξύ της υδατικής και οργανικής φάσης. Το νερό που χρησιμοποιείται πρέπει να είναι κρύο, καθώς, με αυτό τον τρόπο, περιορίζεται η παραγόμενη θερμότητα από την προσθήκη MgSO_4 κατά την εκχύλιση και προστατεύονται οι θερμικά ευαίσθητες ενώσεις [97].

Στην παρούσα εργασία τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με 7,5 mL κρύου νερού, τιμή που είναι σύμφωνη και με άλλες εργασίες [71, 98]. Ελέγχθηκε επίσης και η προσθήκη νερού σε αναλογία 1 προς 1 με το δείγμα (1 mL) η οποία απορρίφθηκε, καθώς όλο το νερό απορροφήθηκε άμεσα από το δείγμα, το οποίο επιβεβαιώνεται και βιβλιογραφικά [4, 99].

8.2.2 Άλατα εκχύλισης

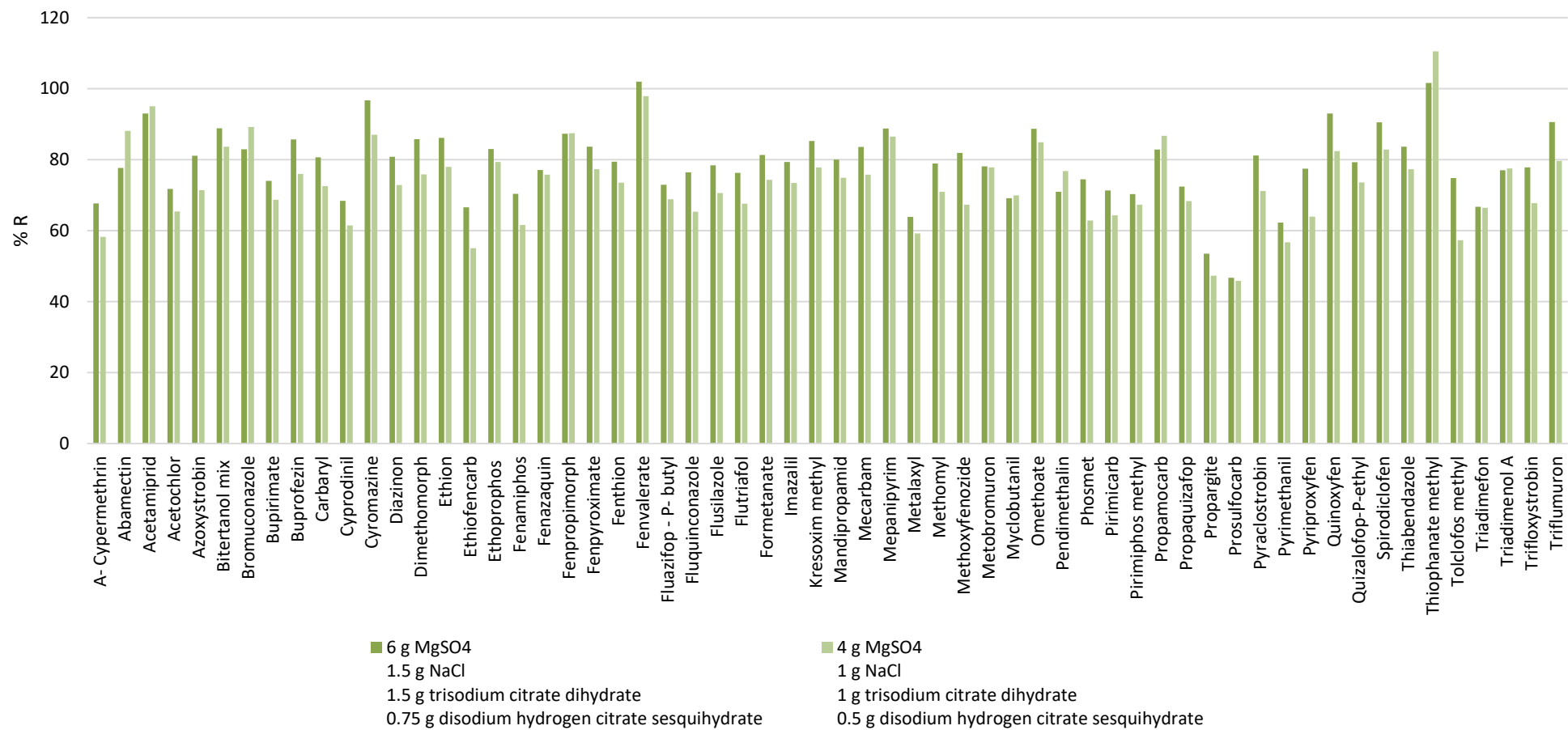
Το εύρος των τιμών pK_a των επιλεγμένων φυτοπροστατευτικών ενώσεων είναι τέτοιο που επιβάλλει τη δοκιμή διαφορετικών συνδυασμών και ποσοτήτων των αλάτων εκχύλισης. Έτσι, ως πρώτο βήμα για τη βελτιστοποίηση της μεθόδου πραγματοποιήθηκαν δοκιμές με τους παρακάτω συνδυασμούς και ποσότητες των αλάτων εκχύλισης QuEChERS, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη εκχύλισης το ακετονιτρίλιο:

- 6 g MgSO_4 , 1,5 g NaCl , 1,5 g κιτρικό νάτριο ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 0,75 g σεσκιυδρίτη διβασικού κιτρικού νατρίου ($\text{HOC}(\text{COOH})(\text{CH}_2\text{COONa})_2 \cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$) [71].
- 4 g MgSO_4 , 1 g NaCl , 1 g κιτρικό νάτριο ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 0,5 g σεσκιυδρίτη διβασικού κιτρικού νατρίου [$\text{HOC}(\text{COOH})(\text{CH}_2\text{COONa})_2 \cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$], πρότυπο EN 15662 του Ευρωπαϊκού Οργανισμού Τυποποίησης (Comité Européen de Normalisation) [100].

Η προσθήκη του MgSO_4 αποσκοπεί στην απομάκρυνση του νερού και την αύξηση της ιοντικής ισχύος του υδατικού μίγματος που προκύπτει, ενισχύοντας τον καλύτερο διαχωρισμό της οργανικής φάσης (ακετονιτρίλιο) από την υδατική. Το NaCl βοηθά στην άρση των πολικών παρεμποδίσεων και στην αποφυγή δημιουργίας γαλακτωμάτων. Η χρήση τροποποιητών (buffers) όπως τα κιτρικά άλατα αποτελεί παραλλαγή της κλασικής μεθόδου και περιλαμβάνει ρύθμιση και διατήρηση του pH σταθερού στη βέλτιστη τιμή με ρυθμιστικά διαλύματα, εμποδίζοντας ταυτόχρονα τη διάσπαση των ευαίσθητων στο pH ενώσεων.

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 8.1 οι ανακτήσεις ήταν ικανοποιητικές και συγκρίσιμες για όλες σχεδόν τις ενώσεις και με τις δύο παραλλαγές. Ωστόσο, η χρήση του πρώτου συνδυασμού (6 g MgSO_4 , 1,5 g NaCl , 1,5 g κιτρικό νάτριο και 0,75 g σεσκιυδρίτη διβασικού κιτρικού νατρίου) αποδείχθηκε η καλύτερη επιλογή για το μίγμα των φυτοπροστατευτικών ενώσεων που μελετήθηκαν, καθώς είχε ως αποτέλεσμα υψηλότερες κατά μέσο όρο ανακτήσεις (80%) συγκριτικά με το δεύτερο συνδυασμό (73%).

Επίσης, παρατηρήθηκαν ανακτήσεις εκτός των αποδεκτών ορίων για τις ενώσεις Propargite και Prosulfocarb, τόσο με τη χρήση του πρώτου συνδυασμού αλάτων, όσο και με τη χρήση του δεύτερου. Συγκεκριμένα, με τη χρήση του πρώτου συνδυασμού, οι ανακτήσεις για τις παραπάνω ενώσεις ήταν 53% και 47% αντίστοιχα, ενώ με τη χρήση του δεύτερου συνδυασμού οι ανακτήσεις ήταν 47% και 46% αντίστοιχα. Επιπλέον, με τη χρήση του δεύτερου συνδυασμού παρατηρήθηκαν και άλλες ανακτήσεις που ήταν οριακά εκτός των αποδεκτών ορίων, για τις ενώσεις A-Cypermethrin (58%), Ethiofencarb (55%), Metalaxyl (59%), Pyrimethanil (57%) και Tolclofos methyl (57%).

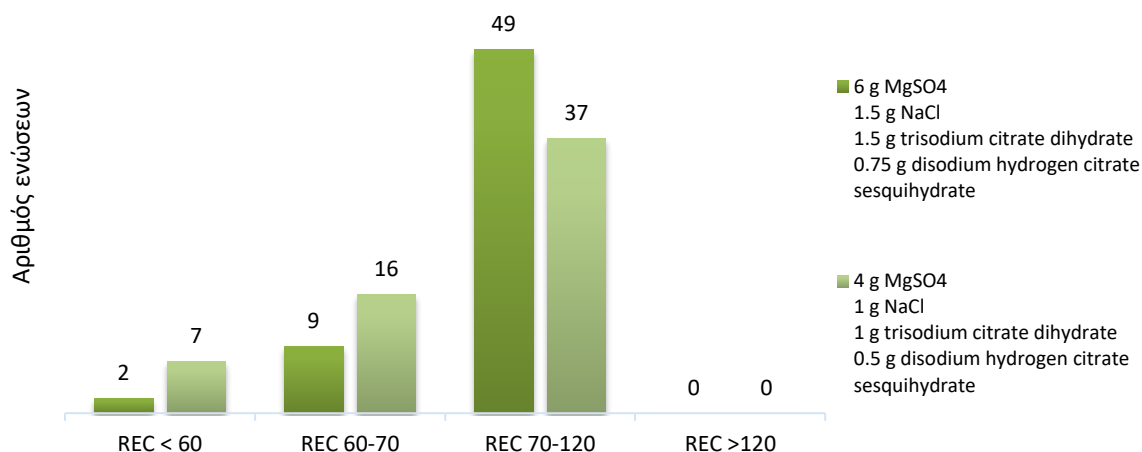


Σχήμα 8.1 Επίδραση των αλάτων εκχύλισης στις ανακτήσεις των φυτοπροστατευτικών ενώσεων.

Συνολικά, από τις 60 φυτοπροστατευτικές ενώσεις που μελετήθηκαν, οι 49 παρουσίασαν ανακτήσεις που κυμάνθηκαν από 70-120% με τη χρήση του πρώτου συνδυασμού, ενώ με τη χρήση του δεύτερου συνδυασμού ο αριθμός των ενώσεων που είχαν ανακτήσεις από 70-120% ήταν 37. Πιο αναλυτικά, οι ενώσεις Acetochlor, Bupirimate, Fenamiphos, Fluazifop-p-butyl, Fluquinconazole, Flutriafol, Methoxyfenozide, Phosmet, Pirimicarb, Pirimiphos methyl, Propaquizafop, Pyriproxifen και Trifloxystrobin, με την εφαρμογή του πρώτου συνδυασμού αλάτων εμφάνισαν ανακτήσεις μεγαλύτερες από 70%, ενώ με την εφαρμογή του δεύτερου συνδυασμού οι ανακτήσεις για τις παραπάνω ενώσεις ήταν σχετικά χαμηλότερες, και συγκεκριμένα, 65%, 68%, 62%, 69%, 65%, 68%, 67%, 63%, 64%, 67%, 68%, 64% και 68%, αντίστοιχα.

Αξίζει να σημειωθεί ότι για την ένωση Methoxyfenozide η διαφορά ήταν συγκριτικά μεγαλύτερη, καθώς με τον πρώτο συνδυασμό αλάτων εκχύλισης το ποσοστό της ανάκτησης ήταν 82%, ενώ με το δεύτερο συνδυασμό ήταν 67%. Επίσης, η ένωση Tolclofos methyl, με την εφαρμογή του δεύτερου συνδυασμού αλάτων εκχύλισης εμφάνισε ποσοστό ανάκτησης οριακά εκτός των αποδεκτών ορίων (57%, όπως αναφέρθηκε παραπάνω), ενώ με την εφαρμογή του πρώτου συνδυασμού είχε ποσοστό ανάκτησης 75%. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία [68], η εφαρμογή του κιτρικού νατρίου οδηγεί σε αύξηση των ανακτήσεων. Από τα παραπάνω αποτελέσματα παρατηρούμε ότι με μικρή αύξηση της ποσότητάς του, στο μίγμα των αλάτων εκχύλισης, οι ανακτήσεις φαίνεται να είναι μεγαλύτερες.

Οι ενώσεις που εμφάνισαν τις υψηλότερες ανακτήσεις, με ποσοστό ανάκτησης μεγαλύτερο από 90% ήταν οι: Acetamiprid, Cyromazine, Fenvalerate, Quinoxifen, Spirodiclofen, Thiophanate methyl και Triflumuron. Τέλος, καμία ένωση δεν εμφάνισε ανακτήσεις με ποσοστό μεγαλύτερο του 120%. Στο σχήμα που ακολουθεί (Σχήμα 8.2) φαίνεται ο αριθμός των φυτοπροστατευτικών ενώσεων που εμφάνισαν ανακτήσεις <60%, 60-70%, 70%-120% και >120% με την εφαρμογή των διαφορετικών ποσοτήτων αλάτων εκχύλισης.



Σχήμα 8.2 Εύρος ανακτήσεων των επιλεγμένων φυτοπροστατευτικών ενώσεων με την εφαρμογή διαφορετικών ποσοτήτων των αλάτων εκχύλισης.

