

Πανεπιστήμιο Κρήτης

Τμήμα Χημείας

ΤΕ.ΠΡΟ.Π. «Τεχνολογίες Προστασίας Περιβάλλοντος»

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης

**“Ανάπτυξη Μεθόδου Υγρής Χρωματογραφίας σε Συνδυασμό με
Διαδοχική Φασματομετρία Μαζών για τον προσδιορισμό Υπολειμμάτων
Γεωργικών Φαρμάκων στο Κρασί.”**

Κατερίνα Ι. Μηλιαρά

Ηράκλειο 2009

UNIVERSITY OF CRETE

Department of Chemistry

ECPL “Environmental Chemical Processes Laboratory”

Master

**“DEVELOPMENT OF A LIQUID CHROMATOGRAPHY TANDEM
MASS SPECTROMETRY METHOD; FOR THE DETERMINATION
OF PESTICIDES RESIDUES IN WINE.”**

Katerina I. Miliara

Heraklion 2009

Στον σύζυγό μου,
Χρήστο Σεβδαλή για την αγάπη του,
την συμπαράσταση και την υπομονή του
όλον αυτό τον καιρό !!!

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Στεφάνου Ευριπίδης (Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Επιβλέπων)

Περγαντής Σπύρος (Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Χημείας)

Κογεβίνας Μανώλης (Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής)

Ευχαριστίες

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Περιβαλλοντικών Χημικών Διεργασιών του Τμήματος Χημείας του Παν/μίου Κρήτης, στα πλαίσια του προγράμματος μεταπτυχιακών σπουδών «Τεχνολογίες Προστασίας Περιβάλλοντος», υπό την επίβλεψη του καθηγητή κ. Ευριπίδη Στεφάνου, τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω ειλικρινά για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, αναθέτοντάς μου αυτή την μελέτη, καθώς επίσης και για την συνεχή καθοδήγηση, τις πολύτιμες συμβουλές και υποδείξεις του.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης, τον καθηγητή κ.Περγαντή Σπύρο, για την βοήθεια και τις γνώσεις που μου πρόσφερε κατά την εκπόνηση της εργαστηριακής μου διατριβής καθώς και για την συμμετοχή του στην εξεταστική μου επιτροπή. Ευχαριστώ ακόμη όλους τους καθηγητές του προγράμματος «Τεχνολογίες Προστασίας Περιβάλλοντος», για τις γνώσεις που απέκτησα στον τομέα του Περιβάλλοντος, κατά την διάρκεια της συμμετοχής μου σε αυτό το πρόγραμμα. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή Μανόλη Κογεβίνα για την συμμετοχή του στην εξεταστική μου επιτροπή.

Ευχαριστώ θερμά τον Δρ. Αντώνη Κουβαράκη για τις συμβουλές του, τις υποδείξεις του και την βοήθειά του σε οτιδήποτε χρειάστηκε, σε διάφορα προβλήματα που προέκυψαν κατά την διάρκεια της εργασίας αυτής. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Μανόλη Μανδαλάκη και την Δρ. Μαρία Αποστολάκη για τις χρήσιμες και πολύτιμες γνώσεις και υποδείξεις τους καθόλη τη διάρκεια πραγματοποίησης αυτής της μελέτης.

Επιπλέον ευχαριστώ την Σοφία Καργάκη και τον Θράσο Τζιάρα για την βοήθεια που μου πρόσφεραν κατά την διάρκεια της εργαστηριακής μου μελέτης.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την συνεχή υποστήριξη, συμπαράσταση και ενθάρρυνσή τους, τον σύζυγό μου Χρήστο για την αγάπη του, την συμπαράσταση του και την υπομονή του όλο αυτό το διάστημα καθώς και την οικογένειά του για την στήριξή τους και την αγάπη που μου έχουν προσφέρει τόσο απλόχερα.

Περίληψη

Στα πλαίσια της εργασίας αυτής, αναπτύχθηκε μια ταχεία και ευαίσθητη μέθοδος υγρής χρωματογραφίας που χρησιμοποιεί διαδοχική φασματομετρία μαζών σε συνδυασμό με την τεχνική του ηλεκτροψεκασμού (HPLC-ESI-MS/MS) για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό 8 γεωργικών φαρμάκων (Diuron, Simazine, Fenoxycarb, Dimethomorph, Triadimefon, Metalaxyl, Carbaryl και Benalaxyl) σε δείγματα κρασιού. Για την εκχύλιση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν μικροστήλες Oasis HLB (200 mg) και ως διαλύτης έκλουσης χρησιμοποιήθηκε οξικός αιθυλεστέρας. Η αυξημένη εκλεκτικότητα του συστήματος διαδοχικής φασματομετρίας μαζών συνδυασμένου με την τεχνική του ηλεκτροψεκασμού, καθιστά δυνατό το διαχωρισμό των υπό μελέτη ουσιών οι οποίες εμφανίζουν παραπλήσιους χρόνους έκλουσης.

Οι μέσες ανακτήσεις για τα περισσότερα γεωργικά φάρμακα κυμαίνονται μεταξύ 60% και 90%, με σχετικές τυπικές αποκλίσεις <10% . Οι καμπύλες αναφοράς είναι γραμμικές στην περιοχή μεταξύ 25 ng/ml και 500 ng/ml ανάλογα με το φυτοφάρμακο, με συντελεστή γραμμικής συσχέτισης μεγαλύτερο από 0,9950 για όλα τα υπό μελέτη γεωργικά φάρμακα. Τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού είναι ικανοποιητικά.

Το αναλυτικό σύστημα δοκιμάστηκε για ανάλυση δειγμάτων κρασιού από την Βόρεια, Κεντρική και Νότια Ελλάδα καθώς και από το εξωτερικό.

Λέξεις – Κλειδιά : Διαδοχική Φασματομετρία μαζών, υγρή χρωματογραφία, εκχύλιση στερεάς φάσης, υπολείμματα φυτοφαρμάκων, κρασί.

Abstract

In this work, a rapid and sensitive liquid chromatographic electrospray ionization mass spectrometric (HPLC-ESI-MS/MS) method has been developed for the simultaneous determination of 8 pesticides (Diuron, Simazine, Fenoxycarb, Dimethomorph, Triadimefon, Metalaxyl, Carbaryl and Benalaxyl) in wine samples. For the extraction of samples, SPE cartridges Oasis HLB (200 mg) were used and were extracted with ethylacetate. The enhanced selectivity afforded by the use of electrospray tandem mass spectrometry allowed discrimination between target pesticides that were marginally separated under isocratic conditions.

Mean recoveries ranging from 60% to 90% for most pesticides, with relative standard deviations <10%. Calibration curves were obtained for all analytes and displayed good linearity between 25 and 500 ng/ml depended on the pesticide, with correlation coefficients higher than 0,9950. Detection and quantitation limits were satisfactory.

The method was applied to analyze wine samples from North, Central and South Greece and from the abroad.

Keywords : Tandem Mass Spectrometry; liquid chromatography; solid phase extraction; pesticides residues; wine.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

	Σελ.
1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	9
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1. ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ	10
1.2. ΕΙΔΗ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ - ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ - ΧΗΜΙΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ	11
1.3. ΧΡΗΣΙΜΟΤΗΤΑ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ	17
1.4. ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ	17
1.5. ΣΥΝΕΠΕΙΕΣ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ	18
1.6. ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ ΚΑΙ ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ ΤΗΣ ΥΓΕΙΑΣ	19
1.7. ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΓΕΩΡΓΙΑ	21
1.8. ΑΝΩΤΑΤΑ ΕΠΙΤΡΕΠΤΑ ΟΡΙΑ	22
1.9. ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΑΣΘΕΝΕΙΩΝ ΣΤΑ ΦΥΤΑ	23
1.10. ΕΧΘΡΟΙ – ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΤΟΥ ΑΜΠΕΛΙΟΥ	26
1.11. ΚΛΙΜΑ ΚΑΙ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ	27
1.12. ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ	28
1.13. ΚΥΡΙΟΤΕΡΕΣ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ	30
1.14. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	47
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	48
2.1. ΑΝΑΛΥΤΙΚΑ ΟΡΓΑΝΑ	48
2.1.1. ΠΡΟΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	48
Εκχύλιση στερεής φάσης –SPE	
2.1.2. ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ	54
2.1.3. ΣΥΣΤΗΜΑ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ ΜΕ ΗΛΕΚΤΡΟΨΕΚΑΣΜΟ ΚΑΙ ΔΙΑΔΟΧΙΚΗ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ (HPLC -ESI- MS/MS)	64
2.2. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΔΕΙΓΜΑΤΑ	73
2.2.1. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	73
2.2.2. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΓΥΑΛΙΚΩΝ	74
2.3. ΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΑΙ ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΗΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ...	74
2.3.1. ΜΕΘΟΔΟΣ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ	77
2.3.2. ΗΛΕΚΤΡΟΨΕΚΑΣΜΟΣ	78
2.3.3. ΤΕΧΝΙΚΗ ΣΑΡΩΣΗΣ ΜΕ ΜΕΛΕΤΗ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ	79
2.3.4. ΜΕΘΟΔΟΣ ΓΙΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΜΑΖΑΣ ΠΡΟΔΡΟΜΟΥ ΙΟΝΤΟΣ	81
2.3.5. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΟΥ ΣΗΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	82
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	83
3.1. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΘΡΑΥΣΜΑΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ	83
3.2. ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΤΟΥ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΟΥ ΜΑΖΑΣ ΓΙΑ ΟΛΑ ΤΑ ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ	86

3.3. ΑΝΑΚΤΗΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ	90
3.4. ΟΡΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ	94
3.5. ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΚΡΑΣΙΟΥ	98
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	109
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α	111
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β	115
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	117

1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο άνθρωπος από τη στιγμή που εμφανίστηκε στον κόσμο μέχρι και σήμερα είναι στενά δεμένος με τη γη, τη “μητέρα γη”, όπως την ονόμαζε παλαιότερα. Στη γη ζει, από τη γη παίρνει τα αγαθά, απ' αυτή τρέφεται.

Τα πρώτα χρόνια της ύπαρξής του, ο άνθρωπος έπαιρνε όλα τα αγαθά που χρειάζονταν, τρόφιμα ή άλλα, όπως τα έβρισκε στην φύση χωρίς να μπορεί να επεμβαίνει σ' αυτά. Με το πέρασμα όμως των χρόνων και με την ανάπτυξη της τεχνολογίας άρχισε να επεμβαίνει με διάφορους τρόπους σ' αυτή, με σκοπό βέβαια να βελτιώσει τη ζωή του. Έτσι άρχισε σιγά σιγά να την καλλιεργεί, στην αρχή με πρωτόγονα μέσα κι αργότερα με τη χρήση ζώων και πιο εξελιγμένων εργαλείων.

Η καλλιέργεια της γης μέχρι και πριν από λίγα χρόνια, ήταν πολύ δύσκολη και απαιτούσε σκληρή δουλειά από όλη την οικογένεια, ενώ σημαντικό ρόλο έπαιζαν και τα καιρικά φαινόμενα.

Ο άνθρωπος, το φυσικό περιβάλλον το θεωρούσε συνεργάτη και φίλο του και δε σκέφτηκε ποτέ να κάνει κακό σ' αυτό για να ωφεληθεί ο ίδιος. Μπορεί οι καλλιέργειες να του απέδιδαν σε μικρή ποσότητα τα απαραίτητα τρόφιμα, του ήταν όμως αρκετά για να μπορεί να ζει και ταυτόχρονα αυτά ήταν υγιεινά και νόστιμα.

Τα τελευταία όμως χρόνια με την αύξηση του πληθυσμού και την ανάπτυξη της τεχνολογίας, ο άνθρωπος άρχισε να επεμβαίνει αλόγιστα στο φυσικό περιβάλλον με σκοπό να παράγει περισσότερα αγαθά και με λιγότερο κόπο, έτσι ώστε όχι μόνο να ζει πιο άνετα, αλλά να μπορεί να μεγαλώσει το κέρδος του, χωρίς να σκέφτεται τις συνέπειες και τις βλάβες που μπορεί να προκαλέσει στο περιβάλλον μέσα στο οποίο κινείται, αλλά και την ίδια του την υγεία. Η ανάπτυξη της τεχνολογίας βοήθησε στην παρασκευή επιθυμητών λιπασμάτων και φυτοφαρμάκων που στόχευαν στην αύξηση και στην προστασία της αγροτικής παραγωγής. Η αλόγιστη όμως χρήση αυτών των προϊόντων, είχε ολέθριες επιπτώσεις στο περιβάλλον το οποίο ρυπάνθηκε αφάνταστα. Η ατμόσφαιρα ρυπαίνεται, το νερό μολύνεται, το έδαφος καταστρέφεται, η χλωρίδα και η πανίδα εξαφανίζονται. Βλάβες επίσης παρατηρήθηκαν και στον άνθρωπο λόγω μεταφοράς των τοξικών χημικών ουσιών που περιέχουν τα φυτοφάρμακα στον ανθρώπινο οργανισμό μέσω της τροφικής αλυσίδας (Θαμνίδης, Μαργαρίτη, 2004) .

1.1. ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ

Φυτοφάρμακα λέγονται μια σειρά από φάρμακα, χημικές ουσίες που φτιάχνονται για την αποτελεσματική καταπολέμηση των εχθρών των φυτών. Είναι τοξικά, προϊόντα υψηλής τεχνολογίας, που δρουν και σκοτώνουν ζωικούς και φυτικούς οργανισμούς που βλάπτουν τις καλλιέργειες ή θεωρούνται οικονομικά ζημιογόνοι (Μαργαρίτη, 2004).

Τα φυτοφάρμακα αναπτύχθηκαν τα τελευταία εξήντα περίπου χρόνια. Το 1942 ο Ελβετός Muller ανακαλύπτει το DDT, ενώ το 1946 τα εργαστήρια της εταιρίας φαρμάκων BAYER κατασκευάζουν το παραθείο. Τα πρώτα χρόνια της ανακάλυψής τους, η συμβολή τους στην προστασία της αγροτικής παραγωγής, γέννησε πολλές ελπίδες για τη λύση του προβλήματος τροφής που αντιμετώπιζε η ανθρωπότητα με την αύξηση του πληθυσμού. Ταυτόχρονα η προσφορά τους ήταν μεγάλη και στην προστασία της δημόσιας υγείας με την καταπολέμηση ενοχλητικών εντόμων, που ήταν υπεύθυνα για διάφορες ασθένειες που παρουσιάζονταν στον άνθρωπο, έτσι άρχισαν να ανοίγονται νέοι ορίζοντες στη βελτίωση της ποιότητας της ανθρώπινης ζωής.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, τα φυτοφάρμακα άρχισαν να αντιμετωπίζονται απ' όλους μόνο από τη θετική τους πλευρά και οι βιομηχανίες φαρμάκων άρχισαν να συναγωνίζονται μεταξύ τους για την παραγωγή νέων φυτοφαρμάκων με μεγαλύτερη δράση. Κανένας δεν είχε αναφερθεί για τυχόν επιπτώσεις και συνέπειες στην ανθρώπινη ζωή και το φυσικό περιβάλλον (Aprea et.al., 1996-Frenzel et.al., 2000).

Μόνο τα τελευταία χρόνια διατυπώνονται οι πρώτες ανησυχίες για τη δράση τους αφού σε ορισμένους τόπους εξαφανίζονται ομάδες φυτών και ζώων, ενώ επιστήμονες ανακαλύπτουν και δημοσιεύουν αποτελέσματα ερευνών με τις οποίες διαπιστώνονται βλάβες στην υγεία του ανθρώπου. Έτσι μερικά από τα πρώτα φυτοφάρμακα αποσύρονται από την κυκλοφορία στις σύγχρονες χώρες, εξακολουθούν όμως να κυκλοφορούν σε άλλες (Annual Report of the pesticide Residues, 2000- ΕΣΥΔ, 2003).

Οι ανησυχίες όμως των επιστημόνων αλλά και πολλών άλλων πλέον μεγαλώνουν, διαπιστώνοντας καθημερινά τις αρνητικές τους επιπτώσεις στην υγεία και το περιβάλλον, χωρίς να παραβλέπουν βέβαια τη χρησιμότητά τους στη σύγχρονη γεωργία, η οποία χωρίς τη δράση λιπασμάτων και φυτοφαρμάκων δε θα είχε αυτή τη μεγάλη ανάπτυξη (Aprea et.al., 1996-Frenzel et.al., 2000).

Σήμερα όλοι πλέον αναγνωρίζουν ότι τα φυτοφάρμακα κατέχουν σημαντικό μερίδιο στην αλλοίωση του φυσικού περιβάλλοντος και γίνεται προσπάθεια ώστε να ληφθούν μέτρα για την καλύτερη αξιοποίησή τους, ελαχιστοποιώντας τις αρνητικές τους συνέπειες.

Τελευταία, υπάρχει μια στροφή των παραγωγών και των καταναλωτών στη βιολογική γεωργία, στην οποία δεν χρησιμοποιούνται φυτοφάρμακα ή άλλες ουσίες. Αυτή θεωρείται ίσως η λύση στο πρόβλημα.

1.2. ΕΙΔΗ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ - ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ - ΧΗΜΙΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ

Τα φυτοφάρμακα με βάση την δράση τους χωρίζονται σε διάφορες κατηγορίες όπως εντομοκτόνα, ζιζανιοκτόνα, μυκητοκτόνα, ακαρεοκτόνα, νηματωδοκτόνα και τρωκτικοκτόνα. Η δραστηριότητά τους ποικίλει ανάλογα με τη χημική ομάδα στην οποία ανήκουν. Οι πιο βασικές κατηγορίες από τις παραπάνω είναι τα ζιζανιοκτόνα, μυκητοκτόνα και εντομοκτόνα (<http://3dim-kater.pie.sch.gr/fitofarmaka.htm>).

Τα ζιζανιοκτόνα καταστρέφουν τα αγριόχορτα που αναπτύσσονται στις καλλιέργειες και «πνίγουν» τα καλλιεργημένα φυτά. Τα προβλήματα ελέγχου των ζιζανίων είναι διαφορετικά από αυτά που σχετίζονται με τα έντομα και τα παθογόνα. Τα ζιζάνια ελαττώνουν την παραγωγή επειδή ανταγωνίζονται τα καλλιεργούμενα φυτά για τροφή και υγρασία. Η εκπεριτροπή αλλαγή της καλλιέργειας προσφέρει ένα φυσικό τρόπο προστασίας της γονιμότητας του εδάφους και του ελέγχου των ζιζανίων και είναι μία τακτική που εφαρμόζεται εκατοντάδες χρόνια. Η βιομηχανοποίηση όμως της γεωργίας απαιτεί εξειδίκευση και επαναληπτικότητα στις καλλιέργειες και υψηλή απόδοση. Η κυριότερη κατηγορία των ζιζανιοκτόνων που χρησιμοποιούνται στην Ελλάδα είναι οι τριαζίνες (27% του ολικού ποσού των ζιζανιοκτόνων). Η επόμενη κατηγορία είναι τα υποκατεστημένα παράγωγα της ουρίας (3%) και τα όξινα ζιζανιοκτόνα (8%), τα οποία είναι συνήθως πολύ τοξικά στα φυτά και σε όλους τους υπόλοιπους οργανισμούς (*Αλμπάνης, 1999-Μπέλλος, 2008-Τούντα, 2005*).

Τα εντομοκτόνα καταστρέφουν τα έντομα που κατατρώνε τα διάφορα μέρη των φυτών, χωρίς να βλάπτουν τα ίδια. Η κυριότερη χημική κατηγορία εντομοκτόνων που χρησιμοποιείται σήμερα στην Ελλάδα είναι αυτή των οργανοφωσφορικών (50% του συνόλου των εντομοκτόνων) που έχουν αντικαταστήσει τη χρήση των οργανοχλωριωμένων (5%). Μια άλλη σημαντική ομάδα εντομοκτόνων είναι τα καρβαμιδικά (7%). Τα περισσότερα εντομοκτόνα είναι νευροτοξικά και χαρακτηρίζονται από μεγάλη τοξικότητα στους οργανισμούς εντόμων. Έχει αποδειχθεί, ότι τα χλωριωμένα εντομοκτόνα διατηρούνται στο έδαφος δεκαετίες και ότι η συγκέντρωσή τους από μέρη ανά τρισεκατομμύριο (ppb) στο υδάτινο περιβάλλον, μπορεί να βιομεγεθυνθεί 1.000.000 –100.000.000 στους ιστούς των ασπόνδυλων, ψαριών, πτηνών και θηλαστικών και να φτάσει σε μέρη ανά εκατομμύριο (ppm) σε ζωικούς οργανισμούς.

Τέλος, τα μυκητοκτόνα καταστρέφουν τα ζωικά ή φυτικά παράσιτα που ζουν στα φυτά και τρέφονται εις βάρος τους. Τα προβλήματα χημικού ελέγχου των μυκήτων είναι διαφορετικά από αυτά των εντόμων. Η ιδιότητα των μυκήτων να πολλαπλασιάζονται από ελάχιστα επιζώντα άτομα, τους κάνει δύσκολους στην πλήρη εξαφάνιση. Ένα μυκητοκτόνο που σκοτώνει, όταν έρθει σε επαφή με τον μύκητα, σταματά την ασθένεια να εξαπλωθεί σε γειτονικά φυτά. Όμως τα πλέον επιτυχημένα μυκητοκτόνα είναι αυτά που επιδρούν πριν την

άφιξη της ασθένειας. Έτσι πρέπει να είναι ανθεκτικά και μη υδατοδιαλυτά. Οι κατηγορίες των μυκήτων είναι πάρα πολλές. Όμως η διείσδυση των μυκητοκτόνων και η επιλεκτική δράση τους γίνεται με συγκεκριμένους βιοχημικούς μηχανισμούς. Τα μυκητοκτόνα χωρίζονται σε δύο τύπους: α) μη συστηματικά (οργανοθειικές ενώσεις, ετεροκυκλικές ενώσεις, δικαρβιξιμιδικά κ.α.) και β) συστηματικά (ακυλοαμίνες, μορφολίνες, τριαζόλες, πυριμιδίνες). Τα πρώτα είναι αυτά που παραμένουν στην περιοχή που εναποτέθηκαν, ενώ τα δεύτερα εισέρχονται στο φυτό και μεταφέρονται στα φύλλα ή τον φλοιό (Αλμπάνης, 1999-Μπέλλος, 2008-Τούντα, 2005).

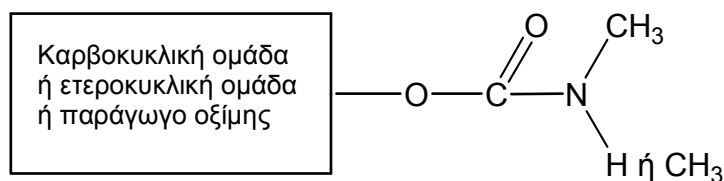
Τα φυτοφάρμακα διοχετεύονται στα φυτά με τρεις κύριους τρόπους: α) ως ψεκαζόμενο υδατικό διάλυμα, β) με τη μορφή ατμών και γ) ως υδατικό διάλυμα με το οποίο ποτίζεται η ρίζα του φυτού. Οι πιο επικίνδυνοι τρόποι παροχής φυτοφαρμάκων είναι οι δυο πρώτοι όπου τα αερόλυμα του φυτοφαρμάκου μπορεί να μεταφερθεί σε μεγάλες αποστάσεις με την ύπαρξη ανέμων.

Ανάλογα με την δραστική ουσία που περιέχουν τα φυτοφάρμακα μπορούν να καταταχθούν σε διάφορες χημικές κατηγορίες. Κάποιες από αυτές είναι οι ετεροκυκλικές ενώσεις, οι ακυλοαμίνες, οι οργανοφωσφορικοί εστέρες, οι πυριμιδίνες, οι τριαζόλες, οι στρομπιλουρίνες, τα καρβαμιδικά και αλειφατικά οξέα και οι εστέρες τους, ενώσεις χλώρο- και αμινο- τριαζινών, πυρεθρινοειδή και φυσικές πυρεθρίνες, οι μορφολίνες, ενώσεις της ομάδας των ουριών, οι χλωριωμένοι υδρογονάνθρακες κ.α. (Μαργαρίτη, 2004).

Τα εντομοκτόνα διακρίνονται ανάλογα με τη χημική τους σύνθεση σε διάφορες χημικές κατηγορίες. Ορισμένες από τις ομάδες στις οποίες διακρίνονται είναι οι εξής (Ware et al., 2004):

- Καρβαμιδικά και θειοκαρβαμιδικά

Στην ομάδα των καρβαμιδικών εντομοκτόνων ανήκουν τα carbofuran, το carbaryl κ.λ.π.. Είναι οι εστέρες ή οξίμες του καρβαμιδικού οξέος. Τα καρβαμιδικά εντομοκτόνα αποτελούνται από την γενική δομή :

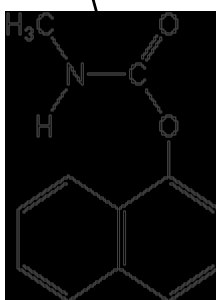


Σχήμα 1.2α. Γενική δομή καρβαμιδικών εντομοκτόνων.

Το Carbaryl είναι έντονα διασυστηματικό και εκτός από εντομοκτόνο, έχει δράση και στους νηματώδεις. Χρησιμοποιείται ως κοκκώδες ή ως υγρό για την προστασία των καλλιεργειών,

κυρίως στα πρώτα βλαστικά στάδια, από έντομα εδάφους (π.χ. σιδηροσκούληκα, υλέμθια, κοφτοσκούληκα) και φυλλώματος (π.χ. θρίπας, αφίδες). Σε άλλες ευρωπαϊκές χώρες βρίσκει ακόμα εφαρμογή ως επενδυτικό σπόρων. Υπάρχουν πάνω από 50 ενώσεις σε αυτή την κατηγορία παρασιτοκτόνων. Αντικατέστησαν σε πολλές περιπτώσεις τα χλωριωμένα εντομοκτόνα εξ αιτίας της μικρής υπολειμματικότητάς τους. Ενσωματώνονται στο χώμα πριν ή μετά το φύτευμα. Ενεργούν με την παρεμπόδιση της ενζυμικής χολινεστεράσης, προκαλώντας παράλυση και θάνατο στα νηματοειδή και τα έντομα.

Αμιδικός δεσμός

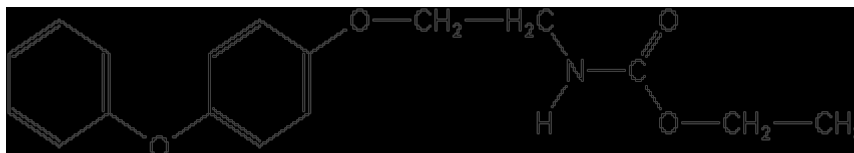


Carbaryl

Σχήμα 1.2β. Δομή του καρβαμιδικού εντομοκτόνου Carbaryl.

Μιμητές νεανικής ορμόνης (Juvenile hormone mimics)

Αυτές οι χημικές ουσίες αναφέρονται χαρακτηριστικά ως ρυθμιστές αύξησης εντόμων (Insect growth regulators, IGRs). Οι IGRs ενεργούν στο σύστημα αδένων ή ορμονών των εντόμων. Αυτά τα εντομοκτόνα είναι συγκεκριμένα για τα έντομα, έχουν πολύ χαμηλή μαστοφόρο τοξικότητα και προκαλούν αργό θάνατο. Η χημική αυτή κατηγορία φυτοφαρμάκων, μιμείται τη νεανική ορμόνη που παράγεται στον εγκέφαλο εντόμων. Η νεανική ορμόνη επιδρά στο έντομο έτσι ώστε να παραμείνει στο νεανικό στάδιο και να μη μπορεί να αναπαραχθεί κανονικά. Σε αυτή την χημική κατηγορία ανήκει το Fenoxycarb.



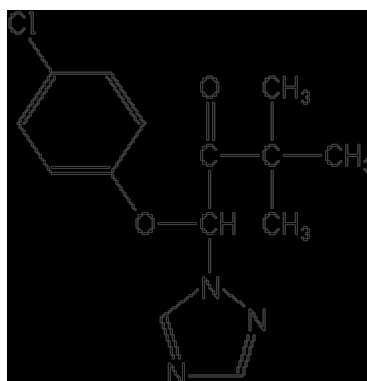
Fenoxycarb

Σχήμα 1.2γ. Δομή του IGR εντομοκτόνου Fenoxycarb.

Τα μυκητοκτόνα διακρίνονται ανάλογα με τη χημική τους σύνθεση σε διάφορες χημικές κατηγορίες. Ορισμένες από τις ομάδες στις οποίες διακρίνονται είναι οι εξής:

- Τριαζόλες

Οι τριαζόλες, όπως και οι πυριμιδίνες, ανήκουν στην κατηγορία των οργανοφωσφορικών φυτοφαρμάκων. Οι τριαζόλες (κοναζόλες ή ιμιδαζόλες) περιλαμβάνουν διάφορα σημαντικά διασυστιματικά μυκητοκτόνα όπως το Triadimefon, Triadimenol, cyprodinil κ.λ.π. Παρουσιάζουν μακροχρόνια προστατευτική και θεραπευτική δραστηριότητα έναντι σε ευρύ φάσμα ασθενειών φυλλώματος, ρίζας και σπόρων φυτών όπως οι κηλίδες στα φυλλώματα των φυτών, κονιώδη ωίδιο και άλλα που προκαλούνται από πολλούς ασκομύκητες, ατελείς μύκητες, και βασηδιομύκητες. Εφαρμόζονται με ψεκασμό στο φύλλωμα του φυτού και ως επεξεργαστές σπόρου και χώματος. Οι τριαζόλες έχουν μηκυτοκτόνο δράση επειδή παρεμβαίνουν στην σύνθεση των στερολών εμποδίζοντας τη C₁₄ διμεθυλίωση από το κυτόχρωμα P₄₅₀ με την αλληλεπίδραση τους με την ομάδα της αίμης.



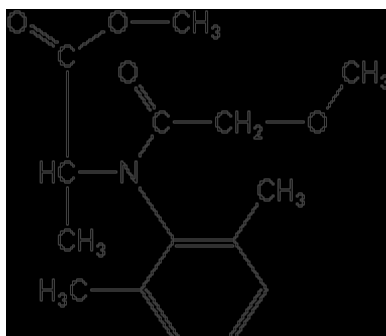
Triadimefon

Σχήμα 1.25. Δομή του τριαζολικού μυκητοκτόνου Triadimefon.

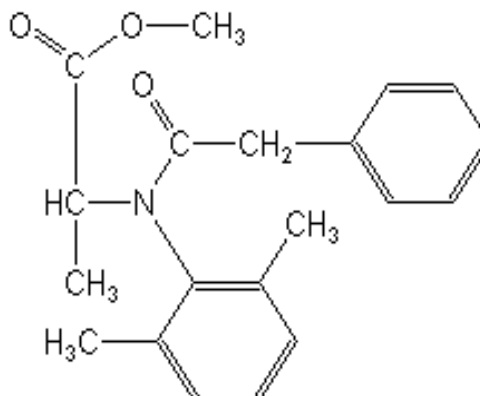
- Ακυλοαμίνες

Οι ακυλοαμίνες περιλαμβάνουν το Benalaxyl, το Metalaxyl κ.λ.π. Το Metalaxyl είναι το πιο σημαντικό ακυλοαμινο μυκητοκτόνο. Είναι αποτελεσματικό ενάντια στον οομύκητα Pythium Phytophthora, στο ωίδιο και στον περονόσπορο. Το Metalaxyl χρησιμοποιείται ευρέως ως ελεγκτής χώματος ή σπόρου για τον έλεγχο του σπόρου pythium και Phytophthora. Το Metalaxyl είναι αρκετά υδροδιαλυτό και μεταφέρεται εύκολα από τις ρίζες στα εναέρια μέρη των περισσότερων φυτών, αλλά η πλευρική δυνατότητα διακίνησής της είναι μικρή. Επειδή η χρήση του Metalaxyl έχει οδηγήσει ήδη στην εμφάνιση ανθεκτικών σε αυτό παθογόνων

μικροοργανισμών, συνιστάται να χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με άλλα μυκητοκτόνα ευρέως φάσματος.



Metalaxyl

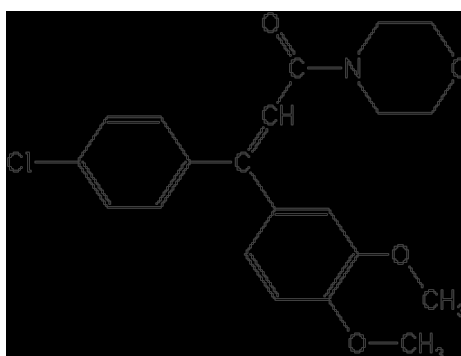


Benalaxyl

Σχήμα 1.2ε. Δομές των ακυλοαμιδικών μυκητοκτόνων *Metalaxyl* και *Benalaxyl*.

- Μορφολίνες

Οι μορφολίνες ενεργούν ως παρεμποδιστές της σύνθεσης στερόλης όπως χοληστερόλης, λανοστερόλης. Στην ομάδα των μορφολινών ανήκει το *Dimethomorph*.



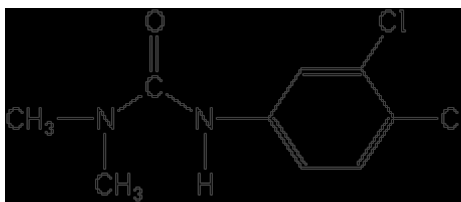
Dimethomorph

Σχήμα 1.στ. Δομή του μορφονιλικού μυκητοκτόνου *Dimethomorph*.

Τα ζιζανιοκτόνα διακρίνονται ανάλογα με τη χημική τους σύνθεση σε διάφορες χημικές κατηγορίες. Ορισμένες από τις ομάδες στις οποίες διακρίνονται είναι οι εξής:

- Παράγωγα ουρίας

Τα παράγωγα ουρίας αποτελούν και αυτά μια σημαντική χημική κατηγορία φυτοφαρμάκων. Δρουν εμποδίζοντας τη φωτοσύνθεση των φυτών. Είναι διασυστηματικά, δηλαδή προσλαμβάνονται κυρίως από τις ρίζες και κινούνται προς τα φύλλα. Σε χαμηλές δόσεις αποτελούν εκλεκτικά ζιζανιοκτόνα. Στην κατηγορία αυτή ανήκει το Diuron.

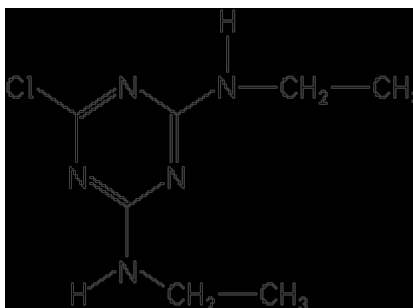


Diuron

Σχήμα 1.2ζ. Δομή του παράγωγου ουρίας ζιζανιοκτόνου Diuron.

- Τριαζίνες

Οι τριαζίνες δρουν εμποδίζοντας τη φωτοσύνθεση των φυτών. Τα πλατύφυλλα ζιζάνια είναι ιδιαίτερα ευπαθή στην ομάδα αυτή. Ορισμένα έχουν μεγάλη διάρκεια ζωής και γι' αυτό χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή κατά την αμειψισπορά με ευαίσθητες καλλιέργειες. Επίσης, έχουν την τάση να εκπλύνονται στα υπόγεια νερά. Στην χημική ομάδα των τριαζινών ανήκει το φυτοφάρμακο Simazine.



Simazine

Σχήμα 1.2η. Δομή του τριαζινικού ζιζανιοκτόνου Simazine.

1.3. ΧΡΗΣΙΜΟΤΗΤΑ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ

Η χρήση των φυτοφαρμάκων στη σύγχρονη γεωργία με τις σημερινές συνθήκες και με ορισμένες προϋποθέσεις είναι αναγκαία για την αγροτική παραγωγή. Τα φυτοφάρμακα όταν χρησιμοποιούνται στη σωστή αναλογία και με την καθοδήγηση ειδικών γεωπόνων, συμβάλλουν στην αύξηση της αγροτικής παραγωγής και στη βελτίωση της ποιότητας των αγροτικών προϊόντων, αφού καταστρέφουν τους βλαβερούς οργανισμούς που εμποδίζουν την ανάπτυξη των φυτών ή τους μικροοργανισμούς που μολύνουν τα προϊόντα και καταστρέφουν πολλές φορές ολόκληρη την παραγωγή.

Η χρήση τους εξοικονομεί χρόνο, αφού χωρίς αυτά οι γεωργοί θα έπρεπε να δουλεύουν στις καλλιέργειές τους πολύ περισσότερο, και μάλιστα με αρκετά μικρότερη απόδοση. Επίσης για να καταπολεμηθούν οι διάφορες ασθένειες χωρίς τα φυτοφάρμακα θα απαιτούνταν περισσότερη και πιο κοπιαστική δουλειά από τον αγρότη. Με τη χρήση τους οι αγροτικές ασχολίες γίνονται λιγότερο κουραστικές, ενώ δε χρειάζονται πολλά "χέρια". Ακόμα, τα φυτοφάρμακα σε ορισμένες περιπτώσεις μπορούν να καθυστερήσουν ή να κάνουν πιο γρήγορη την αγροτική παραγωγή, ανάλογα με τις επιθυμίες του παραγωγού, έτσι ώστε να μπορεί να προλάβει τις καιρικές συνθήκες.

1.4. ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

Πολύ μεγάλες είναι και οι συνέπειες που προκαλούνται από τα φυτοφάρμακα στο φυσικό περιβάλλον το οποίο επηρεάζεται και αλλοιώνεται σε μεγάλο βαθμό, με αποτέλεσμα να καταστρέφεται η ισορροπία του.

Οι βλαβερές ουσίες που περιέχονται στα φυτοφάρμακα επηρεάζουν και καταστρέφουν τη χλωρίδα και την πανίδα της περιοχής όπου γίνεται χρήση τους. Ολόκληρες ομάδες ζώων και εντόμων (όχι μόνο των βλαβερών αλλά και ωφέλιμων) εξαφανίζονται διαταράσσοντας τη φυσική ισορροπία. Πολλά χόρτα, μικρά φυτά και δέντρα απορροφούν αυτές τις ουσίες οι οποίες με το χρόνο συσσωρεύονται και έτσι καταστρέφονται. Ένα μέρος των ουσιών αυτών καταλήγει στο υπέδαφος και τα υπόγεια νερά τα οποία ρυπαίνονται.

Υπολείμματα φυτοφαρμάκων και άδειες συσκευασίες αντί να καταστραφούν, πετιούνται ασυλλόγιστα σε μικρά ποτάμια και ρέματα με αποτέλεσμα να μολύνονται τα νερά τους, αλλά ταυτόχρονα μεταφέρονται και στη θάλασσα μολύνοντας έτσι και τα νερά των θαλασσών. Ο ψεκασμός με φυτοφάρμακα (ιδιαίτερα όταν γίνεται από τον αέρα με ειδικά αεροπλάνα) μολύνει και την ατμόσφαιρα με αποτέλεσμα να έχει αρνητικές συνέπειες στη ζωή φυτών και ζώων.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, η ρύπανση και η καταστροφή του φυσικού περιβάλλοντος είναι πολύ μεγάλη, ακόμα και όταν γίνεται κανονική χρήση των φυτοφαρμάκων, πολύ περισσότερο δε όταν γίνεται αλόγιστη χρήση τους(Αλμπάνης,1999-Hartley & Kidd, 1983-Μπέλλος,2008-Primmer,1992).

Γίνεται έτσι επιτακτική η ανάγκη να παρθούν πιο δραστικά μέτρα έτσι ώστε να περιοριστεί η χρήση τους και να γίνεται πιο σωστά, με έλεγχο και μέτρο γιατί τα φυτοφάρμακα μαζί με τους άλλους παράγοντες μόλυνσης (καυσαέρια, απόβλητα) συμβάλλουν στην κατάρρευση του περιβάλλοντος.

Η πλέον σωστή λύση είναι η στροφή προς την βιολογική γεωργία η οποία μπορεί να είναι ο εναλλακτικός και καλύτερος για την υγεία και το περιβάλλον τρόπος καλλιέργειας.

1.5. ΣΥΝΕΠΕΙΕΣ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ

Όπως έχουν καταδείξει οι επιστήμονες με τις έρευνές τους οι επιδράσεις των φυτοφαρμάκων στην υγεία των ανθρώπων είναι σημαντικές, μακροχρόνιες οι περισσότερες, αλλά και σε μερικές περιπτώσεις άμεσες.

Οι άμεσες (οξεία τοξικότητα), προέρχονται κυρίως από ατυχήματα δηλητηριάσεων με φυτοφάρμακα λόγω κακής χρήσης, φύλαξης ή άγνοιας και επιφέρουν το θάνατο ή προκαλούν ανεπανόρθωτες βλάβες στην υγεία όσων έχουν δηλητηριαστεί. Περισσότερες από ένα εκατομμύριο δηλητηριάσεις από φυτοφάρμακα καταγράφονται κάθε χρόνο στην Ευρωπαϊκή Ένωση και 1500 περίπου περιστατικά δηλητηριάσεων αντιμετωπίζονται ετησίως στα νοσοκομεία της Αθήνας και άλλα τόσα στα νοσοκομεία της Θεσσαλονίκης . Από αυτά πάνω από 50 καταλήγουν σε θάνατο. Επίσης έχουν συμβεί αρκετά ατυχήματα με διαρροή επικίνδυνων ουσιών που χρησιμοποιούνται σε εργοστάσια για την κατασκευή φυτοφαρμάκων με αποτέλεσμα το θάνατο πολλών ανθρώπων και την πρόκληση βλαβών στον οργανισμό πολύ περισσότερων (Bhora της Ινδίας το 1984).

Οι μακροχρόνιες όμως αρνητικές συνέπειες (χρόνια τοξικότητα) που προκαλούνται στην υγεία μας με τη χρήση τους από τη συνεχή και σε μικροποσότητες λήψη φυτοφαρμάκων κυρίως μέσω της λαμβανόμενης τροφής και στο οικοσύστημα από την συσσώρευση μικροποσοτήτων, που μένουν σε αυτό μετά από κάθε εφαρμογή, είναι περισσότερες και οι πλέον ανησυχητικές, αφού αφορούν το σύνολο της ανθρωπότητας.

Τα υπολείμματα επικίνδυνων ουσιών που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή φυτοφαρμάκων περνάνε, πριν προλάβουν να διασπαστούν, μέσα από την τροφική αλυσίδα στον ανθρώπινο οργανισμό με τη λήψη φυτικών τροφών ή με προϊόντα ζώων (γάλατα, κρέατα κ.ά.) τα οποία τρέφονται με φυτικές τροφές και έτσι φτάνουν σ' αυτά οι βλαβερές

ουσίες. Ακόμη και με τη λήψη νερού όμως μπορεί να προκληθούν βλάβες, αφού όπως θα δούμε και στις συνέπειες στο φυσικό περιβάλλον μολύνεται το νερό. Σε ποτάμια όπου καταλήγουν τοξικές ουσίες από καλλιέργειες, συχνά παρατηρείται αλλαγή φύλου στα ψάρια, καθώς τα φυτοφάρμακα λειτουργούν ως ενδοκρινικοί διαταράκτες.

Οι κυριότερες επιπτώσεις που προκαλούνται στον ανθρώπινο οργανισμό είναι: προβλήματα στο νευρικό και αναπνευστικό σύστημα, βλάβες στο συκώτι και τα νεφρά, προβλήματα στην αναπαραγωγή, διάφορες αλλεργίες, επιδράσεις στο αίμα, πρόκληση καρκίνου διαφόρων μορφών κ.ά. Μελέτες δείχνουν αύξηση κατά 40% των περιστατικών καρκίνων στις περιοχές όπου γίνεται ευρεία χρήση φυτοφαρμάκων. Αυτές βέβαια οι επιπτώσεις γίνονται πιο ορατές και πιο άμεσες όταν γίνεται αλόγιστη χρήση των φυτοφαρμάκων, όταν δεν υπάρχει έλεγχος όσον αφορά την ποιότητα, την ποσότητα και τη χρονική διάρκεια χρήσης τους (*Apréa et.al.,1996-Monitoring of pesticides,1997-NZ Food Safety,2003- Pearson,1995-Frenzel, 2000*).

Το 2005, το υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων πραγματοποίησε περίπου 2.000 δειγματοληπτικούς ελέγχους για υπολείμματα φυτοφαρμάκων απ' όλα τα προϊόντα, ελληνικά, εισαγόμενα από τρίτες χώρες αλλά και από χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης, γιατί τόσα δείγματα προλαβαίνουν να εξετάσουν τα οκτώ εργαστήρια που υπάρχουν στην Ελλάδα. Μάλιστα τα δείγματα ελήφθησαν από την αγορά, γεγονός που σημαίνει ότι ουσιαστικά ελέγχεται το ήθος του παραγωγού, καθώς τα προϊόντα έχουν ήδη καταναλωθεί, όταν βγαίνουν τα αποτελέσματα των ελέγχων. Κανένας ασφαλώς δεν ελέγχει τι γίνεται στο χωράφι, κάτι που, για παράδειγμα, γίνεται στις βιολογικές καλλιέργειες. Ξένοι εργάτες, οι οποίοι βεβαίως δεν ξέρουν ούτε να διαβάσουν τις οδηγίες χρήσης των φυτοφαρμάκων, ψεκάζουν ανεξέλεγκτα (*Frenzel,2000-Τούντα,2005*) .

1.6. ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ ΚΑΙ ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ ΤΗΣ ΥΓΕΙΑΣ

Ο μεγάλος κίνδυνος από τα φυτοφάρμακα οφείλεται κατά ένα μεγάλο ποσοστό στην κακή χρήση τους, λόγω κυρίως στην άγνοια των ανθρώπων που τα χρησιμοποιούν. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίνεται τόσο στη χρήση - εφαρμογή όσο και στην αποθήκευση των φαρμάκων, απαιτείται δηλαδή η τήρηση των κανόνων ορθής γεωργικής πρακτικής. Με απλά λόγια, πρέπει να ακολουθούνται πιστά οι οδηγίες, καθώς αυτές αποτελούν αποτέλεσμα μελέτης και αξιολόγησης στοιχείων από πειράματα εργαστηριακά και πεδίου.

Απαραίτητη είναι η μεσολάβηση των κρατικών μηχανισμών έτσι ώστε με την αξιοποίηση του ανθρώπινου επιστημονικού δυναμικού, να γίνεται συνεχής εκπαίδευση και ενημέρωση του αγροτικού πληθυσμού. Συμπερασματικά, η ανάγκη για παραγωγή τροφίμων

πρέπει να βρίσκεται σε ισορροπία με την ανάγκη για προστασία του περιβάλλοντος. Πρέπει λοιπόν και οι φαρμακοβιομηχανίες από την πλευρά τους να παράγουν φάρμακα με μικρή διάρκεια ζωής και πριν κυκλοφορήσουν το σκεύασμα στην αγορά να εξασφαλίζουν ότι ο κίνδυνος ρύπανσης είναι αποδεκτός για τα εδαφικά οικοσυστήματα, τα υπόγεια και επιφανειακά νερά, εφόσον βέβαια το σκεύασμα χρησιμοποιείται σωστά από τους αγρότες. Παρ' όλα αυτά, οι οδηγίες χρήσης, που αναγράφονται στις ετικέτες στην πίσω μεριά των πλαστικών μπουκαλιών, σπάνια ακολουθούνται με ακρίβεια και συνέπεια. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να παρατηρείται το φαινόμενο αλόγιστης χρήσης τοξικών φυτοπροστατευτικών προϊόντων που χρησιμοποιούνται στις καλλιέργειες. Δεν είναι αναγκαίο να χρησιμοποιείται περισσότερο φυτοφάρμακο από αυτό που αναγράφει η συσκευασία, εφόσον οι εταιρίες που τα παράγουν φροντίζουν να πάρουν έγκριση για την μεγαλύτερη ανεκτή ποσότητα. Οι συνέπειες της υπέρμετρης αυτής χρήσης έχουν σοβαρό αντίκτυπο σε θέματα ανθρώπινης υγείας (*Μαργαρίτη, 2004-Pearson, 1995*).

Τα φυτοφάρμακα αποτελούν μια σημαντική πηγή επηρεασμού του οργανισμού μας. Μπορούν να οδηγήσουν σε αθροιστικές ανεπιθύμητες ενέργειες που στη συνέχεια θα δημιουργήσουν το υπόστρωμα δημιουργίας διαφόρων μορφών καρκίνου σε ζωτικά όργανα του ανθρώπινου οργανισμού. Ένα ακόμη σημαντικό φαινόμενο που έχει παρατηρηθεί είναι ότι οι παραγωγοί συχνά όταν τελειώσουν τον ψεκασμό ρίχνουν το υπόλοιπο του φυτοφαρμάκου στην άκρη του χωραφιού, αγνοώντας ότι πρόκειται για επικίνδυνο δηλητήριο. Όσο για το χρόνο αναμονής που πρέπει να τηρείται, οι παραγωγοί δεν διστάζουν να συγκομίσουν την παραγωγή όταν πετύχουν την καλύτερη τιμή και όχι όταν είναι σίγουροι ότι τα φυτοφάρμακα που έχουν χρησιμοποιήσει έχουν αποικοδομηθεί. Η πραγματοποίηση από τους χρήστες επεμβάσεων με επικίνδυνα φυτοφάρμακα με μεγάλη υπολειμματική δράση, όταν πλησιάζει η περίοδος της συγκομιδής δεν δίνει τη δυνατότητα στα φυτοφάρμακα να διασπαστούν, με φυσικό επακόλουθο την προώθηση στην αγορά προϊόντων με υψηλά επίπεδα υπολειμμάτων. Η εφαρμογή υψηλών δόσεων επιμηκύνει τη χρονική διάρκεια διάσπασης με αποτέλεσμα επίσης τη διάθεση προϊόντων βεβαρημένων με υψηλά υπολείμματα, χωρίς καμία προφύλαξη για την υγεία των καταναλωτών (*McEwen & Stephenson, 1979-Μπέλλος, 2008-Τούντα, 2005*).

1.7. ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΓΕΩΡΓΙΑ

Η ανάγκη προστασίας του περιβάλλοντος αλλά και οι απαιτήσεις των καταναλωτών για ασφαλή και υγιεινά προϊόντα οδήγησαν στην προώθηση της βιολογικής γεωργίας. Σε μια βιολογική καλλιέργεια δεν χρησιμοποιούνται χημικές ή άλλες επικίνδυνες ουσίες και η προστασία των φυτών από τους εχθρούς τους γίνεται με βιολογικά «προϊόντα». Με τον όρο «βιολογικά προϊόντα», χαρακτηρίζονται εκείνα τα προϊόντα που για την παραγωγή τους δεν χρησιμοποιούνται χημικά λιπάσματα και φυτοφάρμακα, ούτε διάφορες συνθετικές ή φυτικές ορμόνες προκειμένου να επιτευχθεί μεγαλύτερος όγκος, καλύτερο χρώμα και ταυτόχρονη ωρίμανση. Επί πλέον, σε όσα από αυτά τα προϊόντα επιδέχονται επεξεργασία, δεν χρησιμοποιούνται χημικά συντηρητικά, βελτιωτικά, χρωστικές ουσίες ή άλλα πρόσθετα. Τα βιολογικά δηλαδή προϊόντα, παράγονται με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε να είναι απαλλαγμένα από οποιαδήποτε βλαβερή και επικίνδυνη τοξική ουσία για τον άνθρωπο και το περιβάλλον. Η βιολογική προστασία στηρίζεται :

- α) Στη βοήθεια των ωφέλιμων εντόμων ή πουλιών τα οποία κατατρώνε τους βλαβερούς οργανισμούς. Ένα παράδειγμα αποτελούν οι πασχαλίτσες οι οποίες τρώνε τις μελίγκρες, όπως και οι χρυσόπιλοι που τρέφονται επίσης με μελίγκρες.
- β) Σε διάφορα εκχυλίσματα άγριων βοτάνων. Είναι ακίνδυνα για την υγεία του ανθρώπου, δεν έχουν υπολείμματα στα προϊόντα και φτιάχνονται από τους ίδιους με μηδαμινά έξοδα.
- γ) Σε διάφορα βιολογικά προϊόντα, τα οποία δεν περιέχουν συνθετικά φυτοφάρμακα και δεν είναι γενετικά μεταλλαγμένα, όμως είναι κατά μέσο όρο 65% πιο ακριβά από τα συμβατικά.

Οι ίδιοι οι παραγωγοί βλέπουν στη βιολογική γεωργία ένα διέξοδο από τον ανταγωνισμό που θέλει να παράγουν όσο το δυνατό φθηνότερα γιατί δεν απαιτεί μεγάλα κεφάλαια ή τεχνολογία και γιατί τα προϊόντα βρίσκουν εύκολη διέξοδο στις αγορές, αφού τα τελευταία χρόνια αυξάνεται η ζήτησή τους.

Με τη βιολογική γεωργία βελτιώνεται η ποιότητα της καθημερινής ζωής των ανθρώπων, αναπτύσσεται θετική σχέση με το περιβάλλον, μπορούμε να διατηρήσουμε τη γονιμότητα του εδάφους, να αποφύγουμε τη μόλυνση και τη ρύπανση του περιβάλλοντος και να παράγουμε τρόφιμα υψηλής βιολογικής αξίας. Η στροφή προς τα βιολογικά προϊόντα κρίνεται ιδιαίτερα σημαντική για «Ευαίσθητα τμήματα του πληθυσμού» όπως είναι τα νεογνά, τα βρέφη και τα παιδιά, λόγω των αυξημένων απαιτήσεων για μια επαρκή, ασφαλή, πλήρη σε θρεπτικά συστατικά διατροφή, για την αύξηση και ανάπτυξή τους. Οι έγκυες και οι ηλικιωμένοι αποτελούν, επίσης, «ευαίσθητα τμήματα του πληθυσμού», τα οποία είναι ανάγκη να ευαισθητοποιηθούν για τη χρησιμότητα των βιολογικών προϊόντων.

Γενικά όμως μπορούμε να πούμε ότι η βιολογική γεωργία δεν προωθείται όπως θα έπρεπε από το κράτος ή άλλους φορείς και οι γεωργοί συνήθως μόνοι τους προσπαθούν να ενημερωθούν και να συνεργαστούν για ένα καλύτερο μέλλον για τις οικογένειές τους, την

κοινωνία και το περιβάλλον (Αλμπάνης,1999-Ware & Whitacre,2004- Μπέλλος,2008-Τούντα,2005-Ροδιτάκης,2003).

1.8. ΑΝΩΤΑΤΑ ΕΠΙΤΡΕΠΤΑ ΟΡΙΑ

Η εκτεταμένη χρήση φυτοφαρμάκων στην χημική φυτοπροστασία των θερμοκηπιακών και υπαίθριων καλλιεργειών έχει ως συνέπεια την ύπαρξη τοξικών υπολειμμάτων στα φρούτα και λαχανικά που διατίθενται στο εμπόριο για δημόσια κατανάλωση. Ο αριθμός των γεωργικών φαρμάκων που διατίθενται στους παραγωγούς αυξάνει συνεχώς καθώς παρασκευάζονται διαρκώς νέα προϊόντα που καταπολεμούν συγκεκριμένους παθογόνους μικροοργανισμούς.

Τα προβλεπόμενα από τον νόμο ανώτατα επιτρεπτά όρια για τα φυτοφάρμακα στα τρόφιμα έχουν καθοριστεί στις περισσότερες χώρες με σκοπό την προστασία της υγείας του καταναλωτή. Σε μια προσπάθεια μελέτης της έκτασης του φαινομένου της αλόγιστης χρήσης επικίνδυνων φυτοπροστατευτικών προϊόντων και των επιπτώσεων που αυτά επιφέρουν στο περιβάλλον και τον άνθρωπο, πολλές χώρες έχουν αναπτύξει προγράμματα για την καταγραφή της μόλυνσης των φρούτων και των λαχανικών. Η διασφάλιση υπολειμμάτων κάτω από τα όρια είναι ένα από τα πολλά στοιχεία που προϋποθέτουν τη μακρόχρονη πορεία και ανάπτυξη ενός προϊόντος (Τούντα,2005).

Το μέγιστο όριο των υπολειμμάτων (MRL) που τίθεται από την Ευρωπαϊκή Επιτροπή ή τις Ελληνικές αρχές είναι η μέγιστη συγκέντρωση υπολείμματος που πιθανό να παραμείνει σε ένα τρόφιμο μετά την χρήση ενός φυτοφαρμάκου σύμφωνα με την Καλή Γεωργική Πρακτική. Το MRL δεν αποτελεί τοξικολογικό όριο αλλά πρέπει να είναι τοξικολογικά αποδεκτό. Αναπτύσσεται μόνο για να βρεθεί το όριο εκείνο που επιτρέπει την κατανάλωση της τροφής με ασφάλεια, σε περίπτωση που κάποιος καταναλώνει το τρόφιμο αυτό καθημερινά και για όλη του τη ζωή (Μαργαρίτη,2004-Τούντα,2005).

Συχνά, κατά την ανακοίνωση αποτελεσμάτων ελέγχων για υπολείμματα φυτοφαρμάκων ακούμε ότι «ελάχιστα δείγματα βρέθηκαν να υπερβαίνουν τα όρια επικινδυνότητας». Ωστόσο, όταν αναφερόμαστε σε φυτοφάρμακα, σαφώς γνωρίζουμε ότι πρόκειται για τοξικές ουσίες εφόσον έχουν στόχο να εξοντώσουν κάποιους οργανισμούς. Κανονικά, λοιπόν, δεν θα πρέπει να φτάνουν στο πιάτο μας σε μικρή ή και σε ελάχιστη ποσότητα. Τα προϊόντα που τρώμε πρέπει κατά βάση να είναι «καθαρά» από κάθε τοξική χημική ουσία. Τα όρια, όπως και αν καθορίζονται, δείχνουν την ανεκτή παρέκκλιση και όχι αυτό που θα πρέπει να δεχόμαστε ως φυσικό.

Τα όρια όμως αυτά καθορίζονται από την Ευρωπαϊκή Ένωση και τους διεθνείς οργανισμούς, προκειμένου να γνωρίζουμε πότε υπάρχει οξεία τοξικότητα. Τη χρόνια τοξικότητα, όμως, μόνο κατ' εκτίμηση μπορούμε να υπολογίσουμε γιατί εξαρτάται από πολλούς παράγοντες.

Για παράδειγμα, τα ανεκτά όρια υπολειμμάτων φυτοφαρμάκου που έχουν καθοριστεί για φυτοφάρμακο που χρησιμοποιείται στις ντομάτες αφορούν τις αντοχές ενός οργανισμού ο οποίος τρώει καθημερινά ντομάτες ή ενός άλλου που σπάνια περιλαμβάνει το συγκεκριμένο λαχανικό στο διατροφή του (*Frenzel et.al., 2000*).

Αυτοί που τα έχουν καθορίσει δεν έχουν λάβει υπόψη τους αν κάποιος, εκτός για παράδειγμα από ντομάτες, τρώει και άλλα λαχανικά, οπότε λαμβάνει καθημερινά μίγμα φυτοφαρμάκων. Το πρόβλημα είναι ουσιαστικά το πώς μπορεί να μετρηθεί το αποτέλεσμα του συνδυασμού τοξικών ουσιών.

Πρέπει να σημειωθεί ότι: τα όρια των φυτοφαρμάκων είναι τα ίδια ανεξάρτητα από τους ρύπους που έχει η περιοχή όπου ζει κανείς. Και κάτι ακόμα. Αν αυτά τα όρια υπολειμμάτων είναι αυστηρά καθορισμένα με βάση επιστημονικά στοιχεία και εξασφαλίζουν ότι δεν θα υπάρχει επίδραση στην υγεία μας, τότε, γιατί αλλάζουν κάθε τόσο, γιατί ανεβαίνουν ή πέφτουν με υπουργικές αποφάσεις και γιατί τοξικές ουσίες έπειτα από χρήση χρόνων φτάνουν να καταργηθούν; Μια απάντηση είναι ότι αλλάζουν γιατί συχνά δεν γνωρίζουμε όλες τις επιδράσεις οι οποίες καταγράφονται μόνο έπειτα από χρόνια, οπότε και μεταβάλλονται τα όρια (*Μαργαρίτη, 2004*).

1.9. ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΑΣΘΕΝΕΙΩΝ ΣΤΑ ΦΥΤΑ (*Adams et.al., 1998*)

Οι περισσότερες ασθένειες εμφανίζονται και αναπτύσσονται κυρίως κατά την διάρκεια υγρασίας, θερμών ημερών και νυκτών και τα φυτά λιπαίνονται πολύ με άζωτο δέχονται επιθέσεις πολύ περισσότερο από παθογόνους μικροοργανισμούς από ότι τα φυτά που λιπαίνονται λιγότερο. Οι σημαντικότεροι περιβαλλοντικοί παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών είναι η θερμοκρασία και η υγρασία. Τα θρεπτικά συστατικά του εδάφους παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο σε κάποιες ασθένειες και, σε λιγότερο ποσοστό το φως και το pH του εδάφους. Αυτοί οι παράγοντες επηρεάζουν την ανάπτυξη της ασθένειας μέσω της επίδρασής τους στην ανάπτυξη και την δεχτικότητα του φυτού, τον πολλαπλασιασμό και τη δράση του παθογόνου μικροοργανισμού, ή την αλληλεπίδραση του φυτού με τον παθογόνο μικροοργανισμό.

Επίδραση της Θερμοκρασίας

Τα φυτά, όπως και οι παθογόνοι μικροοργανισμοί, απαιτούν βέλτιστες θερμοκρασίες για να αναπτυχθούν και να πραγματοποιήσουν τις δραστηριότητες τους. Οι χαμηλές θερμοκρασίες του χειμώνα, και της πρώιμης άνοιξης είναι κάτω από το ελάχιστο που απαιτείται από τα περισσότερα παθογόνα για να αναπτυχθούν. Επομένως, οι ασθένειες, καταρχήν, δεν προκαλούνται κατά τη διάρκεια εκείνου του χρόνου, και εκείνες που βρίσκονται υπό εξέλιξη γενικά διακόπτονται. Με την εμφάνιση των υψηλότερων θερμοκρασιών, εντούτοις, τα παθογόνα γίνονται ενεργά και, όταν άλλες συνθήκες είναι ευνοϊκές, μπορούν να μολύνουν τα φυτά και να προκαλέσουν την ασθένεια. Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί διαφέρουν ως προς την προτίμηση τους για υψηλές ή χαμηλές θερμοκρασίες. Η θερμοκρασία επιδρά στον αριθμό των σπόρων που σχηματίζονται σε μια περιοχή του φυτού. Η επίδραση της θερμοκρασίας στην ανάπτυξη μιας ιδιαίτερης ασθένειας μετά από τη μόλυνση εξαρτάται από το συγκεκριμένο συνδυασμό των φυτών-παθογόνων μικροοργανισμών. Η γρηγορότερη εξέλιξη ασθενειών, δηλ., ο πιο σύντομος χρόνος που απαιτείται για την ολοκλήρωση ενός κύκλου μόλυνσης, εμφανίζεται συνήθως όταν η θερμοκρασία είναι βέλτιστη για την ανάπτυξη του παθογόνου αλλά είναι επάνω από ή κάτω από το βέλτιστο για την ανάπτυξη του οικοδεσπότη (φυτό).

Επίδραση της Υγρασίας

Η υγρασία, όπως και η θερμοκρασία, επηρεάζει την έναρξη και την ανάπτυξη των μολυσματικών ασθενειών των φυτών με πολλούς αλληλένδετους τρόπους. Μπορεί να υπάρξει ως νερό βροχής ή άρδευσης στην επιφάνεια των φυτών ή γύρω από τις ρίζες, ως σχετική υγρασία στον αέρα, και ως δροσιά. Η υγρασία είναι αναπόφευκτη για τη βλάστηση των μυκητιακών σπορίων και τη διείσδυση μικροβίων στον οικοδεσπότη (φυτό) από τους κορμούς του. Είναι επίσης αναπόφευκτο για την ενεργοποίηση των βακτηριακών, των μυκητιακών, και νηματοειδών παθογόνων μικροοργανισμών προτού να μπορέσουν να μολύνουν τα φυτά. Η υγρασία, με τέτοιες μορφές όπως οι σταγόνες τις βροχής και το τρεχούμενο νερό, διαδραματίζει επίσης έναν σημαντικό ρόλο στη διανομή και στη διάδοσή τους πολλών από αυτούς τους παθογόνους μικροοργανισμούς στο ίδιο φυτό και από το ένα φυτό στο άλλο. Τέλος, η υγρασία αυξάνει το πάχος της σάρκας των φυτών ξενιστών και έτσι της ευαισθησίας τους σε ορισμένα παθογόνα, η οποία έχει επιπτώσεις στην έκταση και τη δριμύτητα της ασθένειας. Το περιστατικό πολλών ασθενειών σε μια συγκεκριμένη περιοχή συσχετίζεται πολύ με το ποσό και τη διανομή των βροχοπτώσεων μέσα στο έτος. Κατά συνέπεια, η πρόσφατη σήψη της πατάτας, η κρούστα μήλων και το κοκκώδες ωίδιο των σταφυλιών βρίσκονται ή είναι βαριάς μορφής μόνο στις περιοχές με τις υψηλές

βροχοπτώσεις ή την υψηλή σχετική υγρασία κατά τη διάρκεια της αυξανόμενης εποχής. Στις μυκητιακές ασθένειες, η υγρασία έχει επιπτώσεις στο μυκητιακό σχηματισμό σπορίων, τη μακροζωία, και ιδιαίτερα τη βλάστηση των σπορίων, η οποία απαιτεί μια λεπτή στρώση νερού που καλύπτει τους ιστούς του φυτού. Σε πολλούς μύκητες, η υγρασία έχει επιπτώσεις επίσης στην απελευθέρωση των σπορίων, τα οποία, όπως στην κρούστα του μήλου, μπορούν να εμφανιστούν μόνο παρουσία της υγρασίας.

Επίδραση του ανέμου

Ο αέρας επηρεάζει τις μολυσματικές ασθένειες των φυτών, πρωτίστως με την αύξηση της διάδοσης των παθογόνων μικροοργανισμών στα φυτά και του αριθμού των πληγών στα φυτά ξενιστές και, σε μικρότερη έκταση, με την επιτάχυνση της ξήρανσης των υγρών επιφανειών των φυτών. Ο αέρας είναι ακόμα σημαντικότερος στην ανάπτυξη ασθενειών όταν συνοδεύεται από βροχή. Ο αέρας, εντούτοις, μερικές φορές βοηθάει στην πρόληψη της μόλυνσης με την επιτάχυνση της ξήρανσης των υγρών επιφανειών των φυτών στα οποία τα μυκητιακά σπόρια ή τα βακτηρίδια μπορεί να είχαν εγκατασταθεί. Εάν οι επιφάνειες των φυτών ξεραθούν πριν πραγματοποιηθεί η διείσδυση, οποιαδήποτε σπόρια ή βακτηρίδια βλάστησης είναι παρόντα στα φυτά είναι πιθανό να αποξηρανθούν και να πεθάνουν, και δεν θα εμφανιστεί καμία μόλυνση.

Επίδραση του φωτός

Η επίδραση του φωτός στην ανάπτυξη ασθενειών, ειδικά κάτω από φυσικές συνθήκες, είναι πολύ λιγότερη από αυτή της θερμοκρασίας ή της υγρασίας. Διάφορες ασθένειες είναι γνωστές στις οποίες η ένταση και η διάρκεια του φωτός μπορούν είτε να αυξήσουν είτε να μειώσουν την ευαισθησία των φυτών στη μόλυνση και επίσης στη δριμύτητα της ασθένειας. Η μειωμένη ελαφριά ένταση αυξάνει γενικά την ευαισθησία των εγκαταστάσεων στις μολύνσεις ιών. Γενικά, διατηρώντας τα φυτά στο σκοτάδι έχει επιπτώσεις στην ευαισθησία των φυτών ως προς την μόλυνση από ιούς εάν προηγείται του εμβολιασμού. Εντούτοις, οι χαμηλές ελαφριές εντάσεις μετά από τον εμβολιασμό τείνουν να καλύψουν τα συμπτώματα μερικών ασθενειών, τα συμπτώματα είναι σοβαρότερα όταν αυξάνονται τα φυτά σε κανονικό φως από ότι αν είναι σκιασμένα (*Stavropoulos et.al., 2001*).

1.10. ΕΧΘΟΡΟΙ – ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΤΟΥ ΑΜΠΕΛΙΟΥ

Οι ασθένειες που εμφανίζονται στο αμπέλι μπορεί να προέρχονται είτε από μύκητες, ή ζιζάνια ή έντομα. Κάποιες εμφανίζονται πολύ συχνά και άλλες λιγότερο συχνά. Για την αντιμετώπιση και την πρόληψη αυτών των ασθενειών χρησιμοποιούνται μυκητοκτόνα, ζιζανιοκτόνα, εντομοκτόνα, ανάλογα με την αιτία που έχει προκληθεί η ασθένεια. Σύμφωνα με μια έρευνα το 55,5% των σταφυλιών περιέχουν φυτοφάρμακα. Στο αμπέλι οι κυριότερες ασθένειες που εμφανίζονται και είναι μυκητιακής, προέλευσης είναι το ωίδιο και ο περονόσπορος (www.bayercropscience.gr)

Το ωίδιο της αμπέλου (κοιν. μπάστρα, θειαφασθένεια, στάχτωμα, αλευράς) είναι κοινή ασθένεια που οφείλεται σε προσβολή από τον μύκητα *Uncinula necator*, διαδεδομένη σε όλες τις αμπελοργικές χώρες του κόσμου. Το ωίδιο δεν απαιτεί νερό στην επιφάνεια του φυτού για να εξαπλωθεί και ενεργεί κυρίως κατά την διάρκεια του ζεστού καλοκαιριού. Ένα καλό κατάβρεγμα με νερό κατά τη διάρκεια του μεσημεριού μπορεί να περιορίσει την ασθένεια αναταράσσοντας τον ημερήσιο κύκλο εξάπλωσής της, ενώ αφήνει και χρόνο στο φύλλωμα να στεγνώσει. Ο μύκητας αυτός χρειάζεται ζωντανούς ιστούς για να επιζήσει. Το κλάδεμα, η συλλογή και ο περιορισμός των φύλλων κατά την διάρκεια της αδρανούς περιόδου μπορούν να περιορίσουν την προσβολή αλλά όχι να την εξαλείψουν εντελώς. Οι σπόροι του ωιδίου μπορούν να μεταφερθούν με τον αέρα από άλλες περιοχές και να δημιουργήσουν νέες εστίες. Φυτά που είναι φυτεμένα σε ηλιόλουστες τοποθεσίες με καλό αερισμό αντιμετωπίζουν λιγότερα προβλήματα από το ωίδιο. Στην αρχή της καρπόδεσης, τα σταφύλια είναι πιο ευάλωτα από κάθε άλλη στιγμή, στις μολύνσεις του παρασίτου. Τακτικοί ψεκασμοί με κατάλληλα μυκητοκτόνα είναι απαραίτητοι.

Ο περονόσπορος Εμφανίζει διάσπαρτες προσβολές που οφείλονται σε τοπικά φαινόμενα όπως είναι οι δροσιές, οι τοπικές βροχές, το ποτίσματα κ.α. Πολλές φορές «κτυπά» κατ' ευθείαν τα σταφύλια. Η ανάπτυξη του παθογόνου ευνοείται από την υγρασία και την επικράτηση θερμοκρασιών γύρω στους 20 - 21 °C. Σε αμπέλια ή στις τοποθεσίες που υπάρχουν αμπέλια, όταν εμφανιστούν τα συμπτώματα της ασθένειας αυτής θα πρέπει να γίνει αμέσως καταπολέμηση.

Ο Βοτρύτης ή γκρίζα μούχλα είναι ασθένεια που υπάρχει σ' όλες τις αμπελοκαλλιέργειες παγκοσμίως, επιδεικνύοντας πολύ διαφορετικούς βαθμούς τοξικότητας προς ένα δεδομένο είδος ξενιστών. Η νόσος διαχειμάζει στο φλοιό, σε υπνώπτοντα μάτια και σε υπολείμματα φυτών στο χώμα του αμπελιού. Την άνοιξη ο μύκητας παράγει σπόρους και μολύνει τα φύλλα και τα νεαρά τσαμπιά. Κυρίως τα ρεύματα του αέρα μεταφέρουν τους σπόρους σε παρακμάζουσα και νεκρή βλάστηση. Η μόλυνση απαιτεί ελεύθερο νερό για ορισμένη χρονική περίοδο, ανάλογα με τη θερμοκρασία. Η έγκαιρη χρήση των κατάλληλων μυκητοκτόνων είναι σημαντική. Η εφαρμογή των προληπτικών μυκητοκτόνων την άνοιξη, ίσως είναι

απαραίτητη για να μειωθεί η εμφάνιση μόλυνσης στους βλαστούς, απώλειας ανθέων και ποσοτικής μόλυνσης νεαρών καρπών. Συνιστάται επίσης και η προ της συγκομιδή εφαρμογή μυκητοκτόνων (Ροδιτάκης, 2003).

1.11. ΚΛΙΜΑ ΚΑΙ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ

Η Ελλάδα χαρακτηρίζεται από τον μεσογειακό τύπο του εύκρατου κλίματος και έχει ήπιους υγρούς χειμώνες και ζεστά ξηρά καλοκαίρια. Το κλίμα της χώρας μπορεί να διαιρεθεί σε τέσσερις βασικές κατηγορίες:

- υγρό μεσογειακό (δυτική Ελλάδα, δυτική Πελοπόννησος, πεδινά και ημιορεινά της Ηπείρου),
- ξηρό μεσογειακό (Κυκλάδες, παραλιακή Κρήτη, Δωδεκάνησα, ανατολική Πελοπόννησος, Αττική, πεδινές περιοχές Ανατολικής Στερεάς),
- ηπειρωτικό (δυτική Μακεδονία, εσωτερικά υψίπεδα ηπειρωτικής Ελλάδας, βόρειος Έβρος),
- ορεινό (ορεινές περιοχές με υψόμετρο περίπου >1500μ στη βόρεια Ελλάδα, >1800μ στην κεντρική Ελλάδα και >2000μ στην Κρήτη).

Οι θερμοκρασίες είναι σπάνια υπερβολικές στις παραθαλάσσιες περιοχές. Οι χιονοπτώσεις είναι κοινές στα ορεινά από τα τέλη Σεπτεμβρίου (στη βόρεια Ελλάδα, τέλη Οκτωβρίου κατά μέσο όρο στην υπόλοιπη χώρα), ενώ στις πεδινές περιοχές χιονίζει κυρίως από τον Δεκέμβριο μέχρι τα μέσα Μαρτίου. Στις παραθαλάσσιες περιοχές των νησιωτικών περιοχών, οι χιονοπτώσεις συμβαίνουν σπανιότερα και δεν αποτελούν βασικό χαρακτηριστικό του κλίματος. Οι καύσωνες επηρεάζουν κυρίως τις πεδινές περιοχές και είναι κοινότεροι τον Ιούλιο και τον Αύγουστο. Η Ελλάδα έχει μεγάλη ηλιοφάνεια όλο σχεδόν το χρόνο. Λεπτομερέστερα στις διάφορες περιοχές της Ελλάδας παρουσιάζεται μια μεγάλη ποικιλία κλιματικών τύπων, πάντα βέβαια μέσα στα πλαίσια του μεσογειακού κλίματος. Αυτό οφείλεται στην τοπογραφική διαμόρφωση της χώρας που έχει μεγάλες διαφορές υψομέτρου και εναλλαγή ξηράς και θάλασσας. Έτσι από το ξηρό κλίμα της Αττικής και γενικά της ανατολικής Ελλάδας μεταπίπτουμε στο υγρό της βόρειας και δυτικής Ελλάδας.

Το κλίμα αποτελεί σημαντικό παράγοντα στην ανάπτυξη ασθενειών στα φυτά και κατ'επέκταση στο αμπέλι. Με αύξηση θερμοκρασίας και υγρασίας ευνοούνται οι ασθένειες που οφείλονται σε μύκητες. Συνεπώς, σε θερμό και υγρό κλίμα υπάρχει μεγαλύτερη χρήση μυκητοκτόνων για την καταπολέμηση ασθενειών που αναπτύσσονται στα φυτά λόγω εμφάνισης μύκητα.

Η πιο σημαντική ασθένεια που εμφανίζεται στα σταφύλια είναι η ασθένεια του ωϊδίου, που οφείλεται σε έναν μύκητα (*Uncinula necator*, *Erysiphacae*), ο οποίος ανήκει στους Ασκομύκητες. Γενικά, η ασθένεια ευνοείται από θερμό καιρό, όχι όμως και σε θερμοκρασίες

μεγαλύτερες από 35 βαθμούς Κελσίου. Θα πρέπει επίσης να επισημανθεί ότι ο μύκητας αναπτύσσεται καλύτερα στα σκιαζόμενα μέρη του φυτού, επειδή ο ήλιος περιορίζει την ανάπτυξή του. Άλλη ασθένεια είναι ο περονόσπορος. Η ευαισθησία του αμπελιού στην ασθένεια αυτή αρχίζει εάν βρέξει επί 1-2 ημέρες τουλάχιστον 10 χιλ. και επικρατήσουν θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 10 °C. Οι συνεχείς βροχοπτώσεις σε συνδυασμό με τη θερμοκρασία που κυμαίνεται γύρω στους 15° C, δημιουργούν ευνοϊκές συνθήκες για ξεκίνηση πρωτογενών προσβολών από την ασθένεια.

1.12. ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ

Με το αυξανόμενο ύψος των παγκόσμιων συναλλαγών στα γεωργικά προϊόντα τα τελευταία χρόνια, οι αναλυτές δίνουν αυξανόμενη προσοχή στη μελέτη των τεχνικών για την ανάλυση των υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων στα γεωργικά προϊόντα. Με σκοπό την απόκτηση της γνώσης για τις ποικιλίες και το πεδίο των φυτοφαρμάκων που χρησιμοποιούνται, την προστασία του καταναλωτή, την προστασία του περιβάλλοντος, και την εξασφάλιση της ποιότητας των γεωργικών προϊόντων, κρίνεται απολύτως απαραίτητο να καθιερωθούν διάφορες αξιόπιστες, γρήγορες, με μικρό κόστος, και αποτελεσματικές αναλυτικές μέθοδοι για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των υπολειμμάτων πολλών φυτοφαρμάκων.

Ο προσδιορισμός των υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων στο κρασί είναι ένας σημαντικός παράγοντας για να αξιολογήσει την ποιότητα κρασιού και για να προτείνει, στο εγγύς μέλλον, τα αξιόπιστα μέγιστα όρια υπολειμμάτων μετά από τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων που συνήθως υπάρχουν. Στην Ελλάδα ο προσδιορισμός υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων στο κρασί βρίσκεται υπό ανάπτυξη. Έχουν αναπτυχθεί κάποιες για το σταφύλι και το κρασί, οι οποίες είναι για ορισμένες κατηγορίες φυτοφαρμάκων σε συγκεκριμένες περιοχές της Ελλάδας (*Miliadis et.al.-Miliadis et.al.,1999*).

Για την ανάλυση των γεωργικών φαρμάκων σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, απαιτείται πριν από την ανάλυση του δείγματος ένα στάδιο προσυγκέντρωσης (preconcentration) των γεωργικών φαρμάκων που περιέχονται στο δείγμα. Κατά το στάδιο της προσυγκέντρωσης πραγματοποιείται αποχωρισμός ενός ή περισσότερων προσδιοριζόμενων ουσιών από άλλες, που δρουν παρεμποδιστικά κατά την πορεία της αναλύσεως. Το δείγμα που προκύπτει μετά το στάδιο της προσυγκέντρωσης, σε όλες σχεδόν τις αναλυτικές μεθόδους που έχουν χρησιμοποιηθεί μέχρι τώρα, αναλύεται στην συνέχεια με την τεχνική της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) ή με την τεχνική της αέριας χρωματογραφίας (GC) (*Planas et.al.,2006-Pang et.al.,2006-Jimenez et.al.,2001-Alder et.al.,2006-Okihashi et.al.,2005-Flamini&Panighel,2005-Navarro et.al.,2000*). Υπάρχουν πολλές μέθοδοι που χρησιμοποιούν την τεχνική της υγρής ή της αέριας χρωματογραφίας για τον προσδιορισμό

των φυτοφαρμάκων. Οι πρώτες εφαρμογές έγιναν με αέρια χρωματογραφία, όμως τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιείται περισσότερο η τεχνική της υγρής χρωματογραφίας για το λόγο ότι με την τεχνική αυτή αναλύεται άμεσα ευρύτερο φάσμα χημικών ομάδων γεωργικών φαρμάκων. Πολλές χημικές ομάδες γεωργικών φαρμάκων, όπως τα καρβαμιδικά, οι υποκατεστημένες ουρίες και διάφορα φαινολικά παράγωγα, παρουσιάζουν προβλήματα κατά την ανάλυσή τους με την τεχνική της αέριας χρωματογραφίας. Τα προβλήματα που παρουσιάζονται κατά την ανάλυσή τους με αέρια χρωματογραφία οφείλονται στο ότι οι ενώσεις που ανήκουν στις ομάδες αυτές ή δεν παρουσιάζουν την απαραίτητη πτητικότητα για να αναλυθούν με την τεχνική της αέριας χρωματογραφίας ή είναι θερμικά ασταθείς στις συνήθεις θερμοκρασίες λειτουργίας της αέριας χρωματογραφίας. Για να αναλυθούν αυτές οι ενώσεις με την τεχνική της αέριας χρωματογραφίας θα πρέπει πρώτα να μετατραπούν σε πτητικά και θερμικώς σταθερά παράγωγα. Αυτό όμως απαιτεί επιπλέον στάδια κατά την διαδικασία της ανάλυσης πράγμα που κάνει την αναλυτική μέθοδο πιο πολύπλοκη. Πλέον οι περισσότερες μέθοδοι ανάλυσης γεωργικών φαρμάκων βασίζονται στην τεχνική της υγρής χρωματογραφίας (*Rodrigues et.al.,2006-Trosken et.al.,2005-Miliadis et.al.-Pang et.al.,2006-Wu et.al.,2002-Alder et.al.,2006-Otero et.al.,2003-Millan et.al.,2003*). Οι μέθοδοι υγρής χρωματογραφίας που έχουν αναπτυχθεί μέχρι τώρα βασίζονται στην ανάλυση συγκεκριμένων ομάδων γεωργικών φαρμάκων πράγμα που απαιτεί την εφαρμογή πολυάριθμων μεθόδων με αποτέλεσμα το έργο να είναι πολυδάπανο, χρονοβόρο και πολλές φορές και κουραστικό για τον αναλυτή. Στις παλαιότερες μεθόδους που είχαν αναπτυχθεί για την ανίχνευση υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων, χρησιμοποιούσαν συνήθως ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων (DAD) και ανιχνευτή φθορισμού (*Molina-Mayo et.al.,2007-Alamo et.al.,2004-Otero et.al.,2003*).

Ο ανιχνευτής φωτοδιόδων επιτρέπει την μερική ταυτοποίηση των ουσιών που ανιχνεύονται και βασίζεται στα χαρακτηριστικά που δίνουν τα φάσματα απορρόφησής τους στην περιοχή του υπεριώδους φωτός (UV). Με αυτό τον ανιχνευτή δεν είναι επαρκής η αξιοπιστία για την ταυτοποίηση των ενώσεων που ανιχνεύονται, καθώς η θετική ταυτοποίηση του δείγματος σε σύγκριση με το φάσμα απορρόφησης στο UV με τα αντίστοιχα φάσματα των πρότυπων ουσιών δεν επαρκεί. Περαιτέρω θετική ταυτοποίηση των ανιχνευόμενων ουσιών πρέπει να γίνει και με άλλες μεθόδους.

Ο ανιχνευτής φθορισμού παρουσιάζει μεγάλη ευαισθησία και εκλεκτικότητα που καθιστά δυνατή την ανίχνευση ουσιών σε πολύ χαμηλά επίπεδα. Παρ' όλα αυτά, είναι κατάλληλος μόνο για ορισμένες κατηγορίες ουσιών. Η πλειοψηφία των φυτοφαρμάκων δεν επιδέχονται αντιδράσεις παραγωγοποίησης για την παραγωγή φθορίζοντος παραγώγου και έτσι δεν είναι δυνατή η ανίχνευσή τους με ανιχνευτή φθορισμού. Η μέθοδοι ανίχνευσης που έχουν χρησιμοποιηθεί και δημοσιευθεί περισσότερο μέχρι τώρα στην Ελλάδα, για την ανίχνευση υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων στο κρασί είναι αυτή της αέριας χρωματογραφίας σε

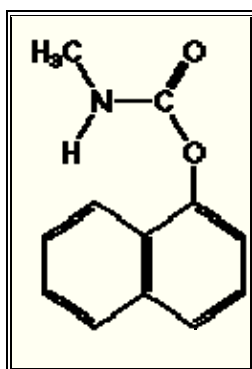
συνδυασμό με φασματομετρία μαζών (GC-MS) και της υγρής χρωματογραφίας με ανιχνευτή φωτοδιόδων (DAD) (Miliadis et.al., 1999).

Σε όλα τα παραπάνω προβλήματα που παρουσιάζονται κατά την ανίχνευση υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων δίνει λύση η ανάπτυξη συστημάτων υγρής χρωματογραφικής ανάλυσης σε συνδυασμό με φασματομετρία μαζών. Αυτά μπορεί να είναι είτε υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματόμετρο μαζών (LC-MS), είτε υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με διαδοχική φασματομετρία μαζών (LC-MS/MS) (Trosken et.al., 2005-Pang et.al., 2006-Alder et.al., 2006). Η τελευταία μέθοδος συγκεντρώνει ολοένα και περισσότερο ενδιαφέρον για την ανάλυση γεωργικών φαρμάκων γιατί προσφέρει μεγάλη αναλυτική ακρίβεια σε ελάχιστο χρόνο, περιλαμβάνει μικρότερο αριθμό σταδίων στην προετοιμασία του δείγματος με αποτέλεσμα να είναι μικρότερο το σφάλμα λόγω απωλειών στο δείγμα και επιπλέον χρησιμοποιείται μικρότερη ποσότητα οργανικών διαλυτών που είναι επικίνδυνοι για την ανθρώπινη υγεία.

1.13. ΚΥΡΙΟΤΕΡΕΣ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

CARBARYL

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ



- Κοινή Ονομασία: Carbaryl
- Χημική Ονομασία: 1-naphthyl methylcarbamate (IUPAC), 1-naphthalenyl methylcarbamate (CA)
- Εμπορικό Όνομα Προϊόντος : Sevin
- EPA Shaughnessy Code : 056801
- Chemical Abstracts Service (CAS) Number : 63-25-2
- Χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά : 1947

- **Κατηγορία** : Εντομοκτόνο
- **Χημική ομάδα** : Καρβαμιδικό
- **Εμπειρικός τύπος** : $C_{12}H_{11}NO_2$
- **Μοριακό Βάρος** : 201.23
- **Σημείο τήξης** : 142 °C
- **Σημείο ζέσεως** : 315 °C
- **Πυκνότητα** : 1.2 g/cm³
- **Διαλυτότητα στο νερό** : 50 mg/L στους 20 °C, 40 mg/L στους 30 °C
- **Διαλυτότητα σε άλλους διαλύτες** : Είναι διαλυτό σε αιθανόλη, πετρελαϊκό αιθέρα, διαίθυλο αιθέρα και χλωροφόρμιο. Είναι σχετικά διαλυτό σε πολικούς διαλύτες όπως ακετόνη, διαιθυλοσουλφοξείδιο, μίγμα κρεσολών και κυκλοεξανόνη.
- **Πίεση αερίων ατμών** : < 5.3 mPa στους 25 °C
- **Συνώνυμα** : Adios, Bugmaster, Carbamec, Carbamine, Crunch, Denaron, Dicarbam, Hexavin, Karbaspray, Nac, Rayvon, Septene, Sevin, Tercyl, Torndao, Thinsec, Tricarnam, και Union Carbide 7744.
- **Δράση** : Το Carbaryl είναι ένα εντομοκτόνο με δράση επαφής (πρέπει να έρθει σε επαφή με το έντομο και δρα αφού διαπεράσει τον εξωσκελετό του εντόμου) και στομάχου (πρέπει να καταποθεί από το έντομο για να είναι αποτελεσματικό) με ελαφρά διασυστηματικές ιδιότητες και ανήκει στην χημική ομάδα των καρβαμιδικών. Χρησιμοποιείται ευρέως στην καταπολέμηση εντόμων κατά την ανάπτυξη των φρούτων και των λαχανικών. Είναι αποτελεσματικό ενάντια σε πολλά παράσιτα εντόμων συμπεριλαμβανομένου τα Alticinae, cicadellidae, κολεόπτερα, Dermateptera, Jassidae, λεπιδόπτερα, Miridae, σκώρος μεσογειακής αμπέλου, φυλλοξήρα, θρίπες κ.λπ. Το Carbaryl έχει επίσης μια ρυθμιστική επίδραση στην αύξηση των οπωροφόρων δέντρων όπου έχει χρησιμοποιηθεί για να «λεπταίνει» τη συγκομιδή ρυθμίζοντας το εμπορεύσιμο μέγεθος των φρούτων.
- **Τρόπος δράσης** : Το Carbaryl επιτίθεται στο νευρικό σύστημα με την παρεμπόδιση της νεύρο μετάδοσης. Όπως τα περισσότερα καρβαμιδικά, το Carbaryl ενεργεί ως ανασταλτικός παράγοντας στη χολινεστεράση, ένα από τα πολλά σημαντικά ένζυμα του νευρικού συστήματος των ανθρώπων, των σπονδυλωτών και των εντόμων (Extoxnet, 2000). Ένα συγκεκριμένο ένζυμο χολινεστεράσεων, η ακέτυλοχολινεστεράση (AChE), διαδραματίζει έναν σημαντικό ρόλο στο σπάσιμο της ακετυλοχολίνης (Ach), η οποία είναι ο συναπτικός μεσολαβητής των ωθήσεων των νεύρων στο νευρικό σύστημα των θηλαστικών και των εντόμων (WHO, 1994). Η παρεμπόδιση της παρουσίας της χολινεστεράσης από τα φυτοφάρμακα, όπως Carbaryl, αποτρέπει την AChE να σπάσει την ακετυλοχολίνη με αποτελέσματα την υψηλή συγκέντρωση Ach στο νευρικό σύστημα. Κατά συνέπεια, η συνεχής υποκίνηση των μυών οδηγεί στην ανεξέλεγκτη, γρήγορη μετακίνηση μερικών μυών, παράλυση, σπασμούς και ακόμη και θάνατο. Τα έντομα αρχίζουν να πεθαίνουν σε 24-48

ώρες, η υπολειμματική δράση ποικίλλει μεταξύ 5-10 ημερών ανάλογα με το έντομο, την δόση και την συγκομιδή.

- **Φάσμα δράσης** : Ελέγχει πάνω από 100 είδη εντόμων στο αμπέλι, στα λαχανικά (ντομάτα, αγγούρι, κολοκύθι, καρπούζι, πεπόνι, φασόλια, λουβιά, κουκιά, μπιζέλια, μαρούλια, μαϊντανός, σπανάκι), στα εσπεριδοειδή, τα φρούτα, το βαμβάκι, τα δάση, τα καρύδια, τα σκιοφύτα, και άλλες συγκομιδές, καθώς επίσης και στα πουλερικά, το ζωικό κεφάλαιο και τα κατοικίδια ζώα.

- **Φυσικά χαρακτηριστικά** : Είναι στερεό και το χρώμα του ποικίλει από άχρωμο σε άσπρο ή γκρι ανάλογα με την καθαρότητα της ένωσης.

- **Υπολείμματα σε τρόφιμα** : Το MRL είναι το νόμιμα επιτρεπόμενο επίπεδο υπολειμμάτων, σε mg/kg, οποιασδήποτε ένωσης σε οποιαδήποτε προϊόντα. Αυτό το επίπεδο καθορίζεται συχνά από το επίπεδο ανίχνευσης ή το επίπεδο εκείνο του υπολείμματος που ανιχνεύεται όταν χρησιμοποιούνται ορθές γεωργικές πρακτικές. Τα MRL τίθενται έτσι ώστε το ποσό όλων των υπολειμμάτων στα τρόφιμα να μην υπερβαίνει την αποδεκτή καθημερινή δόση (acceptable daily intake, ADI) όταν καταναλώνονται τα τρόφιμα. Το εθνικό Συμβούλιο υγείας και ιατρικής έρευνας έχει καθιερώσει το ακόλουθο μέγιστο επίπεδο υπολείμματος (MRLs) (σε ppm ή mg/kg) για το carbaryl : σταφύλια, φρούτα, λαχανικά (εκτός από τα φυλλώδη λαχανικά και τις κολοκύθες), μπανάνες (πολτός), δέρμα πουλερικών, δαμάσκηνα, κεράσια, μάγκο, ακατέργαστα δημητριακά, κεράσι, κρέμα από μήλα (όλα 5 mg/Kg).

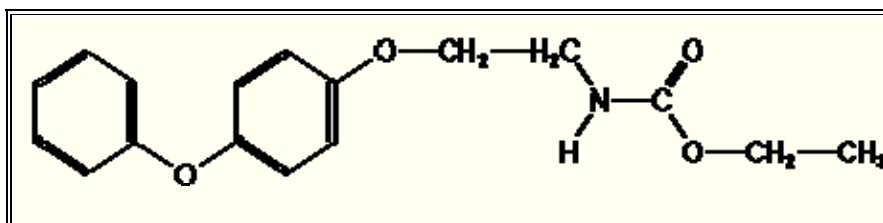
- **Τοξικολογικά χαρακτηριστικά** : Το Carbaryl είναι μέτρια έως πολύ τοξικό, και τοποθετείται σε αυτό ετικέτα με σήμα Προειδοποίησης. Το Carbaryl είναι πολύ τοξικό στα αρπακτικά έντομα και τα ακάρεα καθώς και στο μέλι και τις μέλισσες και άλλα έντομα που είναι επισκέπτες λουλουδιών. Μπορεί να παραγάγει δυσμενή αποτελέσματα στους ανθρώπους από την επαφή, την εισπνοή ή την κατάποση δερμάτων. Τα συμπτώματα της οξείας τοξικότητας είναι χαρακτηριστικά και για τα άλλα καρβαμιδικά. Η άμεση επαφή του δέρματος ή των ματιών με μέσα επίπεδα αυτού του φυτοφαρμάκου μπορεί να προκαλέσει τα εγκαύματα. Η εισπνοή ή η κατάποση των πολύ μεγάλων ποσών μπορεί να είναι τοξική στο νευρικό και αναπνευστικό σύστημα με συνέπεια τη ναυτία, τους αρμοσφίκες στομαχιών, τη διάρροια. Άλλα συμπτώματα σε υψηλές δόσεις περιλαμβάνουν τον ιδρώτα, θόλωμα της όρασης, και σπασμούς. Περίπου πενήντα περιπτώσεις έχουν αναφερθεί σε επαγγελματικές ή τυχαίες ασθένειες λόγω της έκθεσης στο Carbaryl, αλλά κανένα μοιραίο περιστατικό δεν έχει τεκμηριωθεί. Το μόνο τεκμηριωμένο μοιραίο περιστατικό από Carbaryl ήταν μέσω σκόπιμης κατάποσης. Δεν εμφανίζει χρόνια τοξικότητα.

- **Αναλυτικές μέθοδοι** : Έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι αέριας χρωματογραφίας (GC) , αέριας-υγρής χρωματογραφίας με ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων (GLC/ECD), Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC), IR φασματοσκοπίας.

- **Σχόλια** : Το διάλυμα του Carbyaryl είναι ασταθές στο φως, στη θερμότητα και στην υδρόλυση υπό κανονικές συνθήκες αποθήκευσης και δεν είναι διαβρωτικό. Συνδυάζεται με τα περισσότερα φυτοφάρμακα εκτός από τα πολύ αλκαλικά. Το Carbyaryl είναι ένα αποτελεσματικό εντομοκτόνο σε πολλές εφαρμογές του. Λόγω της χαμηλής διαλυτότητάς του στο νερό δεν αποτελεί απειλή για τους υδρόβιους οργανισμούς σε κανονική χρήση. Τα υπολείμματα μορίων σκονών στα λουλούδια έχουν προκαλέσει ζημιά στις μέλισσες και έτσι η προσοχή για την εφαρμογή είναι απαραίτητη για να αποτρέψει την απώλεια μελισσών. Χρησιμοποιείται επίσης και ως ακαρεοκτόνο. Τα συνήθη ιδιοσκευάσματα είναι 50% β.σ. (W.O.) σκόνες 5 και 10%.

FENOXYCARB

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ



- **Κοινή Ονομασία:** Fenoxycarb
- **Χημική Ονομασία:** ethyl 2-(4-phenoxyphenoxy)ethylcarbamate (IUPAC) , ethyl [2-(4-phenoxyphenoxy)ethyl]carbamate (CA)
- **Εμπορικό Όνομα Προϊόντος:** Logic
- **EPA Shaughnessy Code:** 128801
- **Chemical Abstracts Service (CAS) Number:** 79127-80-3
- **Χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά:** 1981
- **Κατηγορία :** Εντομοκτόνο, Μιμητές νεανικής ορμόνης (Juvenile hormone mimics)
- **Χημική ομάδα :** Καρβαμιδικό
- **Εμπειρικός τύπος :** C₁₂H₁₁NO₂
- **Μοριακό Βάρος :** 301.34 g/mol
- **Ακριβές Μοριακό Βάρος :** 301.33706 g/mol
- **Σημείο τήξης :** 53-54 °C
- **Σημείο ζέσεως :** 457.1 °C στους 760 mmHg
- **Πυκνότητα :** 1.23 g/cm³
- **Διαλυτότητα στο νερό :** 6 mg/l στους 20 °C
- **Διαλυτότητα σε άλλους διαλύτες :** Διαλυτό σε εξάνιο, 0.5g/100 g σε ακετόνη, χλωροφόρμιο, διαίθυλαιθέρα, και 25 g/100 g σε μεθανόλη.

- **Πίεση αερίων ατμών** : 0.0078 mPa στους 20 °C

- **Συνώνυμα** : Fenoxycarb, Insegar, Logic, Vaikill, Pictyl, Torus, Ethyl-(2-(4-phenoxyphenoxy)ethyl)carbamate, (2-(4-Phenoxyphenoxy)ethyl)carbamic acid, ethyl ester.

- **Δράση** : Εντομοκτόνο επαφής και στομάχου για την καταπολέμηση της ευδεμίδας στο αμπέλι. Είναι πολύ δραστικό στα αυγά και τις μεγάλες προνύμφες πολλών εντόμων.

- **Τρόπος δράσης** : Είναι καρβαμιδικό εντομοκτόνο και παρόλο που είναι ρυθμιστής ανάπτυξης έχει διαφορετικό τρόπο δράσης από τους παρεμποδιστές της χιτίνης. Η δράση του έχει σχέση με την "ορμόνη νεότητας" των εντόμων . Η "ορμόνη νεότητας" είναι μια ουσία απαραίτητη για να διατηρηθούν τα έντομα σε ένα συγκεκριμένο στάδιο ανάπτυξής τους. Τα έντομα περνούν από τα ακόλουθα στάδια ανάπτυξης: Αυγά - Προνύμφες (5 στάδια) - Νύμφες – Ακμαία. Η απουσία της "ορμόνης νεότητας" προτρέπει τα έντομα να περάσουν:

1) από το στάδιο της μεγάλης προνύμφης στο στάδιο της νύμφης.