8.2.3 Διαλύτης εκχύλισης

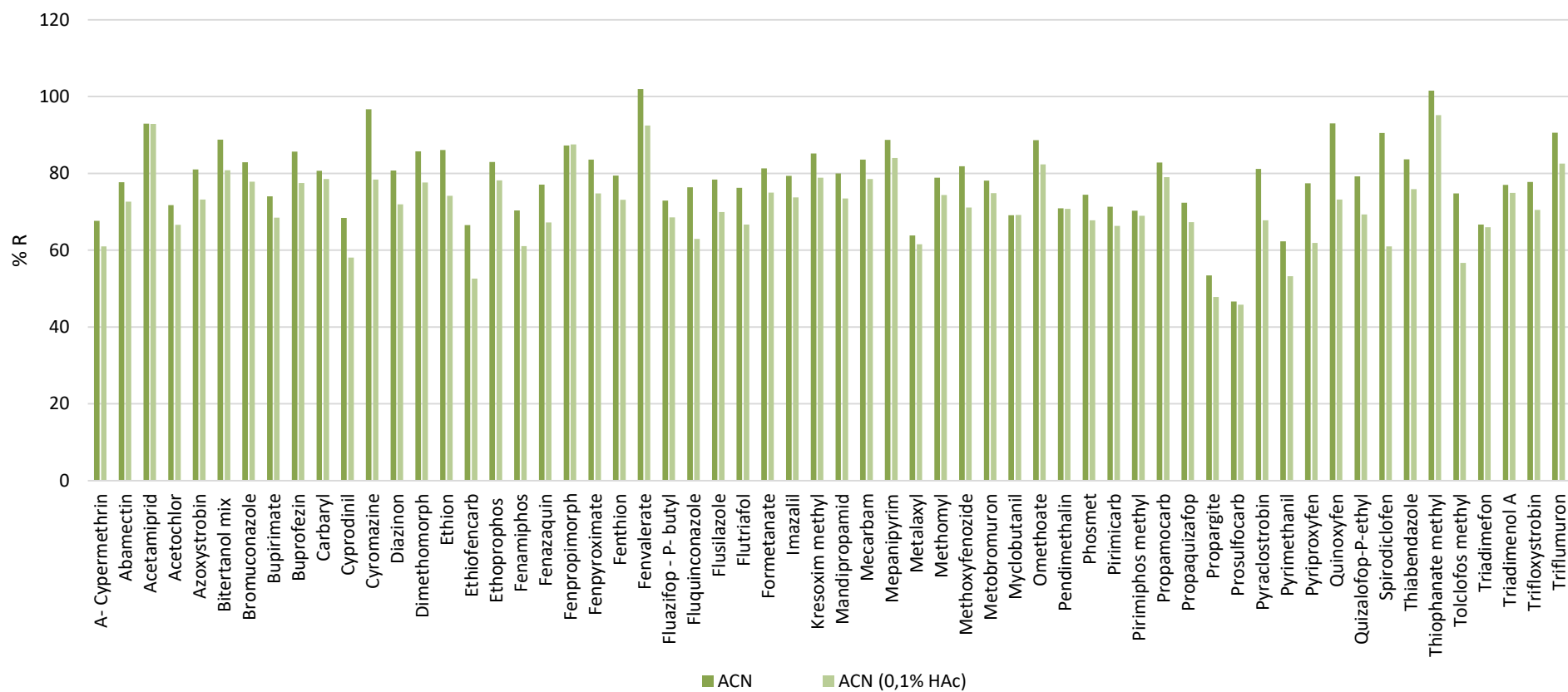
Η επιλογή του κατάλληλου διαλύτη εκχύλισης είναι καθοριστικής σημασίας, προκειμένου να επιτευχθεί εκλεκτική και αποτελεσματική εκχύλιση των επιθυμητών ενώσεων από το υπόστρωμα. Στην εκχύλιση QuEChERS το ακετονιτρίλιο (ACN) είναι ένας από τους βασικούς διαλύτες, που πληροί τις παραπάνω προϋποθέσεις καθώς μπορεί να εκχυλίσει μεγάλο εύρος ενώσεων με μικρότερο αριθμό συνεκχυλιζόμενων συστατικών, ενώ είναι συμβατός τόσο με την υγρή όσο και την αέρια χρωματογραφία [41, 80, 101]. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, για την εκχύλιση δειγμάτων εδάφους, ιζήματος και παρεμφερών υποστρωμάτων, το ακετονιτρίλιο αποτελεί την καλύτερη επιλογή [67, 98, 102, 103, 104]. Παρόλα αυτά, όταν κριθεί απαραίτητο ανάλογα με τις ανάγκες της εκχύλισης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί μεθανόλη, οξικός αιθυλεστέρας, ακετόνη, εξάνιο ή μίγματα αυτών.

Συνεπώς, στην παρούσα εργασία, για την επιλογή του κατάλληλου διαλύτη εκχύλισης χρησιμοποιήθηκε ακετονιτρίλιο και πράγματι, οι ανακτήσεις ήταν καλές για όλες σχεδόν τις ενώσεις. Επίσης, ελέγχθηκε η τυχόν θετική επίδραση τροποποιητών στις ανακτήσεις των φυτοπροστατευτικών ενώσεων. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η χρήση οξικού οξέος σε συγκέντρωση 0,1 % (v/v). Με την προσθήκη 0,1% (v/v) οξικού οξέος, η τιμή του pH κυμάνθηκε από 4 έως 5.

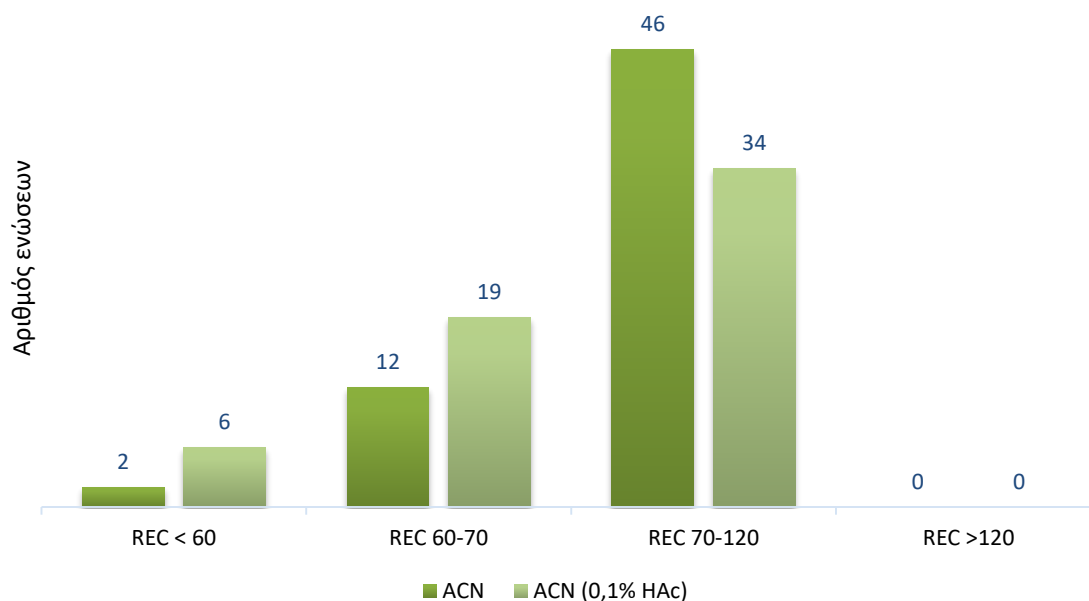
Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 8.3 οι ανακτήσεις στο σύνολο των φυτοπροστατευτικών ενώσεων εμφανίστηκαν ιδιαίτερα υψηλές με τη χρήση μόνο ACN ως διαλύτη εκχύλισης, ενώ με την προσθήκη οξικού οξέος 0,1% (v/v) οι ανακτήσεις ήταν ελαφρώς χαμηλότερες για τις περισσότερες ενώσεις. Και εδώ, οι ενώσεις Propargite και Prosulfocarb εμφάνισαν ανακτήσεις εκτός των αποδεκτών ορίων και με τις δύο συνθήκες. Επιπλέον, με την προσθήκη οξικού οξέος 0,1% (v/v) οι ενώσεις Cyprodinil, Ethiofencarb, Pyrimethanil και Tolclofos methyl εμφάνισαν χαμηλές ανακτήσεις, εκτός των κατώτατων αποδεκτών ορίων, και συγκεκριμένα, 58%, 53%, 53% και 57% αντίστοιχα, σε αντίθεση με την χρήση μόνο ACN, όπου οι ανακτήσεις τους ήταν αρκετά υψηλότερες.

Για τις ενώσεις Acetamiprid, Fenpropimorph, Myclobutanil, Pendimethalin και Triadimefon η προσθήκη οξικού οξέος 0,1% (v/v) δεν φάνηκε να έχει ιδιαίτερη επίδραση, αφού και στις δύο περιπτώσεις οι ανακτήσεις ήταν υψηλές, με παρόμοιες τιμές. Η διαφορά στις ανακτήσεις φαίνεται να είναι μεγαλύτερη για τις ενώσεις Cyromazine, Pyraclostrobin, Pyriproxyfen, Quinoxifen και Spirodiclofen. Πιο αναλυτικά, με τη χρήση μόνο ACN, ως διαλύτη εκχύλισης, οι παραπάνω ενώσεις εμφανίζουν ιδιαίτερα υψηλότερες ανακτήσεις, 97%, 81%, 77%, 93% και 90%, αντίστοιχα, σε σχέση με τις ανακτήσεις τους μετά την προσθήκη οξικού οξέος 0,1% (v/v), οι οποίες είναι 78%, 68%, 62%, 73% και 61%, αντίστοιχα.

Στο Σχήμα 8.4 φαίνεται συγκεντρωτικά ο αριθμός των φυτοπροστατευτικών ενώσεων που εμφάνισαν ανακτήσεις <60%, 60-70%, 70%-120% και >120% με τη χρήση ακετονιτριλίου και με την προσθήκη οξικού οξέος 0,1% (v/v).



Σχήμα 8.3 Επίδραση του διαλύτη εκχύλισης στις ανακτήσεις των φυτοπροστατευτικών ενώσεων.



Σχήμα 8.4 Εύρος ανακτήσεων των επιλεγμένων φυτοπροστατευτικών ενώσεων με την εφαρμογή ACN και την προσθήκη οξικού οξέος.

8.2.4 Προσθήκη EDTA και κεραμικών ομογενοποιητών στην υδατική φάση

Επιπρόσθετα, μελετήθηκε η προσθήκη EDTA στην υδατική φάση. Το EDTA προστέθηκε ως χηλικός παράγοντας που επηρεάζει την πρόσδεση των δισθενών μεταλλικών ιόντων. Πιο συγκεκριμένα, προστέθηκε υδατικό διάλυμα EDTA συγκέντρωσης 0,1 M (0,1% v/v) στην υδατική φάση κατά το στάδιο ενυδάτωσης του δείγματος.

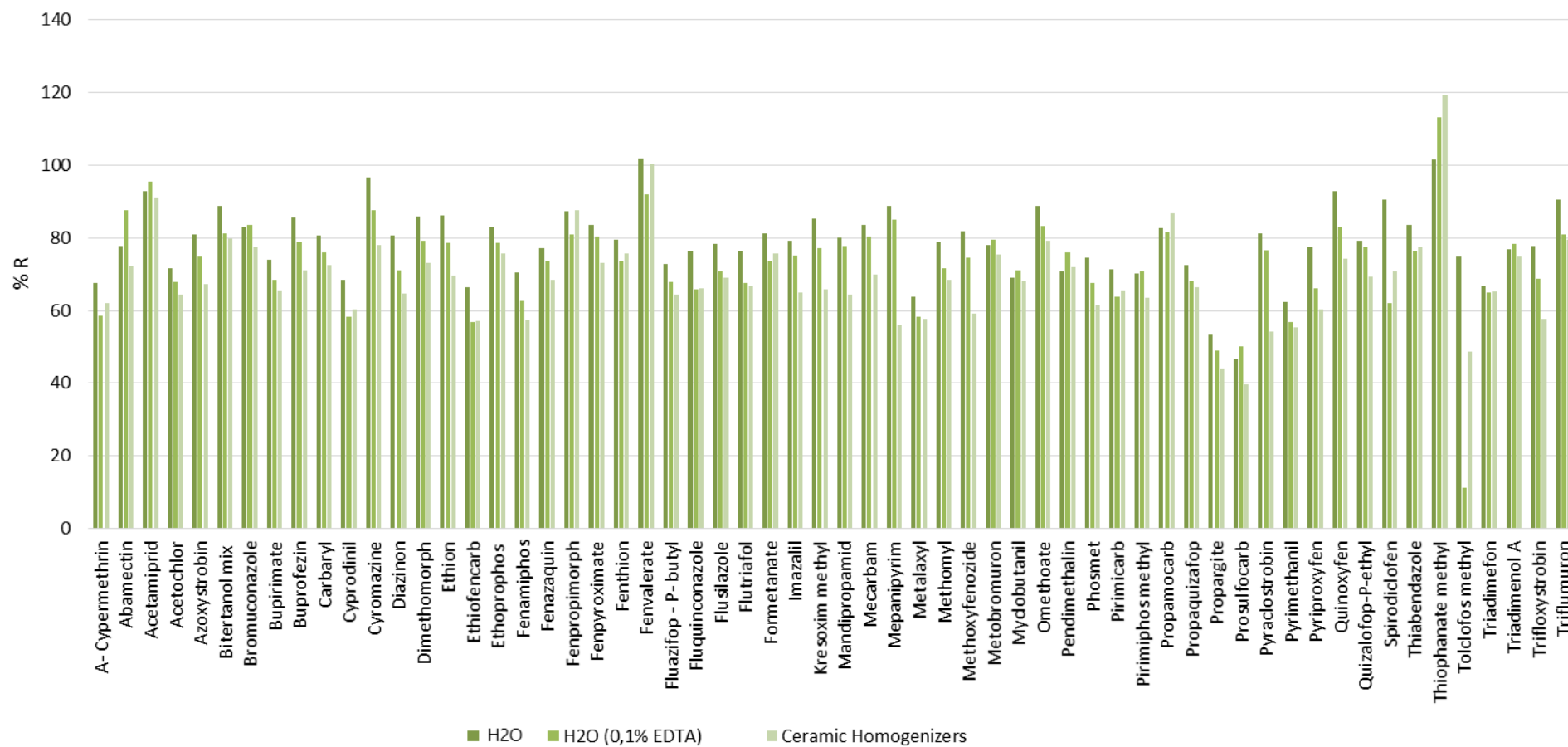
Τέλος μελετήθηκε και η επίδραση των κεραμικών ομογενοποιητών (ceramic homogenizers), οι οποίοι προστέθηκαν στην υδατική φάση πριν το στάδιο της εκχύλισης. Οι κεραμικοί ομογενοποιητές βοηθούν στη καλύτερη ομογενοποίηση του δείγματος, αυξάνοντας έτσι τη συνολική εργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα και οδηγώντας σε πιο αξιόπιστα αποτελέσματα. Στην παρούσα εργασία, αμέσως μετά την προσθήκη του νερού στο στάδιο ενυδάτωσης, προστέθηκαν δύο (2) κεραμικοί ομογενοποιητές (15 mL tubes) και ακολούθησε η ισχυρή ανακίνηση, αρχικά χειροκίνητα και στη συνέχεια στη συσκευή περιδίνησης vortex, όπως προβλέπεται από τη διαδικασία της QuEChERS.