2) από το στάδιο του αυγού στο στάδιο της πρώτης προνύμφης.

Το Fenoxycarb μιμείται την ορμόνη νεότητας και διαταράσσει τον κανονικό βιολογικό κύκλο ζωής των εντόμων δηλαδή, τα έντομα αντιλαμβάνονται το fenoxycarb ως παρουσία ορμόνης νεότητας, οπότε σταματά η μεταμόρφωση των εντόμων και επομένως τα αυγά δεν γίνονται προνύμφες και οι μεγάλες προνύμφες δεν γίνονται νύμφες και πεθαίνουν. Το Fenoxycarb έχει δράση σε αυγά και μεγάλες προνύμφες της καρπόκαψας, της ευδεμίδας, της ψύλλας, του φυλλοδέτη των φυλλορουκτών αλλά και σε κοκοειδή (έρπουσες προνύμφες). Το Fenoxycarb έχει δράση με επαφή αλλά κυρίως με κατάποση. Θα πρέπει να εφαρμόζεται στην αρχή ή στο τέλος της γενιάς των εντόμων. Δεν είναι διασυστηματικό και δεν επιδρά στα ενήλικα έντομα.

- **Εχθροί** : Καταπολεμά: Ψύλλα, Καρπόκαψα, Φυλλορύκτες, Ευδεμίδα, Λεκάνιο, Σαν Ζοζέ, Βαμβακάδα σε Μηλοειδή, Ροδάκινα, Αμπέλι, Ελιά και Εσπεριδοειδή. Ακόμη καταπολεμά : Λεπιδόπτερα, κολεόπτερα, κατσαρίδες, ψύλλοι, προνύμφες κουνουπιών και μυρμήγκια.

- **Φυσικά χαρακτηριστικά** : Κοκκώδες στερεό.

- **Τοξικολογικά χαρακτηριστικά** : Δεν είναι τοξικό στα πουλιά και τα ψάρια είναι όμως τοξικό στους υδρόβιους οργανισμούς και τους μεταξοσκώληκες. Το Fenoxycarb είναι ένα προϊόν "φιλικό". Δεν είναι τοξικό στις μέλισσες, τα αρπακτικά των τετρανύχων, το Phytoseilus, το Anthocoris, τον Χρύσωπα, τα Υμενόπτερα και την Πασχαλίτσα. Είναι ασφαλές όταν χρησιμοποιείται σύμφωνα με τις οδηγίες της ετικέτας.

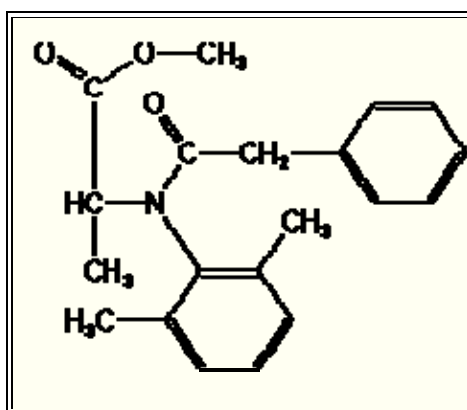
- **Αναλυτικές μέθοδοι** : Έχουν αναπτυχθεί φασματοσκοπικές δοκιμές (φάσμα IR, NMR, φάσματα μάζας), μέθοδοι Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC) και αέριας χρωματογραφίας (GC) .

- **Σχόλια** : Έχει διαφορετικό τρόπο δράσης από τις πυρεθρίνες, τα οργανοφωσφορικά και τους παρεμποδιστές της χιτίνης. Έχει μεγάλη υπολειμματική διάρκεια δράσης. Είναι

ασφαλές στα ωφέλιμα έντομα. Είναι εξαιρετικά δραστικό σε αυγά και μεγάλες προνύμφες της καρπόκαψας, της ευδεμίδας, του φυλλοδέτη και της ψύλλας. Δεν είναι διασυστηματικό και θα πρέπει τα φυτά να λούζονται με πολύ ψεκάστικό υγρό ιδιαίτερα οι καρποί. Είναι ασταθές στο φώς.

BENALAXYL

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

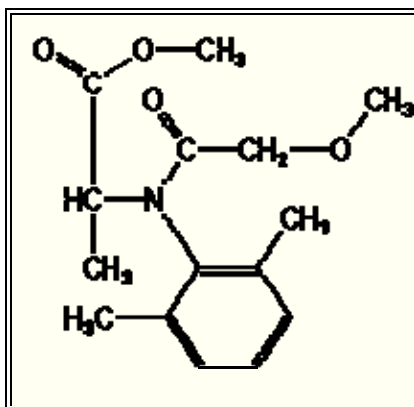


- **Κοινή Ονομασία :** Benalaxyl
- **Χημική Ονομασία :** methyl *N*-(phenylacetyl)-*N*-(2,6-xylyl)-DL-alaninate (IUPAC) , methyl *N*-(2, 6-dimethylphenyl)-*N*-(phenylacetyl)-DL-alaninate (CA)
- **Εμπορικό Όνομα Προϊόντος :** Galben
- **EPA Shaughnessy Code :** 127001
- **Chemical Abstracts Service (CAS) Number :** 71626-11-4
- **Χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά :** 1984
- **Κατηγορία :** Μυκητοκτόνο
- **Χημική ομάδα :** :Ακυλοαμίνες
- **Εμπειρικός τύπος :** C₂₀H₂₃NO₃
- **Μοριακό Βάρος :** 325.4
- **Ακριβές Μοριακό Βάρος :** 325.4015
- **Σημείο τήξης :** 78°-80°C
- **Σημείο ζέσεως :** 250 °C
- **Πυκνότητα :** 1.181 g/cm³ στους 20°C (994g/kg)
- **Διαλυτότητα στο νερό :** 0.0286 g/l στους 20°C

- **Διαλυτότητα σε άλλους διαλύτες στους 22 °C** : Διαλυτό στους περισσότερους οργανικούς διαλύτες. n-επτάνιο: 19.4 g/l, ξυλένιο, 1,2-διχλωρομεθάνιο, μεθανόλη, ακετόνη, οξικός αιθυλεστέρας: >250 g/l
- **Πίεση αερίων ατμών** : 5.72×10^{-4} Pa στους 20°C, 6.64×10^{-4} Pa στους 25°C
- **Συνώνυμα** : Benalaxil , Benalaxyl , DL-Alanine, N-(2,6-methylphenyl)-N-(phenylacetyl)-methyl ester , Galben , M 9834 (Farmoplant) , N-(2,6-Dimethylphenyl)-N-(phenylacetyl)-DL-alanine, Methyl ester , Tairel.
- **Δράση** : Σημαντική θεραπευτική και προστατευτική αποτελεσματικότητα ενάντια στον περονόσπορο.
- **Τρόπος δράσης** : Διασυστηματικό μυκητοκτόνο με προστατευτική και θεραπευτική δράση. Απορροφάται από τις ρίζες, τους μίσχους, και τα φύλλα, με τη δυνατότητα μετακίνησης σε όλα τα μέρη του φυτού, συμπεριλαμβανομένης της επόμενης αύξησης. Η προστατευτική δράση του είναι η παρεμπόδιση της βλάστησης σπορίων και της αύξησης των μικυκλίων, ενώ η θεραπευτική δράση είναι από την παρεμπόδιση της αύξησης των μικυκλίων και της παρεμπόδισης του κονιδιοφόρου σχηματισμού.
- **Φάσμα δράσης** : Ελέγχει τους μύκητες Oomycetes, συμπεριλαμβανομένης της μπλε φόρμας, την πρόσφατη σήψη, και το ωίδιο των πατατών, των ντοματών, του καπνού, των λυκίσκων, των σταφυλιών, του μαρουλιού, των πιπεριών, των κρεμμυδιών, των φραουλών, των ηλιάνθων, της σόγιας, της τύρφης, και των λουλουδιών.
- **Καλλιέργειες** : Σταφύλια, πατάτα, ντομάτα, καπνός, κολοκύθες, κρεμμύδι, λάχανο, μαρούλι
- **Εχθροί** : Oomycetes, ιδιαίτερα μύκητες της οικογένειας Peronosporaceae, περονόσπορος, Plasmodiophora, Sclerospora, Bremia, και pythium SSP, ωίδιο.
- **Φυσικά χαρακτηριστικά** : Άχρωμοι κρύσταλλοι.
- **Υπολείμματα σε τρόφιμα** : Σύμφωνα με τους οργανισμούς FAO/WHO το ανώτατο επιτρεπτό όριο του Benalaxyl στο κρασί έχει οριστεί ίσο με 0,2 ppm.
- **Τοξικολογικά χαρακτηριστικά** : Δεν προκαλεί ενόχληση στα μάτια και το δέρμα.
- **Αναλυτικές μέθοδοι** : Έχουν αναπτυχθεί φασματοσκοπικές δοκιμές (φάσμα IR, NMR, φάσματα μάζας), μέθοδοι Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC) και αέριας χρωματογραφίας (GC) .
- **Σχόλια** : Το Benalaxyl είναι ασταθές στο φως του ήλιου σε υδατικά διαλύματα.

METALAXYL

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ



- **Κοινή Ονομασία:** Metalaxyl
- **Χημική Ονομασία:** methyl *N*-(methoxyacetyl)-*N*-(2, 6-xylyl)-DL-alaninate (IUPAC), methyl *N*-(2,6-dimethylphenyl)-*N*-(methoxyacetyl)-DL-alaninate (CA)
- **Εμπορικό Όνομα Προϊόντος:** Apron, Delta-Coat AD, Ridomil, και Subdue
- **EPA Shaughnessy Code:** 113501
- **Chemical Abstracts Service (CAS) Number:** 57837-19-1
- **Χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά:** 1980
- **Κατηγορία :** Διασυστηματικό Μυκητοκτόνο για επένδυση σπόρων
- **Χημική ομάδα :** Ακυλοαμίνες
- **Εμπειρικός τύπος :** C₁₅H₂₁NO₄
- **Μοριακό Βάρος :** 279.34
- **Ακριβές Μοριακό Βάρος :** 279.33154
- **Σημείο τήξης :** 71-72 °C
- **Σημείο ζέσεως :** 71.8-72.3 °C
- **Πυκνότητα :** 1.20 στους 20 °C
- **Διαλυτότητα στο νερό :** 7100 mg/L στους 20 °C
- **Διαλυτότητα σε άλλους διαλύτες :** Πολύ διαλυτό σε μεθανόλη, βενζόλιο και εξάνιο
- **Πίεση αερίων ατμών :** 0.293 mPa στους 20 °C
- **Συνώνυμα :** (+-)-Metalaxyl, (R)-Metalaxyl, Alanine, *N*-(methoxyacetyl)-*N*-(2,6-xylyl)-, methyl ester, DL-, Allegiance, Apron, Apron 2E, Apron FL, Apron SD 35, C10947, CG 117, CGA 48988, D,L-*N*-(2,6-Dimethylphenyl)-*N*-(2'-methoxyacetyl) alaninate de methyle [French], DL-Alanine, *N*-(2,6-dimethylphenyl)-*N*-(methoxyacetyl)-, methyl ester, DL-Alanine, *N*-(2,6-dimethylphenyl)-*N*-(methoxyacetyl)-, methyl ester (9CI), IPO-FS, Jiashuangling, Mefenoxam, Metalaxil, Metalaxyl, Metalaxyl [ANSI:BSI:ISO], Metanaxin,

Metasyl, Metaxanin, Methyl N-(2,6-dimethylphenyl)-N-(methoxyacetyl)-DL-alaninate, Methyl N-(2-methoxyacetyl)-N-(2,6-xylyl)-DL-alaninate, N-(2,6-Dimethylphenyl)-N-(methoxyacetyl)-alanine methyl ester, Ridomil, Ridomil 2E, Ridomil 72WP, Ridomil Vino, Subdue, Subdue 2E, Subdue 5SP.

- **Δράση** : Καταπολεμά τον περονόσπορο.

- **Τρόπος δράσης** : Το Metalaxyl παρεμποδίζει τους μύκητες επιδρώντας στην σύνθεση του ριβοσωμικού RNA, ειδικότερα παρεμποδίζει την δράση της RNA πολυμεράση 1-templated complex . Το Metalaxyl απορροφάται πολύ γρήγορα από όλα τα μέρη του φυτού εφαρμοζόμενο είτε από το έδαφος είτε από το φύλλωμα. Η κίνησή του μέσα στο φυτό είναι κυρίως ακροπεταλική, όμως μερικές μελέτες που έγιναν για το Metalaxyl δείχνουν μία περιορισμένη βασιπεταλική κίνηση. Η ακροπεταλική ή ανοδική κίνηση του Metalaxyl γίνεται βαθμιαία και συνεχώς οπότε προστατεύεται από τις ασθένειες η καινούργια βλάστηση που δημιουργείται για εβδομάδες μετά την εφαρμογή (ή μήνες στην περίπτωση εφαρμογής από το έδαφος). Το Metalaxyl παρεμποδίζει την ανάπτυξη του μικκυλίου και το σχηματισμό σπορίων.

- **Φάσμα δράσης** : Το Metalaxyl ένα διασυστηματικό μυκητοκτόνο για επένδυση σπόρων βαμβακιού, για την καταπολέμηση της τήξης των φυτωρίων που προκαλούνται από μύκητες όπως το Pythium spp. Το Pythium spp μπορεί να προσβάλλει τα νεαρά φυτά κατά το φύτεμα και να τα νεκρώσει τελείως. Αυτό έχει σαν συνέπεια ανομοιομορφία στο φύτεμα και σε πολλές περιπτώσεις είναι αναγκαία η επανασπορά. Το Metalaxyl, διαπερνά το περίβλημα του σπόρου και μεταφέρεται σε όλα τα μέρη του φυτού κατά την διάρκεια του φυτώματος προστατεύοντας τα νεαρά φυτά.

- **Καλλιέργειες** : Καπνός, τύρφη, πατάτες, σόγια (επεξεργασία σπόρου), κρεμμύδια, εσπεριδοειδή, κολοκύθες, ντομάτες, βαμβάκι, φράουλες, σταφύλι, λαχανικά κ.α.

- **Εχθροί** : Χνουδωτή μούχλα, μαύρη σήψη, φόμωση, Περονόσπορος

- **Φυσικά χαρακτηριστικά** : Άχρωμοι κρύσταλλοι.

- **Υπολείμματα σε τρόφιμα** : Για τα επιτραπέζια σταφύλια το MRL του Metalaxyl είναι ίσο με 2 mg/kg.

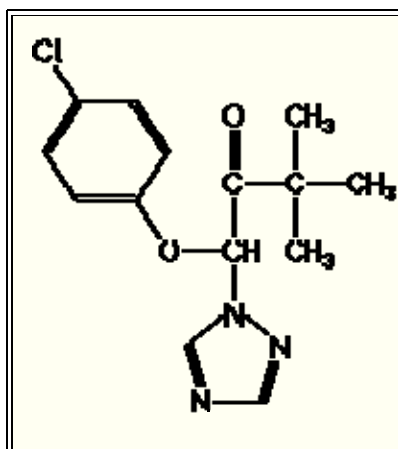
- **Τοξικολογικά χαρακτηριστικά** : Δεν είναι φυτοτοξικό στις συνιστώμενες καλλιέργειες και δόσεις εφαρμογής.

- **Αναλυτικές μέθοδοι** : Έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) και αέριας χρωματογραφίας (GC).

- **Σχόλια** : Το Metalaxyl βρέθηκε να είναι ασταθές στο φως του ήλιου.

TRIADIMEFON

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

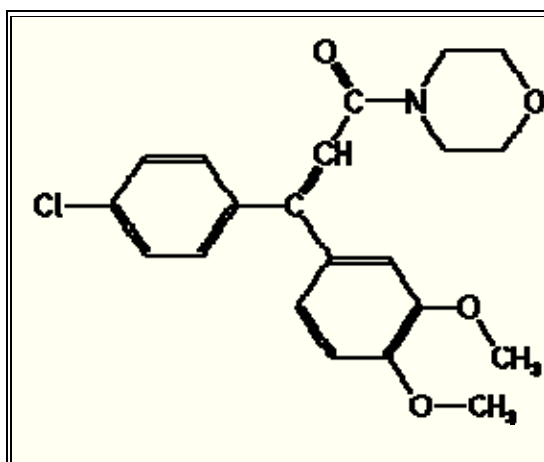


- Κοινή Ονομασία : Triadimefon
- Χημική Ονομασία : (RS)-1-(4-chlorophenoxy)-3,3-dimethyl-1-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)butan-2-one (IUPAC) ,
1-(4-chlorophenoxy)-3,3-dimethyl-1-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)-2-butanone (CA)
- Εμπορικό Όνομα Προϊόντος : Bayleton (92.6% triadimefon)
- EPA Shaughnessy Code : 109901
- Chemical Abstracts Service (CAS) Number : 43121-43-3
- Χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά : 1979
- Κατηγορία :Μυκητοκτόνο
- Χημική ομάδα : Τριαζόλες
- Εμπειρικός τύπος : C₁₄H₁₆ClN₃O₂
- Μοριακό Βάρος :293.8
- Ακριβές Μοριακό Βάρος : 293.7487
- Σημείο τήξης : 82.3 °C
- Σημείο ζέσεως : 441.9 °C στους 760 mmHg
- Πυκνότητα : 1.22 στους 20 °C
- Διαλυτότητα στο νερό : 260 mg/L στους 20 °C
- Διαλυτότητα σε άλλους διαλύτες (20°C) : Ενδιάμεση διαλυτότητα στους περισσότερους οργανικούς διαλύτες :
 - κυκλοεξάνιο 60 – 120 (g/100g)
 - ισοπροπανόλη 20 - 40
 - μεθυλένοχλωρίδιο >120
 - τολουόλιο 40-60
- Πίεση αερίων ατμών : <0.1 mPa στους 20 °C

- **Συνώνυμα** : Acizol, Amiral , Bay MEB 6447 , Bayleton , MEB 6447 , Triademefon , Triadimefom , Triadimefon , Triadimefon (Bayleton) , Triadimefo
- **Δράση** : Δρα ενάντια στο ωίδιο και οξειδώνει τους ζωντανούς ιστούς των σιταριών, των φρούτων, των λαχανικών. Πειραματικό συστημικό μυκητοκτόνο που χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της σκουριάς φύλλων σίτου. Έλεγχος των κονιωδών ωιδίων στα δημητριακά, τα φρούτα, τα φρούτα μούρων, τις αμπέλους, τους λυκίσκους, τις κολοκύθες, τις ντομάτες, τα λαχανικά, το ζαχαρότευτλο, τα μάγκο, την τύρφη, τα λουλούδια, τους θάμνους, και τα δέντρα οξειδώνει τα δημητριακά, τα πεύκα, τον καφέ, τις χλόες σπόρου, την τύρφη, τα λουλούδια, τους θάμνους, και τα δέντρα, αποσύνθεση των σταφυλιών - κηλίδα φύλλων, φόρμα χιονιού στα δημητριακά κ.α. Το Triadimefon με το άλας αλγινικού οξέος carbendazim και νατρίου χρησιμοποιείται για να προστατεύσει τις τομές κλαδεύματος στα δέντρα μήλων και αχλαδιών.
- **Τρόπος δράσης** : Διασυστηματικό μυκητοκτόνο με προστατευτική και θεραπευτική δράση. Απορροφάται από τις ρίζες και τα φύλλα και έχει την δυνατότητα μετακίνησης στους νέους ιστούς ανάπτυξης, αλλά μικρότερη δυνατότητα μετακίνησης στους παλαιότερους, ξύλινους ιστούς.
- **Φάσμα δράσης** : Έλεγχος του περονόσπορου στα δημητριακά, τα φρούτα, τα μούρα, τις αμπέλους, τους λυκίσκους, τις κολοκύθες, τις ντομάτες, τα λαχανικά, το ζαχαρότευτλο, το μάγκο, την τύρφη, τα λουλούδια, τους θάμνους και τα δέντρα επίσης οξειδώνει τον μύκητα *Monilinia SSP* στα δημητριακά, τα πεύκα, τον καφέ, τις χλόες σπόρου, την τύρφη, τα λουλούδια, τους θάμνους και τα δέντρα στα φρούτα μαύρη, αποτρέπει την αποσύνθεση των σταφυλιών και τις κηλίδες φύλλων, καταπολεμά και πολλές άλλες ασθένειες της τύρφης. Τα ποσοστά εφαρμογής είναι στη σειρά 0.0025-0.0125% για τα λαχανικά, τα φρούτα, τα μάγκο, και τα σταφύλια στη σειρά 125-500 g/ha για το βαμβάκι, τα δημητριακά, τους λυκίσκους, τον καφέ, και το ζαχαρότευτλο.
- **Εχθροί** : Κυρίως περονόσπορος.
- **Φυσικά χαρακτηριστικά** : Άχρωμοι κρύσταλλοι.
- **Υπολείμματα σε τρόφιμα** : Στο κρασί το ανώτατο επιτρεπτό όριο πρέπει να κυμαίνεται κατά μέσω όρο κάτω από 0.1 mg/Kg.
- **Τοξικολογικά χαρακτηριστικά** : Παρατηρήθηκε ότι το Triadimefon δεν είχε οποιαδήποτε δυνατότητα ευαισθητοποίησης του δέρματος, είναι ένα ήπιο, αντιστρέψιμο ερεθιστικό δέρματος και δεν είχε κανέναν αρχικό ερεθισμό ματιών σύμφωνα με μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε κουνέλια.
- **Αναλυτικές μέθοδοι** : Έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC) και αέριας χρωματογραφίας (GC).
- **Σχόλια** : Διατηρείται σε δροσερή, ξηρή θέση, και μακριά από το άμεσο φως του ήλιου. Πρέπει να είναι τοποθετημένο στα αρχικά εμπορευματοκιβώτια.

DIMETHOMORPH

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ



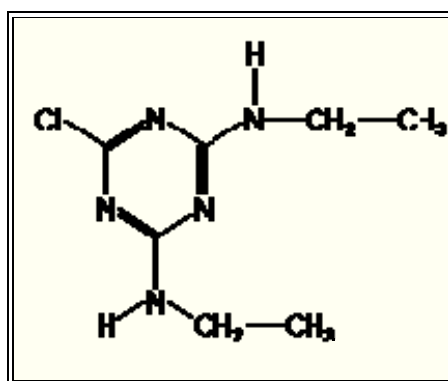
- Κοινή Ονομασία : Dimethomorph
- Χημική Ονομασία : (EZ)-4-[3-(4-chlorophenyl)-3-(3,4 dimethoxyphenyl)acryloyl]morpholine (IUPAC) ,
4-[3-(4-chlorophenyl)-3-(3,4-dimethoxyphenyl)-1-oxo-2-propenyl]morpholine (CA)
- Εμπορικό Όνομα Προϊόντος : Dimethomorphe, Acrobat, Forum, CME 151, και WL-127294.
- EPA Shaughnessy Code : 268800
- Chemical Abstracts Service (CAS) Number : 110488-70-5
- Χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά : 1980
- Κατηγορία : Μυκητοκτόνο διασυστηματικό
- Χημική ομάδα : Μορφολίνες (Αμίδιο καρβοξυλικού οξέος)
- Εμπειρικός τύπος : C₂₁H₂₂ClNO₄
- Μοριακό Βάρος : 387.9
- Ακριβές Μοριακό Βάρος : 387.8567
- Σημείο τήξης : 125-149 °C
- Σημείο ζέσεως : 584.9 °C στους 760 mmHg
- Πυκνότητα : 1318 kg/m³ στους 20 ° C
- Διαλυτότητα στο νερό : Η διαλυτότητα του στο νερό είναι μεγαλύτερη από 50 mg/l στους 20-23 °C.
- Διαλυτότητα σε άλλους διαλύτες : Διαλυτό σε ακετόνη, τολουόλιο, εξάνιο και μεθανόλη
- Πίεση αερίων ατμών : 9.7 x 10⁻⁴ mPa.
- Συνώνυμα : E,Z)-4-(3-(4-Chlorophenyl)-3-(3,4-dimethoxyphenyl)acryloyl)morpholine , 04003 (CA DPR Chem Code) , 110488-70-5 (CAS Number) , 110488705 , 110488705 (CAS

Number) , 268800 (US EPA PC Code) , 4003 (CA DPR Chem Code) , Acrobat WP , CME 151 , Dimethomorph, dimethomorphe , Dimetomorf , Dimetomorfe , Forum DC , 3-(3-(4-chlorophenyl)-3-(3,4-dimethoxyphenyl)-1-oxo-2-propenyl)

- **Δράση** : Το Dimethomorph είναι ένα συστηματικό μυκητοκτόνο που προστατεύει τα φυτά από το ωίδιο και την παρεμπόδιση της διάδοσής του. Επίσης χρησιμοποιείται ως συντηρητικό ξύλου για να ελέγξει το ωίδιο στις αμπέλους, και για να ελέγξει την πρόσφατη σήψη στις ντομάτες και τις πατάτες.
- **Τρόπος δράσης** : Το Dimethomorph παρεμποδίζει την σύνθεση της στερόλης.
- **Φάσμα δράσης** : Το Dimethomorph αναπτύχθηκε για τον περονόσπορο στα σταφύλια, τις πατάτες, τις ντομάτες, και άλλα λαχανικά.
- **Καλλιέργειες** : Σταφύλι, πατάτα, ντομάτα, αγγούρι, πεπόνι, κολοκύθι, καρπούζι κ.α.
- **Εχθροί** : Περονόσπορος.
- **Φυσικά χαρακτηριστικά** : άχρωμη ή γκρι κρυσταλλική σκόνη.
- **Υπολείμματα σε τρόφιμα** : Το ανώτατο επιτρεπτό όριο του Dimethomorph στα τρόφιμα κυμαίνεται από 0,01 -0,5 ppm.
- **Τοξικολογικά χαρακτηριστικά** : Το Dimethomorph είναι ελαφρώς τοξικό στα θηλαστικά, μη τοξικό στα πτηνά, στις μέλισσες (0.1mg/μέλισσα), μέτριας τοξικότητας στα ψάρια.
- **Αναλυτικές μέθοδοι** : ανάλυση με RP HPLC ή capillary GC.
- **Σχόλια** : Μη εύφλεκτο. Διατηρείται σε δροσερή, ξηρή θέση, και μακριά από το άμεσο φως του ήλιου.

SIMAZINE

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ



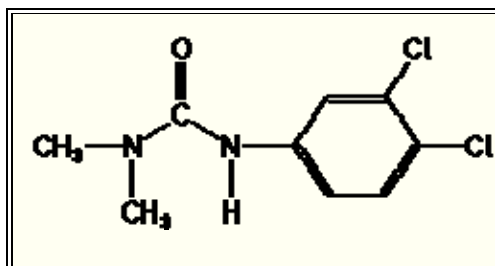
- **Κοινή Ονομασία** : Simazine
- **Χημική Ονομασία** : 6-chloro-*N*²,*N*⁴-diethyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine (IUPAC) , 6-chloro-*N,N'*-diethyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine (CA)

- **Εμπορικό Όνομα Προϊόντος** : Princep
- **EPA Shaughnessy Code** : 080807
- **Chemical Abstracts Service (CAS) Number**: 122-34-9
- **Χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά** : 1957
- **Κατηγορία** : Ζιζανιοκτόνο
- **Χημική ομάδα** : Τριαζίνες
- **Εμπειρικός τύπος** : $C_7H_{12}ClN_5$
- **Μοριακό Βάρος** : 201.66 g/mol
- **Ακριβές Μοριακό Βάρος** : 201.6567
- **Σημείο τήξης** : 225-227 °C
- **Σημείο ζέσεως** : 365.8 °C στους 760 mmHg
- **Πυκνότητα** : 1.3 kg/dm³
- **Διαλυτότητα στο νερό** : Σχετικά αδιάλυτο - 5 mg/L στους 20 °C
- **Διαλυτότητα σε άλλους διαλύτες** : Διαλυτό σε μεθανόλη, χλωροφόρμιο, και διαίθυλαιθέρα και ελαφρώς διαλυτό σε πεντάνιο.
- **Πίεση αερίων ατμών** : 0.000810 mPa στους 20 °C
- **Συνώνυμα** : Aktinit, Batazina, Bitemol, CAT, CDT, Cekuzina-S, Geigy 27,692, Gesatop, Herbazin, Herbex, Hungazin, Premazine, Primatol S, Pricer, Printop, Radocon, Simadex, Tafazine, Zearur.
- **Δράση** : Η simazine είναι ένα εκλεκτικό ζιζανιοκτόνο τριαζίνης. Χρησιμοποιείται για να ελέγξει τα ζιζάνια στα πλατύφυλλα .
- **Τρόπος δράσης** : Το simazine δρα ως παρεμποδιστής φωτοσύνθεσης. Η διαφορά στον έλεγχο μεταξύ των φυκωδών ειδών και μεταξύ των αλγών και των υψηλότερων φυτών μπορούν να οφείλονται στις διαφορές στη δομή κυττάρων και να διευκολύνουν τους τρόπους με τους οποίους η Simazine φθάνει στις περιοχές της δράσης. Προκειμένου να γίνει η εργασία της, η Simazine απορροφάται πρώτα από τα άλγη ή τα φυτά. Καθώς είναι μέσα, η Simazine κινείται προς την περιοχή της φωτοσύνθεσης και διακόπτει την παραγωγή τροφής. Αρκετές ημέρες απαιτούνται για την απορρόφηση. Από έλεγχο σε άλγη έχει προκύψει ότι πρέπει να εμφανιστεί μέσα σε 3-14 ημέρες μετά από την εφαρμογή, ανάλογα με τον τύπο αλγών. Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ο έλεγχος της Simazine στα ζιζάνια γίνεται σε 4-10 εβδομάδες, πολύ αργότερα!
- **Φάσμα δράσης** : Η αρχική γεωργική χρήση του είναι να ελέγξει τα πλατύφυλλα, ποώδη και αγρωστώδη ζιζάνια στους τομείς του καλαμποκιού, τις συγκομιδές εσπεριδοειδών και τα σταφύλια. Χρησιμοποιείται επίσης για να ελέγξει τα ζιζάνια στις φράουλες, τα μήλα, τα αχλάδια, τα καρύδια, τις ελιές, τους ανανάδες, το σπαράγγι, τον κάλαμο ζάχαρης, το τσάι και τον καφέ. Χρησιμοποιείται συχνά ως *προ-προκύπτον ζιζανιοκτόνο* για να ελέγξει τα ζιζάνια προτού να προκύψουν τα νέα σποριόφυτα από το χώμα.

- **Καλλιέργειες** : αγκινάρες, σπαράγγι, , σταφύλι, φράουλα, μήλο, αχλάδι, καρύδι, ελιά, ανανάς, κάλαμο ζάχαρης, τσάι, καφές, συγκομιδές μούρων, φασόλια, εσπεριδοειδή, κ.λπ.
- **Εχθροί** : Ζιζάνια, άλγη, χλόη.
- **Φυσικά χαρακτηριστικά** : Λευκή κρυσταλλική σκόνη.
- **Υπολείμματα σε τρόφιμα** : Η ΕΡΑ αυτήν την περίοδο αξιολογεί εάν τα υπολείμματα της Simazine και τα παραπροϊόντα του στις συγκομιδές (καλαμπόκι, ορισμένα φρούτα, καρύδια) και στα αυγά, γάλα, πουλερικά ή κόκκινο κρέας, θέτουν κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου. Οι προκαταρκτικές μελέτες που αξιολογούνται από το ΕΡΑ έχουν υπολογίσει ότι ο μέγιστος κίνδυνος καρκίνου από τη Simazine ως υπόλειμμα στα τρόφιμα είναι χαμηλός, περίπου ένας στους 100,000. Περισσότερες μελέτες αναμένονται για να υποβληθούν σε ΕΡΑ κατά τη διάρκεια της ειδικής περιόδου αναθεώρησης για να επαναξιολογήσουν τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου από την κατανάλωση των τροφίμων με τα υπολείμματα της Simazine και παραπροϊόντων της.
- **Τοξικολογικά χαρακτηριστικά** : Το Simazine είναι ελαφρώς έως σχεδόν μη τοξικό φυτοφάρμακο. Δοκιμές στους ανθρώπους έχουν δείξει ότι η simazine δεν ερεθίζει το δέρμα ή δεν είναι ευαισθητοποιός ουσία. Εντούτοις, αναφυλαξίες και η δερματίτιδα από την επαγγελματική έκθεση στη simazine έχουν εμφανιστεί. Τα ζιζανιοκτόνα τριαζίνης ενοχλούν τον ενεργειακό μεταβολισμό (λειτουργίες θειαμίνης και ριβοφλαβίνης). Τα συμπτώματα περιλαμβάνουν τη δυσκολία στο περπάτημα, δόνηση, σπασμούς, παράλυση, επιβράδυνση στην αναπνοή, τον πόνο εντέρων, διάρροια, και εξασθενούν την επινεφρίδιο λειτουργία. Καμία περίπτωση στους ανθρώπους δεν έχει αναφερθεί από την κατάποση Simazine.
- **Αναλυτικές μέθοδοι** : Έχουν αναπτυχθεί αναλυτικές μέθοδοι αέριας χρωματογραφίας σε συνδυασμό με φασματογράφο μάζας (GC-MS), Αέριας - υγρής χρωματογραφίας (GLC) και Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης με ανιχνευτή υπεριώδους (HPLC - UV).
- **Σχόλια** : Το Simazine είναι σταθερό σε ουδέτερα και ελαφρώς όξινα ή βασικά μέσα, αλλά υδρολύεται από τα ισχυρά οξέα και βάσεις προς το αδρανές υδροξυ-παράγωγο, ιδιαίτερα σε υψηλότερες θερμοκρασίες. Γενικά, Διατηρείται σε δροσερή, ξηρή θέση, και μακριά από το άμεσο φως του ήλιου Δεν είναι διαβρωτικό. Τα συνήθη ιδιοσκευάσματα είναι 50% και 80% β.σ. (W.P.).

DIURON

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ



- Κοινή Ονομασία : Diuron
- Χημική Ονομασία : 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (IUPAC) ,
N'-(3,4-dichlorophenyl)-*N,N*-dimethylurea (CA)
- Εμπορικό Όνομα Προϊόντος : Karmex.
- EPA Shaughnessy Code: 035505
- Chemical Abstracts Service (CAS) Number: 330-54-1
- Χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά: 1954
- Κατηγορία : Ζιζανιοκτόνο
- Χημική ομάδα : Παράγωγα ουρίας
- Εμπειρικός τύπος : C₉H₁₀Cl₂N₂O
- Μοριακό Βάρος : 233.10 g/mol
- Ακριβές Μοριακό Βάρος : 233.0945
- Σημείο τήξης : 158 °C
- Σημείο ζέσεως : 180 °C
- Πυκνότητα : 1.48 g/cm³
- Διαλυτότητα στο νερό : 42 mg/L
- Διαλυτότητα σε άλλους διαλύτες : Ελαφρά διαλυτό σε ακετόνη, βενζόλιο.
- Πίεση αερίων ατμών : 0.41 mPa στους 50 °C
- Συνώνυμα : 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea, 1,1-dimethyl-3-(3,4-dichlorophenyl)urea, *N'*-(3,4-dichlorophenyl)-*N,N*-dimethylurea, 1-(3,4-dichlorophenyl)-3,3-dimethylurea, DCMC, DCMU, DCMU 99, Diuron Nortox, DMU, DP Hardener 95, Duran, Dyhard UR 200, Herbatox, HRT Dinron, HW 920, Crisuron, Diater, Di-on, Direx, Karmex, Marmex, Marmex D, Karmex Diuron, Unidron, Lucenit, Marmer, Preventol A6, Telvar Diuron Weed killer, unidron, sup'r flo
- Δράση : Είναι ένα ζιζανιοκτόνο που χρησιμοποιείται για τον προ και μετα-προκύπτοντα έλεγχο των ζιζανίων των πλατύφυλλων και της χλόης στη γεωργία. Χρησιμοποιείται επίσης

για να ελέγξει τα ζιζάνια και τα άλγη σε και γύρω από τους οργανισμούς ύδατος και είναι ένα συστατικό των θαλασσίων αντιρρυπαντικών χρωμάτων.

- **Τρόπος δράσης** : Δρα ως παρεμποδιστής φωτοσύνθεσης, σκοτώνει τα ζιζάνια με την παρεμπόδιση της διαδικασίας της φωτοσύνθεσης, αυτό σημαίνει ότι τα φυτά δεν μπορούν να μετατρέψουν σε ενέργεια το φως του ήλιου και να αναπτυχθούν. Απορροφάται από τα φυτά μέσω του συστήματος της ρίζας.

- **Φάσμα δράσης** : Οι περισσότερες από τις χρήσεις είναι στη γεωργία για να ελέγξουν όλους τους τύπους ζιζανίων στο ζαχαροκάλαμο, το βαμβάκι, τις συγκομιδές (βρώμες, σίτος, κριθάρι), τα εσπεριδοειδή και μερικές φυτοκομικές συγκομιδές όπως οι ανανάδες και οι μπανάνες.

- **Καλλιέργειες** : Ζαχαροκάλαμο, βαμβάκι, μήλα, αχλάδια, μπανάνες, ανανάδες, σταφύλια, κριθάρι, καρύδια, σπαράγγια

- **Εχθροί** : Δικοτυλήδονα, μονοετή χόρτα, άλγη, χλόη

- **Φυσικά χαρακτηριστικά** : Λευκό κρυσταλλικό στερεό.

- **Υπολείμματα σε τρόφιμα** : : Στο κρασί το ανώτατο επιτρεπτό όριο πρέπει να κυμαίνεται κατά μέσω όρο κάτω από 0.5 mg/Kg.

- **Τοξικολογικά χαρακτηριστικά** : Το Diuron απορροφάται εύκολα μέσω του εντέρου και των πνευμόνων ενώ η λήψη μέσω του δέρματος είναι περιορισμένη. Είναι ελαφρώς τοξικό στα θηλαστικά αλλά τα νεαρά άτομα είναι πιο ευαίσθητα στην έκθεση από ότι οι ενήλικες με αποτέλεσμα να αποτελεί το diuron αίτιο της μεθεμογλοβίνης, μια ανώμαλη μορφή της πρωτεϊνικής αιμογλοβίνης που φέρνει το οξυγόνο στο αίμα. Το Diuron μπορεί να μειώσει τον αριθμό των ερυθρών κυττάρων του αίματος (RBCs), να αυξήσει τον αριθμό των ανώμαλα διαμορφωμένων RBCs και να αυξήσει τον αριθμό λευκών κυττάρων του αίματος. Το Diuron μπορεί επίσης να προκαλέσει τον ερεθισμό στο μάτι και το δέρμα.

- **Αναλυτικές μέθοδοι** : Έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι Υγρής Χρωματογραφίας με φασματογράφο μάζας (LC-MS), Υγρής Χρωματογραφίας με ανιχνευτή υπεριώδους (LC-UV), Αέριας Χρωματογραφίας με φασματογράφο μάζας (GC-MS).

- **Σχόλια** : Διατηρείται σε δροσερή, ξηρή θέση, και μακριά από το άμεσο φως του ήλιου. Τα συνήθη ιδιοσκευάσματα είναι 80% β.σ. (W.P.)

1.14. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Τα φυτοφάρμακα είναι συνθετικές χημικές ουσίες και αποτελούν ισχυρά δηλητήρια. Σκοπός της σύνθεσής τους είναι η προστασία της καλλιέργειας από ζωικούς και φυτικούς οργανισμούς. Η εκτεταμένη χρήση των φυτοφαρμάκων, έχει ως συνέπεια την ύπαρξη τοξικών υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων τόσο στα τρόφιμα όσο και στα ποτά, πράγμα που εγκυμονεί κινδύνους τόσο για την δημόσια υγεία όσο και για την οικονομία και το περιβάλλον. Στην παρούσα εργασία σκοπός είναι η ανάπτυξη μιας ταχείας και ευαίσθητης μεθόδου υγρής χρωματογραφίας που χρησιμοποιεί διαδοχική φασματομετρία μαζών για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων στο κρασί, τα οποία ανήκουν σε ευρύ φάσμα χημικών ομάδων. Σε αυτή την αναλυτική μέθοδο έγινε προσπάθεια να συμπεριληφθούν φυτοφάρμακα τα οποία χρησιμοποιούνται πολύ στην καλλιέργεια του αμπελιού τόσο στην Βόρεια όσο και στην Νότια Ελλάδα. Επίσης πραγματοποιήθηκαν και αναλύσεις σε κρασιά βιολογικής καλλιέργειας. Επιπλέον έγινε συσχέτιση των αποτελεσμάτων που πήραμε με βάση τις διαφορετικές κλιματικές συνθήκες που επικρατούν μεταξύ Βόρειας και Νότιας Ελλάδας.

Αναλυτικότερα οι επιμέρους στόχοι της εργασίας αυτής ήταν :

- Να αναπτυχθεί μια ιδιαίτερα ευαίσθητη και επιλεκτική μέθοδος για την ανάλυση τριών εντομοκτόνων, τεσσάρων μυκητοκτόνων και δυο ζιζανιοκτόνων φυτοφαρμάκων, η οποία βασίζεται στην χρήση συνδυασμού υγρής χρωματογραφίας, ηλεκτροσπασμού, διαδοχικής φασματομετρίας μαζών (HPLC-ESI-MS/MS).
- Να προσδιοριστούν οι βέλτιστες τιμές, στις οποίες θα πρέπει να ρυθμίζονται οι διάφορες λειτουργικές παράμετροι των οργάνων.
- Να ερευνηθούν οι δυνατότητες της διαδοχικής φασματομετρίας μάζας για την ανίχνευση των φυτοφαρμάκων με εφαρμογή διαφόρων συνδυαστικών σαρώσεων. Αναλυτικότερα, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της παρακολούθησης επιλεγμένων αντιδράσεων (SRM).
- Να βρεθεί κατάλληλη μέθοδος επεξεργασίας των δειγμάτων, να βελτιστοποιηθούν οι συνθήκες που εφαρμόζονται στην εκχύλιση στερεάς φάσης, στην εξάτμιση του εκλούσματος και να προσδιοριστεί η ανάκτηση των φυτοφαρμάκων.
- Να εφαρμοστεί η αναλυτική μέθοδος για την ανάλυση δειγμάτων κρασιού.

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1. ΑΝΑΛΥΤΙΚΑ ΟΡΓΑΝΑ

2.1.1. ΠΡΟΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Εκχύλιση στερεής φάσης –SPE

Η τεχνική αυτή, που αντικατέστησε την κλασική εκχύλιση υγρού-υγρού, συνδυάζει τη δράση μιας στερεής και μιας υγρής φάσης που βασίζεται στο γεγονός ότι τόσο οι προσδιοριζόμενες ενώσεις όσο και οι παρεμποδίσσεις, που είναι διαλυμένες σε κάποιο υγρό, συγκρατούνται με ένα ειδικό προσροφητικό υλικό που βρίσκεται σε μια μικροστήλη εκχύλισης.

Τα προσροφητικά υλικά που χρησιμοποιούνται για την SPE είναι παρόμοια με εκείνα που χρησιμοποιούνται στην υγρή χρωματογραφία, όπου η κινητή φάση είναι ένα υγρό, συμπεριλαμβανομένης της κανονικής φάσης, της αντίστροφης φάσης και της χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής.

Τα προσροφητικά υλικά αντίστροφης φάσης, όπου με αυτό το είδος ασχοληθήκαμε στην παρούσα εργασία, είναι υλικά πακεταρίσματος που είναι πιο υδρόφοβα από το δείγμα. Τα προσροφητικά αυτά υλικά, χρησιμοποιούνται συνήθως στη SPE όταν περιλαμβάνονται υδατικά δείγματα. Οι μηχανισμοί αλληλεπίδρασης είναι δυνάμεις van der Waal's (αποκαλούμενες επίσης ως μη πολικές, υδροφοβικές, ή αλληλεπιδράσεις αντίστροφης φάσης) και περιστασιακά δευτερεύουσες αλληλεπιδράσεις όπως οι αλληλεπιδράσεις δεσμού υδρογόνου και οι διπλόου-διπλόου(*Supelco, 1998-Thurman & Mills, 1998*).

Συνήθη προσροφητικά υλικά για SPE αντίστροφης φάσης παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 2.1.1α. Πρόσροφητικά υλικά για SPE αντίστροφης φάσης.

Προσροφητικό υλικό	Δομή υλικού	Περιεκτικότητα άνθρακα
Οκταδεκυλοσιλοξάνιο (C-18)	(-CH ₂ -) ₁₇ CH ₃	17%C
Οκτυλοσιλοξάνιο (C-8)	(-CH ₂ -) ₇ CH ₃	14%C
Βουτυλοσιλοξάνιο (C-4)	(-CH ₂ -) ₃ CH ₃	
Αίθυλοσιλοξάνιο (C-2)	-C ₂ H ₅	4.8%C
μεθυλοσιλοξάνιο	-CH ₃	
Κυκλοεξυλοσιλοξάνιο	-CH ₂ CH ₂ -cycloexyl	12%C
Φαίνυλοσιλιξάνιο	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ -Phenyl	10.6%C
Graphitized carbon		
Συμπολυμερή	Στυρένιο-διβινυλοβενζόλιο	

Η SPE χρησιμοποιείται συγκεκριμένα για :

- Απομάκρυνση παρεμποδίσεων και ενώσεων που μπορεί να καταστρέψουν τις αναλυτικές στήλες.
- Απομόνωση ή / και προσυγκέντρωση ιχνών της προσδιοριζόμενης ένωσης.
- Αφαλάτωση.
- Αλλαγή διαλύτη της προσδιοριζόμενης ένωσης, ώστε να είναι συμβατός με την χρησιμοποιούμενη μέθοδο HPLC.
- In situ παραγωγοποίηση

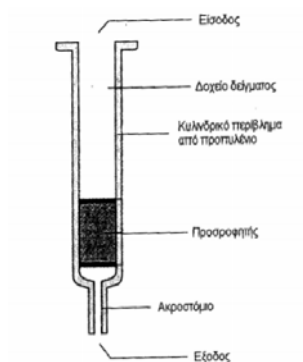
Τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα της SPE είναι :

- Η δυνατότητα συνύπαρξης δύο ή περισσότερων μηχανισμών στη διαδικασία εκχύλισης (ιοντοανταλλαγή, προσρόφηση).
- Η δυνατότητα πραγματοποίησης πολλαπλών εκχυλίσεων του δείγματος με χρησιμοποίηση δύο ή περισσότερων μικροστηλών με το ίδιο ή διαφορετικό προσροφητικό υλικό σε σειρά. Εδώ είναι δυνατή η εφαρμογή διαφόρων μηχανισμών διαχωρισμού σε σειρά για την καλύτερη κλασμάτωση του δείγματος και τον αποτελεσματικότερο καθαρισμό του.
- Η δυνατότητα αυτοματοποίησης με όλα τα πλεονεκτήματα που απορρέουν :
α) μεγαλύτερη ταχύτητα, β) καλύτερη επαναληψιμότητα και γ) ταυτόχρονη κατεργασία πολλών δειγμάτων.
- Η μεγαλύτερη ακρίβεια και εκλεκτικότητα, ιδιαίτερα σε αναλύσεις μικρού όγκου, της τάξης των μL.
- Η απλότητα και η ευκολία στους χειρισμούς και η χρήση απλών και φθηνών διατάξεων.
- Η οικονομία στη χρήση διαλυτών.

Η SPE μπορεί να πραγματοποιηθεί με χρήση :

1) Μικροστηλών (cartridges),

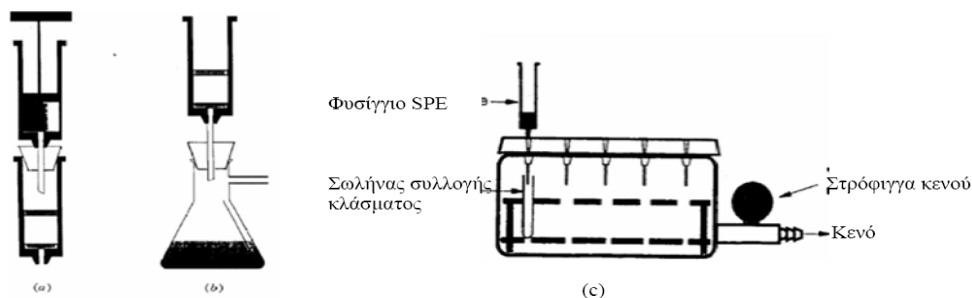
2) δίσκων (discs)



Σχήμα 2.1.1α. Σχηματική απεικόνιση μιας μικροστήλης και δίσκων που χρησιμοποιούνται για SPE.

και 3) ινών (fibers) για μικροεκχύλιση (Solid – Phase Microextraction, SPME). Οι μικροστήλες χρησιμοποιούνται πιο συχνά και είναι συνήθως από πολυπροπυλένιο, πολυαιθυλένιο ή γυαλί ελεύθερο προσμίξεων. Εάν υπάρχουν προσμίξεις όπως πλαστικοποιητές, σταθεροποιητές κ.α., στο υλικό κατασκευής των μικροστηλών, τότε αυτές μπορεί να συνεχυλιστούν κατά την εκχύλιση και να μολύνουν το δείγμα. Το προσροφητικό υλικό, που είναι αντίστοιχο αυτού που χρησιμοποιείται στις αναλυτικές στήλες (π.χ. υλικά συζευγμένου διοξειδίου του πυριτίου, ιοντοανταλλακτικές ρητίνες, κ.ά.), τοποθετείται στις μικροστήλες, όπου συγκρατείται με φρίτες. Οι φρίτες είναι από πολυπροπυλένιο, PTFE ή ανοξείδωτο χάλυβα, με πορώδες 10-20μm, ώστε να μην παρεμποδίζουν ιδιαίτερα την ροή. Οι μικροστήλες που διατίθενται στο εμπόριο κυκλοφορούν σε διάφορα μεγέθη, με όγκους από 0,5 ως 10mL και με ποσότητα υλικού πλήρωσης από 35 mg ως 2 g.