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 8.5 οι ανακτήσεις ήταν ικανοποιητικές και συγκρίσιμες για μεγάλο αριθμό ενώσεων και στις τρεις περιπτώσεις, με εξαίρεση την ένωση Tolclofos methyl, όπου η διαφορά ήταν σημαντική, καθώς η προσθήκη EDTA φάνηκε να έχει αρνητική επίδραση. Και πάλι, οι ενώσεις Propargite και Prosulfocarb εμφάνισαν ανακτήσεις εκτός των αποδεκτών ορίων και στις τρεις περιπτώσεις.

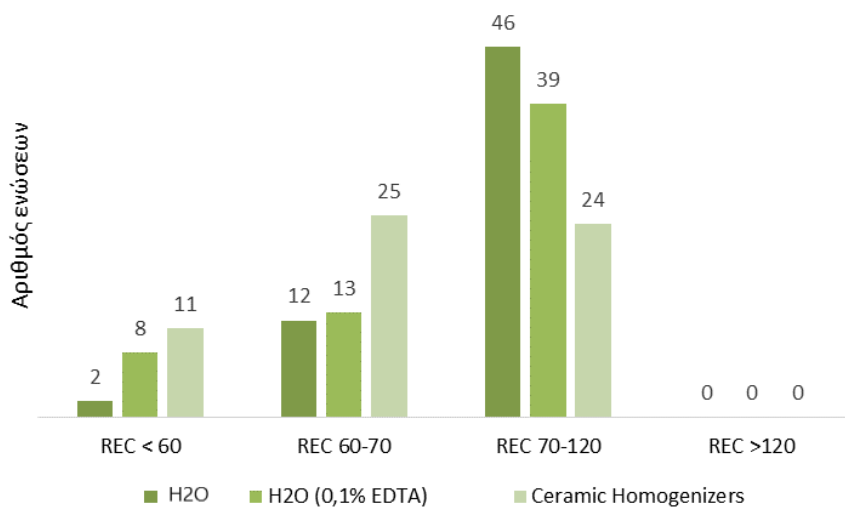
Η χρήση των κεραμικών ομογενοποιητών είχε ως αποτέλεσμα χαμηλότερες, συγκριτικά, ανακτήσεις για τις περισσότερες ενώσεις, ενώ φάνηκε να έχει θετική επίδραση στις ενώσεις Fenpropimorph, Fenvalerate, Propamocarb και Thiophanate methyl (Σχήμα 8.5)

Στο Σχήμα 8.6 φαίνεται συνολικά ο αριθμός των φυτοπροστατευτικών ενώσεων που εμφάνισαν ανακτήσεις <60%, 60%-70%, 70%-120% και >120% με την χρήση μόνο υπερκάθολου νερού, την προσθήκη 0,1% EDTA και την προσθήκη κεραμικών ομογενοποιητών στην υδατική φάση, κατά στο στάδιο ενυδάτωσης του δείγματος. Από τις 60 φυτοπροστατευτικές ενώσεις που μελετήθηκαν, ο αριθμός των ενώσεων που εμφάνισαν ανακτήσεις μεταξύ 70-120%, ήταν 46 με τη χρήση μόνο υπερκάθολου νερού, 39 με την προσθήκη 0,1% EDTA και μόνο 24 με τη χρήση κεραμικών ομογενοποιητών.

Τελικά, απορρίφθηκε τόσο η προσθήκη του EDTA όσο και η χρήση των κεραμικών ομογενοποιητών στην υδατική φάση. Κατά συνέπεια στο στάδιο της ενυδάτωσης του δείγματος πριν την εκχύλιση, χρησιμοποιήθηκε μόνο υπερκάθαρο νερό.



Σχήμα 8.5 Επίδραση της προσθήκης 0,1% EDTA και κεραμικών ομογενοποιητών στην υδατική φάση, κατά στο στάδιο ενυδάτωσης του δείγματος.



Σχήμα 8.6. Εύρος ανακτήσεων των επιλεγμένων φυτοπροστατευτικών ενώσεων με την προσθήκη 0,1% EDTA και κεραμικών ομογενοποιητών στην υδατική φάση, κατά στο στάδιο ενυδάτωσης του δείγματος.

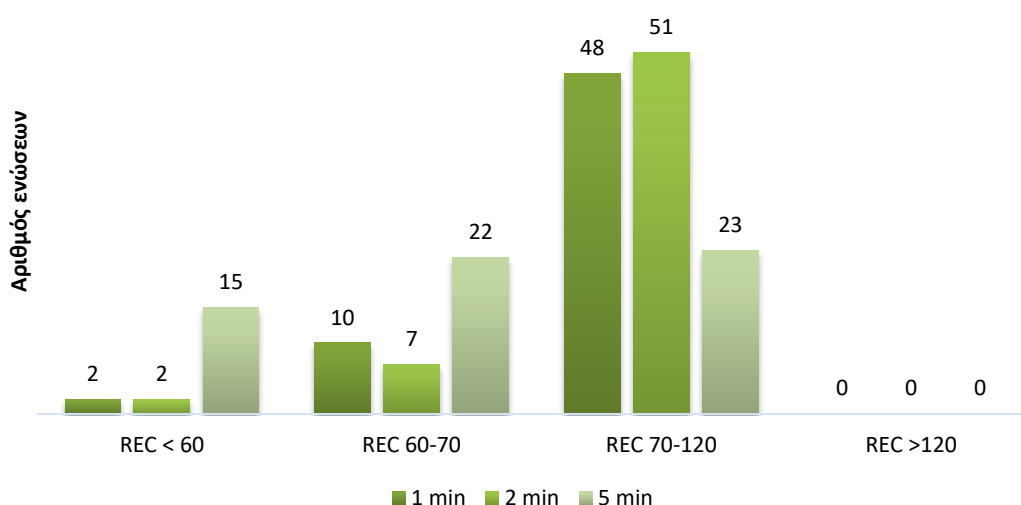
8.2.5 Άλλες παράμετροι που επηρεάζουν την εκχύλιση

Ψύξη δειγμάτων πριν από την εκχύλιση

Η παραμονή των δειγμάτων στην κατάψυξη πριν από την εκχύλιση και πριν από τον καθαρισμό τους δεν εμφάνισε κάποια ιδιαίτερη επίδραση στις ανακτήσεις. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η ψύξη του δείγματος συνιστάται όταν το υπόστρωμα είναι υψηλής περιεκτικότητας σε λίπη ή κηρούς, συστατικά τα οποία απομακρύνονται με την ψύξη, χωρίς όμως να παρασύρονται ταυτόχρονα οι φυτοπροστατευτικές ενώσεις. Αν και η μελέτη της παραμέτρου δεν ήταν σημαντική ως προς τη βελτίωση των ανακτήσεων, εξασφαλίζει ότι σε περίπτωση που το στάδιο του καθαρισμού δεν είναι εφικτό αμέσως μετά την εκχύλιση, η συντήρηση των δειγμάτων στην κατάψυξη δε θα επηρεάζει την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων. Επίσης, η εκχύλιση των δειγμάτων όταν είναι κρύα εμποδίζει την πιθανή διάσπαση των προσδιοριζόμενων ενώσεων, που μπορεί να προκύψει ως αποτέλεσμα της εξώθερμης αντίδρασης που πραγματοποιείται με την προσθήκη των αλάτων εκχύλισης [4, 97].

Χρόνος εκχύλισης

Ο χρόνος εκχύλισης φαίνεται να επηρεάζει περισσότερο την αναπαραγωγιμότητα και την επαναληψιμότητα της μεθόδου, παρά την αποτελεσματικότητα της. Ελέγχθηκαν τρεις διαφορετικοί χρόνοι εκχύλισης: 1 min, 2 min και 5 min, όπως φαίνεται στο Σχήμα 8.7. Οι ανακτήσεις για τους χρόνους εκχύλισης 1 min και 2 min ήταν συγκρίσιμες και δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές, ενώ στα 5 min παρατηρήθηκε απώλεια για ορισμένους αναλύτες (overextraction). Τελικά, η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε σε χρόνο 2 min, καθώς οι ανακτήσεις ήταν ελαφρώς καλύτερες για ορισμένες ενώσεις αλλά και για να εξασφαλιστεί η σωστή εκχύλιση των φυτοπροστατευτικών ενώσεων.



Σχήμα 8.7 Εύρος ανακτήσεων των επιλεγμένων φυτοπροστατευτικών ενώσεων σε τρεις διαφορετικούς χρόνους εκχύλισης.

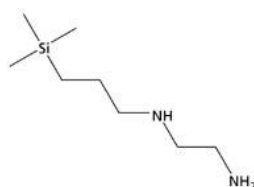
8.3 Επιλογή του κατάλληλου προσροφητικού στο στάδιο καθαρισμού

Το στάδιο του καθαρισμού (clean-up) που πραγματοποιείται μετά την εκχύλιση και πριν από την ανάλυση, είναι απαραίτητο σε πολύπλοκα και επιβαρυνμένα υποστρώματα όπως το έδαφος και τα ιζήματα, καθώς βοηθά στη βελτίωση της ευαισθησίας και της ανθεκτικότητας της μεθόδου, διευκολύνει την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό, ενώ ταυτόχρονα μειώνει την επιβάρυνση και επιμόλυνση των ενόργανων διατάξεων. Ο καθαρισμός επιτυγχάνεται με τη μείωση των παρεμποδισμών που προέρχονται από το υπόστρωμα και την απελευθέρωση των αναλυτών, έτσι ώστε το τελικό αναλυτικό σήμα που θα ληφθεί, να είναι μεγαλύτερης

έντασης. Στις πολυ-υπολειμματικές μεθόδους, το στάδιο αυτό απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή καθώς υπάρχει πιθανότητα απώλειας αναλυτών μαζί με τις παρεμποδίσεις.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία εφαρμόστηκε η πιο δημοφιλής και ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική καθαρισμού που συνοδεύει την QuEChERS, η εκχύλιση στερεάς φάσης σε διασπορά (dispersive Solid Phase Extraction, dSPE). Τα κυριότερα βήματα που περιλαμβάνει η d-SPE είναι η ανάμειξη ενός κλάσματος της οργανικής φάσης με μικρή ποσότητα προσροφητικού υλικού, καλή ανάδευση και ομογενοποίηση του δείγματος και τελικά, φυγοκέντρωση για το διαχωρισμό μεταξύ των δύο φάσεων. Χρησιμοποιήθηκαν τα κυριότερα εμπορικά διαθέσιμα προσροφητικά, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία [41, 44, 97, 103] και συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν: (α) πρωτοταγής δευτεροταγής αμίνη (Primary Secondary Amine, PSA), (β) τροποποιημένη με οκταδέκυλιο πυριτία (C_{18} , octadecyl silica) (γ) γραφίτοποιημένος άνθρακας (graphitized carbon black, GCB) (δ) θειικό μαγνήσιο, $MgSO_4$ και (ε) Florisil.

Η πρωτοταγής δευτεροταγής αμίνη (Σχήμα 8.8) είναι ασθενής ιονανταλλάκτης και χρησιμοποιείται κυρίως για την απομάκρυνση σακχάρων, οργανικών οξέων, λιπαρών οξέων, ορισμένων χρωστικών, και άλλων συστατικών που μπορεί να συνεκλούνται από το υπόστρωμα. Η τροποποιημένη πυριτία (C_{18}) είναι ένα υδρόφοβο, ανάστροφης φάσης προσροφητικό με εξαιρετικά ισχυρή ικανότητα κατακράτησης των μη πολικών παρεμποδίσεων. Όταν χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με το PSA απομακρύνει επίσης πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, στερόλες και άλλες μη πολικές ενώσεις. Ο γραφίτοποιημένος άνθρακας, GCB, είναι ένα ισχυρό προσροφητικό ανάστροφης φάσης, το οποίο είναι αποτελεσματικό για την απομάκρυνση πολυφαινολών, χρωστικών και άλλων πολικών ενώσεων. Ωστόσο, υπάρχει ο κίνδυνος μαζί με τις παρεμποδίζουσες ενώσεις να κατακρατά και πολικά αρωματικά μόρια με επίπεδη κυκλική δομή (planar molecules), με αποτέλεσμα τη μείωση των ανακτήσεων. Τέλος, το Florisil χρησιμοποιείται για την απομάκρυνση λιπών και ελαίων, ενώ το $MgSO_4$, όπως και στο στάδιο της εκχύλισης, χρησιμοποιήθηκε για την απομάκρυνση τυχόν υγρασίας [4].



Σχήμα 8.8 Δομή πρωτοταγούς δευτεροταγούς αμίνης (PSA).

Για τη μελέτη των προσροφητικών υλικών, το δείγμα εδάφους που χρησιμοποιήθηκε ήταν εκχυλισμένο προηγουμένως υπό τις βέλτιστες συνθήκες. Ο καθαρισμός περιγράφεται στην παράγραφο 7.3.1. Για την επιλογή του βέλτιστου συνδυασμού των προσροφητικών, για τον αποτελεσματικότερο καθαρισμό του δείγματος στη διαδικασία της QuEChERS, λήφθηκαν υπόψη οι ανακτήσεις των επιλεγμένων φυτοπροστατευτικών ενώσεων. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε σύγκριση για τους παρακάτω συνδυασμούς προσροφητικών υλικών:

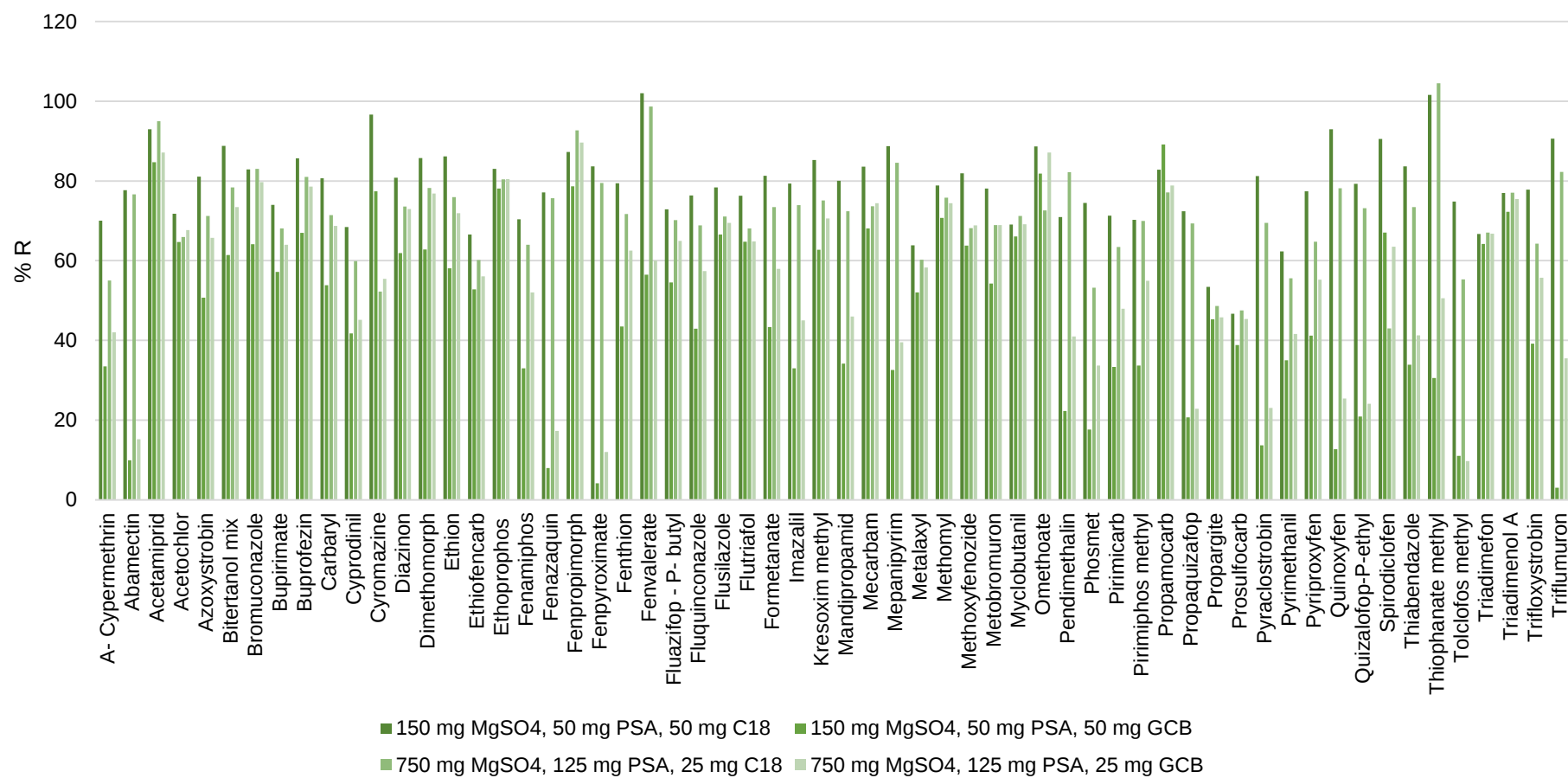
- i. 150 mg MgSO_4 , 50 mg PSA, 50 mg C_{18}
- ii. 150 mg MgSO_4 , 50 mg PSA, 50 mg GCB
- iii. 750 mg MgSO_4 , 125 mg PSA, 25 mg C_{18}
- iv. 750mg MgSO_4 , 125 mg PSA, 25 mg GCB
- v. Florisil 50 mg
- vi. Florisil 100 mg
- vii. Florisil 250 mg
- viii. Florisil 500 mg

Ο συνδυασμός των προσροφητικών υλικών PSA και C_{18} , μαζί με το MgSO_4 , παρουσίασε καλύτερα αποτελέσματα και οπτικά καθαρότερα εκχυλίσματα σε σχέση με το GCB και το Florisil (Σχήματα 8.9, 8.10). Ο συνδυασμός των MgSO_4 /PSA/ C_{18} σε διαφορετικές ποσότητες, και συγκεκριμένα (α) 150/50/50 mg και (β) 750/125/50 mg αντίστοιχα παρουσίασε συγκριτικά αποτελέσματα και υψηλές ανακτήσεις για τις περισσότερες ενώσεις, με εξαίρεση τις ενώσεις Cyromazine, Spirodiclofen και Tolclofos methyl, όπου οι διαφορές ήταν σημαντικές. Πιο αναλυτικά, στην πρώτη περίπτωση οι ανακτήσεις των παραπάνω ενώσεων ήταν 97%, 90% και 75% αντίστοιχα, ενώ στη δεύτερη περίπτωση, με την εφαρμογή μεγαλύτερων ποσοτήτων MgSO_4 και PSA, οι ανακτήσεις των ενώσεων αυτών ήταν χαμηλότερες και συγκεκριμένα 52%, 43% και 55% αντίστοιχα (Σχήμα 8.9).

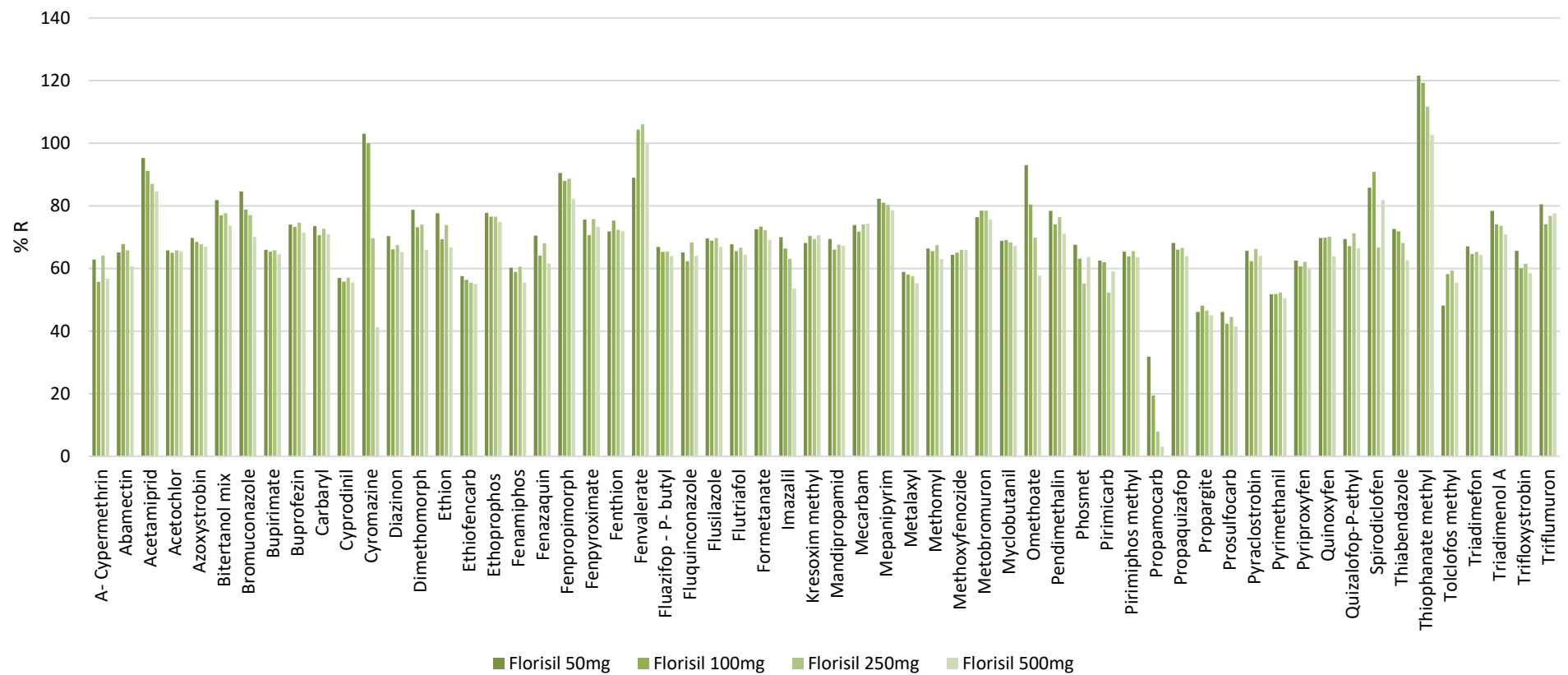
Επίσης, μελετήθηκε ο παραπάνω συνδυασμός, με αντικατάσταση του C_{18} από το γραφιοποιημένο άνθρακα (GCB), όπως φαίνεται στο Σχήμα 8.9. Ο συνδυασμός MgSO_4 /PSA/GCB, που μελετήθηκε σε διαφορετικές ποσότητες, (α) 150/50/50 mg και (β) 750/125/50 mg αντίστοιχα, τελικά κρίθηκε ακατάλληλος, καθώς παρουσίασε σημαντικά μειωμένες ανακτήσεις για την πλειοψηφία των αναλυτών και στις δύο περιπτώσεις. Επιπλέον, παρατηρήθηκαν ανακτήσεις κάτω από τα αποδεκτά όρια για

τις περισσότερες φυτοπροστατευτικές ενώσεις. Ειδικότερα, με την εφαρμογή του πρώτου συνδυασμού τα αποτελέσματα ήταν δραματικά, καθώς οι ανακτήσεις ήταν εξαιρετικά χαμηλές, όπως φαίνεται χαρακτηριστικά στην περίπτωση των: Abamectin (10%), Fenazaquin (8%), Fenpyroximate (4%), Imazalil (33%), Phosmet (18%), Propaquizafop (21%), Pyraclostrobin (14%), Quinoxifen (13%), Toldofos methyl (11%) και Triflumuron (3%). Τα παραπάνω αποτελέσματα για τη χρήση του GCB επιβεβαιώνονται και από άλλες εργασίες [4, 50, 71, 75, 105], όπου, στο στάδιο του καθαρισμού, δοκιμάστηκε η χρήση του GCB σε συνδυασμό με $MgSO_4$ και PSA σε δείγματα εδάφους, δίνοντας χαμηλές ανακτήσεις, οπότε και απορρίφθηκε. Φαίνεται πως ο γραφίτοποιημένος άνθρακας αυξάνει τον κίνδυνο δέσμευσης ορισμένων φυτοπροστατευτικών ενώσεων στο προσροφητικό. Τέλος, η χρήση του GCB δυσκολεύει το διαχωρισμό των φάσεων και τη λήψη καθαρού τελικού εκχυλίσματος.

Επίσης, η προσθήκη του PSA φαίνεται πως βοήθησε στην βελτίωση της απόδοσης της εκχύλισης, συγκριτικά με τα δείγματα του Florisil που δεν πραγματοποιήθηκε η προσθήκη PSA. Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 8.10, η αύξηση της μάζας του προσροφητικού υλικού Florisil, οδηγεί σε μείωση των ανακτήσεων. Η χρήση μικρής ποσότητας Florisil (50 έως 100 mg) δείχνει να έχει καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με τη χρήση μεγαλύτερων ποσοτήτων. Αυτό φαίνεται χαρακτηριστικά στις ενώσεις Cyromazine, Imazalil και Omethoate, των οποίων οι ανακτήσεις ήταν 103%-100%-70%-41%, 70%-66%-63%-54% και 93%-80%-70%-58%, αντίστοιχα, με την προσθήκη 50, 100, 150 και 200 mg του προσροφητικού Florisil, αντίστοιχα. Αυτό, μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι ορισμένες φυτοπροστατευτικές ενώσεις προσροφώνται από τα υλικά, ειδικά όταν χρησιμοποιούνται σε μεγάλες ποσότητες. Αξίζει να αναφερθεί ότι σε ορισμένες μελέτες προσδιορισμού φυτοπροστατευτικών ενώσεων σε δείγματα εδάφους [53, 65] στο στάδιο καθαρισμού έχει χρησιμοποιηθεί ο συνδυασμός μικρής ποσότητας Florisil (25 και 40 mg) με $MgSO_4$ /PSA αλλά και μόνο με $MgSO_4$, δίνοντας καλά αποτελέσματα και υψηλές ανακτήσεις.



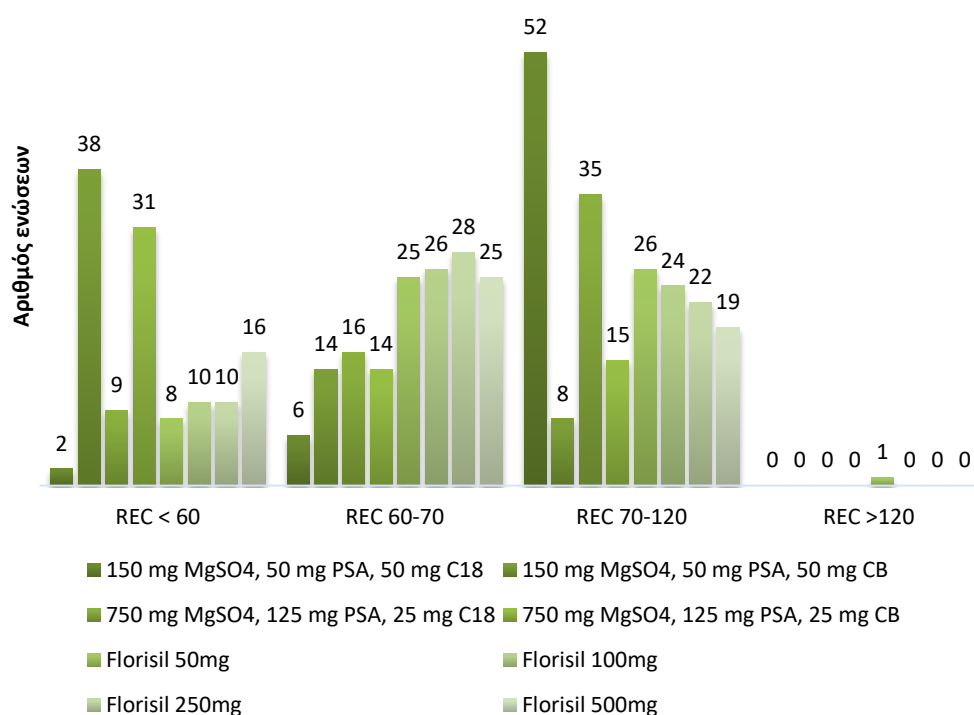
Σχήμα 8.9 Επίδραση MgSO₄, PSA, C₁₈ και GCB στις ανακτήσεις των φυτοπροστατευτικών ενώσεων.