Ο εξοπλισμός που απαιτείται στην SPE είναι απλός. Η βαρύτητα μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως κινητήριος δύναμη αλλά η ροή μέσω των φυσιγγίων είναι εξαιρετικά αργή και γι' αυτό πρακτικά ανεφάρμοστη. Έτσι, απαιτείται μια βασική υποδομή, που ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων, χρησιμοποιείται μια από τις διατάξεις του Σχήματος 2.2. Στην παρούσα εργασία εφαρμόστηκε κενό, σε διάταξη πολλών μικροστηλών (Σχήμα 2.2c) (Supelco, 1998).



Σχήμα 2.1.1β. Σχηματικό διάγραμμα οργανολογίας SPE. (a) Εφαρμογή πίεσης με σύριγγα στο φυσιγγίο. (b) Χρήση κενού για μεμονωμένο φυσιγγίο. (c) Διάταξη κενού για πολλαπλά φυσιγγία.

Η εκχύλιση στερεής φάσης (SPE) γενικώς, περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

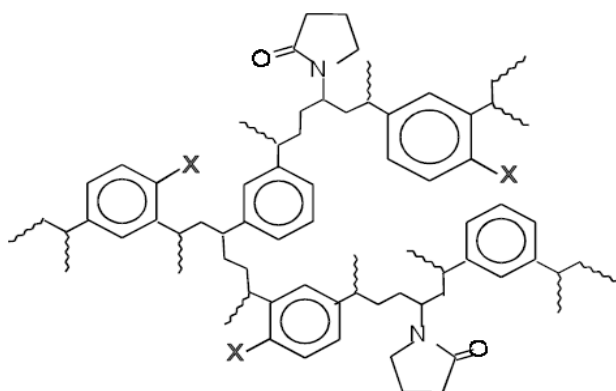
1. Επιλογή κατάλληλης μικροστήλης
2. Ενεργοποίηση του προσροφητικού υλικού
3. Προσθήκη του δείγματος
4. Έκπλυση του φυσιγγίου
5. Έκλυση του αναλύτη

1. Επιλογή κατάλληλης μικροστήλης

Η επιλογή της κατάλληλης μικροστήλης εξαρτάται από την φύση και την συγκέντρωση των αναλυόμενων ενώσεων, την φύση του διαλύτη του δείγματος, καθώς και από τον όγκο του δείγματος. Το υλικό πλήρωσης της στήλης πρέπει να αλληλεπιδρά, όσο πιο εκλεκτικά γίνεται με τις ενώσεις που αναλύονται. Η αλληλεπίδραση αυτή εξαρτάται τόσο από την φύση των αναλυόμενων ενώσεων όσο και από την φύση του διαλύτη, στον οποίο είναι διαλυμένες

(οργανικά ή υδατικά διαλύματα). Ο όγκος του δείγματος και η συγκέντρωση των αναλυόμενων ενώσεων θα πρέπει να είναι τέτοια, ώστε να μην υπερβαίνουν την χωρητικότητα της μικροστήλης (Thurman, 1998).

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν μικροστίλες Waters Oasis HLB, οι οποίες διαθέτουν προσροφητικό υλικό που αποτελείται τόσο από λιπόφιλες όσο και από υδρόφιλες ομάδες. Το προσροφητικό αυτό υλικό αποτελείται από το συμπολυμερές [poly(divinylbenzene-co-N-vinylpyrrolidone)] που παρουσιάζεται στο παρακάτω σχήμα.



Σχήμα 2.1.1γ. Δομή προσροφητικού υλικού της μικροστήλης Waters Oasis HLB, X=H.

Τα κύρια χαρακτηριστικά που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία είναι : α) **μέγεθος πόρων** : 80 Å β) **μέγεθος σωματιδίων** : 30 μm γ) **επιφανειοδραστικό** : συμπολυμερές του m-διβυνιλοβενζολίου και N-βινυλοπυρολιδίνης, δ) **βάρος προσροφητικού υλικού** : 200 mg.

2. Ενεργοποίηση του προσροφητικού υλικού

Κατά την ενεργοποίηση του προσροφητικού υλικού, ένας διαλύτης περνά διαμέσων του προσροφητικού υλικού για να επιδιαλυώσει το πακεταρισμένο υλικό και να ενεργοποιήσει τις λειτουργικές του ομάδες. Επιπλέον, πραγματοποιείται απομάκρυνση οποιασδήποτε μόλυνσης που πιθανόν υπήρχε στο φυσίγγιο και ο αέρας που υπήρχε στο φυσίγγιο απομακρύνεται και τα κενά διαστήματα γεμίζουν με τον διαλύτη. Όσων αφορά την SPE αντίστροφης φάσης, χρησιμοποιούνται μικροί όγκοι διαλύτη ενεργοποίησης, που είναι συνήθως μεθανόλη (MeOH), όπου ακολουθείται από νερό ή υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα. Η μεθανόλη η οποία ακολουθείται από νερό ή υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα ενεργοποιεί την στήλη για τον μηχανισμό προσρόφησης υδατικών δειγμάτων.

Πρέπει να επισημανθεί ότι, η περίσσεια του διαλύτη ενεργοποίησης πρέπει να απομακρύνεται χωρίς να αποξηραίνεται πλήρως το προσροφητικό υλικό. Σε περίπτωση που το προσροφητικό υλικό παραμείνει ξηρό για μερικά λεπτά, τότε θα πρέπει να ενεργοποιηθεί ξανά. Εάν δεν ενεργοποιηθεί ξανά, τότε ο μηχανισμός προσρόφησης δεν θα λειτουργήσει αποτελεσματικά και οι ανακτήσεις του αναλύτη θα είναι μικρές. Στην παρούσα εργασία για

την ενεργοποίηση της μικροστήλης χρησιμοποιήθηκαν 15 ml μεθανόλης και στη συνέχεια 10 ml υπερκάθαρο νερό (*Jimenez et.al.,2001*).

3. Προσθήκη του δείγματος

Σε αυτό το στάδιο, ανάλογα με τον τύπο του δείγματος μπορεί να προστεθεί στο φυσιγγίο από 1 mL έως 1 L αυτού με σιφώνιο ή σύριγγα. Το δείγμα περνάει μέσω του φυσιγγίου είτε με την δύναμη της βαρύτητας, είτε με την βοήθεια αντλίας, είτε υπο κενό ή με κάποιο αυτόματο σύστημα. Σε αυτό το στάδιο, ο αναλύτης κατακρατείται και συγκεντρώνεται στο προσροφητικό υλικό καθώς προστίθεται το δείγμα. Επίσης μπορεί να παραμείνουν και κάποια στοιχεία της μήτρας του δείγματος και κάποια άλλα να απομακρυνθούν, πράγμα που προσδίδει περισσότερη καθαρότητα στον αναλύτη. Ο μηχανισμός κατακράτησης περιλαμβάνει δυνάμεις van der Waal's, δεσμούς υδρογόνου και δυνάμεις διπόλου-διπόλου.

Η ταχύτητα ροής δε χρειάζεται να είναι επαναλήψιμη (συνήθως 2 – 4 mL/min).

Στην παρούσα διατριβή προστέθηκαν 10 ml δείγματος κρασιού, χωρίς καμία προεπεξεργασία (*Jimenez et.al.,2001*). Το κρασί αποτελεί υδατικό διάλυμα.

4. Έκπλυση Φυσιγγίου

Η έκπλυση του φυσιγγίου αποσκοπεί στην απομάκρυνση των παρεμποδιζουσών ουσιών, εκπλένοντας το φυσιγγίο με ένα διαλύτη μέσης ισχύος, χωρίς την ταυτόχρονη έκλυση μέρους του αναλύτη. Αν η μήτρα του δείγματος είναι υδατική, συνήθως, χρησιμοποιείται νερό ή ρυθμιστικό διάλυμα με μικρή προσθήκη οργανικού διαλύτη.

Στην παρούσα διατριβή η έκπλυση της μικροστήλης έγινε με 5 ml υπερκάθαρου νερού/ισοπροπανόλης σε αναλογία 9/1. Μετά την έκπλυση, οι μικροστήλες ξηραίνονται για 30 λεπτά υπό κενό (*Jimenez et.al.,2001*).

5. Έκλυση του Αναλύτη

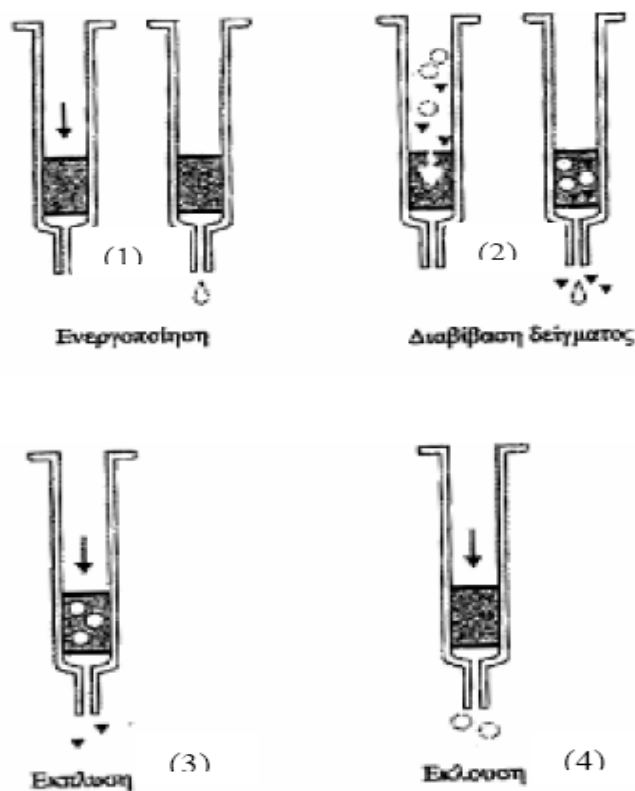
Στόχος κατά την έκλυση του αναλύτη, είναι η ποσοτική παραλαβή του και εάν η μεγάλη ευαισθησία της μεθόδου είναι επιθυμητή, με όσο το δυνατόν μικρότερο ποσό του διαλύτη έκλυσης. Ο τελευταίος συνήθως είναι ένα ισχυρό εκλουστικό μέσο, ισχυρότερο από τον διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε κατά την έκπλυση της μικροστήλης. Μπορεί όμως να χρησιμοποιηθούν και άλλες εναλλακτικές λύσεις, ανάλογα με την ύπαρξη ισχυρά κατακρατούμενων παρεμποδιζουσών ουσιών και με τη φύση του αναλύτη και την ακολουθούσα ανάλυση με HPLC.

Κατά το στάδιο της έκλυσης χρησιμοποιήθηκαν 6 ml οξικού αιθυλεστέρα. Κατά την έκλυση, οι μικροστήλες Oasis HLB συνδέθηκαν με μικροστήλες που φτιάχτηκαν στο εργαστήριο και οι οποίες περιέχουν ως προσροφητικό υλικό Florisil 500 mg. Οι μικροστήλες Florisil ενεργοποιήθηκαν με 5 ml οξικού αιθυλεστέρα και ξηράθηκαν υπό κενό για 5 λεπτά.

Το έκλουσμα που παίρνουμε από τις μικροστήλες Oasis HLB, περνάει μέσα από τις μικροστήλες Florisil (Jimenez et.al.,2001).

Αυτό γίνεται για να κατακρατηθεί η μήτρα του δείγματος μέσα στις μικροστήλες Florisil και να μειωθούν με αυτό τον τρόπο οι παρεμποδίσεις της μήτρας. Αποτέλεσμα αυτού είναι, το έκλουσμα να περιέχει περισσότερη ποσότητα των φυτοφαρμάκων και να έχουμε καλύτερα ποσοστά ανάκτησης.

Τα παραπάνω στάδια που περιγράφηκαν παρουσιάζονται στο παρακάτω σχήμα.



Σχήμα 2.1.1δ. Σχηματική απεικόνιση των τεσσάρων σταδίων τα οποία πραγματοποιούνται κατά την SPE.

Εξάτμιση του εκλούσματος από την SPE

Έκλουσμα που παίρνουμε μετά την εκχύλιση στερεής φάσης έχει περίπου συνολικό όγκο 6ml. Αρχικά το έκλουσμα εξατμίζεται από τα 6ml σε 1ml περίπου με σύστημα εξάτμισης Christ (σχήμα 2.1.1α). Με αυτό το σύστημα επιτυγχάνεται εξάτμιση του διαλύτη έκλουσης και συμπύκνωση των εκλούσματος. Σε αυτό το σύστημα εφαρμόζεται σύστημα κενού και πίεσης και πραγματοποιείται φυγοκέντριση. Με το υψηλό σύστημα κενού και την πίεση που εφαρμόζεται επιτυγχάνεται εξάτμιση του δείγματος χωρίς να υπάρχει ο κίνδυνος εκτόξευσής του από τους κυλίνδρους. Η πίεση ρυθμίστηκε στα 43 bar. Επίσης ανάλογα με τον διαλύτη έκλουσης εφαρμόζεται κατάλληλη θερμοκρασία εξάτμισης. Για τον οξικό αιθυλεστέρα

εφαρμόστηκε θερμοκρασία 40° C. Η διαδικασία εξάτμισης με το Christ για το εκλούσμα μας διαρκεί συνολικά 35 λεπτά.



Σχήμα 2.1.1ε. Σύστημα εξάτμισης Christ.

Μετά την εξάτμιση του εκλούσματος με το σύστημα εξάτμισης Christ, το 1ml του εκλούσματος εξατμίζεται μέχρι ξηρού με αέριο άζωτο (*Jimenez et.al.,2001*), και στη συνέχεια προστίθεται 1ml διαλύτη κινητής φάσης (95% MeOH + 5% H₂O + 5mM NH₄COOH) και το δείγμα είναι έτοιμο για να αναλυθεί με HPLC-ESI-MS/MS.

2.1.2. ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (*Skoog et.al.,2002*)

Ο όρος χρωματογραφία αποδίδεται σε μια μεγάλη ποικιλία μεθόδων, οι οποίες βοηθούν τον ερευνητή να διαχωρίσει ουσίες με παραπλήσιες χημικές ιδιότητες από σύνθετα μίγματα. Σε όλους τους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς το δείγμα κινείται σε μια κινητή φάση η οποία μπορεί να είναι ένα αέριο, ένα υγρό ή ένα υπερκρίσιμο ρευστό. Στη συνέχεια η κινητή φάση εξαναγκάζεται να διέλθει μέσω μιας στατικής φάσης, η οποία είναι καθηλωμένη σε μια στήλη ή σε μια στερεά επιφάνεια. Οι δυο φάσεις επιλέγονται με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε τα συστατικά του δείγματος να κατανέμονται μεταξύ της κινητής και της στατικής φάσης σε διαφορετικό βαθμό. Τα συστατικά τα οποία κατακρατούνται ισχυρότερα από την στατική φάση κινούνται αργά κατά τη ροή της κινητής φάσης. Αντίθετα, τα συστατικά τα οποία κατακρατούνται ασθενέστερα από την στατική φάση, κινούνται ταχύτερα. Ως αποτέλεσμα αυτών των διαφορών στην ευκινησία, τα συστατικά του δείγματος διαχωρίζονται καταλαμβάνοντας το καθένα ξεχωριστές ζώνες, όπου στη συνέχεια τα συστατικά αυτά μπορούν να προσδιορισθούν ποιοτικά ή/και ποσοτικά. Οι χρωματογραφικές τεχνικές μπορούν να ταξινομηθούν βάση του τύπου των κινητών και των στατικών φάσεων και του είδους των ισορροπιών, οι οποίες εμπλέκονται στην ανταλλαγή των διαλυμένων ουσιών μεταξύ των φάσεων. Στην υγρή χρωματογραφία η κινητή φάση είναι ένα υγρό. Ο πιο χρησιμοποιούμενος τύπος υγρής χρωματογραφίας είναι η χρωματογραφία κατανομής.

Η χρωματογραφία κατανομής διαιρείται σε δυο υποομάδες την χρωματογραφία υγρού-υγρού και την χρωματογραφία συνδεδεμένης φάσης. Οι δυο τεχνικές διαφέρουν ως προς τον τρόπο με τον οποίο η στατική φάση κατακρατείται στα σωματίδια του υλικού στήριξης. Στη χρωματογραφία κατανομής υγρού-υγρού, η υγρή στατική φάση κατακρατείται στην επιφάνεια του υλικού πλήρωσης με φυσική προσρόφηση και την χρωματογραφία συνδεδεμένης φάσης,

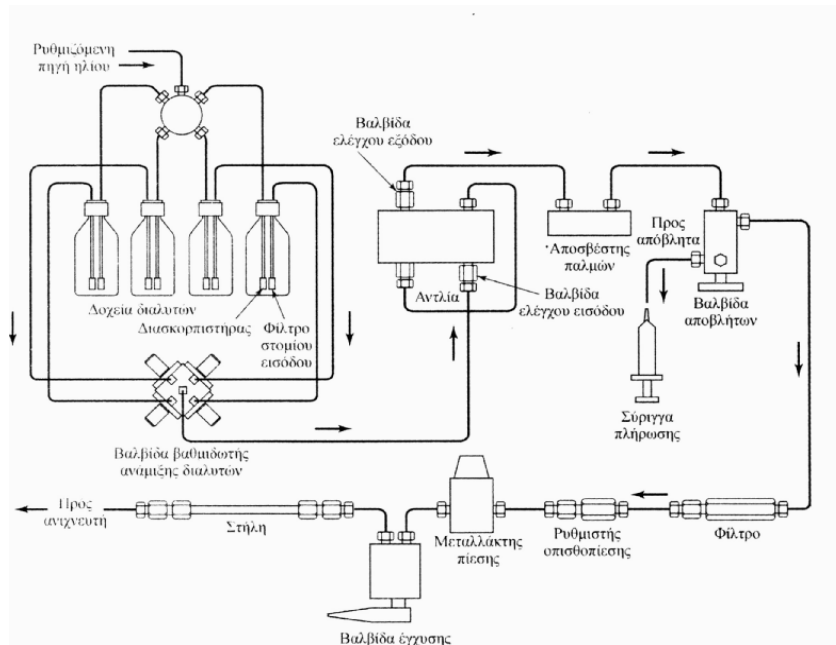
η στατική φάση δεσμεύεται χημικά στην επιφάνεια του υλικού στήριξης. Πλέον, υπερισχύει η μέθοδος συνδεδεμένης φάσης λόγω ορισμένων μειονεκτημάτων στα συστήματα χρωματογραφίας κατανομής υγρού-υγρού.

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography-HPLC) αποτελεί την εξελιγμένη μορφή της υγρής χρωματογραφίας όπου έχει υπάρξει σημαντική βελτίωση στην απόδοση της στήλης με ελάττωση του μεγέθους των σωματιδίων του υλικού πλήρωσης της στήλης. Είναι η πιο διαδεδομένη αναλυτική τεχνική διαχωρισμού από όλες. Οι λόγοι που αυτή η τεχνική είναι πολύ διαδεδομένη είναι η ευαισθησία της, η εύκολη προσαρμογή της σε ακριβείς ποσοτικούς προσδιορισμούς, η καταλληλότητά της για διαχωρισμούς μη πτητικών ή θερμικά ευαίσθητων συστατικών και κυρίως η εφαρμοσιμότητά της σε προσδιορισμούς ουσιών πρωτίστου ενδιαφέροντος για τη βιομηχανία, το δημόσιο και πολλά επιστημονικά πεδία.

Για να αναπτυχθούν ικανοποιητικές ταχύτητες ροής του υγρού έκλουσης όταν χρησιμοποιούνται υλικά πλήρωσης αποτελούμενα από σωματίδια μεγέθους 2-10 μ m, που είναι συνηθισμένα στην σύγχρονη υγρή χρωματογραφία, οι απαιτούμενες πιέσεις από τις αντλίες φτάνουν τις μερικές χιλιάδες psi. Ως συνέπεια αυτών των υψηλών πιέσεων, η οργανολογία της HPLC είναι πολυπλοκότερη και πιο δαπανηρή από την οργανολογία άλλων ειδών χρωματογραφίας.

Υγρή Χρωματογραφία Αντίστροφης Φάσης

Με βάση τη σχετική πολικότητα της κινητής και της στατικής φάσης διακρίνονται δυο τύποι χρωματογραφίας κατανομής. Στην χρωματογραφία κανονικής φάσης η στατική φάση είναι πολική και η κινητή φάση είναι μη πολική. Στην χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (Reversed Phase Liquid Chromatography - RPCLC) η στατική φάση είναι μη πολική (υδρόφοβη) και η κινητή φάση είναι πολική. Στην χρωματογραφία αντίστροφης φάσης, το πολικότερο συστατικό εμφανίζεται πρώτο και με αύξηση της πολικότητας της κινητής φάσης ο χρόνος έκλουσης αυξάνει. Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιείται υγρή χρωματογραφία αντίστροφης φάσης υψηλής απόδοσης. Τα σημαντικότερα τμήματα από τα οποία αποτελείται μια διάταξη HPLC παρουσιάζονται στο σχήμα 2.1.2α.

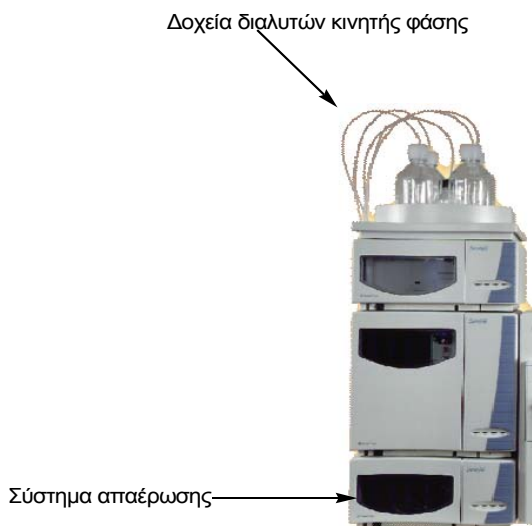


Σχήμα 2.1.2α. Οργανολογία διάταξης HPLC.

Στη συνέχεια περιγράφονται τα επιμέρους τμήματα ενός συστήματος HPLC.

Δοχεία διαλυτών

Ένα σύγχρονο σύστημα HPLC είναι εφοδιασμένο με ένα ή περισσότερα γυάλινα ή ανοξείδωτα δοχεία, καθένα από τα οποία περιέχει 100-200 ml διαλύτη. Τα δοχεία είναι συχνά εφοδιασμένα με μέσα απομάκρυνσης των διαλυμένων αερίων, συνήθως οξυγόνου και αζώτου, που παρεμποδίζουν τον σχηματισμό φυσαλίδων στην στήλη και στον ανιχνευτή των συστημάτων. Οι φυσαλίδες αυτές μπορούν να προκαλέσουν διάφορα προβλήματα. Προκαλούν διεύρυνση των κορυφών του χρωματογραφήματος ή εμποδίζουν συχνά την σωστή λειτουργία του ανιχνευτή. Για την αντιμετώπιση αυτών των προβλημάτων πραγματοποιείται απαέρωση του διαλύτη. Οι απαερωτές μπορεί να αποτελούνται από ένα σύστημα άντλησης κενού, ένα σύστημα απόσταξης, διατάξεις που θερμαίνουν ή αναδεύουν τους διαλύτες ή από συστήματα εισαγωγής μικρών φυσαλίδων αδρανούς αερίου χαμηλής διαλυτότητας. Δεν είναι αναγκαίο οι απαερωτές να αποτελούν ενσωματωμένα τμήματα ενός συστήματος HPLC.



Σχήμα 2.1.2β. Σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) της κατασκευάστριας εταιρίας Thermo Finnigan (δοχεία διαλυτών-σύστημα απαέρωσης).

Είδη έκλουσης

Ο διαχωρισμός στον οποίο χρησιμοποιείται ένας διαλύτης σταθερής σύστασης καλείται *ισοκρατική έκλουση* (isocratic elution). Συχνά, η απόδοση διαχωρισμού ενισχύεται σημαντικά με τη *βαθμιδωτή έκλουση* (gradient elution). Στην βαθμιδωτή έκλουση χρησιμοποιούνται δυο ή τρία συστήματα διαλυτών, που διαφέρουν σημαντικά ως προς την πολικότητα. Αφού αρχίσει η έκλουση, ο λόγος των διαλυτών μεταβάλλεται με τρόπο προγραμματισμένο άλλες φορές συνεχώς και άλλες με μια σειρά βημάτων. Τα σύγχρονα συστήματα HPLC συχνά είναι εφοδιασμένα με διατάξεις, οι οποίες εισάγουν διαλύτες από δυο ή περισσότερα δοχεία σε θάλαμο ανάμιξης με ρυθμούς που μεταβάλλονται συνεχώς. Ο λόγος των όγκων των διαλυτών μπορεί να μεταβάλλεται ως προς το χρόνο γραμμικά ή λογαριθμικά. Ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος τύπος βαθμιδωτής έκλουσης είναι ο γραμμικός.

Η βαθμιδωτή έκλουση είναι απαραίτητη για τον διαχωρισμό πολλών ενώσεων σε διάφορες κατηγορίες δειγμάτων. Επίσης προτιμάται όταν :

- πρέπει να διαχωριστούν ενώσεις με πολύ διαφορετικές τιμές του συντελεστή κατακράτησης k' .
- ο διαλύτης στον οποίο είναι διαλυμένα τα δείγματα είναι ασθενής.
- τα δείγματα περιέχουν παρεμποδίζουσες ενώσεις, οι οποίες εκλούνται αργά, πράγμα που μπορεί να προκαλέσει «μπλοκάρισμα» της στήλης ή να εκλουστούν κατά την διάρκεια ενός από τους επόμενους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς.
- η μοριακή μάζα των ενώσεων που αναλύονται είναι σχετικά υψηλή (>1000) και όταν κυρίως πρόκειται για βιολογικά δείγματα.

Τα μειονεκτήματα που μπορεί να παρουσιάσει η βαθμιδωτή έκλυση είναι τα εξής :

- η πολυπλοκότητά της που καθιστά πιο δύσκολη την ανάπτυξη μιας μεθόδου.
- Η μη συμβατότητά της με ορισμένους τύπους ανιχνευτών (π.χ. ανιχνευτής δείκτη διάθλασης).
- Οι μεγάλοι χρόνοι ανάλυσης που απαιτούνται και που οφείλονται κατα ένα μέρος στην διαδικασία που χρειάζεται η αναλυτική στήλη για να εξισορροπήσει στην αρχική σύσταση.
- Η έλλειψη του απαραίτητου εξοπλισμού σε ορισμένα εργαστήρια.
- Η απαίτηση χρήσης διαλυτών υψηλής καθαρότητας.
- Το πρόβλημα σταθερότητας στην βασική γραμμή, τα οποία εμφανίζονται πιο συχνά απ' ό,τι στην ισοκρατική έκλυση.

Αντλίες HPLC

Οι απαιτήσεις ενός συστήματος άντλησης στην HPLC περιλαμβάνουν :

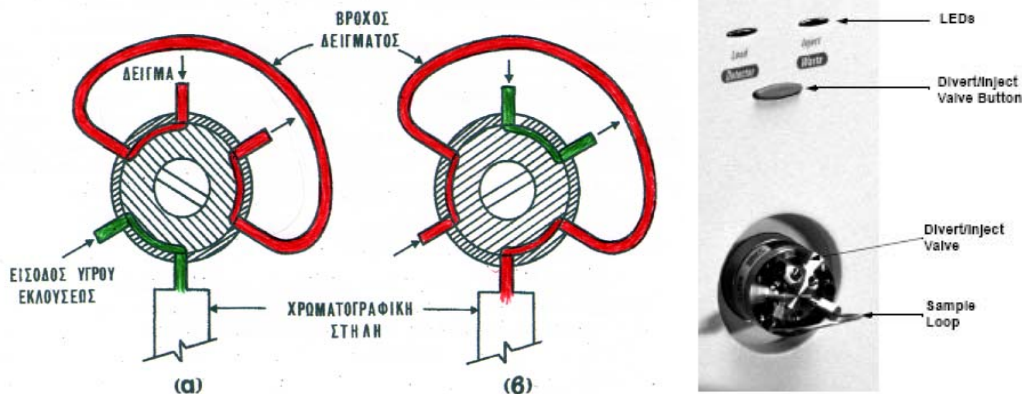
- (1) ανάπτυξη πιέσεων μέχρι 6000 psi,
- (2) απαλλαγή από παλμούς ροής, ώστε να ελαχιστοποιείται ο θόρυβος του ανιχνευτή.
- (3) εύρος ταχυτήτων ροής, κατάλληλων για τους διάφορους τύπους της HPLC που κυμαίνονται από 0,5 έως 10ml/min για συνήθη χρήση και 1 μl/min έως 1ml/min για χρήση μικροστηλών,
- (4) έλεγχο ροής και επαναληψιμότητα ροής 0,5% ή καλύτερη ώστε να διασφαλίζεται επαρκής αναλυτική ακρίβεια,
- (5) τμήματα ανθεκτικά στη διάβρωση από την επαφή με τους διαλύτες.
- (6) μικρούς όγκους συγκράτησης στους θαλάμους της αντλίας, ώστε να είναι επιτρεπτές οι απότομες αλλαγές διαλύτη καθώς και η βαθμιδωτή έκλυση.

Οι υψηλές πιέσεις, από τις αντλίες της HPLC, δεν δημιουργούν κίνδυνο έκρηξης επειδή τα υγρά δεν είναι πολύ συμπιέσιμα. Έτσι η ρήξη ενός τμήματος του συστήματος μπορεί να οδηγήσει μόνο σε διαρροή του διαλύτη. Υπάρχουν τρεις τύποι αντλιών, που ο καθένας έχει τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματά του. Αυτοί είναι : παλινδρομικές αντλίες, αντλίες σύριγγας ή εκτόπισης και αντλίες πνευματικές ή σταθερής πίεσης.

Σύστημα εισαγωγής δείγματος

Ο τρόπος με τον οποίο εισάγονται τα δείγματα στην στήλη, αποτελεί πολλές φορές περιοριστικό παράγοντα στην επαναληψιμότητα των μετρήσεων στην υγρή χρωματογραφία. Μια "κακή" εισαγωγή δείγματος μπορεί να προκαλέσει υπερφόρτωση των στηλών και να έχει ως αποτέλεσμα την διεύρυνση των κορυφών του χρωματογραφήματος. Έτσι, οι όγκοι του δείγματος που εισάγονται πρέπει να είναι όσο το δυνατόν μικρότεροι από μερικές δεκάδες μl έως 500 μl. Σημαντικό είναι επίσης, το δείγμα να εισάγεται με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε να μην

προκαλείται αποσυμπίεση στο σύστημα. Η εισαγωγή του δείγματος μπορεί να γίνει με τρία διαφορετικά συστήματα : α) με μικρισύριγγα, β) με ειδική βαλβίδα εισαγωγής και γ) με αυτόματο δειγματολήπτη. Η πιο συνηθισμένη μέθοδος εισαγωγής του δείγματος στην υγρή χρωματογραφία βασίζεται σε βρόγχους δειγμάτων όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα.



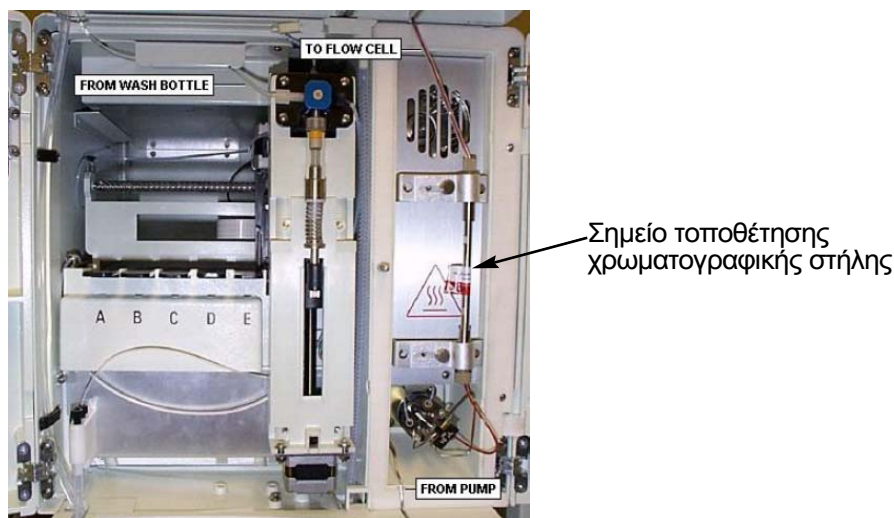
Σχήμα 2.1.2γ : Βρόγχος δειγματοληψίας υγρής χρωματογραφίας. (α) Με τη χειρολαβή της βαλβίδας ο βρόγχος γεμίζει από την σύριγγα και η κινητή φάση ρέει από την αντλία προς την στήλη. (β) Όταν η βαλβίδα τοποθετηθεί στη θέση που δείχνεται στο (β), ο βρόγχος παρεμβάλλεται μεταξύ αντλίας και στήλης, οπότε η κινητή φάση μεταφέρει το δείγμα προς την στήλη.

Οι διατάξεις αυτές αποτελούν συχνά ένα αλληλένδετο τμήμα ενός υγροχρωματογράφου με βρόγχους μεταβλητού όγκου από 5 έως 500 μl. Στους περισσότερους αναλυτικούς προσδιορισμούς χρησιμοποιείται βαλβίδα έξι θέσεων με εξωτερικό βρόγχο όγκου 10-20 μl. Με βρόγχους αυτού του τύπου εισάγονται δείγματα σε πιέσεις μέχρι 7000 psi με επαναληψιμότητα μερικών δεκάτων %. Επίσης είναι διαθέσιμες βαλβίδες έγχυσης για μικροόγκους με βρόγχους δείγματος από 0,5 έως 5 μL.

Αναλυτικές στήλες υγρής χρωματογραφίας

Οι αναλυτικές στήλες της υγρής χρωματογραφίας κατασκευάζονται συνήθως από σωλήνες μικρής διαμέτρου από ανοξείδωτο χάλυβα αν και περιστασιακά χρησιμοποιούνται και γυάλινοι σωλήνες με μεγάλο πάχος τοιχώματος σε πιέσεις μικρότερες από 600 psi. Υπάρχουν πάρα πολλά είδη πακεταρισμένων στηλών που είναι διαθέσιμα στην αγορά, με διαφορετικό μέγεθος και υλικό πλήρωσης. Οι περισσότερες στήλες υγρής χρωματογραφίας έχουν μήκος από 10 έως 30 cm και είναι συνήθως ευθύγραμμες. Περιστασιακά χρησιμοποιούνται σπειροειδείς στήλες αν και λόγω σχήματος η αποτελεσματικότητά τους δεν είναι καλή. Η εσωτερική διάμετρος των στηλών είναι συνήθως 4 έως 10 mm και το μέγεθος σωματιδίων του υλικού πλήρωσης είναι 5 ή 10 μm. Τώρα πλέον υπάρχουν στην αγορά στήλες υγρής χρωματογραφίας υψηλής ταχύτητας με εσωτερικές διαμέτρους από 1 έως 4,6 mm και μέγεθος σωματιδίων υλικού πλήρωσης 3 έως 5 μm. Το μήκος τους είναι μικρό και κυμαίνεται από 3 έως 7,5 cm. Οι στήλες αυτού του τύπου διαθέτουν μέχρι και 100.000

πλάκες/η και προσφέρουν το πλεονέκτημα της ταχύτητας και της ελάχιστης κατανάλωσης διαλύτη.



Σχήμα 2.1.δ. Σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) της κατασκευάστριας εταιρίας Thermo Finnigan (τοποθέτηση χρωματογραφικής στήλης).

Επιλογή στήλης

Μια επιτυχής χρωματογραφική ανάλυση με δραστικές κινητές φάσεις απαιτεί κατάλληλη ισορροπία των ενδομοριακών δυνάμεων μεταξύ των τριών δραστικών παραγόντων, που συμμετέχουν στο μηχανισμό διαχωρισμού δηλαδή, της διαλυμένης ουσίας, της κινητής φάσης και της στατικής φάσης. Αυτές οι διαμοριακές δυνάμεις περιγράφονται ποιοτικά με βάση τη σχετική πολικότητα καθενός από τους τρεις δραστικούς παράγοντες. Συχνά, στην χρωματογραφία κατανομής για την επιλογή μιας στήλης διαχωρισμού, η πολικότητα της στατικής φάσης πρέπει να ταιριάζει αυστηρά με εκείνη των αναλυτών, ενώ για την έκλυση χρησιμοποιείται κινητή φάση με σημαντική διαφορά πολικότητας.

Για να κριθεί μια αναλυτική στήλη κατάλληλη για το σύστημα προσδιορισμού των φυτοφαρμάκων πρέπει να πλήρη τις παρακάτω προϋποθέσεις :

A) να χρωματογραφεί ικανοποιητικά όλες τις υπό μελέτη ουσίες.

B) να παρέχει λεπτές και συμμετρικές κορυφές για όλες τις υπό εξέταση ουσίες.

Αυτό εκτιμάται από τη χρωματογραφική απόδοση (efficiency, N) της στήλης, όπως αυτή εκφράζεται με τον αριθμό των θεωρητικών πλακών και τον συντελεστή ασυμμετρίας (asymmetry factor, as).

Γ) να είναι εκλεκτική μεταξύ βασικών ουσιών που εμφανίζονται συχνά στα προς ανάλυση δείγματα.

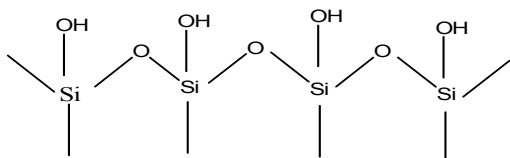
Οι παραπάνω παράγοντες εξαρτώνται, βέβαια, και από την κινητή φάση του χρωματογραφικού συστήματος.

Υλικά πλήρωσης

Στην υγρή χρωματογραφία χρησιμοποιούνται δυο βασικοί τύποι πληρωτικών υλικών, ο πρώτος τύπος αποτελείται από σφαιροειδή σωματίδια και ο δεύτερος από πορώδη. Τα σφαιροειδή σωματίδια αποτελούνται από σφαιρικά, μη πορώδη σωματίδια από ύαλο ή πολυμερές με τυπικές διαμέτρους 30 έως 40 μm . Στην επιφάνεια των σωματιδίων αυτών αποτίθεται λεπτό πορώδες στρώμα όπως SiO_2 , αλουμίνα, συνθετική ρητίνη πολυστυρενίου-διβινυλοβενζολίου ή μια ιονανταλλακτική ρητίνη.

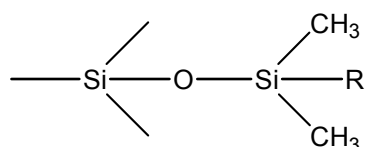
Το υλικό πλήρωσης με βάση τα πορώδη σωματίδια αποτελείται από μικροσωματίδια διαμέτρου 3 έως 10 μm . Τα σωματίδια αποτελούνται από SiO_2 , αλουμίνα, συνθετική ρητίνη πολυστυρενίου-διβινυλοβενζολίου ή ιονανταλλακτική ρητίνη. Το SiO_2 αποτελεί το πιο συνηθισμένο υλικό πλήρωσης στην υγρή χρωματογραφία. Τα σωματίδια του SiO_2 παρασκευάζονται με συσσωμάτωση σωματιδίων SiO_2 μεγέθους μικρότερου από 1 μm σε συνθήκες που οδηγούν στο σχηματισμό μεγαλύτερων σωματιδίων πολύ στενής περιοχής τιμών διαμέτρου. Τα σχηματιζόμενα σωματίδια συχνά καλύπτονται με λεπτά οργανικά στρώματα, που συνδέονται με την επιφάνεια με χημικό ή φυσικό τρόπο.

Στην χρωματογραφία κατανομής συνδεδεμένης φάσης τα υλικά στήριξης για την πλειονότητα των υλικών πλήρωσης παρασκευάζονται από άκαμπτη πυριτία ή σύνθεση που βασίζεται σε πυριτία. Αυτά τα στερεά σχηματίζονται ως ομοιόμορφα, πορώδη και μηχανικώς σκληρά σωματίδια, τα οποία έχουν συνήθως διάμετρο 3,5 ή 10 μm . Η επιφάνεια της πλήρως υδρολυμένης πυριτίας αποτελείται από χημικά ενεργές ομάδες σιλανόλης.



Σχήμα 2.1.2ε. Δομή υδρολυμένης πυριτίας.

Οι πιο χρήσιμες επιστρώσεις για τη χρωματογραφία συνδεδεμένης φάσης είναι τα σιλοξάνια που σχηματίζονται κατά την αντίδραση της υδρολυμένης επιφάνειας με ένα οργανοχλωριωμένο σιλάνιο.



Σχήμα 2.1.2στ. Δομή σιλοξανίου.

Τα υλικά πλήρωσης στην τεχνική συνδεδεμένης φάσης κατατάσσονται ως υλικά αντίστροφης φάσης, όταν η δεσμευόμενη επίστρωση είναι μη πολική και ως κανονικής φάσης, όταν η επίστρωση περιέχει πολικές δραστικές ομάδες. Το μεγαλύτερο ποσοστό των εφαρμογών της HPLC πραγματοποιούνται με στήλες, οι οποίες περιέχουν υλικά πλήρωσης αντίστροφης

φάσης. Συνηθέστερα η ομάδα R του σιλοξανίου των επιστρώσεων είναι μια αλυσίδα C₈ ή μια αλυσίδα C₁₈. Ανεξάρτητα από τις λεπτομέρειες του μηχανισμού κατακράτησης, ένα υλικό επίστρωσης συνδεδεμένης φάσης μπορεί να θεωρηθεί ως ένα συμβατικό, φυσικά κατακρατούμενο υγρό. Οι μεγαλύτερες αλυσίδες παράγουν υλικά πλήρωσης με μεγαλύτερη ικανότητα κατακράτησης. Δηλαδή, υλικό με C₁₈ κατακρατεί διπλάσια ποσότητα ουσίας από ότι ένα υλικό με C₄, το οποίο παρασκευάστηκε σε παρόμοιες συνθήκες.

Στις περισσότερες εφαρμογές της χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης, η έκλουση πραγματοποιείται με κινητή φάση υψηλής πολικότητας, ένα υδατικό διάλυμα που περιέχει διάφορες συγκεντρώσεις πολικών διαλυτών, όπως είναι η μεθανόλη ή το ακετονιτρίλιο. Στα εμπορικά υλικά πλήρωσης κανονικής φάσης το R στη δομή του σιλοξανίου βρίσκεται και μια πολική δραστική ομάδα, όπως κυανοομάδα (-C₂H₄CN), διόλη (-C₃H₆OCH₂CHOHCH₂OH), αμινοομάδα (-C₃H₆NH₂) και διμεθυλοαμινοομάδα (-C₃H₆N(CH₃)₂). Η πολικότητα αυτών των υλικών πλήρωσης ποικίλει σε μια ευρεία κλίμακα, με τις κυανοομάδες να είναι οι λιγότερο πολικές και τις αμινοομάδες οι περισσότερες πολικές.

Ανιχνευτές

Οι ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται στην HPLC πρέπει να λειτουργούν με υψηλή ακρίβεια, ευαισθησία και σταθερότητα. Ο ιδανικός ανιχνευτής πρέπει να έχει όλες τις ιδιότητες που περιγράφονται παρακάτω :

1. Ικανοποιητική ευαισθησία. Γενικά οι ευαισθησίες των σύγχρονων ανιχνευτών κυμαίνονται από 10⁻⁸ έως 10⁻¹⁵ g ουσίας/s.
2. Σταθερότητα και αναπαραγωγιμότητα.
3. Γραμμική απόκριση επεκτεινόμενη σε περιοχή αρκετών τάξεων μεγέθους, ώστε να μπορεί να πραγματοποιηθεί ικανοποιητική ποσοτική ανάλυση.
4. Κατάλληλη περιοχή θερμοκρασιών λειτουργίας.
5. Σύντομους χρόνους απόκρισης ανεξάρτητους από την ταχύτητα ροής, ώστε να μπορεί να καταγράφει τις κορυφές που εκκλύονται γρήγορα.
6. Εξαιρετική αξιοπιστία και ευκολία στη χρήση.
7. Παρόμοια απόκριση προς όλες τις διαχωριζόμενες ουσίες ή εξαιρετικά προβλέψιμη και εκλεκτική απόκριση για μια ή περισσότερες ομάδες ενώσεων.
8. Να μην καταστρέφει το δείγμα.

Επιπλέον ένας ανιχνευτής HPLC πρέπει να έχει τον ελάχιστο δυνατό εσωτερικό όγκο για να περιορίζεται η διεύρυνση των κορυφών του χρωματογραφήματος.

Στην πραγματικότητα είναι πολύ δύσκολο ένας ανιχνευτής να πληρή όλες τις παραπάνω προϋποθέσεις. Υπάρχουν όμως σήμερα, παρ' όλα αυτά αρκετοί τύποι ανιχνευτών οι οποίοι επιτρέπουν ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών.

Υπάρχουν τρεις βασικοί τύποι ανιχνευτών υγρής χρωματογραφίας.

- Αυτοί που ανταποκρίνονται σε μια βασική ιδιότητα της κινητής φάσης, όπως ο δείκτης διάθλασης, η διηλεκτρική σταθερά ή η πυκνότητα, οι τιμές των οποίων επηρεάζονται από την παρουσία των εκλουόμενων συστατικών.
 - Αυτοί που αποκρίνονται σε ιδιότητα του εκλουόμενου συστατικού την οποία δεν πρέπει να διαθέτει η κινητή φάση, όπως είναι η απορρόφηση στο υπεριώδες, ο φθορισμός ή το ρεύμα διάχυσης.
 - Τέλος υπάρχουν και οι ανιχνευτές οι οποίοι διαχωρίζουν το δείγμα από το εκλουστικό, πριν από την ανίχνευση, όπως είναι οι φασματογράφοι μαζών.
- Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε ως ανιχνευτής ο φασματογράφος μάζας.

Ανιχνευτής φασματομετρίας μαζών

Ένας φασματογράφος μάζας έχει την δυνατότητα :

- διάκρισης των κορυφών που μας ενδιαφέρουν από τις κορυφές ενώσεων που δεν είναι τόσο σημαντικές ή που οφείλονται σε παρεμποδίσεις,
- ανίχνευσης και ταυτοποίησης μεμονωμένων κορυφών του χρωματογραφήματος μεταξύ πειραμάτων,
- Και την αναγνώριση μη επιθυμητών και επικαλυπτόμενων κορυφών, που οφείλονται σε παρεμποδίσεις, ώστε να αποφευχθούν λάθη κατά την ανάπτυξη της μεθόδου.

Τα φασματόμετρα μαζών αποτελούνται από τα εξής μέρη : α) την πηγή ιόντων, β) τον αναλυτή μάζας και γ) τον ανιχνευτή.

Στις τεχνικές φασματομετρίας μαζών η ένωση που πρόκειται να προσδιοριστεί πρώτα ιονίζεται στην πηγή ιόντων. Τα ιόντα με συγκεκριμένο λόγο μάζας/φορτίου, (m/z), διαχωρίζονται και εστιάζονται στον αναλυτή μάζας. Η τελική, εστιασμένη ακτίνα προσκρούει στον ανιχνευτή, ο οποίος με την σειρά του προσδιορίζει την ένταση της ακτίνας.

Οι διάφορες τεχνικές MS που εφαρμόζονται στην HPLC διαφοροποιούνται από την επιλογή της πηγής ιόντων. Οι πηγές ιόντων, δηλαδή οι μέθοδοι ιοντισμού που μπορούν να χρησιμοποιηθούν είναι : ο ιονισμός ηλεκτρονίων (Electron Ionization, EI), ο χημικός ιονισμός (Chemical Ionization, CI), ο χημικός ιονισμός υπό ατμοσφαιρική πίεση (Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI), ο βομβαρδισμός ατόμων (Fast Atom Bombardment, FAB), ο ηλεκτροψεκασμός (Electro-Spray Ionization, ESI), ο θερμοψεκασμός (Thermo-Spray, TSP) κ.α. . Η πηγή ιόντων που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία είναι ο ηλεκτροψεκασμός.

Οι αναλυτές μάζας μπορεί να είναι μαγνητικής εκτροπής, μαγνητικού/ηλεκτροστατικού τομέα, τετραπολικό αναλυτές (quadrupole), αναλυτές παγίδας ιόντων (ion trap), αναλυτές χρόνου πτήσης (time of flight) κ.α. Ο αναλυτής μάζας που χρησιμοποιείται πιο συχνά στην σύζευξη HPLC-MS, είναι ο τετραπολικός αναλυτής. Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε ο τετραπολικός αναλυτής.

Σύστημα καταγραφής αποτελεσμάτων

Τα καταγραφικά συστήματα αναλύουν και καταγράφουν τα ηλεκτρικά σήματα του ανιχνευτή με τη μορφή χρωματογραφημάτων. Τα χρωματογραφήματα μπορούν να καταγραφούν είτε με απλό καταγραφικό σύστημα, είτε με ολοκληρωτή ή με ηλεκτρονικό υπολογιστή. Γενικά ο έλεγχος και η αποθήκευση δεδομένων στους ανιχνευτές φασματομετρίας μαζών πραγματοποιείται με ηλεκτρονικό υπολογιστή. Με τον τρόπο αυτό λαμβάνονται χρωματογραφήματα και φάσματα των εκλούμενων συστατικών και υπάρχει η δυνατότητα αποθήκευσης των χρωματογραφημάτων στην μνήμη για περαιτέρω επεξεργασία τους και ταυτόχρονα η δυνατότητα παρέμβασης στον τρόπο ολοκλήρωσης, πράγμα που είναι πολύ σημαντικό όταν αναλύονται πολύπλοκα δείγματα σε αναλύσεις ρουτίνας.

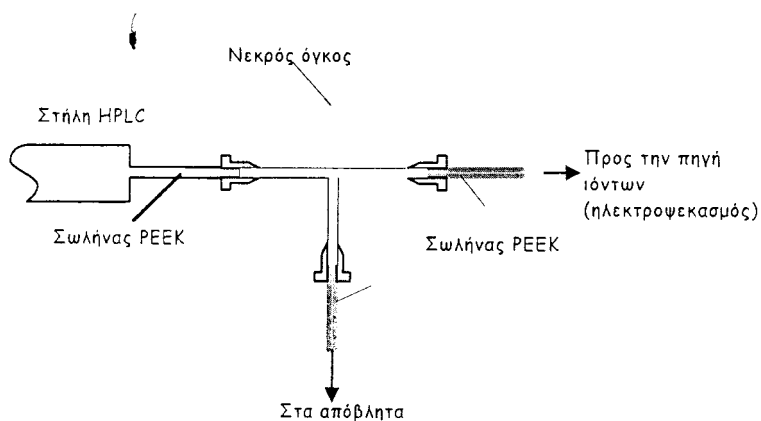
2.1.3. ΣΥΣΤΗΜΑ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ ΜΕ ΗΛΕΚΤΡΟΨΕΚΑΣΜΟ ΚΑΙ ΔΙΑΔΟΧΙΚΗ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ (HPLC -ESI- MS/MS) (Thermo Finnigan, TSQ Quantum Course-Supelco, 1998).

Το σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) που χρησιμοποιείται στην παρούσα διατριβή είναι της κατασκευάστριας εταιρίας Thermo Finnigan (San Jose, USA).

Το σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης αποτελείται από μια αντλία (HPLC Pump) και ένα αυτόματο δειγματολήπτη (Surveyor AS, Thermo Finnigan).

Η ανάλυση των συστατικών του δείγματος γίνεται με υγρή χρωματογραφία αντίστροφης φάσης, χρησιμοποιώντας αναλυτική στήλη PerfectSil 120 C₈ (Analysentechnik, Germany), μήκους 12,5 cm, εσωτερικής διαμέτρου 2.1 mm, με υλικό πλήρωσης μεγέθους 3μm, στους 30 °C και ταχύτητα ροής 150 μl/min. Ο εισαγόμενος όγκος επιλέχθηκε στα 20 μl. Η έκλυση των συστατικών του δείγματος από την αναλυτική στήλη πραγματοποιείται ισοκρατικά, με αναλογία μεθανόλης υπερκάθαρου νερού 95/5 και 5mM οξικού αμμωνίου.

Μετά την έκλυση των συστατικών του δείγματος από την αναλυτική στήλη και πριν την εισαγωγή τους στον ηλεκτροψεκασμό παρεμβάλλεται ένας διακλαδωτής ροής (post-column flow-splitting device).



Σχήμα 2.1.3α. Διακλαδωτής ροής (Thermo Finnigan)

Ο διακλαδωτής ροής είναι ένα βοηθητικό εξάρτημα σε σχήμα T, που επιτρέπει στο 28,7% του εκλούσματος να συνεχίσει την ροή του προς τον ηλεκτροψεκασμό, ενώ το υπόλοιπο μέρος καταλήγει στα απόβλητα. Αυτό συμβαίνει γιατί η ταχύτητα ροής του δείγματος επηρεάζει την αποδοτικότητα του ηλεκτροψεκασμού. Μικρές ταχύτητες ροής βελτιώνουν την ποιότητα του συστήματος και την απόδοση του ηλεκτροψεκασμού, με τελικό αποτέλεσμα την αύξηση της ευαισθησίας της μεθόδου φασματομετρίας μάζας (Gaskell, 1997).

Η εισαγωγή όλων των πρότυπων διαλυμάτων καθώς και των δειγμάτων στην χρωματογραφική στήλη γίνεται από μια βαλβίδα 6 εισόδων εισαγωγής δείγματος (Rheodyne), η οποία φέρει βρόγχο εισαγωγής δείγματος (loop) όγκου 20 μ l.

Τεχνική ηλεκτροψεκασμού

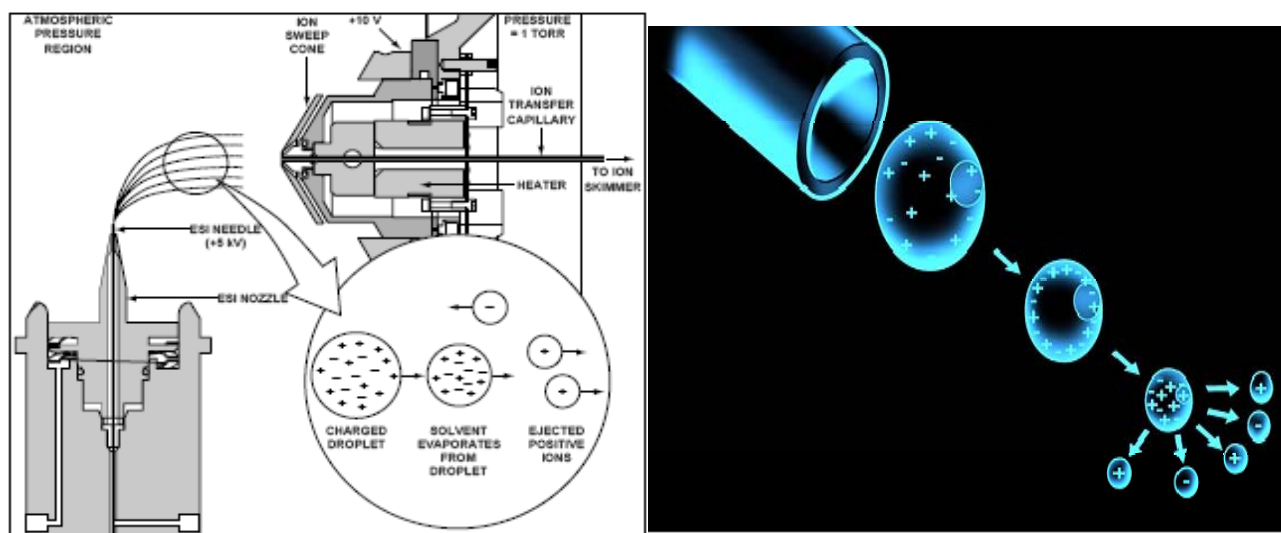
Στην παρούσα εργασία αναπτύχθηκε μια μέθοδος η οποία βασίζεται στην τεχνική του ηλεκτροψεκασμού σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας. Η φασματομετρία μαζών με ιοντισμό με ηλεκτροψεκασμό (electrospray ionization / mass spectrometry, ESI/MS) περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1984 και σήμερα αποτελεί μια από τις σημαντικότερες τεχνικές για μετρήσεις πολικών ενώσεων, βιομορίων, όπως πολυπεπτίδια, πρωτεΐνες και ολιγονουκλεοτίδια με μοριακά βάρη ≥ 100.000 Da. Επίσης, καθιστά δυνατή την ανάλυση θερμικά ασταθών ενώσεων, οι οποίες παρουσιάζουν προβλήματα στην ανάλυσή τους με τη συνήθη τεχνική της φασματομετρίας μάζας. Επιπλέον, η τεχνική αυτή έχει αρχίσει να βρίσκει εφαρμογές στον χαρακτηρισμό ανόργανων ουσιών και συνθετικών πολυμερών.

Ο ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό πραγματοποιείται σε ατμοσφαιρική πίεση και θερμοκρασία, σε μια συσκευή όπως αυτή που φαίνεται στο παρακάτω σχήμα.

Η τεχνική του ηλεκτροψεκασμού χωρίζεται σε τρία στάδια :

- α. στο σχηματισμό σταγόνας
- β. στη συρρίκνωση της σταγόνας και
- γ. στην παραγωγή ιόντων στην αέρια φάση.

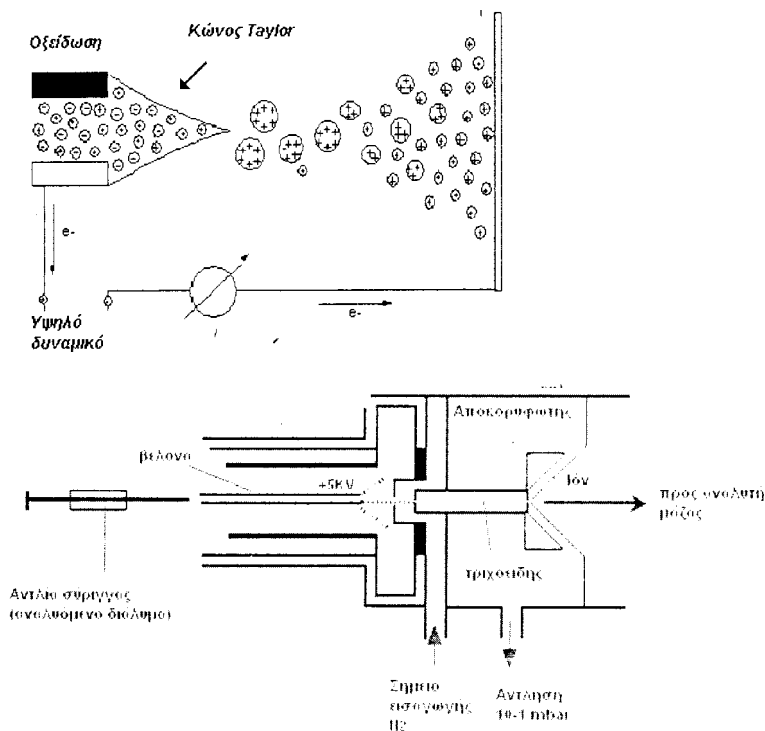
Το διάλυμα της προσδιοριζόμενης ένωσης αντλείται μέσω μιας ανοξειδωτής τριχοειδούς βελόνας με ταχύτητα μερικών $\mu\text{L}/\text{min}$. Το διάλυμα του δείγματος εξέρχεται από την βελόνα του ηλεκτροψεκασμού, όπου εφαρμόζεται ισχυρό ηλεκτρικό πεδίο για να διατηρείται η άκρη της βελόνας του ηλεκτροψεκασμού σε αρκετά υψηλή τάση. Όταν το διάλυμα έρθει σε επαφή με το ισχυρό ηλεκτρικό πεδίο σχηματίζει νέφος σταγόνων που είναι ισχυρά φορτισμένες στην επιφάνειά τους. Στην παρούσα εργασία εφαρμόζεται θετικό δυναμικό, έτσι τα εντός του διαλύματος θετικά ιόντα που βρίσκονται μέσα στο διάλυμα συσσωρεύονται στην επιφάνεια με τέτοιο τρόπο ώστε να σχηματίζουν ένα κώνο (Taylor cone). Σε αρκετά ισχυρό πεδίο, ο κώνος παράγει θετικά φορτισμένες σταγόνες όταν η εφαρμοζόμενη ηλεκτροστατική δύναμη υπερβεί την επιφανειακή τάση του διαλύτη. Η διάμετρος της σταγόνας εξαρτάται από το εφαρμοζόμενο δυναμικό, την ταχύτητα ροής του διαλύματος και τη φύση του διαλύτη. Το νέφος σταγόνων κατευθυνόμενο προς τον αναλυτή μαζών διασχίζει μια βαθμιδωτή μεταβολή της πίεσης και λαμβάνει χώρα η εξάτμιση του διαλύτη από τις αρχικά σχηματιζόμενες σταγόνες, η οποία επιφέρει μείωση στην διάμετρο της σταγόνας και ταυτόχρονη αύξηση της πυκνότητας φορτίου στην επιφάνεια των σταγόνων. Η πυκνότητα του φορτίου στην επιφάνεια κάθε σταγόνας αυξάνει συνεχώς μέχρι ενός κρίσιμου σημείου, γνωστό ως όριο Rayleigh. Σε αυτό το κρίσιμο σημείο, πραγματοποιείται η σχάση της σταγόνας (σχάση Coulomb) σε μικρότερα σταγονίδια για το λόγο ότι η ηλεκτροστατική άπωση έχει υπερβεί την επιφανειακή τάση που κρατάει ενωμένη την σταγόνα. Έπειτα λαμβάνει χώρα περαιτέρω εξάτμιση του διαλύτη και σχάσεις μέχρι το σχηματισμό πολύ μικρών σταγονιδίων από τα οποία εκτινάσσονται τα ιόντα της υπό μελέτη ένωσης στην αέρια κατάσταση λόγω ηλεκτροστατικής άπωσης.



Σχήμα 2.1.3β. Διαδικασία ηλεκτροψεκασμού σε θετικό δυναμικό.

Για την ευκολότερη εκνέφωση του διαλύματος καθώς αυτό εξέρχεται από την βελόνα ηλεκτροψεκασμού, συνήθως διαβιβάζεται ένα αέριο εκνέφωσης (sheath gas). Παράλληλα, το αέριο αυτό διευκολύνει και την εξάτμιση του διαλύτη από τις σταγόνες (auxiliary gas). Στην

παρούσα αναλυτική μέθοδο, ως αέριο ξήρανσης (βοηθητικό αέριο, auxiliary gas) καθώς και ως αέριο εκνέφωσης (sheath gas) χρησιμοποιήθηκε άζωτο υψηλής καθαρότητας 99% που παράγεται από γεννήτρια αζώτου. Στην γεννήτρια αζώτου παράγεται αέρας από ένα αεροσυμπιεστή (Compressor) όπου διατηρείται ο αέρας υπό ατμοσφαιρική πίεση. Η πίεση του αερίου εκνέφωσης έχει επιλεγεί στην τιμή των 20 p.s.i. και του βοηθητικού αερίου στην τιμή των 25 αυθαίρετων μονάδων.



Σχήμα 2.1.3γ. Σχηματική παράσταση σπουδαιότερων φαινομένων τα οποία συμβαίνουν κατά τον ηλεκτροψεκασμό (Stephanou, 2004).

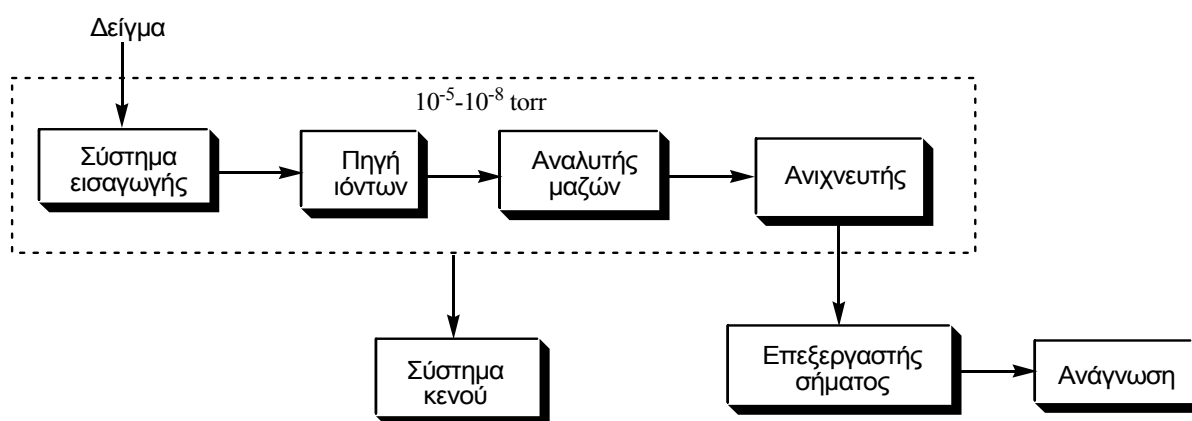
Στα υπόλοιπα τμήματα εφαρμόζεται θετική πολικότητα (θετικά ιόντα), ενώ το εφαρμοζόμενο δυναμικό στην βελόνα ηλεκτροψεκασμού (spray voltage) αντιστοιχεί στην τιμή των 5000 Volt. Τέλος η θερμοκρασία στον θερμαινόμενο τριχοειδή (capillary temperature) ρυθμίζεται στους 346 °C. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται συνοπτικά οι τιμές των παραμέτρων των συνθηκών του ηλεκτροψεκασμού που χρησιμοποιήθηκαν.

Πίνακας 2.1.3α. Τιμές παραμέτρων των συνθηκών ηλεκτροψεκασμού που χρησιμοποιήθηκαν.

	Τιμή
Εφαρμοζόμενο δυναμικό στην Βελόνα ηλεκτροψεκασμού (V)	5000
Πίεση αερίου εκνέφωσης	20
Πίεση αερίου ξήρανσης (units)	25
Θερμοκρασία τριχοειδή (°C)	346

Φασματομετρία μάζας

Σήμερα χρησιμοποιούνται διάφοροι τύποι οργάνων για φασματομετρικές μετρήσεις μοριακών μαζών. Στο σύστημα που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή την μέθοδο χρησιμοποιήθηκε ο τετραπολικός αναλυτής μαζών. Στο παρακάτω συνοπτικό διάγραμμα παρουσιάζονται τα κύρια τμήματα του φασματομέτρου μαζών.



Σχήμα 2.1.3δ. Τμήμα ενός φασματομέτρου μαζών.

Ο σκοπός του συστήματος εισόδου είναι να αφήνει ένα πολύ μικρό ποσό του δείγματος να εισέρχεται στο φασματόμετρο μαζών, όπου τα συστατικά του μετατρέπονται σε ιόντα σε αεριώδη κατάσταση. Όπως περιγράφηκε παραπάνω η *πηγή ιόντων του ηλεκτροψεκασμού* μετατρέπει τα συστατικά του δείγματος σε ιόντα. Σε πολλές περιπτώσεις σύστημα εισαγωγής και πηγή ιόντων συνδυάζονται σε μια ενιαία μονάδα. Σε άλλες περιπτώσεις, η έξοδος είναι ένα ρεύμα ιόντων, τα οποία επιταχύνονται προς τον αναλυτή μαζών.

Η λειτουργία του αναλυτή μαζών βασίζεται στο λόγο μάζας προς φορτίο (m/z) των ιόντων της ουσίας. Τα φασματόμετρα μαζών διακρίνονται σε διάφορες κατηγορίες ανάλογα με τον τύπο του αναλυτή μαζών. Στο φασματόμετρο μαζών περιλαμβάνεται ένας *μεταλλάκτης* (για τα ιόντα), που μετατρέπει την δέσμη των ιόντων σε ηλεκτρικό σήμα. Στο μέθοδο που εφαρμόσαμε ο μεταλλάκτης είναι ένας ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής. Γενικά οι ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστές είναι αξιόπιστοι και ανθεκτικοί στη χρήση. Παρέχουν υψηλή

ενίσχυση ρεύματος και χαρακτηρίζονται από χρόνους απόκρισης της τάξης του ns (10^{-9} s). Μπορούν να χρησιμοποιηθούν με αναλυτές μαζών στους οποίους εισάγονται δέσμες ιόντων χαμηλής κινητικής ενέργειας όπως είναι οι τετραπολικοί αναλυτές. Σε αυτή την περίπτωση τα ιόντα μετά την έξοδό τους από τον αναλύτη, επιταχύνονται τόσο, ώστε να αποκτήσουν κινητική ενέργεια πολλών χιλιάδων ηλεκτρονιοβολτ (eV) πριν προσκρούσουν στην πρώτη επιφάνεια του μεταλλάκτη. Το ηλεκτρικό σήμα που προκύπτει από την μετατροπή της δέσμης των ιόντων από το μεταλλάκτη στη συνέχεια, μπορεί να υποβληθεί σε επεξεργασία, να αποθηκευτεί στην μνήμη του υπολογιστή και να παρουσιασθεί ή να καταγραφεί με ποικίλους τρόπους. Στα σύγχρονα φασματομέτρα μαζών οι μικροϋπολογιστές και οι μικροεπεξεργαστές αποτελούν αναπόσπαστο μέρος. Ένα χαρακτηριστικό του φάσματος μαζών είναι η αφθονία των δομικών πληροφοριών που παρέχει. Για παράδειγμα, ένα μόριο με μοριακό βάρος 500, μπορεί να τεμαχιστεί με μια δέσμη ηλεκτρονίων σε 100 ή περισσότερα διαφορετικά ιόντα, καθένα από τα οποία δημιουργεί μια ευδιάκριτη φασματική κορυφή. Για ένα δομικό προσδιορισμό, πρέπει να προσδιοριστούν, να αποθηκευτούν και τελικά να παρουσιαστούν τα ύψη και οι τιμές m/z για κάθε κορυφή. Επειδή η ποσότητα των πληροφοριών είναι πολύ μεγάλη, είναι απαραίτητη η ταχεία συλλογή και επεξεργασία των δεδομένων, διαδικασίες για τις οποίες η χρήση υπολογιστή είναι ιδανική. Επιπλέον, για την ορθή χρήση των φασμάτων μαζών, πρέπει κατά την διάρκεια της συλλογής των δεδομένων, να ελέγχονται ή να παρακολουθούνται προσεκτικά διάφορες οργανολογικές παράμετροι. Οι υπολογιστές και οι μικροεπεξεργαστές είναι πολύ περισσότερο αποτελεσματικοί από τον ανθρώπινο χειρισμό για τους ελέγχους αυτούς. Τα βασικά χαρακτηριστικά για όλα τα σύγχρονα όργανα είναι κυρίως δυο. Το πρώτο είναι ένας υπολογιστής που χρησιμοποιείται ως κύριος ρυθμιστής οργάνου. Ο χειριστής επικοινωνεί με το όργανο μέσω ενός πληκτρολογίου και επιλέγει τις παραμέτρους και τις συνθήκες λειτουργίας, μέσω ενός εύχρηστου λογισμικού. Ο υπολογιστής ελέγχει επίσης τα προγράμματα που είναι υπεύθυνα για την επεξεργασία και την παρουσίαση των δεδομένων. Το δεύτερο χαρακτηριστικό είναι μια ομάδα μικροεπεξεργαστών, ο καθένας από τους οποίους είναι υπεύθυνος για τον έλεγχο συγκεκριμένων τμημάτων του οργάνου. Η σύνδεση μεταξύ ενός φασματομέτρου μαζών και ενός υπολογιστή συνήθως παρέχει την δυνατότητα ψηφιοποίησης του ενισχυμένου ιοντικού ρεύματος, καθώς και διαφόρων άλλων σημάτων που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο των οργανολογικών παραμέτρων, όπως είναι η θερμοκρασία της πηγής, η τάση επιτάχυνσης, η ταχύτητα σάρωσης και η ένταση του μαγνητικού πεδίου ή τα δυναμικά που εφαρμόζονται στους τετραπολικούς αναλυτές.

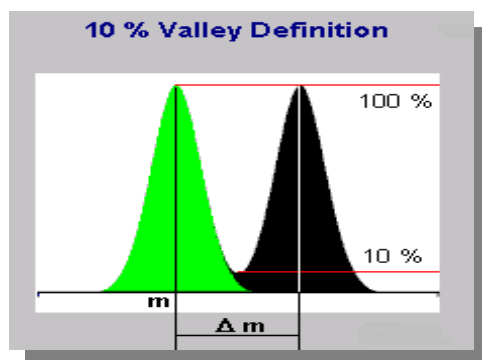
Τα φασματομέτρα μαζών απαιτούν την λειτουργία ενός πολύπλοκου συστήματος κενού για να διατηρεί χαμηλή πίεση (10^{-4} - 10^{-8} torr) σε όλα τα τμήματα του οργάνου, εκτός από το τμήμα του επεξεργαστή του σήματος και του οργάνου παρουσίασης των ενδείξεων. Το υψηλό κενό

είναι απαραίτητο, επειδή τα φορτισμένα σωματίδια, συμπεριλαμβανομένων και των ηλεκτρονίων, αλληλεπιδρούν με τα συστατικά της ατμόσφαιρας και καταστρέφονται.

Αναλυτής μαζών τετραπόλου

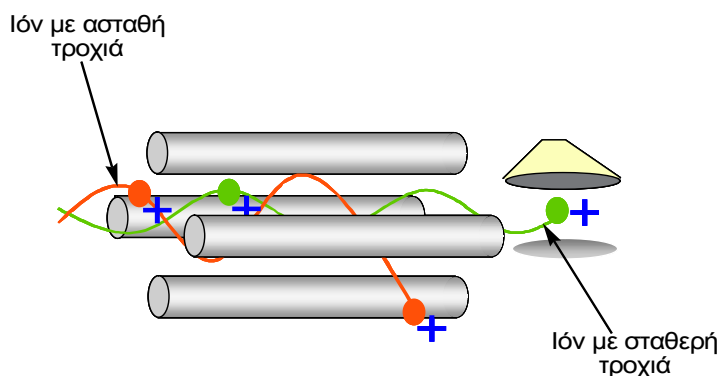
Για το διαχωρισμό ιόντων με διαφορετικούς λόγους μάζας - προς- φορτίο διατίθενται διάφορες διατάξεις. Ο ιδανικός αναλυτής μαζών πρέπει να διαχωρίζει μάζες που διαφέρουν ελάχιστα μεταξύ τους. Επιπλέον, ο αναλυτής πρέπει να επιτρέπει τη διέλευση αρκετών ιόντων, ώστε να παραχθεί ένα άμεσα μετρήσιμο ρεύμα ιόντων. Οι δυο ιδιότητες αυτές δεν είναι απόλυτα συμβατές και πρέπει πάντα να γίνονται σχεδιαστικοί συμβιβασμοί.

Η ικανότητα ενός φασματομέτρου μαζών να διαχωρίζει μάζες αναφέρεται συνήθως ως *διακριτική ικανότητα* R και ορίζεται από τη σχέση $R = m / \Delta m$, όπου Δm είναι η διαφορά μαζών μεταξύ δυο μόλις διαχωριζόμενων κορυφών και m είναι η τιμή της μάζας της πρώτης κορυφής. Δυο κορυφές θεωρείται ότι διαχωρίζονται, όταν η επικάλυψή τους δεν υπερβαίνει ένα δεδομένο κλάσμα του ύψους τους (συνήθως 10%). Η απαιτούμενη διακριτική ικανότητα ενός φασματομέτρου μαζών εξαρτάται από τις εφαρμογές του.



Σχήμα 2.1.3ε. Σχηματική απεικόνιση της διακριτική ικανότητας μεταξύ δυο διαχωριζόμενων κορυφών.

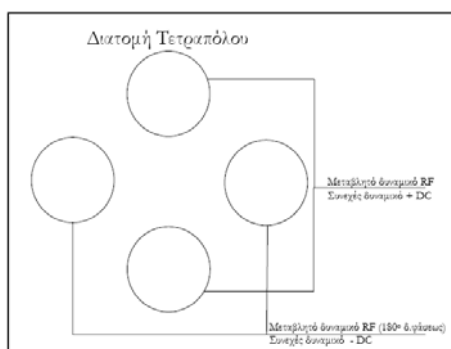
Ο τετραπολικός αναλυτής μαζών αποτελεί τον συνηθέστερο τύπο φασματομέτρου μαζών.



Σχήμα 2.1.3στ. Σχηματική αναπαράσταση τετραπόλου.

Το όργανο αυτό έχει μικρό μέγεθος, μικρότερο κόστος και είναι μηχανικά ανθεκτικότερο από τους περισσότερους τύπους φασματομέτρων μαζών. Επίσης έχει το πλεονέκτημα των υψηλών ταχυτήτων σάρωσης, ώστε ολόκληρο το φάσμα μαζών να λαμβάνεται σε χρόνο μικρότερο των 100 ms.

Το τετράπολο αποτελείται από τέσσερις παράλληλες κυλινδρικές ράβδοι, οι οποίες δρουν ως ηλεκτρόδια. Οι διαγώνιες ράβδοι συνδέονται ηλεκτρικά μεταξύ τους. Το ένα ζεύγος συνδέεται με τον θετικό πόλο μιας συνεχής τάσης DC, ενώ το άλλο με τον αρνητικό πόλο της πηγής. Επιπλέον σε κάθε ζεύγος ράβδων εφαρμόζονται μεταβλητές τάσεις AC (με συχνότητα στην περιοχή των ραδιοσυχνοτήτων), που μεταξύ τους βρίσκονται σε διαφορά φάσης 180° .



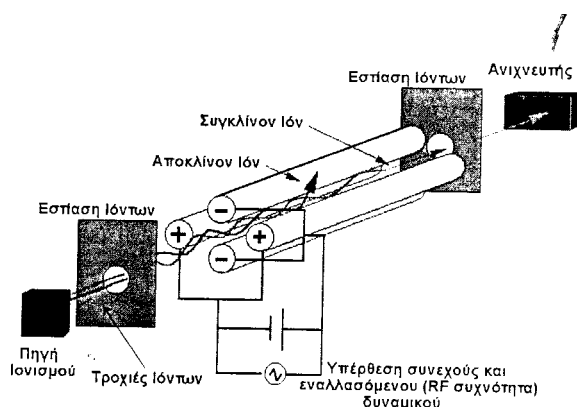
Σχήμα 2.1.3ζ. Ζεύγη ράβδων τετραπόλου.

Για να ληφθεί το φάσμα μαζών με αυτή τη συσκευή, τα ιόντα επιταχύνονται στο χώρο ανάμεσα στις ράβδους με ένα δυναμικό 5 έως 10 V. Τα εναλλασσόμενα και συνεχή δυναμικά των ράβδων αυξάνουν συγχρόνως διατηρώντας όμως το λόγο τους σταθερό. Σε κάποια χρονική στιγμή όλα τα ιόντα, εκτός από αυτά που έχουν μια συγκεκριμένη τιμή λόγου m/z , φθάνουν στις ράβδους και μετατρέπονται σε ουδέτερα μόρια. Έτσι φτάνουν στο μεταλλάκτη μόνο τα ιόντα, των οποίων οι τιμές των λόγων m/z βρίσκονται σε μια στενή περιοχή τιμών του λόγου m/z (Skoog, 2002).

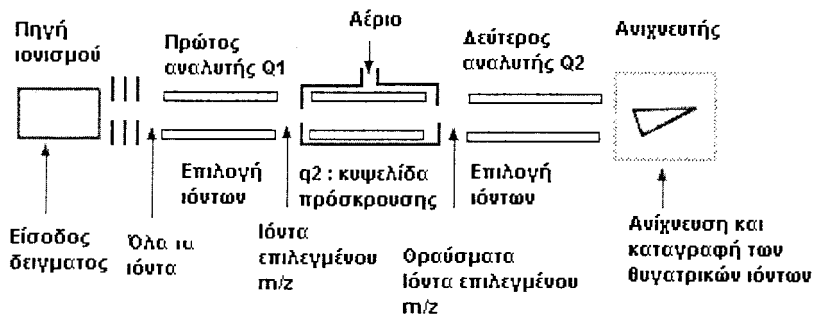
Πιο αναλυτικά, δυο θετικά φορτισμένα σωματίδια διέρχονται μέσω του τετραπόλου παρουσία μόνο εναλλασσόμενου ρεύματος, είτε θα συγκλίνουν στο κέντρο όταν οι δυο πόλοι είναι φορτισμένοι θετικά, είτε θα πλησιάζουν στους πόλους όταν αυτοί είναι φορτισμένοι αρνητικά. Αν κάποιο ιόν χτυπήσει στον αντίθετα φορτισμένο πόλο, αποφορτίζεται και ως ουδέτερο μόριο, απομακρύνεται από το σύστημα κενού. Με την παράλληλη εφαρμογή θετικού συνεχούς ρεύματος σε κάθετο επίπεδο ως προς το εναλλασσόμενο ρεύμα, ιόντα με μεγάλη μάζα θα ανταποκριθούν σχετικά αργά στις αλλαγές του εναλλασσόμενου ρεύματος. Αντίθετα ελαφρύτερα μόρια λόγω αδράνειας μάζας, εκτρέπονται της πορείας τους και προσκρούουν στους αντίθετα φορτισμένους πόλους. Άρα οι θετικοί πόλοι λειτουργούν ως φίλτρα που δεν επιτρέπουν σε ιόντα με λόγο m/z χαμηλότερο από τον καθορισμένο, να περάσουν το τετράπολο. Εξετάζοντας τώρα τους αρνητικούς πόλους, απουσία εναλλασσόμενου ρεύματος, τα θετικά ιόντα θα συγκλίνουν προς αυτούς που προσκρούουν και εξουδετερώνονται. Η

παράλληλη εφαρμογή του εναλλασσόμενου ρεύματος, αντισταθμίζει την κίνηση αυτή των ελαφρύτερων ιόντων, όμως τα βαρύτερα ιόντα τελικά εξουδετερώνονται στους πόλους και έτσι οι αρνητικοί πόλοι, λειτουργούν ως φίλτρα υψηλών μαζών. Ο κατάλληλος συνδυασμός των δυο τάσεων επιτρέπει τελικά σε ιόντα συγκεκριμένου μόνο λόγου m/z να περάσουν το τετράπολο κινούμενα σε ελικοειδείς τροχιές και να φτάσουν στον ανιχνευτή. Η σάρωση των δυναμικών του εναλλασσόμενου και του συνεχούς ρεύματος σε ένα τετραπολικό αναλυτή, με σταθερό λόγο περίπου 6, ξεκινάει από τιμές μηδέν και φτάνει ως μια μέγιστη τιμή ($\pm 250V$ για το συνεχές και $\pm 1500V$ για το εναλλασσόμενο). Κάθε ζεύγος τιμών δυναμικού συνεχούς και εναλλασσόμενου ρεύματος, αντιστοιχεί και σε μια τιμή m/z η οποία θα περάσει από το τετράπολο.

Το δείγμα εισάγεται στην πηγή ιοντισμού και τα ιόντα επιταχύνονται και οδηγούνται στο πρώτο στάδιο ανάλυσης ή στον διαχωριστή μητρικού ιόντος που είναι συνήθως ένα τετραπολικό φίλτρο. Τα διαχωρισμένα ιόντα με μεγάλες πλέον ταχύτητες οδηγούνται στο τετράπολο 2, το οποίο είναι ένας θάλαμος προσκρούσεων, όπου συμβαίνει περαιτέρω ιοντισμός των μητρικών ιόντων που παράγονται στο Q_1 . Αυτό το τετράπολο λειτουργεί μόνο με ραδιοσυχνότητες, δηλαδή δεν εφαρμόζεται συνεχές δυναμικό μεταξύ των ράβδων. Αυτός ο τρόπος λειτουργίας παρέχει έναν αποτελεσματικό τρόπο εστίασης των σκεδαζόμενων ιόντων, αλλά δεν λειτουργεί ως φίλτρο μαζών. Στο θάλαμο αυτό εισάγεται αργό υψηλής καθαρότητας (99,999%) που περιέχεται σε μεταλλική ανοξειδωτή φιάλη και η πίεση έχει ρυθμιστεί στο 1mTorr. Εδώ συνεχίζεται ο ιοντισμός ως αποτέλεσμα των προσκρούσεων των μητρικών ιόντων μεγάλων ταχυτήτων και των ατόμων αργού. Τα παραγόμενα θυγατρικά ιόντα εισέρχονται στο τρίτο τετράπολο (Q_2), όπου σαρώνονται και καταγράφονται. Παρακάτω φαίνεται μια σχηματική αναπαράσταση του τετραπόλου και φασματομέτρου μαζών με τρία τετράπολα αντίστοιχα (Stephanou, 2004).



Σχήμα 2.1.3η. Σχηματική αναπαράσταση τετραπόλου (Stephanou, 2004).



Σχήμα 2.1.3θ. Σχηματική αναπαράσταση φασματομέτρου μαζών με τρία τετράπολα (Stephanou, 2004).

Η μέθοδος που αναπτύχθηκε στην παρούσα εργασία για των προσδιορισμό υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων στο κρασί στηρίζεται στην παρακολούθηση 18 μεταβάσεων μάζας (MS-MS transitions) στην διάρκεια της ισοκρατικής έκλουσης του δείγματος. Το είδος της σάρωσης που χρησιμοποιήθηκε ήταν η παρακολούθηση χαρακτηριστικών αντιδράσεων (SRM, Selected Reaction Monitoring), όπου παρακολουθείτε η θραύση 9 πρόδρομων ιόντων. Η τεχνική της παρακολούθησης μιας χαρακτηριστικής αντίδρασης (SRM), η οποία εφαρμόσθηκε στην εργασία αυτή αναπτύσσεται αναλυτικά πιο κάτω. Η προτεινόμενη μέθοδος περιλαμβάνει 18 γεγονότα σάρωσης (scan events). Κάθε σάρωση προγραμματίζεται ξεχωριστά για τις παραμέτρους λειτουργίας της.

Οι βέλτιστες τιμές ενέργειας πρόσκρουσης (collision energy) και δυναμικού κυλινδρικού φακού (Tube Lens Offset) προσδιορίστηκαν χωριστά για κάθε αναλυόμενη ένωση. Η βελτιστοποίηση των συνθηκών επιτυγχάνεται για κάθε ένωση χωριστά με απ' ευθείας, συνεχή τροφοδοσία (έγχυση) (direct infusion) των αναλυόμενων ουσιών από μια σύριγγα που συμπιέζεται με αντλία (syringe pump). Η σύριγγα αυτή είναι ηλεκτρονικά ελεγχόμενη και το διάλυμα απελευθερώνεται από τη σύριγγα μέσα στην πηγή ηλεκτροψεκασμού [81,89,98].

2.2. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

2.2.1. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

1. Πρότυπο διάλυμα Diuron συγκέντρωσης 10 ng/μl σε ακετονιτρίλιο (Dr. Ehrenstorfer Laboratory, Augsburg, Germany)
2. Πρότυπο διάλυμα Simazine συγκέντρωσης 10 ng/μl σε ακετονιτρίλιο (Dr. Ehrenstorfer Laboratory, Augsburg, Germany)
3. Πρότυπο διάλυμα Fenoxycarb συγκέντρωσης 10 ng/μl σε ακετονιτρίλιο (Dr. Ehrenstorfer Laboratory, Augsburg, Germany)
4. Πρότυπο διάλυμα Dimethomorph συγκέντρωσης 10 ng/μl σε ακετονιτρίλιο

(Dr. Ehrenstorfer Laboratory, Augsburg, Germany)

5. Πρότυπο διάλυμα Triadimefon συγκέντρωσης 10 ng/μl σε ακετονιτρίλιο

(Dr. Ehrenstorfer Laboratory, Augsburg, Germany)

6. Πρότυπο διάλυμα Metalaxyl συγκέντρωσης 10 ng/μl σε ακετονιτρίλιο

(Dr. Ehrenstorfer Laboratory, Augsburg, Germany)

7. Πρότυπο διάλυμα Carbaryl συγκέντρωσης 10 ng/μl σε κυκλοεξάνιο

(Dr. Ehrenstorfer Laboratory, Augsburg, Germany)

8. Πρότυπο διάλυμα Benalaxyl συγκέντρωσης 10 ng/μl σε κυκλοεξάνιο

(Dr. Ehrenstorfer Laboratory, Augsburg, Germany)

2.2.2. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΓΥΑΛΙΚΩΝ

Όλα τα γυαλικά, πριν χρησιμοποιηθούν σε αυτή την πειραματική διαδικασία, πλένονται προηγουμένως με καθαρό τρεχούμενο νερό (νερό βρύσης) και μετά καθαρίζονται με διάλυμα απορρυπαντικού με τη βοήθεια ψήκτρας. Η πλήρης απομάκρυνση του απορρυπαντικού είναι απαραίτητη και επιτελείται με επανειλημμένες εκπλύσεις, στην αρχή με τρεχούμενο νερό, έπειτα με απεσταγμένο νερό και τέλος με ακετόνη. Τα πλυμένα γυαλικά στεγνώνουν στο πυριαντήριο στους 100 °C περίπου, με εξαίρεση τους ογκομετρικούς κυλίνδρους και τις ογκομετρικές φιάλες που στεγνώνουν σε θερμοκρασία δωματίου.

2.3. ΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΑΙ ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΗΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Ένας χρωματογραφικός διαχωρισμός βελτιστοποιείται με ρύθμιση πειραματικών συνθηκών έτσι ώστε τα συστατικά ενός μίγματος να διαχωρίζονται καθαρά και στο συντομότερο δυνατό χρονικό διάστημα. Τα πειράματα βελτιστοποίησης αποβλέπουν στην μείωση της διεύρυνσης των ζωνών ή στη μεταβολή των σχετικών ταχυτήτων μετανάστευσης των συστατικών.

Κάθε στάδιο της αναλυτικής μεθόδου αναπτύχθηκε και βελτιστοποιήθηκε χωριστά. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα διαλύματα των διάφορων γεωργικών φαρμάκων καθώς και δείγματα ανάκτησης σε ορισμένο επίπεδο συγκέντρωσης, τα οποία παρασκευάστηκαν με χρήση των προαναφερθέντων πρότυπων διαλυμάτων.

Από τα πυκνά διαλύματα των πρότυπων ουσιών παρασκευάζεται μια σειρά από πρότυπα διαλύματα με μίγματα γεωργικών φαρμάκων (standard mixture solution), σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 0,05 μέχρι 1000 ppb για κάθε γεωργικό φάρμακο όπου με τη βοήθεια των διαλυμάτων αυτών κατασκευάζονται οι καμπύλες αναφοράς. Τα γεωργικά φάρμακα

ταξινομήθηκαν σε δυο ομάδες, ανάλογα με το διαλύτη που βρίσκονται όταν αγοράστηκαν τα πρότυπα διαλύματα γεωργικών φαρμάκων (Πίνακας 2.3α).

Πίνακας 2.3α. Χωρισμός πρότυπων διαλυμάτων γεωργικών φαρμάκων σε δυο ομάδες.

ΟΜΑΔΑ Α	ΟΜΑΔΑ Β
Diuron (AL)	Carbaryl (CY)
Simazine (AL)	Benalaxyl (CY)
Fenoxycarb (AL)	
Dimethomorph (AL)	
Triadimefon (AL)	
Metalaxyl (AL)	

Αρχικά για να παρασκευάσουμε πρότυπο διάλυμα μίγματος φυτοφαρμάκων για την ομάδα Α συγκέντρωσης 800ppb για κάθε φυτοφάρμακο, προσθέτουμε με πιπέτα ακριβείας σε ογκομετρική φιάλη των 10 ml 0,8 ml από τα 10 ng/ml των πρότυπων διαλυμάτων γεωργικών φαρμάκων και έπειτα συμπληρώνουμε μέχρι την χαραγή με διάλυμα MeOH 95% + H₂O 5% + 5mM NH₄COOH (κινητή φάση). Από το πρότυπο διάλυμα 800 ppb μίγματος φυτοφαρμάκων της ομάδας Α θα παρασκευαστούν και τα υπόλοιπα με αραιώση αυτού σύμφωνα με τον νόμο της αραιώσης $C_{\text{αρχικό}} V_{\text{αρχικό}} = C_{\text{τελικό}} V_{\text{τελικό}}$, όπου :

$C_{\text{αρχικό}}$: αρχική συγκέντρωση πυκνότερου διαλύματος

$V_{\text{αρχικό}}$: όγκος που θα χρειαστεί από το πυκνότερο διάλυμα για την αραιώση αυτού

$C_{\text{τελικό}}$: τελική συγκέντρωση αραιότερου διαλύματος

$V_{\text{τελικό}}$: όγκος που θα χρειαστεί από τον διαλύτη (κινητή φάση) για την αραιώση του πυκνού διαλύματος.

Ο όγκος που θα πάρουμε από το πυκνότερο διάλυμα για να παρασκευάσουμε το αραιότερο

είναι ίσος με $V_{\text{αρχικό}} = \frac{C_{\text{τελικό}} V_{\text{τελικό}}}{C_{\text{αρχικό}}}$ (Πίνακας 2.3β).

Πίνακας 2.3β. Αναλογίες όγκων για την παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων από το πρότυπο διάλυμα 800ppb με αραιώσεις τελικού όγκου 4 ml.

C_{ΤΕΛΙΚΟ} (ppb)	V_{ΤΕΛΙΚΟ} (μl)	C_{ΑΡΧΙΚΟ} (ppb)	V_{ΑΡΧΙΚΟ} (μl)
400	4000	800	2000
300	4000	800	1500
200	4000	800	1000
100	4000	800	500
50	4000	800	250
25	4000	800	125
10	4000	800	50
5	4000	10	2000
2,5	4000	10	1000
1	4000	10	400
0,5	4000	10	200
0,2	4000	10	80
0,1	4000	10	40
0,05	4000	5	40

Για την Ομάδα Β, αρχικά παρασκευάστηκαν 2 διαλύματα από τα δυο φυτοφάρμακα της ομάδας Β συγκέντρωσης 1000ppb σε ισοπροπανόλη. Για να παρασκευάσουμε διάλυμα 1000 ppb σε ισοπροπανόλη, προσθέτουμε με πιπέτα ακριβείας σε ογκομετρική φιάλη των 20 ml, 2 ml από τα 10 ng/ml των πρότυπων διαλυμάτων γεωργικών φαρμάκων και έπειτα συμπληρώνουμε μέχρι την χαραγή με διάλυμα ισοπροπανόλης. Από αυτά τα δυο διαλύματα θα παρασκευαστούν και τα υπόλοιπα διαλύματα με αραιώση προσθέτοντας MeOH 95% + H₂O 5% + 5mM NH₄COOH (κινητή φάση) (Πίνακας 2.3γ).

Πίνακας 2.3γ. Αναλογίες όγκων για την παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων από το πρότυπο διάλυμα 1000ppb με αραιώσεις τελικού όγκου 4 ml.

C_{ΤΕΛΙΚΟ} (ppb)	V_{ΤΕΛΙΚΟ} (μl)	C_{ΑΡΧΙΚΟ} (ppb)	V_{ΑΡΧΙΚΟ} (μl)
400	4000	1000	1600
300	4000	1000	1200
200	4000	1000	800
100	4000	1000	400
50	4000	1000	200
25	4000	1000	100
10	4000	1000	40

$C_{\text{TEΛΙΚΟ}} \text{ (ppb)}$	$V_{\text{TEΛΙΚΟ}} \text{ (}\mu\text{l)}$	$C_{\text{αΡΧΙΚΟ}} \text{ (ppb)}$	$V_{\text{αΡΧΙΚΟ}} \text{ (}\mu\text{l)}$
5	4000	100	200
2,5	4000	100	100
1	4000	100	40
0,5	4000	10	200
0,2	4000	10	80
0,1	4000	10	40
0,05	4000	5	40

2.3.1. ΜΕΘΟΔΟΣ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

Η ανάλυση των συστατικών του δείγματος γίνεται με υγρή χρωματογραφία αντίστροφης φάσης σε αναλυτική στήλη C-8.

Η στήλη που επιλέχθηκε για το σύστημά μας είναι η PerfectSil 120 C8, με διαστάσεις 125 x 2.1 mm και διάμετρο σωματιδίων 3 μm (Analysentechnik, Germany). Αυτή η στήλη έχει όλες τις προϋποθέσεις που περιγράφηκαν στο κεφάλαιο 2.1.2 στην παράγραφο «επιλογή της στήλης». Το μήκος της στήλης επιλέχθηκε στα 12,5 cm σαν ένας συμβιβασμός μεταξύ του χρόνου ανάλυσης και της ποιότητας του διαχωρισμού. Όσο αυξάνεται το μήκος της αναλυτικής στήλης αυξάνεται η ποιότητα του διαχωρισμού, αλλά αυξάνεται ταυτόχρονα και ο απαιτούμενος χρόνος ανάλυσης. Η κινητή φάση είναι μίγμα μεθανόλης 95% με υπερκάθαρο νερό 5% και 5mM οξικού αμμωνίου.

Η έκλουση των συστατικών του δείγματος από την αναλυτική στήλη γίνεται ισοκρατικά. Η θερμοκρασία της στήλης κυμάνθηκε στους 30 °C.

Η διάρκεια του προγράμματος ισοκρατικής έκλουσης επιλέχθηκε στα 10 min, πάλι σαν ένας συμβιβασμός μεταξύ του χρόνου ανάλυσης, της ποιότητας του διαχωρισμού και της ευαισθησίας του συστήματος, στο βαθμό που αυτή εξαρτάται από το πλάτος των κορυφών. Μεγαλύτερα χρονικά προγράμματα χρωματογραφικής ανάλυσης επιφέρουν καλύτερη ποιότητα διαχωρισμού, αλλά στις περιπτώσεις αυτές εκτός του ότι αυξάνεται ο χρόνος ανάλυσης, αυξάνεται και το πλάτος των εκλουόμενων κορυφών με αποτέλεσμα να μειώνεται η ευαισθησία της μεθόδου.

Η ακρίβεια των χρωματογραφικών αναλύσεων εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ακρίβεια εισαγωγής του δείγματος. Γι' αυτό επιβάλλεται καλή έκπλυση της σύριγγας με επανειλημμένες αναρροφήσεις και αποχύσεις, για πλήρη απομάκρυνση των υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων. Εάν τα εσωτερικά τοιχώματα της σύριγγας είναι ακάθαρτα, η έκχυση των δειγμάτων δεν γίνεται κανονικά και είναι δυνατόν να προκύψουν σφάλματα, λόγω

παραμονής υπολειμμάτων στη σύριγγα. Πριν από μια εισαγωγή δείγματος, λαμβάνεται πρόνοια για την απομάκρυνση των φυσαλίδων αέρα από τη σύριγγα.

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι πριν από τη λειτουργία του οργάνου (HPLC-ESI-MS/MS) λαμβάνεται πρόνοια για την απομάκρυνση φυσαλίδων αέρα από τους διαλύτες. Αυτό γίνεται με απαέρωση των χρησιμοποιούμενων διαλυτών, και εκδίωξη 20 ml περίπου από αυτούς στα απόβλητα.