Σχήμα 8.10 Επίδραση Florisil στις ανακτήσεις των φυτοπροστατευτικών ενώσεων.

Το PSA φαίνεται να είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικό για την αύξηση των ανακτήσεων, και σε συνδυασμό με το C₁₈ οδηγεί σε καλύτερα αποτελέσματα. Συνολικά, ο συνδυασμός 150 mg MgSO₄, 50 mg PSA και 50 mg C₁₈, ο οποίος και τελικά επιλέχθηκε, εμφάνισε τις καλύτερες ανακτήσεις για τις περισσότερες φυτοπροστατευτικές ενώσεις, κάτι που επιβεβαιώνεται και βιβλιογραφικά [4, 50, 71]. Συγκεκριμένα, 52 από τα 60 φυτοφάρμακα που μελετήθηκαν συνολικά εμφάνισαν ανακτήσεις από 70% έως 120%. Ανάλογα αποτελέσματα διαπιστώθηκαν και σε προηγούμενες έρευνες για τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα, όπου το μίγμα MgSO₄, PSA και C₁₈, σε διάφορες αναλογίες για διαφορετική ποσότητα δείγματος, έδινε τις καλύτερες ανακτήσεις [49, 80, 105].

Στο Σχήμα 8.11 φαίνεται ο αριθμός των φυτοπροστατευτικών ενώσεων που εμφάνισαν ανακτήσεις <60%, 60%-70%, 70%-120% και >120% με τη χρήση διαφορετικών προσροφητικών και συνδυασμών αυτών, στο στάδιο καθαρισμού. Χαρακτηριστικά φαίνεται πως το GCB ήταν αρκετά ισχυρό ώστε κατακράτησε σημαντικό ποσοστό των αναλυτών, αφού οι ανακτήσεις των ενώσεων μειώθηκαν σημαντικά, ενώ ταυτόχρονα το 63% των μελετώμενων φυτοπροστατευτικών ενώσεων παρουσίασε ανακτήσεις κάτω από 60%.



Σχήμα 8.11 Εύρος ανακτήσεων των επιλεγμένων φυτοπροστατευτικών ενώσεων με την χρήση διαφορετικών προσροφητικών και συνδυασμών αυτών, στο στάδιο καθαρισμού.

Είναι σαφές από το παραπάνω Σχήμα (Σχήμα 8.11) ότι ο συνδυασμός PSA/C₁₈ αποδείχτηκε ο αποτελεσματικότερος για τον καθαρισμό των εκχυλισμάτων. Η χηλική δράση του μορίου PSA, οφειλόμενη στην παρουσία των πρωτοταγών και κυρίως των δευτεροταγών αμινών αποδείχτηκε ικανή για επαρκή κατακράτηση παρεμποδίσεων πολικής φύσης που υπάρχουν στο έδαφος. Ταυτόχρονα, η χρήση του υδρόφοβου, ανάστροφης φάσης προσροφητικού C₁₈ με την εξαιρετικά ισχυρή ικανότητα κατακράτησης των μη πολικών παρεμποδίσεων ικανοποίησε την ανάγκη απαλλαγής από αυτές.

B. Επικύρωση

8.4 Αναλυτικά χαρακτηριστικά επίδοσης της μεθόδου QuEChERS

Η προτεινόμενη μέθοδος επικυρώθηκε για την εφαρμογή της στον προσδιορισμό των συγκεκριμένων φυτοπροστατευτικών ενώσεων σε δείγματα εδάφους, σύμφωνα με τις οδηγίες της SANTE/11813/2017 [93]. Οι παράμετροι που επικυρώθηκαν ήταν:

1. Τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού.
2. Η γραμμικότητα της μεθόδου.
3. Η ακρίβεια της μεθόδου
4. Η επαναληψιμότητα και η αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου.

8.4.1 Όρια ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού

Το όριο ανίχνευσης (limit of detection, LOD) και το όριο ποσοτικής αποτίμησης (limit of quantification, LOQ) της προτεινόμενης μεθόδου υπολογίστηκαν από τις καμπύλες αναφοράς ως το 3,3 και 10 της τυπικής απόκλισης της τετμημένης επί τις αρχής προς την κλίση, αντίστοιχα. Για τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις που μελετήθηκαν, τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης κυμάνθηκαν από 0,11 ng/g (Cyprodinil) έως 2,8 ng/g (Cyromazine, Myclobutanil) και 0,36 ng/g (Cyprodinil) έως 9,24 ng/g (Myclobutanil) αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 8.1.

Πίνακας 8.1 Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της μεθόδου.

Ένωση	LOD (ng/g)	LOQ (ng/g)
A- Cypermethrin	0,21	0,69
Abamectin	1,93	6,37
Acetamiprid	0,31	1,02
Acetochlor	0,52	1,72
Azoxystrobin	1,54	5,08
Bitertanol mix	0,58	1,91
Bromuconazole	1,61	5,31
Bupirimate	1,60	5,28
Buprofezin	0,27	0,91
Carbaryl	0,88	2,91
Cyprodinil	0,11	0,36
Cyromazine	2,80	9,10
Diazinon	0,13	0,43
Dimethomorph	0,19	0,63
Ethiofencarb	0,37	1,22
Ethion	0,59	1,96
Ethoprophos	1,29	4,31
Fenamiphos	0,58	1,92
Fenazaquin	2,30	7,70
Fenpropimorph	1,90	6,40
Fenpyroximate	2,70	8,91
Fenthion	0,15	0,50
Fenvalerate	0,24	0,79
Fluazifop - P- butyl	0,22	0,75
Fluquinconazole	1,08	3,61
Flusilazole	0,42	1,39

Πίνακας 8.1 (συνέχεια) *Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της μεθόδου.*

Ένωση	LOD (ng/g)	LOQ (ng/g)
Flutriafol	0,52	1,74
Formetanate	0,50	1,65
Imazalil	1,73	5,76
Kresoxim methyl	0,22	0,74
Mandipropamid	2,00	6,60
Mecarbam	0,61	2,04
Mepanipyrim	0,19	0,63
Metalaxyl	0,17	0,56
Methomyl	1,90	6,27
Methoxyfenozide	0,25	0,83
Metobromuron	2,65	8,50
Myclobutanil	2,80	9,24
Omethoate	2,10	6,93
Pendimethalin	0,13	0,43
Phosmet	1,68	5,61
Pirimicarb	0,34	1,14
Pirimiphos methyl	1,35	4,51
Propamocarb	0,81	2,71
Propaquizafop	0,53	1,78
Propargite	0,23	0,76
Prosulfocarb	0,40	1,33
Pyraclostrobin	1,34	4,46
Pyrimethanil	0,16	0,55
Pyriproxyfen	0,64	2,12
Quinoxifen	0,20	0,65
Quizalofop-P-ethyl	0,29	0,97
Spirodiclofen	0,31	1,02
Thiabendazole	1,34	4,46

Πίνακας 8.1 (συνέχεια) Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της μεθόδου.

Ένωση	LOD (ng/g)	LOQ (ng/g)
Thiophanate methyl	0,88	2,93
Tolclofos methyl	0,38	1,27
Triadimefon	0,72	2,39
Triadimenol A	2,10	6,93
Trifloxystrobin	0,33	1,11
Triflumuron	0,20	0,67

8.4.2 Γραμμικότητα

Η γραμμικότητα της μεθόδου μελετήθηκε με την κατασκευή καμπυλών βαθμονόμησης προσομοιωμένου υποστρώματος, πέντε σημείων, που ακολούθησαν τη γραμμική παλινδρόμηση. Για το σκοπό αυτό, μια σειρά δειγμάτων εδάφους εμβολιάστηκε με πρότυπα διαλύματα μίγματος των επιλεγμένων φυτοπροστατευτικών ενώσεων για εύρος συγκεντρώσεων από το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) έως 250 ng/g. Για κάθε εμβολιασμένο δείγμα πραγματοποιήθηκαν πέντε (5) επαναλαμβανόμενες εκχυλίσσεις. Ο συντελεστής προσδιορισμού (r^2) είχε για όλες τις ενώσεις τιμές μεγαλύτερες από 0,99, και συγκεκριμένα κυμάνθηκε από 0,9903 έως 0,9998. Συνεπώς, η μέθοδος παρουσίασε εξαιρετική γραμμικότητα. Στον Πίνακα 8.2 δίνονται οι καμπύλες βαθμονόμησης και οι τιμές των συντελεστών προσδιορισμού, στη γραμμική περιοχή LOQ-250 ng/g.

Πίνακας 8.2 Καμπύλες βαθμονόμησης και συντελεστής προσδιορισμού της μεθόδου.

Ένωση	$y = Ax + B$	r^2
A- Cypermethrin	$y = 1576x + 26529$	0,9983
Abamectin	$y = 474,88x + 7172,9$	0,9993
Acetamiprid	$y = 5392,5x + 125684$	0,9927
Acetochlor	$y = 4723,1x + 912299$	0,9976

Πίνακας 8.2 (συνέχεια) Καμπύλες βαθμονόμησης και συντελεστής προσδιορισμού της μεθόδου.

Ένωση	$y = Ax + B$	r^2
Bitertanol mix	$y = 2004,4x + 76012$	0,9998
Bromuconazole	$y = 701,63x + 29459$	0,9911
Bupirimate	$y = 9680,4x + 181220$	0,9937
Buprofezin	$y = 9593,7x + 298051$	0,9996
Carbaryl	$y = 35528x + 71225$	0,9997
Cyprodinil	$y = 45519x + 562347$	0,9987
Cyromazine	$y = 15197x + 158593$	0,9948
Diazinon	$y = 15234x + 253061$	0,9907
Dimethomorph	$y = 5075,2x + 40869$	0,9953
Ethiofencarb	$y = 12375x + 194202$	0,9961
Ethion	$y = 589,04x + 16936$	0,9943
Ethoprophos	$y = 7971,4x + 203778$	0,9925
Fenamiphos	$y = 46293x + 187821$	0,9985
Fenazaquin	$y = 35955x + 353920$	0,9953
Fenpropimorph	$y = 62496x - 442479$	0,9981
Fenpyroximate	$y = 525,36x + 1159,7$	0,9950
Fenthion	$y = 2307,5x + 186313$	0,9931
Fenvalerate	$y = 1385,3x + 7129$	0,9981
Fluazifop - P- butyl	$y = 2076,9x + 44202$	0,9981
Fluquinconazole	$y = 13513x + 142387$	0,9986
Flusilazole	$y = 2972,6x + 247140$	0,9941
Flutriafol	$y = 9733,7x + 17907$	0,9981
Formetanate	$y = 2490,7x + 20318$	0,9957
Imazalil	$y = 51121x - 5354$	0,9997
Kresoxim methyl	$y = 3105,1x + 71274$	0,9943
Mandipropamid	$y = 5633,8x + 521353$	0,9913
Mecarbam	$y = 456,13x + 18279$	0,9967

Πίνακας 8.2 (συνέχεια) Καμπύλες βαθμονόμησης και συντελεστής προσδιορισμού της μεθόδου.

Ένωση	$y = Ax + B$	r^2
Metalaxyl	$y = 24493x + 232382$	0,9970
Methomyl	$y = 14813x + 152831$	0,9924
Methoxyfenozide	$y = 718,42x + 86168$	0,9992
Metobromuron	$y = 2120,1x + 58334$	0,9954
Myclobutanil	$y = 14003x - 137185$	0,9963
Omethoate	$y = 7585,3x + 58143$	0,9940
Pendimethalin	$y = 9733,7x + 17907$	0,9981
Phosmet	$y = 7599,9x - 4582,8$	0,9995
Pirimicarb	$y = 21186x + 270292$	0,9989
Pirimiphos methyl	$y = 10358x + 579026$	0,9990
Propamocarb	$y = 28497x + 19728$	0,9990
Propaquizafop	$y = 3739,7x + 511458$	0,9903
Propargite	$y = 3106x + 35783$	0,9934
Prosulfocarb	$y = 1300,9x + 132742$	0,9939
Pyraclostrobin	$y = 4207,8x + 2866,4$	0,9979
Pyrimethanil	$y = 20306x + 467721$	0,9912
Pyriproxyfen	$y = 13463x - 76525$	0,9945
Quinoxifen	$y = 2945x + 41747$	0,9992
Quizalofop-P-ethyl	$y = 6124,9x + 671683$	0,9934
Spirodiclofen	$y = 4000,4x + 15174$	0,9991
Thiabendazole	$y = 23849x + 62942$	0,9969
Thiophanate methyl	$y = 18939x + 202283$	0,9924
Tolclofos methyl	$y = 991,11x + 13870$	0,9929
Triadimefon	$y = 5068,1x + 656191$	0,9996
Triadimenol A	$y = 23894x + 286481$	0,9927
Trifloxystrobin	$y = 751,29x - 1650,5$	0,9984
Triflumuron	$y = 13455x - 40631$	0,9990

8.4.3 Ορθότητα, επαναληψιμότητα και αναπαραγωγιμότητα

Η εκτίμηση της ορθότητας της μεθόδου βασίστηκε στον υπολογισμό των ανακτήσεων σε εμβολιασμένα δείγματα εδάφους. Πιο συγκεκριμένα, εμβολιάστηκαν πέντε δείγματα ($n=5$) τα οποία αναλύθηκαν μέσα στην ίδια μέρα, για να υπολογιστεί παράλληλα η επαναληψιμότητα της μεθόδου (Relative Standard Deviation, RSD_r) και η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε για πέντε διαδοχικές ημέρες, για να υπολογιστεί η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα (Relative Standard Deviation, RSD_{WR}), συνθέτοντας έτσι την πιστότητα της μεθόδου.