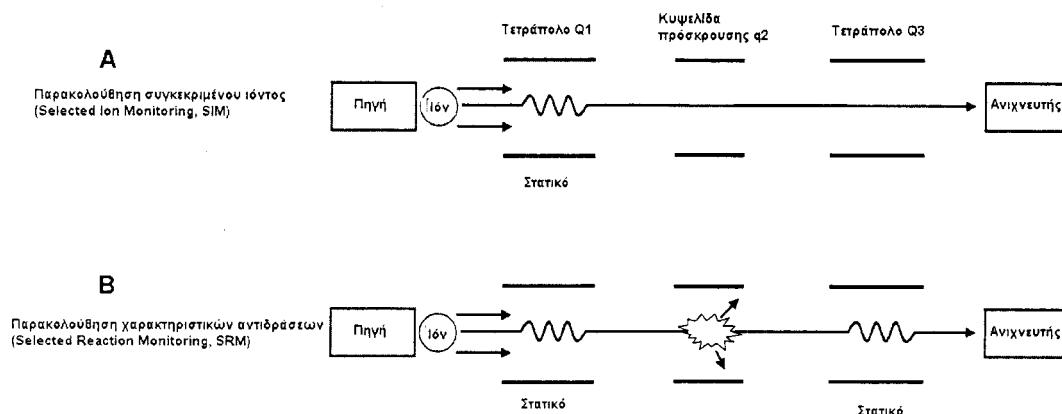
2.3.2. ΗΛΕΚΤΡΟΨΕΚΑΣΜΟΣ

Για να αναπτυχθεί μια εκλεκτική και ευαίσθητη μέθοδος οι παράμετροι που πρέπει να ληφθούν υπόψη είναι :

- Η σύσταση της κινητής φάσης : Κατάλληλοι θεωρούνται οι διαλύτες οι οποίοι έχουν σχετικά χαμηλή επιφανειακή τάση όπως για παράδειγμα η μεθανόλη, ώστε να πραγματοποιείται σταθερός ηλεκτροψεκασμός.
- Οι χημικές ιδιότητες του αναλύτη : όσο περισσότερο υδρόφοβο χαρακτήρα έχει ο αναλύτης τόσο πιο εύκολα εισέρχεται στην επιφάνεια της σταγόνας κατά τον ηλεκτροψεκασμό. Αυτό συμβαίνει γιατί λόγω του υδρόφοβου χαρακτήρα του η συγγένειά του με την υδατική φάση είναι μειωμένη και συνεπώς ευνοείται η απομάκρυνσή του από τη φάση αυτή. Κατάλληλοι θεωρούνται οι αναλύτες οι οποίοι βρίσκονται υπό μορφή ιόντων στην υγρή φάση. Αυτό συμβάλλει σημαντικά στην αποδοτικότητα του ηλεκτροψεκασμού αφού η παρουσία ομάδων στον αναλύτη οι οποίες μπορούν να ιονισθούν επηρεάζει θετικά την απόκριση του συστήματος.
- Το δυναμικό ηλεκτροψεκασμού, το οποίο επηρεάζει την μεταφορά ιόντων του αναλύτη από την υγρή φάση.
- Το δυναμικό το οποίο εφαρμόζεται στους φακούς εστίασης για την βέλτιστη μεταφορά ιόντων από την πηγή ιοντισμού προς τον αναλυτή μάζας.
- Η επιλογή κατάλληλης μεθόδου σάρωσης στον αναλυτή μάζας (Καργάκη, 2006).

2.3.3. ΤΕΧΝΙΚΗ ΣΑΡΩΣΗΣ ΜΕ ΜΕΛΕΤΗ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ

Η μέθοδος που αναπτύχθηκε στην παρούσα εργασία για την ανάλυση των γεωργικών φαρμάκων σε δείγματα κρασιού, εφαρμόζει την τεχνική SRM (Selected Reaction Monitoring) κατά την οποία παρακολουθείται μια χαρακτηριστική αντίδραση ή μια ομάδα αντιδράσεων για κάθε αναλυόμενη ένωση· αντιδράσεις όπως είναι η θραυσματοποίηση ενός ιόντος. Η μέθοδος αυτή παρουσιάζει σήμερα τεράστιο ενδιαφέρον και ευρύτητα εφαρμογών λόγω της απλότητας, της συντομίας και της υψηλής ακρίβειας που προσφέρει. Η τεχνική αυτή επιτυγχάνεται συνήθως με τον κατάλληλο καθορισμό του πρόδρομου ιόντος (με βάση το λόγο μάζας προς το φορτίο, m/z) και την παρακολούθηση ενός θυγατρικού ιόντος. Για το σκοπό αυτό καθορίζεται ένα πρόδρομο ιόν και ένα ή περισσότερα θυγατρικά για κάθε υπό μελέτη ένωση (κατάλληλα διαλεγμένα με βάση τα δεδομένα των καμπυλών θραυσματοποίησης). Η δυνατότητα επιλογής ζεύγους ιόντων σε κάθε ένωση που μελετάται, καθιστά την μέθοδο αυτή ιδιαίτερα αποτελεσματική στην ανάλυση λόγω της εξαιρετικά μεγάλης ακρίβειάς της, σε αντίθεση με τη μέθοδο SIM (Selected Ion Monitoring) η οποία υστερεί σε εκλεκτικότητα και συνεπώς σε ακρίβεια (Σχήμα 2.3.3α).



Σχήμα 2.3.3α. A. Μέθοδος παρακολούθησης συγκεκριμένου ιόντος (SIM), B. Μέθοδος παρακολούθησης χαρακτηριστικών αντιδράσεων (SRM) (singh, 2006).

Η μέθοδος SIM είναι μια εναλλακτική μέθοδος σάρωσης, γενικά εφαρμόσιμη, κατά την οποία ένα χαρακτηριστικό ιόν ή μια ομάδα ιόντων παρακολουθείται σε μια ένωση. Βασικό μειονέκτημα της μεθόδου αυτής αποτελεί το γεγονός, ότι τα ιόντα μιας ένωσης που έχουν επιλεγεί να παρατηρούνται πιθανόν να σχηματίζονται και από ορισμένες άλλες ενώσεις που συνυπάρχουν στο δείγμα πλην της προσδιοριζόμενης. Τα μόρια των συνυπαρχουσών αυτών ενώσεων ιονίζονται και διασπώνται προς διάφορα θραύσματα, μερικά από τα οποία πιθανόν να έχουν τις συγκεκριμένες σχέσεις μάζας προς φορτίο που έχουν καθοριστεί για την μελέτη της αναλυόμενης ένωσης. Ως εκ τούτου, η τεχνική αυτή δεν είναι πολύ ακριβής και προκύπτουν θετικά σφάλματα κατά την εφαρμογή της, διότι παράγεται και τελικά

προσδιορίζεται ποσότητα ιόντων (ένταση σήματος) μεγαλύτερη αυτής που αντιστοιχεί στην προσδιοριζόμενη ουσία. Με τη χρήση όμως της μεθόδου SRM είναι δυνατόν να αποφύγουμε τέτοια σφάλματα. Επειδή σε αυτή την τεχνική, οι παρεμποδίζουσες ενώσεις που περιέχονται στο δείγμα θα πρέπει αρχικά να παράγουν πρόδρομο ιόν, του οποίου η τιμή m/z να είναι ταυτόσημη με αυτή του πρόδρομου ιόντος που έχει καθοριστεί για την αναλυόμενη ένωση, και επιπλέον το πρόδρομο αυτό ιόν θα πρέπει να διασπασθεί προς ορισμένα θραύσματα, ένα από τα οποία θα πρέπει να έχει τον ίδιο λόγο m/z με αυτό του θυγατρικού ιόντος που έχει καθοριστεί για την αναλυόμενη ένωση. Αυτή η αυστηρότητα των συνθηκών που απαιτούνται για να λάβει χώρα μια διαδικασία SRM, καθιστά την τεχνική αυτή ένα πολύτιμο μέσο για την ανάλυση και η σπουδαιότητά της συνεχώς μεγαλώνει και συμβαδίζει με την πρόοδο της τεχνολογίας των χρησιμοποιούμενων συσκευών και της μεθοδολογίας. Στον πίνακα 2.3.3α παρατίθενται οι χαρακτηριστικές αντιδράσεις SRM, που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση των υπο μελέτη γεωργικών φαρμάκων.

Πίνακας 2.3.3α. Χαρακτηριστικές αντιδράσεις SRM των γεωργικών φαρμάκων που εξετάζονται στην παρούσα εργασία.

ΓΕΩΡΓΙΚΟ ΦΑΡΜΑΚΟ	ΜΕΤΑΒΑΣΗ ΜΑΖΑΣ
Diuron	233 → 72
Simazine	202 → 124
Fenoxycarb	302 → 88
Dimethomorph	388 → 301
Triadimefon	294 → 197
Metalaxyl	280 → 220
Carbaryl	202 → 145
Benalaxyl	326 → 148

Για να θεωρηθεί η μέθοδος αυτή αξιόπιστη ως προς την ανίχνευση των φυτοφαρμάκων, έγινε ταυτόχρονη παρακολούθηση δυο μεταβάσεων μάζας (MS-MS transitions) για κάθε γεωργικό φάρμακο. Οι μεταβάσεις μάζας για κάθε γεωργικό φάρμακο παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.3.3β.

Πίνακας 2.3.3β. Μεταβάσεις μάζας των υπό μελέτη γεωργικών φαρμάκων.

Γεωργικό Φάρμακο	Κύρια μέθοδος ανίχνευσης	Μέθοδος επιβεβαίωσης
Diuron	m/z 233,0 → 72,1	m/z 233,0 → 160
Simazine	m/z 202,1 → 124,1	m/z 202,1 → 132
Fenoxycarb	m/z 302,1 → 88,1	m/z 302,1 → 116,1
Dimethomorph	m/z 388,2 → 301,0	m/z 388,2 → 165,0
Triadimefon	m/z 294,0 → 197,1	m/z 294,0 → 69,1
Metalaxyl	m/z 280,1 → 220,1	m/z 280,1 → 160,1
Carbaryl	m/z 202,1 → 145,1	m/z 202,1 → 127,1
Benalaxyl	m/z 326,2 → 148,1	m/z 326,2 → 208,1

Οι μεταβάσεις μάζας που χρησιμοποιήθηκαν για επιβεβαίωση συμφωνούν με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας (*bfr*, 2005).

2.3.4. ΜΕΘΟΔΟΣ ΓΙΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΜΑΖΑΣ ΠΡΟΔΡΟΜΟΥ ΙΟΝΤΟΣ

Για την μεγιστοποίηση της ακρίβειας, οι πειραματικές συνθήκες πρέπει να διατηρούνται σταθερές καθ' όλη τη διάρκεια μιας σειράς μετρήσεων. Σημαντικά σφάλματα στην ανάλυση μπορούν να προκύψουν από μεταβολές στον άξονα μάζας (δυναμικά r.f. και d.c.) του αναλυτή μάζας με την πάροδο του χρόνου, που οφείλονται κυρίως στη μη σταθερότητα των παραμέτρων λειτουργίας του πρώτου τετραπόλου. Ο ακριβής καθορισμός της μάζας του πρόδρομου ιόντος κάθε αναλυόμενης ένωσης πριν από την έναρξη μιας σειράς αναλύσεων και ο συχνός έλεγχος της τυχόν απαιτούμενης διόρθωσης του άξονα μάζας (βαθμονόμηση του πρώτου τετραπόλου) έχει ιδιαίτερη σπουδαιότητα για την ανάλυση, γιατί είναι δυνατόν να επηρεάσει σημαντικά την ορθότητα και την ακρίβεια των μετρήσεων. Επομένως, για να ληφθούν αξιόπιστα αποτελέσματα στην ανάλυση, απαιτείται η χρησιμοποίηση μιας κατάλληλης μεθόδου που βασικός σκοπός είναι ο προσδιορισμός της μάζας του πρόδρομου ιόντος κάθε αναλυόμενης ένωσης με μεγάλη ακρίβεια. Διάφορες τεχνικές έχουν αναπτυχθεί για το σκοπό αυτό. Για αναλύσεις ρουτίνας, συνήθως εφαρμόζεται η μέθοδος σάρωσης του πρόδρομου ιόντος (Precursor Ion Scanning). Η μέθοδος αυτή επιτυγχάνεται με σάρωση του πρόδρομου ιόντος στο πρώτο τετράπολο Q₁ σε μια στενή περιοχή μάζας με την κεντροειδή τεχνική (centroid), ενώ στο τρίτο τετράπολο Q₃ καθορίζεται η μάζα του θυγατρικού ιόντος της υπό μελέτη ένωσης. Η μέθοδος αυτή απαιτεί λίγο χρόνο, είναι εύχρηστη, αξιόπιστη και μοιάζει μερικώς με την κατά την ανάλυση χρησιμοποιούμενη μέθοδο SRM. Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται στην παρούσα εργασία πριν την έναρξη μιας σειράς αναλύσεων, για το σύγχρονο προσδιορισμό της μάζας του πρόδρομου ιόντος όλων των υπό εξέταση γεωργικών φαρμάκων, στην συνέχεια γίνεται η σχετική διόρθωση της μάζας στην μέθοδο

SRM και αμέσως ακολουθεί η ανάλυση των δειγμάτων. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα διαλύματα των φυτοφαρμάκων συγκέντρωσης 800 ng/ml. Η εκτέλεση αυτού του πειράματος για την γρήγορη βαθμονόμηση του αναλυτή μάζας, λαμβάνει χώρα πριν από την σειρά των αναλύσεων.

2.3.5. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΟΥ ΣΗΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

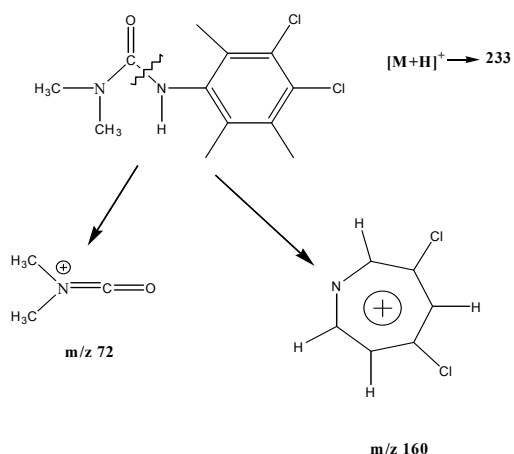
Το σήμα του ανιχνευτή κατά τη διάρκεια της ανάλυσης του δείγματος καταγράφεται, όπως ήδη έχει αναφερθεί, από ηλεκτρονικό υπολογιστή. Μετά το τέλος της ανάλυσης, ακολουθεί η επεξεργασία των καταγραμμένων σημάτων με εντολή του χειριστή ανά πάσα χρονική στιγμή. Τα καταγραμμένα χρωματογραφήματα ελέγχονται για την ύπαρξη ή όχι κορυφών σε αυτά, και οι ανιχνευόμενες κορυφές ολοκληρώνονται για την εύρεση του εμβαδού της επιφάνειάς τους και ταυτοποιούνται, με βάση τη σύγκριση του χρόνου έκλουσής τους με τους αντίστοιχους χρόνους έκλουσης των πρότυπων ουσιών στα δείγματα ανάκτησης. Οι ποσοτικοί προσδιορισμοί γίνονται με βάση τις καμπύλες αναφοράς.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

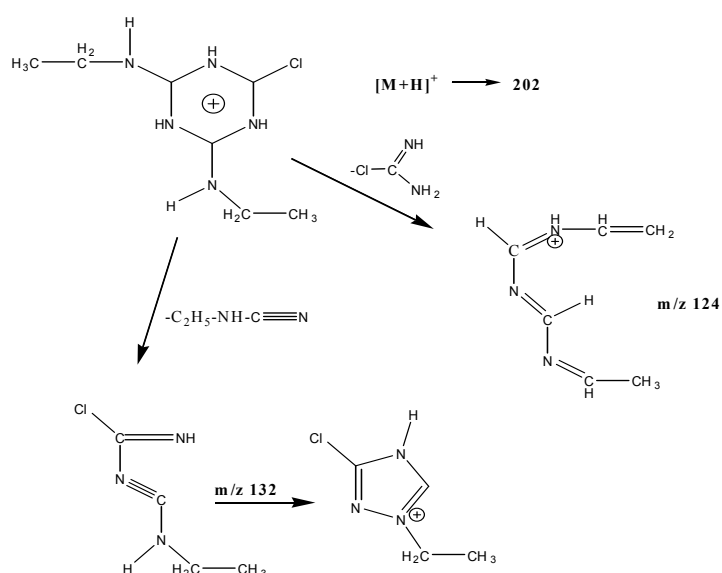
3.1. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΘΡΑΥΣΜΑΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

Οι σημαντικότερες θραυσματοποιήσεις των γεωργικών φαρμάκων που ερευνώνται σε αυτή την εργασία και που καθορίζονται από την ανίχνευση των πρόδρομων και θυγατρικών ιόντων παρουσιάζονται παρακάτω (*bfr, 2005*).

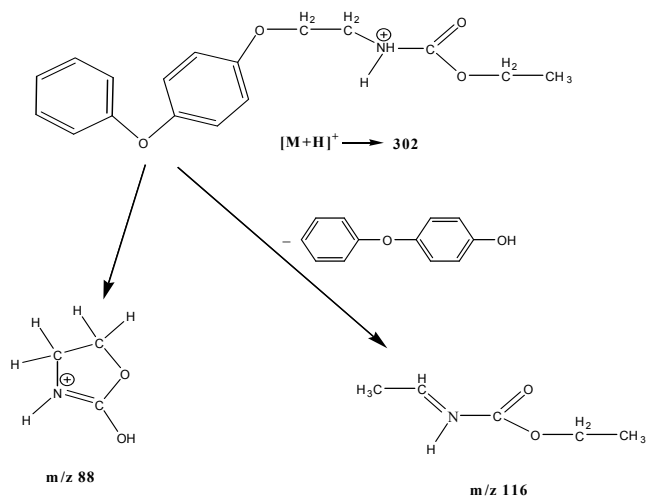
Μηχανισμοί θραυσματοποίησης για το γεωργικό φάρμακο Diuron :



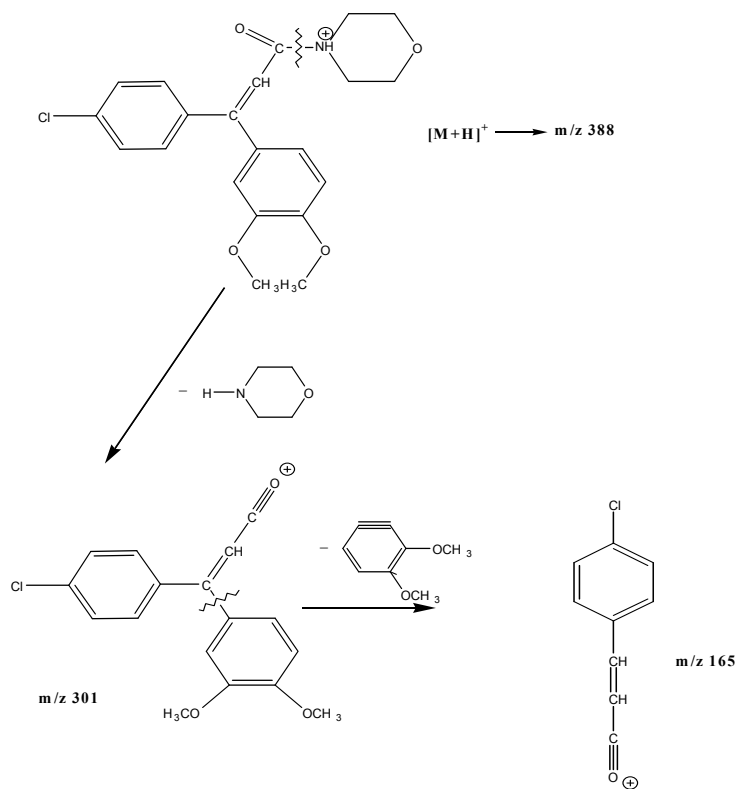
Μηχανισμοί θραυσματοποίησης για το γεωργικό φάρμακο Simazine :



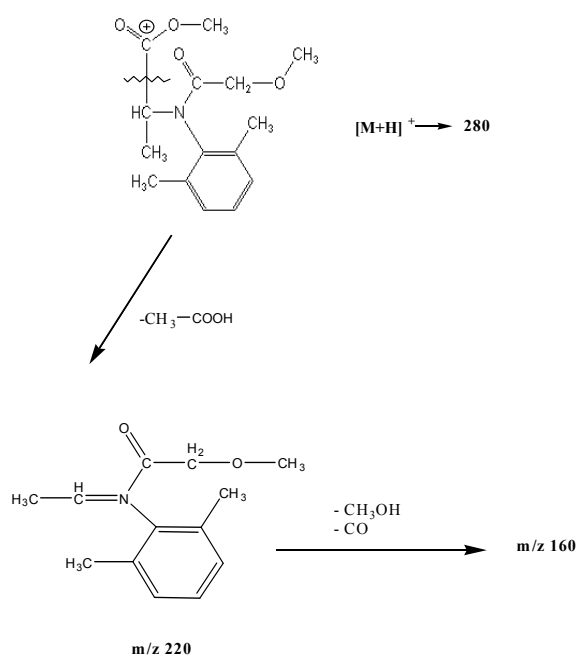
Μηχανισμοί θραυσματοποίησης για το γεωργικό φάρμακο Fenoxycarb :



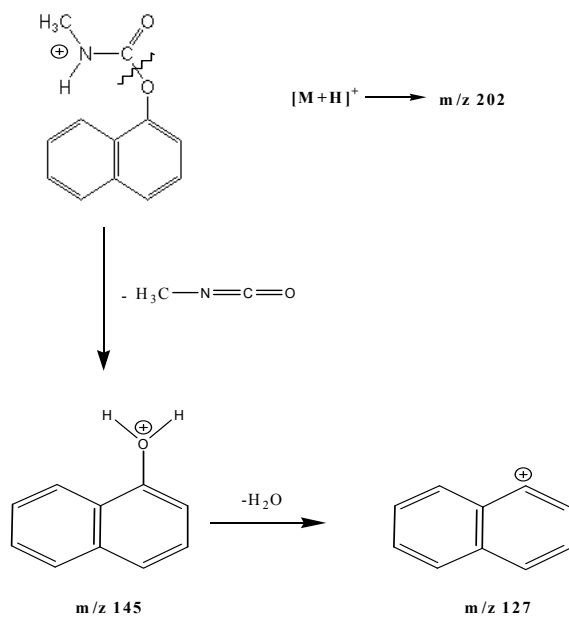
Μηχανισμοί θραυσματοποίησης για το γεωργικό φάρμακο Dimethomorph :



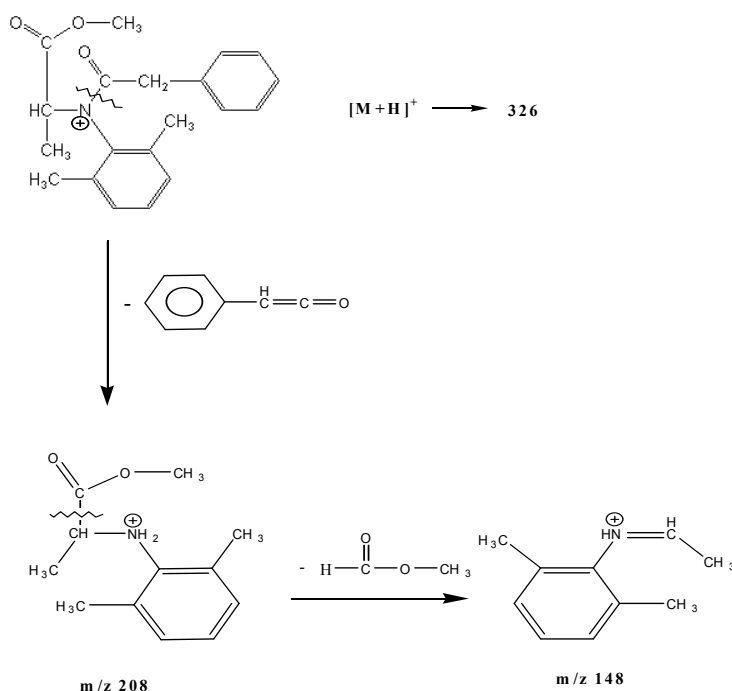
Μηχανισμοί θραυσματοποίησης για το γεωργικό φάρμακο Metalaxyl :



Μηχανισμοί θραυσματοποίησης για το γεωργικό φάρμακο Carbaryl :



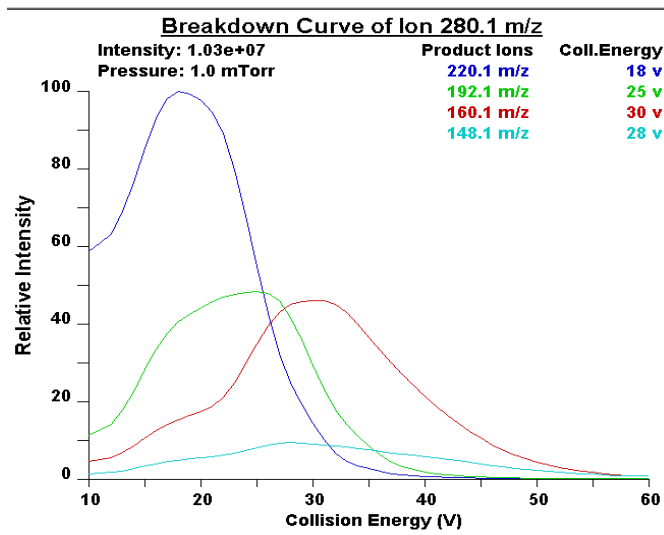
Μηχανισμοί θραυσματοποίησης για το γεωργικό φάρμακο Benalaxyl :



3.2. ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΤΟΥ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΟΥ ΜΑΖΑΣ ΓΙΑ ΟΛΑ ΤΑ ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ

Μεγάλη σημασία δόθηκε στη βελτιστοποίηση των παραμέτρων λειτουργίας του φασματομέτρου μάζας στο οποίο στηρίζεται η προτεινόμενη μέθοδος. Οι παράμετροι αυτοί (π.χ. δυναμικό στη βελόνα ηλεκτροψεκασμού, πίεση αερίου εκνέφωσης, πίεση βοηθητικού αερίου, θερμοκρασία στον τριχοειδή σωλήνα, δυναμικό κυλινδρικού φακού), επηρεάζουν την ποιότητα του σήματος και την αποδοτικότητα του ηλεκτροψεκασμού. Οι παραπάνω παράγοντες επιδρούν συνεπώς και στην ευαισθησία του φασματομέτρου μάζας. Η διαδικασία βελτιστοποίησης των συνθηκών επιτυγχάνεται για κάθε ένωση χωριστά και οι τιμές των παραμέτρων λειτουργίας ελέγχονται και καταγράφονται αυτόματα από τον ηλεκτρονικό υπολογιστή. Για τον σκοπό αυτό παρασκευάστηκαν διαλύματα για κάθε γεωργικό φάρμακο ξεχωριστά σε συγκέντρωση 800 ppb. Ο τρόπος παρασκευής τους περιγράφηκε στην παράγραφο 2.3. « Διεργασίες ανάπτυξης και βελτιστοποίησης της αναλυτικής μεθόδου». Τα διαλύματα αυτά αποθηκεύονται σε σφραγισμένα φυαλίδια σε συνθήκες κατάψυξης (-23 °C). Με τη βοήθεια των διαλυμάτων αυτών κατασκευάζονται οι καμπύλες θραυσματοποίησης (Breakdown Curve) και για τις 8 υπό εξέταση ουσίες. Μια γραφική παράσταση που δείχνει τις σχετικές εντάσεις των ιονικών θραυσμάτων μιας ένωσης στις διάφορες τιμές ενέργειας πρόσκρουσης καλείται

καμπύλη θραυσματοποίησης της ένωσης, και είναι πολύ χαρακτηριστικό της συγκεκριμένης ένωσης. Οι καμπύλες αυτές χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό των βέλτιστων συνθηκών παρακολούθησης κάθε χαρακτηριστικής αντίδρασης SRM που μελετάται στη συγκεκριμένη μέθοδο. Παρέχουν πολύτιμες πληροφορίες για το πρόδρομο ιόν, το κύριο θραύσμα (βασική κορυφή) και τα δευτερεύοντα θραύσματα, καθώς και τη βέλτιστη τιμή ενέργειας πρόσκρουσης για κάθε θραύσμα. Στο σχήμα 3.1α φαίνεται η καμπύλη θραυσματοποίησης για το Metalaxyl.



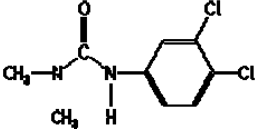
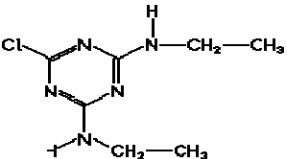
Σχήμα 3.2α. Καμπύλη θραυσματοποίησης του Metalaxyl.

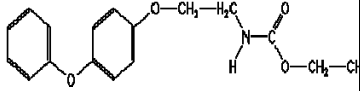
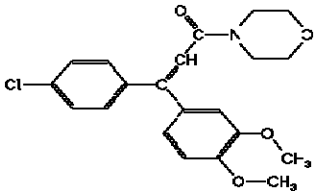
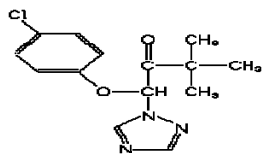
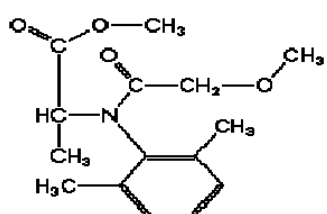
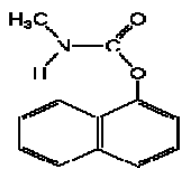
Στο επάνω μέρος του σχήματος αυτού, παρουσιάζεται ο λόγος μάζας προς φορτίο (m/z) για το πρόδρομο ιόν (m/z 280) καθώς και ένας κατάλογος που δείχνει τις σχέσεις μάζας προς φορτίο (m/z) για τα τέσσερα κυριότερα ιονικά θραύσματα της ένωσης (product ions), καθώς και τις αντίστοιχες βέλτιστες ενέργειες πρόσκρουσης για το καθένα θραύσμα. Στο σχήμα αυτό παρατηρούμε ακόμα μια σειρά καμπυλών που παριστούν τη μεταβολή της έντασης συναρτήσει της ενέργειας πρόσκρουσης (collision energy) για τα τέσσερα κυριότερα θυγατρικά ιόντα του Metalaxyl. Λαμβάνεται μια καμπύλη για κάθε θραύσμα. Η καμπύλη με την μεγαλύτερη ένταση αντιστοιχεί στο κύριο θραύσμα. Υπάρχει μια βέλτιστη τιμή ενέργειας πρόσκρουσης για κάθε θραυσματοποίηση πρόδρομου ιόντος σε ένα θυγατρικό ιόν, στην οποία αντιστοιχεί μια μέγιστη τιμή της έντασης του θυγατρικού ιόντος, για την οποία μεγιστοποιείται το σήμα και επομένως και η ευαισθησία του συστήματος για την υπό μελέτη ουσία. Στις καμπύλες αυτές παρατηρούμε, ότι αρχικά καθώς αυξάνει η ενέργεια πρόσκρουσης αυξάνεται και η ένταση των θυγατρικών ιόντων και συγκλίνει προς μια μέγιστη τιμή. Όπως φαίνεται από το σχήμα, στην τιμή αυτή της ενέργειας πρόσκρουσης η ένταση του θυγατρικού ιόντος έχει τη μέγιστη τιμή της. Μόλις η ενέργεια πρόσκρουσης ξεπεράσει τη βέλτιστη τιμή της, η ένταση αρχίζει να μειώνεται. Με περαιτέρω αύξηση της ενέργειας πρόσκρουσης, η ένταση συνεχίζει να μειώνεται. Από μια απλή σύγκριση μεταξύ των τεσσάρων αυτών καμπυλών στο μέγιστο του ύψους τους φαίνεται ότι η ένταση του θραύσματος, με λόγο m/z 220, είναι πολύ μεγαλύτερη από τις

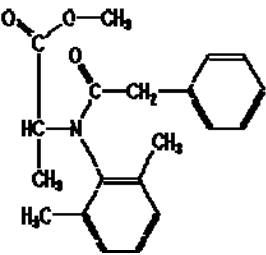
εντάσεις των υπολοίπων ιονικών θραυσμάτων του Metalaxyl. Η αρκετά μεγάλη ένταση του θραύσματος με λόγο m/z 220, οφείλεται στην πολύ μεγάλη σταθερότητα που έχει το εν λόγω θυγατρικό ιόν εξαιτίας της δομής του. Για το λόγο αυτό, η κύρια χαρακτηριστική αντίδραση που χρησιμοποιείται για την μελέτη του Metalaxyl είναι η θραύση $280 \rightarrow 220$. Σε αυτή τη διαδικασία SRM, η ενέργεια πρόσκρουσης επιλέγεται στη βέλτιστη τιμή της που είναι τα 18eV (με βάση τα δεδομένα του σχήματος 3.1α) με σκοπό τη βελτιστοποίηση της θραυσματοποίησης για την υπο μελέτη ουσία. Η πίεση του αερίου αργού στην κυψελίδα πρόσκρουσης επιλέχθηκε στο 1 mTorr. Η τιμή αυτή κρίθηκε κατάλληλη, αφού οι εντάσεις των θραυσμάτων του Metalaxyl στο 1 mTorr είναι ελαφρώς μεγαλύτερες από τις εντάσεις αυτών σε άλλες τιμές πίεσης που δοκιμάστηκαν. Για τα υπόλοιπα γεωργικά φάρμακα που μελετήθηκαν στην εργασία αυτή, οι καμπύλες θραυσματοποίησης παρουσιάζονται στο παράρτημα Α.

Στον Πίνακα 3.2α παρουσιάζονται συνοπτικά οι χημικές δομές, οι σχετικές μοριακές μάζες (M_r , relative molecular mass), τα πρόδρομα ιόντα και τα κυριότερα ιονικά θραύσματα των εννέα γεωργικών φαρμάκων που εξετάζονται. Στον ίδιο πίνακα παρουσιάζονται επίσης, και οι βέλτιστες τιμές ενέργειας πρόσκρουσης για το καθένα θραύσμα καθώς και το βέλτιστο δυναμικό κυλινδρικού φακού για κάθε αναλυόμενη ένωση. Τα πρόδρομα ιόντα για τα γεωργικά φάρμακα παρατηρούμε ότι είναι τα πρωτονιωμένα μόρια $[M + H]^+$.

Πίνακας 3.2α. Χημικές δομές, σχετικές μοριακές μάζες, πρόδρομα ιόντα και τα κυριότερα ιονικά θραύσματα των εννέα γεωργικών φαρμάκων που εξετάζονται.

Γεωργικό Φάρμακο (M_r)	m/z και θυγατρικά ιόντα	Δυναμικό κυλινδρικού φακού (Tube Lens Offset) (V)	Ενέργεια Πρόσκρουσης (eV)
Diuron (232) 	233 $[M+H]^+$ 72 160	107	26 33
Simazine (201) 	202 $[M+H]^+$ 132 124	106	26 23

Γεωργικό Φάρμακο (Mr)	m/z και θυγατρικά ιόντα	Δυναμικό κυλινδρικού φακού (Tube Lens Offset) (V)	Ενέργεια Πρόσκρουσης (eV)
Fenoxycarb (301) 	302 [M+H] ⁺ 88 116	114	27 10
Dimethomorph (387) 	388,2 [M+H] ⁺ 301 165	130	27 39
Triadimefon (239,8) 	294 197 69	114	20 28
Metalaxyl (279) 	280 [M+H] ⁺ 220 160	99	18 30
Carbaryl (201) 	202 [M+H] ⁺ 145 127	84	10 36

Γεωργικό Φάρμακο (Mr)	m/z και θυγατρικά ιόντα	Δυναμικό κυλινδρικού φακού (Tube Lens Offset) (V)	Ενέργεια Πρόσκρουσης (eV)
<p style="text-align: center;">Benalaxyl (325)</p> 	<p style="text-align: center;">326 [M+H]⁺ 148 208</p>	<p style="text-align: center;">96</p>	<p style="text-align: center;">28 19</p>

3.3. ΑΝΑΚΤΗΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

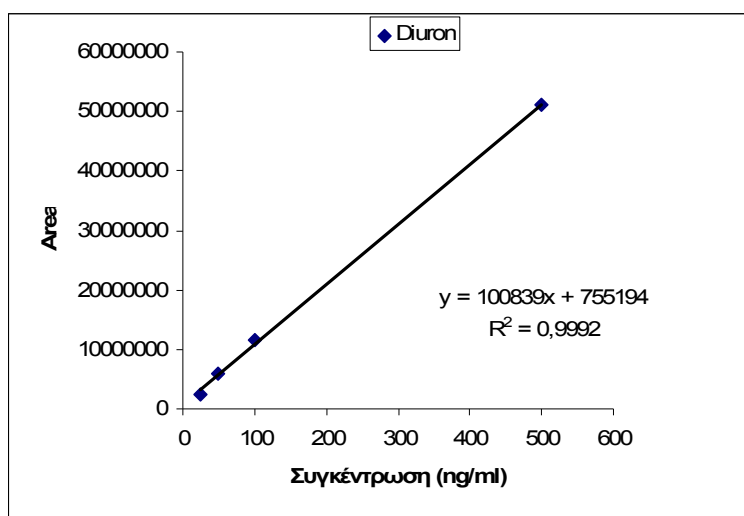
Για τον υπολογισμό της ανάκτησης της μεθόδου παρασκευάσαμε τα εξής :

- Τρία δείγματα με νερό βρύσης και 12% αιθανόλη, τα οποία είναι παρόμοια ως προς την σύσταση με τα δείγματα κρασιού,
- τρία δείγματα από το ίδιο λευκό κρασί
- τρία δείγματα από το ίδιο ροζέ κρασί και
- τρία δείγματα από το ίδιο ερυθρό κρασί.

Στα παραπάνω δείγματα κάναμε προσθήκη γνωστής συγκέντρωσης των προς ανάλυση γεωργικών φαρμάκων (40 ppb). Τα δείγματα αυτά εκχυλίστηκαν με εκχύλιση στερεής φάσης όπως ακριβώς περιγράφεται στην παράγραφο 2.1.1. Γνωρίζοντας την αρχική συγκέντρωση των μιγμάτων μπορεί να υπολογιστεί η ανάκτηση της μεθόδου, η οποία θα λαμβάνεται υπόψη σε κάθε πραγματικό δείγμα. Το πείραμα αυτό πραγματοποιήθηκε τρεις φορές ώστε τα αποτελέσματα να είναι αξιόπιστα.

Αρχικά, παρασκευάζεται μια καμπύλη βαθμονόμησης για κάθε γεωργικό φάρμακο και στη συνέχεια από την εξίσωση κάθε καμπύλης υπολογίζεται η τελική συγκέντρωση των μιγμάτων. Η κατασκευή των καμπυλών αναφοράς (Calibration Curve) γίνεται με την ανάλυση, κατα προτίμηση με σειρά αυξανόμενης συγκέντρωσης, τεσσάρων πρότυπων διαλυμάτων γεωργικών φαρμάκων με τις συγκεντρώσεις 25, 50, 100 και 500 ng/ml. Η εξίσωση της καμπύλης αναφοράς (κλίση και τομή με τον άξονα) βρίσκεται εύκολα με τη βοήθεια προγραμματισμένου ηλεκτρονικού υπολογιστή (με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων). Οι τεσσάρων σημείων καμπύλες αναφοράς , είναι γραμμικές στην περιοχή που μελετήθηκαν, με συντελεστή γραμμικής συσχέτισης $r > 0,9950$ για όλα τα υπο μελέτη

γεωργικά φάρμακα (Πίνακας 3.3α). Στο Σχήμα 3.3α παρουσιάζεται η καμπύλη αναφοράς για το γεωργικό φάρμακο Diuron. Οι καμπύλες αναφοράς για τα υπόλοιπα γεωργικά φάρμακα παρουσιάζονται στο Παράρτημα Β.



Σχήμα 3.3α. Καμπύλη αναφοράς για το Diuron

Πίνακας 3.3α. Παράμετροι γραμμικότητας της ευθείας παλινδρόμησης (συντελεστής γραμμικής συσχέτισης r , κλίση καμπύλης αναφοράς, τιμή της ευθείας με τον άξονα των y) για τα γεωργικά φάρμακα που μελετήθηκαν.

Γεωργικό Φάρμακο	r	Κλίση ευθείας	Τομή ευθείας με τον άξονα των y
Diuron	0,9992	100839	755194
Simazine	0,9997	182701	- 859115
Fenoxycarb	0,9990	542686	8×10^6
Dimethomorph	0,9968	579464	$- 2 \times 10^6$
Triadimefon	0,9996	255235	1×10^6
Metalaxyl	0,9950	2×10^6	$- 4 \times 10^6$
Carbaryl	0,9962	836955	279839
Benalaxyl	0,9950	2×10^6	$- 7 \times 10^6$

Πριν την εκχύλιση στερεάς φάσης η συγκέντρωση κάθε πρότυπου διαλύματος ήταν 40 ppb και ο όγκος 10 ml. Ακολουθεί συμπύκνωση μέσω της διαδικασίας εκχύλισης 10 φορές αφού ο τελικός όγκος είναι 1 ml. Αν η ανάκτηση είναι 100% τότε θα αναμενόταν η τελική συγκέντρωση να είναι 400 ppb. Η τελική συγκέντρωση των μιγμάτων,

υπολογίζεται από τις εξισώσεις που προκύπτουν από τις καμπύλες αναφοράς και εν συνέχεια γίνεται ο υπολογισμός της ανάκτησης από την σχέση :

$$\% \text{ Ανάκτηση} = \frac{100 \cdot \text{τελική συγκέντρωση μίγματος (ppb)}}{400 \text{ (ppb)}}$$

Τα αποτελέσματα από τους παραπάνω υπολογισμούς παρουσιάζονται στον πίνακα 3.3β.

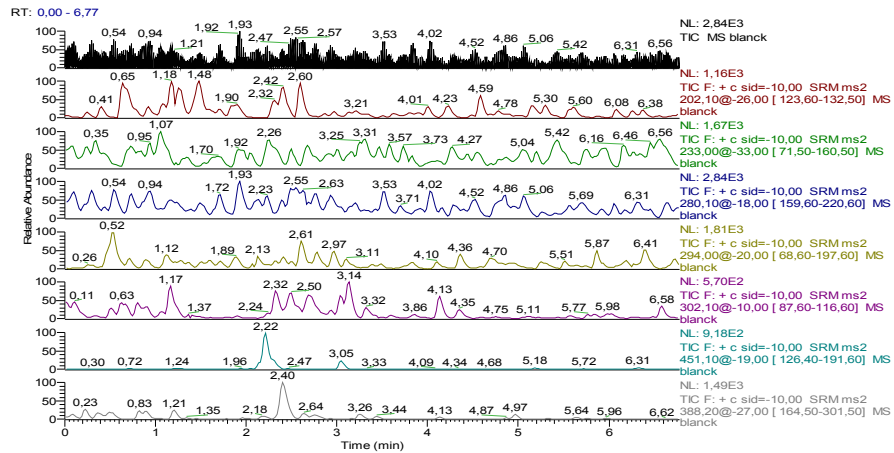
Πίνακας 3.3β. Ανάκτηση θυγατρικών ιόντων κάθε ένωσης, μέσος όρος, τυπική απόκλιση.

Γεωργικό Φάρμακο	t _R (min)	Μέση Ανάκτηση %				RSD %, n=3			
		Νερό βρύσης +12% αιθανόλη	Λευκό κρασί	Ροζέ κρασί	Ερυθρό κρασί	Νερό βρύσης +12% αιθανόλη	Λευκό κρασί	Ροζέ κρασί	Ερυθρό κρασί
Diuron	2,78	86	66	73	64	0,98	8,99	5,53	4,88
Simazine	2,63	79	55	62	56	3,82	5,79	0,96	0,60
Fenoxycarb	3,06	100	77	66	60	4,49	5,79	6,26	1,15
Dimethomorph	2,80	91	72	73	67	2,69	0,72	3,59	0,72
Triadimefon	2,97	113	98	90	85	10,49	0,52	7,93	10,80
Metalaxyl	2,71	82	57	72	65	6,32	3,41	3,92	2,25
Carbaryl	2,97	79	55	63	63	9,34	1,27	7,72	9,08
Benalaxyl	4,10	91	89	80	83	5,75	7,98	7,87	3,20

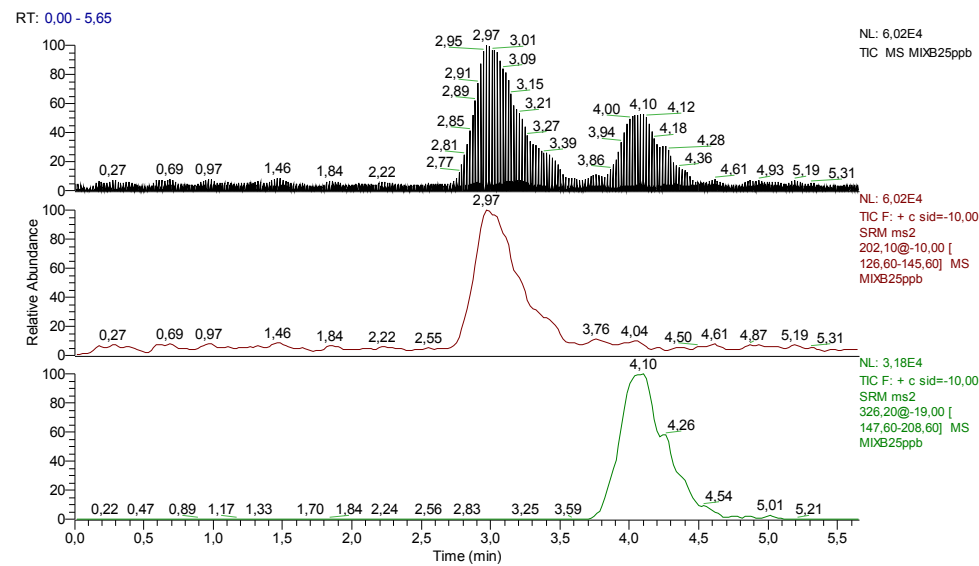
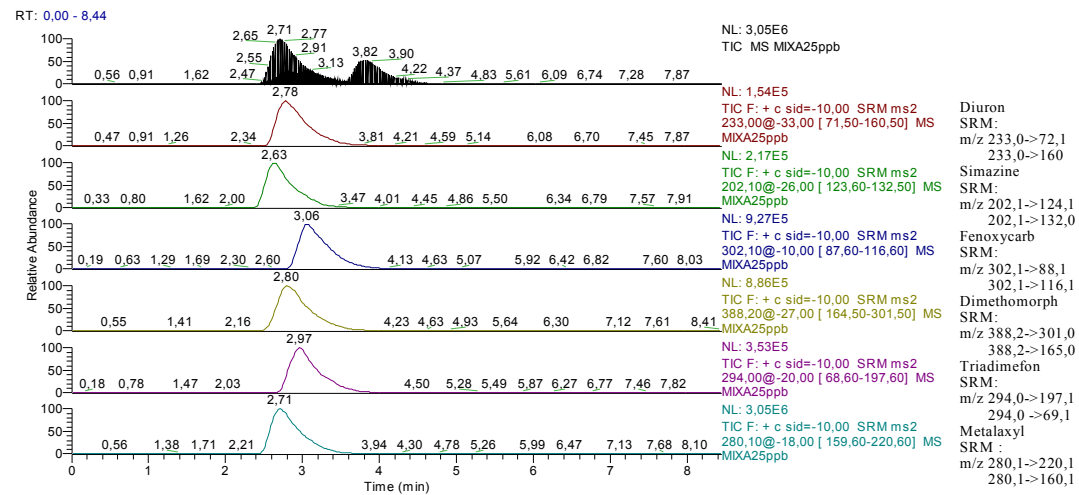
Από τον παραπάνω πίνακα παρατηρούμε ότι οι ανακτήσεις για τα περισσότερα γεωργικά φάρμακα κυμαίνονται μεταξύ 60 και 90%, με σχετικές τυπικές αποκλίσεις <10%. Η ακρίβεια και η επαναληψιμότητα της λειτουργίας του συστήματος είναι ικανοποιητικές κρίνοντας από τις τυπικές αποκλίσεις των ανακτήσεων. Οι τυπικές αυτές αποκλίσεις αναφέρονται στην συνολική λειτουργία του συστήματος και είναι μικρότερες από 10% για τα περισσότερα γεωργικά φάρμακα. Τις ανακτήσεις των γεωργικών φαρμάκων στο κρασί, τις επηρεάζει και η αιθανόλη που βρίσκεται μέσα στο κρασί. Για μείωση της αρνητικής επίδρασης αυτής, χρησιμοποιείται ως διαλύτης έκλουσης ο οξικός αιθυλεστέρας και το έκλουσμα έπειτα περνάει μέσα από cartridges με florasil, έτσι με αυτόν τον τρόπο μειώνεται η αρνητική επίδραση της μήτρας του δείγματος.

Σχήμα 3.3β. Χρωματογραφήματα από την ανάλυση (α) ενός τυφλού δείγματος (β) ενός πρότυπου διαλύματος μίγματος φυτοφαρμάκων σε συγκέντρωση 25 ng/ml.

(α) Τυφλό δείγμα.



(β) Πρότυπο διάλυμα μίγματος φυτοφαρμάκων σε συγκέντρωση 25 ng/ml



Τα παραπάνω χρωματογραφήματα, δείχνουν πως η αυξημένη εκλεκτικότητα του συστήματος διαδοχικής φασματομετρίας μαζών για όλα τα υπό μελέτη γεωργικά φάρμακα, καθιστά δυνατό το διαχωρισμό των ουσιών αυτών οι οποίες εμφανίζουν παραπλήσιους χρόνους έκλουσης. Από μια απλή σύγκριση μεταξύ των χρωματογραφημάτων, φαίνεται ότι το σύστημα διαδοχικής φασματομετρίας μαζών είναι πολύ εκλεκτικό, με αποτέλεσμα την ελαχιστοποίηση των παρεμβολών στην ανάλυση όλων των γεωργικών φαρμάκων από άλλες ουσίες που προέρχονται από την μήτρα του δείγματος.

3.4. ΟΡΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Το όριο ανίχνευσης (Limit of Detection, LOD) μιας ουσίας ορίζεται ως το κατώτερο επίπεδο συγκέντρωσης, που η ουσία αυτή μπορεί να ανιχνευτεί με λόγο σήματος προς θόρυβο (signal to noise ratio, S/N) $S/N = 3$. Το όριο ποσοτικού προσδιορισμού (Limit of Quantitation, LOQ) ορίζεται ως η χαμηλότερη συγκέντρωση στην οποία η ένωση μπορεί να ανιχνευτεί με λόγο σήματος προς θόρυβο $S/N = 10$.

Στον Πίνακα 3.4α παρουσιάζονται τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού, όπως αυτά υπολογίστηκαν με βάση τα δεδομένα των αναλύσεων προτύπων διαλυμάτων στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις.

Πίνακας 3.4α. Όρια ανίχνευσης (LOD) και όρια ποσοτικού προσδιορισμού (LOQ) για τα υπό μελέτη γεωργικά φάρμακα. Οι πειραματικές συνθήκες είναι ίδιες, όπως αναγράφονται στο κείμενο.

Γεωργικό Φάρμακο	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)
Diuron	0,40	1,40
Simazine	0,20	0,77
Fenoxycarb	0,03	0,10
Dimethomorph	0,03	0,10
Triadimefon	0,05	0,16
Metalaxyl	0,03	0,09
Carbaryl	0,02	0,08
Benalaxyl	0,04	0,12

Όπως φαίνεται στον πίνακα, τα όρια ανίχνευσης του οργάνου και ποσοτικού προσδιορισμού είναι αρκετά ικανοποιητικά. Αυτό οφείλεται κυρίως στην μεγάλη ευαισθησία του συστήματος διαδοχικής φασματομετρίας μαζών αλλά και στο γεγονός ότι όπως ήδη αναφέρθηκε, οι παρεμβολές στην ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των γεωργικών φαρμάκων είναι μικρές με αποτέλεσμα να επιτυγχάνονται πολύ καλά όρια ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού. Τα όρια ανίχνευσης για όλες τις ουσίες που εξετάζονται κυμαίνονται από 0,02 μέχρι 0,4 ng/ml. Τα όρια ποσοτικού προσδιορισμού για όλες τις ουσίες κυμαίνονται από 0,08 μέχρι 1,40 ng/ml.

Στον παρακάτω πίνακα (3.4β) παρουσιάζονται τα όρια ανίχνευσης και τα όρια ποσοτικού προσδιορισμού των υπό ανάλυση φυτοφαρμάκων, που έχουν προσδιοριστεί σε διάφορες έρευνες (βιβλιογραφία) καθώς και η μεθοδολογία ανίχνευσής τους, σε σύγκριση με τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού της παρούσας διατριβής.

Πίνακας 3.4β. Σύγκριση ορίων ανίχνευσης (LOD) και ορίων ποσοτικού προσδιορισμού (LOQ) των υπό μελέτη φυτοφαρμάκων της παρούσας διατριβής με την βιβλιογραφία.

*Καλύτερες τιμές LOD και LOQ βιβλιογραφίας από την παρούσα διατριβή.

Φυτοφάρμακο	Μεθοδολογία	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)	References
Diuron	LC-ESI-MS/MS	2.3		Rodrigues et.al.,2006
	GC-MS		10	Pang et.al.,2006
	LC-MS/MS		10	Pang et.al.,2006
	LC-ESI-MS/MS		100	Pizzuttin et.al.,2007
	SPME-HPLC-ESI-MS	0.08*		Wu et.al.,2002
	LOD (ng/ml) 0.40 LOQ (ng/ml) 1.40	LC-MS/MS		0.1*
Simazine	HPLC	0.003*	0.009*	Darchivio et.al.,2007
	isotope dilution gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) with automated solid-phase extraction (SPE)	0.002*		Planas et.al.,2006
	GC-MS		0.0125*	Pang et.al.,2006
	GC-MS		100	Alder et.al.,2006 (Agilent Technologies,1999 Fillion et al.,2000)
	LC-MS/MS		1.0	Alder et.al.,2006 (Baglio et al.,1999 Borba da Cunha et al.,2004)
	LOD (ng/ml) 0.20 LOQ (ng/ml) 0.77	Gas Chromatography/Mass Spectrometry and Flame Photometric Detection	0.02*	

Φυτοφάρμακο	Μεθοδολογία	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)	References
Fenoxycarb Αποτελέσματα παρούσας διατριβής LOD (ng/ml) 0.08 LOQ (ng/ml) 0.10	LC-ESI-MS/MS		10	Hernandez et.al.,2006
	GC-MS		75	Pang et.al.,2006
	LC-MS/MS		10	
	GC-MS		1,000	Alder et.al.,2006 (van Zoonen,1998 Ehrenstorfer GmbH,2005)
	LC-MS/MS		0.1	Alder et.al.,2006 (Klein & Alder,2003 Jansson et al.,2004)
	GC-MS-SIM GC-MS/MS	4 5		Flamini & Panighel,2005
Dimethomorph Αποτελέσματα παρούσας διατριβής LOD (ng/ml) 0.03 LOQ (ng/ml) 0.10	LC-ESI-MS/MS		10	Hernandez et.al.,2006
	GC-MS		1,000.0	Alder et.al.,2006 (Hengel & Shibamoto,2000 NIST/EPA/NIH,2005)
	LC-MS/MS		0.1	Alder et.al.,2006 (Sannino et al.,2004 Vidal et al.,2005)
Triadimefon Αποτελέσματα παρούσας διατριβής LOD (ng/ml) 0.05 LOQ (ng/ml) 0.16	LC-ESI-MS		10	Garcia et.al.,2004
	LC-MS/MS	0.75	7.5	Trosken et.al.,2005
	GC-MS		25	Pang et.al.,2006
	gas chromatography with electron-capture and nitrogen phosphorus detection	10	40	Jimenez et.al., 2001
	LC-ESI-MS/MS		100	Pizzutti et.al.,2007
	GC-MS		100	Alder et.al.,2006 (Agilent Technologies,1999 Fillion et al.,2000)
	LC-MS/MS		1.0	Alder et.al.,2006 (Hetherton et al.,2004 Lehotay et al.,2005)
	gas chromatography with electron-capture and nitrogen phosphorus detection	10	40	Jimenez et.al.,2001
	SPE-HPLC-APCI-MS	3	12	Nozal et.al.,2005
	Gas Chromatography/Mass Spectrometry and Flame Photometric Detection	0.02*		Okihashi et.al.,2005
	GC-MS-SIM	1000		Flamini&Panighel,2005
	GC-electron capture detection		9.4	Navarro et.al.,2000
SPME-HPLC-DAD		17	Millan et.al.,2003	

Φυτοφάρμακο	Μεθοδολογία	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)	References
Metolaxyl Αποτελέσματα παρούσας διατριβής LOD (ng/ml) 0.03 LOQ (ng/ml) 0.09	SPE(Oasis HLB)-HPLC-DAD	0.02*	0.06*	Darchivio et.al.,2007
	GC-MS		37.5	Pang et.al.,2006
	LC-MS/MS		2	
	LC-ESI-MS/MS		50	Pizzutti et.al.,2007
	GC-MS		1.0	Alder et.al.2006 (Agilent Technologies,1999 Fillion et al.,2000)
	LC-MS/MS		0.1	Alder et.al.,2006 (Klein & Alder,2003 Hetherton et al.,2004)
	Gas Chromatography/Mass Spectrometry and Flame Photometric Detection	0.02*		Okihashi et.al.,2005
	GC-MS-SIM	1000		Flamini & Panighel,2005
	HPLC-DAD	40	90	Otero et.al.,2003
GC-nitrogen phosphorus detection		41	Navarro et.al.,2000	
Carbaryl Αποτελέσματα παρούσας διατριβής LOD (ng/ml) 0.02 LOQ (ng/ml) 0.08	LC-MS/MS		20	Pang et.al.,2006
	LC-ESI-MS/MS		10	Pizzutti et.al.,2007
	SPME-HPLC-ESI-MS	0.04		Wu et.al., 2002
	GC-MS		1,000.0	Alder et.al.,2006 (Agilent Technologies,1999 Fillion et al.,2000)
	LC-MS/MS		0.1	[Alder et.al.,2006 (Taylor et.al.,2002 Zrostlikova et.al.,2003)
	Gas Chromatography/Mass Spectrometry and Flame Photometric Detection	0.04		Okihashi et.al.,2005
GC-MS-SIM	10000		Flamini & Panighel,2005	
Benalaxyl Αποτελέσματα παρούσας διατριβής LOD (ng/ml) 0.04 LOQ (ng/ml) 0.12	GC-MS		12.5	Pang et.al.,2006
	GC-MS		10	Alder et.al.,2006 (Agilent Technologies,1999 Fillionet al.,2000)
	LC-MS/MS		0.1*	Alder et.al.,2006 (BfR,2005)
	Gas Chromatography/Mass Spectrometry and Flame Photometric Detection	0.02*		Okihashi et.al.,2005
	GC-MS-SIM	1000		Flamini & Panighel,2005
	GC-nitrogen phosphorus detection		50.3	Navarro et.al.,2000

Σύμφωνα με το παραπάνω πίνακα με την παρούσα μέθοδο ανίχνευσης φυτοφαρμάκων επιτεύχθηκαν καλύτερες τιμές LOD και LOQ, σε σχέση με προηγούμενες μελέτες, για τα περισσότερα υπό μελέτη φυτοφάρμακα. Παρ' όλα αυτά, για το Diuron έχουν επιτευχθεί καλύτερα όρια ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού με μεθόδους ανίχνευσης που περιγράφονται στις βιβλιογραφικές αναφορές Wu et.al.,2002 και Alder et.al.,2006 (Baglio et al., 1999 Hernandez et al.2001). Το ίδιο συμβαίνει με το Simazine στις βιβλιογραφικές αναφορές Darchivio et.al.,2007, Planas et.al.,2006, Pang et.al.,2006 και Okihashi et.al.,2005,

με το Triadimefon στην βιβλιογραφική αναφορά Okihashi et.al.,2005, με το Metalaxyl στις βιβλιογραφικές αναφορές Darchivio et.al.,2007, Okihashi et.al.,2005, και με το Benalaxyl στις βιβλιογραφικές αναφορές Alder et.al.,2006 (BfR,2005) και Okihashi et.al.,2005.

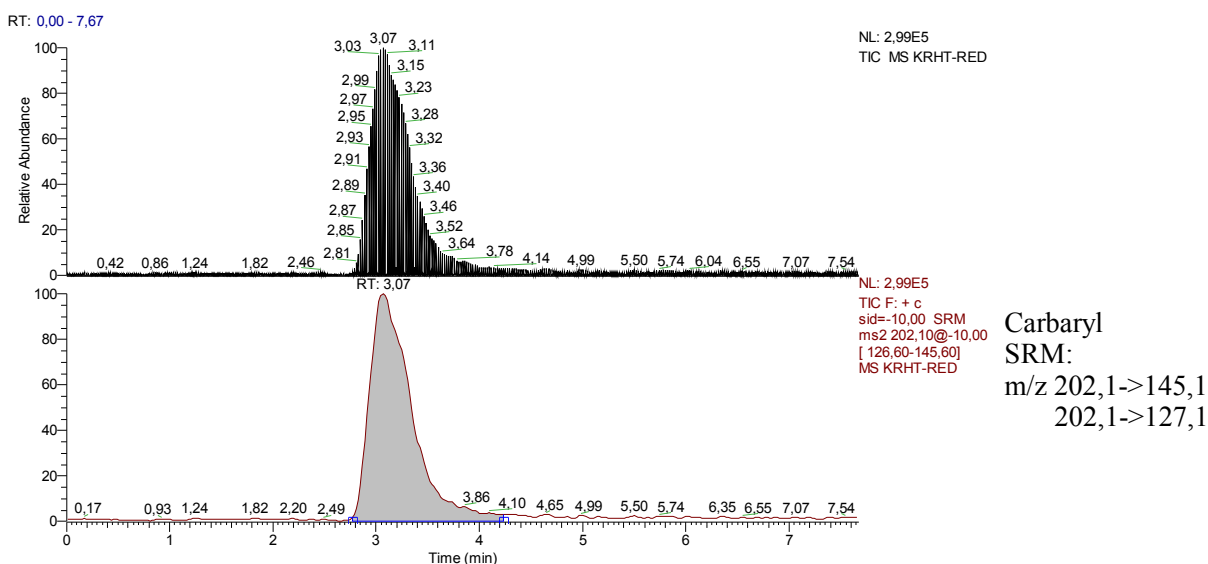
Αυτό συμβαίνει γιατί σε αυτές τις ερευνητικές μεθόδους έχουν επιλεγθεί φυτοφάρμακα παρόμοιων χημικών κατηγοριών, με αποτέλεσμα να μην υπάρχουν σημαντικές παρεμποδίσεις από φυτοφάρμακα διαφορετικών χημικών κατηγοριών. Στην παρούσα διατριβή τα φυτοφάρμακα διαφέρουν ως προς τις χημικές κατηγορίες που ανήκουν, με αποτέλεσμα να είναι πιο δύσκολο να επιτευχθούν βέλτιστες τιμές στα όρια ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού για όλα τα φυτοφάρμακα.

3.5. ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΚΡΑΣΙΟΥ

Μετά την βελτιστοποίηση της μεθόδου λειτουργίας του, το αναλυτικό σύστημα δοκιμάστηκε για ανάλυση 28 δειγμάτων κρασιού από περιοχές της βόρειας, κεντρικής και νότιας Ελλάδας καθώς και από κάποιες περιοχές του εξωτερικού. Αναλύθηκαν επίσης και τρία Βιολογικά δείγματα από την νότια Ελλάδα και ένα από την κεντρική Ελλάδα. Στο Σχήμα 3.5 παρουσιάζονται χρωματογραφήματα από δείγματα κρασιού.

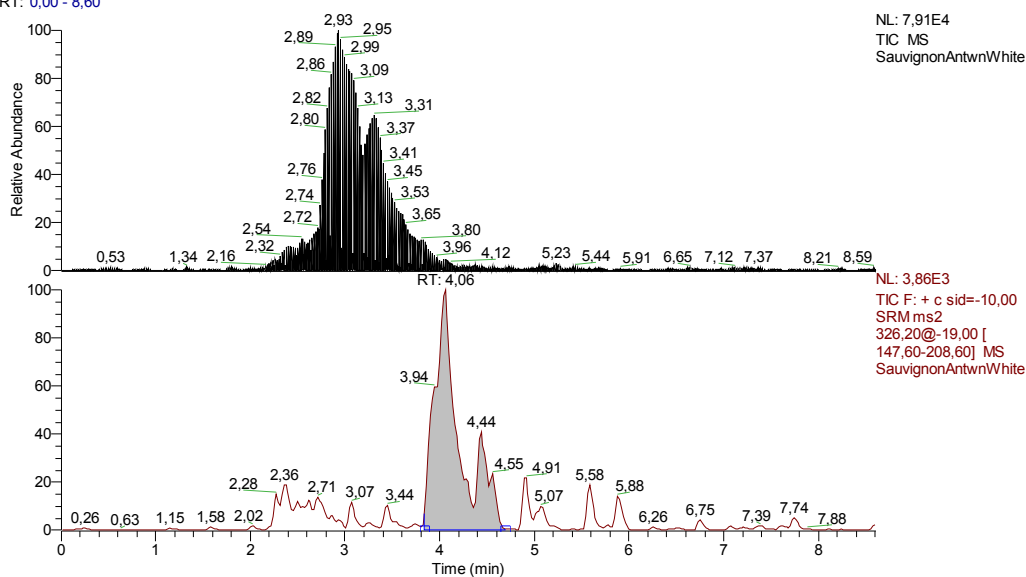
Σχήμα 3.5α. Χρωματογραφήματα δειγμάτων (α) Κρήτης, (β) Πελοποννήσου, (γ) Στερεάς Ελλάδας, (δ) Ηπείρου, (ε) Μακεδονίας και (στ) Εξωτερικού.

(α)Κρήτη



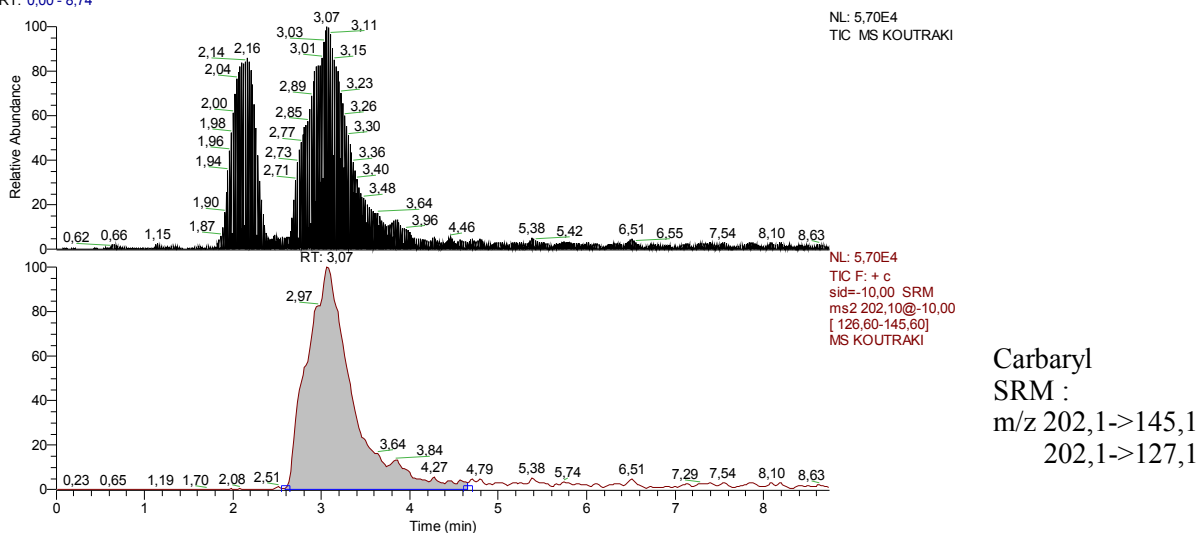
(β) Πελοπόννησος

RT: 0,00 - 8,60

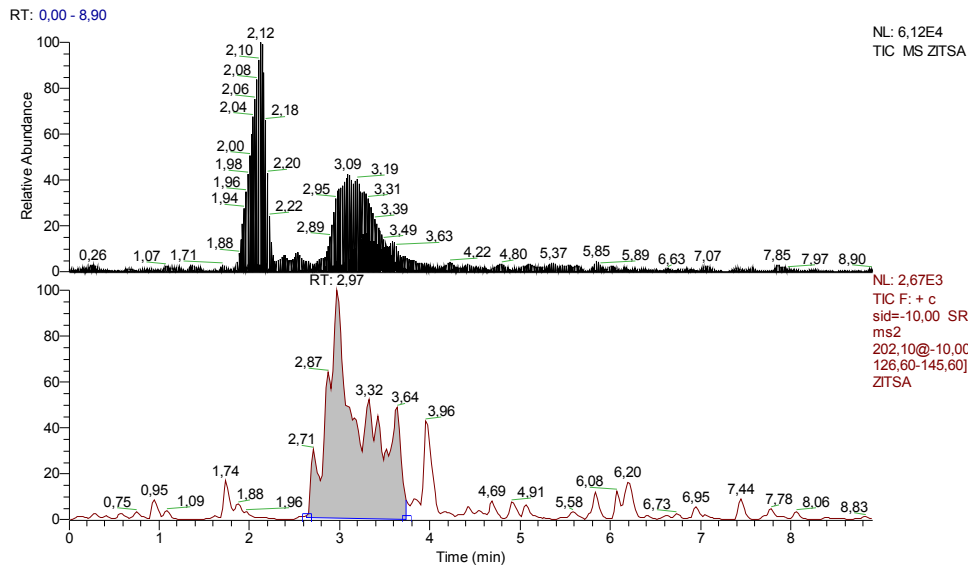


(γ) Στερεά Ελλάδα

RT: 0,00 - 8,74



(δ) Ήπειρος

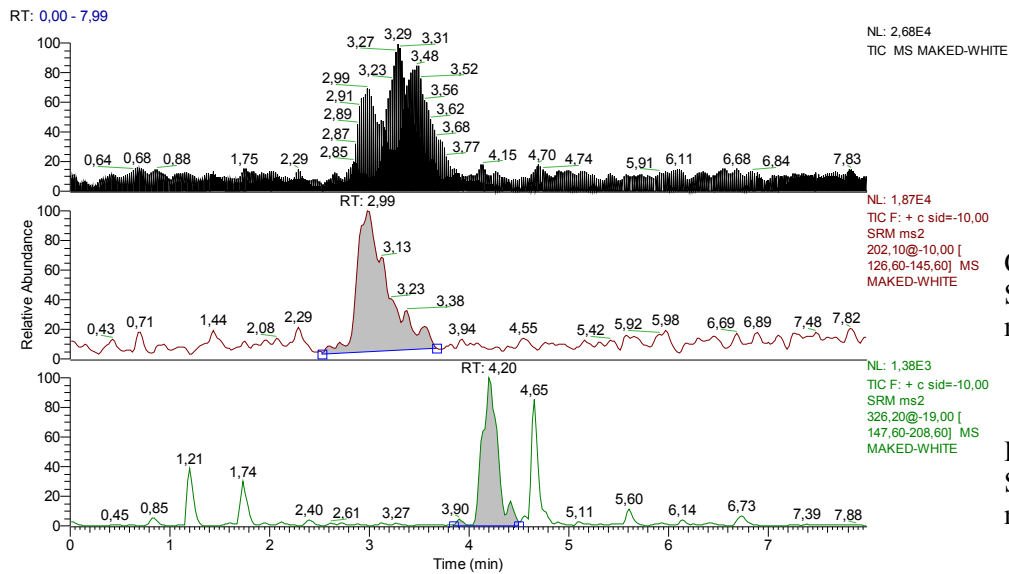


NL: 6,12E4
TIC MS ZTSA

NL: 2,67E3
TIC F: + c
sid=-10,00 SRM
ms2
202,10@-10,00 [
126,60-145,60] MS
ZTSA

Carbaryl
SRM:
m/z 202,1->145,1
202,1->127,1

(ε) Μακεδονία



NL: 2,68E4
TIC MS MAKED-WHITE

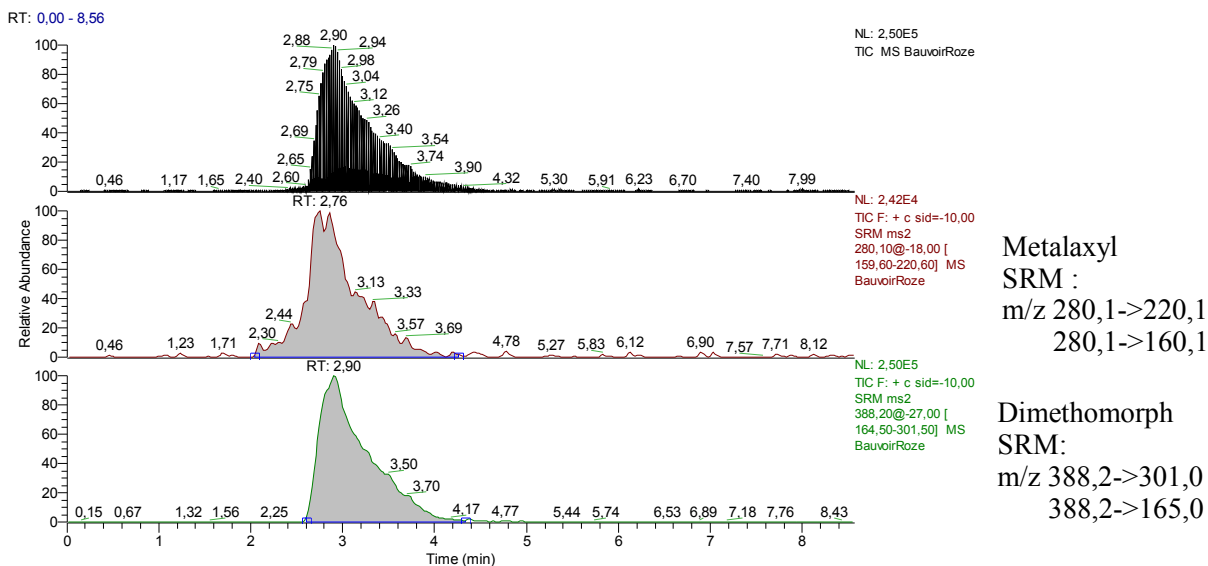
NL: 1,87E4
TIC F: + c sid=-10,00
SRM ms2
202,10@-10,00 [
126,60-145,60] MS
MAKED-WHITE

Carbaryl
SRM :
m/z 202,1->145,1
202,1->127,1

NL: 1,38E3
TIC F: + c sid=-10,00
SRM ms2
326,20@-19,00 [
147,60-208,60] MS
MAKED-WHITE

Benalaxyl
SRM :
m/z 326,2->148,1
326,2->208,1

(στ) Εξωτερικό



Όπως παρατηρούμε από τα χρωματογραφήματα αυτά, οι χρόνοι παραμονής των γεωργικών φαρμάκων στα δείγματα είναι κοντά με αυτούς των πρότυπων διαλυμάτων [βλ.σχήμα 3.3β.(β)].

Στα χρωματογραφήματα των δειγμάτων εμφανίζονται επίσης και μερικές άλλες μικρές σχετικά κορυφές των οποίων ο χρόνος παραμονής δεν συμπίπτει με κανένα γεωργικό φάρμακο, αλλά δεν δημιουργούν πρόβλημα στην ανίχνευση και στον ποσοτικό προσδιορισμό των γεωργικών φαρμάκων. Αυτές οι κορυφές πρόκειται για παρεμβολές που προέρχονται από την μήτρα του δείγματος, διότι δεν εμφανίζονται στα χρωματογραφήματα των πρότυπων διαλυμάτων γεωργικών φαρμάκων. Υπάρχουν επίσης και άλλες παρεμβολές που οφείλονται στους διαλύτες, πράγμα που πιστοποιείται από την ανάλυση ενός τυφλού δείγματος που περιέχει μόνο τους διαλύτες.

Για την ταυτοποίηση των κορυφών των φυτοφαρμάκων στα χρωματογραφήματα δειγμάτων κρασιού δεν επαρκεί η ταυτόχρονη παρακολούθηση δυο μεταβάσεων μάζας για κάθε φυτοφάρμακο αλλά θα πρέπει να ακολουθηθεί μια περεταίρω διαδικασία. Έτσι, υπολογίσαμε την % απόκλιση των χρόνων κατακράτησης (tR) των κορυφών των φυτοφαρμάκων στα δείγματα με αυτών σε πρότυπα διαλύματα. Όταν η % απόκλιση των χρόνων κατακράτησης είναι μικρότερη του 3% (<3%) τότε θεωρούμε ότι έχει πραγματοποιηθεί μια καλή χρωματογραφία. Αυτό όμως δεν επαρκεί για να πούμε με σιγουριά ότι έχει ανιχνευτεί κάποιο φυτοφάρμακο σε δείγμα κρασιού. Στη συνέχεια θα πρέπει να υπολογιστεί ο λόγος: ένταση κύριου θυγατρικού ιόντος φυτοφαρμάκου προς ένταση δευτερεύοντος θυγατρικού ιόντος σε δείγμα κρασιού και ο λόγος : ένταση κύριου θυγατρικού ιόντος φυτοφαρμάκου προς ένταση δευτερεύοντος θυγατρικού ιόντος σε πρότυπο δείγμα. Αυτό γίνεται για κάθε φυτοφάρμακο ξεχωριστά. Όταν η % απόκλιση των λόγων αυτών για ένα φυτοφάρμακο είναι μικρότερη από 20% και η απόκλιση των χρόνων

κατακράτησης δείγματος –προτύπου είναι <3% τότε μπορούμε να πούμε με σιγουριά ότι έχει ανιχνευτεί κάποιο φυτοφάρμακο στο δείγμα. Παρακάτω παρουσιάζονται πίνακες για όλα τα δείγματα, για φυτοφάρμακα που ανιχνεύτηκαν ή όχι, με βάση την παραπάνω διαδικασία.

Πίνακας 3.5α. Φυτοφάρμακα που δεν ανιχνεύτηκαν στα δείγματα με την παρούσα αναλυτική μέθοδο. (Με × σημειώνονται τα φυτοφάρμακα που δεν ανιχνεύτηκαν στα δείγματα και τα δείγματα με * αντιστοιχούν σε βιολογικά δείγματα.).

Περιοχή/ Δείγματα	Diuron	Simazine	Fenoxycarb	Dimethomorph	Triadimefon	Metalaxyl	Carbaryl	Benalaxyl
ΚΡΗΤΗ								
1	x	x	x	x	x		x	x
2	x	x	x	x	x	x		x
3*	x	x	x	x	x	x		x
4	x	x	x	x	x	x	x	x
5	x	x	x	x	x	x	x	x
6*	x	x	x	x		x	x	x
7	x	x	x	x		x		x
8	x	x	x	x	x	x		x
9*	x		x	x		x	x	x
10	x		x		x			x
11	x	x	x		x	x	x	x
ΠΕΛ/ΣΟΣ								
1	x	x	x	x	x	x	x	
2	x	x	x	x	x	x	x	x
3*	x	x	x		x	x	x	x
4		x	x				x	x
ΣΤ.ΕΛΛΑΔΑ								
1	x	x	x	x	x	x		x
2	x	x	x	x	x	x		x
ΗΠΕΙΡΟΣ								
1	x	x	x	x	x	x		x
2	x	x	x	x	x	x	x	
ΜΑΚ/ΝΙΑ								
1	x	x	x	x	x	x		
2	x	x	x	x	x	x		x
3	x	x	x	x	x	x		x
ΕΞΩΤΕΡΙΚΟ								
1	x	x	x	x		x	x	x
2	x		x		x		x	x
3	x	x	x	x	x		x	
4	x	x	x		x	x	x	x
5			x	x	x		x	x
6	x	x	x	x	x	x	x	x

* (Τα φυτοφάρμακα που ανιχνεύτηκαν ή η ύπαξή τους δεν μπορεί να αποκλιστεί, αναφέρονται αναλυτικά σε παρακάτω πίνακες.)

Σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα (πίνακας 3.5α), παρατηρούμε ότι πολλά από τα υπό εξέταση φυτοφάρμακα δεν ανιχνεύθηκαν καθόλου στα χρωματογραφήματα των δειγμάτων ή οι κορυφές που εμφανίζονται σε αυτά δεν αντιστοιχούν σε φυτοφάρμακο αφού οι τιμές της απόκλισης του χρόνου κατακράτησης και του λόγου των εντάσεων των κορυφών των ιόντων βρίσκονται εκτός ορίων, εμφανίζουν δηλαδή >3% απόκλιση tR και >20% απόκλιση οι λόγων των εντάσεων των κορυφών των ιόντων. Εάν η % απόκλιση των λόγων των εντάσεων των κορυφών των ιόντων είναι εντός ορίων αλλά η % απόκλιση του χρόνου κατακράτησης είναι εκτός ορίων (>3%), τότε απορρίπτουμε και πάλι την ύπαρξη του φυτοφαρμάκου στο δείγμα, αφού πρωταρχικός ρόλος για την ύπαρξη του είναι να βρίσκεται εντός των ορίων της % απόκλισης του tR (<3%). Επίσης παρατηρούμε ότι σε 4 από τα 28 δείγματα δεν ανιχνεύθηκαν κανένα από τα υπό μελέτη φυτοφάρμακα. Αυτά είναι, τα δείγματα 4 και 5 από την Κρήτη, το δείγμα 2 από την Πελοπόννησο και το δείγμα 6 από το Εξωτερικό.

Στον πίνακα 3.5β. παρουσιάζονται τα δείγματα εκείνα όπου ανιχνεύθηκαν κορυφές αλλά δεν αντιστοιχούν στην πραγματικότητα σε κάποιο φυτοφάρμακο, σύμφωνα με τα παραπάνω.

Πίνακας 3.5β. Φυτοφάρμακα που αποκρίστηκαν για την ύπαρξή τους στα δείγματα, με % απόκλιση tR >3%.

Περιοχή/ Δείγματα	Φυτοφάρμακο	Απόκλιση % tR	Απόκλιση % εντάσεων ιοντικών κορυφών
ΚΡΗΤΗ			
1	Dimethomorph	6,04	9,98
4	Metalaxyl	11,15	18,22
7	Metalaxyl	8,75	7,90
8	Metalaxyl	17,13	5,40
9	Metalaxyl	6,69	17,77
ΠΕΛ/ΣΟΣ			
1	Metalaxyl	7,51	12,53
4	Simazine	5,20	13,79
	Carbaryl	5,69	2,79
	Benalaxyl	4,06	0,05
ΗΠΕΙΡΟΣ			
1	Metalaxyl	12,30	6,22
2	Metalaxyl	17,13	12,38
ΕΞΩΤΕΡΙΚΟ			
1	Metalaxyl	30,29	17,91
3	Dimethomorph	7,28	13,46
	Carbaryl	9,59	7,67

Στον παραπάνω πίνακα παρατηρούμε ότι οι κορυφές που ανιχνεύτηκαν σε αυτά τα φυτοφάρμακα δεν αντιστοιχούν στην πραγματικότητα σε αυτά, αφού οι % αποκλίσεις των χρόνων κατακράτησης τους βρίσκονται εκτός ορίων (>3%), παρ'όλο που οι αποκλίσεις % εντάσεων ιοντικών κορυφών είναι εντός ορίων.

Στον πίνακα 3.5γ. παρουσιάζονται τα φυτοφάρμακα που η ύπαρξή τους δεν μπορεί να αποκλιστεί στα δείγματα.

Πίνακας 3.5γ. Φυτοφάρμακα που πιθανόν να υπάρχουν στα δείγματα.

Περιοχή/ Δείγματα	Φυτοφάρμακο	Απόκλιση % tR	Απόκλιση % εντάσεων κορυφών
ΚΡΗΤΗ			
1	Metalaxyl	2,17	45,55
2	Carbaryl	3,88	31,83
3*	Carbaryl	0,67	112,90
6*	Triadimefon	2,77	88,24
7	Triadimefon	3,26	92,42
	Carbaryl	2,06	64,09
8	Carbaryl	3,26	33,12
9*	Simazine	2,73	53,79
	Triadimefon	1,98	87,50
10	Simazine	1,94	60,86
	Dimethomorph	1,08	206,53
	Metalaxyl	0,37	83,32
	Carbaryl	1,33	66,08
11	Dimethomorph	0,00	44,21
ΠΕΛ/ΣΟΣ			
3*	Dimethomorph	1,75	24,52
4	Diuron	2,11	96,16
	Dimethomorph	3,45	4,71
	Triadimefon	0,68	94,16
	Metalaxyl	0,37	33,91
ΣΤ.ΕΛΛΑΔΑ			
1	Carbaryl	3,26	31,36
2	Carbaryl	1,33	49,92
ΗΠΕΙΡΟΣ			
1	Carbaryl	0,00	22,54
2	Benalaxyl	2,50	70,62
ΜΑΚ/ΝΙΑ			
1	Benalaxyl	2,38	80,53
3	Carbaryl	1,33	22,26

Περιοχή/ Δείγματα	Φυτοφάρμακο	Απόκλιση % tR	Απόκλιση % εντάσεων κορυφών
ΕΞΩΤΕΡΙΚΟ			
1	Triadimefon	3,26	84,47
2	Simazine	1,15	49,45
3	<i>Dimethomorph</i>	3,45	26,79
	Metalaxyl	1,09	29,22
	Benalaxyl	2,50	28,84
4	Dimethomorph	2,78	75,19
5	Diuron	2,96	92,59
	Simazine	1,87	34,05
	Metalaxyl	1,09	61,15

Στον παραπάνω πίνακα παρουσιάζονται τα φυτοφάρμακα που η ύπαρξή τους δεν μπορεί να αποκλιστεί στα 24 δείγματα. Τα 4 από αυτά, αποτελούν βιολογικά κρασιά. Τα περισσότερα από αυτά βρίσκονται εντός ορίων της % απόκλισης του χρόνου κατακράτησης tR (<3%). Αυτό μας δείχνει ότι έχουμε μια καλή χρωματογραφική ανάλυση και μπορούμε να πούμε ότι πιθανόν να υπάρχουν αυτά τα φυτοφάρμακα στα δείγματα. Πα'όλα αυτά δεν μπορούμε να το πούμε με σιγουριά αφού η % απόκλιση των εντάσεων των ιοντικών τους κορυφών απέχει πολύ από τα όρια για τα περισσότερα από αυτά. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε διάφορες παρεμποδίσεις, όπως παρεμποδίσεις από την μήτρα του δείγματος. Στον παραπάνω πίνακα τα φυτοφάρμακα με πλάγια γράμματα παρουσιάζουν τιμες πάρα πολύ κοντα στα όρια της % απόκλισης του χρόνου κατακράτησης tR και της % απόκλισης των εντάσεων των ιοντικών τους κορυφών χωρίς όμως να είναι εντός ορίων. Μπορούμε να πούμε και σε αυτά τα φυτοφάρμακα οτι πιθανόν να υπάρχουν αφού οι αποκλίσεις τους από τα όρια είναι αρκετά μικρές και μπορεί να είναι αποτέλεσμα παρεμποδίσεων.

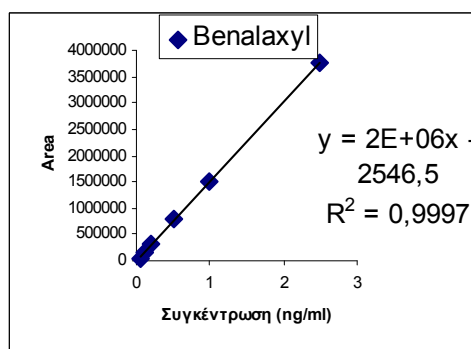
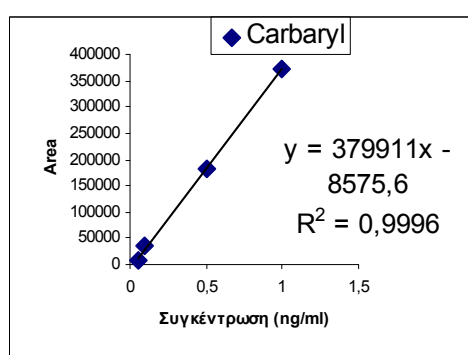
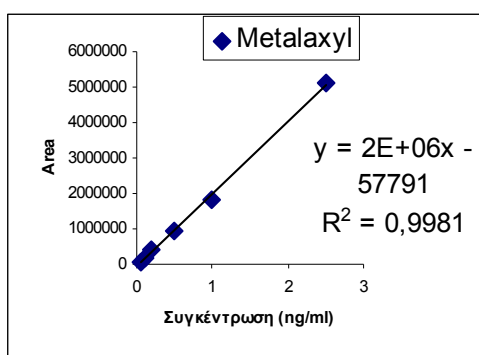
Στον Πίνακα 3.5δ. παρουσιάζονται τα φυτοφάρμακα που ανιχνεύτηκαν στα δείγματα.

Πίνακας 3.5δ. Φυτοφάρμακα που ανιχνεύτηκαν στα δείγματα.

Περιοχή/ Δείγματα	Φυτοφάρμακο	Απόκλιση % tR	Απόκλιση % εντάσεων κορυφών
ΠΕΛ/ΣΟΣ			
1	Benalaxyl	0,99	4,68
ΜΑΚ/ΝΙΑ			
1	Carbaryl	0,67	11,81
2	Carbaryl	1,98	0,76
ΕΞΩΤΕΡΙΚΟ			
2	Metalaxyl	1,81	10,96

Στον παραπάνω πίνακα υπάρχουν τα φυτοφάρμακα που ανιχνεύθηκαν σε δείγματα κρασιού. Σε αυτά παρατηρούμε ότι η % απόκλιση του χρόνου κατακράτησης και η % απόκλιση των λόγων των εντάσεων των ιοντικών κορυφών είναι εντός ορίων, έτσι μπορούμε να πούμε με σιγουριά, σύμφωνα με όσα προαναφέραμε, ότι υπάρχουν στα δείγματα.

Οι τιμές της συγκέντρωσης των φυτοφαρμάκων στα άγνωστα δείγματα υπολογίζονται από καμπύλες αναφοράς προσαρμοσμένες στα επίπεδα των συγκεντρώσεων αυτών.



Παρακάτω στον Πίνακα 3.5ε παρουσιάζονται συνοπτικά για τα δείγματα οι συγκεντρώσεις των φυτοφαρμάκων που βρέθηκαν σε αυτά ανά περιοχή.

Πίνακας 3.5ε. Συγκεντρώσεις σε ppb (ng/ml) φυτοφαρμάκων που ανιχνεύθηκαν ανά περιοχή

Περιοχή	Δείγματα	Metalaxyl	Carbaryl	Benalaxyl
ΠΕΛ/ΣΟΣ				
	1			0,04
ΜΑΚ/ΝΙΑ				
	1		0,095	
	2		0,233	
ΕΞΩΤΕΡΙΚΟ				
	2	0,051		

Από τον παραπάνω πίνακα παρατηρούμε ότι στο δείγμα της Πελοποννήσου το φυτοφάρμακο Benalaxyl, ανιχνεύτηκε σε ποσότητα ίση με το όριο ανίχνευσης του φυτοφαρμάκου (0,04ppb). Στα δείγματα από την περιοχή της Μακεδονίας ανιχνεύτηκε το φυτοφάρμακο Carbaryl. Στο δείγμα 1, ανιχνεύτηκε σε συγκέντρωση κοντά στο όριο ανίχνευσης του φυτοφαρμάκου (0,02ppb), ενώ στο δείγμα 2 αρκετά πιο πάνω από το όριο ανίχνευσης. Τέλος, στο δείγμα από το εξωτερικό το φυτοφάρμακο Metalaxyl, ανιχνεύτηκε σε συγκέντρωση κοντά στο όριο ανίχνευσης του φυτοφαρμάκου (0,03 ppb).

Οι συγκεντρώσεις των φαρμάκων που ανιχνεύτηκαν, ήταν πάντα κάτω από τα ανώτατα αποδεκτά όρια της Ε.Ε. (Maximum Residue Limit, MRL) ή από τα προβλεπόμενα όρια που έχουν καθοριστεί στην χώρα μας αλλά και σε πολλές άλλες χώρες όσο αναφορά το οινοποιήσιμο σταφύλι. Για δείγματα κρασιού δεν έχουν καθοριστεί προς το παρόν (Millan et.al.,2003-Soleas et.al.,2000-Navarro et.al.,2000-Τούντα,2005). Έχοντας όμως, υπόψιν αυτά των οινοποιήσιμων σταφυλιών μπορούμε να βγάλουμε συμπέρασμα υπολογίζοντας ότι στο κρασί θα πρέπει να είναι ακόμα χαμηλότερα, αφού μετά την επεξεργασία που έχει υποστεί το οινοποιήσιμο σταφύλι οι ποσότητες των φυτοφαρμάκων έχουν μειωθεί. Υπάρχει μια παγκόσμια τάση προς τη ρύθμιση συγκεκριμένου, χαμηλότερου MRLs για τα φυτοφάρμακα στο κρασί, το οποίο θα κυμαινόταν από 0,01 έως 2 mg/kg για τα διάφορα φυτοφάρμακα (Millan et.al.,2003) .

Τα επιτρεπόμενα όρια για τα φυτοφάρμακα στο κρασί προσεγγίζουν το φάσμα 0,1 –1 mg/l στις περισσότερες περιπτώσεις, όμως σε μερικές περιπτώσεις επιτρέπονται όρια μέχρι 5 mg/l (Soleas et.al.,2000) .

Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται τα ανώτατα αποδεκτά όρια για τα υπό εξέταση φυτοφάρμακα στο οινοποιήσιμο σταφύλι όπως αυτά έχουν δοθεί από την Ε.Ε. ή έχουν καθοριστεί στη χώρα μας αλλά και σε πολλές άλλες χώρες (WHO,2000-Pico et.al.,2005)

Πίνακας 3.5στ. Ανώτατα αποδεκτά όρια φυτοφαρμάκων για το οινοποιήσιμο σταφύλι.

Γεωργικό φάρμακο	MRL (mg/Kg-ppm) οινοποιήσιμου σταφυλιού
Diuron	<0,5
Simazine	0,1
Fenoxycarb	1
Dimethomorph	0,01-0,5
Triadimefon	2
Metalaxyl	1
Carbaryl	0,05
Benalaxyl	0,2

Τα φυτοφάρμακα που επιλέχθηκαν να ανιχνευτούν θεωρούνται όλα πολύ χρησιμοποιούμενα στην καλλιέργεια του αμπελιού. Όμως τρία από αυτά, το Dimethomorph, το Metalaxyl και το Benalaxyl, τα οποία ανήκουν στην κατηγορία των μυκητοκτόνων, παρουσιάζουν εκτεταμένη χρήση αν και είναι απαγορευμένα. Τα Metalaxyl και Benalaxyl ανιχνεύτηκαν σε δυο από τα δείγματα κοντά στα όρια ανίχνευσης της τεχνικής.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στα πλαίσια της εργασίας αυτής αναπτύχθηκε μια βελτιστοποιημένη μέθοδος, που βασίζεται σε υγρή χρωματογραφική ανάλυση σε συνδυασμό με σύστημα διαδοχικής φασματομετρίας μαζών, για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό ενός ευρέως φάσματος χημικών ομάδων γεωργικών φαρμάκων σε διάφορα δείγματα κρασιού. Η μέθοδος έχει βελτιστοποιηθεί για την ανάλυση 8 γεωργικών φαρμάκων σε δείγματα κρασιού. Η πολυπολεμιακή αυτή μέθοδος είναι απλούστερη, ταχύτερη, πιο αποτελεσματική και ευαίσθητη. Η ανάλυση συνδυάζει απλότητα, ευαισθησία και εξαιρετική διαχωριστική ικανότητα. Η παρούσα μέθοδος είναι ταχύτερη έναντι άλλων πολυδυναμικών αναλυτικών μεθόδων (ο απαιτούμενος χρόνος ανάλυσης είναι 7 min), για αυτό και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε αναλύσεις ρουτίνας. Επειδή δεν απαιτεί πολλά προκαταρκτικά στάδια, οι συνήθεις εργαστηριακές εργασίες προετοιμασίας του δείγματος περιορίζονται στο ελάχιστο, με αποτέλεσμα το σφάλμα, λόγω απωλειών στο δείγμα, να είναι μικρότερο.

Η αυξημένη εκλεκτικότητα του συστήματος διαδοχικής φασματομετρίας μαζών συνδυασμένου με την τεχνική του ηλεκτροψεκασμού, καθιστά δυνατό το διαχωρισμό ουσιών οι οποίες εμφανίζουν παραπλήσιους χρόνους έκλουσης και την ελαχιστοποίηση των παρεμβολών στην ανάλυση από άλλα συστατικά του δείγματος. Η ακρίβεια και η επαναληψιμότητα της λειτουργίας του συστήματος είναι ικανοποιητικές κρίνοντας από τις τυπικές αποκλίσεις των ανακλήσεων. Οι τυπικές αυτές αποκλίσεις αναφέρονται στη συνολική λειτουργία του συστήματος και είναι μικρότερες από 10%. Η μεγάλη ευαισθησία του φασματομέτρου μάζας, στο οποίο στηρίζεται η προτεινόμενη μέθοδος, καθιστά δυνατή την ανίχνευση των γεωργικών φαρμάκων σε πολύ χαμηλά επίπεδα.

Στην παρούσα διατριβή διενεργήθηκε εργαστηριακός έλεγχος σε 28 δείγματα κρασιού από την νότια, κεντρική και βόρεια Ελλάδα καθώς και από το εξωτερικό. Τέσσερα από αυτά τα δείγματα ήταν βιολογικά κρασιά. Από τα 28 δείγματα μπορούμε να πούμε με σιγουριά ότι τα 4 περιείχαν φυτοφάρμακα, σε συγκεντρώσεις όμως κοντά στα όρια ανίχνευσης και κάτω από τα ανώτατα επιτρεπτά όρια που έχουν οριστεί για τα συγκεκριμένα φυτοφάρμακα στο οινοποιήσιμο σταφύλι. Αυτά είναι, το δείγμα 1 της Πελοποννήσου όπου περιείχε το φυτοφάρμακο Benalaxyl, τα δείγματα 1 και 2 της Μακεδονίας όπου περιείχαν το φυτοφάρμακο Carbaaryl και το δείγμα 2 από το εξωτερικό όπου περιείχε το φυτοφάρμακο Metalaxyl. Ακόμη, σε 4 δείγματα δεν ανιχνεύτηκαν κανένα από τα υπό μελέτη φυτοφάρμακα. Αυτά είναι, τα δείγματα 4 και 5 από την Κρήτη, το δείγμα 2 της Πελοποννήσου και το δείγμα 6 από το εξωτερικό. Τα 20 από τα 28 δείγματα, εκ' των οποίων και τα 4 βιολογικά, πιθανόν να περιέχουν κάποια φυτοφάρμακα

χωρίς όμως να είναι σίγουρο, έτσι μπορούμε να περιοριστούμε στην ποιοτική μόνο ανάλυση τους.