Για τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις που μελετήθηκαν, τα επίπεδα εμβολιασμού ήταν 25 ng/g και 50 ng/g. Για τις περισσότερες ενώσεις, οι μέσες τιμές των ανακτήσεων ($n=5$) κυμάνθηκαν από 63% (Fenamiphos) έως 95% (Thiophanate methyl), στο επίπεδο εμβολιασμού 25 ng/g, και από 61% (Pyrimethanil) έως 98% (Thiophanate methyl), στο επίπεδο εμβολιασμού 50 ng/g. Όπως φαίνεται, η ένωση Thiophanate methyl εμφάνισε τις υψηλότερες ανακτήσεις και στα δύο επίπεδα εμβολιασμού. Οι ενώσεις Ethiofencarb, Metalaxyl και Pyrimethanil, στο επίπεδο εμβολιασμού 25 ng/g παρουσίασαν χαμηλές ανακτήσεις, οριακά εκτός των αποδεκτών ορίων, και συγκεκριμένα 59%, 58% και 56% αντίστοιχα. Όσον αφορά το επίπεδο εμβολιασμού 50 ng/g, οι παραπάνω ενώσεις, αν και εμφάνισαν σχετικά χαμηλές ανακτήσεις, 66%, 63% και 61% αντίστοιχα, ήταν εντός των αποδεκτών ορίων. Εξαιρέση αποτέλεσαν οι ενώσεις Propargite και Prosulfocarb, οι οποίες παρουσίασαν αρκετά χαμηλές ανακτήσεις και στα δύο επίπεδα εμβολιασμού.

Σε όλες τις περιπτώσεις η επαναληψιμότητα, $\%RSD_r$ ήταν μικρότερη από 18%, κυμαινόμενη από 2,6% (Pirimicarb) έως 15,2% (Mepanipyrim, Methomyl), σε επίπεδο εμβολιασμού 25ng/g, και από 2,3% (Diazinon) έως 13,3% (Pirimiphos methyl), σε επίπεδο εμβολιασμού 50 ng/g. Η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα, $\%RSD_{WR}$, ήταν μικρότερη από 20%, που είναι το ανώτατο αποδεκτό όριο για όλες τις περιπτώσεις, εκτός από τις ενώσεις Methomyl (20,4%) και Omethoate (20,5%) σε επίπεδο εμβολιασμού 25 ng/g. Για τις υπόλοιπες ενώσεις, η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα, $\%RSD_{WR}$, κυμάνθηκε από 2,9% για το Pirimicarb έως 19,8% για το Pendimethalin, σε επίπεδο εμβολιασμού 25 ng/g, και από 4,8% για το Carbaryl έως 15,3% για το Omethoate, σε επίπεδο εμβολιασμού 50 ng/g. Στον Πίνακα 8.4 φαίνονται οι ανακτήσεις ($\%R$) της μεθόδου σε επίπεδο εμβολιασμού 50ng/g, η επαναληψιμότητα ($\%RSD_r$) και η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα ($\%RSD_{WR}$).

Πίνακας 8.3 Ανακτήσεις (%R), επαναληψιμότητα (%RSD_i) και ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα (%RSD_{WR}) των φυτοπροστατευτικών ενώσεων σε εκχυλίσματα εδάφους σε επίπεδα εμβολιασμού 25 ng/g και 50 ng/g.

Ένωση	25 ng/g			50 ng/g		
	%R	%RSD _r	%RSD _{WR}	%R	%RSD _r	%RSD _{WR}
A- Cypermethrin	65	10,7	12,5	66	8,2	10,4
Abamectin	71	8,3	11,0	77	6,4	9,2
Acetamiprid	82	11,3	13,1	91	8,7	10,9
Acetochlor	64	9,4	12,1	71	7,2	10,1
Azoxystrobin	72	8,8	11,0	80	6,8	9,2
Bitertanol mix	81	6,1	8,6	89	4,4	7,2
Bromuconazole	72	8,7	10,8	83	5,9	6,5
Bupirimate	68	4,6	12,5	73	2,8	10,4
Buprofezin	78	5,5	10,9	85	2,7	9,1
Carbaryl	74	6,9	9,8	81	5,3	4,8
Cyprodinil	64	7,5	8,2	68	5,8	6,8
Cyromazine	88	11,1	14,2	94	8,5	12,5
Diazinon	74	4,9	11,9	81	2,3	9,2
Dimethomorph	80	10,1	15,1	86	7,8	13,6
Ethiofencarb	59	7,8	10,1	66	4,6	7,6
Ethion	77	8,2	7,7	86	4,8	6,4
Ethoprophos	71	7,9	13,9	82	4,7	11,6
Fenamiphos	63	8,9	8,6	71	5,1	7,2
Fenazaquin	66	9,7	11,0	77	6,7	9,2
Fenpropimorph	73	7,5	12,7	87	5,8	10,6
Fenpyroximate	78	7,4	10,6	85	4,9	6,8
Fenthion	71	8,6	12,5	78	6,6	10,4
Fenvalerate	88	11,8	15,0	96	9,1	12,5
Fluazifop-P-butyl	65	5,7	10,1	73	4,4	8,4
Fluquinconazole	69	6,7	9,5	76	4,4	7,9
Flusilazole	65	6,0	10,7	77	4,6	8,9

Πίνακας 8.3 (συνέχεια) Ανακτήσεις (%R), επαναληψιμότητα (%RSDr) και ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα (%RSD_{WR}) των φυτοπροστατευτικών ενώσεων σε εκχυλίσματα εδάφους σε επίπεδα εμβολιασμού 25 ng/g και 50 ng/g.

Ένωση	25 ng/g			50 ng/g		
	%R	%RSDr	%RSD _{WR}	%R	%RSDr	%RSD _{WR}
Flutriafol	69	10,5	13,2	77	8,7	10,8
Formetanate	74	5,3	7,1	81	4,3	8,8
Imazalil	73	10,5	14,1	79	9,6	13,2
Kresoxim methyl	78	6,4	11,3	83	5,0	12,1
Mandipropamid	74	12,4	17,3	80	8,8	11,3
Mecarbam	77	10,2	14,8	83	7,2	10,1
Mepanipirim	81	15,2	18,7	90	9,9	13,2
Metalaxyl	58	8,4	12,4	63	7,5	11,9
Methomyl	69	15,2	20,4	78	9,9	13,8
Methoxyfenozide	76	4,5	9,9	81	9,3	11,8
Metobromuron	72	8,4	12,8	77	5,0	10,4
Myclobutanil	66	9,6	15,1	69	7,4	11,8
Omethoate	75	14,8	20,5	84	9,3	15,3
Pendimethalin	64	14,3	19,8	70	11,1	13,3
Phosmet	68	14,0	16,7	73	8,9	10,5
Pirimicarb	67	2,6	2,9	71	5,3	8,9
Pirimiphos methyl	65	6,5	8,6	69	13,3	10,2
Propamocarb	75	11,2	15,8	81	9,1	11,7
Propaquizafop	68	10,1	14,2	74	6,5	10,9
Propargite	46	8,9	13,2	44	6,8	7,7
Prosulfocarb	50	5,3	8,6	47	10,9	12,6
Pyraclostrobin	71	7,6	9,8	81	5,9	8,9
Pyrimethanil	56	6,9	9,7	61	5,3	8,1
Pyriproxyfen	67	11,9	12,8	74	7,3	11,6
Quinoxifen	86	6,5	9,4	94	7,1	7,8

Πίνακας 8.3 (συνέχεια) Ανακτήσεις (%R), επαναληψιμότητα (%RSDr) και ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα (%RSD_{WR}) των φυτοπροστατευτικών ενώσεων σε εκχυλίσματα εδάφους σε επίπεδα εμβολιασμού 25 ng/g και 50 ng/g.

Ένωση	25 ng/g			50 ng/g		
	%R	%RSDr	%RSD _{WR}	%R	%RSDr	%RSD _{WR}
Quizalofop-P-ethyl	75	8,6	12,1	80	5,9	9,6
Spirodiclofen	86	8,4	13,4	87	6,6	8,2
Thiabendazole	82	9,7	12,7	83	6,9	10,2
Thiophanate methyl	95	11,0	14,5	98	10,1	12,4
Tolclofos methyl	76	6,8	8,8	74	4,6	7,9
Triadimenol A	77	8,6	10,7	76	5,4	10,1
Trifloxystrobin	80	7,8	11,1	78	5,6	9,4
Triflumuron	85	10,5	12,8	90	6,5	8,8

Οι χαμηλές τιμές %RSD είναι σημαντικές κατά την ανάλυση πολύπλοκων υποστρωμάτων, όπως το έδαφος και τα ιζήματα, εξαιτίας δυνητικών παρεμποδίσεων από το υπόστρωμα αλλά και λόγω των περισσότερων σταδίων ανάλυσης, που έχουν ως συνέπεια, τη μεγαλύτερη πιθανότητα εισαγωγής σφαλμάτων στην πειραματική διαδικασία.

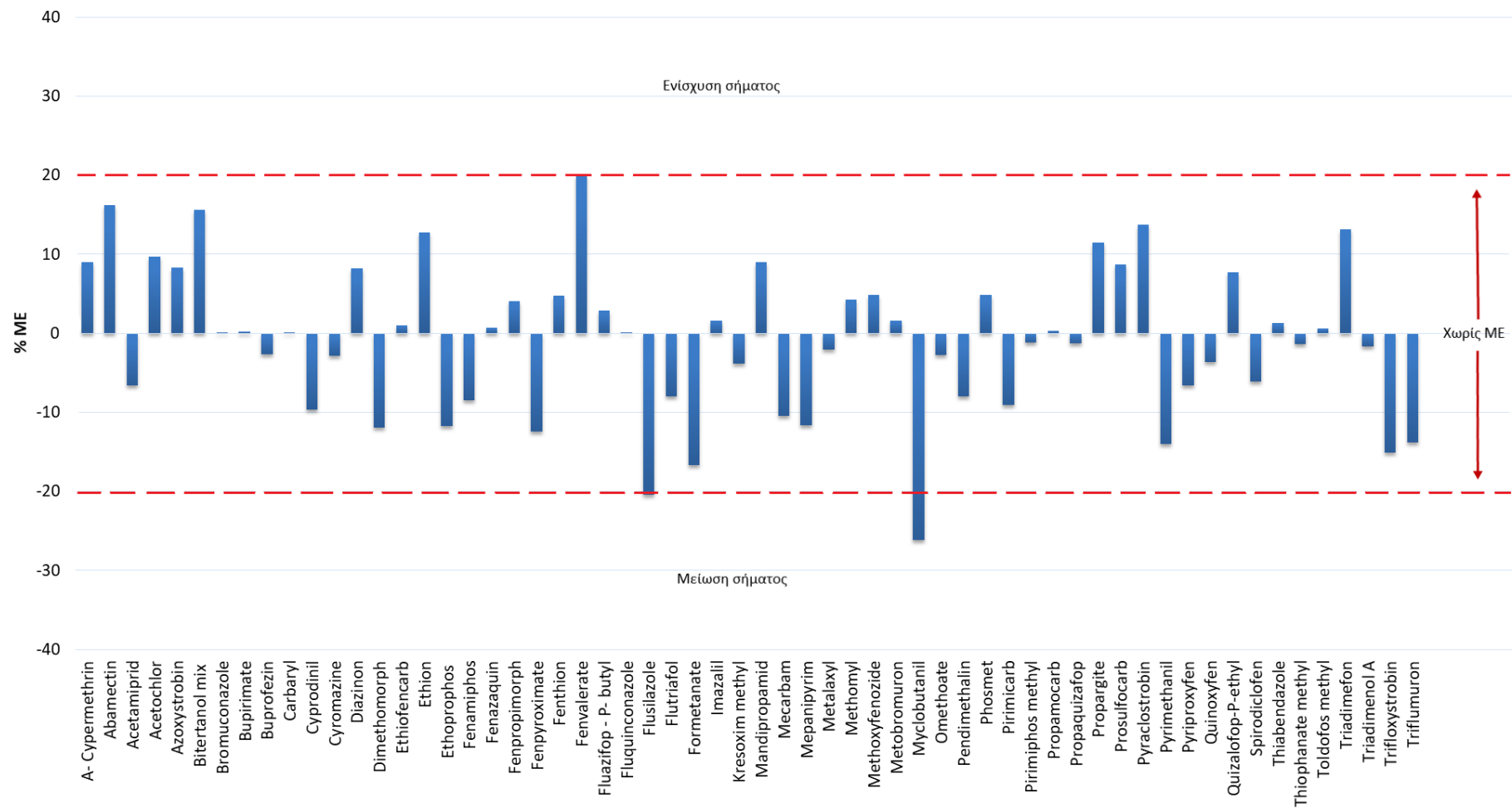
8.5 Επίδραση υποστρώματος

Το φαινόμενο της επίδρασης του υποστρώματος και οι παράγοντες στους οποίους μπορεί να οφείλεται έχουν ήδη περιγραφεί στο θεωρητικό μέρος. Η σημασία της μελέτης του ως αναλυτικό χαρακτηριστικό αποδίδεται στο ότι ο βαθμός στον οποίο επηρεάζεται ο ιοντισμός των ενώσεων από τυχόν παρεμποδίσεις από το υπόστρωμα μπορεί να οδηγήσει σε μεγάλα σφάλματα στον ποσοτικό προσδιορισμό, με αποτέλεσμα εσφαλμένα και αναληθή αποτελέσματα. Για τιμές μικρότερες του 0% η επίδραση του υποστρώματος μειώνει το χρωματογραφικό σήμα, ενώ για μεγαλύτερες τιμές το ενισχύει. Για τιμές επίδρασης του υποστρώματος (Matrix Effect, ME) μεταξύ -20% και 20% θεωρείται ότι το υπόστρωμα προκαλεί ελαφριά μείωση ή ενίσχυση του σήματος. Για τιμές από -50% έως -20% ή από 20% έως 50% η επίδραση θεωρείται

μέτρια, ενώ για τιμές μικρότερες του -50% ή μεγαλύτερες του 50% η επίδραση θεωρείται ισχυρή.

Για το μίγμα των επιλεγμένων φυτοπροστατευτικών ενώσεων παρατηρήθηκαν αρκετές διακυμάνσεις στις τιμές της επί τοις εκατό επίδρασης του υποστρώματος (%ME), υποδηλώνοντας είτε ενίσχυση είτε μείωση του σήματος, όπως φαίνεται στο Σχήμα 8.12. Πιο συγκεκριμένα, η ενίσχυση του σήματος φάνηκε να είναι αμελητέα για τις ενώσεις Fluquinconazole (0,05%), Carbaryl (0,12%), Bromuconazole (0,16%), Bupirimate (0,20%), Toldofos methyl (0,64%), Fenazaquin (0,67%) και Ethiofencarb (0,95%). Αρκετές ήταν οι φυτοπροστατευτικές ενώσεις που παρατηρήθηκε μέτρια αύξηση του σήματος, ενώ για την ένωση Fenvalerate η αύξηση ήταν οριακά πιο σημαντική (19,98%). Μεγάλος ήταν και ο αριθμός των φυτοπροστατευτικών ενώσεων που παρατηρήθηκε ελαφριά μείωση του σήματος, ενώ για τις ενώσεις Flusilazole και Myclobutanil η μείωση ήταν οριακά μεγαλύτερη (-20,46 και -26,18 αντίστοιχα).

Αν και δεν παρατηρήθηκε ισχυρή μείωση ή αύξηση του σήματος λόγω επίδρασης υποστρώματος για καμία ένωση, η χρήση πρότυπων καμπυλών αναφοράς σε υπόστρωμα εδάφους (matrix-matched calibration curve) μειώνει την πιθανότητα εσφαλμένων αποτελεσμάτων.



Σχήμα 8.12 Επίδραση υποστρώματος για τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Με την ολοκλήρωση της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας, αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε μια αναλυτική μέθοδος για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό εξήντα (60) φυτοπροστατευτικών ενώσεων σε δείγματα εδάφους. Με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη βελτιστοποίηση και επικύρωση της μεθόδου QuEChERS καταλήγουμε στα παρακάτω συμπεράσματα:

Όσον αφορά τα άλατα της εκχύλισης, για το μίγμα των φυτοπροστατευτικών ενώσεων επιλέχθηκε ο συνδυασμός των 6 g άνυδρου MgSO_4 / 1,5 g NaCl / 1,5 g κιτρικού νατρίου / 0,75 g σεσκιδρύτη διβασικού κιτρικού νατρίου. Ο διαλύτης εκχύλισης ήταν το ακετονιτρίλιο (10 mL ACN), ενώ είχε προηγηθεί η προσθήκη 7,5 mL νερού πριν την εκχύλιση. Ο χρόνος της εκχύλισης ορίστηκε στα 2 min ενώ για την αποφυγή των συσσωματωμάτων, βοήθησε η έντονη ανακίνηση χειροκίνητα πριν την τοποθέτηση στο vortex. Όσον αφορά τον καθαρισμό των εκχυλισμάτων, μελετήθηκαν διαφορετικοί συνδυασμοί προσροφητικών και τελικά επιλέχθηκε αυτός του 150 mg MgSO_4 / 50 mg PSA / 50 mg C_{18} παρέχοντας πολύ πιο καθαρά εκχυλίσματα χωρίς να υπάρχει κίνδυνος απώλειας αναλυτών. Παρατηρήθηκε ότι η αύξηση της ποσότητας των προσροφητικών υλικών είχε σαν αποτέλεσμα την μείωση των ανακτήσεων και γενικότερα μείωση της αποτελεσματικότητας.

Η ανάλυση και ο ποσοτικός προσδιορισμός των φυτοπροστατευτικών ενώσεων έγινε με τη χρήση Υγρής Χρωματογραφίας συζευγμένη με Φασματομετρία Μάζας (LC-MS). Τα κριτήρια για τον ορθό ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό, καθώς και την επικύρωση της μεθόδου ήταν τα προβλεπόμενα σύμφωνα με τις οδηγίες της SANTE 11813/2017.

Τα αποτελέσματα από την επικύρωση της μεθόδου QuEChERS επιβεβαίωσαν την καταλληλότητα της για τον προσδιορισμό των επιλεγμένων ενώσεων σε δείγματα εδάφους. Συγκεκριμένα, για τις περισσότερες ενώσεις οι ανακτήσεις κυμάνθηκαν από 63% έως 95%, σε επίπεδο εμβολιασμού 25 ng/g και από 61% έως 98%, σε επίπεδο εμβολιασμού 50 ng/g, με εξαίρεση τις ενώσεις Propargite και Prosulfocarb που εμφάνισαν αρκετά χαμηλότερες ανακτήσεις και στα δύο επίπεδα εμβολιασμού.. Τα όρια ανίχνευσης κυμάνθηκαν από 0,11 ng/g έως 2,8 ng/g και τα όρια ποσοτικοποίησης κυμάνθηκαν από 0,36 ng/g έως 9,24 ng/g. Όσον αφορά τη γραμμικότητα, ο συντελεστής γραμμικής συσχέτισης είχε για όλες τις ενώσεις τιμές μεγαλύτερες από

0,99 και συγκεκριμένα κυμάνθηκε από 0,9903 έως 0,9998. Ακόμα, η επαναληψιμότητα και η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα εκφρασμένη ως σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) υπολογίστηκε κάτω από 18% και 21% αντίστοιχα για όλες τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις. Τέλος, η μελέτη της επίδρασης του υποστρώματος φανέρωσε αρκετές διακυμάνσεις για αρκετές ενώσεις χωρίς όμως κάποια ισχυρή μείωση ή αύξηση του σήματος λόγω επίδρασης υποστρώματος για καμία ένωση.

Εν κατακλείδι, η τεχνική QuEChERS σε συνδυασμό με την υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας είναι μια καλή μεθοδολογία για την ταυτόχρονη ανάλυση φυτοπροστατευτικών ενώσεων με διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες σε δείγματα εδάφους. Από τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα της μεθοδολογίας που αναπτύχθηκε είναι ο μικρός συνολικός χρόνος ανάλυσης, ο μικρός αριθμός των σταδίων και το δυναμικό εύρος των προσδιοριζόμενων ενώσεων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Μεγαδούκα, Δ., Ανάλυση περιβαλλοντικού κινδύνου από βαρέα μέταλλα γεωγενούς και ανθρωπογενούς προέλευσης σε δύο αντιπροσωπευτικές περιοχές του Ελλαδικού χώρου, Διδακτορική Διατριβή, ΓΠΑ, Αθήνα 2016
- [2] Dermatas, D., Chrysochoou, M., and Moon, D.H., ASCE, Geotechnical Special Publication, 2008, **177**, 660-667
- [3] European Commission, Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy, Off. J. Eur. Communities, 2000, **327**, 1–72
- [4] Νάννου, Χ., Σύγχρονες αναλυτικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών και φαρμακευτικών ενώσεων σε φυσικά νερά και ιζήματα, Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα 2018
- [5] Nannou, C.I., Kosma C.I., and Albanis T.A., Int. J. Environ. Anal. Chem., 2015, **95**, 1242–1262
- [6] Λαβδάκη, Μ., Η εμφάνιση αναδυόμενων ρύπων σε αστικά απόβλητα και η δυνατότητα αποδόμησης αυτών σε μονάδες επεξεργασίας λυμάτων, Διδακτορική Διατριβή, ΕΑΠ, Πάτρα 2019
- [7] Fatta-Kassinos, D., Hapesh, I.E., Achilleos, A., Meric, S., Gros, M., Petrovic, M., and Barcelo, D., (2011). Water Resour. Manag., 2011, **25**, 1183–1193
- [8] European Commission, Environmental fact sheet: soil protection- a new policy for the EU, European Commission, 2007, Brussels, Belgium.
- [9] Nannou, C.I., Boti, V.I., and Albanis, T.A., Anal. Bioanal. Chem., 2018, **410**, 1977–1989
- [10] Μπότη, Β., Αναλυτικές τεχνικές για τον προσδιορισμό επιλεγμένων ενώσεων με ενδοκρινική διαταρακτική δράση (EDCs) σε φυσικά νερά, ιζήματα και τρόφιμα– Εφαρμογή χημειομετρικών μεθόδων, Διδακτορική Διατριβή. Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα 2009
- [11] Miller, G.T., Living in the environment: principles, connections, and solutions, 12th ed., Brooks/Cole, Belmont, Pacific Grove, CA, 2002.
- [12] Ritter S.R., Pinpointing Trends in Pesticide Use in 1939, Chemical and Engineering News, ACS Publications, 2009
- [13] European Commission, Council Directive 2006/88/EC on animal health requirements for aquaculture animals' products thereof, and on the prevention and control of certain diseases in aquaculture, Off. J. Eur. Union, 2006, **328**, 14–56
- [14] European Commission, Council Decision of 14 October 2004 concerning the conclusion, on behalf of the European Community, of the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, Off. J. Eur. Union, 2006, **209**, 1-2.
- [15] Yamamoto, I., and Casida, J.E., Nicotinoid Insecticides and the Nicotinic Acetylcholine Receptor, Springer-Verlag, Tokyo, 1999, pp. 3–27.
- [16] Zhang, W.J., Jiang, F.B., and Ou, J.F., Proc. Int. Acad. Ecol. Environ., 2011, **1(2)**, 125-144

- [17] European Commission, Directive 2009/128/EC of the European Parliament and the Council of 21 October 2009 establishing a framework for Community action to achieve the sustainable use of pesticides. Off. J. Eur. Communities, 2009, **309**, 71–86
- [18] World Health Organization (WHO), Recommended Classification of Pesticides by Hazard, WHO Library Cataloguing – in – Publication Data, 2009, **36**, pp 3-11
- [19] European Commission, Fact Sheet: EU Policy for a Sustainable Use of Pesticides. The Story Behind the Strategy. Office for Off. Publications of the Eur. Communities, 2009, Luxembourg
- [20] Choudhary, N., and Sekhon, B.S., J. Pharm. Educ. Res., 2011, **2(2)**, 55-70
- [21] Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M, Zaugg, S.D., Barber, L.B., and Buxton, H.T., Environ. Sci. Technol., 2002, **36**, 1202–1211
- [22] Boxall, A.B., Fogg, L.A., Blackwell, P.A., Kay, P., Pemberton, E.J., and Croxford, A., Rev. Environ. Contam. Toxicol., 2004, **180**, 1-91
- [23] European Commission, Directive 2005/396/EC of the European Parliament and the Council of 223 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC. Off. J. Eur. Communities, 2005, **70**, 3-29
- [24] Harris, C., and Gaston, C.P., Food Addit. Contam., 2004, **21**, 857-864
- [25] Aktar, W., Sengupta, D., and Chowdhury, A., Interdiscip. Toxicol., 2009, **2**, 1–12
- [26] Samsidara, A., Siddiqueea, S., and Shaarani, S., Trends Food Sci. Technol., 2018, **71**, 188–201
- [27] Cooper, J., and Dobson, H., Crop Prot., 2007, **26**, 1337–1348
- [28] Agrawal, A., Pandey, R.S., and Sharma, B., J. Water Resour. Prot., 2010, **2**, 432–448
- [29] Damalas, C.A., and Eleftherohorinos, I.G., Int. J. Environ. Res. Public Health, 2011, **8**, 1402–1419
- [30] Palma, P., Köck-Schulmeyer, M., Alvarenga, P., Ledo, L., Barbosa, I.R., López de Alda, M., and Barceló, D., Sci. Total Environ., 2014, **488–489**, 208–219
- [31] European Commission, Council directive 98/83/EC on the quality of water intended for human consumption, Off. J. Eur. Communities, 1998, **330**, 32–54
- [32] Wardencki, W., Curylo, J., and Namiesnik, J., J. Biochem. Biophys. Methods, 2007, **70**, 275-88
- [33] Köck-Schulmeyer, M., Olmos, M., López de Alda, M., and Barceló, D., J. Chromatogr. A, 2013, **1305**, 176–187
- [34] Grimalt, S., and Dehouck, P., J. Chromatogr. A, 2016, **1433**, 1–23
- [35] Smith, R.M., J. Chromatogr. A, 2003, **1000**, 3-27
- [36] Chen, Y., Guo, Z., Wang, X., and Qiu, C., J. Chromatogr. A, 2008, **1184**, 191-219
- [37] Koester, C.J., and Moulik, A., Anal. Chem., 2005, **77**, 3737-3754
- [38] Zygler, A., Wasik, A., and Namieśnik, J., Talanta, 2010, **82**, 1742-1748
- [39] Schmidt, K., and Podmore, I., J. Mol. Biomark. Diagn., 2015, **6**, 253

- [40] Baltussen, E., Sandra, P., David, F., and Cramers, C., *J. Micro. Sep.*, 1999, **11**, 737-747.
- [41] Anastassiades, M., Lehotay, S.J., Stajnbaher, D., and Schenck, F.J., *J. AOAC Int.*, 2003, **86**, 412–431
- [42] Perestrelo, R., Silva, P., Porto-Figueira, P., Pereira, J.A.M., Silva, C., Medina, S., and Câmara, J.S., *Anal. Chim. Acta*, 2019, **1070**, 1-28
- [43] Kim, L., Lee, D., Cho, H., and Choi, S., *Trends Environ. Anal. Chem.*, 2019, **22**, e00063
- [44] Zaidon, S.Z., Ho, Y.B., Hamsan, H., Hashim, Z., Saari, N., and Praveena S.M., *Microchem. J.*, 2019, **145**, 614–621
- [45] Marinho, M.I., Costa, A.I., Vieira, N.M., Paiva, M.C., Freitas, F.C., and Silva, A.A., *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 2019, **167**, 212-217
- [46] Zhang, X., Wang, X., Luo, F., Sheng, H., Zhou, L., Zhong, Q., Lou, Z., Sun, H., Yang, M., Cui, X., and Chen, Z., *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 2019, **172**, 530–537
- [47] Huang, B., Yan, D., Wang, X., Wang, X., Fang, W., Zhang, D., Ouyang, C., Wang, Q., and Cao, A., *Environ. Pollut.*, 2019, **246**, 264-273
- [48] Šudoma, M., Neuwirthová, N., Hvězdová, M., Svobodová, M., Bílková, Z., Kerstin, E. Scherr, K.E., and Hofman, J., *Chemosphere*, 2019, **230**, 347-359
- [49] Silva, V., Mol, H.G.J., Zomer, P., Tienstra, M., Ritsema, C.J., and Geissen, V., *Sci. Total Environ.*, 2019, **653**, 1532–1545
- [50] Biswas, S., Mondal, R., Mukherjee, A., Sarkar, M., and Kole, R.K., *Food Chem.*, 2019, **272**, 559-567
- [51] Baqar, M., Sadeef, Y., Ahmad, S.R, Mahmood, A., Li, J., and Zhang, G., *Sci Total Environ.*, 2018, **618**, 291–305
- [52] Martínez-Piernas, A.B., Plaza-Bolaños, P., García-Gómez, E., Fernández-Ibáñez, P., and Agüera, A., *Anal. Chim. Acta*, 2018, **1030**, 115-124
- [53] Mondal, R., Mukherjee, A., Biswas, S., and Kole, R.K., *Chemosphere*, 2018, **206**, 217-230
- [54] Đurović-Pejčev, R.D., Bursić, V.P., and Zeremski, T.M., *J. AOAC Int.*, 2018, **102**, 46-51
- [55] Wang, S., Zhang, O., Yu, Y., Chen, Y., Zeng, S., Lu, P., and Hu, D., *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 2018, **100**, 72–79
- [56] Zhao, P., Wang, Z., Li, K., Guo, X., and Zhao, L., *J. Chromatogr. A*, 2018, **1568**, 8–21
- [57] Zhao, P., Zhao, J., Lei, S., Guo, X., and Zhao, L., *Chemosphere*, 2018, **204**, 210-219
- [58] Mac Loughlin, T.M., Peluso, L., and Marino, D.J.G., *Sci. Total Environ.*, 2017, **598**, 572–580
- [59] Rodríguez-González, N., Uzal-Varela, R., González-Castro, M.J.J., Muniategui-Lorenzo, S., and Beceiro-González, E., *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 2017, **24**, 7764–7775