Το φυτοφάρμακο Fenoxycarb δεν ανιχνεύτηκε σε κανένα από τα δείγματα. Συνοψίζοντας τα πειραματικά αποτελέσματα, μπορούμε να πούμε ακόμη ότι τα φυτοφάρμακα Metalaxyl και Benalaxyl, όντας απαγορευμένα αλλά πολύ χρησιμοποιούμενα φυτοφάρμακα, ανιχνεύτηκαν σε δυο από τα δείγματα.

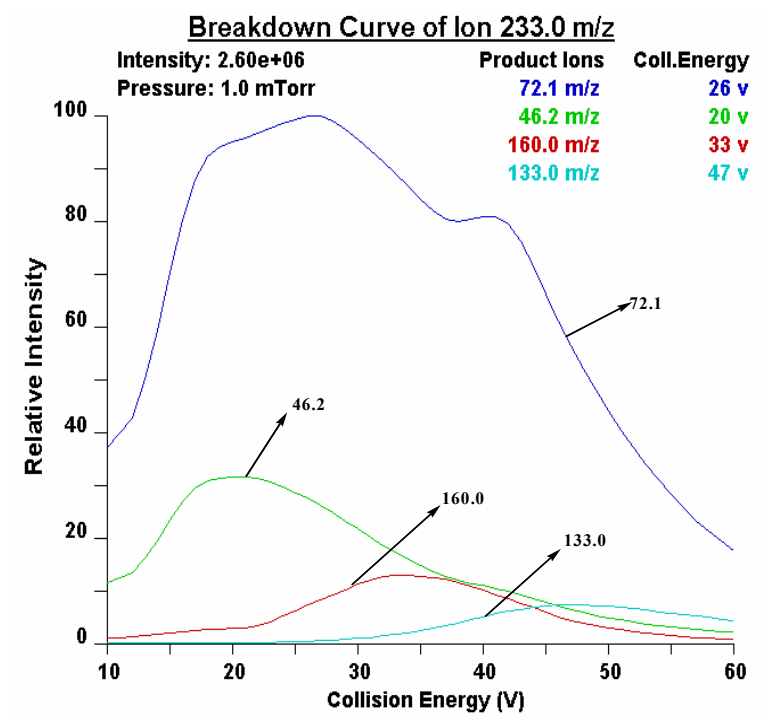
Η χρήση των φυτοφαρμάκων έχει συνδεθεί με την έξαρση που έχουμε τις τελευταίες δεκαετίες στα αυτοάνοσα ή τα τεράστια προβλήματα στην γονιμότητα των ζευγαριών. Αυτές οι ουσίες είναι συνηθέστερα ενδοκρινικοί διαταράκτες, που μιμούνται τα οιστρογόνα με αποτέλεσμα να προκαλούν διαταραχές στα χαρακτηριστικά των δυο φύλων και να επιδρούν στην γονιμότητα τον ειδών (*Ιωάννα Ηλιοπούλου-Γεωργουδάκη, οικοτοξικολόγος και καθηγήτρια Βιολογίας στο Πανεπιστήμιο Πατρών*).

Από την εργαστηριακή έρευνα της παρούσας διατριβής, τα αποτελέσματα είναι αρκετά καθησυχητικά, αφού μόνο σε τέσσερα από τα 28 δείγματα κρασιού ανιχνεύτηκαν φυτοφάρμακα και αυτά σε πάρα πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις.

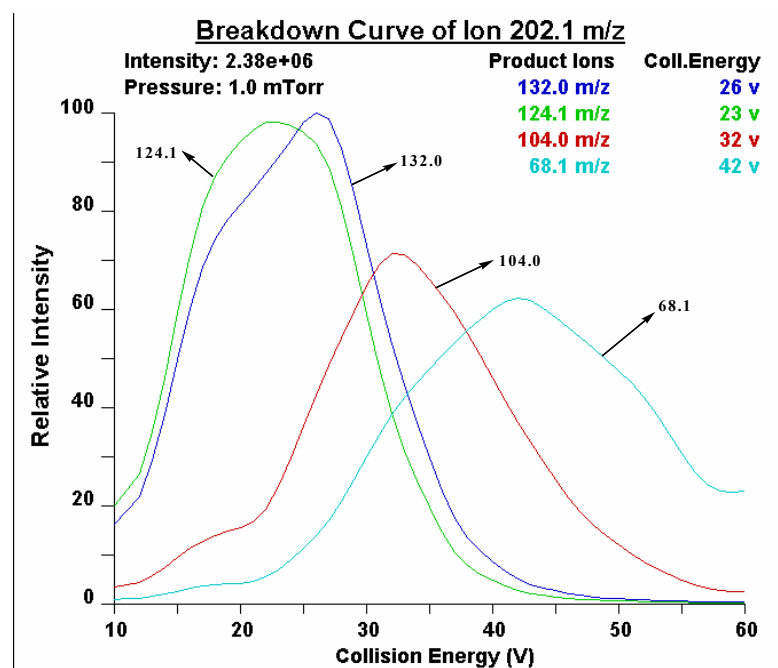
Έρευνες για την ανίχνευση φυτοφαρμάκων σε δείγματα κρασιού δεν έχουν γίνει πάρα πολλές, ενώ στην Ελλάδα είναι πολύ λιγότερες. Παρόλα αυτά, υπάρχει ένα αυξανόμενο ενδιαφέρον προς αυτή την κατεύθυνση και οι έρευνες αυξάνονται διαρκώς. Στην παρούσα διατριβή, η αναλυτική μέθοδος που αναπτύχθηκε για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων στο κρασί, μπορεί να βελτιωθεί περισσότερο και να γίνει ακόμη πιο αξιόπιστη και ακριβής.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α

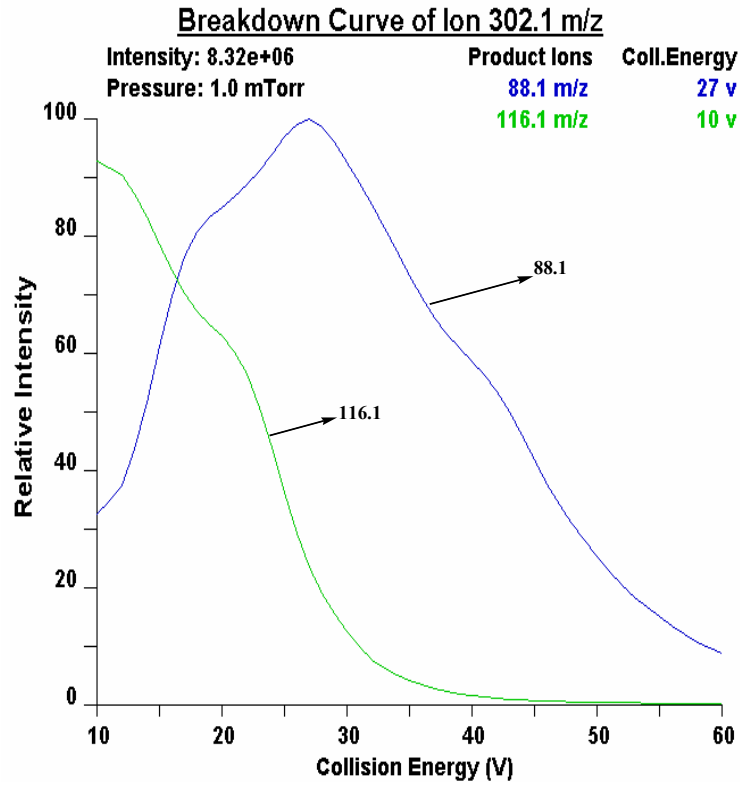
Καμπύλες θραυσματοποίησης (Breakdown curve) των υπό μελέτη γεωργικών φαρμάκων.



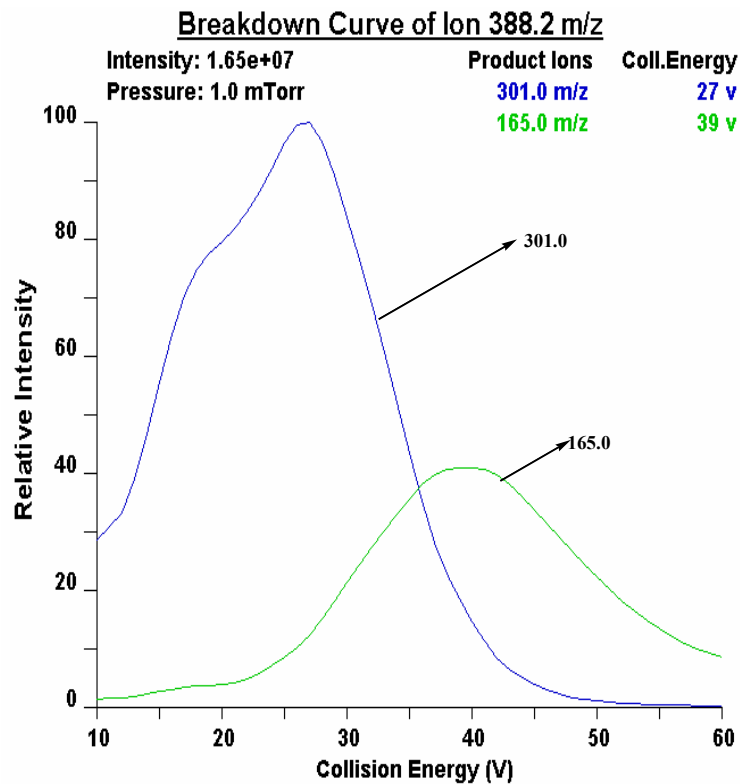
Καμπύλη θραυσματοποίησης Diuron.



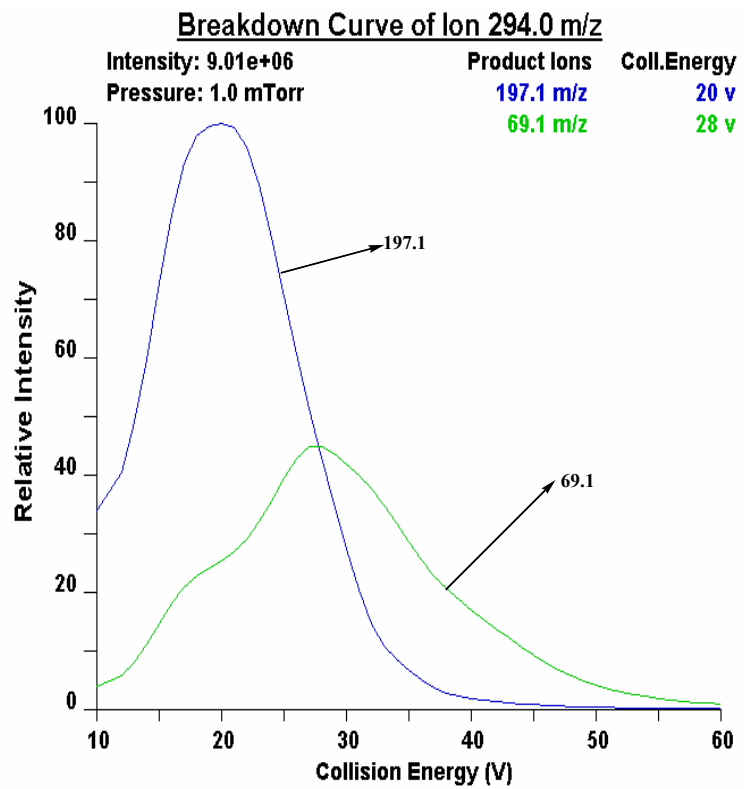
Καμπύλη θραυσματοποίησης Simazine.



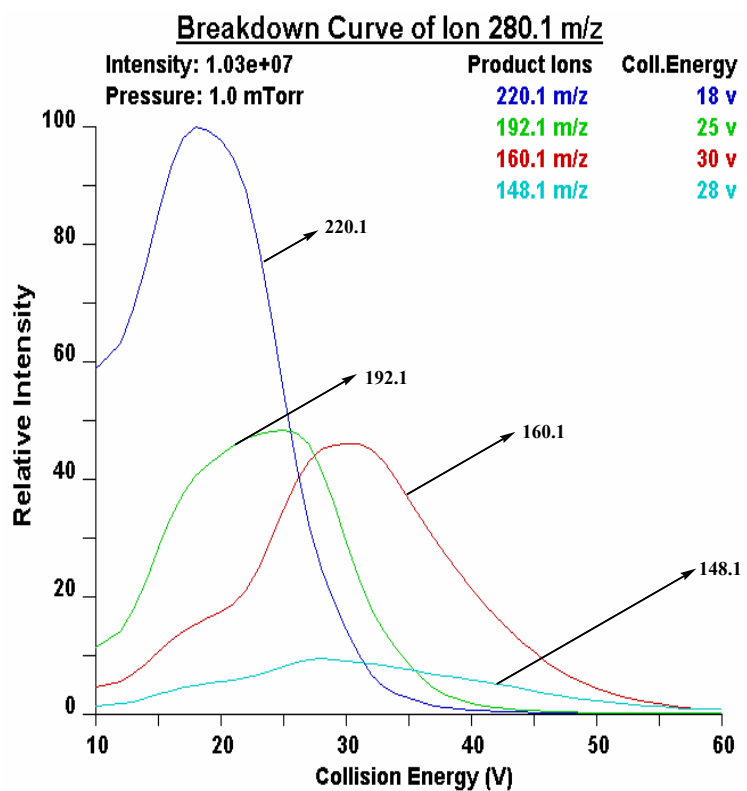
Καμπύλη θραυσματοποίησης Fenoxycarb.



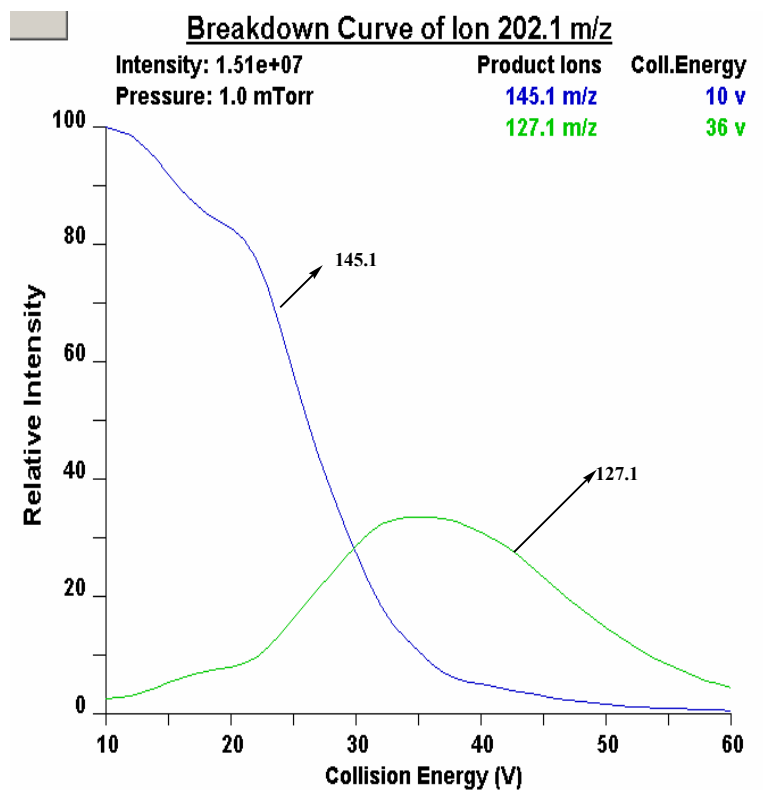
Καμπύλη θραυσματοποίησης Dimethomorph.



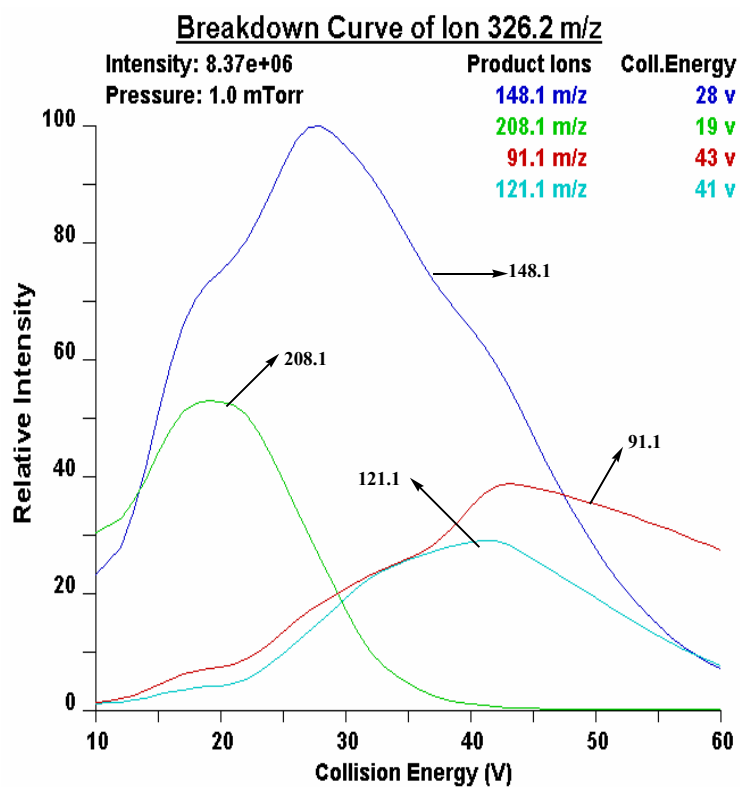
Καμπύλη θραυσματοποίησης Triadimefon.



Καμπύλη θραυσματοποίησης Metalaxyl.



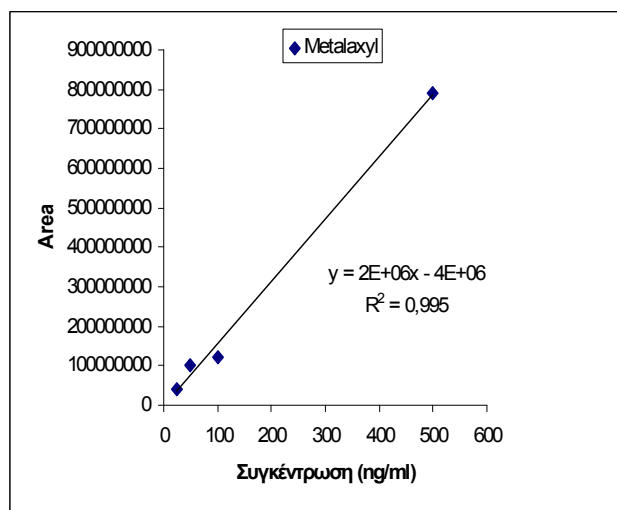
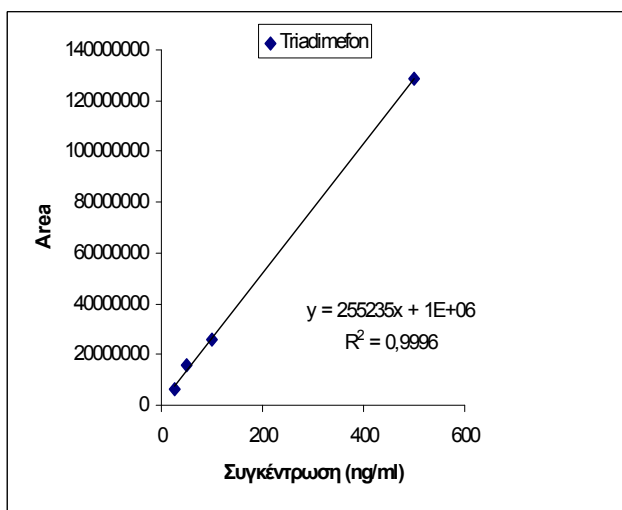
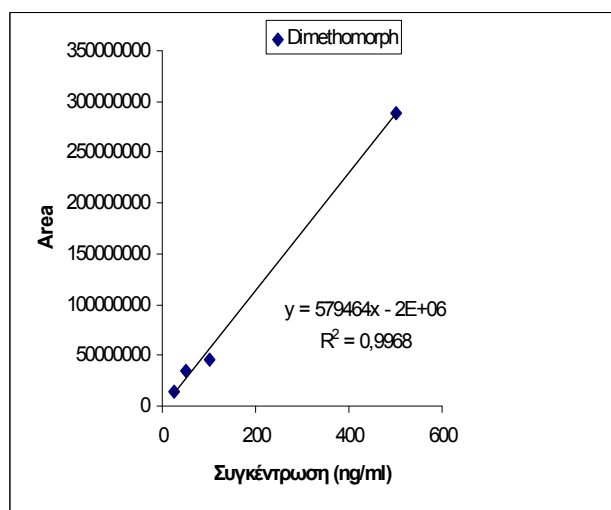
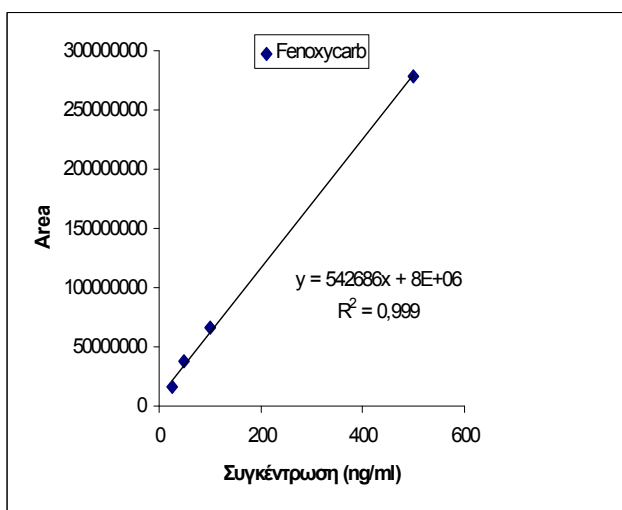
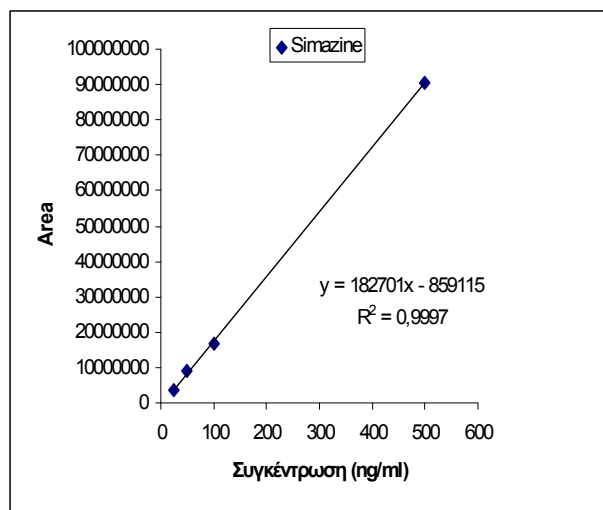
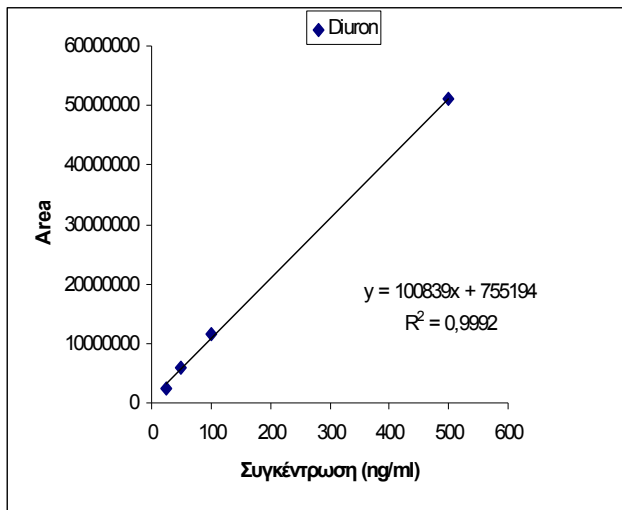
Καμπύλη θραυσματοποίησης Carbaryl.

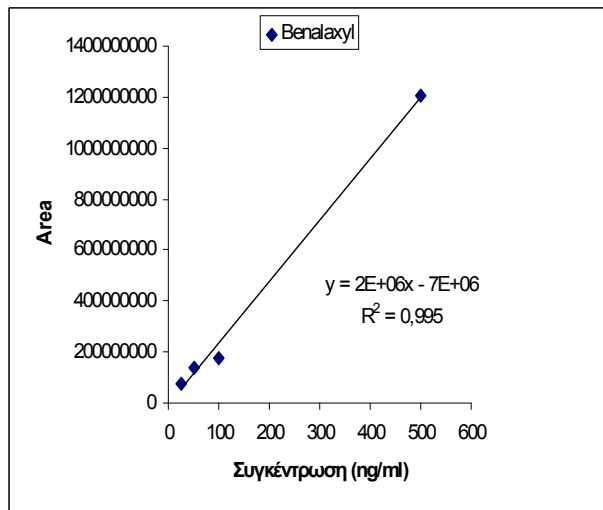
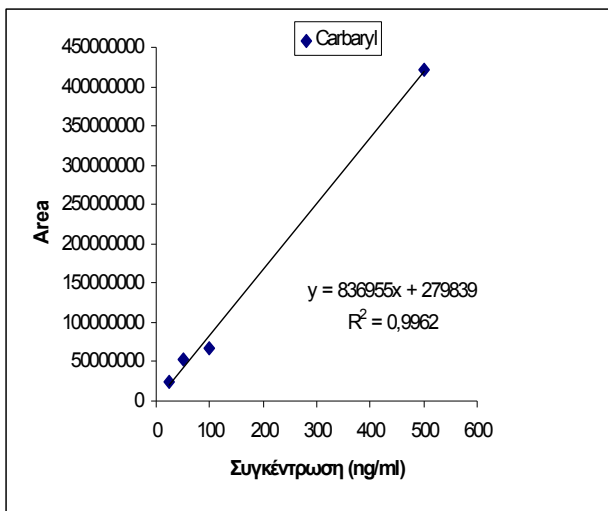


Καμπύλη θραυσματοποίησης Benalaxyl.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β

Καμπύλες αναφοράς γεωργικών φαρμάκων.





5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξένη

Abad A., Moreno M.J. , Pelegri R., Martvnez M.I., Saez A., Gamón M. and Montoya A.. “Determination of carbaryl, carbofuran and methiocarb in cucumbers and strawberries by monoclonal enzyme immunoassays and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection“, J. Cromatogr. A, 833, p.3,1999.

Adams R.M., Hurd B.H., Lenhart S., and Leary N., “Effects of Global Climate Change on Agriculture: An Interpretative Review”, Climatic Research 11:19-30, 1998.

Alamo M., Casado L., Hernándeza V., Jimé'nez J.J., “Determination of free molecular phenolics and catechins in wine by solid phase extraction on polymeric cartridges and liquid chromatography with diode array detection.”, Journal of Chromatography A, 1049, 97–105, 2004.

Alder L., Greulich K., Kempe G., Vieth B., “Residue analysis of 500 high priority pesticides: better by GC-MS or LC-MS-MS?.” Mass Spectrometry Reviews, 25, 838-865, 2006.

Ambrus A.. "Advances in Pesticide Science" , Eds Geissbuhler, G T Brooks and P C Kearney Pergamon Press, Part 3 p.620, 1979.

Annual Report of the Pesticide Residues Committee, Pesticide Safety Directorate, York, 2000.

Apra C., Sciarra G. and Lunghini L., AnalJ. : Toxicol. 20, p. 559,1996.

Baez M.E., Rodrviguez M., Lastra O., and Contreras P., “Solid Phase Extraction of Organophosphorus, Triazine, and Triazole-Derived Pesticides from Water Samples. A Critical Study.” Department of Inorganic and Analytical Chemistry, University of Chile,1997.

Barwick V.J., Ellison S.L.R., Lacey S.J., Mussell C.R. and Lucking C.L., “Evaluation of a solid phase extraction procedure for the determination of pesticide residues in foodstuffs.” J Sci Food Agric 79: 1190-1196, 1999.

Bernal J.L., Nozal M.J., Jimenez J.J., Rivera J.M., “Matrix effects in the determination of acaricides and fungicides in must by gas chromatography with electron-capture and nitrogenphosphorus detection.” Journal of Chromatography A, 778, 111 – 117, 1997.

Blahova E. and Brandsteterova E., “Approaches in Sample Handling before HPLC Analysis of Complex Matrices, Department of Analytical Chemistry.”, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology,2003.

Blasco C., Font G., Pico Y. “Determination of dithiocarbamates and metabolites in plants by liquid chromatography–mass spectrometry.” Journal of Chromatography A, 1028, 267–276, 2004.

Cabras P., Anioni A., Garau V. L., Pirisi F. M., Farris G. A., Madau G., Emonti G., "Pesticides in Fermentative Processes of Wine." *J. Agric. Food Chem.* , 47: 3854-3857,1999.

Cabras P., Angioni A. "Pesticide Residues in Grapes, Wine, and Their Processing Products." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 48, 2000.

Carbas P., Conte E., "Pesticide residues in grapes and wine in Italy." *Food Additives and Contaminants*, Vol.18, No.10, 880-885, 2001.

Carneiro R.L., Braga J.W.B., Bottoli C.B.G., Poppi R.J., "Application of genetic algorithm for selection of variables for the BLS method applied to determination of pesticides and metabolites in wine." *Analytica Chimica Acta* 595, 51-58, 2007.

Cole, R. B., "Electrospray Ionization Mass Spectrometry." John Wiley & Sons, New York,1997.

Correia M., Delerue-Matos C., Alves A., "Multi-residue methodology for pesticide screening in wines." *Journal of Chromatography A*, 889: 59-67,2000.

Correia M., Delerue-Matos C., Alves A., "Development of a SPME-GC-ECD methodology for selected pesticides in must and wine samples." *Fresenius J Anal Chem*, 369: 647-651, 2001.

D'Archivio A.A, Fanelli M., Mazzeo P., Ruggieri F., "Comparison of different sorbents for multiresidue solid-phase extraction of 16 pesticides from groundwater coupled with high-performance liquid chromatography.", *Talanta* 71, 25–30,2007.

D'Ascenzo G., Gentili ., Marchese S., Marino A. and Perret D., "Multiresidue method for determination of post-emergence herbicides in water by HPLC/ESI/MS in positive ionization mode," *Environm. Sci. Technol.*, 32, 1340-1347,1998.

Dean, J.R., "Extraction Methods for Environmental Analysis.", John Wiley & Sons, New York,1998.

Fernandez M., Picó Y. and Mapes J., "Determination of carbamate residues in fruits and vegetables by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography-mass spectrometry." *J.Chromatogr. A*, 871, p.43, 2000.

Flamini R., Panighel A., "Mass spectrometry in grape and wine chemistry. Part II: The consumer protection." John Wiley & Sons, New York, 2005.

Frenzel T., Sochor H., Speer K. and Uihlein M., *Anal J. : Toxicol*, 24, p. 365, 2004.

Friends of the Earth, Press release 28 February 2001 and Pesticides Residues Committee First Quarterly reports 2001.

Garcia A.J., Mañes J., Font G., Picó Y., "Evaluation of solid-phase extraction and stir-bar sorptive extraction for the determination of fungicide residues at low- $\mu\text{g kg}^{-1}$ levels in grapes by liquid chromatography–mass spectrometry." *Journal of Chromatography A*, 1050 119–127, 2004.

Garcia M.A., Melgar M.J., Fernández M.I., "Multiple Determination of Fungicides in Wine." *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 62:717-722, 1999.

Gaskell S. J., "Electrospray: Principles and practice." *Journal of Mass Spectrometry* 32(7): 677-688, 1997.

Geit S., Gebert S., "Extraction of highly polar organophosphorus pesticides from water." *Acta hydrochim. hydrobiol.*, 34, 464 – 473, 2006.

Hartley, Kidd D. And H., *The agrochemicals handbook*. Nottingham, England : Royal Society of Chemistry, 1983.

Hernandez F., Pozo O.J., Sancho J.V, Bijlsma L., Barreda M., Pitarch M., "Multiresidue liquid chromatography tandem mass spectrometry determination of 52 non gas chromatography-amenable pesticides and metabolites in different food commodities." *Journal of Chromatography A*, 1109 ,242–252, 2006.

Hiemstra M. and de Kok A., "Determination of N-methylcarbamate pesticides in environmental water samples using automated on-line trace enrichment with exchangeable cartridges and high-performance liquid chromatography." *J. Chromatogr.*, 667, 155-166, 1994.

Hoffmann E., "Tandem Mass Spectrometry : a Primer, *Journal of Mass Spectrometry.*", Vol.31, p.130, 1996.

Hogenboom A.C., Hofman M.P., Kok S.J., Niessen W.M.A., Brinkman U.A.T.. "Determination of pesticides in vegetables using large-volume injection column liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry", *J. Chromatogr. A*, 892, p.379, 2000.

IUPAC Report on Pesticides No 13 "Development and Evaluation of Simplified Approaches to Residue Analysis". *Pure and Appl Chem* 53, 1039—1049 ,1981.

Jimenez J.J., Bernal J.L., Nozal M.J., Toriobio L., Arias E., "Analysis of pesticide residues in wine by solid-phase extraction and gas chromatography with electron capture and nitrogen – phosphorus detection." *Journal of Chromatography A*, 919, 147-156, 2001.

Jimenez J.J., Bernal J.L., Nozal M.J., Arias E. and Bernal J., "Determination of impurities in pesticides and their degradation products formed during the wine-making process by solid-phase extraction and gas chromatography with detection by electron impact mass spectrometry. I. Vinclozoline, Procymidone and Fenitrothion." *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 18: 657-663, 2004.

Jimenez J.J., Bernal J.L., Nozal M.J., Bernal J., Toribio L., "Persistence and degradation of metalaxyl, lindane, fenvalerate and deltamethrin during the wine making process.", *Food Chemistry* 104, 216–223, 2007.

Junker-Buchheit A. and Witzenbacher M., "Pesticide monitoring of drinking water with the help of solid-phase extraction and high-performance liquid Chromatography.", *J. Chromatogr. A*, 737, 67-74, 1996.

Kaiser R.E., "Advances in Pesticide Science" Part 3 p.643, Eds F! Geissbuhler, G T Brooks and P C Kearney Pergamon Press, 1979.

Lacassie E., Dreyfuss M.F., Doguet J.L., Vignaud M., Marguet and G.Lachbtre (1999). Liquid chromatography - electrospray mass spectrometry multi-residue determination of pesticides in apples and pears, *J.Cromatogr.A*, 830, p.135.

Lehotay S.J., "Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe (QuEChERS) Approach for Determining Pesticide Residues." In Press *Pesticide Analysis in Methods in Biotechnology*, Eds. J.L. Vidal Martinez and A. Garrido Frenich, Humana Press, USA Nov. 2004.

Liu F., Bischoff G., Pestemer W., Xu W., Kofoet A., "Multi-Residue Analysis of Some Polar Pesticides in Water Samples with SPE and LC-MS-MS.", Department of Applied Chemistry, College of Science, China Agricultural University, 2005.

Loos R., Hanke G. and Eisenreich S.J., "Multi-component analysis of polar water pollutants using sequential solid-phase extraction followed by LC-ESI-MS." Institute for Environment and Sustainability, 2003.

Lopez F.J, Beltran J., Forcada M., Herna'ndez M., "Comparison of simplified methods for pesticide residue analysis Use of large-volume injection in capillary gas chromatography.", *Journal of Chromatography A*, 823, 25-33, 1998.

McEwen, Stephenson F.L. And G.R., "The use and significance of pesticides in the environment." NY: John Wiley and Sons, Inc, 1979.

Miliadis G.E., Liapis K.S. and Malatou P.TH.. "Assesment of the performance of nine Greek laboratories through a proficiency test on the analysis of grapes for the determination of residues of pesticides." *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* Vol. 84, No. 1-3, pp. 193-197.

Miliadis G.E., Tsiropoulos N.G., Aplada-Sarlis P.G., "High-performance liquid chromatographic determination of benzoylurea insecticides residues in grapes and wine using liquid and solid-phase extraction." *Journal of Chromatography A*, 835, 113-120, 1999.

Millan S., Sampedro M.C., Unceta N., Goicolea M.A., Rondriguez E., Barrio R.J., "Coupling solid-phase microextraction and high-performance liquid chromatography for direct and sensitive determination of halogenated fungicides in wine." *Journal of Chromatography A*, 995: 135-142, 2003.

Mitra S., Wiley J. & Sons : "Sample preparation Techniques in Analytical Chemistry", Ed. by, Inc, New York, USA, Chapters 2 and 3, 2002.

Molina-Mayo C., Hern'andez-Borges J., Borges-Miquel T.M., Rodr'iguez-Delgado M.A., "Determination of pesticides in wine using micellar electrokinetic chromatography with UV detection and sample stacking.", *Journal of Chromatography A*, 1150, 348-355, 2007.

Monitoring of Pesticide Residues in Products of Plant Origin in the European Union and Norway-Report 1997.

http://europa.eu.int/comm/food/fs/inspections/fnaoi/reports/annual_eu/fnaoi_rep_norw_1996_en.html.

Morabito R., "Extraction Techniques in Speciation Analysis of Environmental Samples." *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 351(4-5): 378-385, 1995.

Navarro, S., Barba, A., Oliva, J., Navarro G., Pardo, F., "Evolution of residual levels of six pesticides during elaboration of red wines. Effect of wine-making procedures in their disappearance." *J. Agric. Food Chem.*, 47, 264-270, 1999.

Navarro S., Barba A., Navarro G., Vela N., Oliva J., "Multiresidue method for the rapid determination – in grape, must and wine – of fungicides frequently used on vineyards." *Journal of Chromatography A*, 882, 221–229, 2000.

Nozal Ma.J, Bernal J.L. , Jim'enez J.J. , Mart'ın Ma.T, Bernal J., "Determination of azolic fungicides in wine by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization–mass spectrometry." *Journal of Chromatography A*, 176, 90–96, 2005.

NZ Food Safety Authority. Health Canada Food & Drug Regulations Part B, Pesticide MRL Database, 2003.

Official Maximum Residue Limits (MRLs). <http://www.mex.plaguicidas/plagas.htm>, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentacion, 2002.

Okimashi M., Kitagaawa Y., Akutsu K., Obana H. and Tanaka Y., "Rapid Method for the Determination of 180 Pesticide Residues in Foods by Gas Chromatography/Mass Spectrometry and Flame Photometric Detection." *J. Pestic.Sci.*, 30(4), 368-377, 2005.

Oliva J., Barba A., Vela N., Melendreras F., Navarro S., "Multiresidue method for the rapid determination of organophosphorus insecticides in grapes, must and wine." *Journal of Chromatography A*, 882: 213-220, 2000.

Otero R.R., Grande B.C., Ga'ndara J.S., "Multiresidue method for fourteen fungicides in white grapes by liquid–liquid and solid-phase extraction followed by liquid chromatography–diode array detection." *Journal of Chromatography A*, 992, 121–131, 2003.

Pang G.F, Fan C.L., M.Liu Y., Z.Cao Y., Zhang J.J., Fu B.L., Li X.M., Li Z.Y., & Wu Y.P., "Multi-residue method for the determination of 450 pesticide residues in honey, fruit juice and wine by double-cartridge solid-phase extraction/gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry." *Food Additives and Contaminants*, 23(8) : 777-810, 2006.

Pang G.F., Liu Y.M., Fan C.L., Zhang J.J., Cao Y.Z., Li X.M., Li Z.Y., Wu Y.P. and Guo T.T. "Simultaneous determination of 405 pesticide residues in grain by accelerated solvent extraction then gas chromatography-mass spectrometry or liquid chromatography-tandem mass spectrometry." *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2006.

Papadopoulou-Mourkidou E. and Patsias J., "Development of a semiautomated HPLC-DAD system for screening pesticides at trace levels in aquatic systems of the Axios river basin.", *J. Chromatogr. A*, 726, 99-113, 1996.

Pearson M.J., "Pesticide loading to the North Sea: the Red List reductions.", pp.161-172 in Best G. and Ruthven D. (eds), *Pesticides-developments, impacts and controls*, Royal Society of Chemistry, 1995.

Pesticides Standard Limits.

Pico Y., Font G., Ruiz M.J., and Fernandez M., "Control of pesticide residues by liquid chromatography-mass spectrometry to ensure food safety.", *Laboratori de Bromatologia i Toxicologia*, 2005.

Pizzutti I.R., Kok A., Zanella R., Adaime M.B., Hiemstra M., Wickert C., Prestes O.D., "Method validation for the analysis of 169 pesticides in soya grain, without clean up, by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using positive and negative electrospray ionization." *Journal of Chromatography A*, 1142, 123-136, 2007.

Planas C., Puig A., Rivera J., Caixach J., "Analysis of pesticides and metabolites in Spanish surface waters by isotope dilution gas chromatography/mass spectrometry with previous automated solid-phase extraction Estimation of the uncertainty of the analytical results.", *Journal of Chromatography A*, 1131,242-252,2006.

Plimmer R.J., "Dissipation of pesticides in the environment.", pp.79-90 in Schnoor J.L. (ed), *Fate of pesticides and chemicals in the environment*, John Wiley & Sons, New York, USA, 1992.

Pous X., Ruiz M.J., Pico Y. and Font G., "Determination of imidacloprid, metalaxyl, myclobutanil, propham, and thiabendazole in fruits and vegetables by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry.", *Fresenius J. Anal. Chem.*, 371, pp. 182-189, 2001.

Ravelo-Perez L.M., Hernandez-Borges J., Borges-Miquel T.M., Rodriguez-Delgado M.A., "Multiple pesticide analysis in wine by MEKC combined with solid-phase microextraction and sample stacking." *Electrophoresis*, 28, 4072-4081, 2007.

Rodrigues A.M., Ferreira V., Cardoso V.V., Ferreira E., Benoliel M.J., "Determination of several pesticides in water by solid-phase extraction, liquid chromatography and electrospray tandem mass spectrometry." , *Journal of Chromatography A*,2006.

Skoog, D. A., Holler, F. J., Nieman, T. A., *Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης*, Εκδόσεις Κωσταράκης, Αθήνα, 2002.

Slobodnik J., Groenewegen M.G.M., Brouwer E.R., Lingeman H. and Bringman U.A.Th., "Fully automated multi-residue method for trace level monitoring of polar pesticides by liquid chromatography.", *J. Chromatogr.*, 642, 359-370, 1993.

- Slobodnik J., Hoekstra-Oussoren S.J.F., Jager M.A., Honing M., van Baar B.L.M. and Bringman U.A.Th., "On-line solid-phase extraction-liquid chromatography-particle beam mass spectrometry and gas chromatography-mass spectrometry of carbamate pesticides.", *Analyst*, 121, 1327-1334, 1996.
- Snyder, L.R., Kirkland, J.J., Glajch, J.L., "Practical HPLC Method Development." John Wiley & Sons, Inc. 2nd Ed. New York.pp.234-237, 1997.
- Soleas G.J., Yan J., Hom K., Goldberg D.M., "Multiresidue analysis of seventeen pesticides in wine by gas chromatography with mass-selective detection." *Journal of Chromatography A*, 882: 205-212, 2000.
- Soler C., James J., Pic'ó Y., "Capabilities of different liquid chromatography tandem mass spectrometry systems in determining pesticide residues in food. Application to estimate their daily intake.", *Journal of Chromatography A*, 1157, 73–84,2007.
- Stajnbaher D., Zupancic-Kralj L.. "Multirasidue method for determination of 90 pesticides in fresh fruits and vegetables using solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry." *Journal of Chromatography A*, 1015, 185-198,2003.
- Stavropoulos P., Athanasopoulos P.E., Kyriakidis N.B., "Degradation of pyrazophos and methidathion in fortified red and white wine under conditions of light and darkness." *Food Chemistry*, 72: 473-477, 2001.
- Stephanou E.G., "Introduction to Modern Mass Spectrometry." *Environmental Analytical Chemistry Course*, 2004.
- Storm T., Hartig C., Reemtsma T. and Jekel M., "Exact mass measurements on-line with high-performance liquid chromatography on a quadrupole mass spectrometer." *Analytical Chemistry* 73(3): 589-595, 2001.
- Strandberg B., Hites R.A., "Concentration of organochlorine pesticides in wine corks." *Chemosphere*, 44: 729-735, 2001.
- Supelco, Bulletin 910, Guide to solid phase extraction, 1998.
- Taylor M.J., Hunter K., Hunter K.B., Lindsay D., Bouhellec S., "Multi-residue method for rapid screening and confirmation of pesticides in crude extracts of fruits and vegetables using isocratic liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry.", *J.Chromatogr. A*, 982, p.225-236, 2002.
- Teixeira M.J., Aguiar A., Afonso C.M.M., Alves A., Bastos M.M.S.M., "Comparison of pesticides levels in grape skin and in the whole grape by a new liquid chromatographic multiresidue methodology." *Analytica Chimica Acta*, 513: 333-340, 2004.
- The European Union On-line, Official Documents. <http://europa.eu.int>, *European Communities*, 2000.
- The Pesticides (Maximum Residue Levels in Crops, Food and Feeding Stuff) (England and Wales) (Amendment) Regulations, Statutory Instruments, No. 1113, The Stationery Office, April 2001.

Thermo Finnigan Training Institute. TSQ Quantum Course.

Thurman, E.M., Mills, M.S., "Solid-Phase Extraction Principles and Practice." John Wiley & Sons, New York, 1998.

Trajkovska V., Petrovska-Jovanovi S., and Cvetkovski M., "Solid-Phase Extraction and HPLC/DAD for the Determination of Some Pesticides in Wine." ANALYTICAL LETTERS Vol. 36, No. 10, pp. 2291–2302, 2003.

Tran A.T.K., Hynec R.V., Doble P., "Determination of commonly used polar herbicides in agricultural drainage waters in Australia by HPLC." Chemosphere 67, 944–953, 2007.

Trosken E.R., Bittner N., Volkel W., "Quantitation of 13 azole fungicides in wine samples by liquid chromatography–tandem mass spectrometry.", Journal of Chromatography A, 1083, 113–119, 2005.

Urruty L., Montury M., "Influence of Ethanol on Pesticide Extraction in Aqueous Solutions by Solid-Phase Microextraction." J. Agric. Food Chem., 44, 3871-3877, 1996.

Ware G.W., Whitacre D.M., The Pesticide Book, 6th ed., 2004.

WHO, 2nd ed, Residues of Pesticides in Foods and Animal Feeds, Vol.2, Codex Alimentarius Commission, 2000.

Wu J., Tragas C., Lord H., Pawliszyn J. "Analysis of polar pesticides in water and wine samples by automated in-tube solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography–mass spectrometry." Journal of Chromatography A, 976, 357–367, 2002.

Zironi R., Farris G. A., Cabras P., Fatichenti F., "Pesticide residues from vine to wine." Proc. Acc. Ital. Vite Vino, 43, 351-369, 1991.

Ελληνική

Αλμπάνης, Τ., «Ρύπανση και Τεχνολογία Προστασίας Περιβάλλοντος» , Σελ. 84-87, Ιωάννινα 1999.

Δρ. Ροδιτάκης Ν. ,Εντομολόγος Ερευνητής, «Εναλλακτικές λύσεις για την αντιμετώπιση των εντόμων-Μια αναγκαιότητα σε πρώτη προτεραιότητα.», ΕΘΙΑΓΕ-Ινστιτούτο Προστασίας Φυτών Ηρακλείου – Εργαστήριο Εντομολογίας και Γ. Ζωολογίας, Ηράκλειο, Δεκέμβριος 2003

ΕΣΥΔ. Υπουργείο Ανάπτυξης, Εθνικό Σύστημα Διαπίστευσης Α.Ε. Επίσημο πεδίο εφαρμογής της διαπίστευσης του Εργαστηρίου Υπολειμμάτων Γεωργικών Φαρμάκων του Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου, Παράρτημα του Πιστοποιητικού Αρ. 97,2003.

Θαμνίδης Α.-Παπαχρήστου Σ., «Φυτοφάρμακα : Χρήση-συνέπειες. Πρόγραμμα Περιβαλλοντικής Εκπαίδευσης«-Δημοτικό Σχολείο Καρίτσας Πιερίας.

Μαργαρίτη Μαρία. Ανάπτυξη μεθόδου υγρής χρωματογραφίας σε συνδυασμό με διαδοχική φασματομετρία Μαζών για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων σε εκχυλίσματα ντομάτας. Μεταπτυχιακό δίπλωμα ειδίκευσης, Πανεπιστήμιο Κρήτης, 2004.

Μαρούλης Α.Ι., Χατζηαντωνίου-Μαρούλη Κ. , Τσιομλεκτσής Α., Χρηστίδης Σ.. «Χημεία και Καθημερινή Ζωή. Φυτοφάρμακα και Λιπάσματα.Η πράσινη προσέγγιση.» Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Τμήμα Χημείας.

Μπέλλος Χ. Δ. «Συγκέντρωση θρεπτικών στοιχείων- Βαρέων μετάλλων και ραδιοκαιοσίου στο νερό-Ίζημα και υδρόβια φυτά του ποταμού Πηνειού.» Διδακτορική διατριβή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Τμήμα Βιολογίας, τομέας Βοτανικής, σελ.32-34, Θεσσαλονίκη 2008.

Τούντα Δήμητρα, Θρεπτική αξία του κρασιού : Αντιοξειδωτικά και πιθανοί αντιθρεπτικοί παράγοντες, Σητεία 2005.

Web sites

http://Hplc.chem.shu.edu/NEW/HPLC_Book.

<http://www.waters.com>

<http://www.lipidlibrary.co.uk/>

http://ec.europa.eu/food/plant/protection/pesticides/legislation_en.htm

<http://wos.ekt.gr/CIW.cgi>

<http://www.inchem.org/documents/pds/pds/pest3-e.htm>

<http://www.chemblink.com/products>

<http://www.alanwood.net>

<http://3dim-kater.pie.sch.gr/fitofarmaka.htm>

<http://www.alfagro.gr>

<http://www.farmachem.gr>

<http://www.bfr.bund.de/cd/5832>

<http://www.bayercropscience.gr>

<http://www.nax.gr>