- [60] Mei, W., Li, Q., Fang, H., Geng, H., and Chen, X., *Chin. J. Chromatogr.*, 2017, **35** (12), 1317-1321
- [61] Pan, X., Dong, F., Chen, Z., Xu, J., Liu, X., Wu, X., and Zheng, Y., *J. Chromatogr. A*, 2017, **1525**, 87-95
- [62] Salem, F.B., Said, O.B., Aissa, P., Mahmoudi, E., Monperrus, M., Grunberger, O., and Duran, R., *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 2016, **23** (1), 36–48
- [63] Pang, N., Wang, T., and Hu J., *Food Chem.*, 2016, **190**, 793–800
- [64] Kaczyński, P., Łozowicka, B., Jankowska, M., and Hrynko, I., *Talanta*, 2016, **152**, 127-136
- [65] Cheng, Z., Dong, F., Xu, J., Liu, X., Wu, X., Chen, Z., Pan, X., and Zheng, Y., *J. Chromatogr. A*, 2016, **1435**, 115-124
- [66] Qi, P., Yuan, Y., Wang, Z., Wang, X., Xu, H., Zhang, H., Wang, Q., and Wang, X., *J. Chromatogr. A* 2016, **1449**, 62-70
- [67] Salem, F.B, Said, O.B., Duran, R., and Monperrus, M., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 2016, **96**, 678-684
- [68] Zhang, H., Bayen, S.S., and Kelly, B.C., *Talanta*, 2015, **143**, 7–18
- [69] Chen, M., Yi, Q., Hong, J., Zhang, L., Lin, K., and Yuan, D., *Anal. Methods*, 2015, **7**, 1896–1905
- [70] Di, S., Shi, S., Xu, P., Diao, J., and Zhou, Z., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 2015, **95**, 67-72
- [71] Masiá, A., Vásquez, K., Campo, J., and Picó, Y., *J. Chromatogr. A*, 2015, **1378**, 19–31
- [72] Kalogridi, E.C., Christophoridis, C., Bizani, E., Drimaropoulou, G., Fytianos, K., *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 2014, **21**, 7252–7262
- [73] Farré, M., Picó, Y., and Barceló, D., *J. Chromatogr. A*, 2014, **1328**, 66–79
- [74] Darwano, H., Duy, S.V. and Sauvé, S., *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 2014, **66**, 582–593
- [75] Cerqueira, M.B.R., Caldas, S.S., and Primel, E.G., *J. Chromatogr. A*, 2014, **1336**, 10-22
- [76] Hellar-Kihampa, H., De Wael, K., Lugwisha, E., Malarvannan, G., Covaci, A., and Van Grieken, R., *Sci. Total. Environ.*, 2013, **447**, 186–197
- [77] Masiá, A., Campo, J., Vázquez-Roig, P., Blasco, C., and Picó, Y., *J. Hazard Mater.*, 2013, **263**, 98–104
- [78] Li, Y., Dong, F., Liu, X., Xu, J., Chen, X., Han Y., Liang, X., and Zheng, Y., *J. Hazard Mater.*, 2013, **250–251**, 9-18
- [79] Fernandes, V.C., Domingues, V.F., Mateus, N., and Delerue-Matos, C., *J. Sep. Sci.*, 2013, **36**, 6–382
- [80] Correia-Sá, L., Fernandes, V.C., Carvalho, M., Calhau, C., Domingues, V.F., and Delerue-Matos, C., *J. Sep. Sci.*, 2012, **35**, 1521-1530

- [81] Lehotay, S.J., Son, K.A., Kwon, H., Koesukwiwat, U., Fu, W., Mastovska, K., Hoh, E., and Leepipatpiboon, N., J. Chromatogr. A., 2010, **1217(16)**, 2548-60
- [82] AOAC Official Method 2007.01, Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate. AOAC Int., 2007
- [83] Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο, Οδηγία 2001/82/EK του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 6ης Νοεμβρίου 2001 περί κοινοτικού κώδικος για τα κτηνιατρικά φάρμακα, Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων, 2001
- [84] Zhu, J., Goodall, D., and Wren, S., Ultra-High Performance Liquid Chromatography and Its Applications, LCGC, London, 2005, pp. 54-72
- [85] Skoog H.N., Holler F.J. and Crouch S.R., Αρχές ενόργανης ανάλυσης, 6^η έκδοση, Εκδόσεις Κωσταράκη 2010, σελ. 816-837
- [86] Παπαδογιάννης Ν.Ι., Σαμανίδου Φ.Β, Ενόργανη χημική ανάλυση, Εκδόσεις Πήγασος, Θεσσαλονίκη 2001
- [87] Χατζηγιάννου Θ.Π., Ενόργανη ανάλυση, Εκδόσεις Μαυρομάτη, Αθήνα 2014
- [88] Μαραγκού, Ν., Ανάπτυξη μεθόδων προσδιορισμού ενώσεων που προκαλούν ορμονικές διαταραχές με υγροχρωματογραφία–φασματομετρία μαζών, Διδακτορική Διατριβή. ΕΚΠΑ, Αθήνα 2010
- [89] Θεοδωρίδης, Γ., Γηρούση, Σ., Ζαχαριάδης, Γ., Ζώτου, Α., και Σαμανίδου, Β., Βιοαναλυτική χημεία, [ηλεκτρ. βιβλ.], Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών, Αθήνα, 2015
- [90] Watson, T., and Sparkman, D., Introduction to Mass Spectrometry: Instrumentation, Applications, and Strategies for Data Interpretation, 4th Edition, Wiley, Wiley, 2007
- [91] Hoffmann, E., and Stroobant, V., Mass spectrometry: principles and applications, 3rd edition, John Wiley & Sons, West Sussex, 2007, p. 43-55
- [92] Gallagher, R.T., Balogh, M.P., Davey, P., Jackson, M.R., Sinclair, I., and Southern, L.J., Anal. Chem., 2003, **75**, 973–977
- [93] European Commission, SANTE/11813/2017; Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed, 2017
- [94] Berberidou, C., Kitsiou, V., Kazala, E., Lambropoulou D.A., kouras, A., Kosma C.I., Albanis, T.A., and Poulis I., Appl. Catal., B, 2017, **200**, 150-163
- [95] Trufelli, H., Palma, P., Famiglini, G., and Cappiello, A., Mass Spectrom. Rev., 2011, **30**, 491–509
- [96] Cajka, T., Sandy, C., Bachanova, V., Drabova, L., Kalachova, K., Pulkrabova, J., and Hajslova, J., Anal. Chim. Acta, 2012, **743**, 51–60
- [97] Lozowicka, B., Rutkowska, E., and Jankowska, M., Environ. Sci. Pollut. Res., 2017, **24**, 7124–7138
- [98] Carmona, E., Andreu, V., and Picó, Y., J. Pharm. Biomed. Anal., 2017, **146**, 117–125

- [99] Čonka, K., Chovancová, J., Stachová-Sejáková, Z., Dömötöröová, M., Fabišíková, A., Drobná, B., and Kočan, A., *Chemosphere*, 2014, **98**, 37–43
- [100] Austrian Standards Institute, European Standard EN 15662, Foods of plant origin-Determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning and clean-up by dispersive SPE - QuEChERS-method, British Standard, 2009
- [101] Vera, J., Correia-Sá, L., Paíga, P., Bragança, I., Fernandes, V.C., Domingues, V.F., and Delerue-Matoset, C., *Sample Preparation*, 2013, **1**, 54-77
- [102] Santos, L.H.M.L.M., Ramalhosa, M.J., Ferreira, M., and Delerue-Matos, C., *J. Chromatogr. A*, 2016, **1437**, 37–48
- [103] Berlioz-Barbier, A., Vauchez, A., Wiest, L., Baudot, R., Vulliet, E., and Cren-Olivé, C., *Anal. Bioanal. Chem.*, 2014, **406**, 1259–1266
- [104] Kvíčalová, M., Doubravová, P., Jobánek, R., Jokešová, M., Očenášková, V., Süssenbeková, H., and Svobodová, A., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 2012, **89**, 21–26
- [105] González-Curbelo, M.A., Socas-Rodríguez, B., Herrera-Herrera, A.V., González-Sálamo J., Hernández-Borges, J., and Rodríguez-Delgado M.A., *Trends Anal. Chem.*, 2015, **71**, 169-185

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Προσδιορισμός υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε εδαφικά δείγματα με την τεχνική QuEChERS σε συνδυασμό με Υγρή Χρωματογραφία με Φασματομετρία Μάζας

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε η ανάπτυξη και η επικύρωση αναλυτικής μεθόδου για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων (ζιζανιοκτόνα, εντομοκτόνα, μυκητοκτόνα, >50 δραστικές ουσίες) σε εδαφικά δείγματα. Η μέθοδος βασίστηκε στην εφαρμογή της τεχνικής QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) σε συνδυασμό με Υγρή Χρωματογραφία Φασματομετρίας Μάζας (LC-MS). Για τη βελτιστοποίηση της μεθόδου μελετήθηκαν διάφορες παράμετροι που επηρεάζουν την «τεχνική» QuEChERS, τόσο στο στάδιο της εκχύλισης/κατανομής, όσο και στο στάδιο καθαρισμού του υποστρώματος (clean-up). Στην κατεύθυνση αυτή συγκρίθηκαν διαφορετικοί διαλύτες εκχύλισης, ποσότητες και συνδυασμοί αλάτων, καθώς και διαφορετικά προσροφητικά υλικά (C₁₈, GCB, PSA, Florisil) για τον καθαρισμό του δείγματος. Πραγματοποιήθηκε η επικύρωση της μεθόδου σύμφωνα με τις οδηγίες της SANTE/11813/2017 με έλεγχο της γραμμικότητας, των ορίων ανίχνευσης (LODs) και ποσοτικοποίησης (LOQs), της ορθότητας μέσω του υπολογισμού των ποσοστιαίων ανακτήσεων και της πιστότητας της μεθόδου μέσω του υπολογισμού της επαναληψιμότητας (%RSD_r) και της αναπαραγωγιμότητας (%RSD_{wr}). Υπό βέλτιστες συνθήκες, τα LODs και LOQs κυμάνθηκαν σε σχετικά ικανοποιητικά επίπεδα (LOQ < 10 µg/Kg), με την επαναληψιμότητα (%RSD_r) και την αναπαραγωγιμότητα (%RSD_{wr}) της δοκιμής να είναι <20%, σχεδόν για όλες τις ενώσεις. Οι μέσες ανακτήσεις των φυτοφαρμάκων κυμάνθηκαν από 60 έως 120% για τις περισσότερες από τις μελετώμενες ενώσεις.

Λαιμού-Γερανίου Μαρία

ABSTRACT

Determination of pesticide residues in soil samples with QuEChERS combined with LC-MS

This study reports an analytical method for the determination of residues of pesticides using liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS). A modified QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe) methodology was used to extract the analytes and determine different groups of pesticides in soil samples by LC-MS. Optimization of the method was performed by studying parameters affecting QuEChERS in both extraction/partitioning and clean up steps. Different extraction solvents, amounts and combinations of salts as well as clean-up sorbents (C₁₈, GCB, PSA, Florisil) were investigated and compared. Finally, the optimized method was validated by evaluating the linearity, accuracy, precision (repeatability, reproducibility), method detection and quantification limits (LODs, LOQs) according to SANTE/11813/2017 guidelines.

Laimou-Geraniou Maria

ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΟ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΕΡΓΟ

1. Προφορική παρουσίαση στο 2^ο Συνέδριο Χημείας Μεταπτυχιακών και Προπτυχιακών Φοιτητών ΑΠΘ, Θεσσαλονίκη 2018

ΕΝΩΣΗ ΕΛΛΗΝΩΝ ΧΗΜΙΚΩΝ
ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑΚΟ ΤΜΗΜΑ
Κ. & Δ. ΜΑΚΕΔΟΝΙΑΣ

25
ΧΡΟΝΙΑ
ΠΤΚΔΜ





ΣΥΝΕΔΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ
& ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΩΝ
ΦΟΙΤΗΤΩΝ **ΑΠΘ**
2-3 ΝΟΕΜΒΡΙΟΥ 2018

ΒΕΒΑΙΩΣΗ ΣΥΜΜΕΤΟΧΗΣ

Βεβαιώνεται ότι ο /η

Μαρία Λαιμού – Γερανίου

Συμμετείχε στο 2ο Συνέδριο Χημείας Μεταπτυχιακών και Προπτυχιακών Φοιτητών ΑΠΘ, που διοργάνωσε η Ένωση Ελλήνων Χημικών σε συνδιοργάνωση με το Σύνδεσμο Χημικών Βορείου Ελλάδος και το Τμήμα Χημείας Α.Π.Θ. που διοργανώθηκε στη Θεσσαλονίκη 2-3 Νοεμβρίου 2018 με προφορική παρουσίαση με τίτλο:

"ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΕ ΕΔΑΦΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ QuEChERS ΣΕ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟ ΜΕ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΑΣ"

Ο Συντονιστής της Επιστημονικής Επιτροπής	Η Πρόεδρος της ΕΕΧ Π.Τ. Κ. & Δ. Μ.	Ο Συντονιστής της Οργανωτικής Επιτροπής
		
Γεώργιος Ζαχαριάδης	Βικτωρία Σαμανίδου	Μιχάλης Τερζίδης

«Το έργο συγχρηματοδοτείται στα πλαίσια του ΕΠΕΑΕΚ από το Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο και Εθνικούς πόρους»

«The project is co-financed within Op. Education by the ESF (European Social Fund) and National Resources»

